

OGG1 遺伝子ノックアウトメダカの作製と DNA 損傷応答可視化系の構築

先端生命科学専攻 動物生殖システム分野 47-086317 垣本史喬

2010年3月修了 指導教員：三谷啓志 教授

キーワード：medaka, ogg1, knockout, 8-oxoguanine, cell-cycle, p21 (WAF1/Cip1)

【序論】

酸素は生体にとって不可欠であるが、その生体内の正常な活動により活性酸素が生じる。活性酸素は反応性に富み、様々な生体内物質が損傷を受けるが、遺伝情報を担う DNA やその前駆体ヌクレオチドの酸化はゲノム損傷を引き起こし、突然変異や細胞死を生じて、発癌や変性疾患の原因となるといわれる。また、ゲノムの酸化損傷は加齢と共に蓄積することが知られており、生体の老化・寿命機構に関与するといわれる。DNA の塩基の中で最も酸化されやすいグアニンは、酸化により 8-oxoG となり、8-oxoG はシトシンに加えてアデニンと対合できるために G:C から T:A への塩基変異を引き起こす。生体内に多様に存在する DNA の酸化損傷の中で 8-oxoG が最も豊富に存在しており、酸化的 DNA 損傷のマーカーとして知られている。生体内にはこのような DNA の酸化損傷を修復する機構が、その損傷の種類に応じて数多く存在している。哺乳類では OGG1 (8-oxoG DNA glycosylase-1) が DNA においてシトシンと塩基対を形成した 8-oxoG を除去する働きがあることが知られている。

細胞内において DNA 損傷が生じると、細胞は増殖を停止し、DNA の修復を行う。DNA の修復が困難である場合にはアポトーシス機構を誘導して自ら細胞死を引き起こす。これらの機構は、DNA が損傷したまま細胞分裂を行うことによって生じる突然変異や異常な機能をもった細胞の増殖を防ぎ、細胞と組織の恒常性を保っている。細胞が増殖するか、増殖停止するか、分化するか、アポトーシスするかなどといった細胞の運命決定は細胞周期制御と密接に関わっており、細胞周期制御はサイクリン依存的リン酸化酵素 (CDK) の活性化や不活性化の切り替えによって行われている。その切り替えに重要な CDK 阻害因子として、p21 は様々な CDK を阻害し、主に G1 期から S 期への移行の制御に関与している。p21 は腫瘍抑制遺伝子 p53 の転写標的として知られ、DNA 損傷への応答において誘導される。また、p21 の誘導には p53 依存的と非依存的な機構が存在し、細胞周期を停止するだけでなく、DNA 複製と修復、細胞分化、老化やアポトーシスなど多くの細胞内過程に関与している。

生体内での OGG1 や p21 を含む酸化的 DNA 修復と細胞周期制御のネットワーク機構については不明である。そこで本研究ではまず、生体内において 8-oxoG が修復されないことが p21 遺伝子発現や細胞のアポトーシスにどのような影響を及ぼすかを解析するために、OGG1 遺伝子ノックアウトメダカを作製することとした。さらに、DNA 損傷が誘導する p21 遺伝子発現応答を生体内において経時的に解析するために、メダカ生体内において p21 遺伝子発現を蛍光タンパク質により可視化する系の構築を行う。本研究ではこれら OGG1 遺伝子ノックアウトメダカと p21 遺伝子発現を可視化したトランスジェニックメダカの解析系を組み合わせることにより、これまで困難であった生体内での酸化ストレス応答の同一個体における経時的、個体全身的な解析系の構築を目指している。

【結果・考察】

1. OGG1 遺伝子ノックアウトメダカの作製

まず、メダカ組織から抽出した RNA 試料を用いて RT-PCR、3'-RACE を行い、メダカ OGG1 遺伝子転写産物を同定した (図 1)。次に、メダカにおける大規模な ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) ミュータジェネシス実験により作製されたメダカ変異体 DNA ライブラリーの中から、メダカ OGG1 の遺伝子領域

