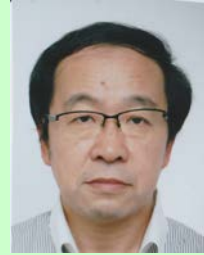


個体内における電離放射線誘発突然変異成立過程の解明

Visualization of radiation induced mutagenesis *in vivo*

三谷 啓志 (MITANI HIROSHI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授



研究の概要

放射線の生物影響を理解するには、分子から細胞レベルの知見ばかりではなく、生体内の組織応答を知ることが必要である。本研究では、遺伝学的手法が利用可能なモデル生物であるマウスとメダカを用いて急性応答としての細胞死、晩発性影響としての突然変異の挙動を解析する新たな方法を開発して、放射線応答を個体レベルで解明することを目指す。

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：①放射線 ②突然変異 ③メダカ ④マウス ⑤細胞死

1. 研究開始当初の背景

これまでの放射線の人体影響研究では、分子から細胞レベルの解析を中心として、放射線にたいする生体防護システムとして、① DNA二本鎖切断や塩基損傷に対するDNA修復機構 ②修復を安全に行うための細胞周期チェックポイント制御機構 ③損傷をもつ細胞を安全に排除するためのアポトーシス機構がネットワーク制御により協調して働いている。しかし個体内での個々の細胞がこれらの分子ネットワークを介して生と死の狭間をどう選択し、個体としての生存を最適化している分子の機能解析は長く未着手の領域であった。これまでの放射線応答研究の分子生物学的知見だけで個体の中の生細胞の挙動を解明する限界を克服する手法が必要となった。

2. 研究の目的

動物の消化器や造血組織などの活発な細胞再生系では、幹細胞→分化途中の分裂細胞→非分裂機能細胞→老化細胞は、それぞれ全く異なる細胞周期制御と代謝能を有して、そのニッチの微小環境も大きく異なっている。さらには、配偶子から初期胚→後期胚→幼体→成体→老体のライフサイクルでは個体レベルのホメオスタシスが激変する。その全容を理解するために個体を用いた研究で分子レベルの現象を定量的イメージングで捉えることのできる方法の確立を目指す。

3. 研究の方法

1) 放射線誘発突然変異細胞を可視化測定す

るモデルマウス/メダカの作製 (分担 野田朝男 三谷 啓志 藤原 (石川) 智子)

① 前進性の突然変異(forward mutation)が生じると細胞が光る系と、② 復帰型の突然変異(reversion)が生じると細胞が光る系を作製するための2種のベクターを開発して、マウスとメダカに遺伝子導入し、培養細胞と個体での突然変異を検出する。

2) 放射線応答を可視化し、測定するメダカモデルの作製 (分担 三谷 啓志)

放射線による転写制御やDNA修復蛋白質の挙動を蛍光蛋白質により個体内でモニターするベクターを開発してメダカに導入し組織間で応答を比較する。

3) メダカ突然変異体組織細胞の放射線応答性解析 (分担 三谷 啓志、藤原 (石川) 智子)

p53等の放射線が誘発するDNA損傷の修復や回避に関連する遺伝子の突然変異体メダカを用いて放射線の組織応答(増殖と細胞死)を異なるストレス環境下で解析する。

4) 放射線応答のモデル組織としてのメダカ咽頭歯 (分担 高野 吉郎)

細胞増殖とターンオーバーが極めて盛んな組織であるメダカの咽頭歯を対象にこれまで報告のない放射線の増殖分化影響を組織レベルで観察する。

4. これまでの成果

マウスX染色体上のHPRT遺伝子を選定した突然変異(reversion)が生じると細胞が

光る系を作製した。培養細胞においては、フローサイトメーターを用いることにより、突然変異細胞を生きたまま迅速に計測できることとなり、低線量被曝の遺伝的影響をこれまでになく詳細に測定することが可能となった (Noda et al. *Mutat Res.*2011)。このシステムにより、培養細胞レベルでの放射線被曝影響のリスク評価と、遺伝影響 (遺伝子突然変異) を修飾する薬剤のスクリーニングが可能になった。HPRTdupGFP ノックインマウスにおいては、HPRT 遺伝子座における復帰突然変異により体細胞および生殖細胞が生きたまま緑色に光らせることに成功した。全身の組織細胞について、組織構築を壊すことなく、*in situ* にて突然変異を検出し、測定することが可能となった。X 線(3Gy)照射し、3ヶ月後にまず代表的な組織として、肝臓、膵臓、小腸、血液リンパ球、精原細胞の突然変異頻度を測定した。(野田分担)

