

メダカ逆遺伝学的手法を基盤とした個体・組織レベルでの 損傷応答解析系の確立

Screening for point mutations in medaka with TILLING

藤堂 剛 (TODO TAKESHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要

本研究では、メダカをにおいて1) 逆遺伝学的手法を確立し、そこで得られた変異個体をベースに、別途確立する2) 組織特異的遺伝子発現系により、組織間・異なるタイプの細胞間での遺伝子機能の違い、その最終生物作用の違いを解析する。この基本戦略のもとに、上記2手法を確立を目指すと同時に、モデルケースとして、「DNA 損傷に対する生物応答」を「突然変異生成」を指標に解析する研究を行う。

研究分野：放射線分子遺伝学

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：メダカ、逆遺伝学、突然変異生成

1. 研究開始当初の背景

我々は本研究において、モデル生物としてメダカを用い、組織レベルでの遺伝子機能解析の方法論の確立と技術開発を目指している。マウスは個体レベルでの解析が可能な代表的モデル生物である。哺乳類でありヒトに極めて近く、遺伝子ノックアウトの手法が確立しているなど実験モデル生物として数多くの利点を持っている。しかしながら、受精卵の発生は全て胎内で進むため胚操作が極めて限られており、また多数の個体を扱うにはかなりの手間と費用を要する等の問題点も存在する。メダカは安価で容易に多数個体を飼育できる。また、卵として体外で胚発生が進むことから、胚操作が極めて容易である。これらの特徴を活かすとともに、モデル生物としての欠点を克服する事により、メダカをマウスを補完できるモデル生物として確立する事を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 逆遺伝学的手法、(2) 組織特異的遺伝子発現系の2技法の確立を目指す。前者は、メダカのモデル生物としての欠点を克服するものであり、後者は長所により効率よい利用をねらったものである。

(1) 逆遺伝学的手法の確立：メダカのモデル生物としての最大の欠点は遺伝子ノックアウトが不可能な事である。ゲノム情報が基盤となるポストゲノム研究において、実験モデル動物としての決定的な欠点となる。そこで我々は TILLING (Targetted Induced

Lesions In Genome) と呼ばれる方法によりメダカにおける逆遺伝学的手法の開発を行い、任意の目的遺伝子をノックアウトできる系の確立を目指した。

(2) 組織特異的遺伝子発現系の確立：メダカの胚発生は透明な卵の中ですすむため、それらの過程を外から観察する事が可能である。この特徴をフルに利用したのが赤外レーザー遺伝子発現制御系である。赤外レーザー照射のヒートショックにより、ヒートショックプロモーターの下流につないだ遺伝子の発現を誘導する。これにより目的の標的細胞・組織で特異的に遺伝子発現のオン・オフが可能になる。

3. 研究の方法

(1) 逆遺伝学的手法の確立：TILLING 法は以下の一連のプロトコールからなる。化学突然変異原 (ENU) で処理した雄個体から、多数の F1 雄個体樹立し、それらの精子とゲノム DNA をセットで保存しライブラリー化する。このライブラリーのゲノム DNA を基質に、標的とする遺伝子のエクソン内に存在する変異を検出する。変異が同定できれば、セットで保存している凍結精子を起こし、*in vitro* 受精により変異個体を得る。我々は、5700 の F1 個体から成る TILLING ライブラリーを作製した。TILLING 法での変異スクリーニングにおいては、ハイスループット化が要求される。また同時に、低コスト化も必須条件である。この2点を満たす方法として、HRM 法 (High Resolution Melting : 融解温

度曲線法)の有用性を検証し、スクリーニング法として確立する。

(2) 組織特異的遺伝子発現系の確立：赤外レーザー照射法を確立するとともに、メダカへの適用をはかる。実際には、効率よいヒートショックプロモーターの開発、iCRE/loxP系の開発を行う。

4. これまでの成果

(1) 逆遺伝学的手法の確立：融解温度曲線法が、TILLING ライブラリースクリーニングには極めて有効な方法である事が明らかとなった。更に改良を加える事により、検出感度を落とす事無く低コスト化を実現した。最終的に1エキソンのスクリーニングが約16万円で可能となった。融解温度曲線法により、現在までに、ATM、ATR、Rb、p53、Rev1、Exo1、Msh2、pCry、Ogg1の9遺伝子について、10個のナンセンス変異、2個のスプライシングサイト変異、112個のミスセンス変異を同定している。

