

東京大学大学院新領域創成科学研究科  
生命科学研究系 先端生命科学専攻

平成 19 年度

修士論文

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

指導教員 青木不学 准教授

湯川 将之

2008年3月修了

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

[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。

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。

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

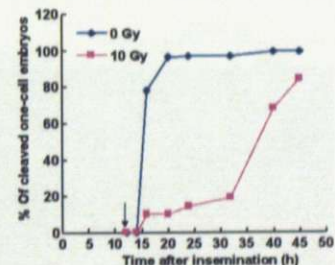


Fig. 1 1細胞期G2期への $\gamma$ 線照射による分裂遅延 矢印は $\gamma$ 線照射した時間を示している。

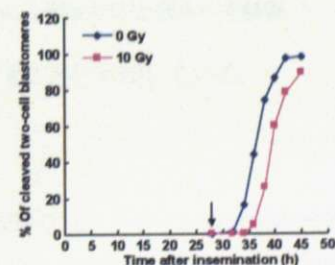


Fig. 2 2細胞期G2期への $\gamma$ 線照射による分裂遅延 矢印は $\gamma$ 線照射した時間を示している。



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。

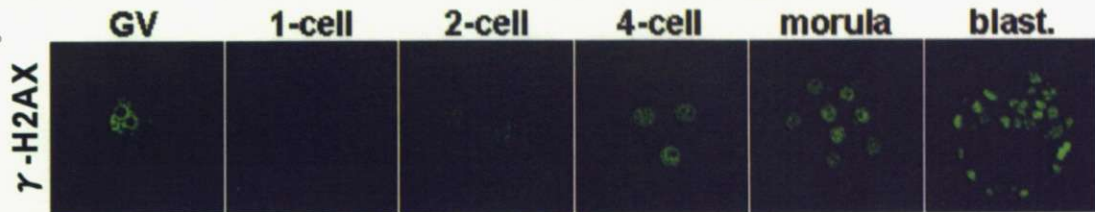


Fig. 3.  $\gamma$ 線照射された卵と着床前初期胚における $\gamma$ -H2AX

## 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)。

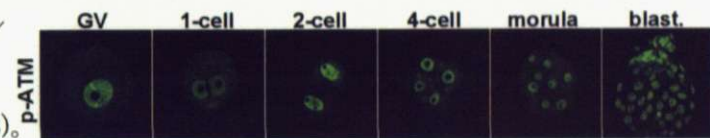


Fig. 4.  $\gamma$ 線照射された卵と着床前初期胚におけるATMリン酸化状態

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。

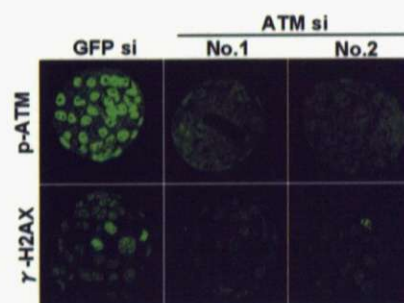


Fig. 5. blastocystにおけるATM発現抑制によるH2AXリン酸化への影響

## [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.*

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

東京大学 大学院新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻 資源生物制御学分野

湯川 将之

## 目次

SUMMARY	1
緒言	3
材料と方法	6
結果	13
考察	17
謝辞	21
参考文献	22
図表	25

## SUMMARY

DNA double-strand breaks (DSBs) are caused by various environmental stresses, such as ionizing radiation and DNA-damaging agents. When DSBs occur, cell cycle checkpoint mechanisms function to stop the cell cycle until all DSBs are repaired. In the response to DSBs, H2AX, the mammalian histone H2A variant, is phosphorylated on serine 139 by ATM kinase, which is activated via autophosphorylation. The phosphorylation of H2AX plays an important role in DSB repair.

Mouse preimplantation-stage embryos are hypersensitive to ionizing radiation. To investigate the mechanisms responding to DNA damage at G2 in mouse preimplantation embryos, I examined G2/M checkpoint and DNA repair mechanisms in the embryos. Most of the one- and two-cell embryos in which DSBs had been induced by  $\gamma$ -irradiation underwent a delay in cleavage and ceased development before the blastocyst stage. In these embryos, phosphorylated H2AX ( $\gamma$ -H2AX) was not detected in the one- or two-cell stages by immunocytochemistry, although it was detected after the two-cell stage during preimplantation development. These results suggest that the G2/M checkpoint and DNA repair mechanisms function insufficiently in one- and two-cell embryos, causing hypersensitivity to  $\gamma$ -irradiation.

In addition, to elucidate the mechanism by which H2AX is phosphorylated in late-stage preimplantation embryos but not early-stage, I examined the phosphorylation state of ATM during preimplantation development using immunocytochemistry. Following  $\gamma$ -irradiation, the phosphorylated ATM was detected at all stages. Next, to determine whether ATM is responsible for H2AX phosphorylation in preimplantation embryos, ATM expression was suppressed using siRNA. The ATM siRNA was injected into one-cell embryos (5 h post-insemination), and then these embryos were cultured to the blastocyst

stage. In these embryos, the amount of  $\gamma$ -H2AX after  $\gamma$ -irradiation was drastically decreased. These data suggest that factors necessary for the phosphorylation of H2AX by ATM kinase are lacking in one- and two-cell embryos. Alternatively, the phosphorylation of H2AX in these embryos by activated ATM may be inhibited via an unknown mechanism.

## 緒言

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 actinomycin D といった 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。

DSB が起こると、DNA 損傷シグナルは細胞周期チェックポイントや DNA 修復を含む様々な機構の下流のシグナルへと伝わっていく。哺乳類において、DSB は最初に Mre11/Rad50/NBS1 (MRN)複合体によって認識される [1]。G2 期において、認識シグナルは ATM-Chk2-Cdc25 シグナル伝達経路を活性化し、Cdc2/CyclinB 活性を抑制し、結果として G2/M チェックポイントにおいて細胞周期停止を引き起こす [2]。また、認識された DSB シグナルは DNA 修復経路へと移行する。哺乳類では、DSB 発生後すぐに、ヒストン H2A の変異体である H2AX の C 末から 139 番目の Ser がリン酸化される [3]。この H2AX のリン酸化形態 ( $\gamma$ -H2AX)は DSB 付近に局在する [4]。DSB による H2AX のリン酸化はホスファチジルイノシトール 3-kinase (PI3K)-like ファミリーの ataxia telangiectasia mutated (ATM)によって触媒されており、これは C 末から 1981 番目の Ser が自己リン酸化されることで活性化する [5]。 $\gamma$ -H2AX は BRCA1 COOH-terminal (BRCT)ドメインを持つ 53BP1, BRCA1, そして MDC1 といった様々な修復タンパクと相互作用する [6]。それゆえに、 $\gamma$ -H2AX は DSB 修復の指標として幅広く用いられている。

DSB の修復には、主に S 期と G2 期で機能する相同組み換え修復 (Homologous recombination: HR)と間期を通して機能する末端結合修復 (Non-homologous end joining: NHEJ)の 2 つの機構がある [7]。真核生物において、細菌の REC A



recombinase のオーソログである Rad51 ファミリーメンバーは相同組み換え修復に関与し、DSB はホリデイ構造を介して修復される (1)。末端結合修復において、Ku ヘテロ二量体は DSB が起きた DNA の末端に結合し DNA-PKcs をリクルートする [8; 9]。その後、ligase4-XRCC4 ヘテロ二量体が DSB の両末端を接合する [10; 11]。

ところで、マウス着床前胚は電離放射線に対して高感受性である。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 [12]。このことは着床前胚においてチェックポイント、あるいは DNA 修復機構が十分に機能していないからであると考えられる。着床前胚において放射線照射された時、もし DNA 修復機構が正常に機能しなければ、DNA 修復は行われないので、結果的に細胞周期は停止したままになり、細胞は死ぬ。一方、もしチェックポイント機構が正常に機能しなければ細胞周期は停止せず、DNA 修復をするための時間を十分に確保することができないので、染色体が正確に娘細胞へ分配されず、細胞は死に至る。X 線照射された 1 細胞期胚において、DNA 損傷は修復されないという報告がある [13]。この結果は、1 細胞期胚では DNA 修復機構が十分に機能していないので、電離放射線に対して高感受性であることを示唆している。しかしながら、上記の仮説は確認されておらず、着床前胚におけるチェックポイントと DNA 修復の分子機構は調べられていない。加えて、これらの機構は細胞の種類によって異なっているので [14]、細胞の性質を劇的に変化させる着床前胚では発生段階によってそれらは異なっている可能性もある。

それゆえに、私はマウス着床前初期胚の G2/M 期において、 $\gamma$  線照射によって引き起こされる DNA 損傷に対する応答機構を調べた。最初に、チェックポイント機構の存在を確認するために、1 細胞、2 細胞期の分裂への  $\gamma$  線照射の影響を調べた。次に、免疫染色法を用いて DNA 修復の指標である  $\gamma$ -H2AX の検出を行うことで DNA 修復機構を調べた。さらに、DSB に反応してリン酸化され、H2AX のリン酸

化を行い、DNA 修復機構の中で重要な役割を持つ ATM のリン酸化状態とその機能を着床前初期胚において調べた。

## 材料と方法

### 培養

#### ①卵と胚の採取と培養

3 週齢 BDF 1 雌マウス (CREA Japan, Inc., Tokyo, Japan) に過排卵処理として 5 IU の pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG; ASKA Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を腹腔内投与した。PMSG 投与 48 時間後に頸椎脱臼にて屠殺した後、卵巢の周りに結合している脂肪を剥がし、卵巢のみを 10 mM HEPES と 3 mg/mL BSA を含む KSOM 培地 (KSOM-HEPES) [15] に移した。その後、顕微鏡下で卵巢を 30 G の針 (TERUMO CO, LTD. Tokyo, Japan) を用いて破壊し、ガラスピペットを用いたピペッティングにて卵母細胞周囲の卵丘細胞を除去後、卵母細胞を KSOM-HEPES にて洗浄した。

