

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		バイオモニタリングによる水環境中有害物質の毒性評価に関する技術的な検討			
研究テーマ (欧文) AZ		Detection and evaluation of toxic substances in aquatic system by bio-monitoring			
研究氏 代 表 名 者	カカナ CC	姓)タニグチ	名)ヨシヒト	研究期間 B	2011～ 2012年
	漢字 CB	谷口	善仁	報告年度 YR	2013年
	ローマ字 CZ	Taniguchi	Yoshihito	研究機関名	慶應義塾大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		慶應義塾大学医学部・講師			
<p>概要 EA (600字～800字程度にまとめてください。)</p> <p>バイオモニタリングに資する化学物質高感受性の遺伝子変異メダカを作製するために、ランダム点変異導入法の一つであるTILLING法を使用した。TILLING用変異メダカライブラリーは、谷口らが作製し2006年に発表したものである。従来は、ハイスループットなキャピラリーシーケンスによって、一遺伝子ずつ点変異を探索していたが、次世代シーケンサーの登場により、複数の遺伝子の変異をスクリーニングすることが可能となった。そこで、薬物代謝第Ⅱ相の代表的な酵素であるグルクロン酸抱合酵素(UGT1A1)を始めとする、90種類近くの遺伝子変異スクリーニングを同時に行うことにした。</p> <p>UGT1A1については、その酵素活性部位の上流に約1kb長のアンプリコンを設定し、PCRにより5,760ゲノムを増幅した。他の遺伝子についても同様にPCR増幅を行った。これらのサンプルを混合しても点変異を検出できるように、それぞれにタグを付加した。そのために、イルミナ社の TruSeq DNA sample preparation v2 を使用したが、96検体の断片化、末端平滑化、アダプターライゲーション、QC という過程は、ゲル抽出や PCR の過程を含めてかなり煩雑であり、バイアスがないライブラリーを作製することは困難だった。そのため、ダウンサイジングした次世代シーケンサー MiSeq と、トランスポゾンによってDNAを破碎することなくタグ付けを可能とする Nextera を使用し、cDNA ライブラリーを調整した。</p> <p>2011年に、TILLING法よりも確実、かつ簡便に遺伝子を破壊可能な人工ヌクレアーゼTALENが発表された。現在、広島大学、京都大学と共同で、in vivo で遺伝子切断活性のあるヌクレアーゼ合成に成功したところである。今後は、TALENを使ったピンポイントな方法で他の遺伝子も破壊していく予定である。</p>					
キーワード FA	メダカ	遺伝子改変	バイオモニタリング		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

In order to generate the mutant medaka which is hypersensitive to chemicals and is suitable for bio-monitoring, TILLING approach was employed, in which genes are randomly mutated. The TILLING mutant medaka library was constructed and reported by Taniguchi, et al. in 2006. In earlier times, the mutations were searched from the library by high-throughput capillary sequencing one gene at a time. The emergence of next generation sequencer has enabled the simultaneous mutation search for the multiple genes. I started to screen the mutations in as many as 90 genes including UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1), the representative phase II detoxifying enzyme.

An amplicon of about 1kb length was set 5' to the site encoding the enzymatic active site of UGT1A1, and 5,760 genomes were used as templates for PCR amplification. Tags were attached to each fragment so that the mutations could be detected and discriminated after all the samples were mixed. TruSeq DNA sample preparation v2 (Illumina, USA) was used for this purpose, but the whole procedure - fragmentation, end repair, adaptor ligation, and QC of all the 96 samples, followed by PCR and gel extraction - was not suited for constructing the uniform and unbiased library. In order to avoid the DNA fragmentation step and bias formation, I shifted to down-sizing the sequencing platform (MiSeq) in combination with tagging with Nextera (Illumina, USA), the transposon-based method for tagging DNA.

In 2011, the artificial endonuclease called TALENs was reported to disrupt the genes in zebrafish efficiently. I succeeded to generate the enzymatically active TALENs in collaboration with Hiroshima and Kyoto University. I plan to disrupt the gene set using this new technology.