

論文内容の要旨

論文題目     **Responses of medaka early embryos to  $\gamma$ -irradiation**  
                  (  $\gamma$ 線照射に対するメダカ初期胚の応答解析 )

氏 名         相澤 浩一

## 序論

放射線をはじめとする環境変異原はゲノムに様々な損傷を与え、細胞死や突然変異を誘発する。初期胚の細胞は増殖が活発で、放射線に感受性が高い。初期胚細胞にゲノム損傷が起きた場合、その個体は奇形を生じたり、成長後、発ガン等の生存上不利な疾病を発症する危険性が高くなる。したがって初期胚細胞における遺伝情報維持機構を解明することは非常に重要である。Russell らはマウスを用いた研究において、着床前期の初期胚はDNA二本鎖切断を引き起こすとされる高い致死率を示すX線曝露で、生き残った胚は奇形を伴わない正常なマウスに成長することに対し、同線量でも器官形成期になると胎児の死亡率は減少するが奇形と新生児死亡率は増加することを報告した。その後、Norimura らのp53 ノックアウトマウスを用いた実験により、DNA二本鎖切断を持つ細胞は、p53 依存性アポトーシスによって自曝し、その穴を正常な細胞が増殖し、補う組織修復による奇形抑制機構の存在が提唱された。哺乳類のモデル生物とは異なり、メダカは受精から孵化までの全発生過程を容易に観察でき、孵化以前の形態形成を観察することができる。当研究室では初期胚における遺伝情報維持機構を解明するためにENUにより生殖系列細胞に突然変異を誘発させたメダカ系統の雄をもとに三世代交配法を行い、魚類において初めて3系統の放射線高感受性変異体系統を作製した。これらは単一の劣性突然変異体であり、生殖能力を保持する。(木暮希望修士論文発表)。本研究ではこの変異体系統メダカのうちのひとつである RIC1 系統を用いて初期胚細胞のゲノム損傷に対する監視機構の解明を目指し、

γ線照射に対するメダカ初期胚の応答解析を行った。

## 1. メダカ MBT の開始時期の決定

アフリカツメガエル、ゼブラフィシュの胚では、接合核からの転写が活性化される MBT(midblastula transition)を境に種々の環境変異原に対する応答に変化が起こることが報告されている。メダカをモデル実験動物とする利点のひとつに北日本集団と南日本集団間の多型の存在があげられる。つまり転写産物に多型が存在すれば両系統間の父性発現と母性発現を識別することができる。そこで両集団間の多型を利用し父性発現を調べることで、メダカ MBT の開始時期を同定した。北日本集団由来 HNI 系統の EST(expression sequence tag)を無作為に選び(総数 187)、HNI 系統と T5 系統(南日本集団)間で多型がみられるものを 33 個選んだ。各発生段階由来の cDNA を用い PCR 反応を行うことで父性発現を調べた。多型がみられた EST のうち最も早く父性発現が検出された時期は発生段階 11 であった。メダカの場合においても、発生段階 12 を境に γ線照射により誘発されるアポトーシス細胞並びに発生遅延が検出された。このことからメダカ MBT の開始時期は発生段階 11 であり、接合核からの転写が始まった後に照射されると γ線に対する応答が変化することが示唆された。

## 2. 放射線高感受性変異体を用いた γ線照射に対するメダカ初期胚の応答解析

### 各発生段階における RIC1 の放射線感受性

桑実胚期(発生段階 8)、初期囊胚期(発生段階 12)並びに器官形成期(発生段階 25)の胚に γ線を照射し、孵化率並びに奇形率を調べた。照射したどの発生段階においても RIC1 系統は野生型 CAB 系統に比べ有意に低い孵化率並びに奇形率を示したことから、RIC1 系統は器官形成期のみならず、より早い初期の発生段階においても γ線照射に対して高感受性であることが示された(表 1)。

表 1 各発生段階に γ線照射した胚の孵化率と奇形

Irradiated stage	Strain	Dose	Malformation Rate (%)	Hatchability (%)	
morula stage	CAB (WT)	0 (104)	0	94.2	
		1.0(396)	0	90.4	
	RIC1	0 (84)	3.6	84.5	
		1.0(320)	54.3	23.8	
pre-early gastrula	CAB (WT)	0 (84)	0	98.8	
		5.1(380)	4.7	94.2	
	RIC1	0 (74)	8.1	81.1	
		5.1(288)	71.5	36.1	
	organogenesis stage	CAB (WT)	0 (86)	0	97.7
			10.2(348)	0.6	90.2
RIC1		0 (74)	2.8	94.5	
		10.2(247)	70.9	4.1	