3 週齢 BDF 1 雌マウスに過排卵処理として 5 IU の PMSG を腹腔内投与した。PMSG 投与 48 時間後に 5 IU の human chorionic gonadotropin (hCG; ASKA Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を腹腔内投与し 15 時間後、卵管膨大部に排卵された減数分裂第二分裂中期卵を回収し、human tubal fluid (HTF) 培地 [16] に移した。体外受精は、リタイア ICR 雄マウス (Japan SLC, Inc., shizuoka, Japan) の精巢上体尾部から採取した精子を、HTF 培地中 37 °C、5% CO<sub>2</sub> と 95% air の条件下で 2 時間前培養したものを用いて行った。媒精 4 時間後、受精卵を 3 mg/mL BSA を含む KSOM 培地の 100 μL の液滴で 3 回洗浄し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> と 95% air の条件下で培養した。

#### ②NIH3T3 細胞の培養

NIH3T3 細胞は 10%FBS (Sigma Aldrich, MO, USA) を添加した Dulbecco's modified

Eagle medium (DMEM; Invitrogen Co., Faraday Avenue Carlsbad, CA,USA) を用いて 37 °C、5% CO<sub>2</sub> と 95% air の条件下で培養した。

### γ線照射

卵および胚への γ線照射処理は、<sup>137</sup>Cs から 9.3 Gy/min の量で照射される γ線を合計で 10 Gy 曝露することにより行った。γ線照射された細胞はその後、37 °C、5% CO<sub>2</sub> と 95% air の条件下で培養した。

### 免疫染色

卵または胚を 3.7% Paraformaldehyde/PBS で 1 時間固定し、1 mg/mL の濃度で BSA を含む PBS (0.1% PBS/BSA) で洗浄し、続いて 0.5% Triton X-100/PBS で 15 分間処理した。その後、サンプルを 0.1% PBS/BSA で洗浄し、0.1% PBS/BSA で 500 倍に希釈した一次抗体溶液中で 4 °C、12–15 時間インキュベートした。その後、0.1% PBS/BSA によって洗浄し、0.1% PBS/BSA で希釈した二次抗体溶液中で室温、45 分間インキュベートした。二次抗体溶液の希釈倍率は Cy5 AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA) を用いた場合で 50 倍、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen Co., Faraday Avenue Carlsbad, CA,USA) で 100 倍とした。二次抗体処理後、サンプルを 0.1% PBS/BSA で洗浄し、propidium iodide (PI) 100 μg/mL (Sigma Aldrich), RNase 25 μg/mL (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を含む VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いてホールマウント標本を作製し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510; Carl Zeiss Japan, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

### RNA 抽出



ISOGEN (Nippon Gene Co., Toyama, Japan) をエッペンドルフチューブに 400  $\mu$ l 入れ、その中に NIH3T3 細胞または卵および胚を加え、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて一時保存した。室温に戻し、それぞれのサンプルに外部標準として 100 pg/ $\mu$ l Rabbit  $\alpha$ -globin mRNA を 1  $\mu$ l ずつ添加し、100  $\mu$ l のクロロホルムを加え、ボルテックスミキサーにて激しく混合した。 $4^{\circ}\text{C}$ で 5 分間放置したのち、12,000 rpm、 $4^{\circ}\text{C}$ で 15 分間遠心し RNA の含まれる水層 (上層) の 200  $\mu$ l を新しいエッペンチューブに移した。共沈剤として 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Glycogen (Invitrogen) をそれぞれのチューブに 2  $\mu$ l ずつ加えしっかりと攪拌した後、イソプロパノールを 400  $\mu$ l ずつ加え、1 分間激しく攪拌した。その後  $4^{\circ}\text{C}$ で 30 分間放置した後、15,000 rpm、 $4^{\circ}\text{C}$ で 30 分間遠心し、RNA の沈殿を得た。70%のエタノールを 800  $\mu$ l 加え沈殿を洗い、再び 15,000 rpm、 $4^{\circ}\text{C}$ で 25 分間遠心した。エタノールを除去し、吸引式乾燥機で 7 分間乾燥した後、DEPC 水 28.5  $\mu$ l を加えた。ピペッティングおよび  $55^{\circ}\text{C}$ 、12 分間放置することにより RNA を溶解した。

### 逆転写反応

抽出した Total RNA 27  $\mu$ l に 2  $\mu$ l の 10 mM dNTP (Invitrogen)、2  $\mu$ l の Oligo (dT)<sub>12-18</sub> primer (Invitrogen) を加え、全量 31  $\mu$ l とした。この混合液を  $70^{\circ}\text{C}$ で 5 分間インキュベートして RNA の高次構造を破壊した。氷中に 1 分以上置き、10 $\times$ Reaction Buffer (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 4  $\mu$ l、RNasin (Promega, Corp., Madison, USA) 0.5  $\mu$ l、ReverseScriptIV (Wako) 0.5  $\mu$ l、DEPC 水 4  $\mu$ l を順に入れ、マイクロチップの先でよく混合した。 $42^{\circ}\text{C}$ で 30 min、 $95^{\circ}\text{C}$ で 5 分間反応させたのち温度を  $4^{\circ}\text{C}$ に下げ、軽く遠心して反応液をチューブの底に集めた。RNaseH (TaKaRa, Shiga, Japan) を 0.5  $\mu$ l (2 units) 加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で 40 分間インキュベートして DNA と 2 本鎖をなす未反応の RNA を除去した。

## cDNA の精製

逆転写反応産物に、1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム、2.5 倍量の 100%エタノールを加え、ボルテックスミキサーにてしっかりと攪拌した。その後 30 分間、室温で放置した。15,000 rpm、4°C、15 分間遠心し、cDNA の沈殿を得た。上清を除去し、70%エタノール 500  $\mu$ l を加えてチューブを洗い、再度 15,000 rpm、4°C、25 分間遠心した。遠心後 70%エタノールを除き、7 分間真空乾燥した。乾燥後、滅菌蒸留水に cDNA を溶かした。

## 定量的PCR

PCR 反応液 (25  $\mu$ l) は 17.65  $\mu$ l の滅菌蒸留水、2.5  $\mu$ l の 10 $\times$ PCR buffer、0.75  $\mu$ l の 10 mM dNTP mix、0.35  $\mu$ l の 250 mM MgCl<sub>2</sub>、0.25  $\mu$ l の ExTaq HS (Takara)、1.25  $\mu$ l の遺伝子特異的 sense と antisense プライマー、そして 1  $\mu$ l の cDNA 溶液を含んでいる。PCR に用いた Rabbit  $\alpha$ -globin、ATM、cyclinA2 [17; 18] に対する各プライマー配列並びに PCR 条件は下に示す。

### *Rabbit $\alpha$ -globin*

Sense: 5'-GTGGGACAGGAGCTTGAAAT-3'

Antisense: 5'-GCAGCCACGGTGGCGAGTAT-3'

95°C、30 秒  $\rightarrow$  (95°C、20 秒  $\rightarrow$  58°C、30 秒  $\rightarrow$  72°C、20 秒)  $\times$  24 cycle

### *cyclin A2*

Sense: 5'-GAGGTGGGAGAAGAATATAA -3'

Antisense: 5'-ACTAGGTGCTCCATTCTCAG -3'

95°C、20 秒  $\rightarrow$  (95°C、15 秒  $\rightarrow$  56.4°C、20 秒  $\rightarrow$  72°C、20 秒)  $\times$  32 cycle

## *ATM*

Sense: 5'- CCAACCAGCCAATCACTAAAC -3'

Antisense: 5'- TGTCTCCTTTCCTTGCCATC -3'

94°C、60 秒 →(94°C、30 秒 →61°C、30 秒 →72°C、15 秒) ×37 cycle

PCR産物を2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。PCR産物の相対的な量は泳動ゲルのバンドの濃さをScion image software (Scion Corporation, MD, USA)で計測することで解析した。そして、その値を $\alpha$ -globinの測定値で補正した。

## **Real-time PCR**

合成した cDNA を鋳型とし、Smart Cycler System (Cepheid, Sunnyvale, USA. And TAKARA, Shiga, Japan)を用いた PCR により定量を行った。DNA に SYBR<sup>®</sup> *Premix Ex Taq*<sup>™</sup> (Perfect Real Time) (TAKARA) を 12.5  $\mu$ l, 10  $\mu$ M プライマーを各 0.5  $\mu$ l を加えて全量が 25  $\mu$ l になるように滅菌蒸留水を加えて PCR 反応液を作製した。PCR に用いたプライマーは前述したものと、*GAPDH* プライマー (以下) である。PCR は全て以下の条件で行った。

## *GAPDH*

Sense: 5'- CACATTGGGGGTAGGACAC -3'

Antisense: 5'- AACTTTGGCATTGTGGAAGG -3'

95°C、10 秒 →(95°C、5 秒 →60°C、20 秒 (optics on) ×35 cycle

## **阻害剤処理**

KU-55933 (calbiochem, Darmstadt, Germany) および CGK733 (Sigma Aldrich) を加え

た KSOM 培地に胚盤胞期胚を移し、1 時間前培養して実験に用いた。KU-55933 は DMSO 中に 10 mM の濃度で溶かしたストック溶液を用いて、最終濃度 10, 20, 50, 100  $\mu$ M となるように KSOM 培地に添加した。CGK733 は DMSO 中に 10 mM の濃度で溶かしたストック溶液を用いて、最終濃度 2, 5, 10, 20  $\mu$ M となるように KSOM 培地に添加した。

