

1. 研究実施計画

研究課題名：「モデル生物ゲノム解析を利用した新規放射線感受性遺伝子の分離と機能解明に関する研究」

研究機関名：独立行政法人放射線医学総合研究所

任期付研究員氏名：平岡 秀一

1. 研究の意義、目的、必要性

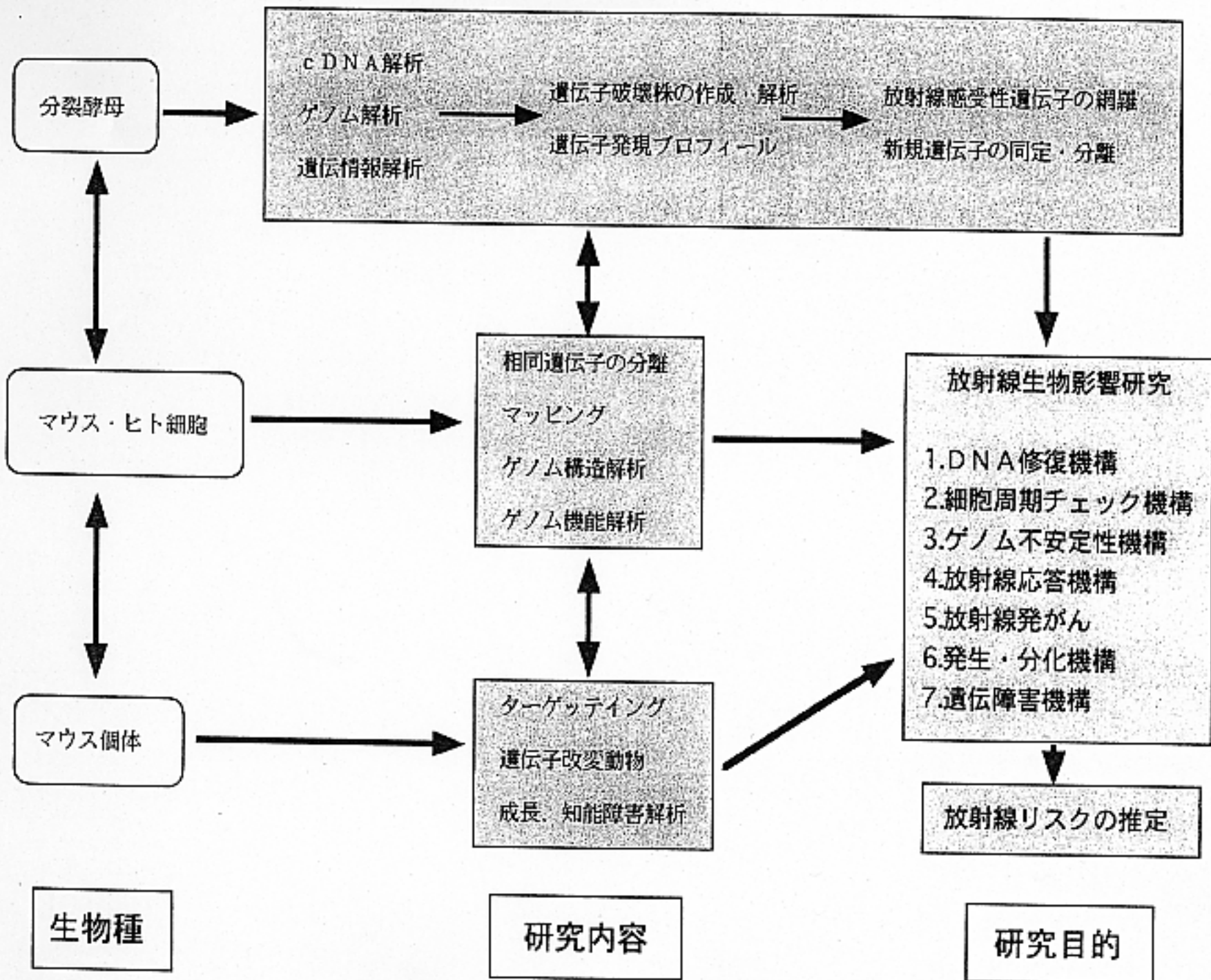
放射線の平和的利用を推進するには、放射線のリスクを正しく評価する必要がある。放射線リスクに科学的根拠を与える放射線の生物影響の本質（分子、細胞、個体レベルでの放射線影響）を解明する事は極めて大きな意義がある。当該研究は、放射線の生物影響を分子、細胞、個体レベルで解明することを目的とし、モデル生物から個体での放射線感受性機構解明を目指した研究である。

