

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
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻：生命情報 専攻
Department of
学生氏名：泰松 清人
Student's Name

申請学位(専攻分野)：博士 (理学)
Academic Degree Requested Doctor of
指導教員(主)：工藤 明
Academic Advisor(main)
指導教員(副)：
Academic Advisor(sub)

要旨(和文 2000 字程度)
Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

【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都合が良い。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・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あるため、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)* 変異体を用いられ、野生型の赤血球と比較した。

最初に、各胚体を細胞浮遊液として処理しフローサイトメトリーにかけることで赤血球の数を定量し、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定量した結果、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成した結果、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、TFDP1 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低酸素環境下において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。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻：生命情報 専攻
Department of
学生氏名：泰松 清人
Student's Name

申請学位(専攻分野)：博士 (理学)
Academic Degree Requested Doctor of
指導教員(主)：工藤 明
Academic Advisor(main)
指導教員(副)：
Academic Advisor(sub)

要旨(英文 300 語程度)
Thesis Summary (approx.300 English Words)

Blood flow carries oxygen to the whole body, and dys-regulation of blood flow causes serious diseases such as thrombopoiesis, polythycemia, and anemia. Because of the closed system of blood circulation, blood flow requires the correct size/number of erythrocytes. Active angiogenesis during embryonic development burdens erythrocytes with two tasks: having the proper size and number for maintenance of blood flow. As to the number, longer blood vessels require more erythrocytes; however, too many erythrocytes form a thrombus, as in polycythemia. Regarding size, narrower blood vessels require smaller erythrocytes; however, small erythrocytes cannot carry enough oxygen. Therefore, we decided to use the medaka fish as a model animal to observe blood flow in early developmental stages because of its transparent body and quick development.

In this study, we divided the blood flow event into 3 phases during medaka development, and discovered adaptation of the size/number of erythrocytes for the phase transitions of blood flow. The size/number in erythrocytes was found to be regulated by proliferation for proper blood flow. Previously, we isolated a medaka mutant for blood cells, *kyoho* (*kyo*), which has erythrocytes of large size. In the positional cloning of the candidate gene for *kyo*, we identified the *TFDPI* gene, which is known as the regulator of the G1-S phase transition. By the quantification of DNA content in erythrocytes, we found that erythrocytes in WT embryos had 4N-8N DNA content, and the results of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation and cell-cycle inhibitor treatment demonstrated the proliferation of erythrocytes of WT embryos, indicating that erythrocytes were controlled by this tetraploid-cell cycle. Erythrocytes in *kyo* showed a large size of cell with higher polyploidization but no change in the number at st25 to st31, which indicates that these phenotypes are consistent with the concept of the proliferation-mediated regulation of the size/number of erythrocytes following polyploidization due to the start of blood flow.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).