

個体発生において放射線が NT-3 および左右非対称性発現  
遺伝子の発現に与える影響  
(課題番号 12670034)

平成12年度～平成14年度科学研究費補助金研究成果報告書  
基盤研究(C) (2)

平成15年3月

研究代表者名 隅田 寛  
広島国際大学保健医療学部・教授

## 目次

はしがき	1
研究概要	2
研究目的	3
1. 高エネルギーX線が Chick 胚の形態形成に与える影響	4
2. $^{252}\text{Cf}$ がマウス胚の形態形成に与える影響	7
3. 3 MeV 中性子がマウス胚の形態形成に与える影響	11
4. 高エネルギーX線がニワトリ胚 NT-3 遺伝子の発現に与える影響	15
5. 高エネルギーX線がニワトリ胚 Pitx2 と Shh 遺伝子の発現に与える影響	16
6. 高エネルギーX線がニワトリ胚 BMP2 および Tbx3 遺伝子の発現に与える影響	18
7. 3MeV 中性子がマウス胚の NT-3、Pitx2 および Ets-2 遺伝子発現に与える影響	20
8. 高エネルギーX線によるp53、ATM および RAD51遺伝子の発現誘導について	22

## はしがき

### 研究組織

研究代表者： 隅田 寛（広島国際大学保健医療学部・教授）

### 交付決定額(配分額)

	直接経費	間接経費	合計
平成 12 年度	1,200 千円	0 円	1,200 千円
平成 13 年度	800 千円	0 円	800 千円
平成 14 年度	700 千円	0 円	700 千円
総計	2,700 千円	0 円	2,700 千円

### 研究発表

#### (1) 学会誌等

1. Kumasaki, T., Sasaki, M., Nishiyama, M., Teranishi, Y., Sumida, H. and Mitsui, Y.: Effect of Bcl-2 down-regulation on cellular life span. *Biogerontology* 3: 291-300 (2002)
2. Kumasaki, T., Sasaki, M., Nishiyama, M., Teranishi, Y., Sumida, H. and Mitsui, Y.: Life span shortening of normal fibroblasts by overexpression of BCL-2: a result of potent increase in cell death. *Exp. Cell Res.* (in press)

#### (2) 口頭発表

1. 隅田 寛、伊達卓治、山内光利: 高エネルギーX線が Chick 胚に与える影響 第 106 回日本解剖学会総会 (2001 年 高知)
2. Sumida, H., Nitta, Y. and Hoshi, M. Effects of Californium exposure on mouse embryos. 41<sup>st</sup> Annual meeting of The Teratology Society (2001 Montreal)
3. 隅田 寛、新田 由美子、星 正治: マウス胎仔に認められたカリフォルニウム 252 照射による外脳と NT-3 遺伝子発現の低下 第 41 回日本先天異常学会学術集会 (2001 年 横浜)
4. Sumida, H. and Yamauchi, M. Effects of X-ray with expression of HSP90 and FGF-8 on chick embryos. 14<sup>th</sup> International Congress of Developmental Biology (2001 Kyoto)
5. 隅田 寛、伊澤 伸尚、内野 達郎、重松 亜里沙、竹内 はるな: ニワトリ胚への放射線照射による ATM、P53、RAD51 遺伝子発現の変化 第 42 回日本先天異常学会学術集会 (2002 年 浜松)

## 研究概要

研究目的は放射線が多分化能を有する神経堤細胞を障害するか、あるいは左右非対称性発生にかかわるホメオボックス遺伝子の発現に影響を与えるか否かを調べて、放射線の発生過程に与える影響の原則的側面の見直しを検討することである。

孵卵48時間あるいは72時間のホワイトレグホン胚にLinacを使用して6MeVの高エネルギーX線を5Gyから9Gy照射して、その影響を調べた。また、妊娠7.5日のマウスに<sup>252</sup>Cfあるいは3MeVの中性子線を0.5Gy、0.75Gyおよび1.0Gy照射して、同様に影響を調べた。中性子線照射により、左右軸の発生障害が認められた。特に神経堤細胞に与える影響を調べるためにNT-3遺伝子の発現について調べた。また、発生における左右差に関連すると考えられているPitX2の発現にあたる影響を調べた。

その結果、高エネルギーX線により、NT-3遺伝子の発現が極端に障害される例があることが判明した。他の遺伝子群については、胚によっては発現が低下していたが、低下していない胚もあり、全体的な傾向としては発現に大きな変化はなかった。Pitx2遺伝子の発現も影響を受ける場合があることがわかった。また、異常PitX2遺伝子の発現を強く示唆する例が認められた。結論として、放射線照射によりNT-3など特にその発現に障害を受ける遺伝子がある可能性が示唆されると同時に、発生に関する特定の遺伝子特にホメオボックス遺伝子の変異は生じないことがわかった。

その他、放射線に対する細胞防御に関連する遺伝子の発現について検討した。つまり、ニワトリ胚に高エネルギーX線を照射して、p53、ATMおよびRAD51の発現に与える影響を検討した。5Gyあるいは8Gyを照射後24時間のp53およびATM遺伝子の発現は対照群に比較して有意に低下していた。p53およびATMは放射線照射によるG1期停止や細胞死に関連する重要な遺伝子であり、放射線照射が細胞の防御機構に影響を与えた可能性が示唆され、異常発生のメカニズムを解明する上で興味深い。ただし、タンパクレベルではp53の低下は顕著ではなかった。また、RAD51遺伝子は放射線照射により最大2倍程度発現の上昇が認められた。これは、今までの報告と異なる結果であり、放射線に照射により、DNA修復遺伝子の発現が増加する可能性がわかった。

以上の結果から、放射線照射により、発生に根本的に関わる遺伝子の発現に影響が現れることがわかった。しかし、特定の遺伝子に特異的な変異は起こらないこと、そして、細胞の修復システムに関しては新たに検討する必要性が示唆された。

