

# マウス着床前初期胚における DNA 二本鎖切断に対する応答機構

学生証番号 66553

資源生物制御学分野 湯川 将之

Keyword; DSB, G2/M チェックポイント, DNA 修復,  $\gamma$ -H2AX

指導教員 青木不学

## [序論]

DNA 二本鎖切断 (DNA double-strand break: DSB)は様々な環境ストレス、例えば、電離放射線や DNA 損傷試薬によって引き起こされる。DSB の発生は細胞周期チェックポイントと DNA 修復を誘導する。DSB が起きた時、細胞周期チェックポイント機構は DSB が修復されるまで細胞周期を停止させておく。もし DSB が修復される前に細胞が分裂すると、染色体が正確に娘細胞へ分配されず、細胞は死に至る。

マウス着床前胚は電離放射線に対して高感受性であることが以前から知られている。つまり、放射線照射による胚性致死率は着床後よりも着床前の方が高い。このことは細胞周期チェックポイント、あるいは DNA 修復機構に何らかの違いがあることによると考えられるが、その原因は未だ不明である。

そこで本研究では、 $\gamma$  線照射によって引き起こされる細胞周期の変化と DNA 修復機構の指標として知られる H2AX のリン酸化を調べることでマウス着床前初期胚における電離放射線に対する高感受性の原因を明らかにすることを試みた。

## [結果と考察]

### 1. $\gamma$ 線照射された 1, 2 細胞期における G2/M チェックポイント

本研究では、各々の胚における受精のタイミングと細胞周期を同調することができる体外受精系を用いた。はじめに、媒精後 12 時間の 1 細胞期 G2 期に対して 10 Gy の  $\gamma$  線を照射することで、1 細胞期胚における G2/M チェックポイントを詳しく調べた (Fig. 1)。 $\gamma$  線未照射 (0 Gy) のコントロール群では、媒精後 14 時間の時点で分裂した胚はなかったが、20 時間では全体の 89% が 2 細胞期へと分裂していた。一方、10 Gy の  $\gamma$  線を照射した実験群では、媒精後 20 時間になっても分裂した胚はわずか 10% しかなかった。ところが、媒精後 45 時間の段階では 84% の胚が分裂していた。 $\gamma$  線照射により分裂が遅延した胚の前核は消失していなかったため、これらの胚は M 期へ移行していなかったことがわかった。全体の 50% が分裂した時間を調べると、 $\gamma$  線照射による遅延時間は約 22.5 時間であることがわかった。

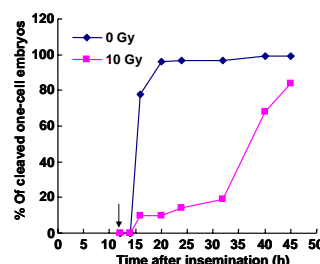


Fig. 1. 1細胞期G2期への $\gamma$ 線照射による分裂遅延  
矢印は $\gamma$ 線照射した時間を示している。

次に、媒精後 28 時間の 2 細胞期 G2 期で  $\gamma$  線照射することで、2 細胞期胚の G2/M チェックポイントを調べた。0 Gy のコントロール群では、2 細胞期胚のほとんどは媒精後 32-42 時間の間に分裂した (Fig. 2)。それに対して、10 Gy の  $\gamma$  線を照射した実験群では、媒精後 34-45 時間の間に分裂し、分裂時間の遅延は約 2.5 時間であることがわかった。

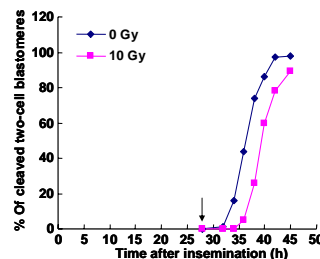


Fig. 2. 2細胞期G2期への $\gamma$ 線照射による分裂遅延  
矢印は $\gamma$ 線照射した時間を示している。

このように、 $\gamma$  線照射された胚の大部分は分裂が遅れたが、その後発生を停止し、最終的に胚盤胞期にまで到達した胚は 1 細胞期に  $\gamma$  線照射したもので 19%、2 細胞期で 6%であった。対照的に、 $\gamma$  線未照射の胚では胚盤胞期にまで 91% が到達した。これらの結果は、 $\gamma$  線照射によって DSB が発生し、G2/M チェックポイント機構によって G2 期で胚は細胞周期を停止させるが、時間の経過によりこの停止から逃れ、DSB が修復される前に M 期に進入してしまい、結果として胚盤胞期に到達する前に胚性致死を起こしたことを示している。すなわち、1, 2 細胞期胚では G2/M チェッ