### **si (short interference) RNA の調整**

使用する siRNA は、Invitrogen program BxLOCK-iT<sup>TM</sup> RNAi Designer (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) を用いて設計した。また、siRNA すべてに invitrogen program Convert standard siRNA to Stealth<sup>TM</sup> RNAi (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/sirna/extend.do?pid=2660227812202383890>) を用いて stealth 修飾を施した。siRNA を RNase free water で溶解し、20  $\mu$ M の濃度に調整した。Transfection および microinjection に用いた *eGFP* [19]、*ATM* の siRNA の配列は下に示す。

*eGFP* : 5'- CCACUACCUGAGCACCCAGUCCGCC-3'

*ATM* : no.1 5'- UAACAGAGAGAUACUUCUCCUGA-3'

: no.2 5'- UGAACUCCUGAUAAUCCACAAGGG-3'

: no.3 5'- UUAGGAAGCCCACUCCUCUUUGGC-3'

### **NIH3T3 細胞への siRNA transfection**

24 穴プレート (IWAKI, Fukui, Japan)に 15000 個の NIH3T3 細胞を入れ、最終容量 500  $\mu$ l となるように DMEM を加え培養した。24 時間後、Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium (Invitrogen)100  $\mu$ l 中に 6 pmol の siRNA と 1  $\mu$ l の Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX を加えた溶液、100  $\mu$ l を加えることで、各ウェルに siRNA が最終濃度



10 nM、培地容量 600  $\mu$ l となるように調製した。それから 48 時間培養後、これらを real-time PCR 用のサンプルとして実験に用いた。

### **1 細胞期胚の細胞質への siRNA microinjection**

microinjection は Inverted microscope (ECLIPSE TE300, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) と micromanipulator (Narishige Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使い、borosilicate glass capillaries (GC100 Tf-10, Harvard Apparatus Ltd., Kent, UK) 中に入れた各ターゲット遺伝子の siRNA を microinjector (IM300, Narishige Co., Ltd., Tokyo, Japan) により  $N_2$  の圧力で押し出し、受精後 5 時間の 1 細胞期胚の細胞質に約 25 pl 注入した。注入後の 1 細胞期胚を 50  $\mu$ l の KSOM で三回洗浄し、培養した。microinjection は 10 mM HEPES を含む KSOM 培地中で行った。

## 結果

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

X線照射されたマウスから得られた1細胞期胚が2細胞期胚に分裂するまでの時間に遅れが見られることが報告されていることから、1細胞期ではX線照射によるDNA切断に対してG2/Mチェックポイントが機能していると考えられる [20]。本研究ではまず、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て、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)。1細胞期胚へはG2期である媒精後12時間 [21]で10 Gyの $\gamma$ 線を照射した。M期への移行は、前核の消失を観察することで調べた。 $\gamma$ 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M期へ移行した1細胞期胚は全体の86%、分裂した胚は0%であったが、16時間ではそれぞれ全体の98%、78%になり、20時間では99%、89%となった (Fig. 1)。一方で、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M期へ移行した胚は全体の15%で、分裂した胚はわずか10%であった。媒精後32時間までに、M期へ移行した1細胞期胚と分裂した1細胞期胚の割合は、それぞれ全体の24%、20%にまで増加し、その後、40時間の段階で76%、69%、45時間の段階で87%、84%となった。0 Gyのコントロール群では45時間の時点で大部分の胚が二回目の分裂を終えて4細胞期胚に到達していた (data not shown)。全体の50%が分裂した時間を、0 Gyと10 Gyの $\gamma$ 線を照射した1細胞期胚の実験群で比較すると、 $\gamma$ 線照射による遅延時間は約22.5時間であることが分かった。このように、 $\gamma$ 線照射によってG2期で細胞周期停止が誘起されたことから、1細胞期胚においてG2/Mチェックポイントは機能していることが示された。

次に、2細胞期胚のG2/Mチェックポイントを調べた。2細胞期胚へはG2期であ

る媒精後 28 時間 [22]で  $\gamma$  線照射した。 $\gamma$  線未照射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)。一方で、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。このことから、2 細胞期においても G2/M チェックポイントは機能していることが示された。

$\gamma$  線照射された胚の大部分は照射後の分裂を行ったが、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 (Table. 1 and 2)。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。よってこのことから 1, 2 細胞期胚では 10 Gy の  $\gamma$  線照射に対して 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。

#### $\gamma$ 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  $\gamma$ -H2AX を調べた。各胚に 10 Gy の  $\gamma$  線を照射し 30 分後、H2AX の Ser139 のリン酸化を特異的に認識する抗体を用いた免疫染色法によって  $\gamma$ -H2AX を検出した。 $\gamma$  線未照射の卵母細胞および着床前初期胚では  $\gamma$ -H2AX シグナルは検出されなかった (Fig. 3, non-irradiated)。一方、 $\gamma$  線照射された卵母細胞では  $\gamma$ -H2AX シグナルははっきりと検出された (Fig. 3, irradiated)。しかしながら、1, 2 細胞期胚では検出されず、4 細胞期以降から核内で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。

体細胞の M 期で  $\gamma$ -H2AX のシグナルが検出されることが報告されているため [23; 24]、H2AX がリン酸化されない 1, 2 細胞期胚の M 期において、 $\gamma$  線照射による H2AX リン酸化が起こるかを調べたところ、1, 2 細胞期胚の M 期では  $\gamma$  線照射によって、 $\gamma$ -H2AX の強いシグナルを検出することができた (Fig. 4)。

### 卵と着床前初期胚での ATM の発現レベルとリン酸化状態

ATM は  $\gamma$  線による DSB の発生に反応して serine 1981 (S1981) が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 [5]。  $\gamma$  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、ATM の発現を、卵母細胞と着床前初期胚において RT-PCR 法によって調べた。 ATM mRNA の相対量は受精後、2 細胞期までわずかに減少していた (Fig. 5A)。 4 細胞期以降、ATM mRNA 量は増大し、胚盤胞期まで同じレベルを維持していた。

次に、 $\gamma$  線照射 30 分後の卵母細胞と着床前初期胚におけるリン酸化 ATM を免疫染色法によって調べた。  $\gamma$  線未照射のコントロール群において、卵母細胞のみにわずかにリン酸化 ATM (p-ATM) のシグナルは検出された (Fig. 5B, non-irradiated)。  $\gamma$  線照射後、すべてのステージで p-ATM のシグナルは増加した。 その強度は 1 細胞期のみわずかに低いが、その他のすべてのステージの細胞ではリン酸化 ATM のシグナルは同程度に検出された (Fig. 5B, irradiated)。

### 着床前胚における H2AX リン酸化への ATM の関与

着床前胚における 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 の阻害剤と siRNA を使った実験を行った。 阻害剤は ATM の特異的阻



害剤である KU-55933 と ATM, ATR の特異的阻害剤である CGK733 を用いた。胚盤胞期胚 (媒精後 96 時間) を KU-55933 (10, 20, 50, 100  $\mu$ M) および CGK733 (2, 5, 10, 20  $\mu$ M) で 1 時間前処理し、 $\gamma$  線を照射して免疫染色した (Fig. 6)。KU-55933 処理した胚盤胞期胚は 50  $\mu$ M の濃度まで、p-ATM および  $\gamma$ -H2AX のシグナルレベルを次第に減少させていったが、それ以上の濃度ではさらにシグナルレベルが減少することにはなかった。一方、CGK733 は 20  $\mu$ M の濃度まで、p-ATM および  $\gamma$ -H2AX のシグナルレベルを濃度依存的に減少させていった。

次に、siRNA によって ATM の発現抑制を行った。はじめに、ATM に対する 3 種類の異なる配列の siRNA のうち、ATM の発現抑制効果が高いものを調べた。siRNA の胚へのマイクロインジェクションは、多大な労力を要するため、マウス繊維芽細胞である NIH3T3 細胞に siRNA をトランスフェクションしてその効果を定量した。その結果、ATM の mRNA 量は ATM siRNA の no.1 と no.2 をトランスフェクションしたものでのみ大幅に減少していた (Fig. 7A)。一方、コントロールの Cyclin A2 の mRNA 量に関しては siRNA をトランスフェクションしていない細胞、eGFP siRNA トランスフェクション細胞、ATM siRNA トランスフェクション細胞の間では大きな差はなかった (Fig. 7B)。この結果より、no.1 と 2 の ATM の siRNA を以下の初期胚の実験に用いることにした。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。ATM siRNA をインジェクションした胚では GFP siRNA をインジェクションしたコントロール胚と比べて ATM mRNA が減少していることを確認した。 $\gamma$  線照射後、p-ATM と  $\gamma$ -H2AX のシグナルレベルは、ATM siRNA をインジェクションした胚の方が GFP siRNA インジェクションした胚と比べて大幅に減少していた (Fig. 8C)。

## 考察

$\gamma$ 線照射された1, 2細胞期胚は分裂する時間が遅延し、胚盤胞期に至る前に発生を停止した (Fig. 1 and 2, Table 1 and 2)。さらにこれらの胚では $\gamma$ 線によるH2AXのリン酸化は検出されなかった (Fig. 3)。これらの結果は1, 2細胞期胚において、G2/MチェックポイントとDNA修復機構は十分に機能していないことを示している。

