

# γ線がメダカ雄生殖細胞に及ぼす影響の解析

学生証番号 47-106329

動物生殖システム分野 柴田 崇弘

指導教員 三谷 啓志

キーワード：メダカ、アポトーシス

## 【序論】

DNAに損傷を引き起こす因子の一つに放射線が挙げられる。放射線は地球上の多くの物質から放出され、また宇宙空間から地表に到達するものもあり、それら放射線の影響により生物の持つDNAは常に損傷を受ける環境にある。一般に細胞や組織の放射線感受性は未分化であるほど高いことが知られている。放射線感受性が非常に高い組織の一つとして精巣が知られており、放射線障害として不妊がある。p53 遺伝子は一般的にガン抑制遺伝子として知られ、その重要な機能として、アポトーシス誘導、DNA 修復、細胞周期の制御などがある。本研究では、γ線により DNA 損傷を受けた際の近交系メダカ Hd-rR 系統 (Hd-rR) と p53 変異体 Hd-rR 系統 (p53(-/-)) の雄生殖細胞の応答差を解析することにより、p53 遺伝子が雄生殖細胞の品質管理に関与するメカニズムの解明を目的とした。

## 【結果および考察】

### 精子の形態観察

精子の形態は雄の生殖能力に大きく関与していることが知られていることから、p53 遺伝子が精子の形態形成への関与を通してオスメダカの生殖能力の維持に寄与しているのか明らかにするため精子の形態観察を行った。Hd-rR オスメダカと p53(-/-)オスメダカにγ線 (5Gy) を照射し、照射 24 時間後、14 日後、31 日後に精巣を単離し、精巣細胞懸濁液を調製した。雄生殖細胞の塗抹標本を作製し、ギムザ染色した後、精子の形態を観察した。1 サンプルにつき 100 個の精子を観察し、異常形態の精子の比率を算出した。また、異常形態の精子を、いびつな頭部を持つ精子、肥大化および赤く染色された頭部を持つ精子、中片部細胞質余剰の精子、その他の異常の精子に分類した (図 1)。

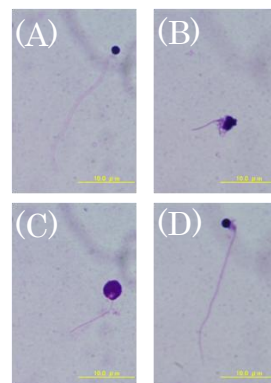


図 1、精子の顕微鏡写真

- A) 正常な形態の精子
- B) いびつな頭部の精子
- C) 頭部が肥大化し赤く染色された精子
- D) 中片部の細胞質余剰の精子

他の異常の精子に分類した (図 1)。非照射時における p53(-/-)の精子の異常形態の比率は Hd-rR の異常形態の比

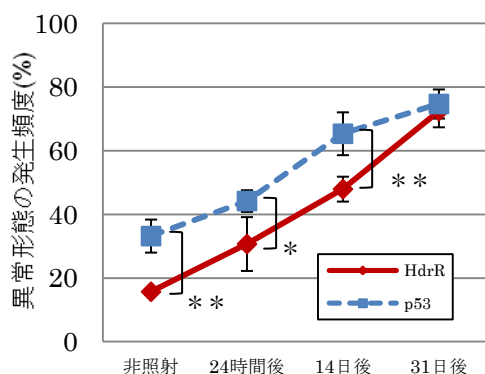


図 2、γ線 5Gy を照射し、照射 24 時間後、照射 14 日後、照射 31 日後における異常精子の発生頻度をギムザ染色により算出した。エラーバーは SD を示す。\*P<0.05, \*\*P<0.01.

率より高く、有意水準 1% で有意差が認められた (p=0.007) (図 2)。これにより、放射線が照射されていない平常時においても p53 遺伝子は異常形態の精子の抑制に寄与していることが示唆された。γ線照射により Hd-rR、p53(-/-)ともに異常形態の発生頻度が増加したことは、γ線照射による DNA 損傷が精子の正常な形態形成を阻害していることを示唆している。また、γ線照射後、時間経過とともに異常形態の発生頻度は増加した。このことは、γ線照射による DNA 損傷が生じた際の細胞の分化段階が未分化であるほどその後の分化において精子形成に異常をきたしやすくなることを示唆している。いびつな頭部の精子は照射 31 日後で顕著な増加をみせ、肥大化および赤く染色された精子は照射 14 日後で増加した (date not shown)。

