

放射線の細胞、特に生殖細胞への影響：モデル生物 線虫 *C. elegans* を用いた研究

東谷 篤志

東北大学 大学院生命科学研究科 ゲノム継承システム分野

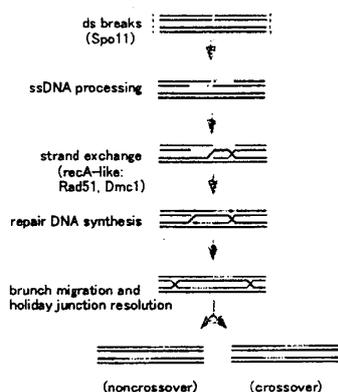
はじめに

ゲノム情報である遺伝子 DNA が、紫外線や放射線、変異原物質などで傷つけられたとき、細菌からヒトに至るまで全ての生物は、それら DNA 損傷を修復する様々な機構を保持していること、一方、加齢や環境要因などによりこれら修復活性が低下し、染色体異常や突然変異が蓄積することで、がん化や細胞死へとつながることが知られてきた。なかでも生殖細胞の DNA に生じた損傷は、不妊の原因であるとともに、子孫にその突然変異が固定され受け継がれる可能性を秘めている。実際、害虫の防除等においては、放射線を照射し生殖能力を失った変異個体を作成し、生態系に放つことでその防除を確立した例も有名である。

放射線による DNA 損傷は、主に DNA の二本鎖切断 (DSB) を引き起こし、遺伝情報の安定性に最も脅威を与える損傷となる。地球上のヒトをはじめとする生物は弱いながらも自然放射線を常に浴びていること、また放射能物質の利用に伴い被曝の危険にさらされるようになったことなどから、放射線が生殖細胞と子孫に与える影響については古くから関心が持たれ研究がなされてきた分野の一つである。生殖細胞に及ぼす放射線の影響については、個体を用いた研究が必要となり、これまでマウスやラットを用いて X 線や  $\gamma$  線を照射した後、細胞生物学的な解析を中心に研究が行われ、生殖細胞の形成ステージによって放射線感受性に違いが生じるというデータが示されてきた。また私たちは、モデル生物の一つである線虫 *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*) を用いた研究を中心に、減数分裂細胞の特定のステージで放射線への抵抗性がかなり高まることと、この超抵抗性は減数分裂に必須な遺伝的組換え酵素の高発現に起因することを明らかにしてきた。これら生殖細胞における放射線感受性の違いと減数分裂期の相同組換え機構の関連性について紹介する。

1. 配偶子形成過程における染色体ダイナミクス

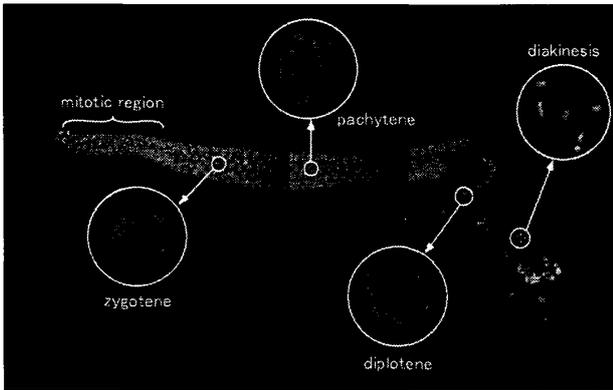
有性生殖を行う生物の配偶子は、1回の染色体複製後、2回の連続した分裂 (減数分裂) により半数体として形成される。また、この減数第一分裂前期において、父母由来の相同な染色体間で高頻度に遺伝的組換えが生じ、この相同組換えは、真核生物に広く保存されている SPO11 タンパク質が触媒する DNA の二本鎖切断 (DSB) によって開始されることが報告されている(1、図 1 参照)。



(図 1 減数分裂過程における遺伝子組換えの分子モデル)

さらに減数第一分裂の前期過程は、減数分裂過程で最も長い時間をかけて進行し、染色体ダイナミクスの特徴から、倍加した姉妹染色分体が細糸状に観察されるレプトテン期、相同染色体間での対合形成が開始されるザイゴテン期、相同染色体間全体に渡ってシナプトネマ構造を介した対合形成が完了するパキテン期、対合が解かれ組換えの結果生じるキアズマが観察されるディプロテン期、染色体が凝集し核膜から離れるディアキネシス期の5つの時期に便宜的に分けることができる。図2には、

