T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	発生に応じたメダカの赤血球の数と大きさの調節
Title(English)	
著者(和文)	泰松清人
Author(English)	Kiyohito Taimatsu
出典(和文)	学位:博士（理学）, 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9929号, 授与年月日:2015年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:工藤　明,川上　厚志,立花　和則,徳永　万喜洋,山口　雄輝
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9929号, Conferred date:2015/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

平成 26 年度　博士論文

発生に応じたメダカの赤血球の数と大きさの調節

東京工業大学大学院　生命理工学研究科

生命情報専攻　工藤研究室

泰松　清人

指導教官　工藤　明教授

目次

要旨 ... 3

1.1 赤血球について ... 6

1.1.1 赤血球の数と大きさの制御の必要性について ... 6

1.1.2 赤血球形成について ... 7

1.1.3 赤血球の数と大きさの制御のメカニズムについて ... 7

1.2 血管形成について ... 8

1.3 細胞の大きさの制御について ... 8

1.3.1 細胞の大きさの制御の概観 ... 8

1.3.2 細胞の大きさと細胞周期制御 ... 9

1.3.3 細胞の大きさとゲノムサイズ ... 10

1.4 細胞周期の進行を制御するメカニズムについて ... 10

1.4.1 細胞周期の概観 ... 10

1.4.2 細胞周期を駆動する **Cyclin/CDK/CKI** ... 11

1.4.3 **Cyclin/CDK/CKI** を制御する **Rb/E2F/TFDP** ... 11

1.4.4 **TFDP** ファミリー ... 12

1.4.5 細胞周期制御による細胞の倍数体化 ... 13

1.5 メダカについて ... 14

1.5.1 モデル生物としてのメダカ ... 14

1.5.2 メダカにおける赤血球形成 ... 14

1.5.3 メダカにおける血管形成 ... 14

1.5.4 メダカの細胞周期制御 ... 15

1.6 本研究の目的 ... 15

第 **2** 章　材料と方法 ... 16

2.1 実験動物と飼育方法 ... 16

2.2 メダカ赤血球の分取 ... 17

2.3 赤血球の大きさの測定 ... 17

2.4 **Whole-mount RNA *in situ* hybridization (WISH)** ... 17

2.5 ポジショナルクローニング ... 18

2.6 レスキュー ... 18

2.7 ジェノタイピング ... 19

2.8 **Fluorescence-activated cell sorting (FACS)** ... 20

2.9 透過型電子顕微鏡による観察 ... 20

2.10 赤血球の染色体標本作製 ... 21

2.11 半定量 **RT-PCR** ... 21

2.12　赤血球の細胞周期阻害 22
2.13　S 期の赤血球の同定 22
第 3 章　結果 24
3.1　メダカ発生における血流の変化は 3 段階に分類できた 24
3.2　メダカにおける二次造血の赤血球形成組織は、ゼブラフィッシュとは異なる 24
3.3　*kyo* は赤血球が大型化し、発生後期において血管に赤血球が詰まるようになる変異体である 26
3.4　*kyo* において一次造血関連遺伝子群の顕著な発現異常は観察されなかった 26
3.5　*kyo* 遺伝子は細胞周期制御遺伝子 TFDP1 に同定された 27
3.6　TFDP1 は赤血球で発現していた 28
3.7　E2F ファミリー遺伝子は *kyo* において発現が変化していた 28
3.8　*kyo* 変異体のレスキューによって原因遺伝子が TFDP1 であることが確認された 30
3.9　phase ごとに赤血球の大きさは変化した 31
3.10　*kyo* の赤血球はミトコンドリアが増加していた 32
3.11　WT と *kyo* で phase ごとに赤血球数の増加は異なっていた 32
3.12　phase2 以降の赤血球は 4-8 倍体だった 33
3.13　phase2 における赤血球の染色体数は 4 倍体に相当した 35
3.14　各発生段階における赤血球は高い EdU 取り込み割合を示した 35
3.15　*kyo* の赤血球において S 期 Cyclin の発現上昇と M 期 Cyclin の発現低下が認められた 37
3.16　細胞周期阻害剤の赤血球サイズへの影響は血流中の赤血球の細胞増殖を裏付ける 37
第 4 章　考察 40
4.1　WT 赤血球の数の変化と大きさの変化の対応関係と、その生理学的意義について 40
4.2　血流中の赤血球の増殖について 40
4.3　赤血球の大きさの変化に対する核型の対応関係について 41
4.4　phase 間での赤血球の細胞周期制御の差異について 42
4.5　赤血球の倍数体化を行う細胞周期制御について 42
4.6　赤血球が 4 倍体であることの生理学的意義について 43
4.7　TFDP の機能と *kyo* の表現型について 43
4.8　メダカ胚における二次造血赤血球形成について 44
第 5 章　総括 46
第 6 章　図表 47
第 7 章　引用文献 77
第 8 章　謝辞 84

要旨

発生に応じたメダカの赤血球の数と大きさの調節

発表者氏名　泰松清人
指導教員名　工藤明

【背景と目的】

赤血球は血管系によって運ばれて全身へ酸素運搬を行い、個体の生命活動を支えている。赤血球の数と大きさは、全身の様々な長さ・太さの血管を通過するにはより小さく数が少ない方が循環しやすいが、酸素を十分に運搬するにはより大きく数もより多い方が好適である。このように血流中における赤血球の数と大きさは、個体の血管の長さ・太さに応じた適正レベルである必要があると考えられる。

成体においては、赤血球の数と大きさ・血管系の長さと太さは一定である一方で発生期においては、マウスの胚体の血流循環は、循環開始当初は背側大動脈、腹側大動脈のような太い血管が主であり、その後、より細く長い複雑な血管網が出現する。そのため、発生が進むにつれて赤血球はより長く細い血管を通過する必要が生ずるので、血流循環の保持のためには、赤血球はその血管形成レベルに応じて数と大きさの調整が必要であると考えられるが、その調整の実際はマウスが胚発生・血流観察に不向きなためかよく分かっていない。

本研究でモデル生物として用いられたメダカは、早い発生速度と透明な体を持つことから発生における血管形成と赤血球形成の関連を解析する上で好適である。本研究は、発生期における血管系の発達に伴い、赤血球の数と大きさがメダカにおいてどのように調節されているのかを明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

まず、メダカの発生における血流変化を phase1：赤血球の形成が行われるが、まだ血

流は開始していない、phase2：血流は開始したが、まだ背側大動脈や卵黄静脈のような太い単純な血管しか流れない、phase3：肝臓血管、体節間血管、中脳血管や鰓弓血管の血流が同時期に開始し成体の血流循環の基本型が出来上がる、という三段階に分類した。また、発生期のメダカ赤血球の数と大きさを観察するにあたり、当研究室の変異体スクリーニングによって得られていた赤血球が大きい *kyoho*(*kyo*)変異体を用い、野生型の赤血球と比較した。

最初に、メダカ胚を細胞浮遊液としてフローサイトメトリーにかけることで赤血球の数を測定し、次に採血して赤血球の大きさを測定した。その結果、野生型の赤血球数は phase3 の初期まで増大し続けた後に約 18000 で一定となること、一方 *kyo* においては phase2 における増殖が生じない事が判明した。大きさに関しては、phase2 から phase3 への移行に際し一過的に小型化することが明らかとなった。増殖に関して、EdU の取り込み率が赤血球数の倍増する発生時期に 70-90%と高率であったことから、血液中の赤血球が細胞分裂していることが示唆された。また M 期阻害剤コルヒチンの処理により、phase2 から 3 への一過的な小型化は細胞分裂によるものであることが判明した。

kyo の原因遺伝子は、ポジショナルクローニングにより、細胞周期の調節、特に S 期への移行において重要である転写因子 TFDP1 であることがわかった。*kyo* の赤血球の細胞周期異常を明らかにするために, WT と *kyo* それぞれの赤血球の DNA 量をフローサイトメトリーで測定した結果、①WT において赤血球の DNA 量は phase1 では 2 倍体の細胞周期制御下にあるが phase2 は 4 倍体の細胞周期制御下となり、phase3 以降は 4 倍体に落ち着く②*kyo* においては phase1 においては WT と変化がないものの、phase2 以降は 8 倍体が多数となること、が判明した。phase2 の赤血球の核型に関しては、野生型の赤血球の染色体標本を作製した結果、血管中の赤血球は 4 倍体の細胞周期制御下にあることが確かめられた。また、*kyo* の核型異常は、赤血球の細胞周期が S 期において遅延が生じているためと考えられた。S 期阻害剤アフィジコリンの処理でも赤血球の大型化が生じることから、*kyo* の赤血球の大型化は S 期の遅延により間接的に引き起こされているものと考えられた。このように、メダカの赤

血球の数と大きさは、発生における血管形成の段階に応じて、血液中の赤血球が 4 倍体の細胞周期制御下で増殖することにより調整されていることが明らかになった。

【考察と結論】

血管中における赤血球の細胞分裂については、先行研究では具体的に生理的に意味がある解明がされていない。本研究ではメダカの胚発生期全体に渡り赤血球の数と大きさを解析し、ほぼ全ての胚性赤血球の血流中での分裂と、数と大きさの調整、血管形成との関係を明らかにした。血管内の赤血球が増殖能を有することは、より早く総赤血球数を増やすこと、血流中の赤血球を一過的に小型化することに有益であると考えられる。

kyo に関しては、私が見出した血流中の赤血球の増殖により、TFDP 1 の異常の表現型が血流中の赤血球に生じたと考えられる。

また、phase2 以降の赤血球が 4 倍体であることについては、先行研究においては、2 倍体よりも 4 倍体のカエルのほうがヘモグロビン合成能が高く、赤血球数が少ないことが明らかにされている。そのためメダカ発生においては、赤血球が 4 倍体であることで低酸素濃度に適応したり、あるいは赤血球を少なくして血流を流れやすくしているのかもしれない。

今後、今回の研究で明らかになった赤血球の数・大きさ・核型の調節メカニズムが分子レベルで明らかにされることが望まれる。

【報文目録】

Proliferation following tetraploidization regulates the size and number of erythrocytes in the blood flow during developmental angiogenesis in medaka embryos, as revealed by the abnormal karyotype of blood cells in the medaka TFDP1 mutant

Developmental Dynamics 2015 May;244(5):651-68 doi:10.1002/dvdy.24259

第 1 章　序論

1.1　赤血球について

1.1.1　赤血球の数と大きさの制御の必要性について

赤血球は血流によって運ばれることで全身への酸素運搬を行い、個体の生命活動を支えている。哺乳類の成体赤血球の特徴として、その数の多さと無核であることが挙げられる。成人の総赤血球数は 20-30 兆個と見積もられており[1]、総細胞数の実に 1/3-1/2 にあたる数の赤血球が全身を巡っている。また無核であることは、全身の様々な長さ・太さの血管網を通過するための柔軟性に役だっている[2]。このように赤血球は、十分な酸素を全身に運搬するための性質を有している。

赤血球関連の疾患としては多血症や貧血などが知られている[3,4,5]。多血症は赤血球数が増大する疾患であり、末梢部の毛細血管において循環障害が生じる。二次的に形成されやすい血栓は、その形成部位に虚血・梗塞をもたらす。一方、貧血は全身への酸素供給が低下する疾患の総称であり、鉄分不足によるヘモグロビンの産生低下か、赤血球そのものの増殖障害・成熟障害によって引き起こされる。特に、巨赤芽球貧血はビタミン B12 や葉酸の摂取不足によって引き起こされるもので、直径が 2 倍程度の赤血球が生ずる[6]。大型の赤血球は骨髄から血管系へ流出しにくくなり、その結果血管中の赤血球数が減少し、貧血症状を呈する。また、血管系へ流出した大型赤血球は血栓を生ずる原因となりやすい。巨赤芽球性貧血の中でビタミン B12 不足によって引き起こされるタイプを悪性貧血と呼ぶが、これは治療法が発見される以前は致死性の病だったことの名残である[7]。

このようにヒトの成体においては、赤血球の数の増減や大きさの増大は貧血や血栓形成の原因となる。赤血球は全身の様々な長さ・太さの血管を通過するにはより小さく数が少ない方が循環しやすいが、一方で酸素を十分に運搬するにはより大きく数もより多い方が都合が良い。このことから、血流中における赤血球の数と大きさは、個体の血管の長さ・太さに応じた適正レベルである必要があると考えられる(図 1)[8,9]。

1.1.2　赤血球形成について

赤血球を含む血球を産生することを造血と呼ぶ。造血は、個体の発生・成熟過程において異なった部位において行われ、また、形成される血球の種類も造血部位によって異なることが分かっている。以上から造血は、発生期において一過的に行われる一次造血と、幹細胞の増殖と分化によって終生にわたり血球を供給する二次造血に大別される(図 2)[10]。そのため、赤血球には一次造血赤血球と二次造血赤血球の 2 種類が存在する。

マウスでは、一次造血赤血球は、E7.5 から E11 にかけて卵黄嚢において産生され、有核であるとともに二次造血赤血球と比較して大型であるという特徴を有する[11]。二次造血赤血球は、E10.5 から出生までは胎児肝臓で、そして出生後の骨髄と脾臓で産生される。成熟に際しては脱核して無核となり、血流中に流出する。E10.5 以降の胚体の血流中においては、一次造血赤血球と二次造血赤血球が混在しており、E16.5 までは血流中において有核赤血球が観察されるが、その後はすべて無核となる。興味深いことに、一次造血赤血球をβH1-globin を抗原マーカーとして用いた追跡と、ε-globin:GFP の Tg マウスを用いた解析によると、生後 5 日目まで血流中に無核の一次造血赤血球が残存していることが判明している[12,13]。すなわち、一次造血赤血球は血流中で脱核し、無核の二次造血赤血球を混在していた。一次造血赤血球の脱核によるダウンサイジングは、出生期における細く長い血管網に対応しているものと考えられるが、そのメカニズムはよく分かっていない[11,14]。

1.1.3　赤血球の数と大きさの制御のメカニズムについて

成体における赤血球の数と大きさの制御は、数についてはエリスロポエチンによる増殖と脾臓での破壊によって制御し一定にしていることが知られている[15]。一方で、大きさの制御は不明な点が多い。病理処見では、先述したように巨赤芽球性貧血という血流中に大型の有核赤血球が生ずる病気が知られているが、これは S 期における DNA 合成障害により S 期が進行遅延し、過剰な細胞肥大が生ずるものと理解されている。このように、赤血球の大きさは細胞周期の進行の乱れによる影響を受ける。また、胚発生期における赤血球の数と大き

さがどのように制御されているのかについては不明な点が多い[11,14]。数と大きさに限ったことではなく、マウスの胚発生においてどの部位でどのような種類や分化段階の血球が産生され、どのように移動するのかといったことは未だに不明な点が多い[16,17,18]。一般的な細胞の大きさの制御について、明らかにされていることについては後の項で述べる。

1.2 血管形成について

マウスの成体の血管系は、動脈、静脈、そして末梢の毛細血管より成っており、これらのうち特に太く重要な血管(上大静脈、下大静脈、肺静脈、肺動脈、大動脈)は大血管 great vessels と総称される。成体のそれぞれの血管の長さと太さにおいては疾患により変動しない限りは一定に保たれていることが知られている[19]。

一方、発生期においては血管形成が盛んである。発生期におけるマウスの胚体の血流循環において、循環開始当初(E8.5)は、前基本静脈、後基本静脈、総主静脈、腹側大動脈、背側大動脈（上述の大血管にそれぞれ対応）などからなる太く単純な血管系から始まる。その後 E10.5 以降において、各部位と臓器においてより細く長い複雑な血管網が出現し、全身に渡る複雑な循環網へと変化していく[20]。赤血球にとって、発生が進むにつれて赤血球はより長くそして細い血管を通過する必要が生ずるため、発生期における血流循環の保持のために、赤血球はその血管形成の段階に応じて数と大きさの調整が必要であると考えられる。先行研究において、血流開始が血管形成に与える影響が示されているが [21]、発生期における血管の長さと太さと、赤血球の数と大きさの関係性は、マウスが胚発生と血流観察に不向きなためかよくわかっていない。

1.3 細胞の大きさの制御について

1.3.1 細胞の大きさの制御の概観

正常な細胞は、通常はその細胞種固有の大きさを保っている[22]。細胞が分裂すると大きさが 1/2 になるはずであるが、分裂する前後において細胞が肥大する、すなわちリボソーム

の合成と活性化によってタンパク質合成が盛んに行われるため、細胞の大きさは一定に保たれている[23,24]。細胞が大型化する現象には、巨赤芽球性貧血という末梢血において大型の赤芽球が出現する病気が挙げられる[6]。この疾患は葉酸や内因子の欠乏により細胞分裂が阻害されるため、赤芽球が大型化するとともに成熟不全が生じる。細胞の大きさが小型化する現象として創傷治癒があり、この場合は細胞肥大のペースを細胞増殖が上回るために小型化する[23]。このように細胞は、自身の肥大と増殖のバランスを取ることによって一定の大きさを維持している[23]。

1.3.2 細胞の大きさと細胞周期制御

マウスの線維芽細胞やトリの赤芽球細胞の実験においては、S 期の遅延誘導によって細胞を過剰に肥大させた後に遅延を解除すると、その分 G1 期が短くなるために、細胞の大きさは細胞分裂が進むにつれ正常な大きさに戻ることが明らかにされている[25,26]。このように細胞の大きさは、細胞周期の各段階の肥大速度や、それに要する時間によって制御されている。以上の各段階ごとの肥大速度について、HeLa 細胞においては、S 期から G2 期にかけてが最も細胞が肥大する時期であり、一方 G1 期から S 期への移行期間が最も細胞が肥大しない区間である[27]。実際に細胞がどのように自身の大きさを認識し、肥大速度や細胞周期の各段階ごとに要する時間を制御しているのかという点に関しては、様々な仮説が立てられている。例えば分裂酵母においては、細胞の両端から中心へと濃度勾配を形成する Pom1 kinase は、間接的に CDK1 の活性を阻害することによって、小さい細胞における細胞分裂を阻害するという知見が得られている。すなわち、細胞の大きさが細胞内の分子濃度勾配によって細胞制御されるということであり、また、G2 期から M 期にかけて制御されるということでもある[28]。一方、上述のトリ赤芽球の結果からは、サイズ制御のために G1 期の短縮が行われることから、G1 期から S 期への移行のタイミングを決定する cell size checkpoint の存在の可能性が指摘されている[25,29]。このように、細胞の大きさを細胞がどう認知し、いつど

うやって制御を行うのかということに関しては、様々な生物種、細胞種を用いて解析がなされているものの、報告もまた様々であり、統合した理解は得られていない。

1.3.3 細胞の大きさとゲノムサイズ

細胞の大きさの決定について、ゲノムサイズが細胞の大きさと比例することがよく知られている[23]。同じ種類の細胞においては 2 倍体よりも 4 倍体の方が細胞が大きく、個体の大型化につながることから、4 倍体化は大きい野菜や果物を作出するための品種改良に広く利用されている[30]。また、同一の生物種内においても、倍数性を有するトロフォブラストや巨核球の方が他の細胞よりも大型である[31,32]。ゲノムサイズが大きくなると細胞も大きくなるメカニズムについては、2 つの説が提唱されている。一方は、多倍体では転写量が増加するために、タンパク質合成も結果的に盛んになるためという説である。もう一方は細胞内の DNA 量を計測し、細胞の大きさを DNA 量に比例したサイズに調節する機構が存在するという説である[33]。しかし 2012 年に、シロイヌナズナにおいては、4 倍体化処理によって細胞が大型化するかどうかは系統により異なり、必ずしも DNA 量の増加は細胞の大型化には結びつかないと報告された[34]。このように、ゲノムサイズと細胞の大きさの関係性については不明な点が多い。一方で本研究のターゲットである赤血球に関しては、様々な脊椎生物のゲノムサイズと赤血球の大きさを計測した報告が存在する[35]。その報告では、赤血球の大きさとゲノムサイズが比例することが実際の統計データから示されていることから、少なくとも赤血球においてはゲノムサイズと細胞の大きさは相関していると考えられる。

1.4 細胞周期の進行を制御するメカニズムについて

1.4.1 細胞周期の概観

細胞が DNA 量を倍加させ、細胞分裂し、再び DNA 合成へ至る、細胞の自己複製の周期とその中の諸現象を細胞周期といい、DNA 合成期を S 期、分裂期を M 期、M 期から S 期への間を G1 期、S 期から M 期への間を G2 期と呼ぶ[36]。細胞分裂は上述したように、細

胞数を倍加させるとともに娘細胞の大きさが分裂直前の大きさの半分となる現象であるため、赤血球の数と大きさの制御を考える上で本質的に重要である。

1.4.2 細胞周期を駆動する Cyclin/CDK/CKI

細胞周期における各段階の進行においては、Cyclin/CDK/CKI が重要な役割を果たすことが知られている[36]。CDK は各段階における細胞周期の進行に関わるタンパク質をリン酸化することでその活性を制御している。CDK 自身の活性は Cyclin の結合依存的であり、また CDK 自身あるいは Cyclin・CDK 複合体は CKI の結合によるダウンレギュレーションを受ける。Cyclin/CDK/CKI は、全真核生物に共通する細胞周期進行の根幹となる分子である。

1.4.3 Cyclin/CDK/CKI を制御する Rb/E2F/TFDP

細胞周期の各段階において、適切な Cyclin/CDK/CKI が働くことが細胞周期の進行に重要であるが、Cyclin/CDK/CKI の組み合わせの変更を制御するシステムの一つが Rb/E2F/TFDP である[37,38,39,40]。E2F には典型的活性化型 E2F(E2F1-3)、典型的抑制型 E2F(E2F4-6)、非典型的 E2F(E2F7,8)が確認されている。典型的活性化型 E2F は、TFDP と結合することによって、細胞周期関連遺伝子のプロモーターに結合し、転写の活性化を行う。典型的抑制型 E2F は TFDP と結合することによって、細胞周期関連遺伝子のプロモーターに結合し、転写の抑制を行う。非典型的 E2F は、TFDP 非依存的に働き、自分たちでホモダイマーかヘテロダイマーを形成し、細胞周期関連遺伝子の転写抑制を行う。

S 期進行関連遺伝子群のプロモーターには、G1 期の細胞においては E2F4/5・TFDP・Rbl1/2 複合体が結合し転写を抑制している(図 3)[41,42]。増殖因子の刺激を受けると、まず CyclinD・CDK4/6(G1 期 Cyclin・CDK 複合体)の発現が上昇する。G1 期 Cyclin・CDK 複合体が Rbl1/2 のリン酸化を行うと、E2F4/5 と TFDP とリン酸化 Rbl1/2Rb はそれぞれ S 期進行関連遺伝子群のプロモーターから遊離する。また G1 期 Cyclin・CDK 複合体は、E2F1/2/3 複合体の Rb をリン酸化し、その結果 E2F1/2/3 が解離し TFDP と結合する。E2F1/2/3・TFDP1/2

複合体は、CyclinE・CDK2 を含む S 期進行関連遺伝子群の転写因子として働く[43]。E2F1/2/3・TFDP 複合体は自身の転写も行うため、正のフィードバックとなって G1 期から S 期への進行を行う[44,45,46]。また、E2F7・8 の転写も行う(図 4)[47,48]。S 期に移行すると、CyclinE・CDK2 によるリン酸化や SCF 複合体(skp2)によるユビキチン化を受け、E2F1/2/3・TFDP 複合体は不活性化もしくは分解される。S 期進行関連遺伝子群のプロモーターには、代わりに E2F7・8 のホモあるいはヘテロダイマーか E2F6・TFDP 複合体が結合し、転写の抑制を行う(図 5)[49]。このように、S 期進行関連遺伝子群の発現は、Rb/E2F/TFDP らによって細胞周期を通し一過的になるように制御されている。がん細胞のほとんどは Rb/E2F/TFDP のいずれかに変異を有することが知られており、細胞の増殖制御に Rb/E2F/DP は重要である[40]。ただし、上述の知見は大半が哺乳類の培養細胞によって明らかとなった知見である。一方 *in vivo* において、ショウジョウバエの 2 つある E2F の両方に変異を持つダブルミュータントは、蛹化まで生育することが明らかにされており、Rb/E2F/TFDP システムは S 期進行関連遺伝子群の発現調節に重要ではあるものの必須ではないと考えられている[50]。また、E2F ファミリーと TFDP の組み合わせが、ターゲットの遺伝子にどのような差を生ずるのか、活性制御はどのように異なっているのか、細胞種や発生段階における使い分けがどのようになっているのかは不明な点が多い[38]。

1.4.4 TFDP ファミリー

TFDP ファミリー分子は、Rb や E2F と同様に、マウスかシロイヌナズナまで広く保存された約 410AA の転写因子である[38,51,52]。E2F 結合ドメインと不完全な DNA 結合ドメインを有しており、E2F と結合することにより初めて DNA 結合能を獲得し、細胞周期を通じて上述の細胞周期制御遺伝子の転写制御を行うことが明らかにされている[53,54,55]。マウスにおいては、TFDP1 と TFDP2 の 2 種が発見されており[56]、そのうち TFDP1 の KO マウスは、胎盤のトロフォブラストが小型化しており、そのために胎盤形成不全となり致死とな

る[57]。TFDP1 の KO 細胞を移植し、モザイク胚として発生させたキメラマウスによる解析においては、その後の生育に顕著な異常は観察されていないものの[57]、キメラマウスによる解析ということもあり、本当に TFDP1 の異常が胎盤形成以降の発生において何ら影響を与えないかどうかは定かではない。

1.4.5　細胞周期制御による細胞の倍数体化

多細胞生物の体内においては通常の細胞よりも DNA 量の多い、倍数性を有する細胞が存在する。倍数性を有している細胞としては、哺乳類では肝臓のヘパトサイト、骨髄の巨核球、胎盤のトロフォブラストが代表的であり、ショウジョウバエにおいては唾液腺細胞が知られている[31,32,58,59]。これらの細胞が倍数性を有する理由としては、DNA 量が多くなることによって細胞サイズが増すことが細胞の機能的に有利であるため[31]、あるいは分裂を行わないことにより単一細胞の組織がより早く形成できるためと説明されている[60]。

倍数性の獲得メカニズムは細胞種により異なっている。S 期と G 期のみが繰り返される endocycle(植物の trichome など)、S 期のみの細胞周期となる re-replecation(がん細胞)、M 期をスキップする endomitosis(巨核球など)が知られており、これらを総称して endoreplication と呼ぶ(著者により上記と異なる表現をする場合がある)[61]。Endoreplication のメカニズムについては、ハエの唾液腺細胞の場合は、周期的な CyclinE・CDK2 の活性化が起こることが示されており、その変動は転写活性化型 E2F・TFDP による CyclinE・CDK2 の転写と、S 期に移行した際に生じる CRL4(cdt2)ユビキチンリガーゼの活性化による E2F・TFDP の分解が繰り返されるためである[62]。一方で、巨核球の endomitosis の制御については、CKI の一つである P27 の周期的な変動と MYC の活性化により endoreplication を駆動するという報告がある[63,64]。このように、倍数性を得るための細胞周期の分子メカニズムは細胞種により異なっている。

1.5　メダカについて

1.5.1　モデル生物としてのメダカ

本研究でモデル生物として用いられたメダカは、早い発生速度と透明な体を持つことから発生における血管形成と赤血球形成の関連を解析する上で好適である[65]。また、毎日産卵を行うことから遺伝学的解析にも適しており、過去に本研究室において変異体作製が行われている[66]。さらにマウスでは遺伝子の機能解析において、変異体が胎盤形成異常となって胚体における表現型が解析できなくなってしまうような場合があるが[67]、メダカは体外発生を行うことから変異体の胚発生の観察が可能である。