## 研究目的

放射線に心臓に対する催奇形作用があることは周知の事実である。最近では低線量被曝による放射線の影響に研究の主体が移行してきたが、最近、多量の放射線を妊婦が被曝しうる事故が起こる可能性を示唆する出来事が生じたことは記憶に新しい。本研究の目的は、放射線による心・大血管異常形態形成のメカニズムを遺伝子レベルで解明するための基礎的知見を得ることである。申請者は以前に放射線による心臓奇形発現の研究をおこなっていたが、放射線が発生に関連するある特定の遺伝子発現に影響を及ぼしていることを示す証拠はない。ところが、放射線照射の時期特異性による細胞障害が結果的に発生のある特定の時期に発現する遺伝子産物を十分に機能させることができないために異常形態形成が引き起こされることは十分考えられる。

心臓の形態形成には、神経堤細胞の心臓への遊走およびそれら細胞の正常な発育と文化が必要である。今までに、神経堤細胞の遊走障害による心臓の異常形態形成は数多く報告されているが、放射線によって神経堤細胞に障害が生じるという報告は見あたらない。

最近、神経成長因子グループの1つである Neurotrophin-3 (NT-3)が神経堤細胞自身によって産生され、神経堤細胞の生存因子となっていることが報告された。仮に、発生の適当な時期への放射線照射が神経堤細胞に障害を与えるならば、NT-3 遺伝子発現に影響を受けるはずであり、その発現低下は放射線による神経堤細胞の障害を示す指標となりうる。そこで、本研究では、発生中の胚に放射線を照射し、NT-3 遺伝子の発現状況を調べることにより、放射線が神経堤細胞の発育を障害しているか否か検討すると共に、放射線による催奇形メカニズム解明の一助としたい。

一方で、最近、個体の左右差に関連すると思われる遺伝子が数多く同定されてきた。これらの遺伝子は、胚内で左右非対称性に発現する。それらの遺伝子の中には、個体発生の根幹に関わるとと思われるホメオボックス遺伝子も含まれている。

速中性子線を形態的に胚の左右差が現れてくるより前の妊娠ラットに照射すると、胚の発生中の心臓が逆向にループすることがある。これは、放射線が個体の左右差を生じせしめる遺伝子発現に影響を与えている可能性を示唆している。また、放射線が発生の初期に発現するホメオボックス遺伝子を障害するならば、個体発生においてその影響は甚大である。そこで、今回は特に左右差に関連する遺伝子の中で Pitx2 について、放射線がその発現に影響を与えるか否か調べる。

## 高エネルギーX線がChick胚の形態形成に与える影響

Chick胚に高エネルギーX線を照射して、その影響を調べた。37度湿潤空気中で3日孵卵したホワイトレグホン胚にLinacを使用して6MeVの高エネルギーX線を5Gyから9Gy照射した。対照には無照射群を使用した。照射6日(孵卵9日)の生存率は、5Gy照射群で約80%、7Gy照射群で60%程度であったが、8Gy照射群では約25%に急激に低下し、9Gy照射群では約10%であった(図1)。50%生存線量は6.5Gy程度と推定された(図1)。照射胚には対照胚に比較して発育遅延が認められ、体重には有意差が認められた(図2)。ただし、発育遅延の程度は線量依存的ではなかった。5Gy照射群では3%に外表奇形を認めたのみであるが、6Gy照射群で約60%、7Gyでは約75%に外表奇形が認められた(図3, 4)。micromeliaが外表奇形の主なものであったが(図3)、ectopia cordiaを合併している例もあった(図4)。8Gyおよび9Gy照射群では、主にmicrophthalmiaを中心とした顔面の奇形が認められた(図4)。