### FACSによるアポトーシス細胞の解析

$\gamma$ 線により誘発されるアポトーシス応答の差を Hdr-rR と p53(-/-) の間で明らかにすることを目的とし、Hdr-rR と p53(-/-) に  $\gamma$ 線 (10Gy、5Gy、1Gy) を照射し、照射 24 時間後、14 日後、31 日後に精巣を単離して精巣細胞懸濁液とし、雄生殖細胞を PI と Annexin V-EGFP で染色後、FACS により解析した。メダカ雄生殖細胞では分化型精原細胞期にアポトーシスによりゲノム損傷を排除する機構が備わっていることが報告されており、本研究において FACS により定義されているアポトーシス細胞は分化型精原細胞であると考えられる。 $\gamma$ 線が照射されていない状況下においても Hdr-rR、p53(-/-) とともにアポトーシスの発生が認められた (図 3) ことから、メダカ雄生殖細胞において p53 非依存性アポトーシスが存在し、また、放射線非照射の平常時には p53 非依存性アポトーシスがメダカ雄生殖細胞の遺伝情報や生理機能の維持に関与していることが示唆された。 $\gamma$ 線 (10Gy) の照射 24 時間後では、Hdr-rR においてはアポトーシスの発生頻度の増加がみられたが、p53(-/-) においてはみられなかった (図 3 A)。この Hdr-rR において増加したアポトーシスは p53 依存性アポトーシスであると考えられる。その後、Hdr-rR のアポトーシス発生頻度は減少したが、p53(-/-) のアポトーシス発生頻度は逆に増加し、31 日後の時点では p53(-/-) の方がより高いアポトーシス発生頻度を示した。この p53(-/-) において増加したアポトーシスは p53 非依存性アポトーシスであると考えられる。 $\gamma$ 線 (5Gy) の照射 24 時間後では、Hdr-rR、p53(-/-) とともにアポトーシスの発生頻度の増加は見られなかったが、照射 14 日後では p53(-/-) においてアポトーシスの発生頻度の増加がみられた (図 3 B)。10Gy 照射の際と同様に、この増加したアポトーシスは p53 非依存性アポトーシスであると考えられる。1 Gy の  $\gamma$ 線照射では Hdr-rR、p53(-/-) とともにアポトーシス発生頻度の増加はみられなかった (date not shown)。

### 【結論】

本研究において p53 遺伝子がオスメダカの生殖能力の維持に貢献していることが示唆され、メダカ雄生殖細胞においては p53 依存性アポトーシスと p53 非依存性アポトーシスが存在することが明らかとなった。また、メダカ雄生殖細胞におけるアポトーシスは分化型精原細胞期において発生することが報告されていることと、 $\gamma$ 線照射後に p53 依存性、非依存性アポトーシスのそれぞれが増加するのに要する時間を考慮すると、p53 依存性アポトーシスは DNA 損傷が分化型精原細胞期において生じた場合に誘導され、p53 非依存性アポトーシスは DNA 損傷が精原幹細胞期において生じた場合に誘導されると考えられる。 $\gamma$ 線照射 24 時間後、14 日後の精子における Hdr-rR と p53(-/-) の異常形態精子の発生頻度の差は  $\gamma$ 線に由来しない DNA 損傷によるものであると考えられ、また、31 日後の精子における Hdr-rR と p53(-/-) の異常形態の発生頻度に差が認められなかったことから、照射 24 時間後、14 日後、31 日後では p53 遺伝子は  $\gamma$ 線照射により誘発される異常形態精子の抑制に寄与していないことが示唆された。

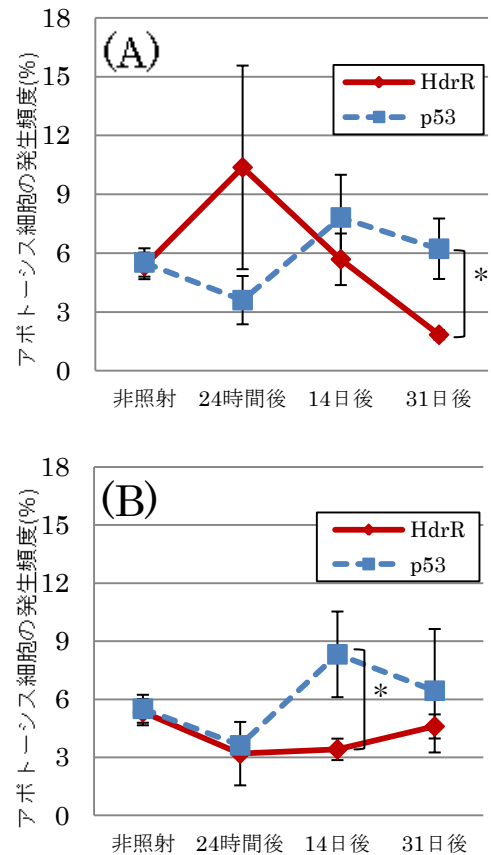


図 3.アポトーシス発生頻度の経時間的变化

(A)  $\gamma$ 線 10Gy を照射したときのアポトーシス発生頻度

(B)  $\gamma$ 線 5Gy を照射したときのアポトーシス発生頻度。

エラーバーはSDを示す。\*P<0.05。