1.5.2　メダカにおける赤血球形成

メダカの一次造血赤血球の形態については、特徴として哺乳類の一次造血赤血球とは異なり発生を通して有核であることが挙げられる[66]。発生期における赤血球の形成部位に関しては、WISH 法による赤血球マーカーα0-globin の発現解析[68]によると、α0-globin 陽性細胞は stage(st)21 の側板中胚葉において初めて出現し、血流開始直前の st24 においては、腹側への移動が観察されている。その後 st25 で血流開始するが、st27 と st32 での発現解析では、α0-globin 陽性細胞が集団で存在する赤血球形成部位のような組織は観察されていない。ゼブラフィッシュでは、血流開始直後に二次造血組織として caudal hematopoietic tissue CHT)が出現し、各血球マーカーの発現が 6days post fertilization (dpf)まで塊状に検出される(図 7)[69,70]。以上から、メダカの赤血球形成部位はゼブラフィッシュと明らかに異なっている。そのため、メダカの発生期の赤血球を観察するには、いつから二次造血の赤血球形成が始まるのかを解明する必要があると考えられる。

1.5.3　メダカにおける血管形成

メダカの血管形成の開始期で、体節期の初期において、血球血管前駆細胞マーカーである lmo2 が側板中胚葉において発現する[68]。ロシアンブルー色素の注入による血管造影解析

[71]により、その後の血管系は、血流循環の開始時期(st26)においてメダカの血管は、背側大動脈、尾部大静脈、卵黄静脈、キュービエ管、腹側大動脈を中心に構成されている。その後 st29-30 にかけて鰓弓血管や体節間血管の形成が進み、st30 においてメダカ血管系の基本構造が出来上がるとされている。

1.5.4 メダカの細胞周期制御

本研究で議論する Cyclin/CDK/CKI システムと Rb/E2F/TFDP システムは、マウスからシロイヌナズナまで機能が広く保存されていることが明らかになっているため[38,51,52]、メダカにおいても同様の機能を有しているであろうと考えられる。ただし、メダカにおいて、細胞周期の関連遺伝子の働きがマウスや酵母とどのように異なっているのかを論じた論文はこれまでのところ存在しない。

1.6 本研究の目的

全身への十分な酸素の供給のために、血流中の赤血球は適切な数と大きさでなければならない。発生期は血管形成が盛んであり、太く単純な血管系から、より細く長い血管を伴う血管系へと変化していく。それに伴い、血流中の赤血球の数と大きさは調整される必要性があるが、マウスは胚発生や血流の観察に不向きであるため、そのメカニズムはよく分かっていない。本研究でモデル生物として用いたメダカは早い発生速度と透明な胚体を有し、発生期の血流の観察に適している。

メダカ発生において、血管血流のパターンと、それに対応した赤血球の数と大きさはどう変化し、どのような制御を受けているのだろうか。

第 2 章　材料と方法

2.1　実験動物と飼育方法

メダカは野生型として cab 系統[72]が用いられた。赤血球の同定のためにα0globin;GFP [73]の transgenic line(TG)が用いられた。胚は、29 度の山本のメダカリンガー[74]中で培養された。ただし、EdU 取り込みの際には phase1 のみ 26 度で飼育された。発生段階の区分は岩松ステージ[75]に従った。実際の発生ステージの同定は受精後の時間経過に準拠し、形態がその発生段階と矛盾しないことを確かめた上でなされた。また、各発生ステージのデータを取得する際は、その発生ステージに達した時点でなされた。主に実験に用いられた発生ステージの簡潔な説明を以下に示す。

st11　8hpf　後期胞胚期

st13　13hpf　初期嚢胞胚

st16　20hpf　後期嚢胞胚

st17　23hpf　胚体頭部形成期

st18　23.5hpf　眼胞形成期

st19　25hpf　2 体節期　体節期の始まりであり、側板中胚葉で c-myb や scl といった造血遺伝子の発現が開始し、一次造血が開始する

st24　38hpf　16 体節期　心拍開始期　卵黄上に発達した血島が観察される

st25　43hpf　18 体節期　血流開始期

st26　46hpf　22 体節期　血流循環開始期

st28　53.5hpf　30 体節期　胸びれ原基が出現する

st30　68hpf　肝臓血管血流・体節間血管血流開始期

st31　78hpf　鰓弓血管血流開始期

st35　100hpf　内蔵血管形成期

st39　173hpf　孵化期

胚全体の写真撮影においては、実体蛍光顕微鏡が用いられた(AF6000, Leica)。

2.2 メダカ赤血球の分取

メダカ胚の赤血球の分取においては、発生段階に応じて 2 通りの方法が用いられた。st22-26 の、赤血球が流れる前か流れだして間もないステージにおいては、胚の血島をピンセットでもって取り出した上で、ピンセットにより刻むことで単細胞化した赤血球を得た。st27 以降において尾端での血液循環が開始して以降は、尾端を切断して尾部大動脈から血液を流出させる事によって赤血球を得た。

2.3 赤血球の大きさの測定

赤血球の大きさを定量するにあたり、本研究においては真上から観察した際の見た目の面積(size in a visual field)を尺度とした。α0globin;GFP から分取した赤血球は、終濃度 2 μM の DRAQ5(Biostatus)によって核染色され、MAS コートスライドガラス(MATSUNAMI)の上で 5 分以上静置することによってスライドガラス上に貼り付けられた。写真撮影は共焦点レーザー顕微鏡(FV1000, Olympus)によって行われた。Photoshop(Adobe)か ImageJ（NIH のサイト http://rsb.info.nih.gov/i よりダウンロード）によって、GFP 陽性の領域の面積を細胞全体のサイズ、DRAQ5 陽性の領域の面積を核のサイズとして計測された。核膜崩壊している赤血球においても、DRAQ5 陽性の領域を核のサイズとして計測した。

2.4 Whole-mount RNA *in situ* hybridization (WISH)

メダカ胚に対する WISH は、DIG ラベルアンチセンス RNA を用いて以下のプロトコルを用いて行われた[76,77]。RNA プローブ用の鋳型 cDNA のクローニングにおいては、c-myb、lmo2、gata1、α0-globin、l-plastin、mpo1 は以下の論文に記載されたものを用いた。[68,78]。E2F3、E2F5、E2F6、runx1 の cDNA は National Bio Resource Project (NBRP)から olli63f04、

olova3o21、olsp20m12、olbr26m06 として分譲されたものを用いた。他の cDNA のクローニングは、表 1 に記載されたプライマーを用いて行われた。WISH によって染色された胚は実体顕微鏡(MZ16, Leica)によって写真撮影された。

2.5 ポジショナルクローニング

ポジショナルクローニングは、以下の論文に記載された手順で行われた [79]。メダカの多型マーカーは、マーカーB は AU169062 [80]が用いられ、他のマーカーは表 2 に示したものが用いられた。TFDP1 の cDNA のクローニングは表 1 に記載したプライマーによって行われた。

2.6 レスキュー

kyo 変異体の表現型レスキューは、TFDP1 プロモーター7kbp: mcherry-t2a-TFDP1 cDNA の DNA コンストラクトを 1 細胞期にインジェクションし、外来 TFDP1 プロモーター下で mcherry と野生型 TFDP1 をランダムに赤血球において発現させることによって行われた。

まず TFDP1 プロモーターは、開始コドンの手前から 7kbp 分を 5'-CATTTAAAAAAAACACATTATTTTATTGGAGTGG -3' (F)、 5'- GATCCAAAAGGACCGGGACAGGTATTGTTTC -3' (R)のプライマーによって、NBRP によって作製されたメダカゲノムライブラリーの GOLWFno621_k17 フォスミドを鋳型として増幅され、PCR4-TOPO ベクター(Invitrogen)にサブクローニングされ、TFDP1 promoter/PCR4-TOPO が得られた。次に野生型 TFDP1 cDNA が 5'-AAGCTTATGGCTAAAGATGCTGGTCTGATTG-3' (F) と 5'-GCGGCCGCGGGGGGTTAGGTTAGTCTTCGTCA -3' (R)のプライマーによってメダカ cab 胚由来の cDNA より増幅され、SpeIHindIII-TFDP1 cDNA-NotI/PCR4-TOPO が作成された(SpeI はベクターの配列)。それとは別に SpeINotI-mCherry-t2a-HindIII が、pT2hsp70l:mCherry-t2a-Cre^{ERt2} [81] を鋳型として 5'-ACTAGTGCGGCCGCACCATGGCCAT

CATCAAGGAGTTC -3' (F)と 5'-GGTTAAGCTTAGGGCCGGGATTCTCCTCCACGTC -3' (R)のプライマーによって増幅され、PCR4-TOPO にサブクローニングされた。SpeINotI-mCherry-t2a-HindIII は HindIII-TFDP1 cDNA-NotI/PCR4-TOP ベクターの SpeI/HindIII サイトに挿入され、結果 SpeINotI -mCherry-t2a-TFDP1 cDNA-NotI/ PCR4-TOPO ベクターが得られた。そのうえで、mCherry-t2a-TFDP1 cDNA が NotI によって切りだされ、SalI-TFDP1 promoter/PCR4-TOPO のベクターの NotI 配列に挿入され、結果 SalI-TFDP1 promoter-mcherry-t2a-TFDP1 cDNA/ PCR4-TOPO が作製された。SalI-TFDP1 promoter-mCherry-t2a-TFDP1 cDNA は 5'-CATTTAAAAAAAACACATTATTTTATTGGAGTGG -3' (F) と 5'-ATCGATCGGGGGGTTAGGTTAGTCTTCGTCA -3' (R)のプライマーによって増幅された上で SalI/ClaI によって切断され、pt2kxigΔin [82]の SalI/ClaI サイトに挿入された。これにより、SalI -TFDP1 promoter-mCherry-t2a-TFDP1 cDNA-SV40pA-BglII/pt2kxigΔin(BglII はベクターの配列)が作製された。

最後に、TFDP1 promoter-mCherry-t2a-TFDP1 cDNA-SV40pA は SalI/BglII によって切りだされ、*kyo* 胚の 1 細胞期にインジェクションされた。結果、ランダムに mCherry を全身に発現する胚が得られた。採血サンプル中の mCherry 陽性/陰性の赤血球は共焦点レーザー顕微鏡(Olympus)によって観察、写真撮影され、それぞれの赤血球の大きさが測定された。本項における PCR は KOD Fx Poolymerase (TOYOBO)が用いられた。

2.7 ジェノタイピング

kyo のジェノタイピングは、TFDP1 コーディングリージョンの第二イントロンに存在する制限酵素断片長多型(RFLP)を用いて行われた。RFLP を含む 542bp の領域は 5'-CCATCATCTCATTATGTACAAGC -3' (F) と 5'-CCAAAGTGTAAAGGCTAGCTTAGG -3' (R)のプライマーによって増幅された上で、TaqI によって消化された。この処理では WT の PCR 産物は切断されなかったが、*kyo* においては 307/235bp の断片に消化された。消化後の

PCR 断片は GR-red ローディングバッファー(BIO CRAFT)を加えられた上で 2.5%アガロースゲルによって泳動された。

2.8 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

FACS に先立ち、メダカ胚性赤血球を長時間に渡り溶血・凝血させずに培養できる培養液の検討がなされた。その結果 0.9 x PBS or HANKS balanced salt solution with 10% FCS, 10 μg/ml heparin が 12 時間以上にわたりメダカ胚性赤血球を培養できることが判明し、本項の培養液として用いられた。

メダカ胚は培養液中にてピンセットで細切れにされた上でトリプシン(和光)処理、コラゲナーゼ(タイプ 2 コラゲナーゼ、Worthington)処理が行われ、赤血球を含むメダカ胚の浮遊細胞液が得られた。DNA 量を測定する場合はさらに、終濃度 10 μM の DRAQ5 (Biostatus)を RT で 5 分、もしくは終濃度 12.5 μM の DyeCycle Ruby (DC-Ruby; Invitrogen)を 37 度で 10 分処理することにより DNA 染色がなされた。死細胞マーカーとして Propidium iodide (PI)か 7-Amino-ActinomycinD (7-AAD)が用いられた。フローサイトメーターとしては FACS Calibur か FACS Aria (Becton Dickinson)が用いられた。得られたヒストグラムからそれぞれの核型の DNA 量を類推するにあたっては ModFit (Verity software)が用いられた。DRAQ5/DC-Ruby の蛍光ヒストグラムの解釈においては、赤血球の有するヘモグロビンによって赤外蛍光の吸収が行われること[83]が考慮された。

2.9 透過型電子顕微鏡による観察

サンプルのメダカ胚は 4%PFA(PBS pH7.4 ベース)中にて、4 度 24 時間でシェーカー上において振盪しつつ固定された。固定後、1%四酸化オスミウム(PBS pH7.4 ベース)によって RT で 2 時間固定された。段階的に脱水された後にサンプルは Quetol 812 (Nisshin EM)に包埋された。サンプルから超薄切片が作製され、酢酸ウラニルとクエン酸鉛染色の後に、H7500

透過型電子顕微鏡(Hitachi)で 80 kV の加速電圧で観察された。

2.10　赤血球の染色体標本作製

染色体標本は一般に、微小管重合阻害剤により細胞分裂間期で染色体が凝縮した状態の細胞を破砕することによって作製される。細胞分裂間期で停止したメダカ胚性赤血球は、st28 の区間において 20 μM コルヒチン入りメダカリンガー中にて 29 度で培養したメダカ胚(α0globin;GFP)から採血することによって得られた。赤血球を含む 40 μl の培養液は MAS コートスライドガラス(Matsunami)上にのせられ、RT で 5 分静置されることでスライドガラス上に貼り付けられた。その後、5 μl の カルノア液が添加され、4 度 5 分で半固定された。この条件では GFP を全て変性させることがなかった。スライドガラス上の溶液が除去された後に、赤血球にカバーガラスが押さえつけられ、直後にスライドガラスごとドライアイス上に 5 分置かれることで赤血球は破砕された。カバーガラスが除かれた後に EC-4030 ホットプレート(AS ONE)において 65 度 5 分で加熱され、これにより染色体はスライドガラス上に固定された。最後に 1 μg/ml DAPI 入りグリセロールで包埋した上でカバーガラスがかけられ、共焦点レーザー顕微鏡(Olympus)による観察に供された。DAPI 陽性の塊は染色体と解釈し、GFP 陽性の染色体は赤血球由来と判定した。

2.11　半定量 RT-PCR

半定量 RT-PCR にあたって、まず phase2 の WT/kyo(α0globin;GFP)の赤血球が GFP 陽性細胞として FACS Aria によりソーティングされ、RNeasyMinikit (Qiagen)によって RNA 抽出された。全身の RNA も ISOGEN (NIPPON GENE)によって抽出された。抽出された RNA は AMV Reverse Transcriptase (Takara Bio)によって逆転写された。PCR は Ex Taq DNA Polymerase (Takara Bio)によって行われた。用いたプライマーとその PCR 条件は表 3 に記載した。内部コントロールとしてβ-actin が用いられた。PCR 産物は GR-red ローディングバッファー

(BIO CRAFT)を加えられた上で 2.5%アガロースゲルによって泳動された。PCR 産物の定量は、バンドの濃さと面積を ImageJ(NIH http://rsb.info.nih.gov/i よりダウンロード)によって解析された。

2.12 赤血球の細胞周期阻害

赤血球の細胞周期阻害は、胚ごと阻害剤処理することにより行われた。具体的には、メダカ胚は 356 μM aphidicolin か、20 μM colchicine か、0.7-1.4 mM DMSO 入り山本リンガーで 29 度にて培養された。阻害の行われた発生区間は st25-27、28-29、30 であり、それぞれの発生区間終了後に直ちに赤血球数測定、赤血球の DNA 定量、赤血球の形態観察に用いられた。

2.13 S 期の赤血球の同定

メダカ胚を 400 nM 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) 入り山本リンガーで 26 度(phase1 の場合)か 29 度(phase2、3 の場合)で培養することでメダカ赤血球にを取り込ませた。EdU 取り込みは st22 11-13som、st23 14-15som、st24、st25、st26-27、st28-29、st30、st31-32 の各発生区間に行われた。それぞれの取り込み終了直後に 10 μg/ml heparin 入り 0.9 x PBS 中で採血した上で、その 40 μl を MAS コートスライドガラス(Matsunami)上に RT で 5 分間静置し赤血球を貼り付けた。 次に 5 μl のカルノア液を添加して 4 度で 5 分静置することが 2 回行われた。さらに、40 μl の 3.6% PFA/0.9 x PBS に置換され 4 度 3 分で固定された。RT に移された上で、40 μl の PBS に置換し 5 分静置することが 2 回行われることで固定赤血球は洗浄された。その後 40 μl の 0.5% TritonX-100/PBS 溶液に置換し 10 分静置されることで固定赤血球は透徹された。50 μl の PBS に置換され、5 分静置されることで固定赤血球は洗浄された。GFP に対する免疫染色によって赤血球の同定が行われた。用いられた抗体は一次抗体が Anti-GFP rabbit IgG antibody、二次抗体が Alexa-488 conjugated, (Molecular Probes)である。最

後に click-IT EdU Imaging Kit (Invitrogen)によって赤血球に取り込まれた EdU が検出された。

染色後の赤血球は共焦点レーザー顕微鏡(FV1000, Olympus)によって観察された。

第 3 章　結果

3.1　メダカ発生における血流の変化は 3 段階に分類できた

本研究では発生に伴う赤血球の変化を解析するにあたり、まず胚発生期の赤血球特異的に GFP 蛍光を有するトランスジェニックラインα0-globin; GFP [73]を用いて、発生に伴うメダカ胚の血流変化を観察した。図 7a は GFP によって可視化された st22-st39 の WT の全身の血流を示し、図 7b はその中でも st30 と st31 の拡大図として示す。st22-24 において、GFP 蛍光は血島とその周囲に局在しており、まだ血流は開始していなかった。st25-29 においては、血流は開始したものの太い血管(背側大動脈、卵黄静脈、後脳動脈、キュービエ管など)でしか流れていなかったが、この間においては、まだ赤血球が流れていないだけで体節間血管、中脳血管、肝臓血管、鰓弓血管は形成され続けている[71]。その後 st30 において体節間血管、中脳血管、肝臓血管血流が、さらに st31 において鰓弓血管血流が生じ(図 7b)、メダカの血管血流系は基礎が完成する[71]。このことから、st30 から st31 において赤血球が流れるべき血管長が急激に伸び、またより細い血管を流れる必要性が生ずるといえる。これらの観察から、メダカの発生における血流は三段階に変化するとみなすことができ、それぞれ phase1 (st22-24、血流開始前)、phase2 (st25-29、太い血管中しか流れない)、phase3 (st30 以降、細長い血管中も流れる成熟期)とした。

3.2　メダカにおける二次造血の赤血球形成組織は、ゼブラフィッシュとは異なる

メダカの発生期における、血流の変化に対応した赤血球の数と大きさの制御を解析するにあたり、血流開始後の二次造血における赤血球形成部位の同定が試みられた。α0-globin; GFP ラインの観察(図 7a)では、st26(血流循環開始期)以降において、赤血球形成部位とみなせるような GFP 陽性細胞の密集した組織は、st37 以降の脾臓に限られた。脾臓は、マウスやヒトにおいては赤血球形成部位として知られているが[84]、同時に古い赤血球の分解の場でもあるため[85]、st37 以降の脾臓における GFP 蛍光が、新規に形成された赤血球を示している

のか、集められた古い赤血球を示しているのかは判別がつかなかった。しかし、ゼブラフィッシュにおいては、血流開始(24hpf)後直ちに caudal hematopoietic tissue (CHT、尾部大静脈と背側大動脈との間の部位における造血)で二次造血赤血球形成が開始し(36hpf)(図 6)、その後赤血球マーカーである gata1 のプロモーターを用いた gata1; RFP TG ラインや同じく赤血球マーカーであるαe-globin の WISH により、CHT において赤血球塊が観察されている[69,70]。そのため、α0-globin; eGFP ラインにおいて血流開始(st25)以降で赤血球塊が st37 になるまで観察されないことは、メダカはゼブラフィッシュとは造血部位が異なることを示唆していた。

別の方法による二次造血の赤血球形成部位の同定として、造血幹細胞マーカーである c-myb[86]と runx1[87]の WISH が st27-st35 の胚において行われた(図 8、9)。頭部においては胸腺や中脳後脳境界における発現パターンがゼブラフィッシュと相同的であったものの、runx1 においては尾部及び腎臓で一切の発現は認められなかった。c-myb においては st27-29 においては背側大動脈とマージする発現が、st31 以降では尾部大静脈より腹側での弱い発現が検出されたが、やはり CHT と騒動である尾部大静脈と背側大動脈の間と腎臓での発現は検出されなかった。これらのことから、メダカにおいては、血流開始後から st35 までの区間において CHT と相同的な部位および腎臓での造血は行われていないことが明らかとなった。しかし、明らかに発生が進むにつれ血流中の赤血球は増加していくことから、血流開始後においてどこで赤血球が増殖し血流中に供給されるのかということに関し、2 つの可能性が考えられた。

1、 CHT 及び腎臓以外の部位での赤血球形成

はっきりとした赤血球塊が検出されないというだけで、実際には c-myb や runx1 陽性である胸腺のような組織で少しずつ赤血球形成を行うという考え方。

2、 血流中の赤血球自らの造血

特定の赤血球形成部位があるのではなく、血流中の赤血球自らが増殖を行うことで血流中の赤血球を供給するという考え方。

しかし、胸腺における赤血球形成はこれまで知られておらず、血流中での赤血球の分裂もマウスにおいて示唆する報告が 2 報、散発的になされているのみであった[88,89]。そのため、メダカの造血部位、特に赤血球形成部位について大きな謎が生じた。

3.3 *kyo* は赤血球が大型化し、発生後期において血管に赤血球が詰まるようになる変異体である

発生におけるメダカの赤血球の数と大きさについて解析するために、過去に当研究室の変異体スクリーニングで得られた赤血球が大型化する変異体 *kyoho*(*kyo*)が用いられた[66]。その基本的な表現型として、st28 の WT/*kyo* において WISH によって赤血球、好中球、マクロファージを染色した像を図 10 に示す。赤血球のマーカーとしてα0-globin、マクロファージのマーカーとして l-plastin、好中球マーカーとして mpo1 が森山らの研究[68]を参考にして用いられた。その結果、3 種類の血球は共に大型化していたが、特に赤血球の大型化が顕著であった。このことは、この赤血球では好中球とマクロファージに比べて、大きさの制御と原因遺伝子の働きが異なっていることを示している。

次に、*kyo* の大型赤血球が血流に与える影響を検証するために、α0-globin; eGFP ラインを用いて発生に伴う *kyo* 胚の血流変化を観察した(図 11a、b)。phase1 で赤血球が形成され phase2 において血流が開始する時点では、図 7 に示した WT の血流と同様であったが、phase3 以降において中脳血管、体節間血管、肝臓血管、鰓弓血管において赤血球が詰まっている様子が観察された。以上の結果から、序論で述べたように、赤血球の大きさが適切に制御されなかった場合は、血流に重大な影響をおよぼすことが *kyo* の血流における表現型から裏付けられた。

3.4 *kyo* において一次造血関連遺伝子群の顕著な発現異常は観察されなかった

kyo における赤血球形成において、赤血球前駆細胞において分化制御を行う一次造血関連遺伝子群の発現に変化が生じていないか WISH による発現解析を行った(図 12)。用いた遺

伝子(lmo2, scl, c-myb, gata1) は、ゼブラフィッシュの一次造血マーカーとして用いられている転写因子であり、主に頭部側側板中胚葉(ALPM)と尾部側側板中胚葉(PLPM)で発現することが知られている[90]。赤血球を形成するのは PLPM の方である。

結果、lmo2 は WT では st18 では ALPM で発現しており、st20 では PLPM とキュービエ管の基部でも発現した。*kyo* においては、PLPM における発現が若干強かった。scl は st20 においては PLPM で発現しており、その後 st22 においては ALPM でも発現していた。*kyo* においては、ALPM での発現は検出されず、PLPM での発現も若干低下していた。c-myb は st22 においては ALPM、PLPM、キュービエ管の基部で発現していた。gata1 は st22 では PLPM において発現していた。*kyo* において、c-myb と gata1 の発現変化は検出されなかった。

このように *kyo* において赤血球形成部位である PLPM では、一次造血関連遺伝子群の顕著な発現変化は検出されなかった。このことは、用いた代表的な一次造血関連遺伝子群(lmo2, scl, c-myb, gata1)とは関連性の低い制御が *kyo* の赤血球において働いていることを示唆している。

3.5 *kyo* 遺伝子は細胞周期制御遺伝子 TFDP1 に同定された

kyo 遺伝子の同定を目的として、減数分裂時の相同組み換えを利用したポジショナルクローニングが行なわれた。責任領域は LG21 の 58kbp の区間に絞られ、その領域にあった 4 つのオープンリーディングフレームのうち TFDP1 領域のみに変異が確認された。その変異は第 2 エキソンにあり、cDNA 配列で 130 番目の C が T へ、アミノ酸配列で 44 番目のグルタミンがストップコドンへとナンセンス変異していた(図 13a)。この結果は、*kyo* において TFDP1 タンパク質が機能ドメインを全て喪失していることを示唆している(図 13b)。

その後、TFDP1 の異常と *kyo* の表現型がリンクしているのかを確認するため、まず TFDP1 の遺伝子座における多型を探索した。その結果 *kyo* の染色体において、TFDP1 の第 2 イントロンに制限酵素長多型が検出され、その多型をターゲットとしたジェノタイピングが行わ

れた。その結果、WT 胚由来の DNA からは 1 本か 3 本のバンドが生じたのに対し、*kyo* 変異体由来の DNA からは全て 2 本のバンドが生じたため、*kyo* 変異体は共通して異常な TFDP1 の遺伝子座を有していることが示された(図 13c)。

3.6 TFDP1 は赤血球で発現していた

原因遺伝子 TFDP1 がメダカの発生において実際に赤血球で発現しているのかを明らかにするために、WT の st11-st29 と *kyo* の st28、29 に対し WISH による TFDP1 の発現解析が行われた(図 14a)。WT では、st11-20 にかけて TFDP1 はユビキタスに発現していた。st22-28 にかけては全身的に発現が低下する一方で、前脳、中脳、中脳後脳境界、後脳、中線、眼胞、胸鰭原基、耳胞、体幹へと発現が局在していった。*kyo* では st28、29 において全体的に WT の同一発生段階よりも発現が上昇していた。

TFDP1 の赤血球での発現については、一連の WISH による発現解析では血管内においてその発現は検出されなかった。そのため、別の手法での検証として、FACS Aria によって分取した赤血球から RNA を抽出し、RT-PCR を行なった。st27 の WT/*kyo* の赤血球由来と全身由来の RNA に対する TFDP1 の RT-PCR の結果を図 14b に示す。WT と *kyo* の赤血球由来の RNA 双方から TFDP1 が検出された。このことから、WISH の検出レベルでは TFDP1 の赤血球での発現を確認できなかっただけで、実際には赤血球においても TFDP1 が発現していることが明らかになり、表現型のある部位において原因遺伝子と推測される遺伝子が発現していることが確かめられた。

3.7 E2F ファミリー遺伝子は *kyo* において発現が変化していた

kyo の原因遺伝子が TFDP1 であるかどうかの検証として、WISH による E2F ファミリー遺伝子群の発現解析を行った(図 15)。E2F ファミリー遺伝子群は、TFDP1 と同様に E2F・TFDP 複合体によって転写制御がされているため[44,45,46,47,48]、*kyo* において E2F