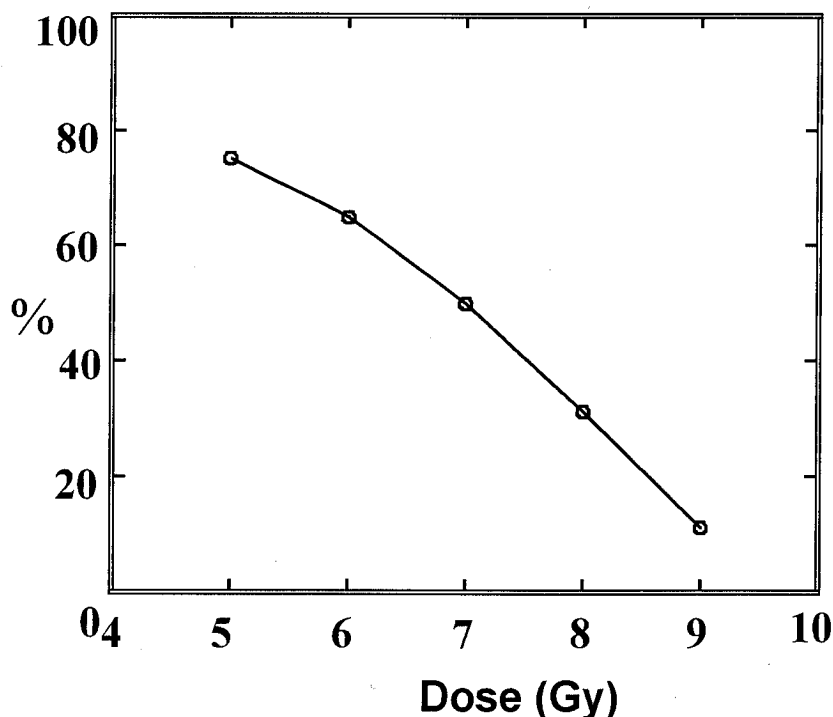


図1

生存率は線量依存性に低下した。LD<sub>50</sub>は6.5 Gy程度であると推定される。

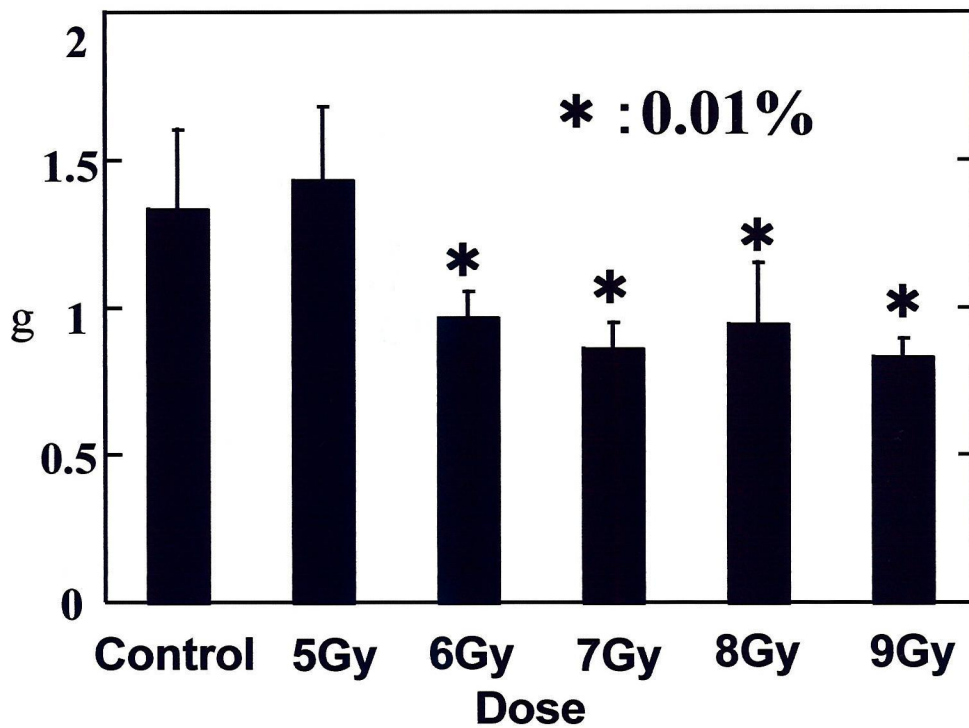


図2

5Gy の照射では、発育遅延は認められないが、6 Gy 以上の高エネルギーX 線照射により発育遅延が認められる。ただし、発育遅延は線量依存性ではなく、9 Gy 照射による発育遅延の程度は、6 Gy 照射による発育遅延のそれと差は認められない。

