

氏名	とよしま 豊島めぐみ
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2858号
学位授与の日付	平成17年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科生理系専攻
学位論文題目	Transcription independent suppression of DNA synthesis by p53 in sperm irradiated mouse zygotes (照射精子受精マウス卵における p53 の転写非依存的な DNA 合成の抑制)
論文調査委員	(主査) 教授 藤堂 剛 教授 武田 俊一 教授 篠原 隆司

論文内容の要旨

マウス受精卵は放射線に高感受性であるが、その高感受性の機構は、胚の難操作性から詳細な解析がなされていない。我々は、受精卵、初期胚の放射線応答の解析を行っているが、その中で、細胞質をもたない照射したマウス精子で受精した卵でもちこまれた DNA 損傷による卵子核の損傷応答の研究を行っている。今回の研究では、この系に精製 p53 タンパクを微量注入する方法を用いて、既に我々が報告した p53 依存性 S 期チェックポイントについて、更なる p53 の機能ドメインの解析を行った。

放射線応答では、損傷感知キナーゼとして ATM, ATR が知られており、p53 はこれらによりリン酸化されることで活性化される。受精卵でみられる p53 依存性 S 期チェックポイント機構に ATM, ATR が関与するかどうかを検討するため、これら両者を共に活性阻害する caffeine と、ATM の阻害剤である wortmannin を用いて S 期チェックポイントへの影響を調べた。非照射精子受精卵では caffeine と wortmannin 共に影響はみられなかったが、照射精子受精卵での DNA 合成抑制は双方のいずれの投与でも解除された。これより S 期チェックポイントには ATM が関与している可能性が示唆された。

p53 は損傷後、ATM, ATR らの損傷応答シグナルによりリン酸化を受け、安定化、活性化することが知られている。ここで、ATM や p38 MAP キナーゼでリン酸化をうける p53 タンパクのセリン15, 20, 46, 315位のアミノ酸残基に変異を導入した GST-p53 コンストラクトを作製し、これを大腸菌で発現させ精製した。これらの変異タンパクを照射精子受精卵に微量注入したが S 期チェックポイントの阻害はみられず、どの変異タンパクも DNA 合成抑制を示した。このことより、S 期チェックポイントには ATM による p53 タンパクのリン酸化は大きな役割を果たしていないかもしれない。

p53 は転写活性化因子として知られている。マウス受精卵においても DNA 合成抑制に p53 の転写活性化能が必要かどうか調べた。転写活性化領域である p53 タンパクの22/23位に変異の入った GST-p53 融合タンパクを p53 ノックアウト受精卵に微量注入したところ、DNA 合成抑制が見られた。また、転写阻害剤である α -amanitin を投与しても DNA 合成には影響がなかった。これらの結果は、S 期チェックポイントには p53 の転写活性化は必要でないことを示している。実際、p53 で転写活性化される p21 遺伝子のノックアウトマウスでも S 期チェックポイント機構は存在することからも、p53 の転写活性化機構は必要ではないといえるであろう。一方、p53 タンパクの配列特異的 DNA 結合領域である175, 273位のアルギニン残基をヒスチジンに変換した GST-p53 融合タンパクを p53 ノックアウト照射精子受精卵に微量注入したところ、DNA 合成抑制はみられなくなった。また、p53 野生型において同様にしてドミナントネガティブ効果を試みたところ、p53 の変異タンパクを微量注入することにより DNA 合成抑制が阻害された。

以上より、p53 の DNA 結合が転写とは異なる機構を介して S 期チェックポイントに関与していることが明らかとなった。これは、p53 の新規の機能といえる。しかしながら、ATM による p53 のリン酸化は必要としないことから、ATM がターゲットとする第三の未知のタンパクと p53 が何らかの働きで S 期チェックポイントに関与していることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

哺乳動物初期胚における損傷応答は、体細胞のものとは異なっているがその機構は未だに不明な点が多い。本研究では新たに発見されたマウス受精卵での p53 依存性 S 期チェックポイントの分子機構を解析をした。

照射精子受精マウス卵は、caffeine と wortmanmin 処理により DNA 合成抑制が解除されることから、P53 依存性 S 期チェックポイントは ATM 依存性である。しかし ATM や p38 MAP キナーゼでリン酸化されるセリン15, 20, 46, 315位の変異タンパクは、精子照射受精卵への微小注で p53 依存性 S チェックポイントの機能を示す。転写活性化領域の22/23位に突然変異をもつタンパクも S 期チェックポイント機能を保持しており、 α -amanitin も DNA 合成抑制に影響しない。しかし DNA 結合領域であるアルギニン175, 273位に変異をもつタンパクは DNA 合成抑制能を示さなかった。これらより p53 依存性 S チェックポイントは、ATM によりリン酸化を受ける未知のタンパクと、p53 タンパクの DNA 結合領域のもつ機能の双方ががかわっている。CldU と IdU で DNA 鎖を分別染色した解析から、p53 依存性 S チェックポイントは DNA 鎖の複製点の伸長速度を抑制することが明らかになった。

以上の研究は、低線量域で機能する p53 依存性 S チェックポイントの分子機構研究に貢献し、哺乳動物発生初期胚の損傷応答の特異性解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年2月14日実施の論文内容とそれに関連した諮問をうけ、合格と認められたものである。