

## 学位論文審査の結果の要旨

専攻	生物圏生命科学専攻	氏名	栗谷 健志
審査委員	主査 教授 奥村 克純 副査 教授 梅川 逸人 副査 教授 田丸 浩		
論文題目 (題目変更の有無) ①有 ・ 無	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)		
<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>本研究は、生命活動の基本過程の一つであるDNA複製に関して、種々の薬剤や生物資源に含まれる機能性成分の評価法への応用なども期待されるゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)について、その培養細胞および初期胚を用いて、細胞レベルでのDNA複製の可視化方法の確立とその解析を行ったものである。</p> <p>DNA複製は、生命活動の基本過程であり、ゲノムDNAの遺伝情報を娘細胞に継承するために行われるが、その制御機構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。動物細胞のゲノムは極めて長大で、それぞれのゲノム領域は、S期の決まったタイミングに、ある程度まとまって複製される複製ドメインによって構築され、ゲノムの安定性を保っていると考えられるが、このような複製ドメインが個体発生や細胞分化の過程でどのように形成されるかについては明らかになっていない。</p> <p>一方、ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)は、脊椎動物の重要なモデル生物の一つで、世代時間が短く、一度の産卵で100個以上の産卵を行う点、発生が速く胚が透明で大きいため、実験操作及び観察に適している点などから、発生過程の研究に適している。さらに、ヒトを含む哺乳類とほぼ同等の遺伝子組成を有し、主要臓器・組織の構造もヒトとの共通点が多くあり、薬剤や化学物質のスクリーニング、食品や栄養素の影響を試験するためにも使われるなど、基礎研究にも応用研究にも利用価値の高い生物である。ゼブラフィッシュは個体レベルの研究に特に有用であり、その利用価値をさらに高めるには、分子レベル、細胞レベルの詳細な情報が必要となるが、DNA複製をはじめとして、分子・細胞レベルの研究に関する報告がほとんどないのが現状である。</p> <p>そこで、本研究では、まず、ゼブラフィッシュ由来細胞株AB9を用いて、細胞周期及び細胞増殖に関する基本的なデータを集め、DNA複製の可視化技術を用いて、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なった。複製標識を行ったAB9の核内DNA複製foci(顆</p>			

粒様構造)を可視化したところ、そのパターンはヒトやマウスに比較的近く、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。この複製領域の局在の変化は、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。しかしながら、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。これは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、ヒトやマウス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いため、まず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に近い結果が得られた。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すべ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と同様にAB9に近い割合となった。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、核内複製領域の形成は細胞周期及び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fociの割合が大きくばらつき始めることから、この時点でDNA合成は同調していないということが示唆された。3 hpfまで卵割は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2回分ほど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る。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、発生初期にはDNA合成のタイミングや複製速度がダイナミックに変化することが明らかになった。

以上のように、本研究は、ゼブラフィッシュにおけるDNA複製について、哺乳類との共通点・相違点、ならびに、初期胚発生時の複製領域のパターン、及び、そのダイナミックな変化も明らかにした。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、特に、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である。これらの成果の主な内容は、専門分野の国際誌2報に英文で掲載、または印刷中であり、これらの結果は、ゼブラフィッシュを基礎及び応用目的で用いる研究のための重要な知見であると考えられ、審査委員会は本論文が十分に学位論文に値するものであると全員一致で認めた。