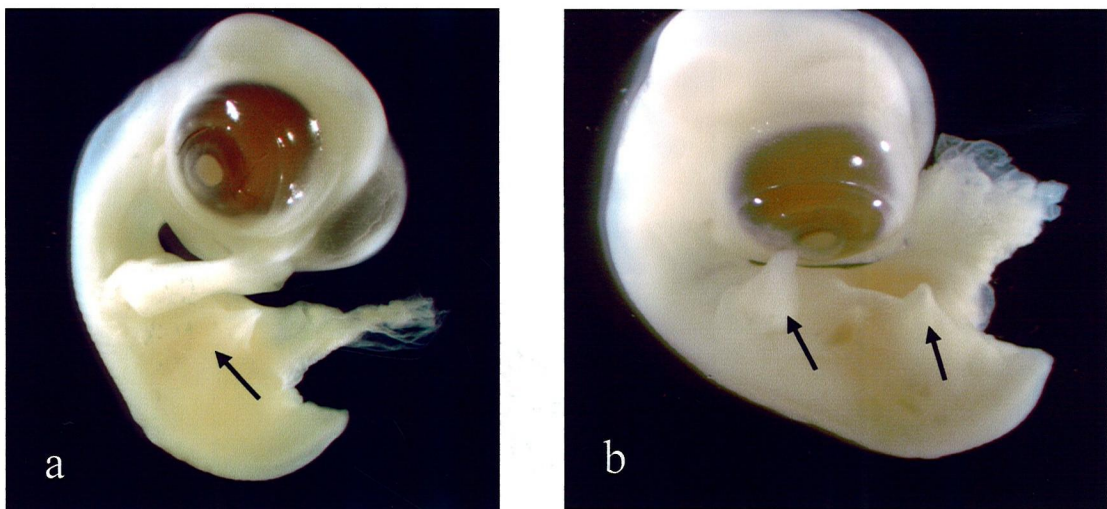


図3

7 Gy 照射群に認められた小肢症。a: 下肢の小肢。b: 上肢、下肢両方の小肢。

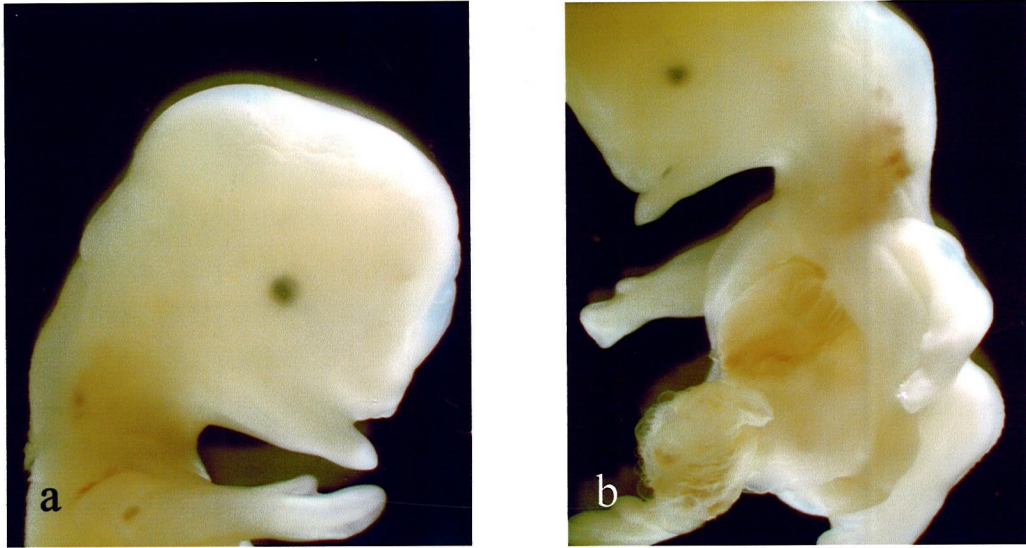


図4

9 Gy照射群に認められた小眼球症を含む頭部顔面異常。a:上肢の異常も認められる。嘴の異常も顕著である。b: aの例と同様小眼球症、嘴の異常をはじめとする頭部顔面異常、上肢の異常に加えて、胸腹裂による心臓逸所が認められる。



## $^{252}\text{Cf}$ がマウス胚の形態形成に与える影響

$^{252}\text{Cf}$  からの放射線は、 $\gamma$ 線と中性子線を1:2の割合で含んでおり、核反応による放射線を模倣するのに有用である。そこで今回、 $^{252}\text{Cf}$  核反応炉の事故等により、発生に関連するある特異的な遺伝子に重要な影響が引き起こされる可能性があるか否かマウスを使用して検討した。その胚仔が器官形成を始めるより早期である妊娠 7.5 日に、総線量として 0.50 Gy、0.75 Gy および 1.00 Gy 照射した。線量率は比較的 low、0.29 cGy/分である。妊娠 17.5 日に母体を屠殺し、胎仔を調べた。

その結果、1.00 Gy 照射群に生存胚は認められなかった(図5)。生存率は線量依存性に低下したが、線形的な低下ではなかった(図5)。0.5 Gy 照射群と 0.75 Gy 照射群の生存率はそれぞれ 91%と 69%であった。LD<sub>50</sub> は約 0.8 Gy であった(図5)。

ほとんどすべての生存胚に、発育遅延が認められた(図6, 7)。ただし、発育遅延の程度は線量依存的ではなかった(図6)。外表奇形はあまり認められなかった。外脳症と小眼症が 0.5 Gy 照射群の 9%に、0.75 Gy 照射群の 4%に認められたのみであった(図7, 8)。これらの症例では、羊水は血性を呈していた。外脳症の症例では、非定型的で不規則な神経組織が認められ、脈絡叢組織が脳室内と推定される部位によく発達していた(図9)。眼球に関しては、水晶体の異常形成が認められ、正常な網膜構造は欠落していた(図10)。この結果から、神経管の閉鎖時期よりかなり早期の照射により神経管閉鎖の障害が引き起こされることがわかった。また、神経管閉鎖の障害は線量依存性ではなかった。つまり、 $\text{Cf}^{252}$  の照射による神経管閉鎖の障害は確率的影響であり、 $^{252}\text{Cf}$  の照射により、神経管の閉鎖に関連する遺伝子の障害が引き起こされた可能性が示唆された。

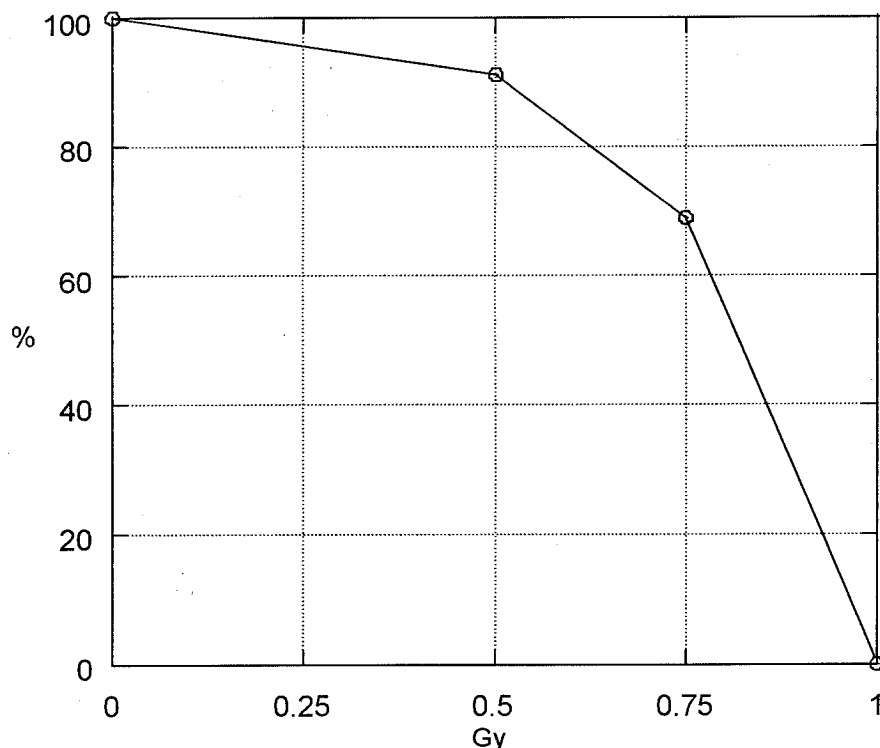


図5

$^{252}\text{Cf}$  照射群の生存率。生存率は線量依存性であるが、線形ではない。LD<sub>50</sub> は約 0.8 Gy と推定される。