得られたナンセンス変異体は、TILLING ライブラリー作成段階で導入された予期せぬ変異を除去する為に、野生株 HdrR に3-5代バッククロスした後、変異ホモ個体を樹立し、表現型の観察を行った。ナンセンス変異の多くは、遺伝的変異を持つ患者あるいはノックアウトマウスの表現型と矛盾する事は無い。しかしながら、詳細にはメダカ特有の表現型も観られる。例えば、ATM 遺伝子ノックアウトマウスは雄雌ともに完全な不妊になるが、メダカ変異体は産卵可能な雌、あるいは受精率は悪いものの受精能を持つ雄も含む。また、組織像からは、哺乳動物と異なるチェックポイントが機能している事が示唆されている。

本研究で樹立した、融解温度曲線法による TILLING ライブラリースクリーニングはメダカを用いたあらゆる研究分野にとり、極めて有用である。そこで、国内外18の研究グループとの共同研究により、様々な遺伝子のメダカ変異体スクリーニングを行っている。これらの共同研究により27遺伝子についてスクリーニングを行い、現在までに9個のナンセンス変異、170個のミスセンス変異を得ている。今後共同研究を広げる事により、メダカコミュニティへ更に貢献できると考えている。

(2) 組織特異的遺伝子発現系の確立：顕微鏡下での赤外レーザーによる1細胞レベルでの遺伝子発現誘導システムが、本研究班の研究分担者である弓場・亀井により開発された。本研究班では、本法をメダカに適応すべくヒートショックプロモーターの開発を研究分担者である三谷、弓場とともにを行い、Hsp70 遺伝子上流領域、hsp エレメントが複数回リピートした人工プロモーターの有効性が確認できた。更に、ヒートショックプロモータ

ーの「もれ」を防ぎ、バックグラウンドを低減する為の iCRE の開発を行っている。

5. 今後の計画

本研究のこれまでの成果により、当初目指した1) 逆遺伝学的手法の確立、2) 組織特異的遺伝子発現系の確立の2法は基本的に確立できた。しかしながら、より効率よく遺伝子機能解析を行う為には、Transgenic 個体作製における遺伝子導入法に更なる工夫が必要であると考えている。正常な遺伝子発現を個体で再現する為には、1コピーの導入が必須である。トランスポゾンベクターの利用により、遺伝子導入法の改良を行いたいと考えている。トランスポゾンベクターは極めて高率に1コピー遺伝子導入を可能にし、小型魚の利点を更に有効利用する強力な手段となる。場合によっては、Transgenic 個体を作製する事無く、遺伝子導入したその個体の体細胞で解析を行う事により、詳細なキメラ解析が可能となるわけである。本研究では、損傷応答を、突然変異生成に着目して、組織レベルで、単一細胞において解析する事を目指しているが、本技法により飛躍的進展が期待できると考えている。

6. これまでの発表論文等

Kamei Y, Suzuki M, Watanabe K, Fujimori K, Kawasaki T, Deguchi T, Yoneda Y, Todo T, Takagi S, Funatsu T, Yuba S. Infrared laser-mediated gene induction in targeted single cells in vivo. Nat Methods. 2009 Jan;6(1):79-81.
Deguchi T, Itoh M, Urawa H, Matsumoto T, Nakayama S, Kawasaki T, Kitano T, Oda S, Mitani H, Takahashi T, Todo T, Sato J, Okada K, Hatta K, Yuba S, Kamei Y. Infrared laser-mediated local gene induction in medaka, zebrafish and Arabidopsis thaliana. Dev Growth Differ. 2009 Oct 15. Epub
Kamei Y, Ito J, Oda S, Masui M, Kim JH, Ishikawa T, Yuba S, Kinoshita M, Mitani H, Todo T. Development of a convenient in vitro fertilization method using interspecific hybrids between Oryzias latipes and Oryzias curvinotus. Dev Growth Differ. (2007) 49(9):721-30.

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/radbio/www/index-jp.html> に基盤研究(S)サイトを設置し、研究成果の公開を行っている。