

論文審査の結果の要旨

氏名 相澤 浩一

本論文は2部からなり、第1部はメダカ MBT(midblastula transition)の開始時期の同定とその前後の発生段階における γ 線照射に対する応答の解析について、また第2部では放射線高感受性変異体系統メダカ(RIC1 系統)を用いた解析により、初期胚の γ 線照射に対するゲノム損傷監視機構について述べられている。

初期胚は放射線に対して非常に感受性が高いことが知られている。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が報告されている。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。本論文では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、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 γ 線を、またマウスやラットなどの哺乳類のモデル生物とは異なり、初期発生全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ている。

まず本論文では、メダカ MBTの開始時期を同定している。MBTはS期とM期とから構成される同調的な細胞分裂から、G1期の出現により非同調的な通常の体細胞分裂への転換期であり、その前後で γ 線照射に対する応答が変化することを考えた。MBTはG1期の出現だけでなく、接合核からの転写の活性化することで定義されているため、メダカを実験に用いる利点のひとつで

ある北日本集団系統と南日本集団系統間の多型を利用し、メダカ EST(expression sequence tag)マーカーの父性発現を調べている。無作為に選んだ総数 187 の中で両系統間で多型のあるものを 33 個選び、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ところ、最も早く父性発現が検出された時期は後期胞胚期であった。次に γ 線照射に対する応答をアポトーシス並びに発生遅延の観点から調べたところ、初期囊胚期を境に 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。これらのことからメダカ 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 線照射に対する応答が変化することを示唆している。続いて RIC1 系統を用いた解析では、まず RIC1 系統がスクリーニングに用いた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を示し、初期囊胚期における TUNEL 法の解析により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ている。また初期囊胚期における Comet assay 中性法により、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されている。さらに野生型系統との交配実験により、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ている。本論文により、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され、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深く関わり、奇形や致死を抑制することが明らかとなった。

なお、本論文第 1 部は、A. Shimada、K. Naruse、H. Mitani、A. Shima との共同研究であり、本論文第 2 部は、H. Mitani、N.

Kogure, A. Shimada, Y. Hirose, T. Sasado, C. Morinaga, A. Yasuoka, H. Yoda, T. Watanabe, N. Iwanami, S. Kunimatsu, M. Osakada, H. Suwa, K. Niwa, T. Deguchi, T. Hennrich, T. Todo, A. Shima, H. Kondoh, M. Furutani-Seiki との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。