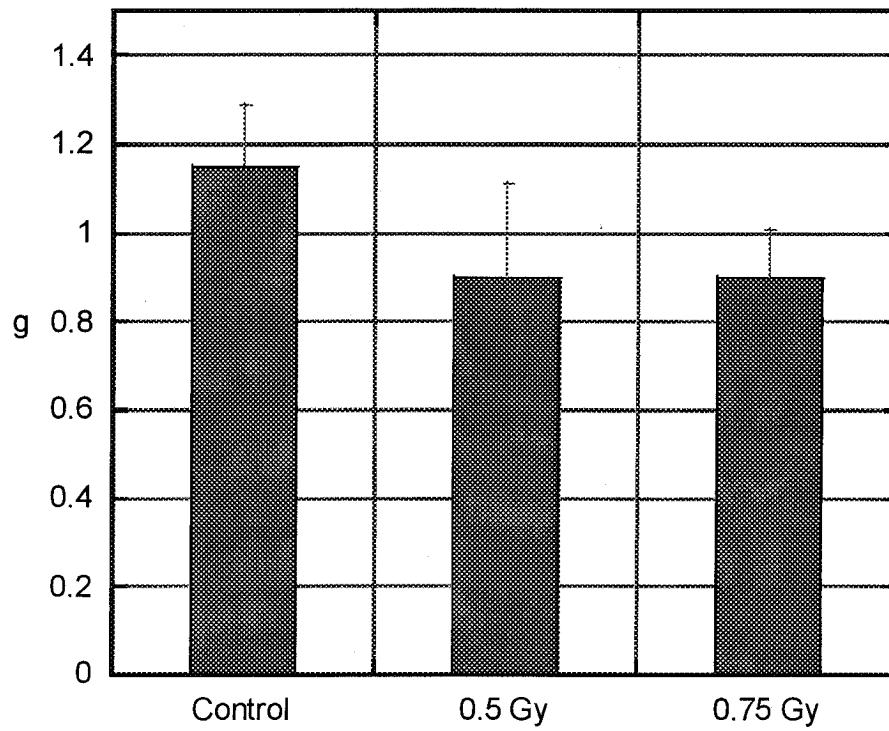


図6  
 $^{252}\text{Cf}$  照射による発育遅延。胎仔の体重は非照射群に比較して優位に低下している。  
ただし、発育遅延の程度に線量依存性は認められない。

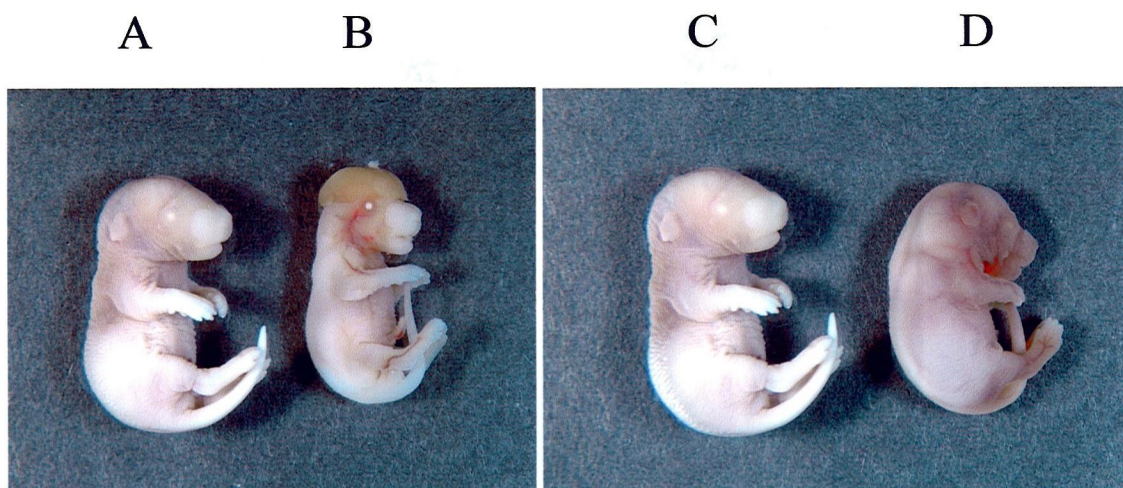


図7

A:妊娠 17.5 日対照胎仔。B:0.75 Gy 照射群に認められた外脳。C:妊娠 17.5 日対照胎仔  
D:0.75 Gy 照射群の胎仔。対照胎仔に比較して発育遅延が認められる。