括弧内は調べた個体数を示す

### 初期囊胚期における DNA 二本鎖切断の再結合

ゲノム損傷を細胞単位で高感度に直接定量できる Comet assay 中性法を用いて、 $\gamma$  線照射により初期胚細胞に生じた DNA の二本鎖切断の再結合を調べた。Comet assay とは、単一細胞をアガロースゲルに封入し電気泳動することにより、切断された DNA を細胞核から溶出分離する方法であり、損傷の程度が大きいほど核からの DNA の泳動距離が長くなる。Comet assay を行う胚の発生段階として、胚細胞が容易にばらける初期囊胚期を選んだ。15.2Gy の  $\gamma$  線を照射し、照射後 30 分並びに 1 時間後の胚について解析を行った。その結果、CAB 系統では DNA の二本鎖切断の指標となる Tail moment が照射後 30 分で完全に非照射群のレベルまで下がった。一方 RIC1 系統では、Tail moment が照射後 30 分のみならず、照射後 1 時間でも非照射群のレベルよりも高い値を示した。このことから RIC1 系統は DNA 二本鎖切断修復機構に関する遺伝子の突然変異体であることが示唆された。

### 初期囊胚期における $\gamma$ 線誘発アポトーシス

$\gamma$  線照射に対するメダカ初期胚の応答を調べるために、TUNEL 法によりアポトーシス細胞の検出を行った。 $\gamma$  線照射する発生段階には最初にアポトーシスが観察される初期囊胚期を選んだ。初期囊胚期の胚に 5.1Gy の  $\gamma$  線を照射し、30 分後にアポトーシス細胞の検出を行ったところ、CAB 系統では TUNEL 陽性細胞が検出された胚の割合が約 23.9%であったのに対し、RIC1 系統では約 63.6%であった。このことから RIC1 系統の胚細胞は初期囊胚期において  $\gamma$  線照射に対してアポトーシスを起こしやすいことから、DNA 二本鎖切断修復をすることができない細胞はアポトーシスにより除去されることが示された。

### $\gamma$ 線照射後の孵化率に対する RIC1 の母性因子の効果

ほとんどの動物の発生は、まず卵内に蓄えられた mRNA やタンパク質などの母性因子によって制御され、発生が進むにつれ母性因子が枯渇する一方、MBT を過ぎ、接合核由来の因子が出現する。そこで本研究では DNA 二本鎖切断修復に関わる母性因子が初期発生過程にどのように関わるのかを調べるために、4 種類の掛け合わせにより得られた胚の  $\gamma$  線照射後の孵化率を調べた。CAB 系統、RIC1 系統の桑実胚期に 2Gy の  $\gamma$  線を照射し孵化率を調べたところ、それぞれ 66.7%、0%であった。次に CAB 系統の雌に RIC1 系統の雄を掛け合わせにより得られた胚の孵化率は 65.7%であったのに対し、RIC1 系統の雌に CAB 系統の雄を掛け合わせるにより得られた胚の孵化率は 31.5%であり、有意に低い孵化率を示した。加えて、器官形成期の胚に 10.2Gy の  $\gamma$  線を照射し孵化率を調べたところ、桑実胚期の照射の場合と同様に、RIC1 系統の雌に CAB 系統の雄を掛け合わせるにより得られた胚は、CAB 系統の雌に RIC1 系統の雄を掛け合わせるにより得られた胚よりも有意に低い孵化率を示した。これらの結果から、メダカ胚では MBT 以前の発生段階のみならず器官形成期においてでさえも、 $\gamma$  線照射後の孵化率を高くする母性因子の効果が持続することが示唆され、また RIC1 遺伝子産物は初期の発生段階においてゲノム損傷の監視機構に関わる可能性が推測された。

## 本研究のまとめ

本研究ではゲノム損傷を誘発するために、主な致死作用が DNA の二本鎖切断によると考えられている $\gamma$ 線を用いた。またすべての初期発生過程を容易に観察することができるメダカをモデル動物として用いた。本研究により以下の事が明らかになった。

- ・メダカの MBT の開始時期は発生段階 1 1 であり、ほぼ同時期に $\gamma$ 線照射に対する応答が変化していた。

- ・RIC1 系統は、器官形成期照射のみならず、より早い発生段階である桑実胚期並びに初期囊胚期においても放射線高感受性であることが示された。

- ・野生型系統では迅速な DNA 修復が行われているが、RIC1 系統では DNA 二本鎖切断修復機構に欠陥があることが示唆された。

- ・RIC1 系統は初期囊胚期においてアポトーシスを指標としても放射線高感受性であることが示された。

- ・MBT 以前の細胞周期が S 期と M 期とからなる桑実胚期においても DNA 二本鎖切断修復機構の存在が示唆され、また母性プログラムから胚性プログラムへの転換期である MBT 以降の器官形成期においても、DNA 二本鎖切断修復の母性因子効果が持続することが示唆された。

本研究により、卵割期において母性由来の因子による DNA 二本鎖切断修復機構が存在するが、細胞周期停止を伴わないため放射線に対して高感受性であることが示唆された。また、細胞分裂並びに分化が活発で DNA 損傷を受けると奇形が発生しやすい器官形成期まで母性因子が深く関わり、奇形や致死を抑制することが明らかになった。