

氏名	志村 勉
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2462号
学位授与の日付	平成14年3月25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	p53 dependent S phase damage checkpoint and pronuclear crosstalk in mouse zygotes with X-irradiated sperm (照射精子受精卵における p53 依存性の S 期チェックポイント機構と前核間のクロストーク)
論文調査委員	(主査) 教授 武田俊一 教授 藤井信吾 教授 丹羽太貫

論文内容の要旨

マウスの受精卵は放射線に高感受性であり、その感受性には様々な放射線応答が関与している。しかし、受精卵の難操作性からそのメカニズムの解析はあまり行われていない。放射線応答では、がん抑制遺伝子である p53 が中心的な働きをし、その下流の遺伝子を発現させることによって、細胞周期の停止や細胞死を誘導している。そこで申請者らは受精卵での p53 依存性の放射線応答について解析した。

受精卵への DNA 損傷の持ち込みは X 線を照射した精子で受精させることによって行った。受精卵では精子由来の雄性核と卵子由来の雌性核が別々に形成され、DNA 合成は独立に行われる。このため、照射精子受精の系では放射線に当たっていない雌性核において純粋な放射線応答のみを解析することができる。p53 応答性のレポーター遺伝子(核移行型 LacZ 遺伝子プロモーターの上流に p53 結合配列を結合したもの)を作成し、これを受精卵の雌性核に微小注入したところ、照射精子受精によりその発現が誘導された。このことから、受精卵では DNA 損傷に対する p53 依存性の応答機構が存在し、これが雄性核と雌性核の間でのクロストークを行っていることが明らかになった。次に DNA 合成を [3H]-Tdr の取り込みによって解析したところ、非照射精子受精卵の DNA 合成は受精後 8 時間から開始され、21 時間後に終了した。照射精子受精卵でも受精後 8 時間から DNA 合成が開始することから、受精卵では p53 が活性化されるにも関わらず G1/S アレストが見られないことが示された。しかし、照射精子受精卵では [3H]-Tdr の取り込み量が減少しており、DNA 合成が抑制されていた。DNA 合成の抑制は雄性核だけでなく、雌性核でも見られた。これは単に DNA 損傷により物理的に DNA 合成が抑制されているのではなく、損傷応答として受精卵全体の DNA 合成が抑制されたことを示している。p53 を欠損した受精卵では、照射精子受精による DNA 合成の抑制は見られなかった。さらに、この受精卵に大腸菌で作らせた GST-p53 融合蛋白質を微小注入すると、DNA 合成の抑制が回復した。以上より、照射精子受精による DNA 合成の抑制が p53 依存性であることが示された。しかし、p21 を欠損した受精卵では照射精子により DNA 合成の抑制がみられることから、DNA 合成の抑制に p21 は不必要であることが示された。核を PI で染色して、レーザースキャニングサイトメーターで DNA の定量を行った解析では、精子への照射によりやはり合成量の抑制がみられ、[3H]-Tdr の解析はヌクレオチドプールの変動によるものでないことが示された。以上より、照射精子受精卵では p53 依存性の S 期チェックポイントにより DNA 合成を抑制している事が明らかになった。

これまで p53 は G1/S, G2/M チェックポイントに関わっていることが知られており、S 期チェックポイントに関わるという報告はなかった。これは、体細胞では G1/S チェックポイントが強く働くために損傷細胞は S 期に入ることが出来ず、p53 依存性の S 期チェックポイントが観察しにくく、受精卵では G1/S アレストがないので細胞が S 期に進入し、p53 依存性の S 期チェックポイントが観察し得たとも考えられる。受精卵では p53 依存性の S 期チェックポイントがみられ、G1/S チェックポイントがないなど体細胞とは異なる放射線応答の特異性が明らかになった。

論文審査の結果の要旨

DNA 損傷応答機構は、これまで体細胞を使い詳しく解析されている。しかし、受精卵では難操作性により DNA 損傷応答の十分な解析がなされていない。また、受精卵においては、精子由来の雄性核と卵子由来の雌性核は別々に形成されるため、精子にのみ電離放射線してからその受精卵を解析することにより電離放射線を受けていない雌性核における損傷応答を解析することが可能である。本研究では、マウス受精卵における p53 依存性の電離放射線応答について解析した。まず p53 応答性のレポーター遺伝子を作成し、これをマウス受精卵の雌性核に微小注入したところ、精子が照射されている場合においてのみその発現が誘導された。この知見は、精子核に損傷が存在するという情報が細胞質を介して p53 依存性に雌性核に伝わることを示している。次に DNA 複製を解析したところ、照射精子受精卵では雄性核と雌性核の両方において、G1/S アレストは見られなかったが S 期の [3H]-Tdr の取り込み量の減少し S 期が少し延長していた。この照射精子受精による [3H]-Tdr の取り込み量の減少や S 期の延長は、p53 欠損マウス受精卵では見られなかった。p53 欠損マウス受精卵に GST-p53 融合蛋白質を微小注入すると、p53 欠損マウス受精卵で観察された [3H]-Tdr の取り込み量の減少が抑制された。以上の知見より、受精卵では DNA 損傷が雄性核に存在するときに p53 依存性に雌性核の DNA 複製も抑制されることが解明された。さらに、p53 依存性のシグナル伝達経路に p21 が関与しているかどうかを調べるために、p21 欠損マウス受精卵でも同様の実験を行ったところ、p21 は関与していないことがわかった。

以上の研究は、p53 依存性 S 期チェックポイントの存在を新たに発見したもので、体たさい胞とは異なる初期胚発生の損傷応答の解明に貢献し放射線生物学の発展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14年2月1日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。