

## メダカを用いた宇宙環境放射線の経世代影響の評価法の開発

三谷啓志、尾田正二（東大・新領域）、清木誠（SORST）、亀井保博（京大・放生研）、舟山知夫（JAEA）、大森克徳（JAXA）、古賀章彦（名大・理）

### Novel assay for transgenerational effects of space radiation in Medaka

<sup>1</sup>Hiroshi Mitani, <sup>1</sup>Shoji Oda, <sup>2</sup>Makoto Furutani-Seiki, <sup>3</sup>Yasuhiro Kameji, <sup>4</sup>Tomoo Funayama, <sup>5</sup>Katsunori Omori, and <sup>6</sup>AKIHIKO KOGA

<sup>1</sup>Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, <sup>2</sup>SORST JST, <sup>3</sup>Radiation Biology Center, Kyoto University, <sup>4</sup>JAEA-Takasaka, <sup>5</sup>JAXA, <sup>6</sup>Graduate School of Science, Nagoya University

E-Mail: mitani@k.u-tokyo.ac.jp

**Abstract:** During space flights, crew members are constantly exposed to space radiation. Such radiation damages the cellular DNA, and may induce mutations in germ cells. Medaka (*Oryzias latipes*) is a useful experimental fish and precise system to measure germ cell mutation induction by specific locus test was established and found that the spontaneous and  $\gamma$ -ray induced mutation rates are very similar to those of mice. We are developing novel assay systems which can detect the germinal mutation using sperm genome. The point variation and frame shift variation will be detected by the high throughput SNPs detection system. And the transgenic strains with visible fluorescent marker expressed in sperm can detect deletion-type mutations. These systems will enable a better assessment of the late genetic risk for humans in space and, in the long-term, will contribute to optimise radiation shielding for future space exploration missions..

**Key words;** Mutation, Germ Cells, Medaka, Sperm, Transgenic fish

国際宇宙ステーション (ISS) の運用が本格化し、NASA は月、火星へ向けてのミッションの現実化に着手し、いよいよヒトが宇宙空間に長期間滞在する時代が到来する。将来、ヒトが宇宙空間という環境において世代を重ねるようになることは容易に想像されるが、宇宙放射線、微小重力といった宇宙環境特有のファクターがどのような経代的影響をもたらすのか、まったく不明である。マウス、ラットは小型の哺乳類としてヒトのモデルとしてはより適しているが、宇宙環境下におけるの生殖実験については技術的に不可能である。宇宙空間において動物が被る影響のメカニズムを解明しようとする場合は、地上での重粒子放射線の照射実験など、微小重力と宇宙放射線とを分離してそれぞれの効果を評価することが必要であるが、そのためには多大な時間が必要である。しかし、人類の宇宙への進出は加速しており、ISS の運用、月面への進出計画などの実施のためには影響があるのか無いのかを大雑把に、しかし緊急に見積もることも必要である。脊椎動物が宇宙空間において宇宙放射線などに長期間曝露され、次

世代にいかなる影響が生じるのか、あるいは現実的に問題が無いのか、個体レベルにおいて評価するため、ヒトと同じ脊椎動物であるメダカに着目し、宇宙環境がおよぼす経世代影響を個体レベルにおいてモニタリングする方法論を確立することを目的として、宇宙環境利用科学委員会研究班ワーキンググループで検討を行った。

（第一回目は、平成18年12月1日に開催）

### 活動報告

メダカはゲノム情報が充実し、多くの純系が維持されている上に、既に宇宙空間での長期飼育装置の開発が進んでいる。最近では、GFP 遺伝子導入個体を用いた細胞の生体観察法が確立され、TILLING 法に必要なハイスループットでゲノム多型を検出方法が開発されている。さらに人為誘発突然変異によって作製された放射線高感受性メダカ (Radiation Induced Curly tailed; RIC) と TILLING 法によって作製された DNA 修復機構欠損メダカ系統が得られている (Aizawa et al. 2004, Mitani et al. 2006, Taniguchi et al., 2006)。これらは、メダカの放射線応答をより詳細かつ高感度に