に偶然にナンセンス変異を生じている個体のスクリーニングを行った。その過程は図 2 に示すように、OGG1 エキソン領域で PCR を行い、その融解温度曲線を解析することによって変異の検出を行った。エキソン2のスクリーニングにおいてはナンセンス変異が得られなかったため、エキソン3においても同様に実験を行い、約 6000 サンプルの中からナンセンス変異を生じている個体の検出に成功した。スクリーニングによりみつかったこの変異個体の凍結精子を用いて人工授精を行い、野生型系統との交配を重ね、OGG1 ホモ変異体メダカの作製を行った。これまでに、通常の飼育条件下において、OGG1 ホモ変異体メダカに発生過程などにおいて異常はみられていない。そこで、得られた OGG1 ホモ変異体の後期胚において、アクリジンオレンジ染色法による γ 線誘導のアポトーシス解析を行った。しかしながら、野生型と同様にアポトーシスが誘導され、顕著な違いは見られなかった。 γ 線によって 8-oxoG 損傷は生じるが、それ以外の損傷も多く生じるため適切な酸化ストレス下において 8-oxoG を優先的に生じさせて OGG1 変異体の解析を行う必要がある。

2. メダカにおける p21 遺伝子発現の可視化

メダカにおいて DNA 損傷が誘導する p21 遺伝子発現を生体内で可視化するために、メダカ p21 遺伝子プロモーター領域の制御下において蛍光タンパク質 (Venus) を発現するプラスミド DNA を作製した。それを野生型近交系メダカ Hd-rR 系統由来の培養細胞 (Hd-rRe3) に遺伝子導入して p21p-Venus 細胞を樹立したところ、 γ 線照射によって誘導される p21 遺伝子転写発現 (図 3) と Venus 遺伝子転写発現 (図 4) が同様の变化を示した。このことから、今回用いた p21 プロモーター領域は γ 線照射による DNA 損傷応答において機能しており、メダカ生体内においても DNA 損傷が誘導する p21 遺伝子発現を Venus 遺伝子発現によって可視化できると考えられる。

【今後の展望】

今後、作製した OGG1 ホモ変異体を用いて適切な酸化ストレス下において生体内で 8-oxoG を優先的に発生させて、そのアポトーシス誘導や p21 遺伝子発現変化を解析することにより、酸化的 DNA 損傷と細胞周期制御の関わりについて解明していく。また、p21 遺伝子発現の可視化を行い、生体内における DNA 損傷応答をリアルタイムに解析できる系の構築を目指す。

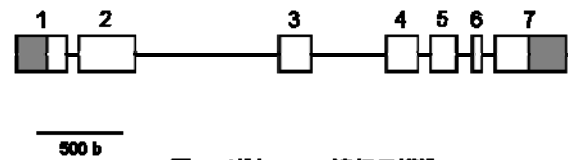


図1 メダカOGG1遺伝子構造

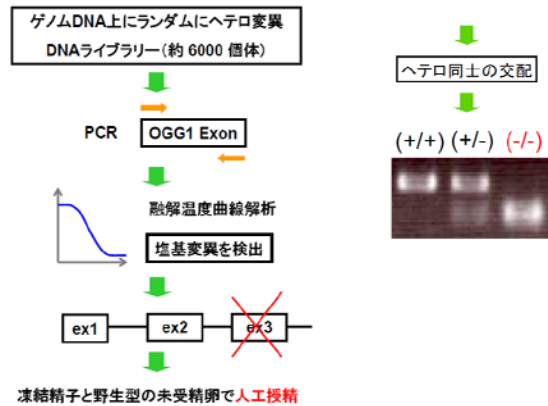


図2 OGG1ノックアウトメダカの作製

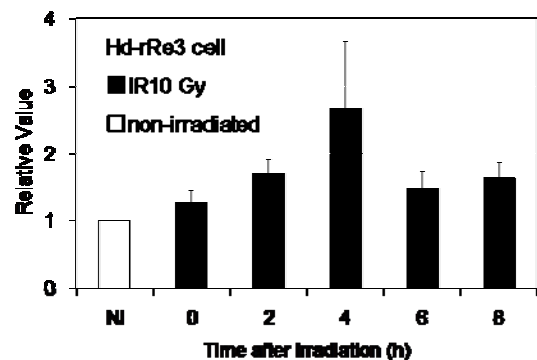


図3 γ 線照射後のp21遺伝子転写発現変化

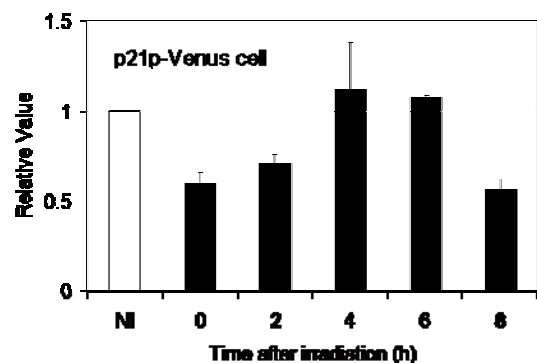


図4 γ 線照射後のVenus遺伝子転写発現変化