2. 研究概要

放射線の生物影響を解明するために、モデル生物ゲノム解析やcDNA解析に関連する遺伝子群を網羅し、遺伝子破壊や遺伝子発現プロファイル解析で構造と機能の基本的解明を行う。更に、ヒト・マウス遺伝子を分離して機能解明を進める一方、遺伝子改変マウスを作成して、個体での遺伝子機能解明を行う。

3. 研究目標

分裂酵母のcDNAやゲノム解析で得られた37を越す放射線感受性遺伝子群の中から、X線感受性に関連する5遺伝子の遺伝子破壊による突然変異株作成で機能を解析する。これら変異株での遺伝子発現プロファイル解析に関連するX線感受性遺伝子の同定や機能解明を行う。また、新規放射線感受性遺伝子（*apc493*）のマウス・ヒト相同遺伝子を分離して細胞レベルでの機能解明をする。更に、ターゲッティングにより放射線感受性遺伝子を破壊したマウスを作成して、個体レベルでの遺伝子機能解明を目指す。



2. 研究成果の概要

①研究成果

分裂酵母をヒト細胞のモデルとして捉え、遺伝子のカタログ化やゲノム解析を進めて放射線感受性遺伝子群を網羅し、真核生物の放射線感受性機構の解明を目的とした研究を行った。DNA修復や細胞周期の調節等の放射線感受性に関連の深い遺伝子群は、生物が誕生以来保持している最も基本的な生体防御遺伝子である。cDNA解析とゲノム解析により、新規放射線感受性遺伝子を同定した。

(A) 分裂酵母から発現している遺伝子を網羅するために cDNA ライブラリーを作成し、12000 クローン全ての DNA 塩基配列を決定した。cDNA クローン同士の比較から 2500 種類に分類され、公開 DNA database のサーチで半数以上が新規遺伝子と判明した。これら新規遺伝子の中から X線感受性に関連する遺伝子を分離するために、PCR で増幅した cDNA をスポットした高密度 cDNA フィルターを作成し、X線照射等のストレス処理細胞から mRNA を抽出して遺伝子発現の変化を調べた。約 5% の遺伝子でストレス処理による遺伝子発現の変化が見られた。この中で、c493 クローンは X線照射後 10 分培養で遺伝子発現量が増加することが Northern hybridization でも確認された。

(B) cDNA 解析だけでは全ての遺伝子を網羅する事は困難である。そこで、未着手であった第 3 染色体のゲノム解析により遺伝子網羅と機能解析を進めた。BAC で作成したゲノムライブラリーは平均 170 kb のインサート DNA を含み 33 倍のゲノムサイズであった。第 3 染色体にマップされた 200 個の cDNA クローンをプローブとして BAC クローンとハイブリダイゼーションを行い、第 3 染色体の contig map を作成した。最少の 20 個で全体をカバーする BAC クローンを選別し、DNase I を用いたショットガン法で平均 8 倍の重複度で DNA 塩基配列を決定した。両端の rDNA 領域を除き、全体で連続 2482.668 kb を決定し、1162 個の遺伝子を同定した。67 個の放射線感受性遺伝子から 9 遺伝子を選び遺伝子破壊株を作成した。6 株は必須遺伝子、3 株は放射線非感受性のため他遺伝子と修復経路を共有すると推定された。また、cDNA とゲノム解析及び遺伝子地図を統合した遺伝子発現地図を作製した。

②波及効果、発展方向、改善点等

最も単純な 2 種の真核生物、出芽酵母と分裂酵母、のゲノム解析が完成し、真核生物の基本や種の違い、放射線感受性を決定する要因を遺伝子の形で把握できる道が開けた。全遺伝子をスポットした DNA チップでの遺伝子発現解析に改善。