

放射線照射による高効率トランスジェニックメダカ作製法の開発

指導教官 三谷啓志 教授

2006年3月 学生証番号 46540

先端生命科学専攻

動物生殖システム分野 戸塚 慶一郎

研究目的

本研究では遺伝子導入を受ける動物としてメダカに着目し、効率の良いトランスジェニックメダカ作製系を目指し技術開発を行った。通常、細胞内に注入された DNA はそのごく一部分が核内に移動し、その中の一部が遺伝子組み換えを起こし、染色体 DNA に取り込まれ、ホストゲノムの一部となることが知られている。そこで、マイクロインジェクション法に組み込み効率を上げる技術を組み合わせることでトランスジェニック作製の効率化を試みた。そのための手段として *I-SceI* meganuclease を用い、環状プラスミドを直鎖化させる方法、および放射線照射をすることでゲノムの DNA 二本鎖切断を誘発させる方法を組み合わせることによって、組み込み効率を向上させることを試みた。また本研究室で作製された放射線高感受性変異体 RIC 系統に遺伝子導入を行うことで効率が上がるかどうかを検討した。メダカは近年の大規模なゲノム解析により遺伝情報の蓄積がめざましく、体外受精し大量の受精卵が得られ、胚の発生が早く、世代期間が約 3 ヶ月と短いことから実験動物として有用である。さらに、メダカの胚や稚魚の体内は透明であり、観察が容易なため、生体现象を可視化するためのモデル生物としても最適である。GFP などの蛍光タンパク質を組織特異的に発現させたり、機能タンパク質と融合させたトランスジェニックメダカを作製することにより個体レベルでの生体機能の解明に利用することができる。こうした個体レベルでの研究に必要なトランスジェニック動物を高効率で作製する技術の開発を研究目標とした。

方法

インジェクションに供するプラスミドにはメダカ β -actin-promoter に EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) とミトコンドリア移行シグナル(ヒトシトクロム C 酸化酵素サブユニット由来)を連結し、それを二つの *I-SceI* サイトではさんだ *I-SceI*EYFP-Mito ベクターを作製した。

DNA と *I-SceI* meganuclease を受精卵の一細胞期に同時にマイクロインジェクションを行い、各発生段階、原形質盤形成期(ステージ 2)、4 細胞期(ステージ 4)、初期桑実胚期(ステージ 8)、後期胞胚期(ステージ 12)に 線を 1Gy 照射した。マイクロインジェクション後 6 日目における胚体の蛍光強度を胚体全体で蛍光が発現している強発現(A型)、発現している細胞の分別が可能で胚体の一部分だけで蛍光を発現している弱発現(B型)、蛍光を発現している細胞が確認できないC型の3つに分類し DNA の組み込み効率を検討した。

結果

放射線と *I-SceI* meganuclease を組み合わせた条件によって遺伝子導入を行った 6 日胚における蛍光発現を観察した結果、放射線を照射した場合、照射しない場合と比べて蛍光発現する胚体の割合が上昇することが確認された (図 1)。この結果から *I-SceI* meganuclease と放射線照射を組み合わせることで、遺伝子導入効率が増加し、さらに放射線を照射するステージによってその効率が変化することが確認された。特に発生段階の初期ステージ (ステージ 2、ステージ 4) において効率が上がることを示唆された。また RIC 系統は DNA 二本鎖切断修復機構に異常があることが示唆されており、マイクロインジェクションと放射線照射を併用することで DNA の組み込み効率が上がることを期待したが、孵化時において蛍光を発現する胚の割合は CAB 系統と変わらなかった。また RIC 系統は CAB 系統に比べて低い孵化率を示した。

現在 A 型の発現を示した 4 個体が産卵可能な大きさに成長し、4 個体全てにおいて次世代 (F1) に蛍光発現する胚が確認されている。この結果から強い蛍光発現を示した A 型は DNA の組み込み効率がよく、トランスジェニックメダカファウンダー個体になることが示された。

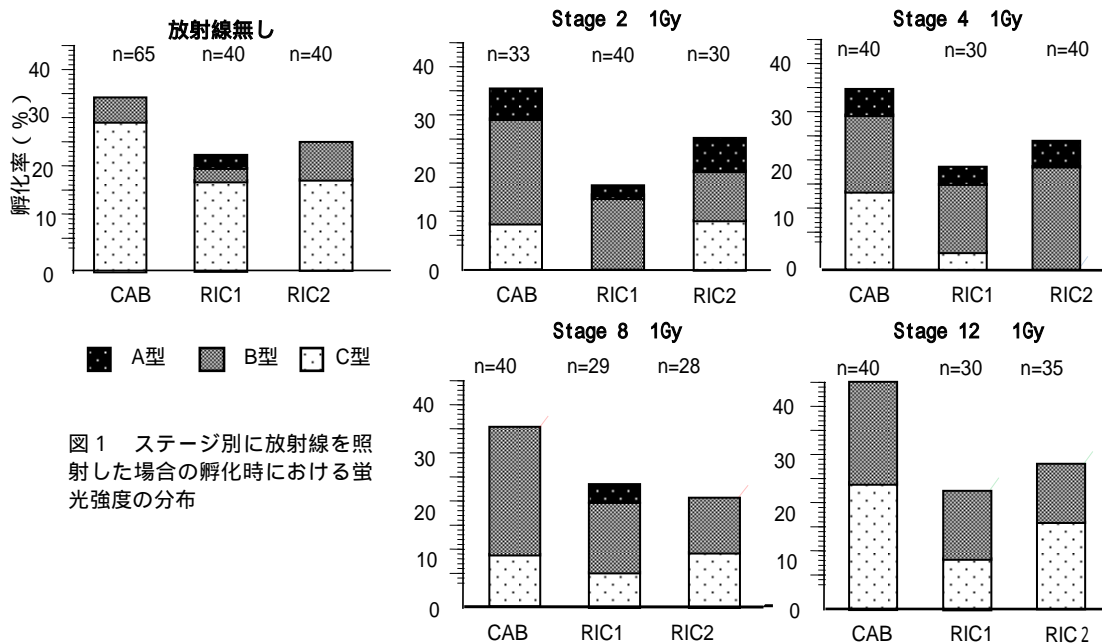


図 1 ステージ別に放射線を照射した場合の孵化時における蛍光強度の分布

考察

放射線が DNA の組み込み効率を上げる直接的な原因になるのかどうかを調べるために、リポフェクション法による培養細胞の遺伝子組み込み効率をみたが、培養細胞においては効率に差がみられなかった。

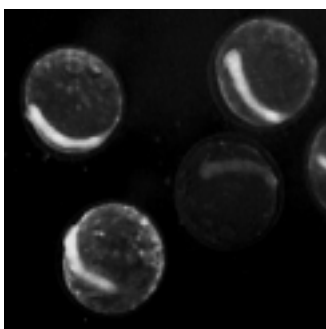


図 2 作製した EYFP-Mito トランスジェニックメダカ (F1)

培養細胞では長い G_1 期を持つのに対して、メダカ胚の初期段階では G 期が無くチェックポイント機構が働かないため、放射線によって生じた損傷は相同組み換え修復機構によって修復される可能性が高い。本研究の結果より放射線によってゲノムに二本鎖切断を誘発させることで、相同組み換えによる修復機構が働き、その結果外来プラスミドの組み込み効率が上がると考えられた。