ファミリー遺伝子群の発現変化が検出されることが期待された。以下、st28 での発現解析結果を記す。

E2F1 は、st28 では、WT においては各脳の境界部、特に前脳との境界部で強い発現が見られた。胸びれ原基と尾端では弱い発現が見られた。一方、*kyo* では若干発現が減少していた。

E2F2 は、WT においては各脳の境界部、特に中脳との境界部で強い発現が見られた。胸びれ原基でも発現が見られた。一方、*kyo* ではほぼ発現が消失していた。

E2F3 は、WT においては脳全体、特に間脳と後脳で強い発現がみられた。また、*kyo* では全身的に発現が強まっていた。

E2F4 は、WT においては各脳の境界部、特に中脳との境界部で強い発現が見られた。胸びれ原基と尾端でも弱い発現が見られた。

E2F5 は、WT においては始原生殖細胞と尾端において発現していた。*Kyo* においては始原生殖細胞領域と尾端に加え、頭部でも弱い発現が見られた。

E2F6 は、WT においては頭部、特に中脳で強い発現が観察された。*kyo* では、中脳―中脳境界で発現がやや上昇していたが、発現はほぼ維持されていた。

E2F7 は、WT においては前脳、中脳、中脳後脳境界、胸びれ原基で顕著な発現が観察された。一方、*kyo* では、発現は検出されなかった。

E2F8 は、WT においては前脳、中脳、中脳後脳境界、胸びれ原基で発現が観察された。一方、*kyo* では、発現は検出されなかった。

まとめると、*kyo* において発現が変化していたのは、上昇：E2F3、低下：E2F1・E2F4、検出されず：E2F7・E2F8 であった。このように、*kyo* においては E2F ファミリー遺伝子群の発現が大きく変化していることが確認され、TFDP1 が原因遺伝子であるとすることと矛盾しなかった。

3.8 *kyo* 変異体のレスキューによって原因遺伝子が TFDP1 であることが確認された

原因遺伝子を確認するためのレスキュー実験を行った。TFDP1 プロモーター7kbp-mcherry-t2a-TFDP1 cDNA-pA の DNA コンストラクトを 1 細胞期の *kyo* 胚にインジェクションし、ランダムに TFDP1 プロモーター下で mcherry と正常 TFDP1 が発現する個体を作製し、mcherry 陽性赤血球と陰性赤血球とを比較して正常 TFDP1 が *kyo* の大型赤血球に及ぼす影響を検証した。

まず始めに、WT 胚に DNA コンストラクトを 1 細胞期にインジェクションし、この DNA コンストラクトの TFDP1 プロモーターが正常に働くのかを mcherry の発現を元に検証した(図 16a)。その結果、mcherry の発現は st11-21 にかけてユビキタスであり、その後は全体的には低下しつつ脳や体幹へと局在した。これは WISH による発現パターンの解析結果(図 14)と似ていた。そのため、この DNA コンストラクトの TFDP1 プロモーターは本来の TFDP1 プロモーターと同様に働いていると考えられた。

次に、DNA コンストラクトをインジェクションした *kyo* 胚と、コントロールとしてメダカリンガーをインジェクションした WT/*kyo* 胚を st28 において採血し、それぞれの赤血球のサイズを定量した(図 16b、c)。その結果、DNA コンストラクトをインジェクションした *kyo* 胚の赤血球では、mCherry 陽性の赤血球の細胞質と核の大きさがメダカリンガーをインジェクションした WT の赤血球とほぼ一致した。一方 mCherry 陰性の赤血球の場合は、メダカリンガーをインジェクションした *kyo* 胚と一致した。mCherry 陽性の赤血球のサイズがレスキューされ正常に戻ったことから、*kyo* の原因遺伝子は TFDP1 であることが確かめられた。また、mCherry 陰性の赤血球が大型化した状態で、mCherry 陽性の赤血球のサイズがレスキューされていることから、TFDP1 の赤血球サイズに対する作用機序は細胞外環境に対するものではなく細胞自律的な働きであることが示唆された。

TFDP1 は、典型的 E2F と結合することによって G1→S 期遺伝子群の発現調節行い、細胞周期をコントロールすることが知られている。TFDP1 KO マウスが胎盤形成不全により致死

になることから赤血球に関する表現型は報告されていない [67]。故に、本研究は TFDP1 の赤血球形成に対する役割を *in vivo* で解析した初めての報告となる。

3.9 phase ごとに赤血球の大きさは変化した

発生に伴う血流の変化に対して､赤血球の大きさはどのように対応しているのかを解析するために、まず各発生段階の WT と *kyo* の胚(α0globin; GFP)から採血を行い、DRAQ5 によって核染色をした上で、赤血球の形態観察を行った。st23、24、26、28、30、31、35 の WT と *kyo* の赤血球の、共焦点レーザー顕微鏡による形態観察の結果を図 17a に示す。赤血球の形状に関しては、WT においては発生を通して球形であり、st30 において一過的に細胞と核の大きさが小型となり、その後は、核は小さいままに赤血球全体の大きさは phase2 の状態に戻った。*kyo* では、st23 において赤血球はスライドガラス上に仮足を伸ばしており、球形となったのは st24 以降だった。その後、*kyo* の赤血球は細胞、核共に大型化していき、st26 以降はタマゴ型となった。st31 以降は大型化が止まる一方で、小型の赤血球や核のない赤血球が新たに生じた。

WT と *kyo* の赤血球の細胞と核の大きさの変化を詳細に解析するために、写真上での大きさの測定が行われた。WT と *kyo* においてそれぞれのステージ間(st23-24、st26-28、st30-31-35)で比較した結果を図 17b に示す。

まず WT の赤血球は、phase1(st23、st24)では細胞 200-550 μm^2、核 50-250 μm^2 だったが、phase2(st26、28)にかけて核が若干大型化し、細胞 200-550 μm^2、核 100-250 μm^2 で一定となった。初期 phase3(st30)においては細胞と核の大きさは若干小型化し細胞 220-400μm^2、核 90-220μm^2 となった。その後 st31 では、全体の約 80%の小型グループと約 20%の大型グループに分かれた。小型グループは、細胞は 150-400μm^2 と発生を通じて最も小型であり、核も 50-100 μm^2 と顕著に小型化した。大型グループは、細胞 250-450μm^2、核 130-180 μm^2 と、st30 に比べて細胞は若干大型化し、核はやや小型化した。その後、グループは再び一つにな

り、st35 の細胞では 350-600μm^2 と再び大型化し、核は 50-80 μm^2 とより小型化し、細胞と核の大きさの多様性は低下した。

kyo においては、st23 では赤血球の細胞 150-400 μm^2、核 50-150 μm^2 であり、奇妙なことにこの時点で WT の赤血球よりも小型だった。st24 では細胞 100-700 μm^2、核 75-300 μm^2 で、st23 から大型化するとともに、WT との大きさの差は全ステージで最も小さくなった。その後 phase2 (st26)に移行する際には、WT と同様に 50-100 μm^2 の核が消失した。以降は細胞と核は大型化を続け、phase3 初期(st30)においては細胞 750-3000 μm^2、核 50-500 μm^2 に達した。st31 以降ではより小型の赤血球や核のない赤血球が新たに生じ、細胞と核の大きさにおいて非常に多様な集団となった。

このように、*kyo* における赤血球は、phase ごとに異なる表現型を示した。細胞周期の制御遺伝子 TFDP1 の機能不全による表現型が phase ごとに異なるということは、すなわち phase ごとに赤血球の細胞周期制御が異なっていることを示している。

3.10 *kyo* の赤血球はミトコンドリアが増加していた

kyo の赤血球の表現型を詳細に解析するために、st28 の WT/*kyo* 胚に対し透過型電子顕微鏡による観察が行われた(図 18)。その結果、1 切片あたりの WT の赤血球は 0-1 個のミトコンドリアを、*kyo* の赤血球は 3-4 個のミトコンドリアを含んでいることが明らかとなった。また、*kyo* の赤血球の核膜は WT と比較して薄かった。

kyo の赤血球のミトコンドリアの増加に関しては、細胞内の代謝が活性化しているものと解釈され、phase2 における赤血球の肥大化と合致した。

3.11 WT と *kyo* で phase ごとに赤血球数の増加は異なっていた

発生に伴う血流の変化に対して、赤血球の数がどのように対応しているのかを調べるために、WT と *kyo* の各発生段階における赤血球の数をフローサイトメトリーによって測定した。発生段階別の WT と *kyo* それぞれの赤血球数の変化を図 19 に示す。

赤血球数は、phase1 の区間(st22-st24)においては、WT : 301±24(st22 11som)から 1023±42(phase2 の始まり、st25 18som)まで、*kyo*：300±25(st22 11som)から 793±53(phase2 の始まり、st25 18som)までの増加を示し、WT と比較して *kyo* の赤血球の増殖速度はゆるやかだった。phase2 の区間(st25-st29)においては、WT は 1023±42 (st25 18som)から 9175±325 (phase3 の始まり、st30)へと大きく増加したが、*kyo* においては 793±53(st25 18som)から 938±47 (st25 20som)まで増加するものの、以降の phase2 では赤血球数に変化はなかった。phase3 においては、st30 から st33 において赤血球数は倍増し(st30:9175±325-st33:17798±597)、その後は約 18000 で一定となった。一方 *kyo* においても、st30 から st36 にかけてゆっくりではあるが倍増し(st30:963±37-st36:1821±97)、その後は約 1800 で一定となった。

WT の赤血球数は、単に発生が進むと赤血球数も比例して増加するのではなく、st32 以降は約 18000 で一定となった。このことは、メダカ胚における赤血球の増殖は何らかの厳密な制御下にあることを意味している。WT の赤血球の st30-st33 での倍増については、この間に図 10b で示した一過的な小型化が生じることから、この小型化が血管内における細胞分裂によるものであることが予想された。一方、*kyo* の赤血球数の変化については、phase1 では WT と比べゆっくりとした増加を行い、phase2 では増加せず、phase3 では phase2 で増殖しなかったにも関わらず倍増する、というように phase ごとに異なった表現型を示した。phase 間で増殖に関する表現型が異なるということは、赤血球の増殖制御のメカニズムが phase 間で異なっていること、phase2 における増殖が TFDP1 依存的であることを示している。

3.12　phase2 以降の赤血球は 4-8 倍体だった

kyo の赤血球において実際にどのように細胞周期が異常となっているのかを明らかにするために、FACS による DNA 定量が行われた。実際の FACS による DNA 定量は、以下のプロトコルで行われた(図 20)。まずメダカ胚(α0globin; GFP)胚の細胞浮遊液を作製し、DRAQ5 もしくは DC-Ruby と、PI もしくは 7-AAD を加えた。GFP 陽性細胞を赤血球としてゲーテ

ィングし、一方 GFP 陰性で forward scatter height(FSCH、細胞の大きさを反映)の低い集団を 2 倍体のコントロール細胞集団としてゲーティングした。2 つの細胞集団それぞれについて、死細胞マーカーである PI もしくは 7-AAD 陰性集団を生細胞としてゲーティングした。さらに、正確な DNA 定量のためのダブレット除去として、DRAQ5 もしくは DC-Ruby 蛍光のパルス幅が低い集団をゲーティングした。蛍光のパルス幅は、蛍光を発する粒子の大きさを反映している。そのため、DRAQ5 もしくは DC-Ruby 蛍光のパルス幅が低い集団は単細胞、高い集団はダブレットであるとみなすことができる。これらゲーティング処理の結果、赤血球 2 倍体細胞集団であり、生細胞集団であり、単細胞集団の有する DRAQ5/DC-Ruby の蛍光強度のヒストグラムが得られた。DRAQ5 で DNA を染色した場合の DNA 量の定量結果を図 21a に示す。さらに結果を ModFit によって解析し、各発生段階における 2N、2-4N、4N、4-8N、8N、8-16N、デブリス(phase1 において 2N 未満、phase2-3 において 4N 未満)の DNA 量を有する赤血球の割合を計算し、発生を通した変化をグラフ化した(図 21b)。

WT の赤血球においては、WT/*kyo* の赤血球の核型は、st23 では 2N-4N だったが、st24 において 4 倍体化が生じていた。phase2 では、WT は 4-8N 赤血球は 50-65%程度存在し、4 倍体の細胞周期制御によって WT 赤血球が増殖していることを示唆する。このことは α0-globin;GFP 胚の観察(図 7)及び runx1 と c-myb の WISH(図 8、9)により得られた知見と矛盾しない。その後 phase3 においては 4N が 95%以上を占め、赤血球の増殖がほぼ生じないとする赤血球数の測定結果(図 19)と一致した。*kyo* においては、st24 では 4N 赤血球と 4-8N 赤血球が 30-40%と多数だった。その後 st25-30 においては 4-8N の DNA 量の赤血球が多数(40-65%)となった。st31-33 においては 4-8N の赤血球の割合は減少に転じ、代わって 8N 赤血球が多数(40%以上)となった。st34-st38 では、8N 赤血球の割合が減少する一方でデブリスの割合が急増し多数(40%以上)となった。このように *kyo* における各核型の赤血球の割合は、発生が進むに連れて多数派が、4N と 4-8N(st24)→4-8N(st25-st30)→8N(st31-st33)→デブリス(st34-st38)と変化していくことが分かった。この変化から、以下の 2 つの現象が示唆される：

①*kyo* の赤血球は遅くはあるものの細胞周期自体は進行していた。すなわち、細胞周期進行の遅延が *kyo* の赤血球の本質的な異常だった。②8N 赤血球の分裂によってデブリスを生じ、それが phase3 における様々な形状の赤血球となった。

3.13　phase2 における赤血球の染色体数は 4 倍体に相当した

本当に FACS での DNA 量測定の結果の通り、phase2 以降の赤血球が 4N 以上の核型であるかを他の方法で証明するために、st27 から st28 にかけて WT 胚をコルヒチン処理し、採血した赤血球から染色体標本の作製が行われた(図 22a)。コルヒチン処理で得られる染色体標本は、その細胞が分裂する直前の M 期における染色体数を示し、メダカの 2 倍体細胞の染色体数は 24 対であるので[80]、2 倍体の細胞周期の制御下ならば 48 対、4 倍体の細胞周期の制御下ならば 96 対となると考えられた。実際の染色体標本観察においては、DAPI 陽性かつ GFP 陽性の塊を赤血球由来の染色体であるとみなし、ひとまとまりで存在する染色体集団を 1 赤血球由来としてその染色体数をカウントし、群散布図としてプロットした(図 22b)。

その結果、1 赤血球あたりの姉妹染色体数は 96 対前後であり、48 対前後の姉妹染色体を有する赤血球は確認されなかった。このことは、FACS による DNA 量測定の結果と同様に、メダカ胚の赤血球が血管内において、4 倍体の細胞周期制御下で細胞分裂することを示す。

3.14　各発生段階における赤血球は高い EdU 取り込み割合を示した

さらに FACS での DNA 量測定の結果について検証するために、各発生段階においてメダカ胚に EdU を取り込ませた上で赤血球中の EdU を検出し、取り込んだ赤血球の割合を算出し、各区間において S 期を通過した赤血球の存在比を推定した。実際の実験では、EdU 検出用の染色液が赤血球の GFP を変性させてしまうので、赤血球の同定のために EdU 染色後に GFP を検出する免疫染色が行われた。

まず、本実験の代表例として、WT 赤血球における EdU 取り込み区間 st28-st29、採血時

期 st30 の EdU 検出と GFP の免疫染色の結果を図 23a に示す。取り込み区間 st28-st29 においては殆どの GFP 陽性細胞(赤血球)において EdU が検出された。このような EdU の検出実験を取り込み区間 st22 11som-st23 13som、st23 14som-15som、st24、st25、st26-st27、st28-st29、st30、st31-st32、それに対応する採血時期 st23 14som、st24、st25、st26、st28、st30、st31、st33 に対して行い、各区間における赤血球の EdU を取り込んだ割合を計測した結果を図 23b に示す。

取り込み区間のうち、st22 11som-st23 13som、st23 14som-15som、st25、st26-st27、st28-st29 は WT において赤血球数が倍増する区間である。phase1 において、取り込み区間 st22 11som-st23 13som、st23 14som-15som、st24 に対し WT の赤血球の EdU 取り込み率はそれぞれ 68%、85%、87%と推移し、*kyo* の赤血球の EdU 取り込み率もほぼ同様に推移した。phase2 においては、取り込み区間 st25、st26-st27、st28-st29 に対し WT の赤血球の EdU 取り込み率はそれぞれ 64%、82%、92%と推移したが、一方 *kyo* の赤血球の EdU 取り込み率は 66%、67%、61%とほとんど変化はなかった。phase3 においては、取り込み区間 st30、st31-st32 に対し WT の赤血球の EdU 取り込み率はそれぞれ 32%、0.2%と推移し、*kyo* の赤血球の EdU 取り込み率も同様に 21%、0.7%と大きく低下した。

st24 の WT/*kyo* の赤血球は、約 90%と高い EdU 取り込み率を示すのにも関わらず、図 19 に示したように赤血球数は WT において 914±46 から 1023±42、*kyo* において 688±70 から 793±53 と、その増加が小さいことは、図 21 において示した st24 での赤血球の 4 倍体化で説明できる。phase2(st25、st26-st27、st28-st29)においては WT の赤血球の EdU 取り込み率は徐々に上昇し、st28-st29 においては 90%以上となった。この高い EdU 取り込み率は、血流中の赤血球においても DNA 合成が生じていることを示し、図 21 の FACS、図 22 の染色体標本の知見と合致した。phase3 においては、st30 の区間において WT では赤血球が 9000 から 14000 に増殖するにも関わらず EdU 取り込み率が 30%と低いことに関しては、st30 の開始時点において赤血球が既に G2 期に移行していたか、あるいは S 期の末期であったために取り込ま

れた EdU が検出するのに十分でなかった可能性がある。

kyo においては、図 19 に示したように赤血球数が約 950 で増加が認められないのにも関わらず 65%前後の割合で EdU 取り込みが行われることは、図 21 の FACS で示された細胞周期進行の S 期における停滞で説明できる。

3.15 *kyo* の赤血球において S 期 Cyclin の発現上昇と M 期 Cyclin の発現低下が認められた

フローサイトメトリーによって明らかにされた *kyo* の赤血球の細胞周期異常の検証のために、phase2 の胚から作製した細胞浮遊液からソーティングして得た赤血球から RNA を抽出し、Cyclin・CDK ファミリーの発現解析を行った(図 24)。

その結果、phase2 の *kyo* の赤血球においては、G1 期 Cyclin である ciclinD1 の発現の大幅な上昇と、M 期 Cyclin である CyclinB1 の発現の大幅な低下が確認された。この発現変化は、FACS(図 19)と EdU 取り込み(図 23)によって明らかになった、*kyo* の赤血球が phase2 において主に S 期をゆっくりと進行していることと一致した。

3.16 細胞周期阻害剤の赤血球サイズへの影響は血流中の赤血球の細胞増殖を裏付ける

血流中の赤血球における細胞周期進行と、細胞の数と大きさの変化の関連を検証するために、細胞周期の阻害剤を処理したメダカ胚においてどのように赤血球の数と大きさが変化するのかを解析した(図 25、26)。S 期の阻害剤としてアフィジコリンが [91]、M 期の阻害剤としてコルヒチンが[92,93] 、コントロールとして DMSO が、st25-st27、st28-st29、st30 の区間において用いられた。

まず、阻害剤処理した胚の赤血球数を計測し、処理前の赤血球数と DMSO 処理した場合の赤血球数とを比較した(図 25a)。その結果、st25-27, st28-29 間の阻害において阻害前の赤血球数からの顕著な増加は確認されず、アフィジコリン及びコルヒチンがメダカ赤血球において細胞周期を阻害していることを示している。st30 での阻害においては、アフィジコリン処理の場合はコルヒチン処理の場合ほどには赤血球の増殖を阻害できなかった。このことは

図21で示したように、st30はS期(この場合は4-8N細胞)の細胞割合が著しく減少していく、すなわちS期細胞の多くはS期の末期であるため、DNA合成が十分に阻害されなかったためではないかと推察される。

さらに、阻害剤処理した赤血球のDNA量をフローサイトメトリーによって測定した結果(図25b、c)、アフィジコリン処理においては4-8N赤血球の割合の増加、コルヒチン処理においては8N赤血球の増加が確認され、それぞれS期及びM期阻害剤としての働きが確かめられた。

最後に、阻害剤処理した赤血球の形状を観察した(図26a)。その結果、アフィジコリン処理においては細胞が大型化しており、そして30-70%の細胞でDRAQ5陽性の領域がピーナッツ型となっていた。DRAQ5陽性の領域がピーナッツ型となっていたことは、染色体の分離不全を示す。このような現象はNitta らによって報告されており[91]、アフィジコリンが赤血球においてDNAの合成阻害剤として働き、S期の長期化と不十分なDNA合成の結果として染色体の不分離が生じていると考えられた。一方、コルヒチン処理においては30-50%の確率で、核膜崩壊が観察され、2核、3核、4核の赤血球も観察された。核膜崩壊の検出は、メダカの赤血球においてもコルヒチンがM期の阻害剤として働いたことを示す。多核化した赤血球が生ずるそのメカニズムは不明であるが、phase2-3の赤血球が倍数体であることと矛盾しないと考えられる。

実際に阻害剤処理を行った赤血球の、細胞と核の大きさを測定し、細胞周期の阻害によって細胞の形状にどのような変化が生じたのかを検証した(図26b)。アフィジコリン処理においては、いずれの発生区間の阻害においても細胞と核の大きさは1.5-2倍に増加していた。またコルヒチン処理においては、核膜崩壊によるDRAQ5陽性領域の増加があったものの、細胞の大きさについては処理前からの変動は認められなかった。特にst30からst31にかけてDMSO処理では小型化が生じるのに対して、コルヒチン処理ではst30からの小型化は一切認められなかった。

まとめると、アフィジコリン処理による細胞の大きさの増加は、S 期における細胞周期の停止と遅延が赤血球の大型化をもたらすことを示し、これは先行研究の結果[25,26]と一致した。また、*kyo* の赤血球肥大が S 期の遅延による二次的な表現型であることを示す。コルヒチン処理によって st30 から st31 にかけての小型化が生じないことは、この小型化が血流中の赤血球の分裂によるものであることを示す。

第 4 章　考察

4.1　WT 赤血球の数の変化と大きさの変化の対応関係と、その生理学的意義について

WT における赤血球の大きさの変化は、phase1 から phase2 への移行に際し、小型の核を有する赤血球が失われ、phase2 から phase3 への移行では一過的に細胞と核が小型化し、その後 phase3 では核が小さいまま細胞質は肥大化し細胞全体としてのサイズを回復させた。phase2 から phase3 の移行における赤血球の小型化は、赤血球数の倍増と対応し、細胞分裂によって小型化し、なおかつ数を増加させているものと解釈される。このことは、phase3 においてより細く長い血流が開始することに対して赤血球の数と大きさが対応しているものと考えられる。また、その後の赤血球も、細胞は大型化するものの核は小型であるため、細胞の大きさの割に柔軟性が見込まれるため､やはり細長い血流に対応しているものと考えた。

このように、発生における WT の赤血球の数の変化と大きさの変化は一致していた。WT における赤血球の数と大きさの変化は血流環境の変化に対応しているものと考えられた。

4.2　血流中の赤血球の増殖について

金魚を用いた赤血球の解析においては、成体から採血した赤血球においては 0.2%の確率で分裂中の赤血球が検出されることが示されている[94]。また、カエル(*Rana esculenta*)を用いた解析では、汚染のひどい地域のオタマジャクシの末梢血において 5%の割合で分裂中の赤血球が観察されており、その結果として無核赤血球が生ずることが明らかにされている[95]。これらの結果は、分裂赤血球の割合が低く、またカエルにおいては正常な状態でないため､赤血球が分裂することがあることを示したに過ぎず､本研究のメダカ赤血球の血流中での増殖とは異なる。マウスにおいては 2 つ報告がある。Chapelle らは 1969 年に、血流開始間もない E11 において血流中の赤血球でチミジンが取り込まれることを示し[89]、Sangiorgi らは 1990 年に、やはり E11 の血流由来の赤血球において、低 RNA 合成かつ 2N

の赤血球よりも高RNA合成でDNA量が2N以上の赤血球の方が多数派であることを示した[88]。しかしこれらの解析は、赤血球の血管内の増殖を示すには断片的であるとともに、単発的であり、また生理学的な意義が明らかにされていない。従って、本研究は赤血球の血管内増殖を赤血球の数と大きさの調節とし、血管形成との関連を明らかにし、変異体を用いて*in-vivo*で示した点に新規性があるといえる。

4.3 赤血球の大きさの変化に対する核型の対応関係について

本研究においては、WTにおけるphase間での赤血球の大きさの変化、*kyo*における赤血球の大型化を報告した。WTにおける赤血球の大きさの変化は、phase1からphase2への移行に際し、小型の核を有する赤血球が失われ、phase2からphase3への移行では一過的に細胞と核が小型化し、その後phase3では核が小さいまま細胞質は肥大し細胞全体としてのサイズを回復させた。phase2からphase3への移行の際に核が小型化することは、DNA量の変化と一致している。奇妙なことに、phase1からphase2への移行の際の細胞と核の大きさの変化は、一般的に細胞はDNA量が増加すると核も細胞も大型化するとされている[23]にもかかわらず、小型核を有する1割ほどの赤血球が消失するにとどまっており、細胞の大きさについては顕著な変化は観察されなかった。また、phase2の4-8N赤血球とphase3の2N赤血球の細胞サイズを比較すると、DNA量に反し、むしろわずかにphase3の2N赤血球の方が大型であり、DNA量と細胞の大きさの相関関係に反した。このことは、一般的な細胞の大きさとDNA量の関係性に対する理解には反するものの、シロイヌナズナにおいてはDNA量と細胞の大きさの相関は必ずしも成り立たないことが示されているため[34]、異常であるとまでは言えないと考えられた。

一方、*kyo*における赤血球の大きさの変化を記述すると、phase1からphase2への移行に際し、小型の核を有する赤血球が失われ、細胞も大型化した。phase2においては細胞と核の大型化が進んだ。また、phase3においては、赤血球の肥大が停止するとともに新たに小型

の赤血球や無核の赤血球が出現した。phase1 から phase2 への移行では赤血球の DNA 量は 2N-4N から 4N-8N へと推移するため、細胞と核の大きさの変化に対して合目的である。DNA 量が増加していくことは、赤血球の細胞と核の大きさの変化に対して合目的である。このように、WT の赤血球とは異なり、*kyo* の赤血球においては DNA 量と細胞の大きさの相関関係が成立していた。言い換えると、*kyo* の原因遺伝子 TFDP1 の異常により、WT の赤血球において成り立っていなかった DNA 量と細胞の大きさの相関関係が正常化したということになる。このことは、WT において DNA 量と細胞の大きさの相関関係を成立させないメカニズムが存在すること、そのメカニズムにおいて TFDP1 が重要な役割を担っていることを示唆している。

4.4 phase 間での赤血球の細胞周期制御の差異について

TFDP1 変異体である *kyo* の赤血球は、phase1 では WT と数において顕著な差は見られなかったが、phase2 においては増殖が起きず、また顕著な肥大が生じた。その後 phase3 においては数が倍化するとともに核の無い赤血球や小型の赤血球が新たに生じた。この現象は、マウス一次造血赤血球の血流中での脱核と類似しており興味深い[11,14]。また、phase2 における *kyo* の赤血球の数と大きさの顕著な異常に対し、phase1 においては、赤血球の数・大きさの変化の仕方に WT と大きな差は認められなかった。このことは、赤血球において 2 倍体の細胞周期制御下にある phase1 と 4 倍体の細胞周期制御下にある phase2 以降では細胞周期の制御メカニズムが異なっていることを示している。phase3 での *kyo* の赤血球の分裂については、phase2 においてゆっくりと S 期が進行した結果、丁度 phase3 で G2-M 期に達したということなのか、phase3 に入り TFDP1 非依存的な細胞周期制御に変化し S 期の遅延が解消されたということなのか、判別はつかなかった。