$\gamma$ -H2AXはDNA損傷部位に修復タンパク質を維持するのに必要である [6]。DNA修復機構の中で、HRは主にS期後期とG2期で機能している、一方、NHEJは間期を通して機能している [7]。先行研究では、H2AXをノックアウトしたマウスES細胞では、野生型のES細胞と比べてHR経路のDNA修復機構が正常に機能しないと報告されている [25]。酵母では、哺乳類のH2AXのS139に相当するH2AのS129の変異はNHEJ経路のDNA修復機能を低下させることが報告されている [26]。このように、 $\gamma$ -H2AXは両方のDNA修復機構において重要な働きをしていると考えられる。私は着床前初期胚のG2期におけるDNA修復機構を、 $\gamma$ 線照射後にH2AXのリン酸化を調べることで評価した (Fig. 3)。 $\gamma$ 線照射後、1細胞期胚ではH2AXのリン酸化は起こらなかったことから、1細胞期G2期においてHRもNHEJも十分に機能していないと考えられる。最近、G1-S期前期 (交尾後8時間)のマウス1細胞期胚において、 $\gamma$ 線照射後にH2AXがリン酸化されないことが報告された [27]。さらに、X線照射された精子で受精した受精卵は、p53依存的様式で1細胞期のG1/S期で細胞周期が停止したままになるという報告がある [28]。これらの結果は1細胞期のG1/S期においてNHEJは十分に機能していないことを示唆しており、今回の結果と合わせると、1細胞期胚では間期を通してDNA修復機構が十分に機能していないと考えられる。

$\gamma$ -H2AXはクロマチンリモデリング因子と相互作用して、クロマチンのリモデリングを引き起こすことが知られている [29]。受精後、胚性ゲノムからの転写は1細胞期中期から後期にかけて始まり、2細胞期の間に増大する [22]。この胚性遺伝子の発現にはクロマチンのリモデリングが関わっていることが示唆されている [30]。また、胚性遺伝子発現の異常は、その後の胚発生に大きく影響を与えることが示唆されている [31]。細胞内環境では様々な反応による副産物として常に活性酸素種が発生している。そのため、ゲノムは常に活性酸素種によってある程度の損傷を受けている。このとき、もし1, 2細胞期胚においてH2AXのリン酸化が起きてしまうとDNAの損傷部位でクロマチンのリモデリングが起きてしまい、結果として胚性遺伝子発現を厳密に制御することができなくなると考えられる。よって1, 2細胞期胚において、H2AXのリン酸化が起きないのは、この時期における胚性遺伝子発現の開始を厳密に制御し、胚発生を正常に行うためであると考えられる。したがって、転写が行われていないM期では、1, 2細胞期胚においてもH2AXのリン酸化は通常通り起こったものと考えられる (Fig. 4)。

G2期で $\gamma$ 線照射された1, 2細胞期胚は細胞周期を一時的に停止した後、分裂した (Fig. 1 and 2)。1, 2細胞期胚における $\gamma$ -H2AXの結果から、これらの胚では、細胞周期停止中にDSBは完全修復されていないようなので、これが原因で胚盤胞期に至る前に発生を停止してしまったと考えられる。このように、DNA修復が完了する前に分裂しているので、1, 2細胞期胚においてG2/Mチェックポイントは機能しているが、十分ではないことが示唆される。

排卵前に卵に蓄えられた母方転写産物は、受精後に徐々に分解していき、そのほとんどは2細胞期後期までに分解される [32]。胚性ゲノムからの転写は1細胞期中期から後期にかけて始まり、2細胞期の間に増大し [22]、母方転写産物の損失を補う。それゆえに、この時期における胚性ゲノムからのG2/Mチェックポイント

機構に関わる遺伝子の転写レベルが低ければ、2細胞期後期までにその転写産物は非常に少なくなる。そして、それら転写産物の量が G2/M チェックポイント機構が機能するために必要な閾値以下に減少すると、細胞周期の進行が再開し、細胞の分裂が起こると考えられる。このことが、1, 2細胞期胚における不十分な G2/M チェックポイント機構の原因と考えられる。この仮説は、 $\gamma$ 線照射された1, 2細胞期胚が、いずれも本来2細胞期後期である媒精後約40時間で同調して分裂したことから支持される (Fig. 1 and 2)。

1, 2細胞期胚においてリン酸化 ATM は検出されたが (Fig. 5B)、 $\gamma$ -H2AX は検出されなかった。ATM は S1981 の自己リン酸化によって活性化され、H2AX をリン酸化する [5]。ATM をノックアウトしたマウス繊維芽細胞では放射線照射による H2AX のリン酸化がほとんど起こらない [33]。よって、ATM は H2AX をリン酸化する主な酵素であると考えられる。実際、ATM の阻害剤および siRNA を使った実験から、ATM は胚盤胞期における  $\gamma$ 線照射による H2AX のリン酸化を触媒していることが分かった (Fig. 6 and 7)。1細胞期胚では H2AX タンパク質が核内に存在していることが報告されているので [27]、1, 2細胞期胚で H2AX がリン酸化されないことは、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、H2AX のリン酸化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. 8)。

卵母細胞において  $\gamma$ -H2AX とリン酸化 ATM のシグナルは検出されたので (Fig. 2 and 3)、卵母細胞においても DNA 修復機構は機能していると考えられる。ATM は DNA 修復機構だけでなく、p53 依存的、非依存的な細胞死の両方に関わっている [34]。また、成長期卵における p63 依存的細胞死 [35] や MII 期卵における Bax 依存的細胞死 [36] 等が報告されている。卵巣内で長い間 G2 期で停止している卵母細胞は、ゲノムの安定性を保つために DNA 修復と細胞死の機構によって監視され



ているようである。

以上の結果は G2/M チェックポイントと DNA 修復機構が 1, 2 細胞期胚において不十分な状態であることを示唆するものであり、これによってマウス着床前初期胚は  $\gamma$  線に対して高感受性であると考えられる。また、1, 2 細胞期胚で 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、H2AX のリン酸化を阻害するような機構が存在するからだと考えられる。

## 謝辞

本論文を終えるにあたり、研究及び論文の作製を終始親身に御助言、御指導いただきました東京大学大学院新領域創成科学研究科 青木不学 准教授に心から深く感謝致します。また、研究の様々な局面において御助言を頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科 永田昌男 教授に感謝致します。

実験の進行におきまして多大なる技術的指導・専門的知識および様々な御助力を頂きました同大学大学院同研究科の 三谷啓志 教授、尾田正二 講師に心より感謝を致します。

また、日々の研究生活において、ともに苦しみ、励まし、喜びあった同期の井上梓君、菊田真吾君、曾根原弘樹君、平坂聡君に心から感謝します。

共に楽しく充実した時間を歩んでくれた、同大学大学院同分野の後輩、先端生命科学専攻の同期、後輩に感謝します。

最後に、私の二年間の研究生活において、研究に没頭できる素晴らしい環境を提供し、また研究が円滑に進むように暖かく見守ってくださった家族をはじめとする、本研究に関わるすべての方々に心から感謝致します。

## 参考文献

- [1] D. Cahill, B. Connor, and J.P. Carney, Mechanisms of eukaryotic DNA double strand break repair. *Front Biosci* 11 (2006) 1958-76.
- [2] A. Sancar, L.A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, and S. Linn, Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73 (2004) 39-85.
- [3] E.P. Rogakou, D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, and W.M. Bonner, DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273 (1998) 5858-68.
- [4] E.P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, and W.M. Bonner, Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146 (1999) 905-16.
- [5] C.J. Bakkenist, and M.B. Kastan, DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421 (2003) 499-506.
- [6] O. Fernandez-Capetillo, A. Lee, M. Nussenzweig, and A. Nussenzweig, H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* 3 (2004) 959-67.
- [7] M. Takata, M.S. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, M. Hashimoto, H. Utsumi, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Shinohara, and S. Takeda, Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J* 17 (1998) 5497-508.
- [8] T.M. Gottlieb, and S.P. Jackson, The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 72 (1993) 131-42.
- [9] M. Yaneva, T. Kowalewski, and M.R. Lieber, Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *Embo J* 16 (1997) 5098-112.
- [10] D.A. Ramsden, and M. Gellert, Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *Embo J* 17 (1998) 609-14.
- [11] S.A. Nick McElhinny, C.M. Snowden, J. McCarville, and D.A. Ramsden, Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 2996-3003.
- [12] P. Jacquet, Sensitivity of germ cells and embryos to ionizing radiation. *J Biol Regul Homeost Agents* 18 (2004) 106-14.

- [13] P. Jacquet, J. Buset, J. Vankerkom, S. Baatout, L. de Saint-Georges, W. Schoonjans, and C. Desaintes, Mouse one-cell embryos undergoing a radiation-induced G2 arrest may re-enter S-phase in the absence of cytokinesis. *Can J Physiol Pharmacol* 80 (2002) 618-24.
- [14] O. Fernandez-Capetillo, H.T. Chen, A. Celeste, I. Ward, P.J. Romanienko, J.C. Morales, K. Naka, Z. Xia, R.D. Camerini-Otero, N. Motoyama, P.B. Carpenter, W.M. Bonner, J. Chen, and A. Nussenzweig, DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol* 4 (2002) 993-7.
- [15] J.A. Lawitts, and J.D. Biggers, Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol* 225 (1993) 153-64.
- [16] P. Quinn, and A.J. Begley, Effect of human seminal plasma and mouse accessory gland extracts on mouse fertilization in vitro. *Aust J Biol Sci* 37 (1984) 147-52.
- [17] S. Kageyama, M. Nagata, and F. Aoki, Isolation of nascent messenger RNA from mouse preimplantation embryos. *Biol Reprod* 71 (2004) 1948-55.
- [18] Z. Alizadeh, S. Kageyama, and F. Aoki, Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNAs after fertilization. *Mol Reprod Dev* 72 (2005) 281-90.
- [19] S. Kageyama, H. Liu, M. Nagata, and F. Aoki, The role of ETS transcription factors in transcription and development of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 344 (2006) 675-9.
- [20] S. Grinfeld, and P. Jacquet, An unusual radiation-induced G2 arrest in the zygote of the BALB/c mouse strain. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 51 (1987) 353-63.
- [21] F. Aoki, and R.M. Schultz, DNA replication in the 1-cell mouse embryo: stimulatory effect of histone acetylation. *Zygote* 7 (1999) 165-72.
- [22] F. Aoki, D.M. Worrall, and R.M. Schultz, Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 181 (1997) 296-307.
- [23] K.J. McManus, and M.J. Hendzel, ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16 (2005) 5013-25.
- [24] Y. Ichijima, R. Sakasai, N. Okita, K. Asahina, S. Mizutani, and H. Teraoka, Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. *Biochem Biophys Res Commun* 336 (2005) 807-12.
- [25] A. Xie, N. Puget, I. Shim, S. Odate, I. Jarzyna, C.H. Bassing, F.W. Alt, and R. Scully, Control of sister chromatid recombination by histone H2AX. *Mol Cell* 16 (2004) 1017-25.