線虫 *C. elegans* の卵母細胞形成過程における減数分裂過程の染色体ダイナミクスを観察した像を示



している。

(図2 *C. elegans* の生殖腺における減数分裂核染色体の DAPI 染色像)

これら染色体ダイナミクスは、酵母から植物、ヒトに至る全ての有性生殖を行う真核生物において広く保存されており、また一般的には何れの生物種においても、対合や相同組換えが阻害された場合、その後の減数分裂は異常を来し、配偶

子形成が不全となることが各種遺伝的突然変異を用いた解析により知られている。

## 2. 哺乳類の生殖細胞における放射線感受性

哺乳類の精巣では、精細管の外壁側から内腔に向かい生殖幹細胞である精原細胞(spermatogonia)、減数分裂とそれに伴う遺伝子組換えを行っている精母細胞(spermatocyte)、形態形成を行っている精子細胞(spermatid)の連続的な分化が規則正しい周期で進行している。精子形成過程におけるこれらの細胞の放射線感受性を調べるために、Oakbergらは、成熟雄のマウス個体に X 線照射を行った後、ある一定時間において形成されてきた精子の受精能力、染色体異常などを調べた(2,3)。その結果、300rad の照射では 6 週間後に 2 週間の一過的な生殖不全を生じ、500rad 以上の照射では永久的な不全となることを示した。この一過的な不全が生じた原因は、放射線に感受性のより高い B 型精原細胞(幹細胞から分化し精子細胞となる運命決定がなされた前減数分裂細胞)が致死的な影響を受け細胞死を起こしたのに対し、幹細胞である A 型精原細胞はより抵抗性であるためと考察された(2)。一方 500rad 以上の放射線では、A 型精原細胞も回復不能なダメージを受けるため、その後も永久的に不全となることが示唆された。また 300rad 照射後の 6 週間までは、ほぼ不全とならないこと、さらに 800rad 以下の照射では Dose が低いほど照射後から不全になるまでの期間がより長くなることから、成熟した精子や精母細胞は精原細胞よりも感受性が低い(抵抗性である)ことが示唆された。さらに、精母細胞の発達ステージの違いによる放射線の感受性については、照射後一定時間経過したときの減数第一分裂終期に観察される染色体の切断の数から、ディアキネシス期と第一分裂中期で最も放射線に感受性が高く、レプトテン期で最も抵抗性を示し、パキテン期はその中間の感受性を示すという結果が報告されている(3)。マウスの精子細胞は、1500rad の照射においても形態的な異常を生じることはなく、成熟した精子へと分化を続け受精能も有するが、染色体 DNA へのダメージは蓄積されており、その精子による受精卵では胚発生に至らないことなども報告されている(3)。

雌性配偶子の形成過程における放射線感受性の研究は、雄性配偶子の研究に比べあまり多くなされていない。このことは、精子形成と異なり哺乳類の卵形成が、一般的にその数も限られ、その発生分化も胎児期の段階でディプロテン期に停止した卵母細胞が形成され卵巣に蓄えられるからである。そのため、減数分裂前複製から減数第一分裂前期のザイゴテン期にかけての卵母細胞の放射線感受性は、妊娠期間の異なるラットに X 線を照射して、その胎児における生殖細胞の数やパキテン期の染色体観察を通して評価されてきた。その結果、X 線 Dose に依存してパキテン期でのシナプトネマ構造の形成異常と対合しない染色体断片化が観察され、なかでも卵原細胞の時期における X 線照射が最も感受性であることが示唆された(4,5)。一方、チャイニーズハムスターを用いた研究からは、パキテン期の卵母細胞をもつ

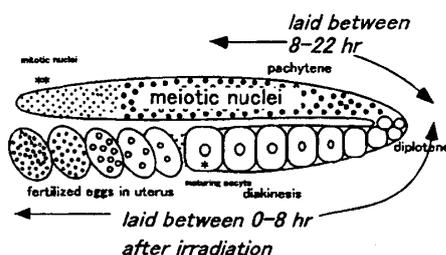
生後0日目から4日目の新生児にX線を照射した場合、これらの卵母細胞がX線に抵抗性を示したのに対し、ディプロテンから初期のディクチオテン期（ディプロテンとディアキネシス期の中間で、卵母細胞が成熟して大きくなる時期）の卵母細胞では急激に抵抗性を失い、ディアキネシス期には再び抵抗性になるという現象が報告された(6,7)。