4.5 赤血球の倍数体化を行う細胞周期制御について

本研究においては、メダカ発生において赤血球が 4 倍体の細胞周期制御下で増殖すること

を明らかにした。倍数性が増していく細胞としては、ヘパトサイト、トロフォブラスト、巨核球などが知られている。これらの細胞の倍数体化に E2F/DP 複合体が関わっていることがすでに明らかにされており[96]、実際に TFDP1 のノックアウトマウスは通常より小型のトロフォブラストを生ずることが明らかにされている[67]。また、E2F1、2、3 のトリプルノックアウトマウスのトロフォブラストにおける倍数性の増加と大型の核の出現という表現型は、*kyo* の赤血球の表現型と類似している[97]。しかしながら、*kyo* において赤血球の細胞周期異常は、倍数体化の際に生じるのではなくその後の 4 倍体の細胞周期において生じていた。このことから *kyo* の赤血球は、倍数性のある細胞において異常な表現型が生じるという点では過去の E2F・DP のノックアウトマウスの知見と一致するものの、倍数体化の時期に異常が生じないという点で異なっていた。このことは、メダカ赤血球の倍数体化における細胞周期制御が既知のトロフォブラストやヘパトサイトとは異なり TFDP1 非依存的であることを示している。

4.6　赤血球が 4 倍体であることの生理学的意義について

1 つの種の中で、2 倍体の系統と 4 倍体の系統を持つカエル(*Odontophrynus americanus*)を用いた先行研究においては、2 倍体の系統と比較して 4 倍体の系統は低酸素状態において、ヘモグロビンの合成量が多く、なおかつ赤血球数の増加度が低いという結果を報告しており[98]、4N 赤血球は 2N 赤血球と比べて酸素の運搬効率が良いと考えられる。そのためメダカ発生において血流中の赤血球が 2N よりも 4N であるほうが、酸素運搬効率で優るとともに、数が少なくてすむために血管を詰まらせるリスクを減らせる可能性がある。メダカ赤血球は st32 以降は 18000 個から増加しないが、4N 赤血球は高酸素運搬能によってその一助となっている可能性がある。

4.7　TFDP の機能と *kyo* の表現型について

TFDP1 の KO マウスは胎盤形成不全によって致死となる表現型を示し、造血系の異常に

関しては解析されていない[67]。一方、ファミリー分子である TFDP2 については、マウス胎児肝臓由来の培養赤芽球における shRNA を用いた阻害の結果、赤芽球の大型化、増殖の低下が生じることが明らかにされている[99]。Chen らの解析は本研究における *kyo* の赤血球の表現型と類似性があるが、一方で赤芽球の肥大の要因については、細胞周期の S 期での停滞によって細胞が分裂しない分だけ大型化しているのではないかと論じている。一方で、細胞周期阻害剤による検証を行なっておらず、TFDP2 の阻害と赤芽球の表現型との関連については不明瞭に見受けられる。また、Chen らは、TFDP2 の阻害によって細胞周期の進行が S 期で停滞するために赤芽球が分裂しなくなると述べているが、この点は *kyo* が st30-st37 にかけてゆっくり分裂する点と大きく異なっている。この差異に関しては、以下の可能性：①有核赤血球とマウス胎児肝臓における赤芽球という細胞種の違い②*in vivo* と *in vitro* の違い③TFDP1 と TFDP2 の遺伝子機能の違い④実際にはマウス赤芽球もより時間をかけて観察すれば分裂する、が考えられる。このように、本研究は TFDP ファミリーの先行研究と比較して、*in vivo* において発生を通して観察した点に新規性があると思われる。

4.8　メダカ胚における二次造血赤血球形成について

st22-39 にかけてのα0globin: GFP TG ラインの観察及び st27-35 にかけての造血幹細胞マーカーc-myb、runx1 の WISH による解析から、少なくとも血流開始(st25)から st35 にかけてメダカ胚では赤血球形成を行わないと考えられた。この考え方は、マウスでは E7.5 において卵黄嚢で、ゼブラフィッシュでは 48hpf において CHT で二次造血赤血球形成を開始して以降は、成体期まで赤血球形成が連続的に行われるのとは大きく異なっている[10]。

しかし、赤血球数の計測からメダカは胚発生において赤血球形成を st32 以降は行わないことが明らかとなった。このことは、マウスやゼブラフィッシュとは異なり成体期へと続く赤血球形成が発生期に行われないことを示している。さらに、血流中の赤血球の高い EdU 取り込み率のから、大半の赤血球は血流中にて細胞増殖を行うことが示された。

以上の結果から、メダカ胚の赤血球形成においては、血流開始(st25)以降は血流中にて赤血球が分裂し、そして st32 までに形成した約 18000 個の赤血球によりその後の発生における酸素運搬を行うと考えられた。特定の造血組織を持たない代わりに血流中で十分に増殖するというシステムは、赤血球の分裂によって大きさを調整する機構に活かされており、合理的であると考えられる。しかし、*kyo* の表現型の重篤さや、ヒトにおいても白血病が重大な疾患となっていることから[100,101]、血流中の赤血球を盛んに増殖させるメダカ胚の戦略は、血流中の赤血球において細胞周期異常が反映されやすいというリスクを抱えていると考えられる。

第 5 章　総括

本研究は、まずメダカ発生における血流の変化を三段階に分類した上で、その段階ごとに赤血球の数と大きさが調節されていることを示し、最終的にその調節が血流中における 4 倍体赤血球の分裂によるものであることを明らかにした。WT/*kyo* の赤血球の細胞周期制御の概要を図 27 に示す。phase3 の始めに赤血球が分裂によって小型化し、なおかつ数を増加させることは、血流がより細く長くなっていくことと対応していると考えられ、全身に酸素を運ぶ上で役立つと考えられる。また、血流中の赤血球が肥大化、減少し多数の血栓を生じる変異体 *kyo* の原因遺伝子は細胞周期の調節遺伝子 TFDP1 であり、その表現型は、血流中の赤血球の細胞周期進行の遅延によって二次的に生ずるものであることが判明した。血流中の赤血球において細胞周期異常の表現型が生ずることは、すなわち血流中の赤血球が増殖していることを裏付けていると考えられる。また、これらの解析の過程で、メダカの造血部位がゼブラフィッシュやマウスと大きく異なっていることが示された。今後、メダカ赤血球の細胞周期の制御メカニズムを分子レベルで解明するとともに、メダカの造血部位の移動の全容を明らかにすることが期待される。

第 6 章　図表

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
scl	ACGCTCGAATGGTCCAACTGAGC	GAGTCCTGGTCTTCCATGAAGCTC
TFDP1	ACGGCTAGCTGAAAGGGAGTGA	GGGGGGTTAGGTTAGTCTTCGTCA
E2F1	GACTTTGAGACTCTGCTGAACTCC	CCTCCAGACCAAAGTGATAATCG
E2F2	ATGATGCGGGTGCCTAAA	TCAGCTCCTCAACAAGTCACC
E2F4	CCGACTGCTCCTTCATTGAA	TGTGCCTATCCTCAACCTCTGA
E2F7	CTGATGGATGTGAAGTGCGTGACGC	CACCATAAAGTGGCCTGGGGGCAC
E2F8	ATGGGTCCCCTTTCCACACCTAAG	TCACCCATCATAAATTAAACCCATC

表 1 WISH 用 cDNA のクローニングのためのプライマー配列

Primer name	Restriction enzyme	Forward Primer	Reverse Primer
A	MspI	CAGAAACAACAAACTATTGAAAAAG	CAAACCTCATATTTACCTTCTTGG
C	MspI	CTTTTCCCGCTTTAGCATTGAG	CTGCTTGAAATTTGCTCTTGG
D	TaqI	CATACAGAGAGCACCCGGAG	GCTTTTGAACATATTGCTGGTG
E	EcoRI	ACAGGGTGAAGTCAGAGCAAG	GAGTGAAAACAGTCTACGCCAAAG
F	DraI	GAAACTTAAAGGTGCGCGTG	CTTTCCCCCTCCCTAGATGTTC
G	TaqI	GCAGCAAGACGTTTTTGTATGAG	CATACAACACAAGCTCAAACCAAG
H	PstI	CATCAATTCTTTGTGTGGGC	CTGCAAACATTAACACGAACG
I	HinfI	GGACCTGCAGTATGTACAC	CAACTTCTGAGGCAATAGG
J	HindIII	CCAGTAGATATGAAAGGGCGTTG	GGATTTCGTAGTGATGTAAGGATGAC
K	PvuII	GCTTAAACCCGTTATCTAGTATGTGTG	GCTAACACACCTGGAATGAAAGAC
L	PvuII	GTTTGTTCAGTAGGTCCGTAAAATG	CTTTTTTAGGTTTGCATTATCACTCTG
M	TaqI	CCTACCATCAATCTCCCTTAAATC	CAACAAGGTACCCACAATCAG
N	EcoRV	GATGTACGAATAAAGCACTCAAAG	CCAGGTCTCCATATTTTAATAGTTTG

表 2　*kyo* の責任領域同定のための RFLP マーカー

Gene	Annealing temperature (°C)	Cycle number	Forward Primer	Reverse Primer
β-actin	55	23	GAAGAGCTATGAGCTGCCTG	GAGTATTTACGCTCTGGTGGG
CyclinA2	55	31	AATCCTTGGCAGAGATGACG	AATACATCAACAACAAGCAGG
CyclinB1	60	31	AAGATCGAGCTACCAAAAGCTG	TGAGGATGACATCTGAAAATGC
CyclinD1	55	35	CCAACTACTTCAAGTGTGTTCAG	CACTGATAAAAATCTGTCCAAATAG
CyclinE1	60	34	GAGAGGAGCAGAAAGAGGAAG	CACGAATATGTTGTGGAAGTTG
CDK1	55	31	GAGAGTGAGGAGGAGGGAGTTC	GGGATGCTATCCAGGTACTTCTT
CDK2	55	31	TGAGATCGATCAGTTATTCAGGA	TTTGGGTCATATTTCAGCATTTC
CDK4	55	31	ACTGATGTTACCGTGTCCAGAAA	GTCCTGGAAGTACGGATGCTC
CDK6	55	34	CCAAAACATCCTGGTCACTAGC	GGTGTAGCATAACTGGACTGGAG
TFDP1	60	31	TGGCCAAACAGCTACTACCC	GAGTGAGGAACTGGGAGCTG

表 3 半定量 RT-PCR プライマーの配列とサイクル条件

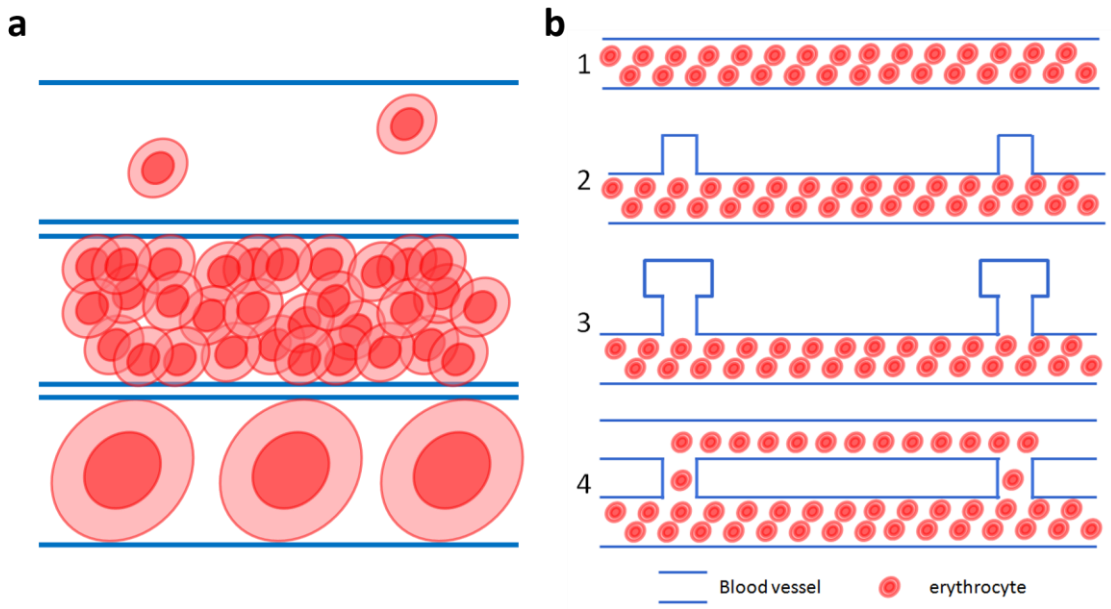

図 1 発生期における赤血球の数と大きさの制御の必要性

(a)血管内を流れる異常な赤血球の図。一番上の図は、赤血球が少なすぎる状態であり、酸素運搬が十分に行われず貧血となる。真ん中の図は、赤血球が多すぎる多血症の状態であり、血流の停滞や血管の詰まりをもたらす。一番下の図は赤血球が大きすぎる巨赤芽球性貧血の状態である。巨赤芽球性貧血は、大きすぎる赤血球が骨髄から血管中に流出するのに失敗するために全体的には貧血症状となるが、大きすぎる赤血球が血流中に流出した場合、やはり血管の詰まりの原因となる。(b)体節間血管の形成と体節間血管血流開始の図。体節間血管は 1→2→3→4 の過程で形成され続けるものの、実際に体節間血管血流が生じるのは血管同士がつながってからである。そのため、血管の長さは 1→2→3→4 の過程で伸び続けるものの、赤血球が流れている血管の長さは、3→4 の過程で急激に伸びることとなる。

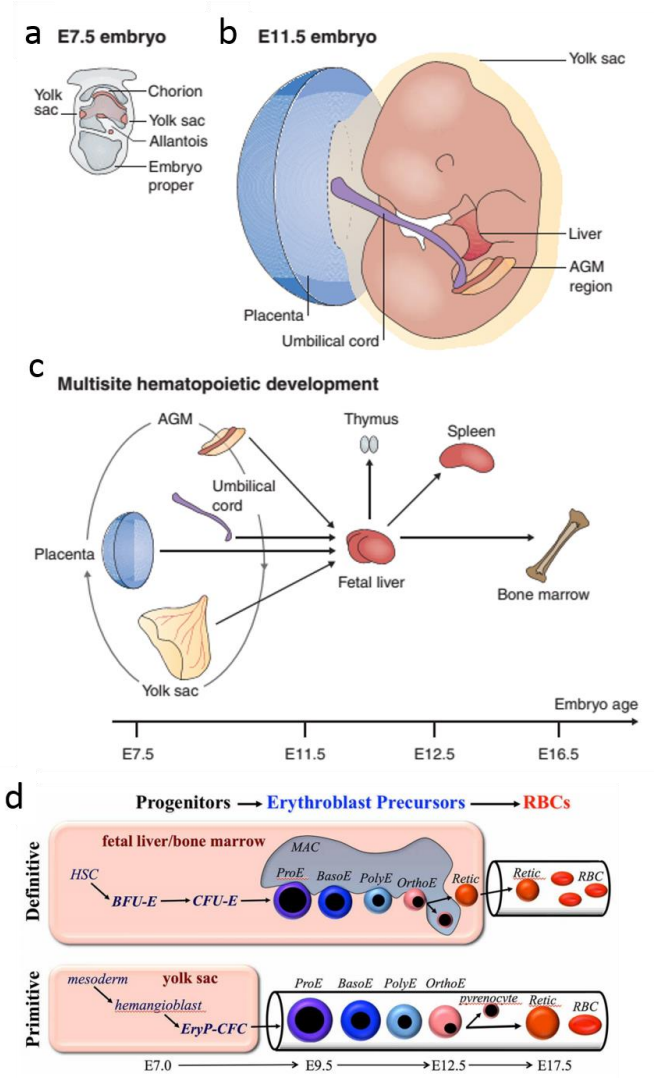

図 2 マウスにおける造血部位の発生に伴う移り変わり

(a、b) マウスにおける造血部位の発生に伴う移り変わり。E7.5 では卵黄、その後 E11.5 では胎児肝臓と AGM(aorta gonad mesonephros region)と胎盤において造血が行われる。 (c) マウスにおける造血部位の発生に伴う移り変わりの概略。出生後は、胸腺や脾臓、骨髄で造血を行う。(d)マウスにおける赤血球の分化、成熟の概略。一次造血赤血球も二次造血赤血球も、最終的には脱核を行い成熟する。HSC:造血幹細胞、BFU-E:前期赤芽球系前駆細胞 CFU-E:後期赤芽球系前駆細胞、EryP-CFC:原始的赤芽球前駆細胞、Pro-E:赤芽球、Baso-E、塩基性赤芽球、poly-E:多染性赤芽球、Ortho-E:正染性赤芽球、Retic:網状赤血球、RBC:成熟赤血球、MAC:マクロファージ、pyrenocyte:赤血球核が薄く細胞膜に包まれた血球。図 2a、b、c は文献[84] より、図 d は文献[11]より引用。

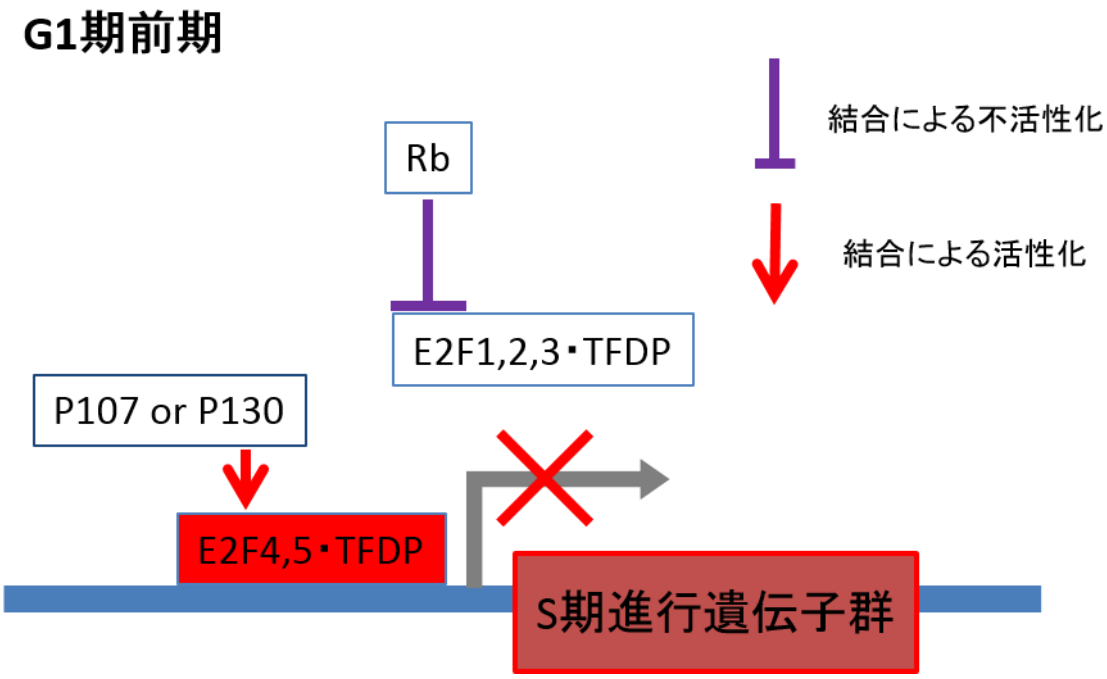

図 3 G1 期前期における E2F・TFDP 複合体の働き

転写活性化型 E2F1,2,3 は Rb によって不活性化されている。転写抑制型 E2F4,5 は P107 か P130 により活性化され、TFDP と二量体を形成した状態で S 期進行遺伝子群の転写を抑制している。

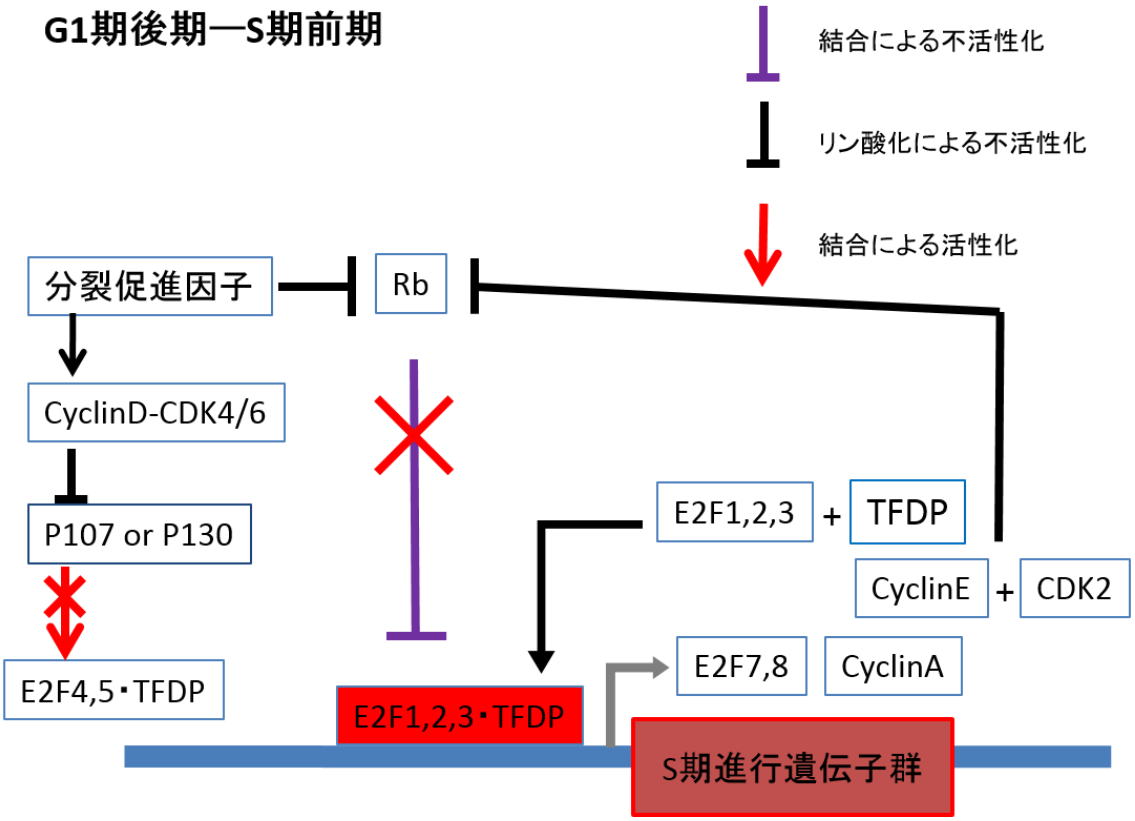

図 4 G1 期後期から S 期前期における E2F・TFDP 複合体の働き

分裂促進因子により cyclinD-CDK 複合体が活性化すると、P107、P130 をリン酸化し、結果 E2F4,5-TFDP 複合体は不活性化し S 期進行遺伝子群のプロモーターから離れる。CyclinD-CDK 複合体は Rb もリン酸化し、それにより E2F1,2,3-TFDP 複合体は活性化し S 期進行遺伝子群を転写する。転写産物には cyclinE と E2F1,2,3、TFDP が含まれており、正のフィードバックが生じて急激に S 期進行遺伝子群の発現が進み、細胞周期は G1 期から S 期へと移行する。

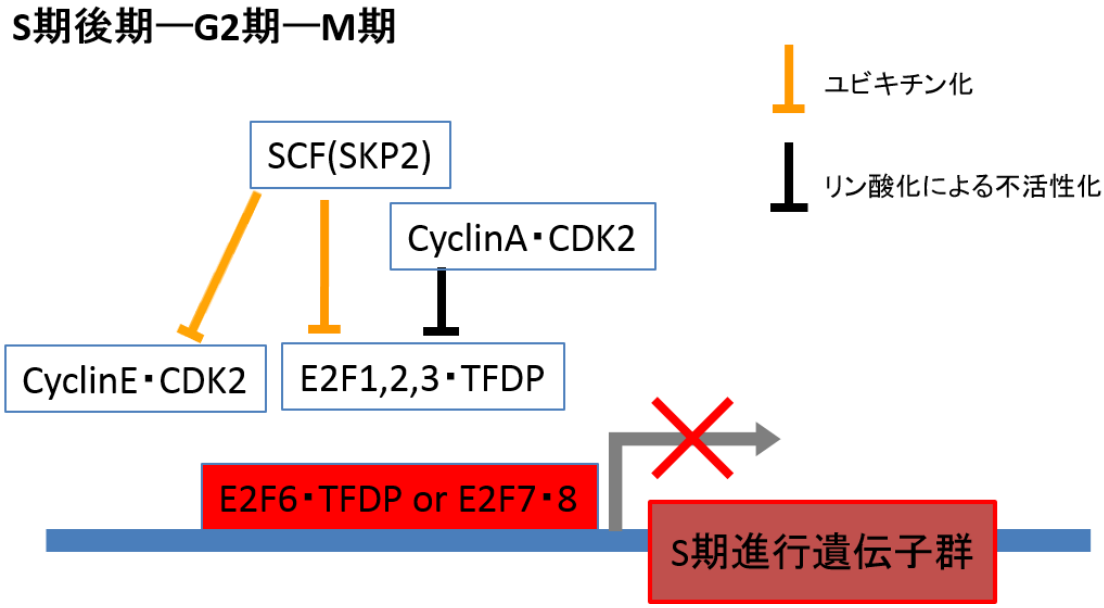

図 5 S 期後期から M 期における E2F・TFDP 複合体の働き

S 期に入ると SCF(skp2)による CyclinE の分解が進み、cyclinA の働きが支配的となる。E2F1,2,3 は CyclinA-CDK 複合体によるリン酸化を受け不活性化するか、SCF(skp2)によるユビキチン化を受け分解される。S 期進行遺伝子群のプロモーターには E2F6-TFDP か E2F7・8 複合体が結合し、転写を抑制する。

