

# メダカ RIC1 系統生殖細胞の発生に伴う電離放射線感受性の変化

2006 年 3 月修了 先端生命科学専攻

動物生殖システム分野 46523 神永 知春

指導教官； 三谷啓志 教授

キーワード；メダカ、生殖細胞、放射線、雌雄

## < 序論 >

組織学的研究により、メダカの生殖細胞の性分化までの発生過程は大きく第 1 分裂期（第 1 増殖期；発生段階 1～26）、第 1 分裂停止期（生殖巣原基への移動期、発生段階 26～33）、第 2 分裂期（第 2 増殖期；発生段階 33～孵化）の 3 段階に分けることが可能である。第 2 分裂期に個体レベルでの性分化が起こる。近年、メダカ *vasa* 遺伝子の発現制御領域を用いて緑色蛍光蛋白質(GFP)遺伝子を生殖細胞特異的に発現した *vasa*-GFP トランスジェニックメダカ (*olvas*-GFP 系統メダカ)が作製され、生きたままの個体において生殖細胞の動態を経時的にモニターすることが可能となった。所属研究室においては、野生型 CAB 系統から初期胚が放射線感受性となる変異体系統 (RIC) が作製された。この系統の 1 つである RIC1 系統は DNA 二本鎖切断修復機構に異常があり (Aizawa et al,2004)、精原幹細胞が放射線に高感受性であることが示されている (頼、修士論文,2004)。そこで、発生初期の生殖細胞の放射線感受性がどのように変化し、果たして *ric1* 遺伝子産物が寄与するのかを検討するために、*olvas*-GFP 系統と RIC1 変異体を交配させ、*ric1olvas*-GFP 系統を作製した。本研究では *ric1olvas*-GFP 系統を用い、生殖細胞のダイナミックな発生に伴う放射線感受性の変化の有無と放射線感受性変化への *ric1* 遺伝子の関与の検出および解析を試みた。

## < 結果と考察 >

### olvas-GFP 系統および ric1olvas-GFP 系統を用いた正常な初期発生段階における生殖細胞発生過程の観察

メダカ生殖細胞の発生過程における雌雄の最も顕著な差は、第 2 増殖期における生殖細胞の増殖率であると報告されている。*olvas*-GFP 系統と *ric1olvas*-GFP 系統の胚 (以下、両系統) を用い顕微鏡下で生殖細胞を観察し生殖細胞量を定量した結果、両系統において雌生殖細胞の方が雄生殖細胞よりも増殖が早く、本研究による手法によって雌雄の生殖細胞発生過程の相違をモニターすることが可能なことが示された。また両系統の生殖細胞の増殖に違いがないことも示された。

### 線照射による発生段階 7 における生殖細胞への影響

卵割期にあたり生殖細胞が未分化な時期である発生段階 7 の胚における生殖細胞の放射線感受性に、*ric1* 遺伝子産物が関与しているのか否かを検討するために、両系統の発生段階 7 の胚に 線(1Gy,2Gy)を照射した。孵化率を算出したところ、1Gy の 線照射では両系統の孵化率に影響はなかったが、2Gy の 線照射によって *ric1olvas*-GFP 系統の胚の孵化率は低下した。照射 4 日後の胚において形態的に正常発生している胚の生殖細胞量を定量したところ、*ric1olvas*-GFP 系統の胚においてのみ 1Gy および 2Gy の 線照射後の生殖細胞量に大幅な減少が観察された。このとき生殖細胞の放射線感受性に雌雄の差はなかった。過去に RIC1 変異体

の雌と olvas-GFP 系統を交配させて得た発生段階 7 の RIC1 雌ヘテロ胚に 1Gy の 線を照射した実験においても発生段階 7 の生殖細胞量は減少したが、今回の *ric1* ホモ胚における 1Gy 照射による生殖細胞量の減少度合いと差がなかった。発生段階 7 は MBT 前にあたり母方 *ric1* 因子による DNA 修復機構の放射線感受性への寄与が大きいと考えられる。また今回発生段階 7 の *ric1olvas-GFP* 系統の胚において低線量照射後の生殖細胞量が減少していたことから、初期発生の段階から将来生殖細胞系列となる細胞群が分化している可能性が示唆された。

### 線照射による発生段階 33 における生殖細胞への影響

第 2 分裂開始期にあたる発生段階 33 における生殖細胞の放射線感受性に *ric1* 遺伝子が関与しているのかを検討するために、両系統の胚に孵化率に影響を及ぼさない線量 (2Gy, 5Gy, 10.5Gy) を照射し、照射後の生殖細胞量を定量した。その結果、両系統において線量に応じて生殖細胞量の減少が見られた。雌雄別に 線照射後の生殖細胞量の変化率を算出したところ、*ric1olvas-GFP* 系統では雌の方が雄よりも変化率の変動が大きく、放射線感受性が高いことが示唆された。これは発生段階 33 において性分化が起こっており、雌生殖細胞の方が雄生殖細胞よりも分裂頻度が高いためであると考えられる。

### 線照射による発生段階 36 における生殖細胞への影響

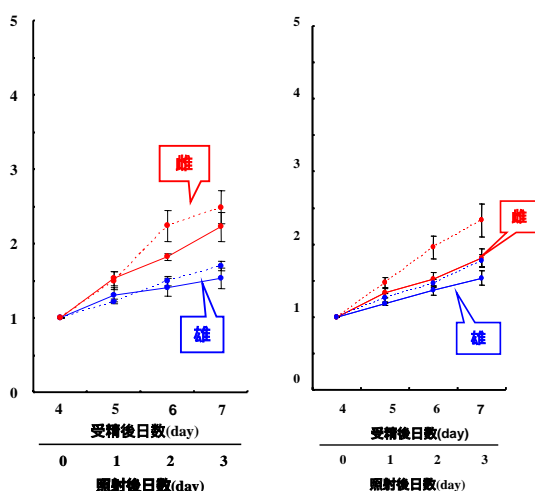
第 2 分裂中期にあたる発生段階 36 における生殖細胞の放射線感受性に *ric1* 遺伝子が関与しているのかを検討するために、両系統の胚の孵化率に影響を及ぼさない線量 (10.5Gy, 20Gy) を照射し、照射直後と 1 日後の生殖細胞量を定量した。その結果、両系統において生殖細胞への線照射による影響は観察されず、また雌雄間の放射線感受性の差も検出されなかった。発生段階 36 に 線を照射した実験では、他の発生段階に 線を照射した実験系よりも観察期間が短い。したがって、生殖細胞への照射による影響を完全に観察しきれておらず、結果として影響がないように見えている可能性がある。発生段階 36 の生殖細胞における放射線感受性を検討するには、照射による影響をより後期で検討する必要があると考えている。

### < 結論 >

*ric1olvas-GFP* 系統は発生過程で生殖細胞の放射線感受性が変化する。母性の *ric1* 遺伝子産物は発生段階 7 の生殖細胞の安定性維持に関与していると考えられる。

*ric1olvas-GFP* 系統の発生段階 7 における放射線感受性に雌雄の差は関係しない。

*ric1olvas-GFP* 系統の発生段階 33 (生殖細胞第 2 分裂開始期) の胚における放射線感受性は雌の方が雄よりも高い可能性がある。これはこの時期の雌生殖細胞の分裂がより活発であることが原因である可能性がある。



左図；発生段階 33 の olvas-GFP 系統(左)と *ric1olvas-GFP* 系統(右)の胚に 5Gy 照射後の生殖細胞量の変化率。縦軸；生殖細胞量の変化率、横軸；観察した日数を示す。