解析することを可能としている。また共同研究を行っている Tom Hinton 博士 (Savannah River Ecology Laboratory University of Georgia) らのグループは、屋外の長期ガンマ線暴露飼育場を利用して、低線量長期被曝 (0.1-100mGy/日) が次世代に誘発するマイクロサテライト変異を解析しているが、これは、メダカが温度変化に強いことで可能となっている (Tsyusko et al. 2006)。

これまでスペースシャトルに搭載されたショウジョウバエでは、生殖細胞突然変異出現率が地上対照群に比べて野生株で約2倍、放射線高感受性株で約3倍高くなることが報告されている (Ikenaga et al. 1997)。しかし脊椎動物で同レベルでの解析を行うためには、少なくとも1万遺伝子座をハイスループット解析する必要があり、哺乳類を用いた実験では非常に困難である。

そこで、本ワーキンググループでは、メダカに生じる経代的影響を評価する手法について、ゲノムの不安定性という観点から、トランスポゾン解析、特定座位法による生殖細胞突然変異研究、重粒子線による突然変異誘発モデルといった既存の技術をベースに、どのような新規手法の開発が必要であるのか、また可能であるのかについて議論を進めた。

その結果、生殖細胞の突然変異をメダカ精子ゲノム (半数体) をモデルとして用いて飛躍的に多数かつ迅速に検出する方法を開発することを結論した。メダカ精子を対象とする利点には、1) メダカの精巣構造は、哺乳類と比べて単純で観察しやすく細胞の分化段階も区別しやすい。2) メダカは毎日交尾を行うことが可能で精子が体内で長期滞留することはなく、精子の100%近くが受精可能である。3) 放射線が誘発する雄性生殖細胞の細胞死や複製阻害等についての知見がある (Kawahara et al. 2003)。等があげられる。議論の結果、現在以下の3プロジェクトについて実験を開始している。

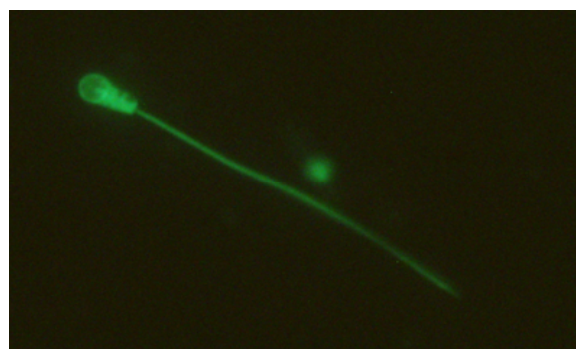
#### プロジェクト1：メダカ精子ゲノム突然変異のハイスループット検出法の開発

雄メダカより採取した精子からゲノム DNA を抽出し、適切なプライマーによって500ベース程度のゲノム領域をPCRによって増幅する。この増幅産物について融解温度曲線分析を行い、突然変異の有無を検出する。突然変異が検出された場合、どのような変異 (点突然変異、フレームシフト etc) が起きたのかを明らかにすることが必要となるので、融解温度曲線分析によって変異体が存在することが明らかとなったサンプルについて、

PCR産物をTAクローニングによって直接ベクターにサブクローニングし、シーケンスして変異部位を確定する方法を検討する。

#### プロジェクト2：精子の発光で突然変異をセンサーできるメダカの開発

宇宙環境下において主に曝露すると考えられる重粒子線によってゲノムに生じる突然変異は主に欠失であると考えられている。これを検出するために、プロジェクト2として、精子特異的プロモーターによって精子のミトコンドリアないしは細胞質/核にターゲットした BFP、YFP、DsRed のトランスジェニックメダカを作製し、これら3種の蛍光タンパク質を同時に精子で確認できる。トランスジェニックメダカを実現する。欠失突然変異によってそれらトランスジーンが欠落した場合、精子の蛍光スペクトルが変化するので、これをフローサイトメトリーないしはレーザー顕微鏡サイトメトリーによって検出できる。一匹のトランスジェニック雄メダカより、 $2.0 \times 10^7$  sperm/ml の濃度の精液が約 100 uL 得られる。20匹の雄より  $4.0 \times 10^7$  sperm を回収し、解析することが可能となるので、従来の解析個体数に比して、桁違いのゲノムを解析することが可能となることが期待される。



