

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651048

研究課題名(和文)メダカを用いた放射線モニタリング系の開発

研究課題名(英文)Biological monitoring system for detection of environmental stress.

研究代表者

藤堂 剛 (Todo, Takeshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90163948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：福島原発事故に伴う放射能汚染、海外発展途上国における環境汚染等、野外環境汚染状況を感知し、迅速に対応できる事は、極めて社会的要請の大きい緊急課題である。本研究では、広範囲な地域の汚染状況を、簡便な方法でモニタリングする生物検出系の作成を提案した。野外での飼育に適したメダカを用い、放射線等によりゲノムDNAに損傷が生じた時、損傷精生成に鋭敏に反応する遺伝子に注目し、DNA損傷に対応して蛍光発色するメダカ系統の樹立を試みた。

研究成果の概要(英文)：Detection of the environmental pollution is an emerging issue having strong social demand. In this proposal, we proposed establishment of a biological monitoring system for DNA damaging agents, which include radiation and chemical mutagens. Medaka is a small experimental model fish and very suitable for field experiments. We tried to establish a medaka line, which produces fluorescent light response to DNA damage.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：損傷応答 放射線 化学変異原 メダカ

1. 研究開始当初の背景

環境汚染は、現代社会における重大な社会問題の一つである。福島原発事故に伴う放射能汚染、海外発展途上国における産業廃棄物による汚染等、緊急な対応が迫られている。当然ながら、除染方法の確立が最終的な解決策である。しかしながら、その前にまず求められているのは、広範囲にわたる地域の汚染モニタリングによる、汚染の程度、汚染場所の詳細な特定である。詳細に汚染をモニタリングする事により、初めて、除染の対象地域を特定できるとともに、ヒトへの影響を最小限に停める事が可能になる。そこで、本申請研究では、広範囲な地域の汚染状況をモニタリングできる生物検出系の作成を提案する事とした。

2. 研究の目的

モニタリング系として第一に要求されるのは、その方法が鋭敏かつ簡便である事である。また対象地域の広範さを考えると、安価である事も必須である。本研究の目的は、このような条件に合致したモニタリング系の候補を吟味するとともに、システムの鋭敏化の方向性を探る事にある。

環境汚染モニタリング法としては、機械による直接モニタリングと生物を用いた間接モニタリングが考えうる。機械によるモニタリングは、測定条件に依存せず、客観的数値として汚染レベルが計測できる利点を持つ。しかしながら、各測定対象(汚染要因物質)に特異的な計測機器を用いる必要があり、環境汚染物質全般のモニタリングには適さない。例えば、放射線汚染であってもその放射線の種類により、利用できる機器が異なる。同様な事は、化学変異原の検出においてはより顕著であり、対象物質が特定できない限り検出は不可能である。一方、生物モニタリングは、生物応答を利用するため、測定環境により多少の測定誤差が生じるものの、あらゆる種類の環境汚染を、その生物影響の強さとして包括的に測定できる。しかも、例えば多種の物質による複合汚染の場合、その影響をトータルに判断できる利点を持っている。またこの時重要なのは、生物応答のフィルターを通して行われるので、各々の汚染が実際にどの程度の生物影響を持つのかが判定の指標になる点である。つまり、異なる変異原物質についての実影響を総合的に判定できるわけである。そこで本申請研究では、生物モニタリング系の可能性を探る事とした。

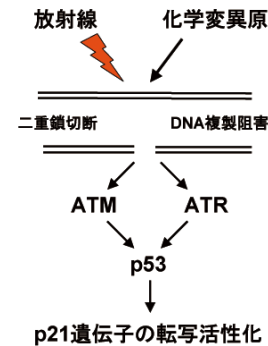
環境汚染の中で水質汚染は、ヒトに限らず、あらゆる生物に直接関わってくる為、極めて重要である。そこで、小型魚を用いた水質汚染モニタリングを目指す事とした。メダカは、野外で生育可能であり、しかも我が国で古くから愛玩動物として飼育されてきた歴史から多くの近交系が存在し、遺伝学を有効に利用できる優れたモデル実験動物である。本計画には最適であると考え、メダカを用い、放

射線等によりゲノム DNA に損傷が生じた時、損傷生成に鋭敏に反応する遺伝子に注目し、DNA 損傷に対応して蛍光発色するメダカ系統の作成を行い、in vivo モニタリングに利用する事を目指した。

3. 研究の方法

野外での飼育に適したメダカを使用し、どこにでも設置できる簡易で、かつ鋭敏な放射線(あるいは化学変異原)の in vivo モニタリング系の樹立を目指す。放射線を感知し、恒常的なレポーター遺伝子(蛍光色素遺伝子)発現のスイッチをオンにできるような遺伝子改変メダカを作製するのが基本原理である。この様なレポーター系で一番問題になるのはバックグラウンドである。予期せずに発生したバックグラウンドをキャンセルできる系を導入する事によりバックグラウンドの排除を行う。また、損傷応答・修復に関わる遺伝子変異体を用いる事により検出感度の鋭敏化を目指す事とした。