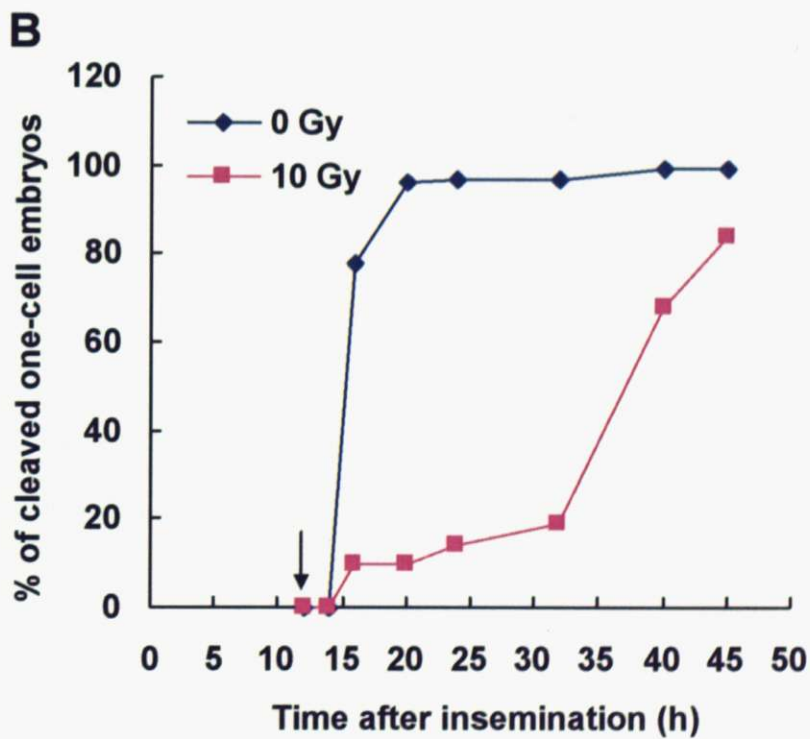
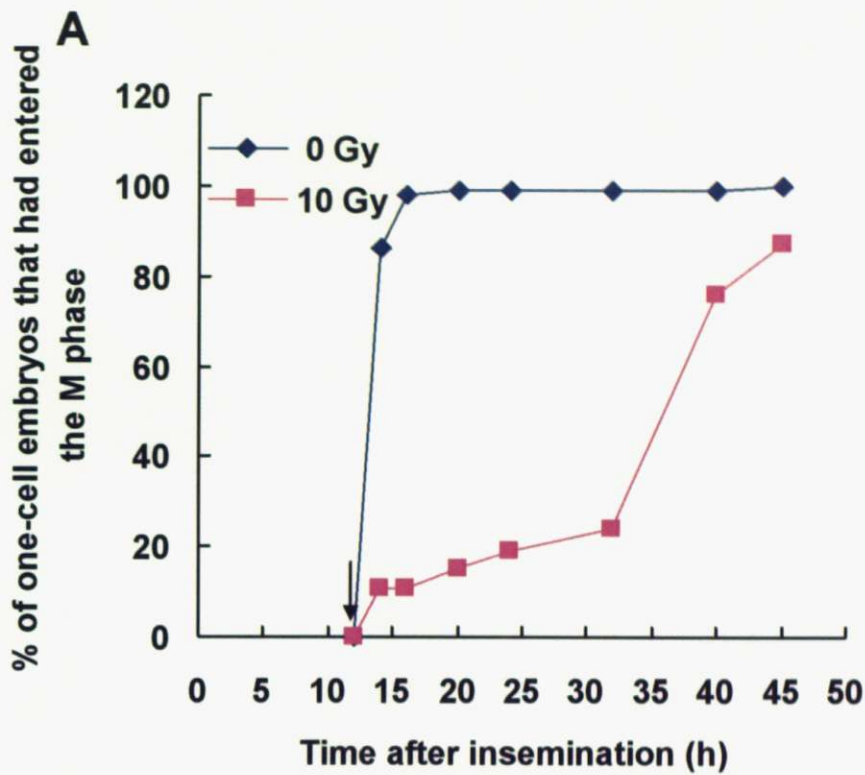
- [26] J.A. Downs, N.F. Lowndes, and S.P. Jackson, A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* 408 (2000) 1001-4.
- [27] S.K. Adiga, M. Toyoshima, T. Shimura, J. Takeda, N. Uematsu, and O. Niwa, Delayed and stage specific phosphorylation of H2AX during preimplantation development of gamma-irradiated mouse embryos. *Reproduction* 133 (2007) 415-22.
- [28] T. Shimura, M. Inoue, M. Taga, K. Shiraishi, N. Uematsu, N. Takei, Z.M. Yuan, T. Shinohara, and O. Niwa, p53-dependent S-phase damage checkpoint and pronuclear cross talk in mouse zygotes with X-irradiated sperm. *Mol Cell Biol* 22 (2002) 2220-8.
- [29] R.H. Pusarla, and P. Bhargava, Histones in functional diversification. Core histone variants. *Febs J* 272 (2005) 5149-68.
- [30] J.P. Renard, Chromatin remodelling and nuclear reprogramming at the onset of embryonic development in mammals. *Reprod Fertil Dev* 10 (1998) 573-80.
- [31] S.J. Bultman, T.C. Gebuhr, H. Pan, P. Svoboda, R.M. Schultz, and T. Magnuson, Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes Dev* 20 (2006) 1744-54.
- [32] R.M. Schultz, Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays* 15 (1993) 531-8.
- [33] S. Burma, B.P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, and D.J. Chen, ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276 (2001) 42462-7.
- [34] B. Zhivotovsky, and G. Kroemer, Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (2004) 752-62.
- [35] E.K. Suh, A. Yang, A. Kettenbach, C. Bamberger, A.H. Michaelis, Z. Zhu, J.A. Elvin, R.T. Bronson, C.P. Crum, and F. McKeon, p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature* 444 (2006) 624-8.
- [36] G.I. Perez, C.M. Knudson, L. Leykin, S.J. Korsmeyer, and J.L. Tilly, Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nat Med* 3 (1997) 1228-32.

**Table 1****Preimplantation development of the embryos irradiated at one-cell stage**

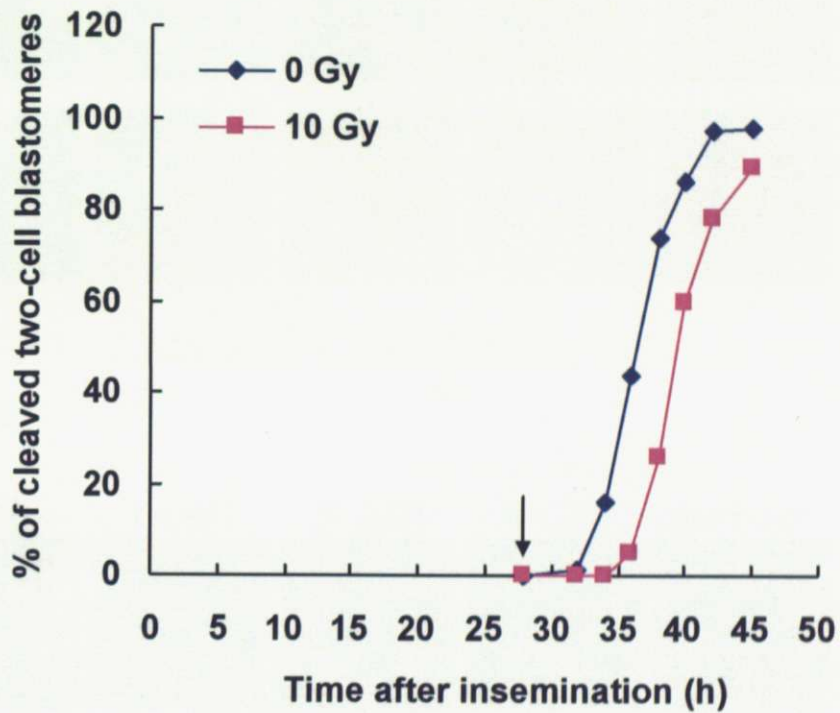
	The number of the embryos developed to (%)				
	1-cell	2cell	4-cell	morula	blast.
<b>0 Gy</b>	135 (100)	134 (99)	134 (99)	131 (97)	127 (94)
<b>10 Gy</b>	135 (100)	127 (94)	105 (78)	51 (38)	26 (19)