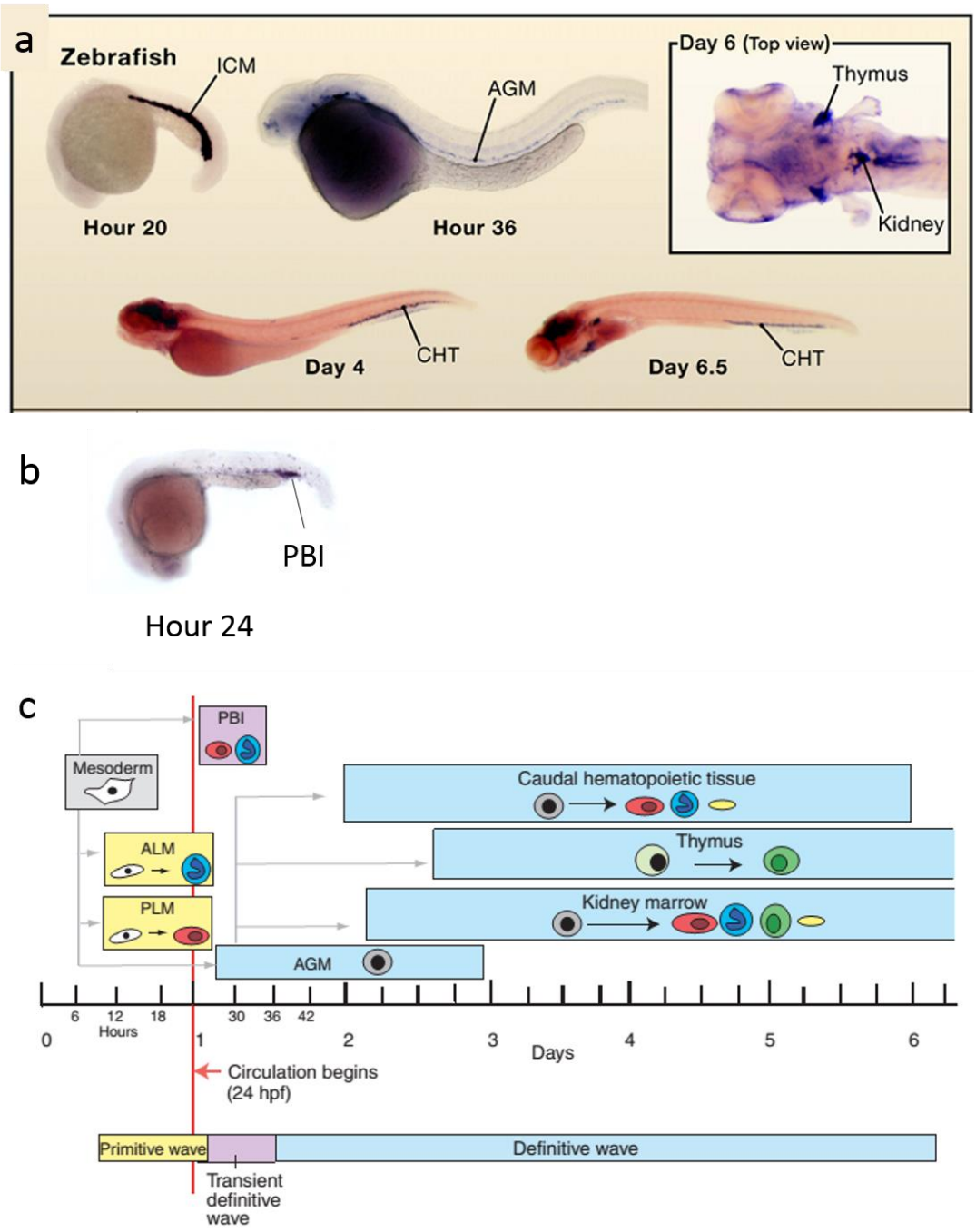

図 6 ゼブラフィッシュにおける造血部位の発生に伴う移り変わり

(a、b)ゼブラフィッシュにおける造血系細胞マーカーの WISH による各発生段階における発現部位の同定。Hour 20 胚は赤血球マーカーgata1、Hour24, 36, Day6 胚は造血幹細胞マーカーc-myb、Day4, 6.5 胚は造血幹細胞マーカーscl を対象とした WISH による染色胚である。ICM : intermediate cell mass、AGM : aorta-gonad-mesonephros region、CHT ; caudal hematopoietic tissue, PBI: primitive blood island。 (c) ゼブラフィッシュにおける造血部位の発生に伴う移り変わりの概略。図 6a は文献[10]より、図 6b は文献[86]より、図 6c は文献[102]より引用。

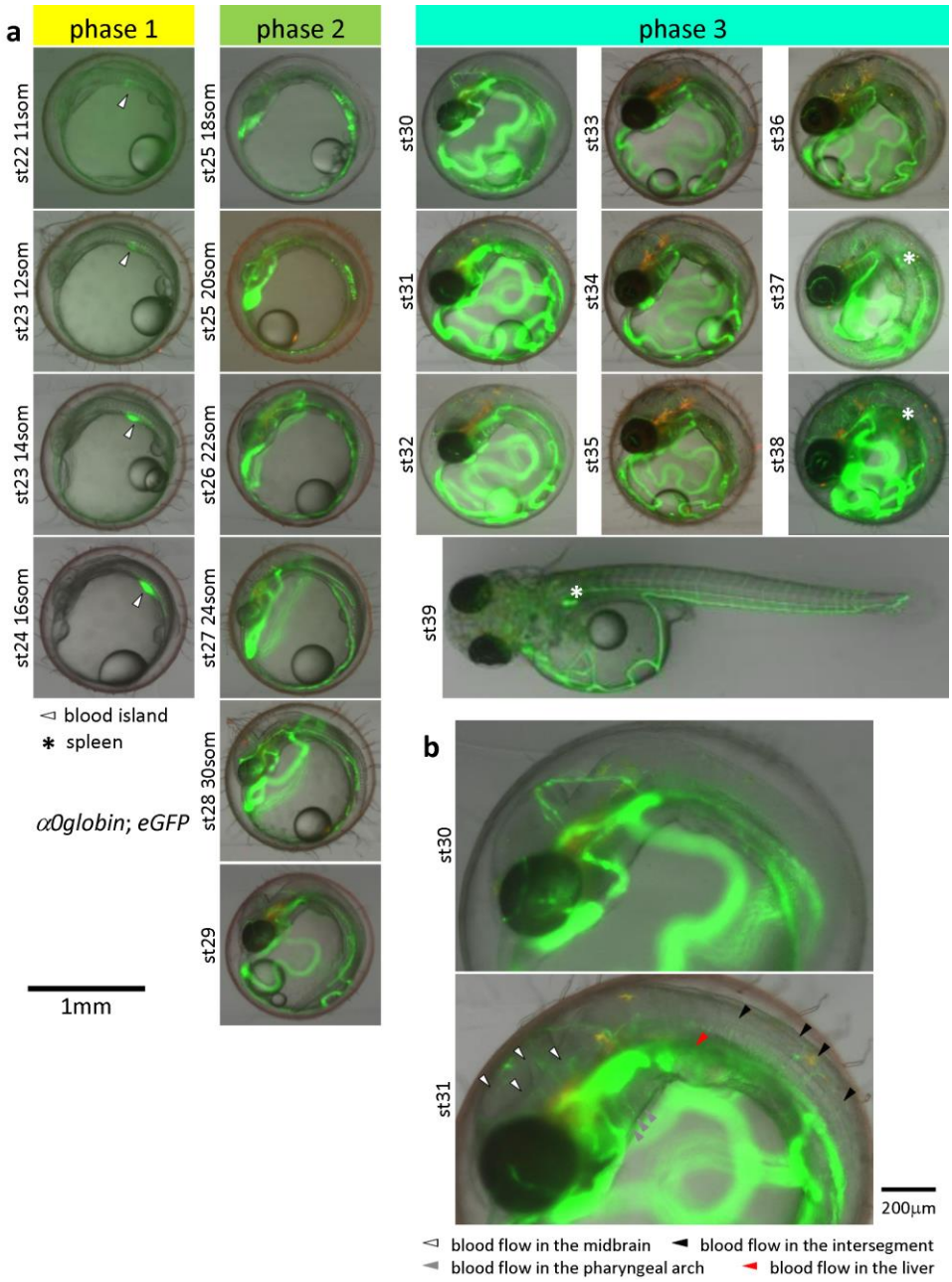

図 7 メダカ胚(WT)における赤血球の分布の変化

(a)WT メダカ胚(α0-globin; GFP)を st22 から st39 にかけて蛍光顕微鏡で観察した。phase1(st22 11som- st24 16som)においては血島(白矢頭)とその周囲にしか赤血球は存在しなかった。phase2(st25 18som- st29)においては血流が開始したが、赤血球が流れる血管は背側大動脈や卵黄静脈のような大血管に限定された。phase3(st30-)においては、st30 で体節間血管・中脳血管・肝臓血管血流が、さらに st31 において鰓弓血管血流が開始し、メダカの血流パターンの基本形が出来上がった。st37 以降においては、個体により程度の差があったが、新たに脾臓(*)で赤血球集団が観察された。赤い蛍光は色素細胞を示す。(b)st30 と st31 の WT メダカ胚(α0-globin; GFP)の血流パターンの比較である。st30 の区間内において体節間血管血流(黒矢頭)・中脳血管血流(白矢頭)・肝臓血管血流(赤矢頭)が、さらに st31 の初期において鰓弓血管血流(灰矢頭)が開始した。

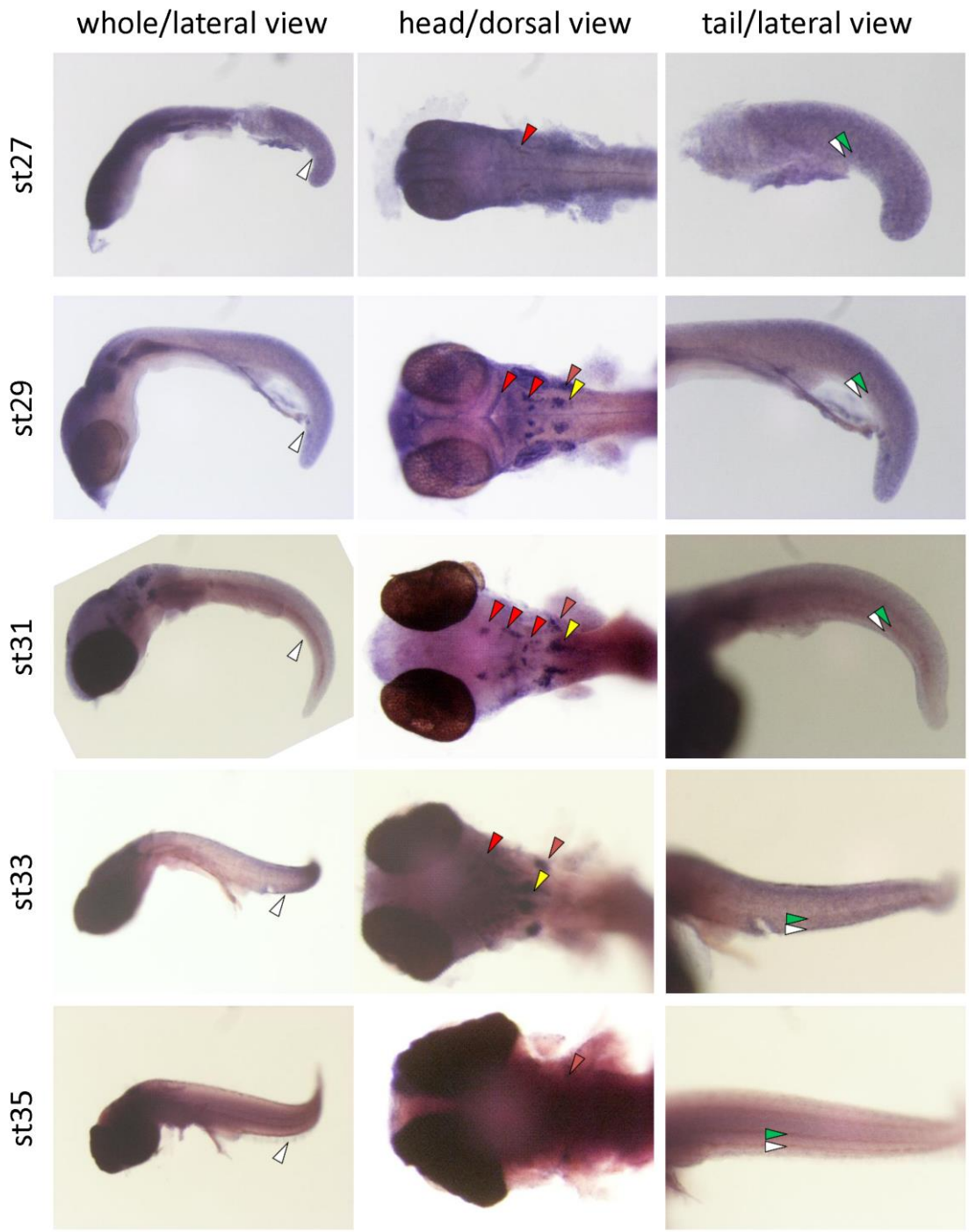

図 8 メダカ胚(WT)における runx1 の発現変化

WT メダカ胚の st27,29,31,33,35 における WISH による runx1 発現の検出。卵黄を除去し撮影した。尾部においては、背側大動脈(緑矢頭)、尾部大静脈(白矢頭)含め一切の発現が検出されなかった。頭部においては、st27-st31 にかけて中脳後脳境界(赤矢頭)で、st29 以降で胸腺(茶矢頭)で発現が検出された。また、st29-31 において後脳(黄色矢頭)における発現が検出された。これらの写真は角度、輝度、バックグラウンド補正が行われた。縮尺は同一ではない。*N*=5-10。

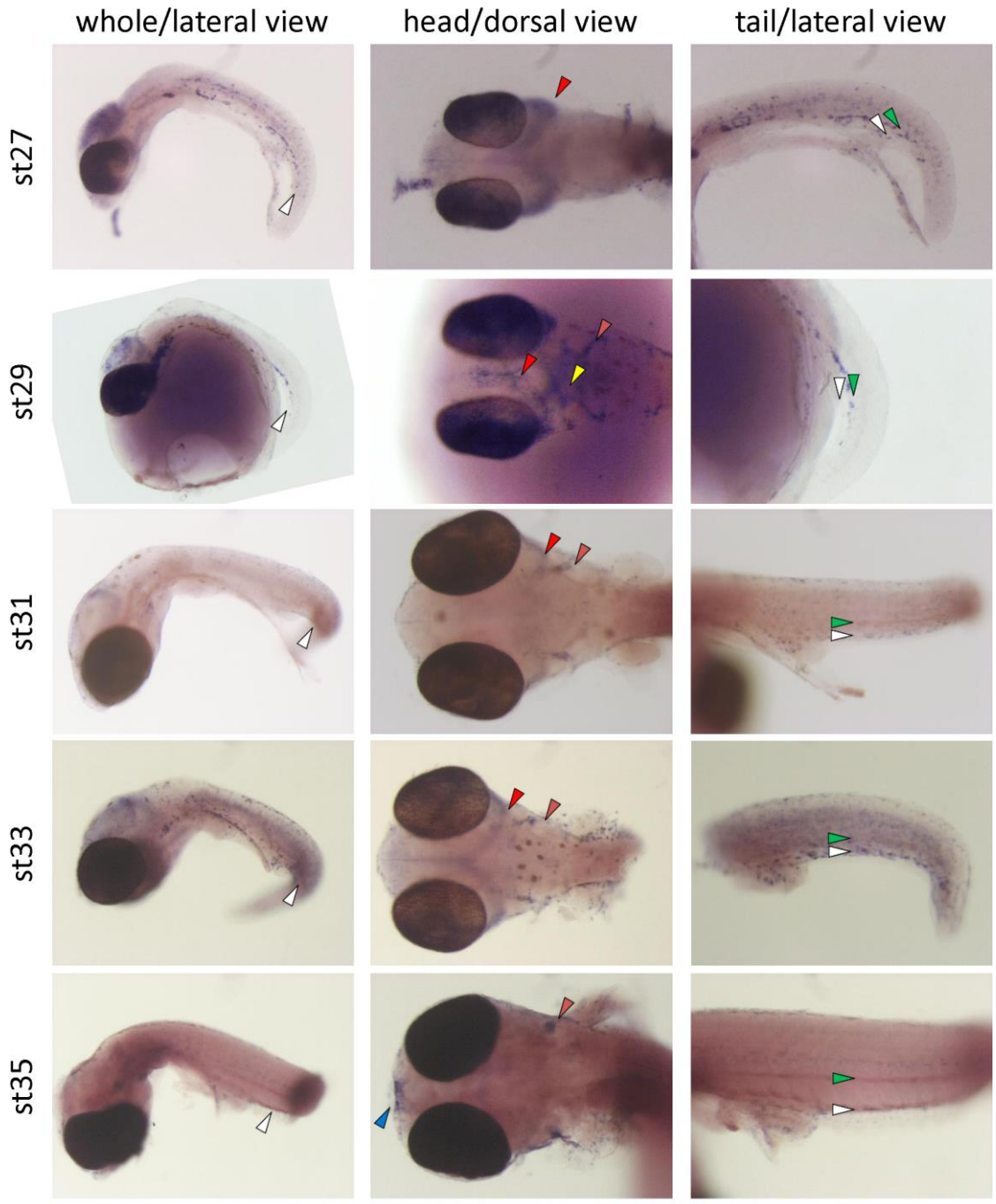

図 9 メダカ胚(WT)における c-myb の発現変化

WT メダカ胚の st27,29,31,33,35 における WISH による c-myb 発現の検出。st29 胚以外は卵黄を除去し撮影した。尾部においては、st27、29 においては背側大動脈(緑矢頭)で発現が検出されるが、その後のステージでは検出されなかった。st31、st33、st35 においては、尾部大静脈(白矢頭)の腹側で弱い発現が検出された。頭部においては、st27-st33 にかけて中脳(赤矢頭)で、st29 以降で胸腺(茶矢頭)で発現が検出された。また、st29 において後脳(黄色矢頭)、st35 においては歯部における発現が検出された。これらの写真は角度、輝度、バックグラウンド補正が行われた。縮尺は同一ではない。*N*=5-10。

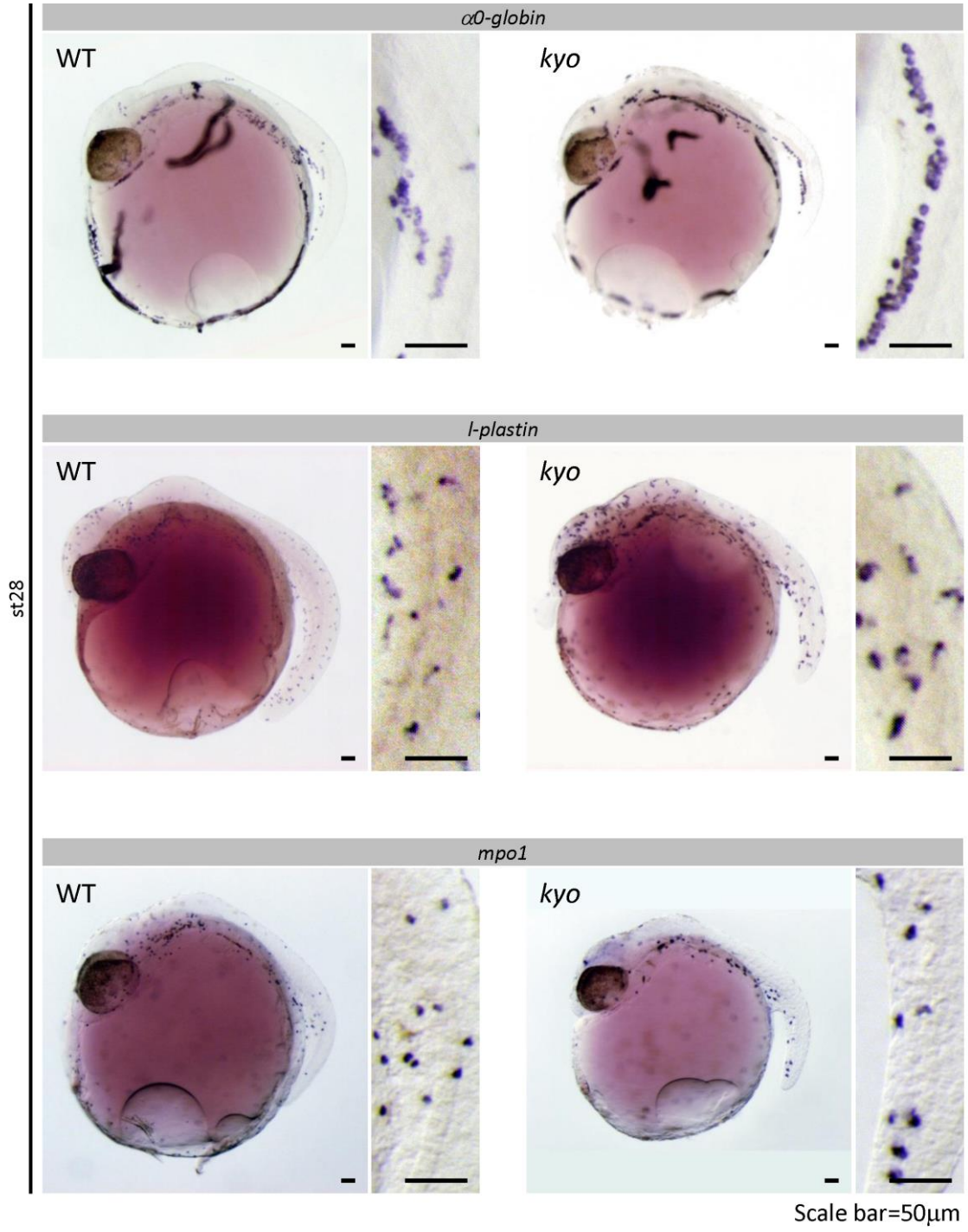

図 10 *kyo* における分化した血球の表現型

St28 の WT・*kyo* 胚に対して血球マーカー(α0-globin、mpo1、l-plastin)の WISH を行い、それぞれの血球(赤血球、好中球、マクロファージ)の形態を比較した。*kyo* においてはいずれの血球も明らかに大型化していた。これらの写真は角度、輝度、バックグラウンド補正が行われた。*N*=5-10。

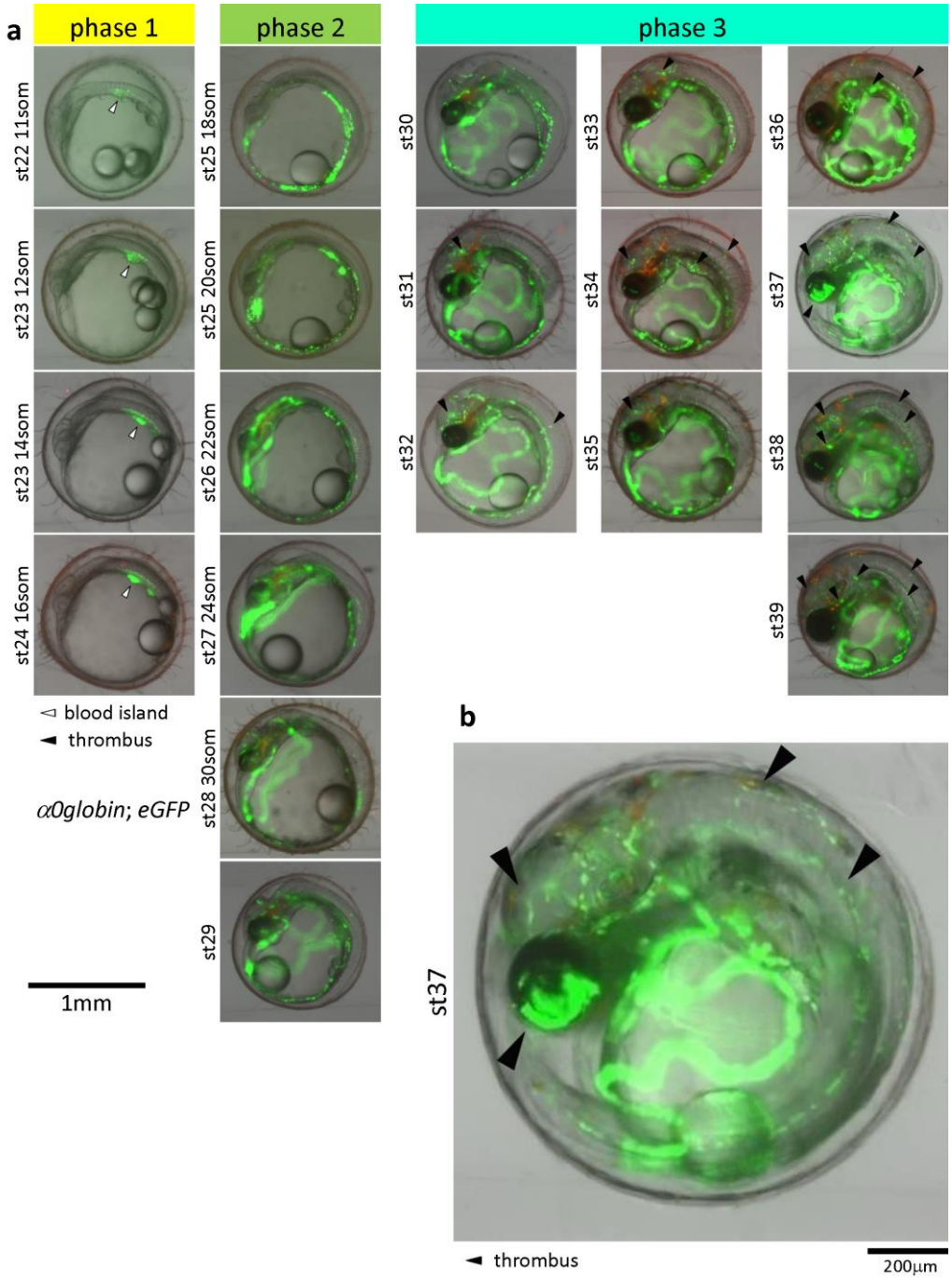

図 11 メダカ胚(*kyo*)における赤血球の分布の変化

(a)*kyo* メダカ胚(α0-globin; GFP)を st22 から st39 にかけて蛍光顕微鏡で観察した。phase1(st22 11som- st24 16som)においては WT と同様に血島(白矢頭)とその周囲にしか赤血球は存在しなかった。phase2(st25 18som- st29)においては血流が開始したが、赤血球が流れる血管は WT と同様に背側大動脈や卵黄静脈のような大血管に限定された。phase3(st30-)においては、WT と同様に st30 で体節間血管・中脳血管・肝臓血管血流が、さらに st31 において鰓弓血管血流が開始するものの、これらの細い血管において赤血球の詰まり(黒矢頭)が観察された。赤い蛍光は色素細胞を示す。(b)st37 の *kyo* メダカ胚(α0-globin; GFP)拡大図である。中脳血管や体節間血管、網膜動脈において赤血球の詰まりが観察された。