図8

0.75 Gy 照射群に認められた外脳。小眼症を合併している。



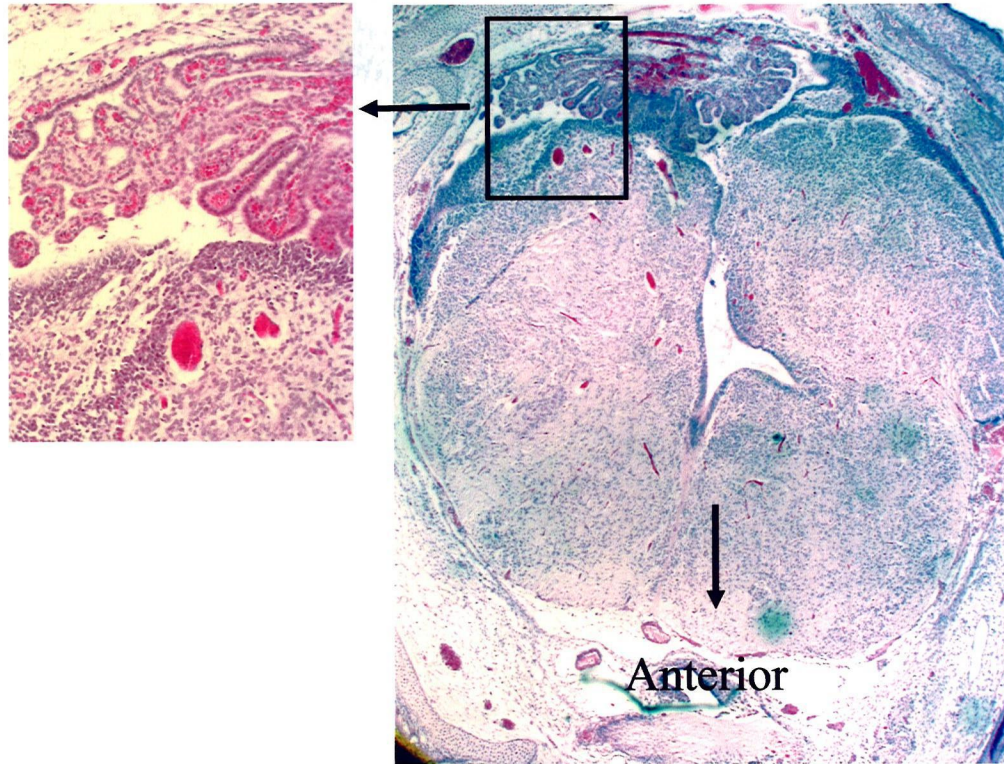


図9  
 外脳症の脳組織。神経細胞の配列はかなり不規則である。第4脳室に相当すると思われる部位に脈絡叢様組織がよく発達している。

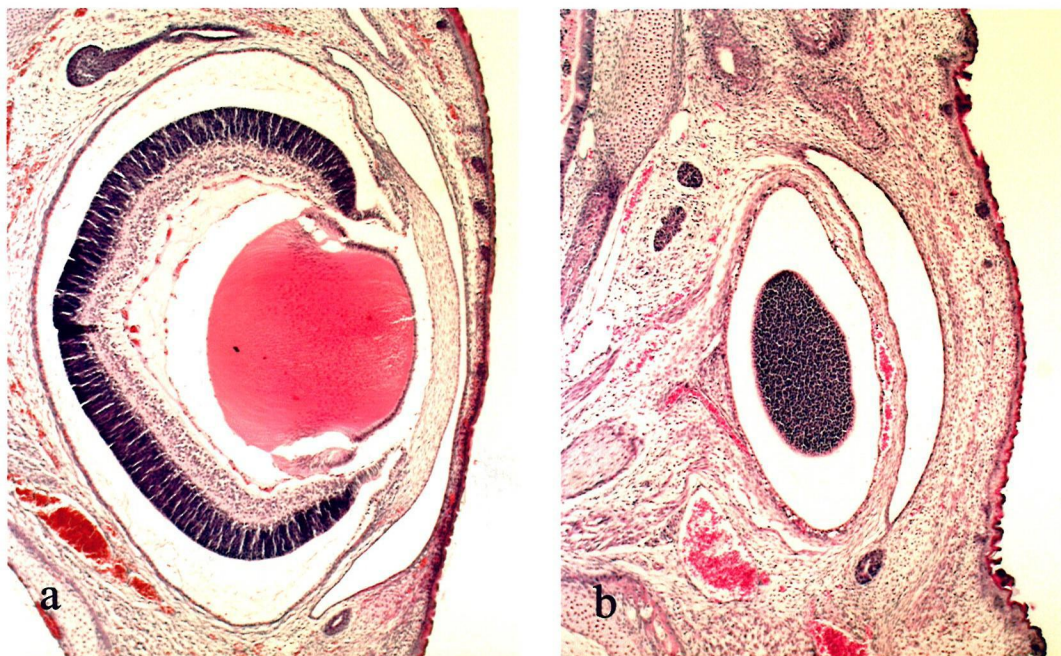


図10  
 a: 対照胎仔の眼球。水晶体と網膜の構造が観察できる。b: 0.75 Gy 照射群に認められた眼球の形成異常。水晶体の異常形態形成が認められ、網膜は欠落している。

### 3MeV 中性子がマウス胚の形態形成に与える影響

中性子線がマウス胚に与える影響をしらべた。照射線量は $^{252}\text{Cf}$ 同様 0.5 Gy, 0.75 Gy, 1Gyである。生存率は照射線量に依存性に、かつ比較的線形に低下した(図11)。LD50は約 0.55 Gyと推定され、 $^{252}\text{Cf}$ より低値であった。つまり、 $^{252}\text{Cf}$ 照射においても高LETである中性子線の致死効果が高いと考えられた(図11)。

しかし、 $^{252}\text{Cf}$ 照射と異なり、1.0 Gy 照射群に生存胚が少数ながら認められた(図11)。0.75 Gy 照射群の発育遅延の程度は、等線量の $^{252}\text{Cf}$ 照射群のそれより重篤であった(図12)。また、 $^{252}\text{Cf}$ 照射と異なり、発育遅延の程度は、線量依存的であった(図12)。

注目すべき点は、1.0 Gy 照射群の2例の生存胎仔中1例に認められた外表奇形である。頭部顔面の異形成症候群が認められた(図13)。下顎は欠損しており、耳介低位および象鼻様吻が認められた(図13)。脳は全前脳胞を呈しており、耳頭症と診断された(図14)。象鼻様吻には、毛包と嗅上皮が認められた(図14)。小眼球症も合併していた。これは、中性子線によって引き起こされた奇形として報告された初めての例であると考えられる。さらに、このケースは胸部器官の左右逆転が認められた(図15)。心尖部は右方に位置し、かつ形態学的右心室から大動脈が起始しており、完全大血管転換と診断された(図15)。つまり、心ループ形成が完全に左右逆転していたことが示唆された。

さらに、1.0 Gy 照射群のもう1例の心臓にも、左右に関する位置異常が認められた。この症例では、心尖部は左側に位置していたが、大動脈が肺動脈と共に形態学的右心室から起始していたため、両大血管右室起始症と診断された(図15)。この症例も、心ループの左右形成の異常が示唆された。

