

学位論文要旨

専攻名 生物圏生命科学専攻

氏名 栗谷 健志

題目 ゼブラフィッシュ培養細胞及び初期胚における DNA 複製に関する研究
(Studies on DNA replication in zebrafish cultured cells and embryos)

DNA 複製は細胞分裂の際に、その遺伝情報を娘細胞に継承するために正確に行われる必要がある。その破綻は細胞機能の異常を引き起こし、やがてがん化や細胞死を導くことが知られている。DNA 複製は細胞周期の S 期に複製起点 (*ori*) から開始し、そこから両方向に複製フォークが進行する。動物細胞ゲノムでは、発生初期の未分化状態から分化していく過程で、複数個の *ori* を含むドメインを形成し、個々の細胞における複製ドメインを確立することでゲノムの安定性を保っていると考えられている。発生初期段階においてゲノム中のすべての *ori* は同調的に活性化され、その後徐々に部分的に不活性化されることで複製ドメイン形成に至ると考えられるが、ゲノムレベルの全体像は明らかになっていない。ドメイン形成過程を明らかにすることは、DNA 複製の制御機構やゲノム安定性の解明に寄与し、DNA 複製異常や疾患のメカニズム等のさらなる研究につながるが、個体を用いて発生過程を解析する必要がある。個体レベルでの研究を行う上でモデル生物を利用することは非常に有用であり、中でもゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は近年注目を集めている。維持管理が行いやすく、胚が母体外で発生する上に透明で大きいため、実験操作に適した生物である。全ゲノムが解読されており、薬剤や化学物質のスクリーニングのみならず、疾病の研究にも用いられている。しかし、ゼブラフィッシュは細胞レベルでの研究があまり進んでおらず、DNA 複製に関する報告がほとんどない上、薬剤耐性や分子レベルでの応答についてもヒトとの相違点は不明な部分が多い。そのため、発生過程の解析に加え、細胞レベルの基礎的な研究を行う意義があると考えた。以上の背景から、本研究ではゼブラフィッシュ培養細胞および初期胚を用いて、DNA 複製の可視化方法の確立とその解析を行うことを目的とした。

まずは、ゼブラフィッシュ由来細胞株 AB9 を用いて、細胞周期、細胞増殖、DNA 複製の可視化技術を用いた DNA 複製領域、DNA 複製フォーク進行速度、複製起点間距離等の解析を行った。複製標識を行った AB9 の核内 DNA 複製 foci を可視化したところ、そのパターンはヒトに比較的近く、S 期前半には核内部に均一に広がっていた foci が S 期の進行に伴い核膜周辺に移行することが確認された。この複製領域の変化は、染色体標本上で複製領域を可視化した際にも同じ傾向が見られた。AB9 における各 foci の割合を算出すると、哺乳類に比べて核内部及び核全体に均一に複製している割合が高かった。ゼブラフィッシュには、S 期前期に複製されるユークロマチンが比較的多く、後期に複製される反復配列などが少ないことが要因として考えられる。続いて、分子コーミング法により DNA 複製フォーク進行速度及び複製起点間距離を測定した結果、ヒトの培養細胞とほぼ変わらないことが明らかとなった。

次に、ゼブラフィッシュ初期胚を用いて DNA 複製の可視化を行ない、その解析及び培養細胞との比較を行った。初期胚における核内複製領域の報告はこれまでになく、まずは複製標識の条件を検討し、胚1個単位で細胞を可視化する方法を確立した。卵割が非同調状態の受精後6時間 (hpf) の初期胚において、その複製 foci の解析を行ったところ、パターンおよび割合は AB9 に近い結果となった。また、2、2.25、2.5、2.75、3 及び 4 hpf の各段階における複製 foci のパターンおよび割合を解析したところ、2 hpf では核膜部分での複製がほとんど見られずほぼ全ての細胞が同じパターンを示していたことから、foci パターンの偏りが存在していること及び DNA 合成が同調して行われている可能性が示唆された。発生の進行に伴いこの傾向は見られなくなり、4 hpf の初期胚では 6 hpf 及び AB9 に近い割合を示した。初期胚においても体細胞に類似した複製 foci パターンが存在することから、核内複製領域の構築は、細胞周期或いは S 期の長さに依存するものではないということが示唆された。また、2.75 hpf の時点で各 foci パターンの割合が大きくばらつき始めることから、この時点ですでに DNA 合成は同調していないということが示唆された。3 hpf までは卵割が同調していると知られていることから、DNA 合成は卵割と比較して細胞周期約 2 周分早いタイミングで細胞間のずれが生じ、その後卵割に時間差が生じていくと考えられた。さらに、分子コーミング法を用いて DNA 複製鎖を可視化し、DNA 複製フォーク進行速度の解析を行った。3-5 hpf の初期胚における複製フォーク進行速度は培養細胞の 10-15 倍程度で、3 hpf よりも 5 hpf の方が複製速度は速くなる傾向を示した。

本研究により、ゼブラフィッシュにおける DNA 複製の、哺乳類との共通点・相違点が明らかとなり、発生初期には DNA 複製領域、複製タイミング、複製速度がダイナミックに変化することが明らかとなった。本研究はゼブラフィッシュ由来細胞における複製 foci 及び複製フォークの可視化・解析に加え、初期胚における複製 foci 及び複製フォークの可視化方法を確立・解析を行った初めての報告となる。