放射線や化学物質によりゲノム DNA に損傷が生じると、細胞はこれを認識し様々な損傷応答を誘起する。この時、ATM あるいは ATR 等の蛋白質リン酸化酵素によるシグナル伝達系が活性化される。そのシグナルは p53 蛋白質に集約される。P53 は転写因子活性を持っており、細胞周期制御に重要な役割を果たしている p21 遺伝子の転写を活性化(右図参照)する。この「p21 遺伝子発現の活性化」を放射線や化学物質(DNA 損傷を与える因子)のモニタリングに利用する。



1)「P21 遺伝子の発現制御領域下流に Cre 組換え酵素(recombinase)遺伝子を繋いだコンストラクト」と、2)「この組換え酵素の標的となる loxP で挟んだ転写抑制配列で発現が阻害されている GFP 遺伝子コンストラクト」を共存させる事により、損傷応答を起こした細胞でのみ GFP が発現されるようになる。これが基本原理である。更に、検出系の鋭敏化として、DNA 損傷に対し高感受性の変異個体利用の可能性を検討した。我々はこれまでメダカで逆遺伝学的手法 TILLING(Targetted Induced Lesion In Genome)法を確立し、DNA 損傷応答に関わる遺伝子群の変異体を作成してきた。更に近年、TALEN (Transcription Activator-like Effector Nuclease) や CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)等のゲノム編集技術が開発され変異体の作成が極めて容易になってきた。これらの変異体を利用し、より鋭敏にゲノム損傷を検出できる系の作出を試みる。

類似の系は既にマウスで試みられているが、受精卵操作の容易さ、体表面の半透明さ等、蛍光色素によるマーキング技術に極めて適しているメダカの利点を利用し、より実用的な系が作成が可能であると考えられる。

4. 研究成果

本研究の主要ステップは、(1) 遺伝子発現誘発系コンストラクト作成、(2) TG 個体樹立、(3) 放射線量、化学物質暴露積算量の依存性の確認、(4) 様々な変異体への系導入による感受性のチェック、から成る。

(1) 遺伝子発現誘発系コンストラクト作成：本系は、ドライバーとレポーターの2つのコンストラクトからなる。p21 遺伝子発現制御領域を含む BAC(Bacterial Artificial Chromosome)クローンをメダカゲノムデータベース (<http://utgenome.org/medaka/>) で検索し、NBRP-MEDAKA より導入した。ドライバーコンストラクトとして、p21 遺伝子発現制御領域の下流に Cre 遺伝子を挿入したコンストラクトを作成した。この時作成ベクターには以下の工夫を行った。トランスポゾンベクターの利用：TG (TransGenic) 個体作製時にゲノムへ高効率に遺伝子が挿入されるよう、またタンデムリピートや予期せぬ truncated タイプの挿入が起こらないよう、トランスポゾン piggyBac ベクターを用いた。

遺伝子挿入サイトの発現制御をなるべく受けないように、インスレーターで挟んだ状態でゲノムに遺伝子が挿入できるようなコンストラクトにした。TG 個体作製時に TG 個体を容易に識別できるように、TG 個体の眼に蛍光色素遺伝子が特異的に発現するレポーターを持たせる事とした。このレポーター系は清水厚志博士(慶応大)により作成されたものを分与いただいた。以下にベクターのコンストラクトを示す。



(2) TG 個体樹立：TG 個体としては、上記ドライバーコンストラクト及びレポーターコンストラクトの作成が必要である。前者については現在樹立中であり、後者については既に樹立済みである。このレポーター系では、メダカ b-actin プロモーターの下流に GFP 遺伝子が配置されているが、この時、プロモーターとの間に loxP で挟まれた転写阻止配列が挿入されている為、Cre 発現により loxP で挟まれた配列が切り出されると GFP が発現するレポーター系となっている。この TG 個体は木下政人博士(京都大学)により樹立された。

3) メダカ個体の放射線・化学変異原物質感受性：放射線としてはガンマ線を、また化学変異原物質としてはメダカで発がん性が証明されている DENA (Diethyl-nitrosoamine)