**Table 2****Preimplantation development of the embryos irradiated at two-cell stage**

	The number of the embryos developed to (%)			
	2-cell	4-cell	morula	blast.
<b>0 Gy</b>	150 (100)	149 (99)	148 (99)	131 (87)
<b>10 Gy</b>	150 (100)	146 (97)	111 (74)	9 (6)



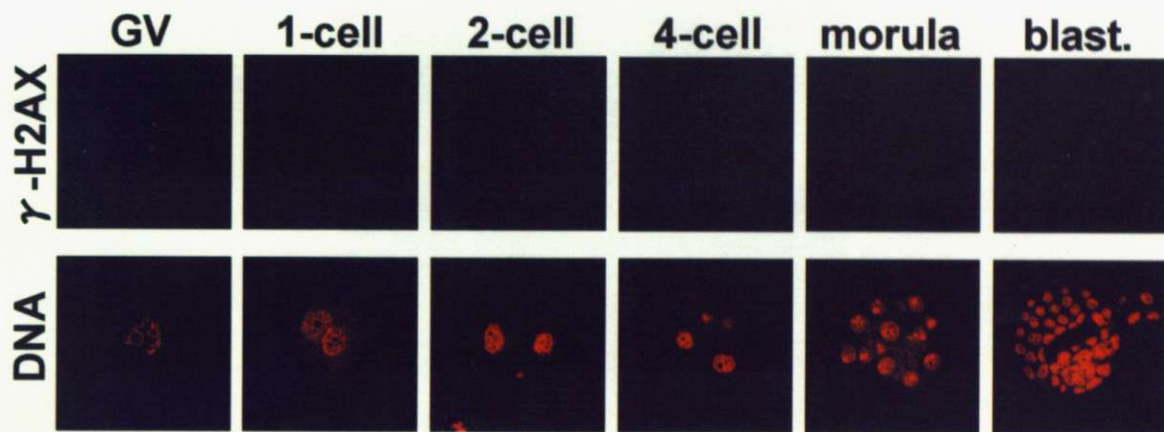
**Fig. 1.** 1細胞期G2期への $\gamma$ 線照射による分裂遅延  
 媒精後12時間の1細胞期胚に10 Gyの $\gamma$ 線を照射した。 A; 1細胞期M期に進入した胚の割合。すなわち、核膜消失した胚と分裂した胚の合計を示している。 B; 2細胞期へ分裂した時間。矢印は $\gamma$ 線照射した時間を示す。45個の胚を用いた実験を3回独立して行った結果を合計した。



**Fig. 2. 2細胞期G2期への $\gamma$ 線照射による分裂遅延**  
 媒精後28時間の2細胞期胚に10 Gyの $\gamma$ 線を照射し、分裂する時間を調べた。矢印は $\gamma$ 線照射した時間を示す。50個の胚を用いた実験を3回独立して行った結果を合計した。



non-irradiated



irradiated

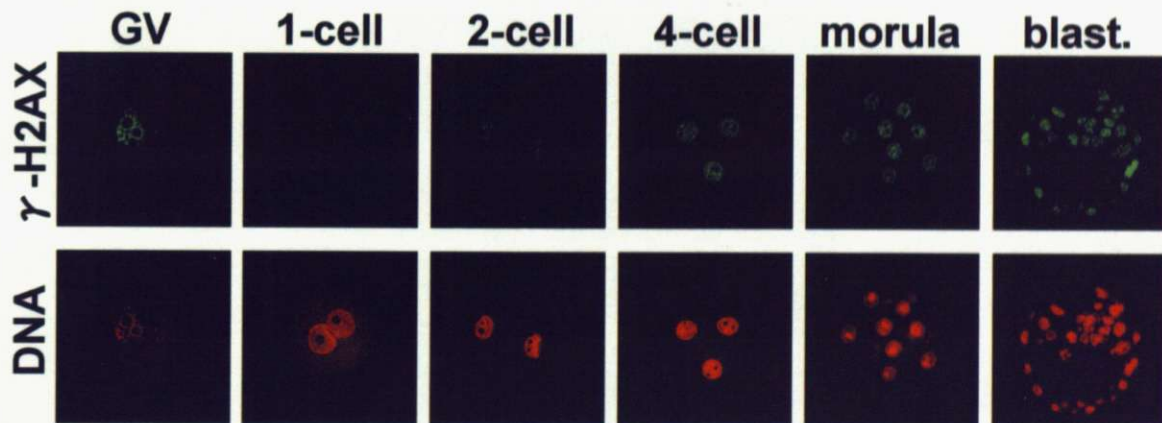
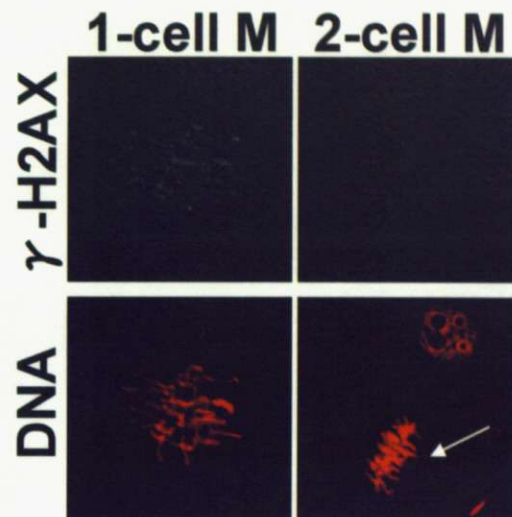


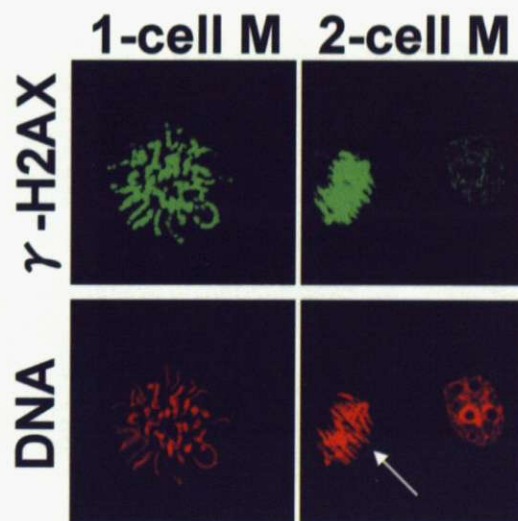
Fig. 3. 卵と着床前初期胚における  $\gamma$ -H2AX

GV期卵(卵母細胞)と1-cell(1細胞期胚; 媒精後12時間)、2-cell(2細胞期胚; 28時間)、4-cell(4細胞期胚; 45時間)、morula(桑実胚期胚; 60時間)、blast.(胚盤胞期胚; 96時間)に10 Gyの $\gamma$ 線を照射した(irradiated)。また、コントロールとして未照射の胚を用いた(non-irradiated)。各胚を $\gamma$ 線照射30分後に固定し、 $\gamma$ -H2AXに対する抗体を用いて免疫染色を行った。二次抗体はCy5結合抗マウス抗体を用い、DNAをpropidium iodideで染色した。