### 3. 出芽酵母の減数分裂細胞における放射線感受性

哺乳類の生殖細胞とは異なり、単細胞である酵母などでは、培養条件を変えることにより減数分裂を同調的に誘導させることができる利点を有している。出芽酵母を用いた研究では、減数分裂を誘導する培地に移して減数分裂前複製を行っている細胞群と、それから2時間後の減数分裂に入った細胞群のそれぞれにX線を照射したところ、前者はDNA合成を行った後にチェックポイント機構が働いてその後の進行を停止するものが多かったのに対し、後者の場合は生存可能な胞子が多く現れ、減数分裂期が放射線により抵抗性であることが示唆された(8)。しかも栄養増殖している細胞に照射した場合は、いずれの細胞周期にあっても99%致死となるX線Doseの照射に対しても、生育可能な胞子形成が行えることから、体細胞分裂に比べ、減数分裂に入った細胞群が高い放射線抵抗性を示すことが確かめられた(8)。

### 4. 線虫の減数分裂細胞における相同組換え活性と放射線超抵抗性

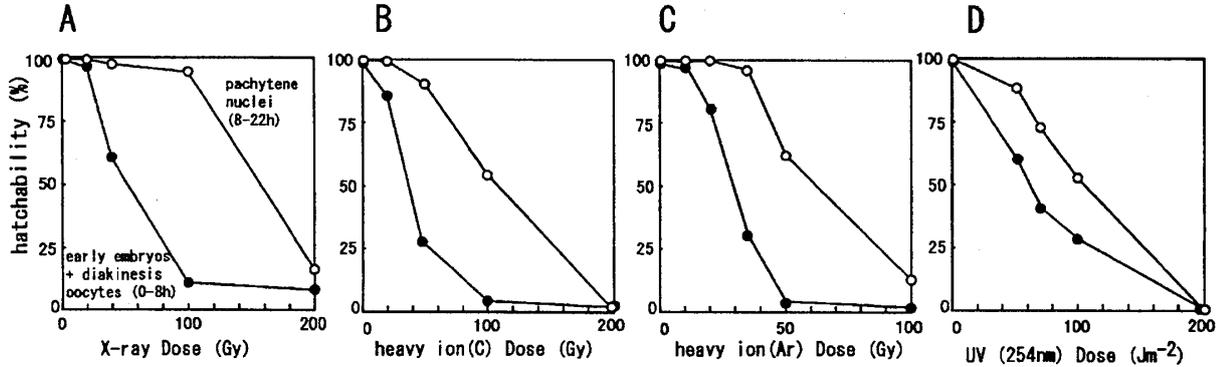
上述の哺乳類や酵母の生殖細胞の各ステージで放射線感受性が異なること、なかでも減数第一分裂前期の比較的早いステージが放射線に抵抗性を示すことが報告されてきた。またこのステージでは、高頻度に相同染色体間での遺伝的組換えが生じることから、相同組換えと放射線の抵抗性との関連性があることが示唆されてきたが、その直接的な実験証明はなされていなかった。そこで私たちは、生殖腺内で減数分裂を含む生殖細胞形成が連続的に進行している線虫を用いて、放射線の感受性について検討した。図2にみられるように、線虫の雌雄同体には大きく発達した1対の生殖腺が存在し、成虫になると卵母細胞形成のための減数分裂前の体細胞分裂から減数分裂を経て自家受精後の初期胚までの連続的な発生・分化が認められ、なかでも減数第一分裂前期の染色体ダイナミクスは大変観察し易い。成熟した卵母細胞においては、第一分裂前期のディアキネシス期で停止し、倍加した二価相同染色体が最も凝縮しキアズマを介して繋がった常染色体5対と性染色体1対の計6対が認められる(図2)。その後、貯精巣を通過する際に受精し、減数第一、第二分裂が引き続き生じ、精子核と融合する。したがって、1回の放射線照射でこれら全ての発達段階にある細胞核にランダムかつ均一にDNA損傷を導入することが可能となり、照射後の時間経過とともに産まれてきた卵の孵化率を調べることで、初期胚から減数分裂期の細胞核の放射線感受性を各々測定することができる。つまり放射線を照射後すぐに産まれた卵は、子宮内の胚発生段階で放射線によるDSB障害を受け、また照射後4時間から8時間までに産まれた卵は、受精前の卵母細胞（ディアキネシス期）であったと考えられる。一方、8時間以降24時間に産まれた卵は、照射時点では、生殖腺内で最も多く存在するパキテン期の減数分裂細胞核であったと考えられる(図3)。