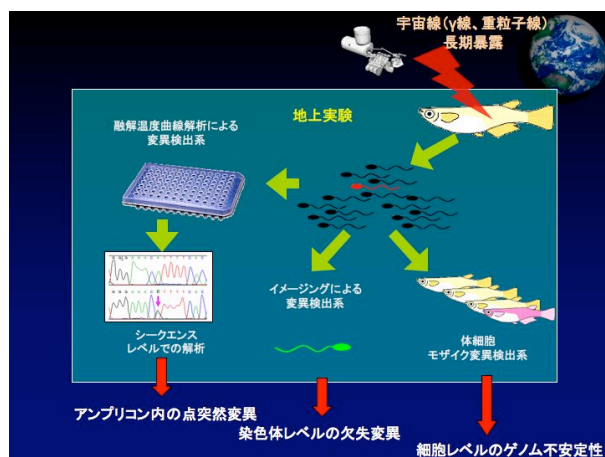
GFP で生体ラベルしたメダカ精子

#### プロジェクト3：標的遺伝子のモザイク型突然変異を可視化するセンサーメダカの開発

純系メダカ (AA2) をベースとして、バクテリア由来リプレッサー遺伝子を導入し、別途作製したリプレッサー制御下においた GFP 遺伝子を導入したテスターメダカと交配することで、リプレッサー遺伝子に変異が生じると GFP の蛍光で可視化さ

れるシステムを構築する。F1 においてモザイク個体が得られた場合、これらにおける「光る細胞」を回収しゲノムアレイ解析、シーケンス解析によって、モザイク発生の原因となる欠失がゲノムのどこに発生したかを解析することが可能となる。

これらの実験系を用いて地上の放射線暴露実験を進める予定である。



メダカ精子ゲノムを用いた突然変異検出系の概略

### 参考文献

Aizawa, K., Mitani, H., Kogure, N., Shimada, A., Hirose, Y., Sasado, T., Morinaga, C., Yasuoka, A., Yoda, H., Watanabe, T., Iwanami, N., Kunimatsu, S., Osakada, M., Suwa, H., Niwa, K., Deguchi, T., Hennrich, T., Todo, T., Shima, A., Kondo, H., Furutani-Seiki, M. (2004) Identification of radiation-sensitive mutants in the Medaka, *Oryzias latipes*. **Mechanisms of Development** 21, 895-902.

Ikenaga M., Yoshikawa, I., Kojo, M., Ayaki, T., Ryo, H., Ishizaki, K., Kato, T., Yamamoto, H., Hara, R. (1997) Mutations induced in *Drosophila* during space flight. **Biol Sci Space**. 11. 346-350.

Kuwahara, Y., Shimada, A., Mitani, H., and Shima, A. (2003)  $\gamma$ -Ray Exposure Accelerates Spermatogenesis of Medaka Fish, *Oryzias latipes*. **Mol. Rep. Dev** 65.204-211.

Mitani, H., Kamei, Y., Fukamachi, S., Oda, S.,

Sasaki, T., Asakawa, S., Todo, T., Shimizu, N. (2006) The Medaka Genome: Why we need the multiple fish models in vertebrate functional genomics. **Genome Dynamics vol2. "Structure and Evolution of Vertebrate Genomes"** Edited by Volf JN. Karger Publishers Basel p.165-182.

Taniguchi, Y., Takeda, S., Furutani-Seiki, M., Kamei, Y., Todo, T., Sasado, T., Deguchi, T., Kondoh, H., Mudde, J., Yamazoe, M., Hidaka, M., Mitani, H., Toyoda, A., Sakaki, Y., Plasterk, R. H., Cuppen, E. (2006) Generation of medaka gene knockout models by target-selected mutagenesis. **Genome Biol.**, 7, R112

Tsyusko, O., Yi, Y., Coughlin, D., Main, D., Podolsky, R., Hinton, T.G. and Glenn, T.C. (2006) Radiation-induced untargeted germline mutations in Japanese medaka. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** (Available online)