クポイントは十分に機能していないと考えられる。

## 2. $\gamma$ 線照射された卵と着床前初期胚における $\gamma$ -H2AX

着床前初期胚においてDNA修復機構が機能しているかどうかを調べるために、DSB修復の指標となるリン酸化H2AX ( $\gamma$ -H2AX)を調べた。各胚に10 Gyの $\gamma$ 線を照射後、 $\gamma$ -H2AXに対する抗体を用いた免疫染色法を行った (Fig.3)。 $\gamma$ 線照射された卵母細胞 (GV卵)では $\gamma$ -H2AXシグナルは強く検出された。しかしながら、1, 2細胞期胚では検出されず、4細胞期以降からシグナルが検出されるようになり、胚盤胞期まで徐々にそのシグナル強度は強くなっていった。これらの結果は、1, 2細胞期胚ではDNA修復機構は機能していないことを示唆している。

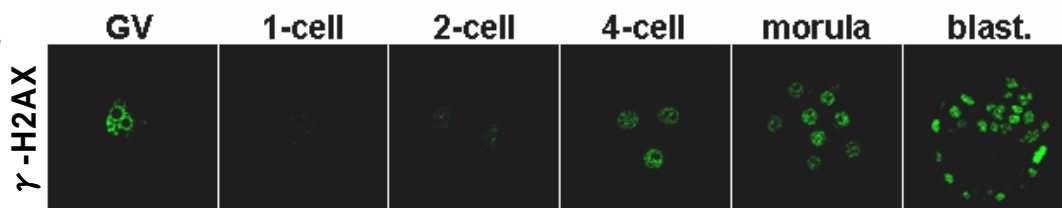


Fig. 3.  $\gamma$ 線照射された卵と着床前初期胚における $\gamma$ -H2AX

## 3. 着床前胚におけるH2AXリン酸化へのATMの関与

ATMは $\gamma$ 線によるDSBの発生に反応して自己リン酸化されることによって活性化し、H2AXをリン酸化することが知られている。よって、 $\gamma$ 線照射によるH2AXのリン酸化が1, 2細胞期では起こらず、4細胞期以降で起こる機構を調べるために、 $\gamma$ 線照射後の卵母細胞と着床前初期胚におけるリン酸化ATM (p-ATM)を免疫染色法によって調べた。 $\gamma$ 線照射後、p-ATMのシグナルは増加し、どのステージの細胞においてもp-ATMのシグナルは検出された (Fig. 3)。

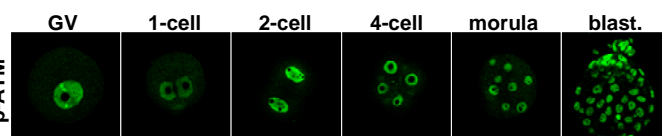


Fig. 4.  $\gamma$ 線照射された卵と着床前初期胚におけるATMリン酸化状態

次に、4細胞期以降でのH2AXのリン酸化にATMが関与しているかどうかを調べるために、ATM siRNAを使った実験を行った。1細胞期胚 (媒精後5時間)にATM siRNAをマイクロインジェクションし、それを胚盤胞期まで発生させた。 $\gamma$ 線照射後、ATM siRNAをインジェクションした胚では、p-ATMと $\gamma$ -H2AXのシグナルレベルが大幅に減少していた。この結果から、4細胞期以降でのH2AXリン酸化にはATMが関与していることが明らかになった。

これらの結果は、1, 2細胞期胚においてH2AXがリン酸化されないのはATMがH2AXをリン酸化するために必要な補因子が存在しない、もしくは、ATMがH2AXをリン酸化するのを阻害するような機構が存在することを示唆している。

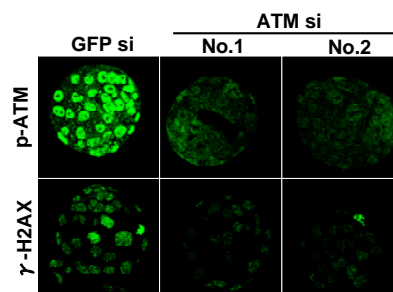


Fig. 5. blastocystにおけるATM発現抑制によるH2AXリン酸化への影響

## [結論]

以上の結果から、マウス着床前胚における放射線に対する高感受性はG2/MチェックポイントとDNA修復機構の両方が十分に機能しないためであると考えられる。また1, 2細胞期胚においてH2AXがリン酸化されないのは、ATMがH2AXをリン酸化するために必要な補因子が存在しない、もしくは、ATMがH2AXをリン酸化するのを阻害するような機構が存在するからであると考えられる。

## [文献]

Yukawa, M., Oda, S., Mitani, H., Nagata, M. and Aoki, F. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*