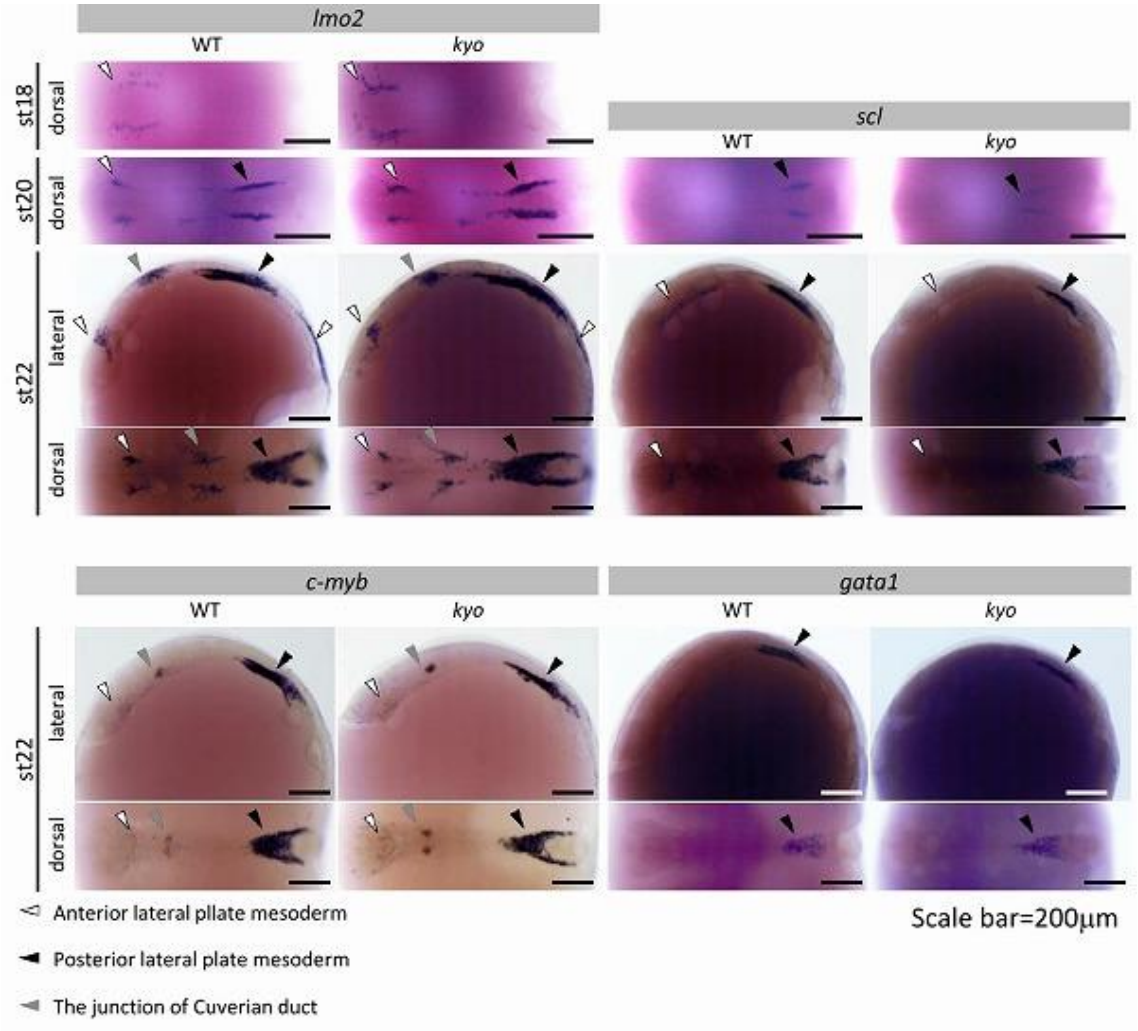

図 12 WT と *kyo* における未分化血球マーカーの発現

phase1 の WT/*kyo* における未分化血球マーカー遺伝子の発現パターンの WISH による解析。lmo2 は、WT では、st18 で頭部側側板中胚葉(ALPM、白矢頭)で発現しており、その後 st20 では新たに尾部側側板中胚葉(PLPM、黒矢頭)とキュービエ管の基部(灰矢頭)でも発現が検出された。*kyo* においては、PLPM での発現が WT よりも強かった。scl は、st20 で PLPM で発現しており、その後 st22 では ALPM でも検出された。*kyo* においては、ALPM での発現は検出されず、PLPM での発現も低下していた。c-myb の発現は st22 では ALPM、PLPM、キュービエ管の基部で見られた。gata1 の発現は、st22 では、PLPM において検出された。*kyo* においては c-myb、gata1 共に顕著な発現変化は観察されなかった。これらの写真は角度、輝度、バックグラウンド補正が行われた。*N*=5-10。

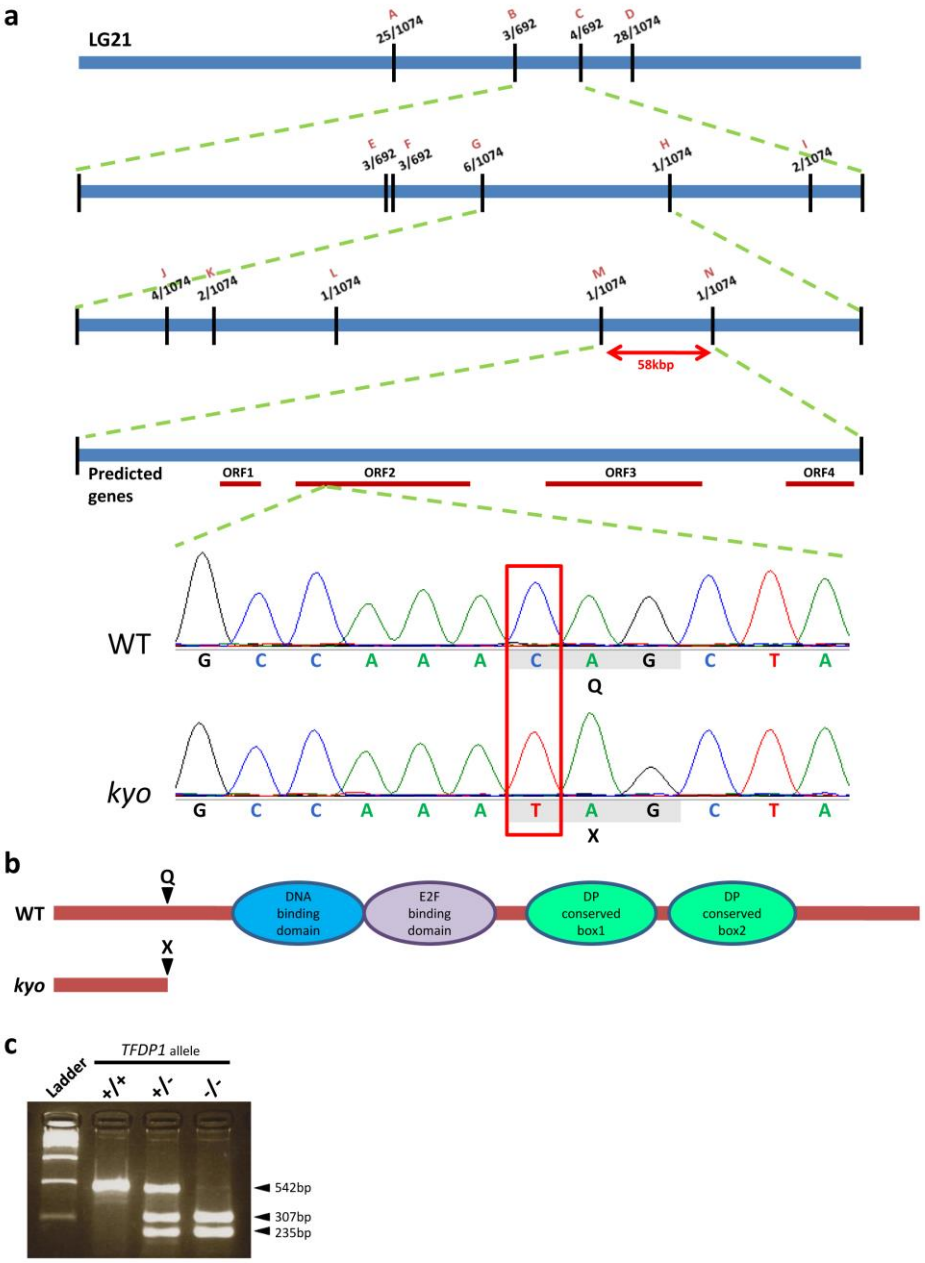

図 13 *kyo* の原因遺伝子の同定

(a)*kyo* の原因遺伝子のポジショナルクローニングの過程を示す。*kyo* の原因遺伝子が第 21 番染色体にあることが M マーカーシステムによって決定された。1074 の組み換え体を用いて、原因遺伝子が第 21 番染色体内の 4 つのオープンリーディングフレームを含む 58kbp の領域内に存在することが示された。その 4 つの cDNA を *kyo* 胚からクローニングし配列を読んだ結果、TFDP1 cDNA の 130 番目の C が T へと変化し、コドンがグルタミンからストップコドンへと変異していた。(b)TFDP1 の蛋白構造の概略を示す。TFDP1 は脊椎動物においては、DNA 結合ドメイン、E2F 結合ドメイン、DP conserved box1、DP conserved box2 の 4 つの機能性部位が存在する。*kyo* 変異体の TFDP1 はそれらの機能性部位よりも N 末端側にナンセンス変異が生じていたため、全ての機能を喪失しているものと考えられる。(c)*kyo* 変異体に対するジェノタイピングの結果を示す。TFDP1 遺伝子座の第 2 イントロンに存在する RFLP を *kyo* 変異体は共通して保有していた。

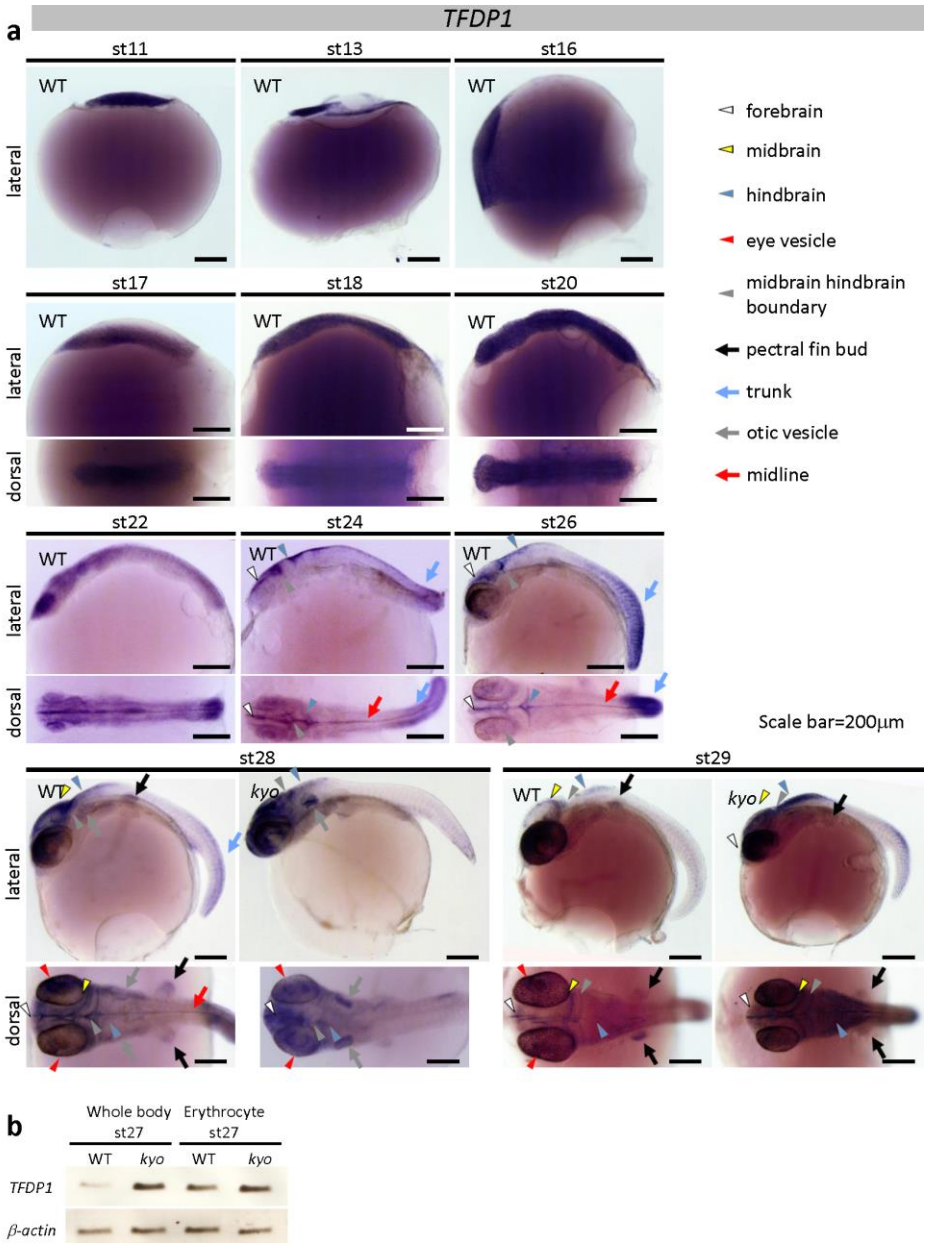

図 14 TFDP1 の全身における発現変化と赤血球での検出

(a)メダカ胚発生における TFDP1 の発現変化を WISH で同定し観察した。WT において、st11, 13, 16, 17, 18, 20 ではユビキタスに発現していた。その後 st22 では全体的に発現が低下し、st24 と st26 においては前脳(白矢頭), 中脳(黄矢頭), 中脳後脳境界(灰矢頭), 後脳(青矢頭),中線(赤矢印), 胴部(青矢)で発現が検出された。st28 では加えて胸鰭原基(黒矢印)、耳胞(灰矢印)、眼胞(赤矢印)でも検出された。st29 では、耳胞での発現が消失した。*kyo* においては、st28 と st29 において TFDP1 の発現は WT よりも全体的に強かった。これらの写真は角度、輝度、バックグラウンド補正が行われた。*N*=5-15。(b)赤血球における TFDP1 の半定量 RT-PCR による検出。st27 の WT/*kyo* のソーティングした赤血球と胚体から RNA を抽出し、半定量 RT-PCR を行なった。β-actin が内部標準として用いられた。代表的な結果を示す。st27 のサンプルを 2 回ずつ実験に用いた。

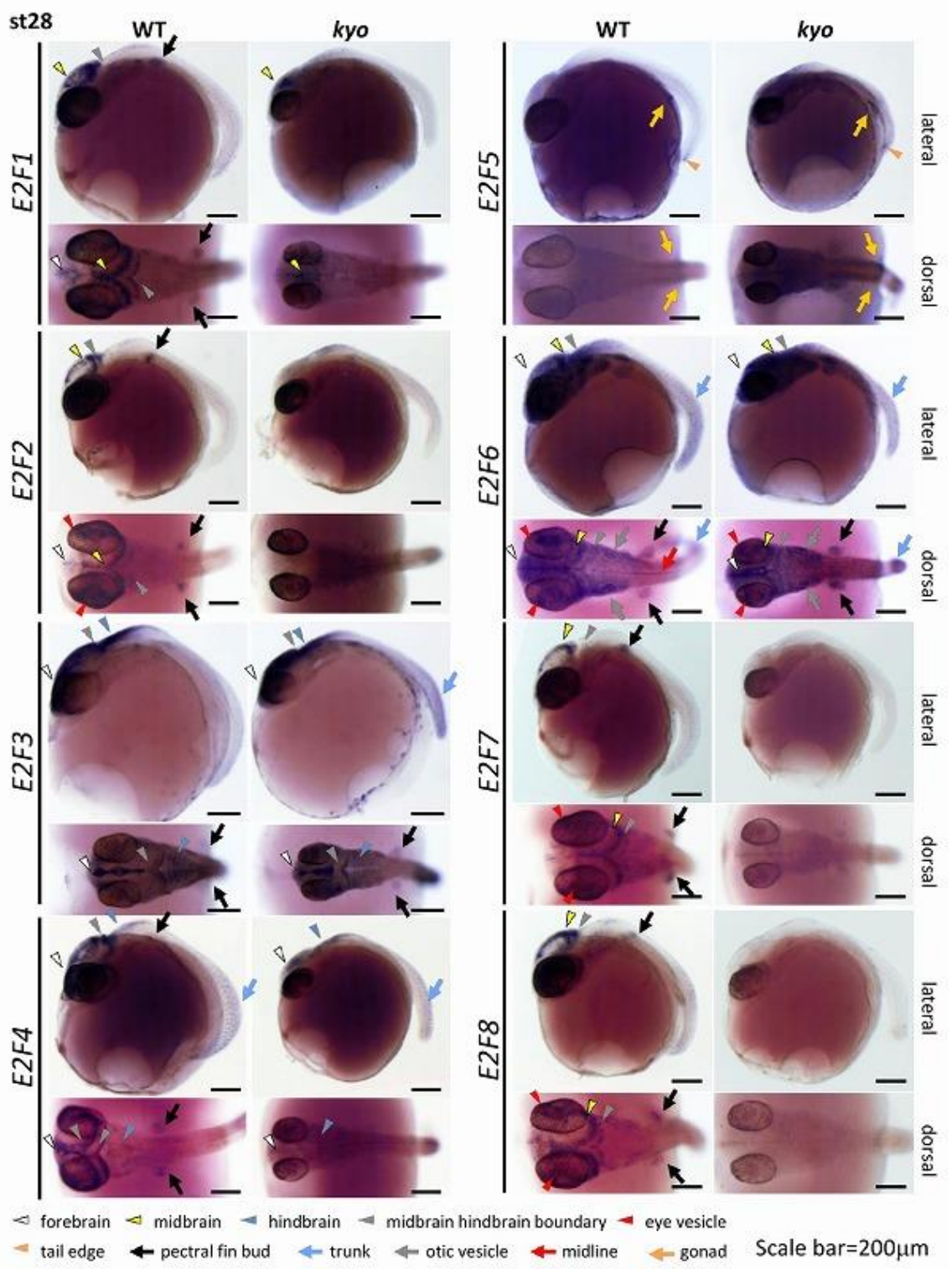

図 15 st28 における WT と *kyo* 間での E2F 遺伝子群の発現比較

st28 の WT/kyo における E2F ファミリー遺伝子の WISH による発現解析。各矢印、矢頭の解説は、図の下部に示す。これらの写真は角度、輝度、バックグラウンド補正が行われた。*N*=5-15。

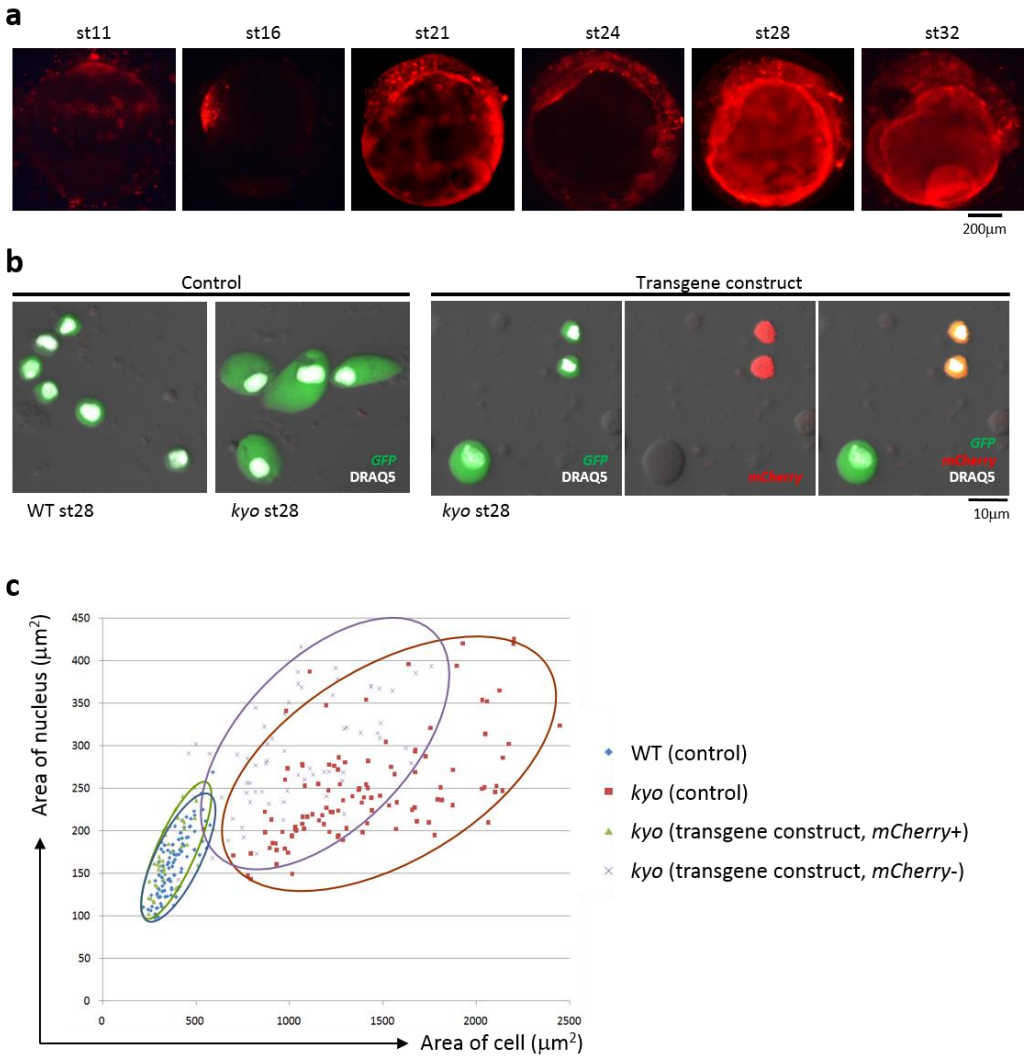

図 16 野生型 TFDP1 の強制発現による *kyo* の赤血球の表現型のレスキュー

(a)遺伝子コンストラクト(TFDP1; mCherry-T2A-TFDP1cDNA)を 1 細胞期にインジェクションした WT 胚における、コンストラクトの発現パターンを示す。赤色蛍光は遺伝子コンストラクト由来の mCherry の発現を示す。赤色蛍光のパターンは、TFDP1 の発現パターン(Fig. 5)と一致した。(b) 野生型 TFDP1 の強制発現による *kyo* の赤血球サイズの正常化を示す。1 細胞期の *kyo* 胚(α0-globin;GFP)に対し、遺伝子コンストラクトかメダカリンガー(コントロール)を、WT 胚(α0-globin;GFP)に対しメダカリンガー(コントロール)をインジェクションした。その後 st30 にて採血し、DRAQ5 により核染色した上で共焦点顕微鏡で赤血球の形態を観察した。 (c) (b)で示した実験で得られた赤血球サンプルの大きさの測定結果をドットプロットとして示す。各々の円は各ドットを 90%以上含み、おおよそのドットの分布を示す。遺伝子コンストラクトが発現した mCherry 陽性の *kyo* の赤血球は大型化しておらず、メダカリンガー(コントロール)をインジェクションした WT の赤血球と同様の大きさを示した。サイズを測定した赤血球の数は、メダカリンガー(コントロール)をインジェクションした WT/*kyo* では約 100 個、遺伝子コンストラクトをインジェクションした *kyo* では mCherry 陽性赤血球が約 40 個、mCherry 陰性赤血球が約 60 個だった。これらの結果は代表的なものを示した。遺伝子コンストラクトをインジェクションした 8 個体の *kyo* 全てで、mCherry 陽性の赤血球のサイズの正常化が観察された。

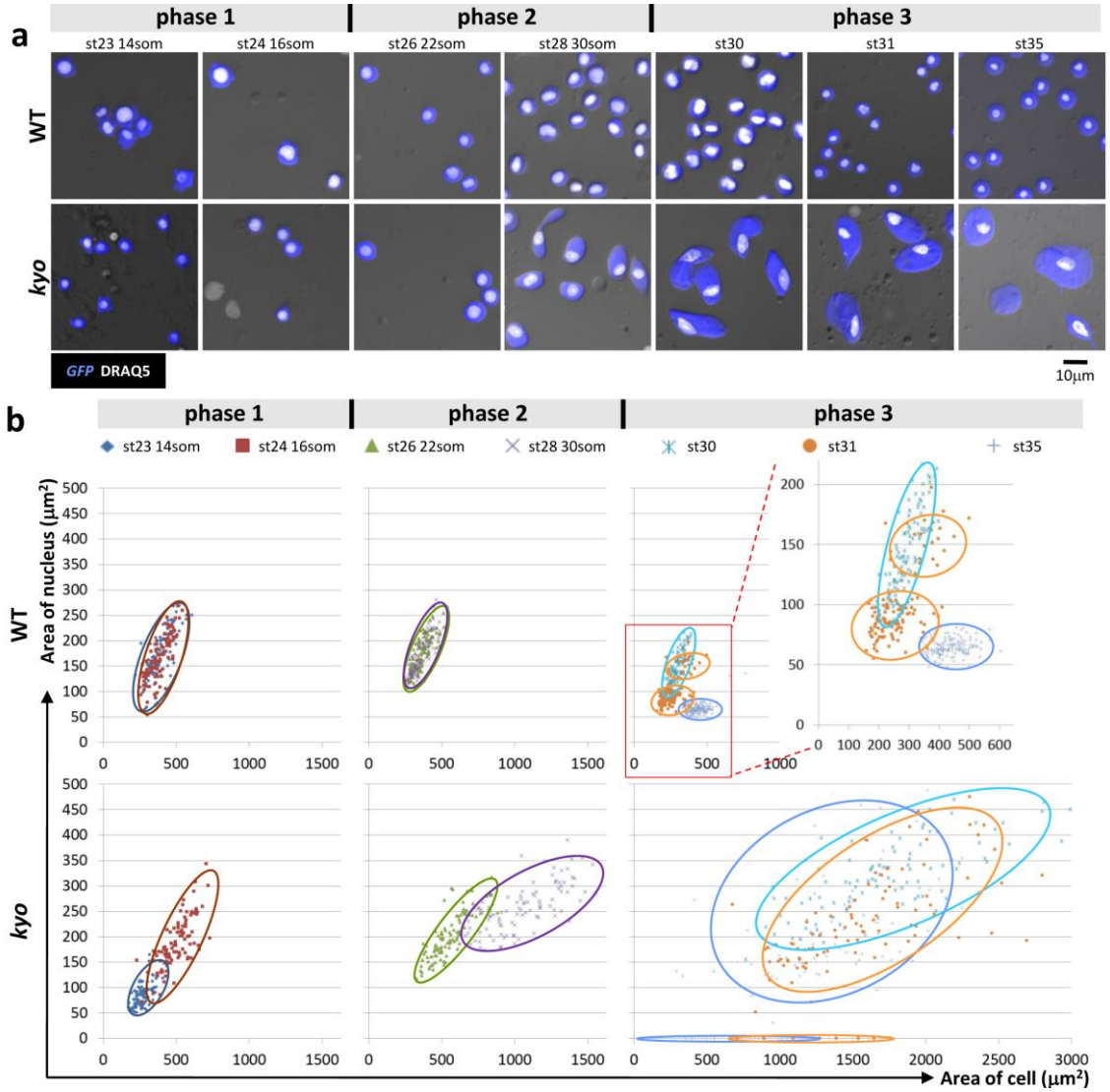

図 17 発生に伴う赤血球の大きさの調節

(a)発生に伴う赤血球の形態変化を示す。各ステージ(st23 14som, st24 16som, st26 22som, st28 30som, st30, st31, st35)の WT/*kyo* 胚(a0-globin; GFP)から採血を行い、DRAQ5 による核染色を行なった上で共焦点顕微鏡により観察した。(b)(a)で示した赤血球の大きさの測定結果をドットプロットとして示す。各々の円は各ドットを 90%以上含み、おおよそのドットの分布を示す。サイズを測定した赤血球の数は 100-130 個だった。WT の phase3 は、拡大図も付随して示す。

