

## P-079

**Re-establishment of *in vitro* Nucleotide excision repair assay using human cell extract**

Yuina Sonohara, Shigenori Iwai, Isao Kuraoka  
*Graduate School of Engineering Science, Osaka University*

Cells have various DNA repair pathways, which resolve specific DNA lesions created by endogenous or exogenous genotoxic agents and maintain genome integrity. Nucleotide excision repair (NER) is one of them, which is an important DNA repair pathway that resolves numerous DNA lesions generated by UV radiation or chemical agents, particularly base modifications that distort the normal helical structure of duplex DNA. For example, cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts.

XP is a rare autosomal recessive disease with defective NER characterized by severe photosensitivity and causes skin cancers. Moreover, XP patients exhibit an increased risk for spontaneous internal cancers, and develop neurological symptoms. Agents or mechanisms of neurological symptoms of XP remain to be fully explained, so far there is no radical cure.

Our aim is to find DNA damage agents that cause neurological symptoms of XP, so first, we restructured the assay that detect DNA lesions removed by NER. We would like to report the results.

**ヒト細胞抽出液を用いたヌクレオチド除去修復検出系の再構築**

園原 由依菜、岩井 成憲、倉岡 功  
*大阪大学大学院基礎工学研究科*

細胞には、内在的にまたは外在性遺伝物質によって形成する様々な損傷を修復し、ゲノムの安定性を保つためのDNA修復機構が多く存在する。そのうちの一つであるヌクレオチド除去修復(NER)は、紫外線、化学物質によって生じる多様なDNA損傷を除去することのできる重要なDNA修復機構である。特に二本鎖DNAのらせん構造にゆがみを与える大きな損傷、例えば、cyclobutane pyrimidine dimers、(6-4)photoproductsなどを修復する。

このNERに異常を持つヒト遺伝性疾患として色素性乾皮症(XP)がある。XP患者は太陽光に対して高感受性を示し、最終的に高頻度の皮膚がんを発症する。さらに、紫外線に対しては自然発生的な体内におけるがんのリスクも高まり、また精神神経症状も発症する。この精神神経症状の原因物質や詳細な発症メカニズムは現在解明されておらず、根本的な治療法はない。

そこで本研究では、XP患者の精神神経症状を引き起こすDNA損傷物質の探索を目的とし、まずNERによって修復されるDNA損傷の検出法を再構築した。その結果を報告する。

## P-080

**Establishment of TLS polymerase mutants in Medaka using TALENs**

Yoshihiro Fujikawa<sup>1</sup>, Tomoko Fujiwara<sup>1</sup>,  
Tetsushi Sakuma<sup>2</sup>, Takashi Yamamoto<sup>2</sup>, Takeshi Todo<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Graduate School of Medicine, Osaka University*,  
<sup>2</sup>*Graduate school of science, Hiroshima University*

We have established a general reverse genetics method, called TILLING in Medaka, and have obtained several kinds of DNA damage response mutants. It's possible to obtain a lot of nonsense and missense mutants in TILLING at one time. However, sometimes we cannot get objective gene mutants because TILLING cannot introduce mutations at site-specific region. Thus we need to establish targeted mutagenesis method using TALENs (Transcription activator-like effector nucleases). TALENs are chimeric proteins which were fused specific DNA binding domain and catalytic DNA cleavage domain. TALENs can cleave DNA in pairs, and create targeted DNA double-strand breaks (DSBs). When DSBs are repaired by non-homologous end joining, small deletions or insertions are introduced. We tried to establish REV3L and REV7 mutants. Here, we report the results (mutation spectrum, efficiencies of mutagenesis, efficiencies of germline transmission and off-target effects).

**メダカにおける TALENs 利用した遺伝子破壊による損傷乗り越え DNA 合成ポリメラーゼ変異体の作製**

藤川 芳宏<sup>1</sup>、藤原 (石川) 智子<sup>1</sup>、佐久間 哲史<sup>2</sup>,  
山本 順<sup>2</sup>、藤堂 剛<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*大阪大学大学院医学系研究科*,  
<sup>2</sup>*広島大学大学院理学系研究科*

我々は、メダカにおいて変異体作製法の1つであるTILLING法を確立し、損傷応答に関わる多くの遺伝子変異体を作製してきた。TILLING法では一度に多くのナンセンス・ミスセンス変異体を得ることができるが、部位特異的に変異導入ができないために標的領域内の変異体が得られない場合も起こりうる。そこで我々は、ゲノム編集技術の1つであるTALENs(Transcription activator-like effector nucleases)を用いた部位特異的遺伝子変異法の樹立を開始した。TALENsはDNA特異的結合ドメインとDNA切断活性ドメインを連結させたキメラタンパク質である。TALENsをペアで作用させることで標的箇所を切断し、非相同末端結合を介した塩基挿入・欠失によって標的遺伝子に変異が引き起こされる。これが変異導入の基本原理である。本発表ではRev7及びRev3L遺伝子について、設計したTALENsのSSA assayによる切断活性評価、実際の変異メダカ作製経過(変異スペクトラム/導入効率、Germline transmission効率、オフターゲット効果の有無)を報告する。