(図3 線虫染色腺内における卵母細胞の連続的な発生と放射線影響の模式図)

実際に100GyのX線を照射した場合、0から8時間までは約10%の孵化率となり、9割の卵が致死であるのに対して、8から22時間後では95%以上の孵化率を示し、パキテン期の核

が放射線に超抵抗性を示すことが明らかになった(図 4A)(9)。次に X 線に比べ、さらに DNA に広範囲な損傷を与える重イオン線 (C; LET23keV/ $\mu$ m, 135MeV/u, Ar; LET 240keV/ $\mu$ m) を照射したところ、同様にパキテン期の核が抵抗性を示した(図 4B,C)。UV を照射した場合もわずかではあるがパキテン核



が抵抗性を示したものの、X 線や重イオン線ほど顕著ではなかった (図 4D)。

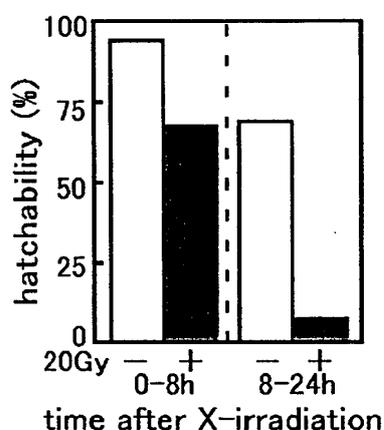
(図 4 各放射線に対する減数分裂細胞および胚の放射線感受性の違い。照射後 0 から 8 時間の間に産まれた卵の孵化率 (●) と照射後 8 から 22 時間の間に産まれた卵の孵化率 (○)。照射後 0 から 8 時間の間に産まれた卵は照射時に初期発生の胚やディアキネシス期の卵母細胞。照射後 8 から 22 時間の間に産まれた卵は照射時にパキテン期の細胞核を意味する(図 3 参照)。)

また、アポトーシスを起こさない *ced3* 変異株も同様にパキテン核が X 線照射に対して超抵抗性を示したことは、ダメージを受けたパキテン核がアポトーシスによって取り除かれることで見かけ上の抵抗性を示したわけではないことを意味した。DAPI 染色により生殖細胞の染色体を観察すると、X 線、重イオン線のいずれの照射においても、照射 4 時間後、受精直前のディアキネシス期卵母細胞の染色体像には凝縮異常や切断が見られるのに対し、遠位部で減数分裂前複製が行われている細胞核は形態上の異常が認められなかった。一方、照射 24 時間後、ディアキネシス期卵母細胞の染色体像には形態的に正常な 6 対の 2 価染色体が観察されたのに対し、減数分裂前複製を行っている細胞核には異常に大きな核や小さな核が見られ数も少なくなっていた。このことから、時間経過とともに、減数分裂前複製を行っている核では放射線による損傷を修復できずにアポトーシスが誘導され異常な核が増えたのに対し、照射時にパキテン期にあった核は損傷が修復され、その結果正常な卵母細胞を形成することができたと考えられた。

## 5. 相同組換えと放射線抵抗性

減数分裂期の相同組換えの開始反応である DNA の DSB は、SPO11 により減数第一分裂前期のレプトテン期からザイゴテン期にかけて導入されることが、マウスなどにおいて知られている(10)。次に、導入された DSB 末端から一本鎖 DNA 末端がプロセッシングされた後、真核生物における大腸菌 *recA* 様遺伝子産物の RAD51 ならびに DMC1 の働きによって、相同的 DNA 鎖交換反応が行われ、遺伝子組換えが生じる。RAD51 は体細胞分裂時と減数分裂時に姉妹染色分体間での組換えを、DMC1 は減数分裂時に相同染色体間の組換えを主に触媒すると考えられている(11,12)。酵母、植物やヒトのゲノムにおいては、少なくとも一種以上 *RAD51* と *DMC1* 遺伝子がそれぞれ存在することが知られているが、線虫のゲノム上では *recA* と相同な遺伝子が 1 つしか見いだせず、そのアミノ酸配列も両タイプの間隔的な配列であり、私たちは *Ce-rdh-1*(*C. elegans rad51/dmc1* homolog 1)と、また別な研究者らは *Ce-rad-51* と名付けた(13,14)。線虫における本遺伝子発現は、パキテン期以降の生殖腺において最も高