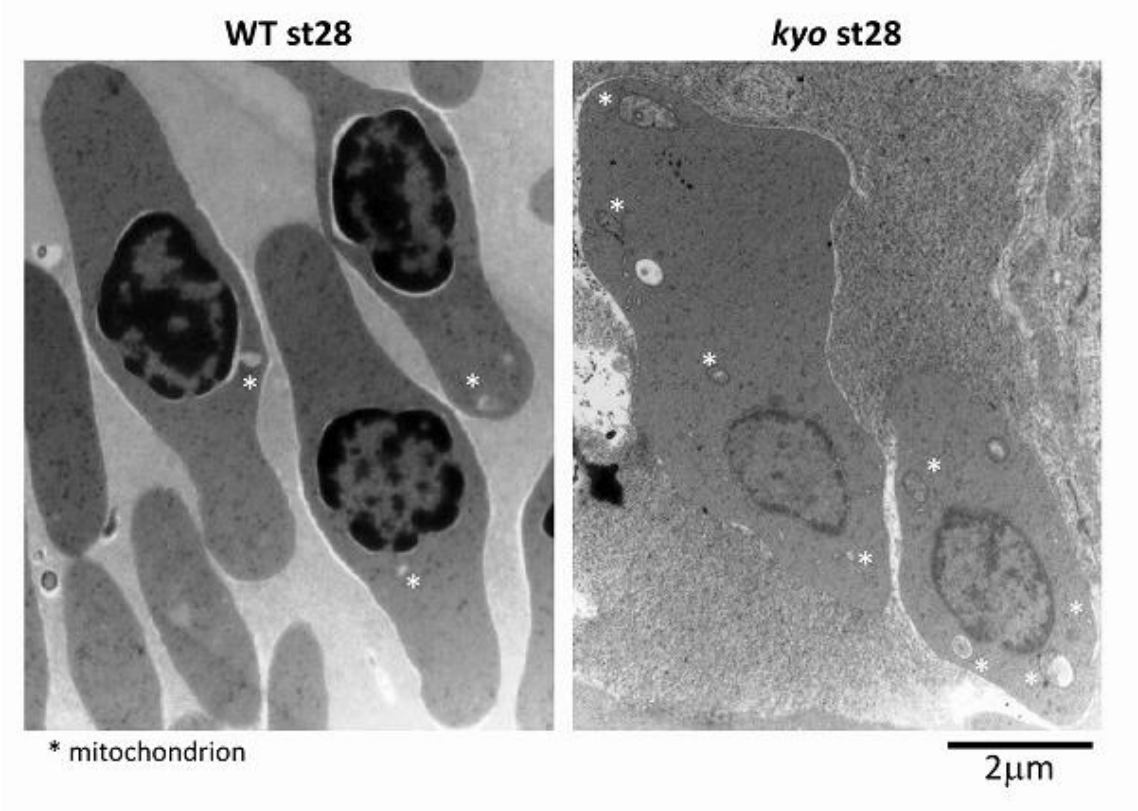

図 18 透過型電子顕微鏡による st28 の赤血球の観察

透過型電子顕微鏡による st28 の WT/*kyo* の赤血球の観察結果を示す。WT と比較して *kyo* の赤血球は核膜が薄く、ミトコンドリアの数も 1 切片の 1 赤血球あたりにつき WT が 0-1 個だったのに対し *kyo* では 3-5 個と多かった。示した写真は代表的なものである。WT の赤血球は計 20 個、*kyo* の赤血球は計 5 個観察された。アスタリスクはミトコンドリアを示す。

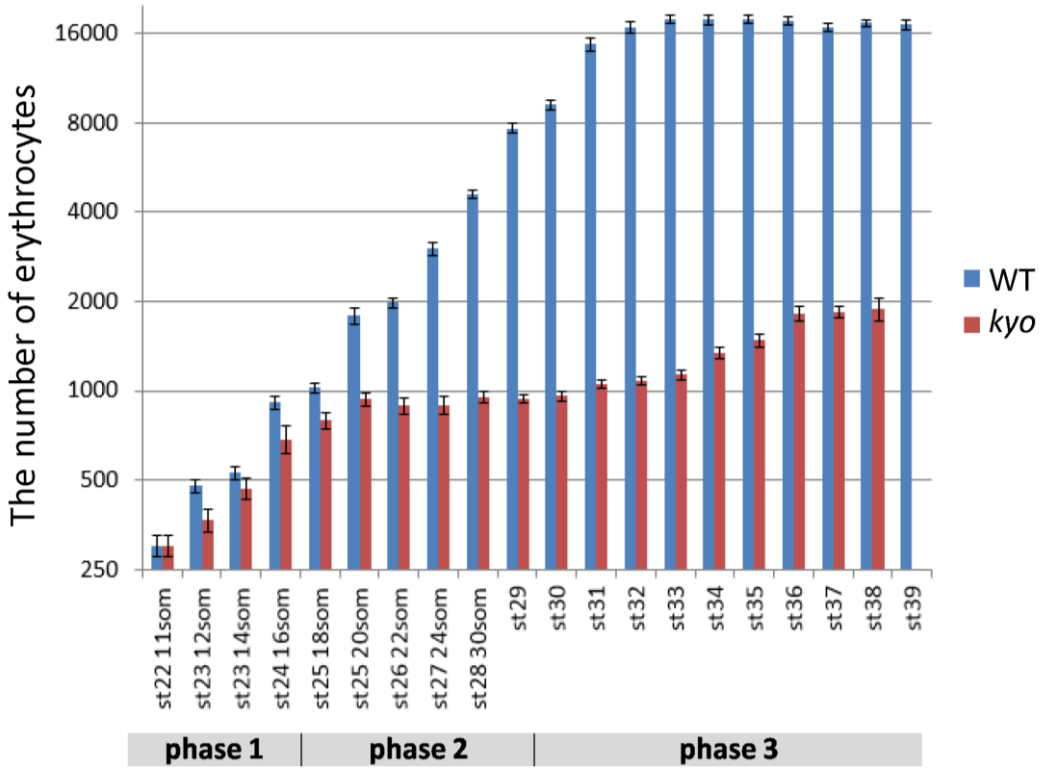

図 19 発生に伴う赤血球の数の調節

発生に伴う 1 個体あたりの平均的な赤血球数の変化を示す。1 個体あたりの赤血球数は、胚(a0-globin; GFP)を細胞浮遊液とした上でフローサイトメトリーにより GFP 陽性細胞の数をカウントすることによって算出された。st39 の *kyo* の赤血球数は、胚が致死となるために解析されなかった。用いられた胚の数はそれぞれ 8-30 であった。エラーバーは SEM を示す。

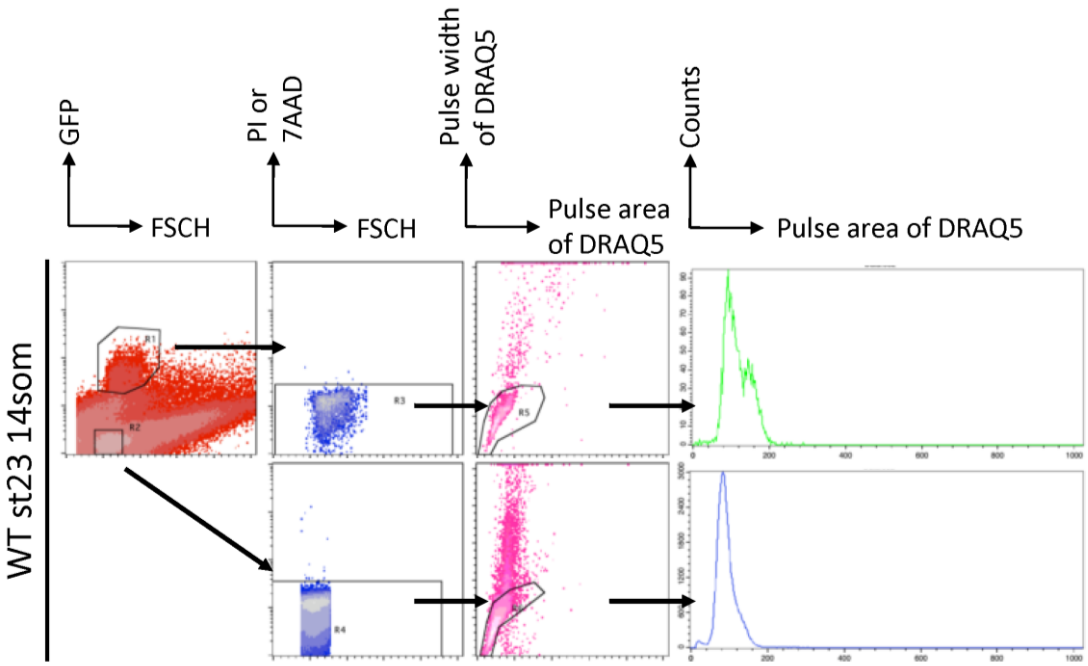

図 20 FACS による赤血球の核型解析法

赤血球の DNA 量を FACS により測定する方法。DRAQ5 により染色された WT st23 14som のサンプルを例として示す。赤の密度プロットは x 軸が forward scatter height (FSCH)、y 軸が GFP の蛍光強度を示している。GFP 陽性細胞を赤血球とみなし、GFP 陽性細胞集団にゲーティングした。また、GFP 陰性細胞集団で最も FSCH の低い集団を、非赤血球の 2N 細胞集団としてゲーティングした。青の密度プロットは、x 軸が FSCH、y 軸が PI もしくは 7AAD(いずれも死細胞マーカー)の蛍光強度を示しており、PI もしくは 7AAD 陰性細胞を生細胞としてゲーティングした。ピンクの密度プロットは、x 軸が DRAQ5 蛍光のパルスエリアを、y 軸は DRAQ5 蛍光のパルス幅を示しており、低パルスエリア集団を単細胞集団とみなしゲーティングした。最終的に赤血球集団か、非赤血球の 2N 細胞集団の DRAQ5 の蛍光強度を示すヒストグラムが得られた。

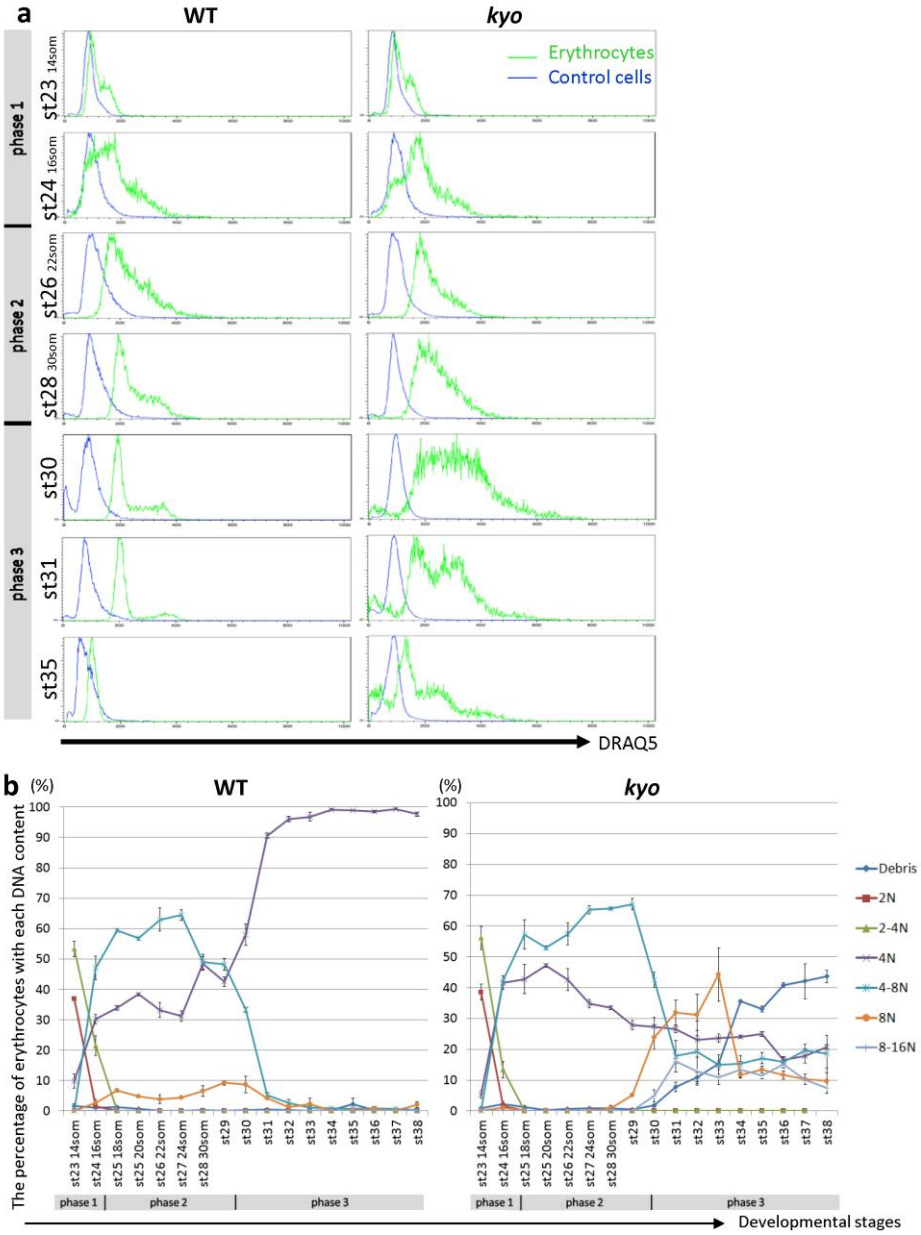

図 21 発生に伴う赤血球の DNA 量の変化

(a)赤血球の DNA 量を反映したヒストグラムの、発生に伴う変化を示す。赤外に蛍光を持つ DNA マーカーである DRAQ5 によって染色されたメダカ胚(α0-globin; GFP)の細胞浮遊液に対しフローサイトメトリーを行い、赤血球と他の体細胞の赤外蛍光の強度を定量しヒストグラムとした。x 軸は赤外蛍光強度、y 軸は細胞数を示す。緑のヒストグラムは GFP 陽性細胞(赤血球)であり、青のヒストグラムは非赤血球の細胞のうちの FSCH の比較的小さい集団のものであり 2N の細胞が多数であると考えられる。各々の実験は 3-5 回繰り返され、1 回につき 5000-8000 個の GFP 陽性細胞が解析に用いられた。変動係数(Coefficient of variation: CV)は WT では 6.5-15、*kyo* では 8-25。(b)各発生段階の赤血球における、各核型の占める割合の変化をグラフとして示す。各核型の割合は、DNA 量を反映したヒストグラムを ModFit によって計算することで算出された。各 FACS 解析は 3-17 回行われた。Debris は、st23-24 においては DNA 量が 2N 以下、st25 以降においては 4N 以下の細胞として定義した。エラーバーは SEM を示す。

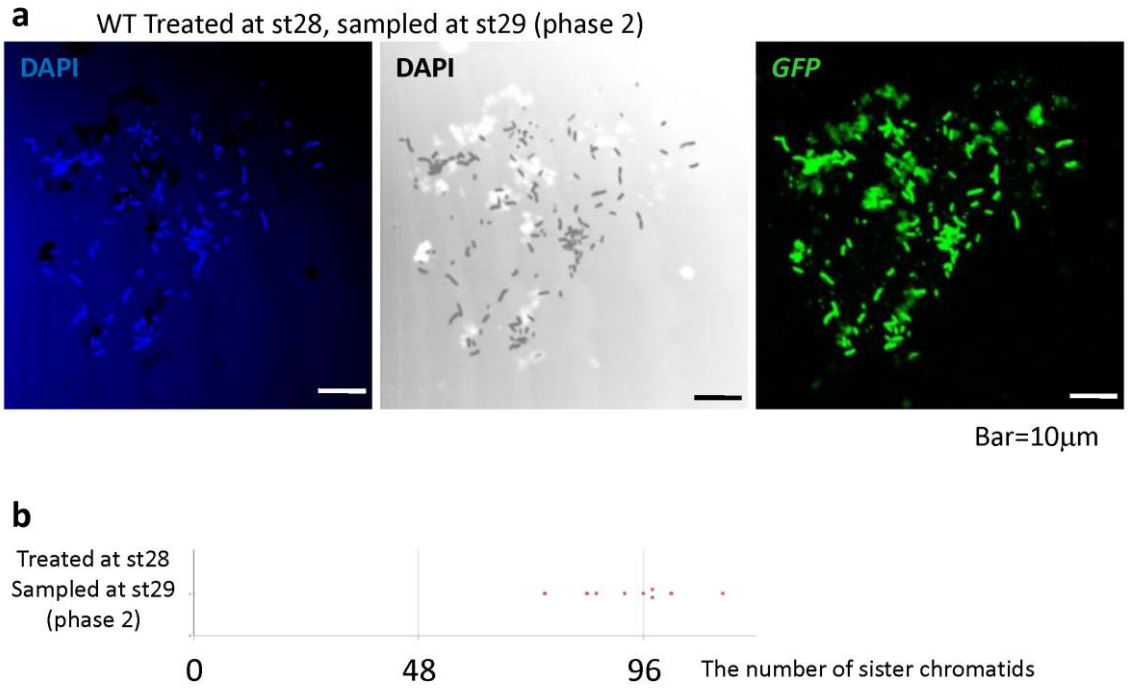

図 22 phase2 における赤血球の染色体標本

(a)DAPI 染色された phase2 の赤血球の染色体標本。phase2 にてコルヒチン処理した α0globin; GFP 胚より赤血球を分取し、染色体標本に用いた。染色体の GFP 蛍光は、その由来が赤血球であることを示す。(b)phase2 の赤血球の姉妹染色体数の群散布図。phase2 における赤血球の姉妹染色体数は 96 対前後であり、48 対本前後の赤血球は観察されなかった。

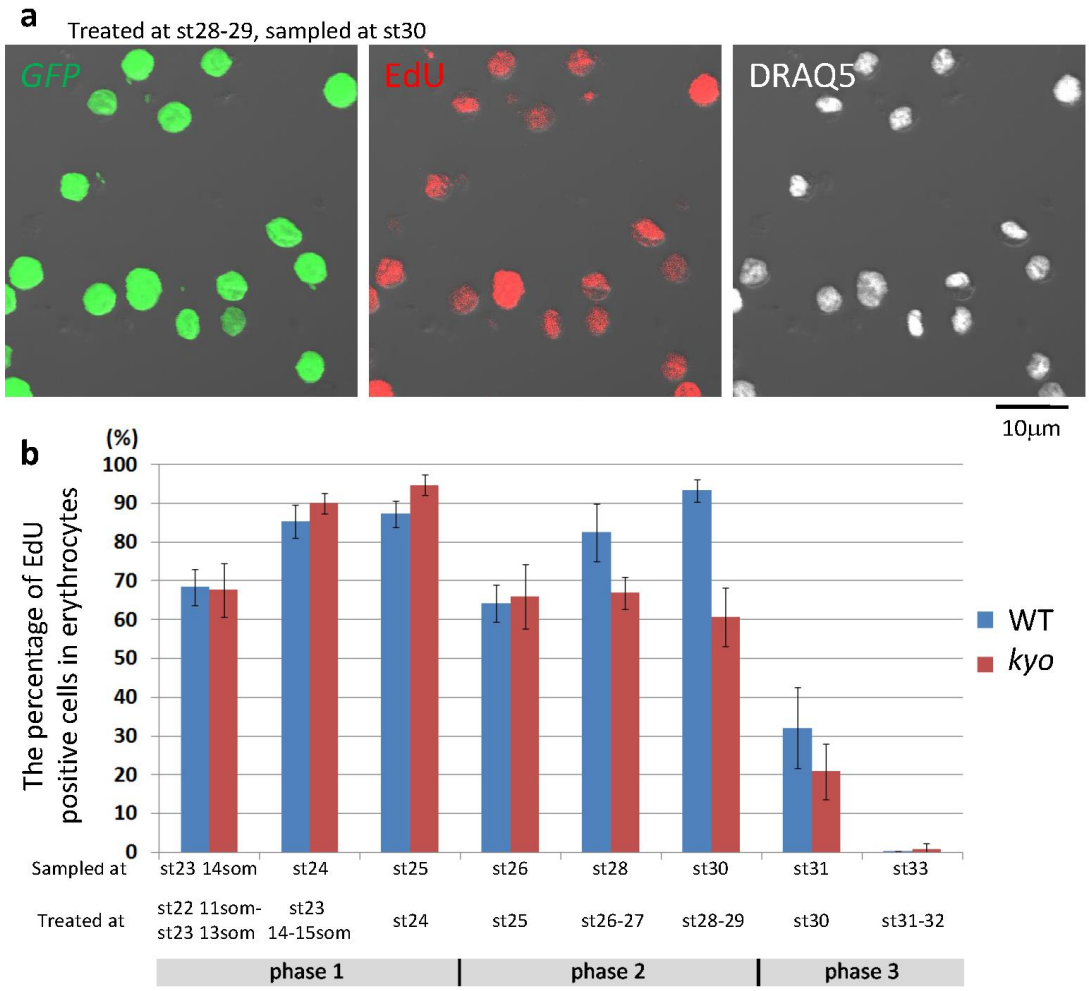

図 23 各発生段階での赤血球の EdU 取り込み確率

(a)st28-29 にかけて EdU を取り込ませた胚(α0globin; eGFP)から st30 にて赤血球を採血によりサンプリングし、EdU の取り込みを検出した。赤血球は GFP に対する免疫染色によって同定し、DRAQ5 によって核染色が行われた。(b)WT と *kyo* の各発生時期における EdU を取り込んだ赤血球の割合を示す。x 軸は取り込み・サンプリング時期を、y 軸は赤血球の EdU 取り込み率を示す。確率計算に用いられた赤血球は各 5 個体からサンプリングし、数は WT では約 100 個ずつ、*kyo* では約 20 個ずつだった。エラーバーは SEM である。

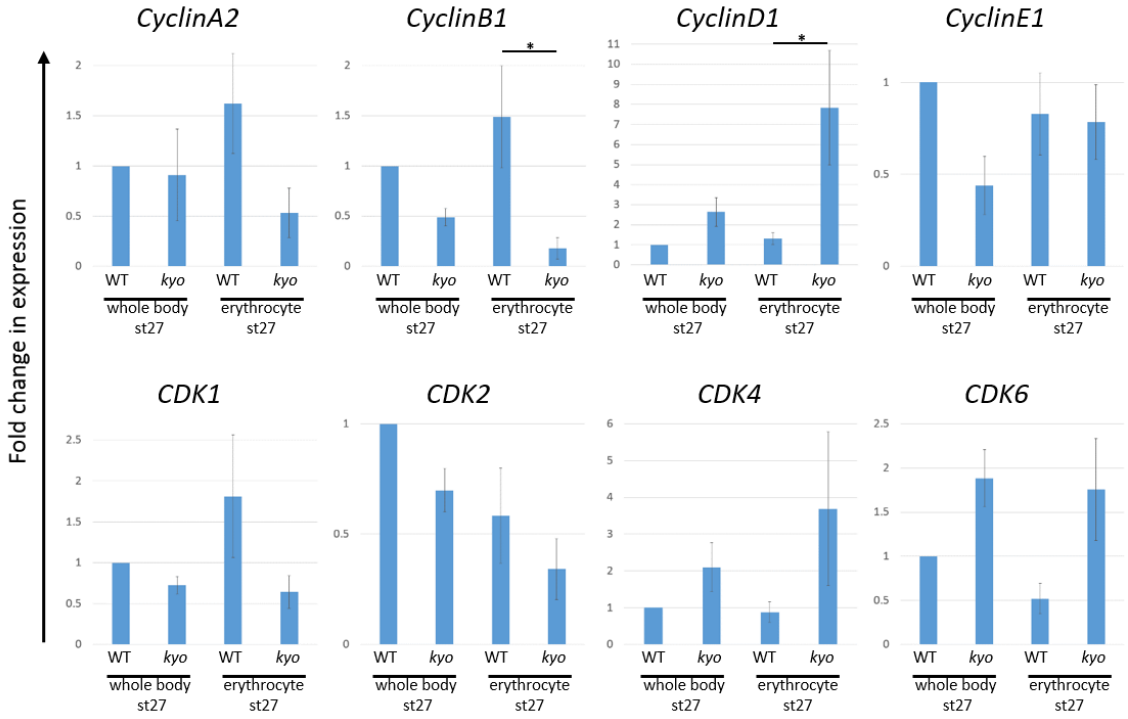

図 24 phase2 の赤血球における Cyclin/CDK の発現解析

phase2 の WT/*kyo* の全身/赤血球における Cyclin/CDK の、半定量 RT-PCR による mRNA 発現の解析。赤血球は、胚全体の細胞浮遊液を作製し、GFP 陽性細胞をソーティングすることで単離された。mRNA の発現はバンドの光学密度より測定され、β-actin の発現によって標準化された。WT の胚体における発現を 1 として算出された。本実験は 3 サンプル(st27x2、st29x1)を用いて、2 回ずつ行われた。エラーバーは SEM である。有意差は Student's t-test によって計算された。*P<0.05

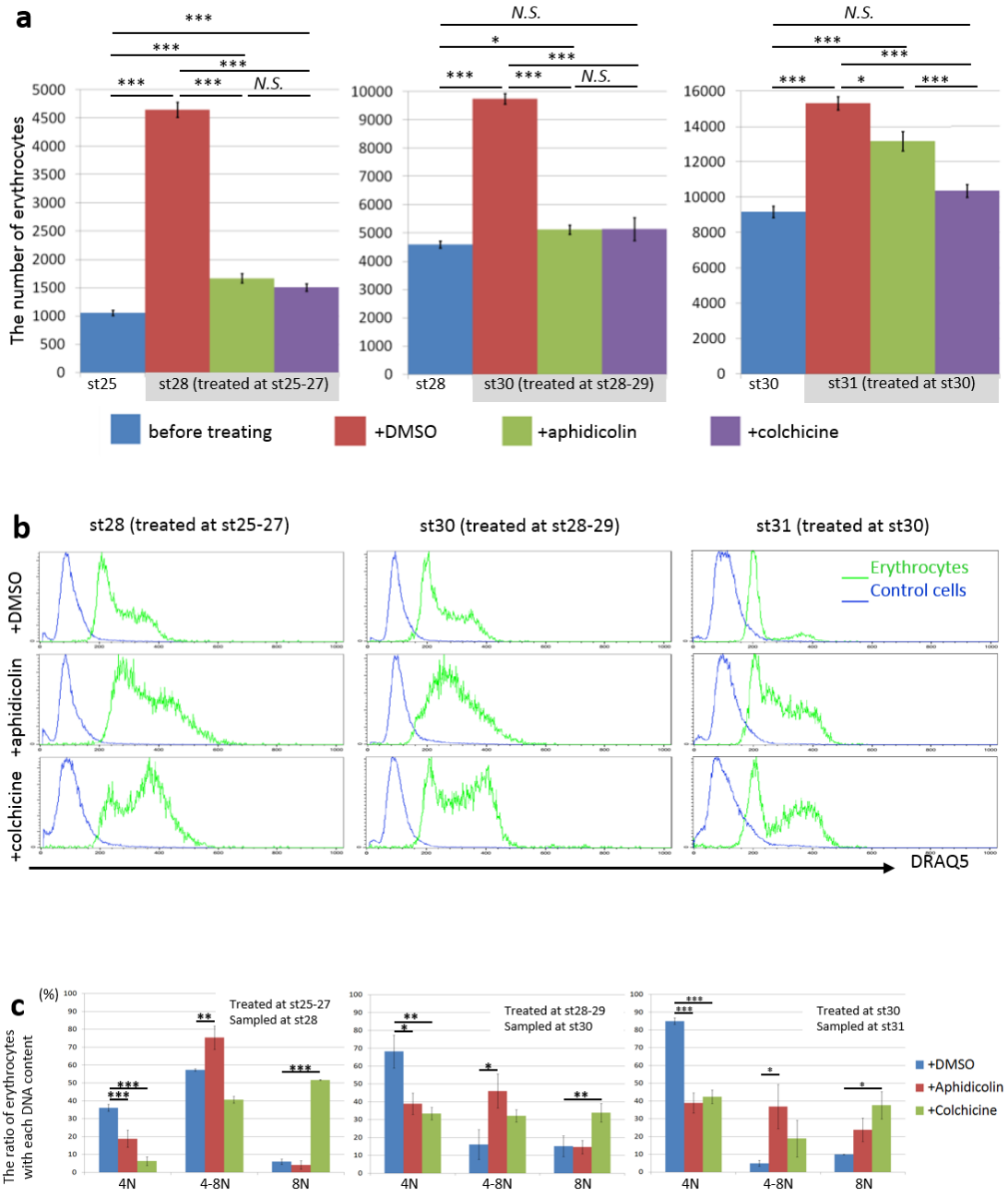

図 25 細胞周期の阻害が赤血球の数と核型に与える影響

(a)細胞周期阻害剤(アフィジコリン、コルヒチン、DMSO(コントロール))の処理による WT の赤血球数の変化(b、c)核型の変化(ヒストグラム : b、グラフ : c)を示す。各発生区間(st25-27、28-29、30)において細胞周期阻害剤で処理した胚(α0globin; GFP)を、処理直後(st28、30、31)において細胞浮遊液とし、DRAQ5 で染色した上でフローサイトメーターにより DNA 量を測定した。一度の FACS につき 5000-8000 個の赤血球が解析され、一つの区間について 3-5 回の FACS が行われた。エラーバーは SEM を示す。有意差は Student's t-test によって計算された。*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; *N.S* = not significantly different。