レポーターコンストラクトを導入した細胞内でエンドヌクレアーゼ I-SceI による人為的な DSB を起こし、その修復経路を蛍光タンパク質の発現によって検出する DNA 修復実験系がメダカ細胞でも哺乳類と同様に修復能を検出できることを確認した。NBS1 と 53BP1 と GFP との融合蛋白質を発現させるコンストラクトを作製し、DSB 後の蛍光の挙動を調べるため安定発現培養細胞株を作製した。放射線により NBS1 foci 数、53BP1 foci 数を定量し、さらに損傷直後の NBS1、53BP1 の損傷部位への集積量を京都大学放射線生物研究センターのマイクロビーム照射装置を用いて解析可能であることを確かめた。

p53 遺伝子は、細胞の恒常性の維持やアポトーシス、DNA 修復、細胞周期制御といった重要な機能を有する。ナンセンス変異を有する p53 遺伝子をメダカ近交系統 HdrR に 5 代以上交配導入した系統を樹立した。これは、発生中の放射線誘発中脳アポトーシスに不全がみられた。p53 遺伝子は哺乳類において、精子形成過程での細胞死に関わっていることが報告されている。p53(-/-)メダカ精巣組織内では、精原幹細胞が位置する場所に、大きな核と核小体が鮮明な細胞が存在していた。γ線照射を行うと、これらの細胞数が一過的に急激に増加する。これら細胞は、卵母細胞に特異的に発現する遺伝子 42Sp50 を発現していた。p53 の機能欠損が生殖細胞分化の異常を顕在化させるという報告は哺乳類でもあるが、魚類では放射線が雄性生殖細胞の性転換を増加させ、p53 依存性、非依存性の 2 種類のアポトーシス経路で排除されるという報告

はこれまで見当たらず、p53 遺伝子機能の新しい知見となった。(三谷, 藤原 (石川) 分担)

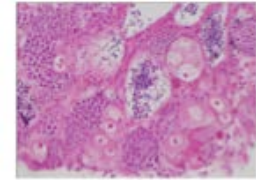


図1 放射線照射7日後 p53(-/-)精巣組織像

5Gy 照射では歯胚にアポトーシスは誘導されなかった。しかしながら照射後 1 日で咽頭歯の数がほぼ半数に減少しており、残存する歯の配列も大幅に乱れていた。予想に反して精巣や胚の中脳と異なり p53(-/-)成魚でも同様な放射線影響が認められ、歯の脱落の原因としてはγ線照射により咽頭域に p53 非依存的な急激な炎症性の組織破壊が生じた可能性が挙げられる。(高野分担)

5. 今後の計画

- ①突然変異の可視化メダカ系統の作製の継続
- ②突然変異の可視化マウス系統の組織における突然変異細胞出現率の定量法の開発
- ③新規放射線応答遺伝子のスクリーニング
- ④放射線応答をモニターするメダカ系統の作製と応答定量化方法の開発
- ⑤DSB 修復に関連する新規突然変異系統の作製と組織放射線応答の p53 系統との比較

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
Yasuda, T., Oda, S., Yasuda, H., Hibi, Y., Anzai, K. and Mitani, H. (2011). "Neurocytotoxic effects of iron-ions on the developing brain measured in vivo using medaka (*Oryzias latipes*), a vertebrate model." *Int J Radiat Biol* 87(9): 915-22.

Noda, A., Hirai, Y., Kodama, Y., Kretzschmar, W. W., Hamasaki, K., Kusunoki, Y., Mitani, H., Cullings, H. M. and Nakamura, N. (2011). "Easy detection of GFP-positive mutants following forward mutations at specific gene locus in cultured human cells." *Mutat Res.* 721(1):101-107.

Atukorala, A.D.S., Inohaya, K., Baba, O., Tabata, M.J., Ratnayake, R.A.R.K., Abduweli, D., Kasugai, S., Hiroshi Mitani, and Yoshiro Takano. "Scale- and tooth phenotypes in medaka with mutated ectodysplasin-A receptor." *Arch Histol Cytol* 73(3): 139-148, 2010/2011

Yasuda T, Oda S, Ishikawa Y, Watanabe-Asaka T, Hidaka M, Yasuda H, Anzai K, Mitani H. (2009). "Live imaging of radiation-induced apoptosis by yolk injection of acridine orange in the optic tectum." *Journal of Radiation Research* 50:487-494.

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/K-medaka/TOP.html>