いことが認められた(9)。RNA 干渉法により本遺伝子発現を特異的に抑制した結果、完全に抑制された F1 世代では、その減数第一分裂前期パキテン期の相同染色体間での対合まではみかけ正常に観察されるが、正常なキアズマは形成されずディアキネシス期の卵母細胞でランダムに絡まった染色体異常となることが確認され、減数分裂の相同組換えとその進行に必須であることが明らかになった(13,15)。また、RNA 干渉法を行った 24 時間後の当代においては、その mRNA 発現をほぼ完全に抑制し、既存の酵素タンパク質由来の活性だけで減数分裂を進行させる状況下(部分的な抑制)となることを明らかにした。そこで、その部分的な抑制条件下での放射線感受性を調べたところ、線虫のパキテン期の細胞核における X 線の超抵抗性は完全に失われたことから(図 5)、本来、減数分裂の相同組換えに関わる酵素群が高発現しているパキテン期の核は、外因性の DSB に対しても効率良く修復がなされるものと考察された(9)。



(図 5 *Ce-rdh-1/rad-51* の発現抑制と X 線感受性。RNA 干渉法により *Ce-rdh-1/rad-51* 遺伝子発現を抑制した成虫に、20Gy の X 線を照射した場合としない場合(コントロール)の、照射後 0 から 8 時間に産まれた卵と 8 から 24 時間に産まれた卵の孵化率。)

酵母の *rad51* 変異株に放射線などによる DSB を導入した場合、姉妹染色分体間での DNA 鎖交換による組換え修復が行われず、高頻度に転座や挿入が起こるようになることから、RAD51 による組換え修復は、転座や挿入が起きないようにしてゲノムを安定的に維持する働きがあると考えられる(16)。マウスの生殖細胞では RAD51 タンパク質の発現はザイゴテン期からパキテン期にかけて、DMC1 タンパク質の発現はレプトテン期からザイゴテン期にかけて認められる(17,18)。また *rad51* をノックアウトしたマウスでは、胎性致死となり体細胞分裂に必須であること、*dmc1* のノックアウトマウスでは生殖不全となることのみが観察され、減数分裂過程において必須であることが示唆された(19,20)。そして、*dmc1* のノックアウトマウスの生殖細胞では、パキテン期以降の分化が起こらずアポトーシスを起こすため、それらの個体を用いて生殖細胞の放射線感受性を調べることは不可能であったが、線虫で得られた知見から、酵母や哺乳類の生殖細胞形成における放射線感受性の違いには、遺伝的組換えに関わる相同組換え酵素の発現の違いが深く関与している可能性が立証された。

おわりに

これまで生殖細胞形成過程における相同組換え機構は、重大な環境変化に適応できるよう子孫の遺伝的多様性を高めるために存在する仕組みと考えられてきた。この相同組換え機構により外因性の DSB も効率よく修復することができるということは、環境や内的要因から受ける DNA の DSB に対して生殖細胞の完全性を保つためにもこの仕組みが重要な働きをしていると考えられる。また近年、減数分裂過程や組換えをモニターするチェックポイント機構にかかわる遺伝子群が発見されつつあり(21,22)、異常な生殖細胞が次世代に受け継がれないように監視する機構も注目されている。生殖細胞形成過程ではゲノムの安定性を保証しつつ多様性を持たせるために巧みな機構が働いているといえる。