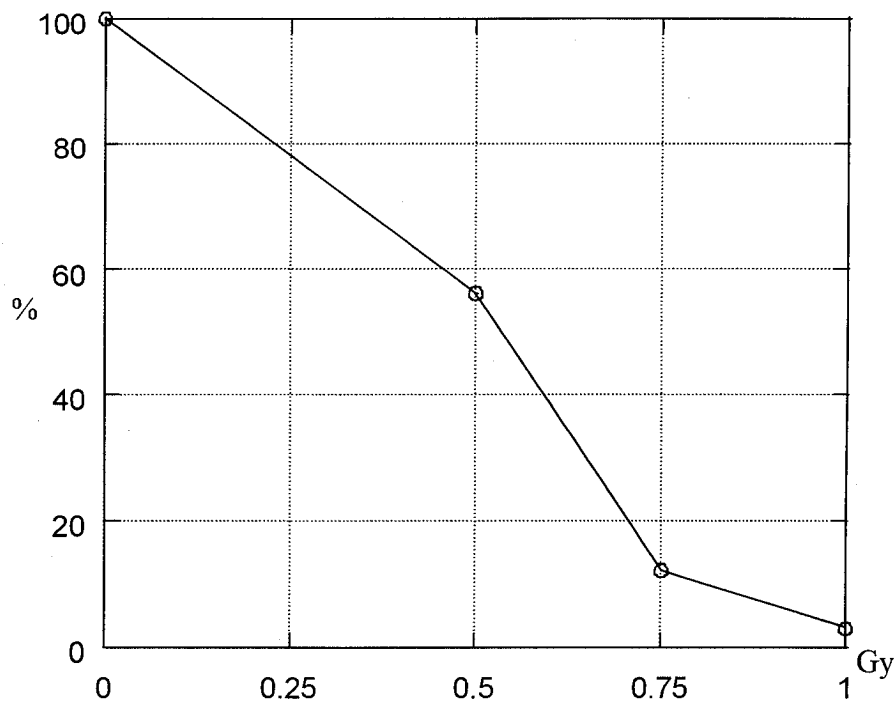


図11

中性子線によるマウス胎仔の生存率。生存率は照射線量に依存性に、かつ比較的線形に低下している。LD50は約 0.55 Gyと推定される。

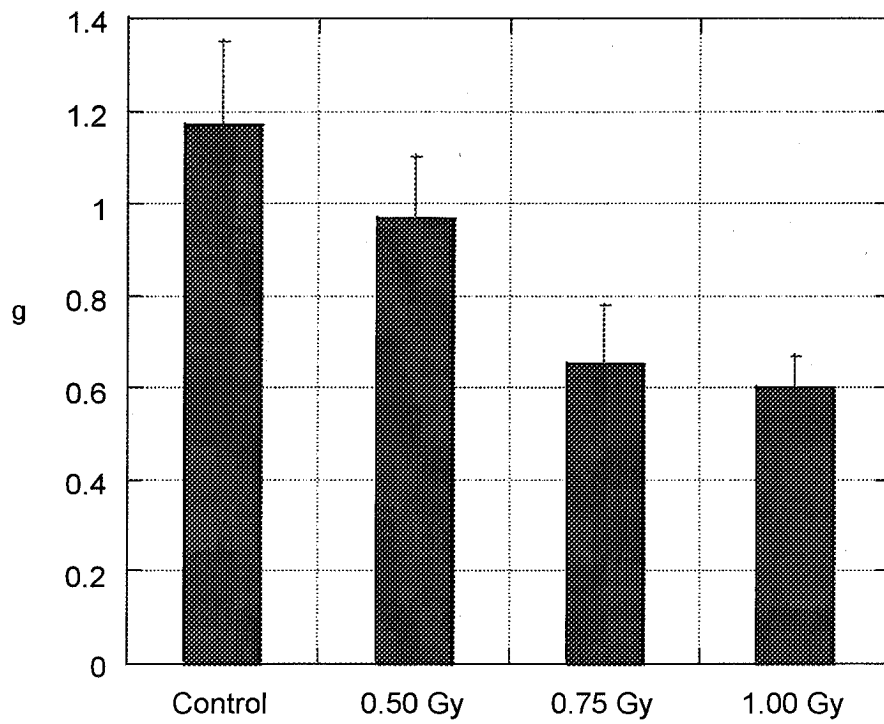


図12

中性子線照射によるマウス胚子の発育遅延。発育遅延の程度は線量依存性である。したがって、0.75 Gy 照射群の発育遅延の程度は、等線量の  $^{252}\text{Cf}$  照射のそれより重篤である。