## non-irradiated

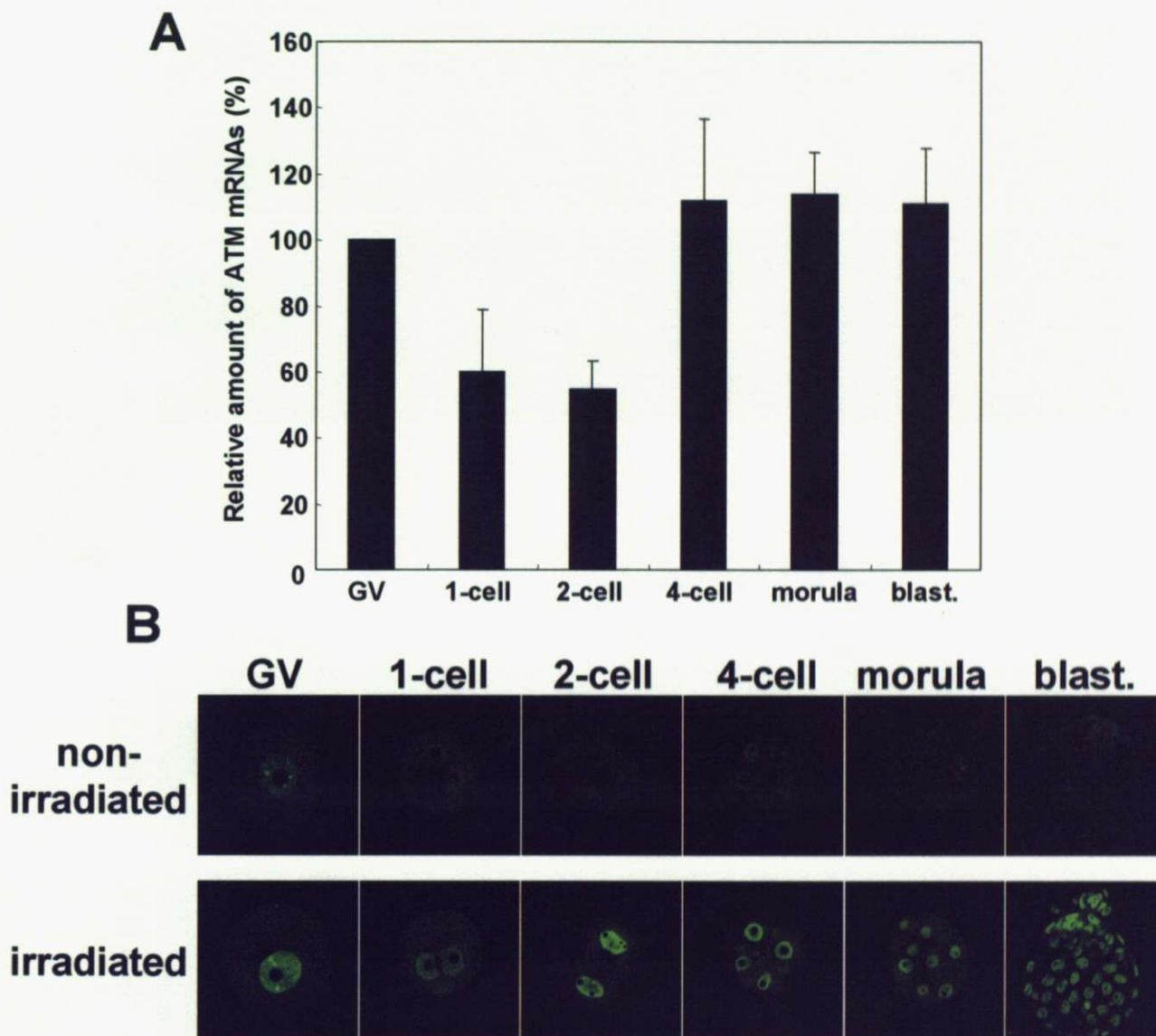


## irradiated



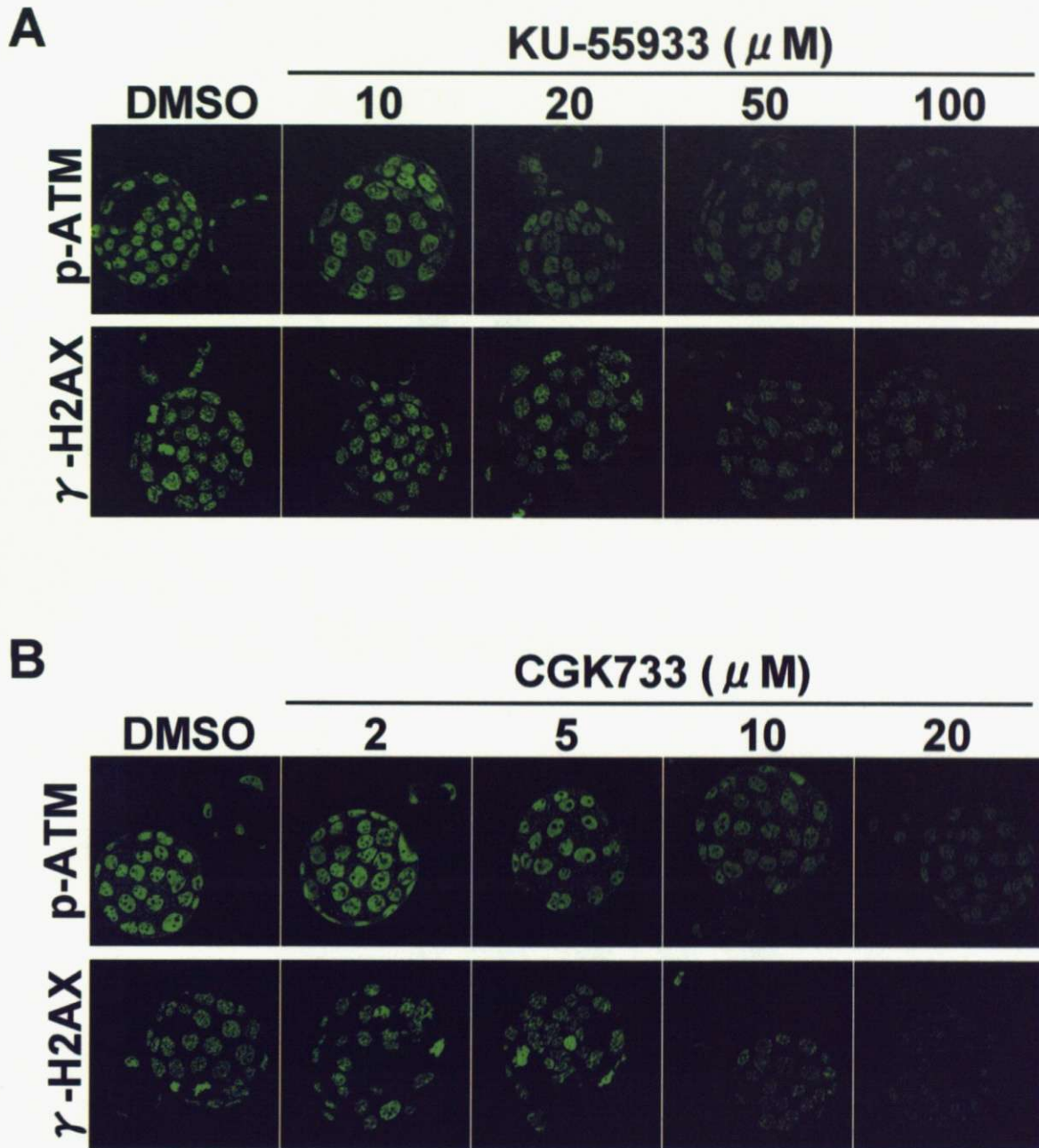
**Fig. 4. 1, 2細胞期M期における $\gamma$ -H2AX**

1, 2細胞期M期の胚はそれぞれ媒精後14, 37.5時間で採取した。胚に10 Gyの $\gamma$ 線を照射し(irradiated)、コントロールとして未照射の胚を用いた(non-irradiated)。各胚を $\gamma$ 線照射30分後に固定し、 $\gamma$ -H2AXに対する抗体を用いて免疫染色を行った。二次抗体はCy5結合抗マウス抗体を用い、DNAをpropidium iodideで染色した。矢印は2細胞期胚の写真におけるM期染色体を示す。



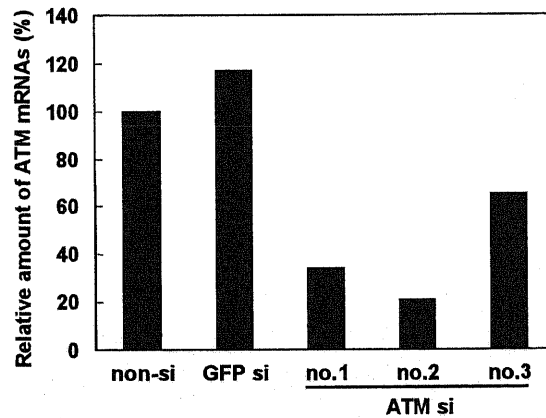
**Fig. 5.** 卵と着床前初期胚におけるATM発現レベルとリン酸化状態  
 GV期卵 (卵母細胞)と1-cell (1細胞期胚; 媒精後12時間)、2-cell (2細胞期胚; 28時間)、4-cell (4細胞期胚; 45時間)、morula (桑実胚期胚; 60時間)、blast. (胚盤胞期胚; 96時間)を採取した。A; 卵と着床前初期胚におけるATM転写産物の発現。卵と胚の全RNAを抽出し、ATM転写産物の発現量を調べるためにRT-PCR法を行った。GV卵で得られた値を100%とし、他のステージで得られた値をその相対値として表した。独立した実験を3回行い、値を平均±SEMで表した。B; 卵と着床前初期胚におけるリン酸化ATM。卵と胚に10 Gyの $\gamma$ 線を照射し (irradiated)、コントロールとして未照射のものを用いた (non-irradiated)。各胚を $\gamma$ 線照射30分後に固定し、ATMのserine1981のリン酸化に対する抗体を用いて免疫染色を行った。二次抗体はCy5結合抗マウス抗体を用いた。





**Fig. 6.** 胚盤胞期胚におけるATM阻害剤によるH2AXリン酸化への影響  
 媒精後96時間の胚盤胞期胚を阻害剤を含む培地で1時間前処理した。A；胚盤胞期胚におけるATM特異的阻害剤KU55933のH2AXリン酸化への影響。胚盤胞期胚をDMSOおよびKU55933 (10, 20, 50, 100  $\mu$  M)を含む培地で処理した。B；胚盤胞期胚におけるATM, ATR特異的阻害剤CGK733のH2AXリン酸化への影響。胚盤胞期胚をDMSOおよびCGK733 (2, 5, 10, 20  $\mu$  M)を含む培地で処理した。胚を $\gamma$ 線照射30分後に固定し、 $\gamma$ -H2AXとATMのserine1981のリン酸化に対する抗体を用いて免疫染色を行った。二次抗体はAlexa Fluor® 488結合抗マウス抗体を用いた。