を用い、それらに対する感受性を測定するとともに、発がん性の検定を行った。残念ながら、放射線単独では発がんを観察できなかったが、DENA では 240ppm 1 週間処理により 80-90% の個体に肝臓ガンを確認できた。(4) 様々な変異体への系導入：TILLING 法及び TALEN, CRISPR 等のゲノム編集技術により、放射線や化学変異原物質に高感受性の変異体の作成を行った。標的とする遺伝子としては、損傷 DNA の感知、および、そのシグナル伝達に関わる遺伝子、損傷シグナルの transducer として働く遺伝子、損傷応答の最終段階で、修復や DNA 損傷のバイパスに関与する遺伝子、の3区分に属する重要な機能を果たすものとして、ATM, DNA-PKcs, p53, Rev1, Rev3, Rev7 を選出した。ATM は DNA 二重鎖損傷に応答して最初に活性化されるリン酸化酵素遺伝子で、放射線応答において最も重要な役割を果たしている。DNA 二重鎖損傷修復は、組換え修復及び非同相末端結合修復により修復されるが、DNA-PKcs は後者に重要な役割を果たすリン酸化酵素である。DNA 損傷が生じると細胞は、細胞周期を停止し、修復を行うとともに、場合によってはアポトーシスを誘導し、損傷を持った細胞を除去する。この細胞運命決定に重要な役割を果たしているのが p53 遺伝子である。DNA に損傷が生じると、DNA 合成が損傷部位で阻害される。DNA 複製阻害は、その後の細胞分裂を阻害するのみではなく、ゲノム上にある程度の長さの短鎖部位を生じさせる。この短鎖部位は、その後二重鎖切断を引き起こし、大きなゲノム再構成の原因となる。この時、基質となる DNA 鎖に損傷が存在しても、それを乗り越えて DNA 合成を行える DNA 複製酵素が知られている。この様な DNA 複製酵素の中で、Rev1, Rev3, Rev7 遺伝子は、その機能がなくなると細胞は放射線感受性になる事から、放射線を含む幅広い変異原に対する抵抗性に関与していると考えられる。以上、ATM, DNA-PKcs, p53, Rev1, Rev3, Rev7 遺伝子の変異体を網羅的に作成した。これ等の変異体は、放射線・化学変異原物質に高感受性となる事から、それらを検出する鋭敏なモニタリング系となる事が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

Nakajima H, Fujiwara M, Tanihata I, Saito T, Matsuda N, Todo T. Imaging plant leaves to determine changes in radioactive contamination status in Fukushima, Japan.

Health Phys. 2014 May;106(5):565-70. doi: 10.1097/HP.000000000000020.

Otozai S, Ishikawa-Fujiwara T, Oda, S, Kamei Y, Ryo H, Sato A, Nomura T, Mitani H, Tsujimura T, Inohara H, and Todo T, p53-Dependent Suppression of Genome Instability in Germ Cells.

Mutat Res. (2014) 760:24-32
doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.12.004

Hashimoto K, Todo T, Mitotic slippage underlies the relationship between p53 dysfunction and the induction of large micronuclei by colcemid.

Mutagenesis. (2013) 28(4) 457-64
doi: 10.1093/mutage/get021

Yasuda T, Oda S, Li Z, Kimori Y, Kamei Y, Ishikawa T, Todo T, Mitani H. Gamma-ray irradiation promotes premature meiosis of spontaneously differentiating testis-ova in the testis of p53-deficient medaka (*Oryzias latipes*).

Cell Death Dis. 2012;3:e395.
doi: 10.1038/cddis.2012.133.

〔学会発表〕(計18件)

Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Kumi Nakamura, Yoshihiro Fujikawa, Takeshi Todo*: Targeted Inactivation of DNA photolyase family genes using CRISPR system. The 6th Asia and Oceania Conference on Photobiology, November 11, 2013, Sydney (Australia)(* Invited Speaker)

Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Kumi Nakamura, Yoshihiro Fujikawa, Takeshi Todo : Targeted Inactivation of Rev1 gene The 6th Asia and Oceania Conference on Photobiology, November 11, 2013, Sydney (Australia)

中島裕夫、本行忠志、花本敦、福角隆仁、武本憲彦、岡幸子、藤堂剛：福島シミュレーション実験としての137Csのマウス多世代低線量率内部被曝による子孫での生理的影響、日本環境変異原学会第42回大会、2013年11月29日(岡山)
藤川 芳宏、藤原(石川) 智子、中村 公美、佐久間 哲史2)、山本 卓、藤堂剛：ゲノム編集技術(TALEN)を用いたメダカにおけるTLSポリメラーゼ変異体の網羅的作製、日本放射線影響学会第56回大会、2013年10月20日(青森)

Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Yoshihiro Fujikawa, Kumi Nakamura, Takeshi Todo Genome editing in medaka: targeted inactivation of DNA photolyase family genes using CRISPR system、第19回小型魚類研究会、2013年9月20日(仙台)

藤川 芳宏、藤原(石川) 智子、中村 公美、佐久間 哲史2)、山本 卓、藤堂

剛：人工ヌクレアーゼに夜ゼブラフィッシュ培養細胞の遺伝子変異細胞の作成、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日(福岡)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/radbio/www/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤堂 剛 (Takeshi Todo)

大阪大学大学院・医学系研究科・遺伝医学講座・放射線基礎医学教室・教授

研究者番号：90163948