参考文献

1. Keeney, S., Giroux, C. N. and Kleckner, N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are

- catalyzed by Spo11, a member of widely conserved protein family. *Cell*, 88: 375-384, 1997.
2. Oakberg, E. F. The influence of germ cell stage on reproductive and genetic effects of radiation in mammals. *Diseases Nervous System*, 24: 49-54, 1963.
  3. Oakberg, E. F. and DrMinno, R. L. X-ray sensitivity of primary spermatocytes of the mouse. *Intern. J. Radiation Biol.*, 2: 196-209, 1960.
  4. Pujol, R., Cusidó, L., Rubio, A., Egozcue, J. and Garcia, M. Effect of X-rays on germ cells in female fetuses of *Rattus norvegicus* irradiated at three different times of gestation. *Mutat. Res.*, 356: 247-253, 1996.
  5. Pujol, R., Cusidó, L., Rubio, A., Egozcue, J. and Garcia, M. X-ray-induced synaptonemal complex damage during meiotic prophase in female fetuses of *Rattus norvegicus*. *Mutat. Res.*, 379: 127-134, 1997.
  6. Tateno, H. and Mikamo, K. Absence of late effects on survival and developmental abilities of pachytene oocytes X-irradiated during neonatal stages in the Chinese hamster. *Int. J. Radiat. Biol.*, 49: 121-130, 1986.
  7. Tateno, H. and Mikamo, K. Effects of neonatal ovarian X-irradiation in the Chinese hamster. II Absence of chromosomal and developmental damages in surviving oocytes irradiated at the pachytene and resting dictyate stages. *J. Radiat. Res.*, 30: 209-217, 1989.
  8. Thorne, L. W. and Byers, B. Stage-specific effects of X-irradiation on yeast meiosis. *Genetics*, 134: 29-42, 1993.
  9. Takanami, T., Mori, A., Takahashi, H. and Higashitani, A. Hyper-resistance of meiotic cells to radiation due to a strong expression of a single *recA*-like gene in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.* 28: 4232-4236, 2000.
  10. Keeney, S. Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 52: 1-53, 2001.
  11. Shinohara, A., Ogawa, H. and Ogawa, T. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell*, 69: 457-470, 1992.
  12. Bishop, D. K., Park, D., Xu, L. and Kleckner, N. *DMC1*: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli recA* required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell*, 69: 457-470, 1992.
  13. Takanami, T., Sato, S., Ishihara, T., Katsura, I., Takahashi, H. and Higashitani, A. Characterization of a *Caenorhabditis elegans recA*-like gene *Ce-rdh-1* involved in meiotic recombination. *DNA Res.*, 5: 373-377, 1998.
  14. Rinaldo, C., Ederle, S., Rocco, V. and La Volpe, A. The *Caenorhabditis elegans* RAD51 homolog is transcribed into two alternative mRNAs potentially encoding proteins of different sizes. *Mol. Gen. Genet.*, 260: 289-94, 1998.
  15. Takanami, T., Mori, A., Takahashi, H., Horiuchi, S. and Higashitani, A. *Caenorhabditis elegans Ce-rdh-1/rad-51* functions after double-strand break formation of meiotic recombination of *Caenorhabditis elegans*. *Chromosome Res.*, 2003. in press.
  16. Fasullo, M., Giallanza, P., Dong, Z., Cere, C. and Bennett, T. *Saccharomyces cerevisiae rad51* mutants are defective in DNA damage-associated sister chromatid exchanges but exhibit

- increased rates of homology-directed translocations. *Genetics*, 158: 959-972, 2001.
17. Barlow, A. L., Benson, F. E., West, S. C. and Hulten, M. A. Distribution of the *Rad51* recombinase in human and mouse spermatocytes. *EMBO J.*, 16: 5207-5215, 1997.
  18. Yoshida, K., Kondoh, G., Matsuda, Y., Habu, T., Nishimune, Y. and Morita, T. The mouse *RecA*-like gene *Dmc1* is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol. Cell*, 1: 707-718, 1998.
  19. Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y. and Morita, T. Targeted disruption of the *Rad51* gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6236-6240, 1996.
  20. Pittman, D. L., Cobb, J., Schimenti, K. J., Wilson, L. A., Cooper, D. M., Brignull, E., Handel, M. A. and Schimenti, J. C. Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for *Dmc1*, a germline-specific *RecA* homolog. *Mol. Cell*, 1: 697-705, 1998.
  21. Lydall, D., Nikolsky, Y., Bishop, D. K. and Weinert, T. A meiotic recombination checkpoint controlled by mitotic checkpoint genes. *Nature*, 383: 840-843, 1996.
  22. Xu, L., Weiner, B. M. and Kleckner, N. Meiotic cells monitor the status of the interhomolog recombination complex. *Genes. Dev.*, 11: 106-118, 1997.