## A. ATM



## B. Cyclin A2

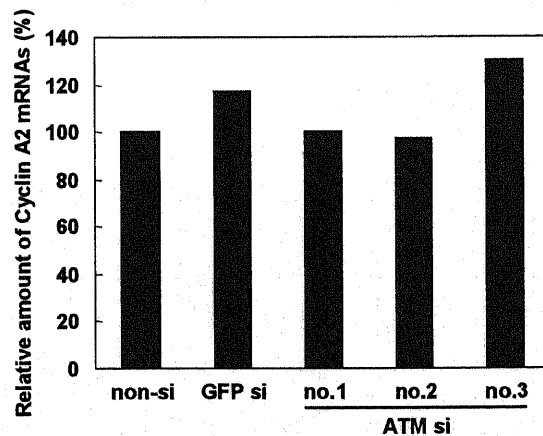
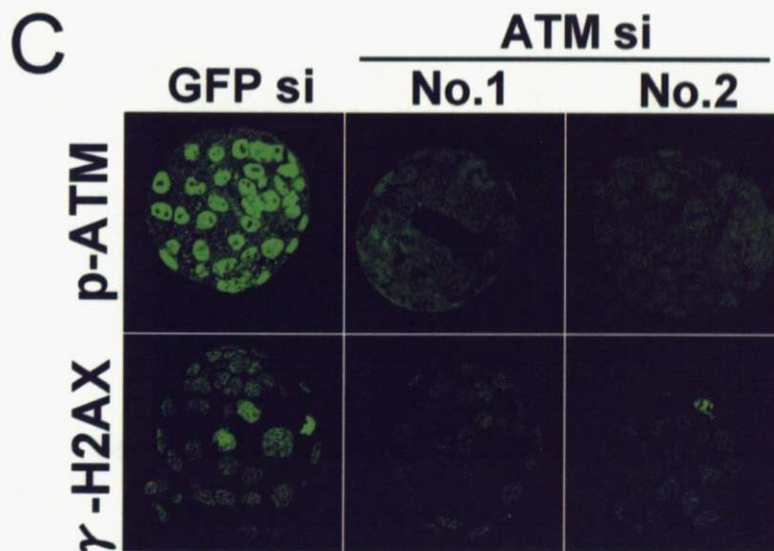
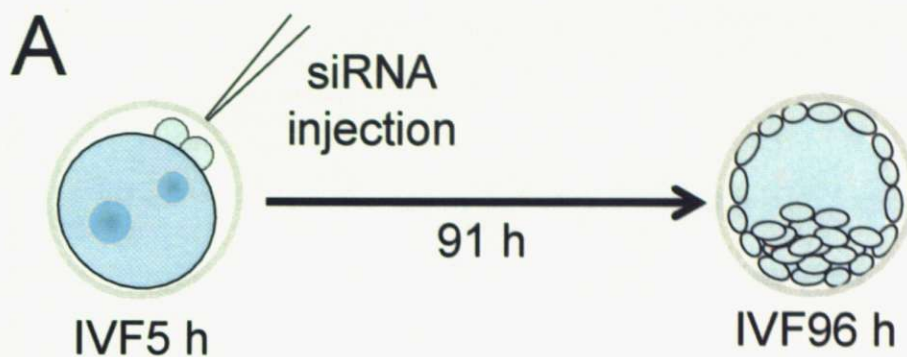


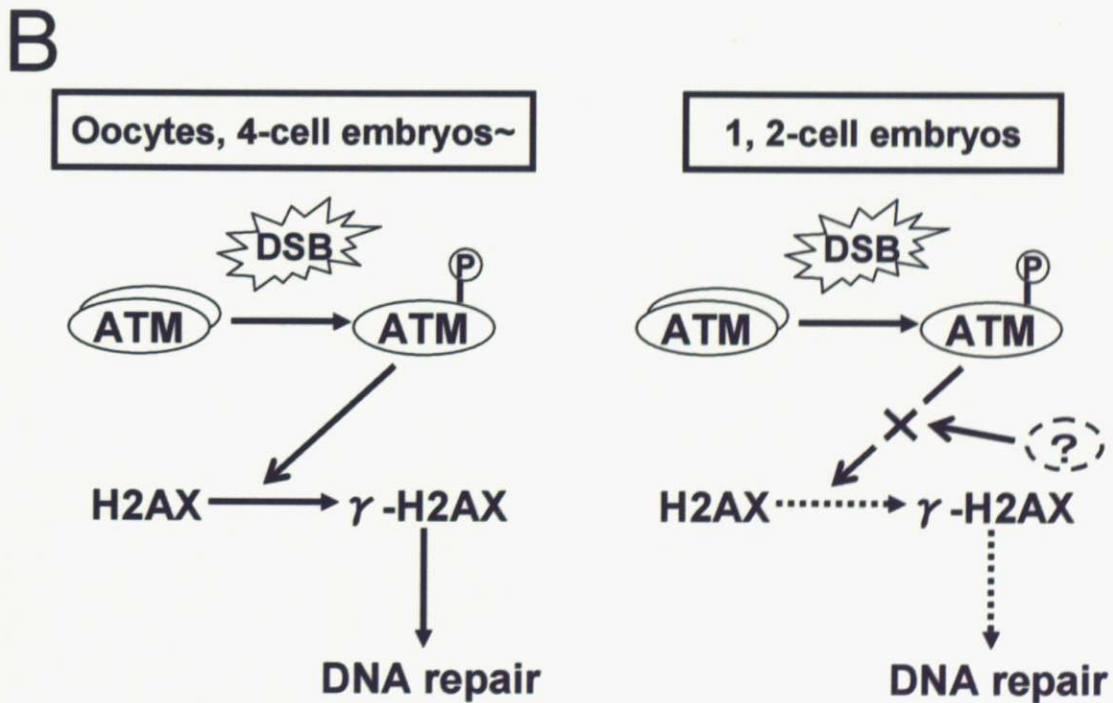
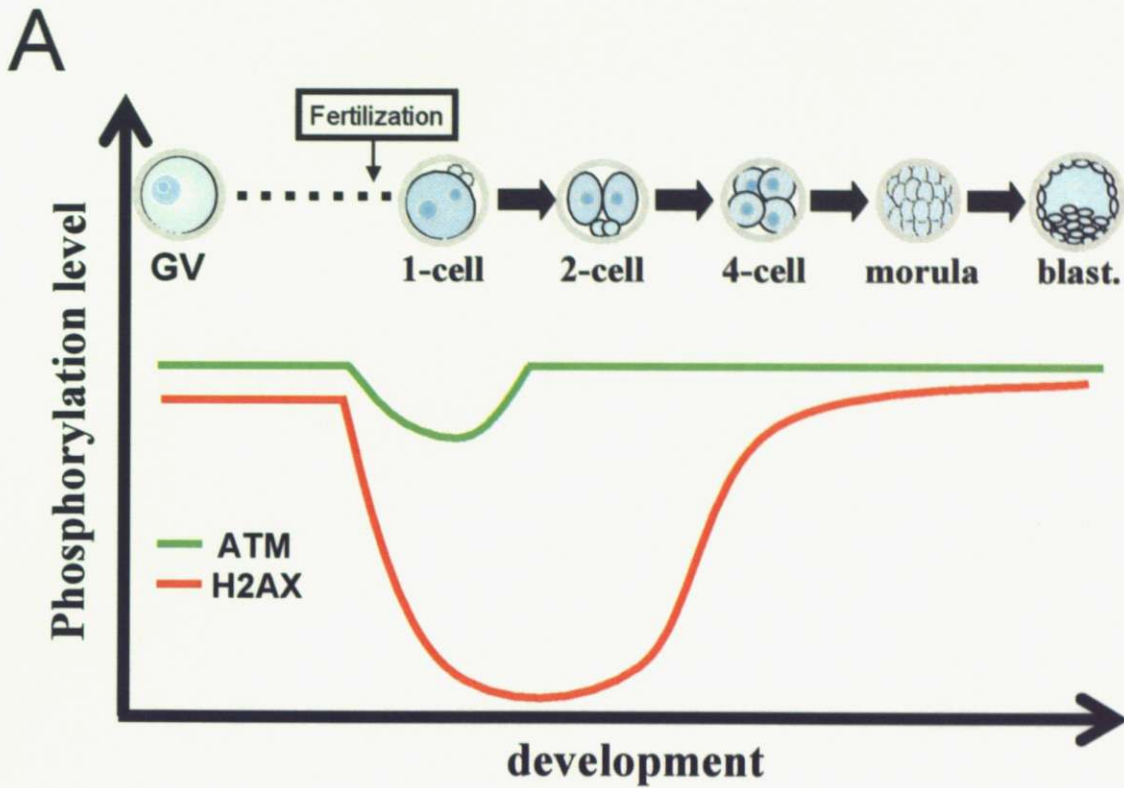
Fig. 7. 体細胞におけるATM siRNAの効果の検討

NIH3T3にsiRNAをトランスフェクションしてreal-time PCRを行った。A;体細胞におけるATM siRNAによるATM mRNA量への影響。ATM mRNA量をGAPDH mRNAで標準化したものを示した。B;体細胞におけるATM siRNAによるCyclin A2 mRNA量への影響。Cyclin A2 mRNA量をGAPDH mRNAで標準化したものを示した。non-siはsiRNAをトランスフェクションしていないサンプル。GFPsiはコントロールとしてGFPに対するsiRNAをトランスフェクションしたサンプル。



**Fig. 8.** 胚盤胞期胚におけるATM発現抑制によるH2AXリン酸化への影響

A; 胚盤胞期におけるATM発現抑制の方法。1細胞期胚(媒精後5時間)の細胞質にATM siRNAをマイクロインジェクションし、それを91時間体外培養して胚盤胞期にまで発生させた。B; ATM siRNAインジェクションによるATM発現量の抑制。Aの方法で得られた胚盤胞期胚の全RNAを抽出し、RT-PCRを行い、電気泳動した。Rabbit  $\alpha$ -globinは外部標準として用いた。C; ATMの発現を抑制された胚盤胞期胚におけるH2AXリン酸化。Aの方法で得られた胚盤胞期胚に10 Gyの $\gamma$ 線を照射し、30分後に胚を固定し、それぞれ $\gamma$ -H2AXとATMのserine1981のリン酸化に対する抗体を用いて免疫染色を行った。二次抗体はAlexa Fluor® 488結合抗マウス抗体を用いた。



**Fig. 9.** 着床前初期胚におけるH2AXリン酸化の概要とその機構のモデル  
 A; 着床前初期胚におけるH2AXリン酸化とATMリン酸化の概要。緑線をATM、赤線をH2AXのリン酸化レベルとして表した。 B; 着床前初期胚におけるH2AXリン酸化機構のモデル。