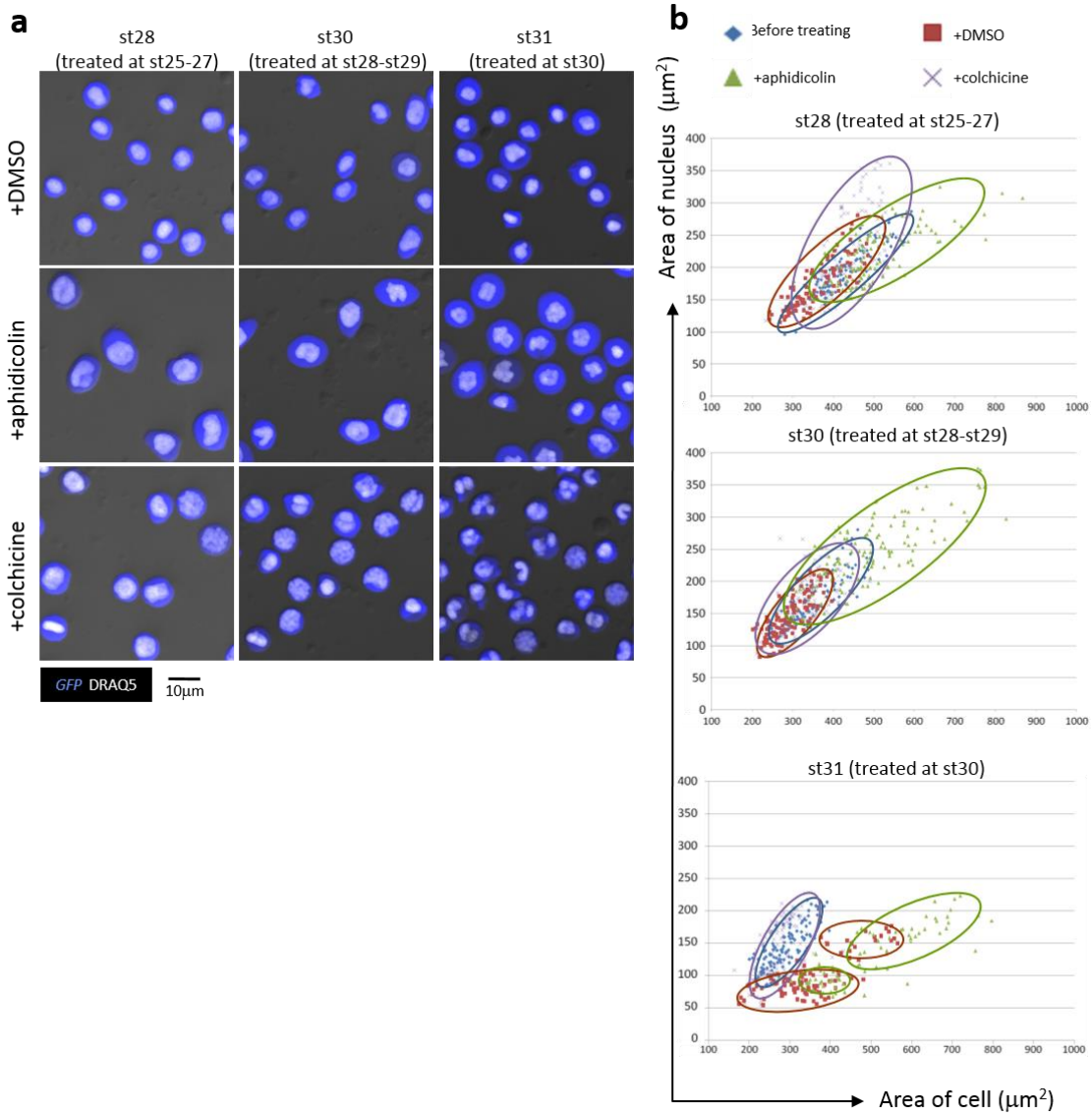

図 26 細胞周期の阻害が赤血球の大きさに与える影響

(a) 細胞周期阻害剤の処理による WT の赤血球の形態の変化。各発生区間(st25-27、28-29、30)において細胞周期阻害剤で処理した胚(α0globin; GFP)を、処理直後(st28、30、31)において採血し、DRAQ5 で核染色した上で共焦点顕微鏡を用いて観察した。(b)(a)で解析した細胞周期阻害剤で処理した赤血球の細胞/核の大きさの測定結果。各々の円は各ドットを 90%以上含み、おおよそのドットの分布を示す。サイズを測定した赤血球の数は 100-130 個だった。代表的な結果を示す。

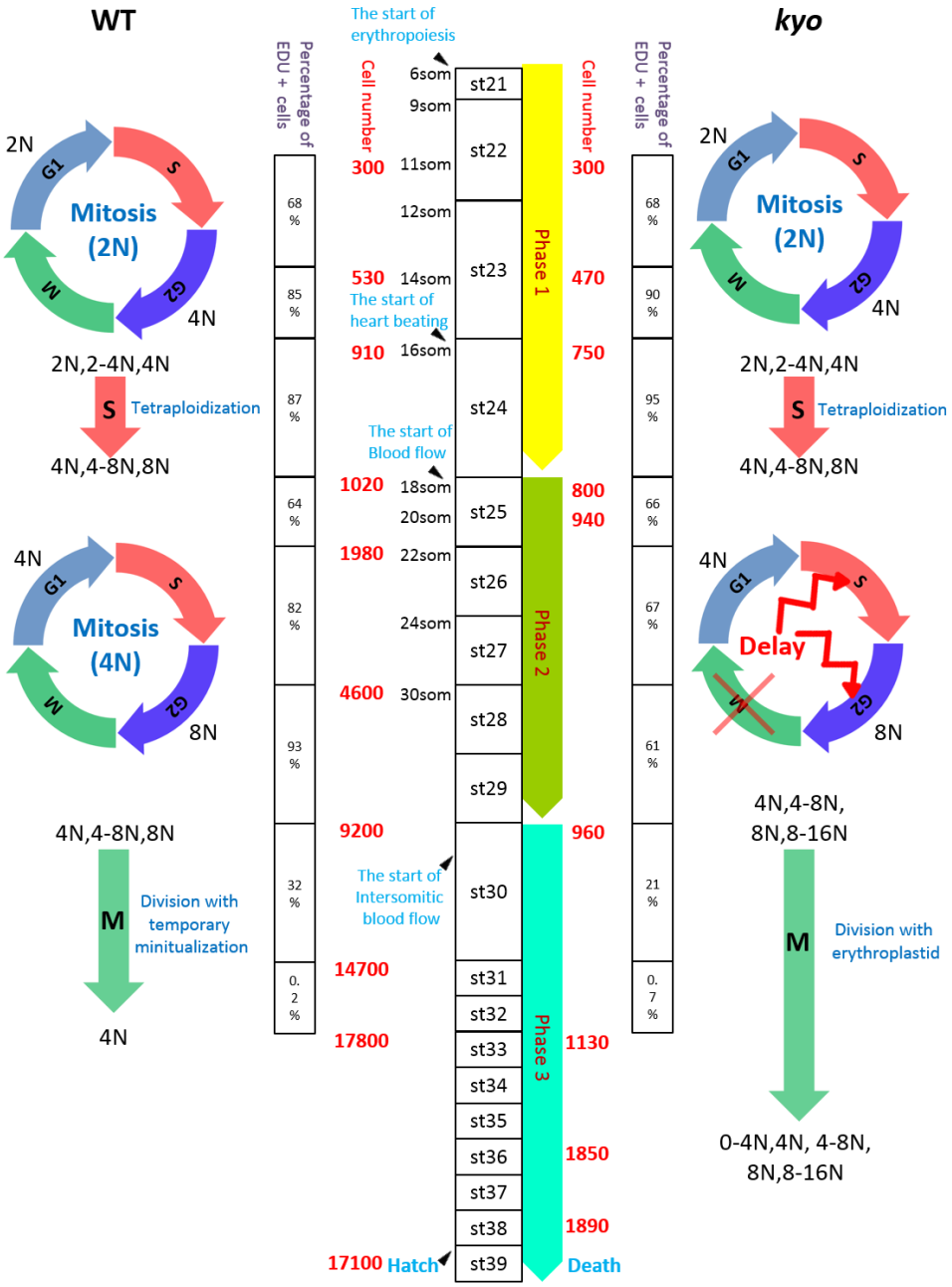

図 27 WT と *kyo* の発生に伴う赤血球の細胞周期調節の変化の概略

WT/*kyo* の赤血球の数・DNA 量・EdU の取り込み確率の発生に沿った変化の概略を示す。st23 (14som)では赤血球は 2 倍体の細胞周期制御下にあったが、st24 (16som)にて 4 倍体化が生じ、phase2(st25-st29)では 4 倍体の細胞周期制御下で増殖し、st30 で一過的な小型化が生じて以降は増殖が停止し殆どの赤血球が 4 倍体となった。*kyo* においては、phase1 では赤血球の数・核型・EdU の取り込み確率は WT と比較して顕著な変化は検出されなかった。phase2 では赤血球は増殖しない一方で、65%前後で EdU の取り込みが検出され、65%の赤血球において S 期で細胞周期が停止していると考えられた。その後 phase3 にて赤血球の細胞分裂が検出されたことから、TFDP1 は phase2 以降の血流中の赤血球において、S 期の移行と進行において重要であると考えられた。

第 7 章　引用文献

1. Föller M, Huber SM, Lang F (2008) Erythrocyte programmed cell death. IUBMB life 60: 661-668.
2. Keerthivasan G, Wickrema A, Crispino JD (2011) Erythroblast enucleation. Stem cells international 2011.
3. Weiss G, Goodnough LT (2005) Anemia of chronic disease. New England Journal of Medicine 352: 1011-1023.
4. Demiroğlu H (1997) The importance of erythrocyte aggregation in blood rheology: considerations on the pathophysiology of thrombotic disorders. Blood 89: 4236-4236.
5. Tefferi A. Polycythemia vera: a comprehensive review and clinical recommendations; 2003. Elsevier. pp. 174-194.
6. Aslinia F, Mazza JJ, Yale SH (2006) Megaloblastic anemia and other causes of macrocytosis. Clinical Medicine & Research 4: 236-241.
7. Toh B, Van Driel I, Gleeson P (1997) Pernicious anemia. New England Journal of Medicine 337: 1441-1448.
8. Tamplin OJ, Zon LI (2010) Blood flow: metalloproteases cut loose in primitive erythrocytes. Current Biology 20: R561-R562.
9. Sankaran VG, Ludwig LS, Sicinska E, Xu J, Bauer DE, et al. (2012) Cyclin D3 coordinates the cell cycle during differentiation to regulate erythrocyte size and number. Genes & Development 26: 2075-2087.
10. Orkin SH, Zon LI (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. Cell 132: 631-644.
11. Palis J (2014) Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. Frontiers in physiology 5.
12. Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, Palis J (2004) Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. Blood 104: 19-25.
13. Fraser ST, Isern J, Baron MH (2007) Maturation and enucleation of primitive erythroblasts during mouse embryogenesis is accompanied by changes in cell-surface antigen expression. Blood 109: 343-352.
14. Palis J, Malik J, McGrath KE, Kingsley PD (2010) Primitive erythropoiesis in the mammalian embryo. Int J Dev Biol 54: 1011-1018.
15. Lang E, Qadri SM, Lang F (2012) Killing me softly–Suicidal erythrocyte death. The international journal of biochemistry & cell biology 44: 1236-1243.
16. Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, et al. (2013) Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from

hematopoietic stem cells. Cell 154: 1112-1126.
17. Sun J, Ramos A, Chapman B, Johnnidis JB, Le L, et al. (2014) Clonal dynamics of native haematopoiesis. Nature 514: 322-327.
18. Wesemann DR, Portuguese AJ, Meyers RM, Gallagher MP, Cluff-Jones K, et al. (2013) Microbial colonization influences early B-lineage development in the gut lamina propria. Nature 501: 112-115.
19. Risau W (1998) Angiogenesis is coming of age. Circulation Research 82: 926-928.
20. McGrath KE, Koniski AD, Malik J, Palis J (2003) Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. Blood 101: 1669-1676.
21. Udan RS, Vadakkan TJ, Dickinson ME (2013) Dynamic responses of endothelial cells to changes in blood flow during vascular remodeling of the mouse yolk sac. Development 140: 4041-4050.
22. Echave P, Conlon IJ, Lloyd AC (2007) Cell size regulation in mammalian cells. Cell Cycle 6: 218-224.
23. Lloyd AC (2013) The regulation of cell size. Cell 154: 1194-1205.
24. Ruvinsky I, Meyuhas O (2006) Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. Trends in Biochemical Sciences 31: 342-348.
25. Dolznig H, Grebien F, Sauer T, Beug H, Mullner EW (2004) Evidence for a size-sensing mechanism in animal cells. Nat Cell Biol 6: 899-905.
26. Killander D, Zetterberg A (1965) A quantitative cytochemical investigation of the relationship between cell mass and initiation of DNA synthesis in mouse fibroblasts in vitro. Experimental Cell Research 40: 12-20.
27. Kafri R, Levy J, Ginzberg MB, Oh S, Lahav G, et al. (2013) Dynamics extracted from fixed cells reveal feedback linking cell growth to cell cycle. Nature 494: 480-483.
28. Martin SG, Berthelot-Grosjean M (2009) Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. Nature 459: 852-856.
29. Umen JG (2005) The elusive sizer. Curr Opin Cell Biol 17: 435-441.
30. Rasmussen RS, Morrissey MT (2007) Biotechnology in aquaculture: transgenics and polyploidy. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 6: 2-16.
31. Mattia G, Vulcano F, Milazzo L, Barca A, Macioce G, et al. (2002) Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. Blood 99: 888-897.
32. Klisch K, Hecht W, Pfarrer C, Schuler G, Hoffmann B, et al. (1999) DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. Placenta 20: 451-458.
33. Marshall WF, Young KD, Swaffer M, Wood E, Nurse P, et al. (2012) What determines cell size? BMC Biology 10: 101.

34. Tsukaya H (2013) Does ploidy level directly control cell size? Counterevidence from Arabidopsis genetics. PLoS ONE 8: e83729.
35. Gregory TR (2001) The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates. Blood Cells, Molecules, and Diseases 27: 830-843.
36. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Proliferation 36: 131-149.
37. Aguilar V, Fajas L (2010) Cycling through metabolism. EMBO Mol Med 2: 338-348.
38. van den Heuvel S, Dyson NJ (2008) Conserved functions of the pRB and E2F families. Nat Rev Mol Cell Biol 9: 713-724.
39. Knudsen ES, Knudsen KE (2006) Retinoblastoma tumor suppressor: where cancer meets the cell cycle. Experimental Biology and Medicine 231: 1271-1281.
40. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RA (2013) Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. Nature reviews Molecular cell biology 14: 518-528.
41. Sardet C, Vidal M, Cobrinik D, Geng Y, Onufryk C, et al. (1995) E2F-4 and E2F-5, two members of the E2F family, are expressed in the early phases of the cell cycle. Proceedings of the National Academy of Sciences 92: 2403-2407.
42. Cam H, Dynlacht BD (2003) Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. Cancer Cell 3: 311-316.
43. Iaquinta PJ, Lees JA (2007) Life and death decisions by the E2F transcription factors. Curr Opin Cell Biol 19: 649-657.
44. Bracken AP, Ciro M, Cocito A, Helin K (2004) E2F target genes: unraveling the biology. Trends Biochem Sci 29: 409-417.
45. Blais A, Dynlacht BD (2004) Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. Curr Opin Genet Dev 14: 527-532.
46. Johnson DG, Ohtani K, Nevins JR (1994) Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression. Genes & Development 8: 1514-1525.
47. Li J, Ran C, Li E, Gordon F, Comstock G, et al. (2008) Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development. Dev Cell 14: 62-75.
48. Westendorp B, Mokry M, Groot Koerkamp MJ, Holstege FC, Cuppen E, et al. (2012) E2F7 represses a network of oscillating cell cycle genes to control S-phase progression. Nucleic Acids Res 40: 3511-3523.
49. Moon NS, Dyson N (2008) E2F7 and E2F8 keep the E2F family in balance. Dev Cell 14: 1-3.
50. Frolov MV, Huen DS, Stevaux O, Dimova D, Balczarek-Strang K, et al. (2001) Functional

antagonism between E2F family members. Genes Dev 15: 2146-2160.

51. Fang SC, Umen JG (2008) A suppressor screen in chlamydomonas identifies novel components of the retinoblastoma tumor suppressor pathway. Genetics 178: 1295-1310.

52. Shen WH (2002) The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. Trends in Plant Science 7: 505-511.

53. La Thangue NB (1994) DRTF1/E2F: an expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell-cycle control. Trends in Biochemical Sciences 19: 108-114.

54. Bandara L, Buck V, Zamanian M, Johnston L, La Thangue N (1993) Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. The EMBO Journal 12: 4317.

55. Hao XF, Alphey L, Bandara LR, Lam E, Glover D, et al. (1995) Functional conservation of the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F and its pathway of control in Drosophila melanogaster. Journal of Cell Science 108: 2945-2954.

56. Zhang Y, Venkatraj VS, Fischer SG, Warburton D, Chellappan SP (1997) Genomic Cloning and Chromosomal Assignment of the E2F Dimerization PartnerTFDPGene Family. Genomics 39: 95-98.

57. Kohn MJ, Leung SW, Criniti V, Agromayor M, Yamasaki L (2004) Dp1 is largely dispensable for embryonic development. Mol Cell Biol 24: 7197-7205.

58. Gall JG, Cohen EH, Polan ML (1971) Repetitive DNA sequences in Drosophila. Chromosoma 33: 319-344.

59. Gentric G, Desdouets C, Celton-Morizur S (2012) Hepatocytes polyploidization and cell cycle control in liver physiopathology. International journal of hepatology 2012.

60. Kondorosi E, Kondorosi A (2004) Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. FEBS Letters 567: 152-157.

61. Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ (2009) Endoreplication: polyploidy with purpose. Genes Dev 23: 2461-2477.

62. Zielke N, Kim KJ, Tran V, Shibutani ST, Bravo MJ, et al. (2011) Control of Drosophila endocycles by E2F and CRL4(CDT2). Nature 480: 123-127.

63. Chagraoui H, Kassouf M, Banerjee S, Goardon N, Clark K, et al. (2011) SCL-mediated regulation of the cell-cycle regulator p21 is critical for murine megakaryopoiesis. Blood 118: 723-735.

64. Munoz-Alonso MJ, Ceballos L, Bretones G, Frade P, Leon J, et al. (2012) MYC accelerates p21CIP-induced megakaryocytic differentiation involving early mitosis arrest in leukemia cells. Journal of Cellular Physiology 227: 2069-2078.

65. Wittbrodt J, Shima A, Schartl M (2002) Medaka—a model organism from the far East. Nature Reviews: Genetics 3: 53-64.
66. Tanaka K, Ohisa S, Orihara N, Sakaguchi S, Horie K, et al. (2004) Characterization of mutations affecting embryonic hematopoiesis in the medaka, Oryzias latipes. Mech Dev 121: 739-746.
67. Kohn MJ (2003) Dp1 is required for extra-embryonic development. Development 130: 1295-1305.
68. Moriyama A, Inohaya K, Maruyama K, Kudo A (2010) Bef medaka mutant reveals the essential role of c-myb in both primitive and definitive hematopoiesis. Dev Biol 345: 133-143.
69. Belele CL, English MA, Chahal J, Burnetti A, Finckbeiner SM, et al. (2009) Differential requirement for Gata1 DNA binding and transactivation between primitive and definitive stages of hematopoiesis in zebrafish. Blood 114: 5162-5172.
70. Demy DL, Ranta Z, Giorgi J-M, Gonzalez M, Herbomel P, et al. (2013) Generating parabiotic zebrafish embryos for cell migration and homing studies. Nature Methods 10: 256-258.
71. Fujita M, Isogai S, Kudo A (2006) Vascular anatomy of the developing medaka, Oryzias latipes: a complementary fish model for cardiovascular research on vertebrates. Dev Dyn 235: 734-746.
72. Loosli F, Koster RW, Carl M, Kuhnlein R, Henrich T, et al. (2000) A genetic screen for mutations affecting embryonic development in medaka fish (Oryzias latipes). Mech Dev 97: 133-139.
73. Maruyama K, Ishikawa Y, Yasumasu S, Iuchi I (2007) Globin gene enhancer activity of a DNase-I hypersensitive site-40 homolog in medaka, Oryzias latipes. Zoolog Sci 24: 997-1004.
74. Gilkey JC, Jaffe LF, Ridgway EB, Reynolds GT (1978) A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, Oryzias latipes. The Journal of cell biology 76: 448-466.
75. Iwamatsu T (2004) Stages of normal development in the medaka Oryzias latipes. Mech Dev 121: 605-618.
76. Inohaya K, Yasumasu S, Ishimaru M, Ohyama A, Iuchi I, et al. (1995) Temporal and spatial patterns of gene expression for the hatching enzyme in the teleost embryo, Oryzias latipes. Dev Biol 171: 374-385.
77. Inohaya K, Yasumasu S, Yasumasu I, Iuchi I, Yamagami K (1999) Analysis of the origin and development of hatching gland cells by transplantation of the embryonic shield in the fish, Oryzias latipes. Dev Growth Differ 41: 557-566.

78. Kinoshita M, Murata K, Naruse K, Tanaka M (2009) Medaka: biology, management, and experimental protocols: John Wiley & Sons.
79. Hibiya K, Katsumoto T, Kondo T, Kitabayashi I, Kudo A (2009) Brpf1, a subunit of the MOZ histone acetyl transferase complex, maintains expression of anterior and posterior Hox genes for proper patterning of craniofacial and caudal skeletons. Dev Biol 329: 176-190.
80. Naruse K, Fukamachi S, Mitani H, Kondo M, Matsuoka T, et al. (2000) A detailed linkage map of medaka, Oryzias latipes: comparative genomics and genome evolution. Genetics 154: 1773-1784.
81. Yoshinari N, Ando K, Kudo A, Kinoshita M, Kawakami A (2012) Colored medaka and zebrafish: transgenics with ubiquitous and strong transgene expression driven by the medaka beta-actin promoter. Dev Growth Differ 54: 818-828.
82. Kawakami K, Takeda H, Kawakami N, Kobayashi M, Matsuda N, et al. (2004) A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. Dev Cell 7: 133-144.
83. Zijlstra W, Buursma A, Meeuwsen-Van der Roest W (1991) Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. Clinical chemistry 37: 1633-1638.
84. Medvinsky A, Rybtsov S, Taoudi S (2011) Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. Development 138: 1017-1031.
85. Mebius RE, Kraal G (2005) Structure and function of the spleen. Nature Reviews Immunology 5: 606-616.
86. Soza-Ried C, Hess I, Netuschil N, Schorpp M, Boehm T (2010) Essential role of c-myb in definitive hematopoiesis is evolutionarily conserved. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 17304-17308.
87. Kalev-Zylinska ML, Horsfield JA, Flores MVC, Postlethwait JH, Vitas MR, et al. (2002) Runx1 is required for zebrafish blood and vessel development and expression of a human RUNX1-CBF2T1 transgene advances a model for studies of leukemogenesis. Development 129: 2015-2030.
88. Sangiorgi F, Woods CM, Lazarides E (1990) Vimentin downregulation is an inherent feature of murine erythropoiesis and occurs independently of lineage. Development 110: 85-96.
89. De La Chapelle A, Fantoni A, Marks PA (1969) Differentiation of mammalian somatic cells: DNA and hemoglobin synthesis in fetal mouse yolk sac erythroid cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 63: 812-819.

90. Chen AT, Zon LI (2009) Zebrafish blood stem cells. J Cell Biochem 108: 35-42.
91. Nitta M, Kobayashi O, Honda S, Hirota T, Kuninaka S, et al. (2004) Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. Oncogene 23: 6548-6558.
92. Borisy GG, Taylor E (1967) The mechanism of action of colchicine. Binding of colchincine-3H to cellular protein. Journal of Cell Biology 34: 525-533.
93. Ikegami S, Taguchi T, Ohashi M, Oguro M, Nagano H, et al. (1978) Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase-alpha. Nature 275: 458-460.
94. Murad A, Everill S, Houston A (1993) Division of goldfish erythrocytes in circulation. Canadian Journal of Zoology 71: 2190-2198.
95. Barni S, Boncompagni E, Grosso A, Bertone V, Freitas I, et al. (2007) Evaluation of Rana snk esculenta blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. Aquatic toxicology 81: 45-54.
96. Meserve JH, Duronio RJ (2012) Atypical E2Fs drive atypical cell cycles. Nat Cell Biol 14: 1124-1125.
97. Chen H-Z, Ouseph MM, Li J, Pécot T, Chokshi V, et al. (2012) Canonical and atypical E2Fs regulate the mammalian endocycle. Nature cell biology 14: 1192-1202.
98. Cianciarullo AM, Naoum PC, Bertho ÁL, Kobashi LS, Beçak W, et al. (2000) Aspects of gene regulation in the diploid and tetraploid Odontophrynus americanus (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Genetics and Molecular Biology 23: 357-364.
99. Chen C, Lodish HF (2014) Global analysis of induced transcription factors and cofactors identifies Tfdp2 as an essential coregulator during terminal erythropoiesis. Exp Hematol.
100. Belson M, Kingsley B, Holmes A (2007) Risk factors for acute leukemia in children: a review. Environmental Health Perspectives: 138-145.
101. Taylor GP, Matsuoka M (2005) Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. Oncogene 24: 6047-6057.
102. Jing L, Zon LI (2011) Zebrafish as a model for normal and malignant hematopoiesis. Dis Model Mech 4: 433-438.

第 8 章　謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官として多大なご指導、ご助言を頂きました工藤明教授に心から感謝致します。赤血球のソーティングでお世話になり、さらに多くのアドバイスをしてくださった慶応大学の須田年生教授、田久保圭誉講師に心から感謝致します。また、メダカのトランスジェニックラインを供与して下さり、またディスカッションして頂いた放射線医学研究所の丸山耕一主任研究員に心から感謝致します。

技術的なアドバイスやディスカッションをしていただいた川上厚志准教授、猪早敬二助教に心から感謝致します。特に、メダカの赤血球の核型を FACS により解析する戦略は川上先生とのディスカッションで思いついたものであり本当に助かりました。また、電子顕微鏡の操作の指導をしてくださった本学のバイオ技術センターの池田桂子さんに心から感謝致します。

E2F3、*E2F5*、*E2F6*、*runx1* プラスミド及び GOLWFno621_k17 フォスミドを提供してくださった NBRP に心より感謝致します。

研究はもとより生活、進路について親身になって相談してくださった森山明美さんに心より感謝を申し上げます。また、茶谷昌宏助教には研究面・精神面において支えていただき心より感謝致します。研究室においては大勢の先輩、同窓、後輩諸氏にお世話になりました。

最後に、私の 10 年に及ぶ大学生活を支えてくださった両親、兄弟に心より感謝致します。