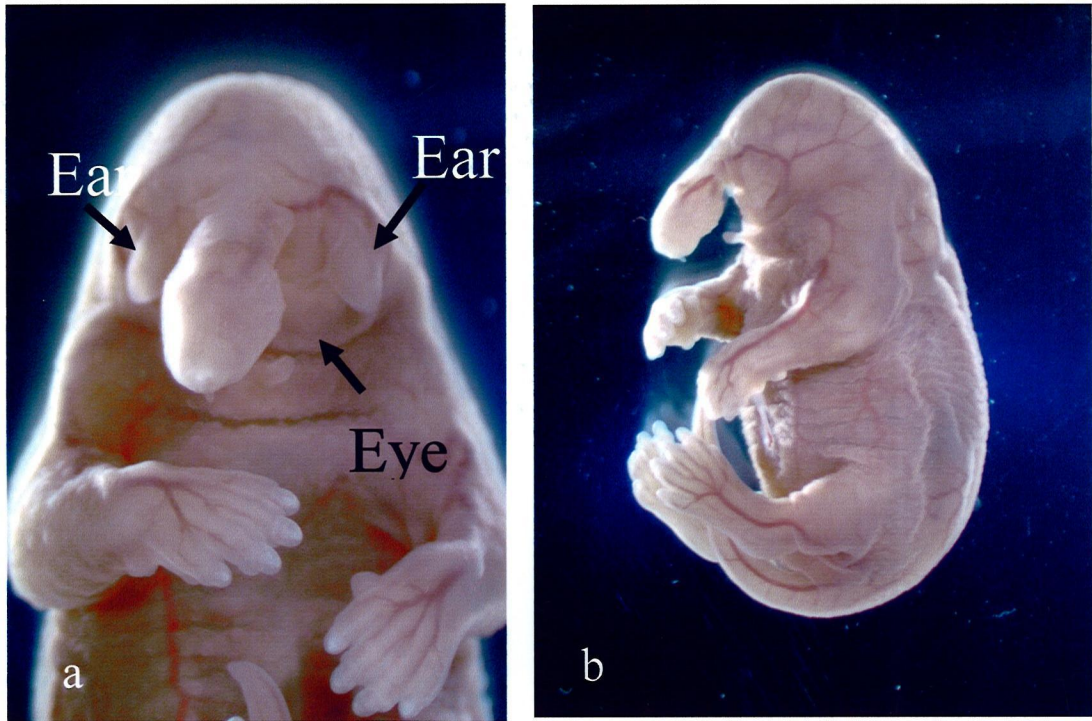


図13

1.0 Gy 照射群に認められた、頭部顔面形成異常。全前脳胞症で、耳頭症と診断できる。下顎の欠損(b)、耳介低位、眼球異常、象鼻様吻が認められる。

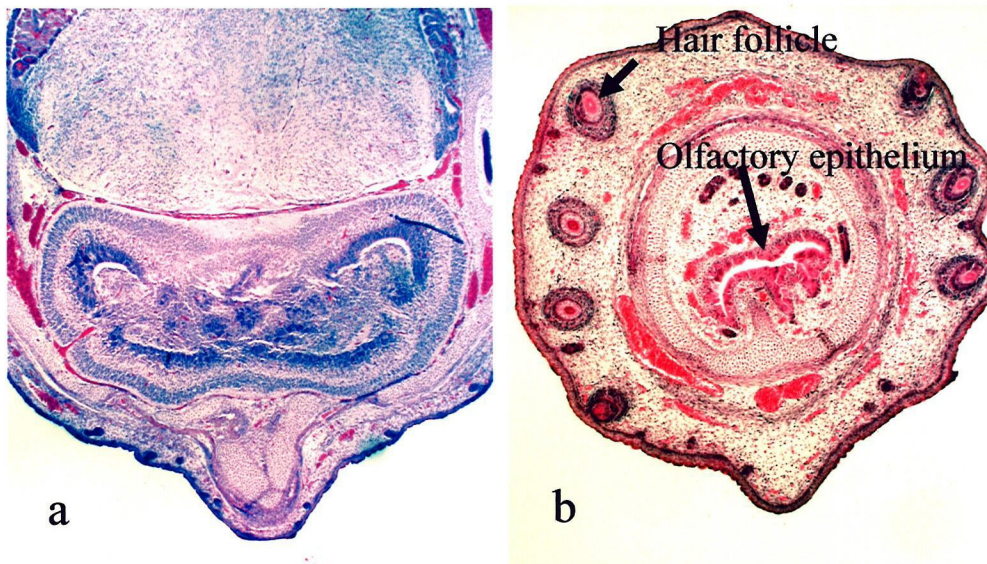


図14

耳頭症例の頭部組織標本。a: 大脳半球は左右に分離しておらず、全前脳胞症である。b: 象鼻様吻には、毛包と嗅上皮が認められる。

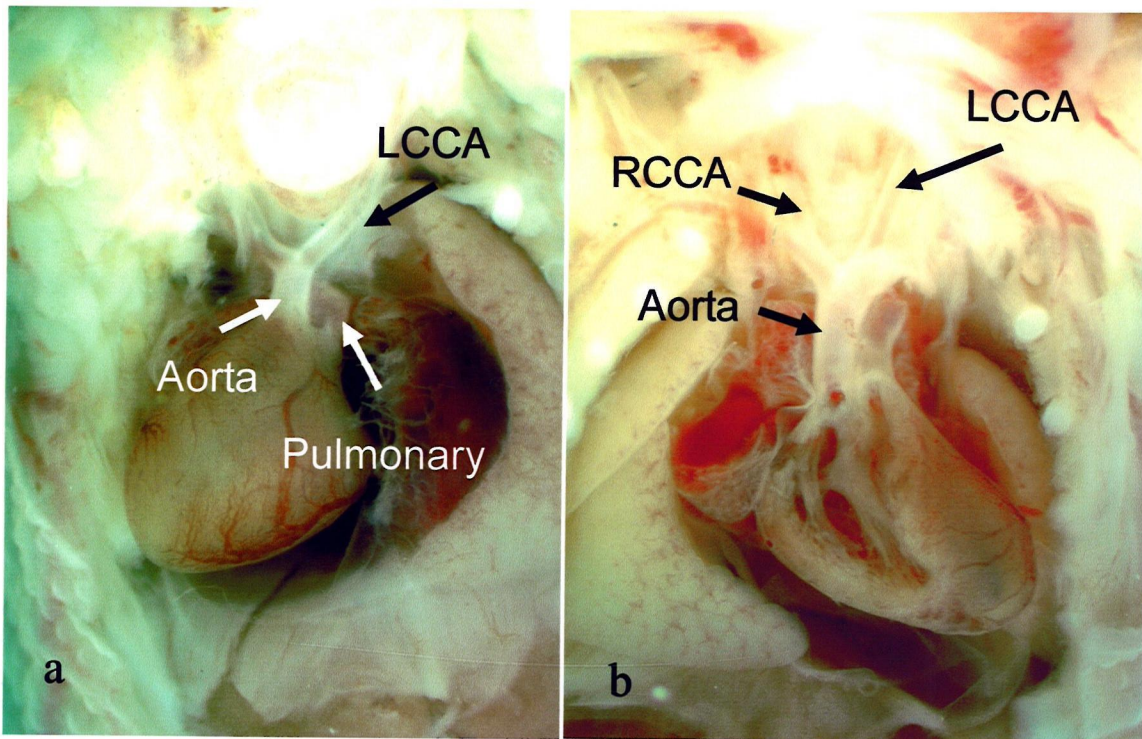


図15

a: 1.0 Gy 照射群に認められた完全大血管転換と b: 両大血管右室起始症



## 高エネルギーX線がニワトリ胚 NT-3 遺伝子の発現に与える影響

孵卵48時間胚に 5 Gy あるいは 8 Gy の高エネルギーX線を照射して、NT-3 遺伝子発現に与える影響を調べた。照射後24時間に照射胚から RNA を抽出して、RT-PCR を行った。

その結果、NT-3 遺伝子は発現は照射胚によって異なり、ほとんどその発現に影響が認められない胚が多かったが、非常に発現が低下している胚も認められた(図16)。このことから、X線照射が NT-3 遺伝子の発現影響することがあることがわかった。X線によるこの遺伝子の発現障害は All or Non 的であり、照射群として統計的に扱くと、照射群の標準偏差が非常に大きくなるため、その発現低下は対照に比較して有意ではなかった。また、発現低下の程度は線量依存的ではなかった。NT-3 遺伝子の発現が低下した胚は、神経堤細胞をはじめとし、神経系の異常を惹起するものと思われる。

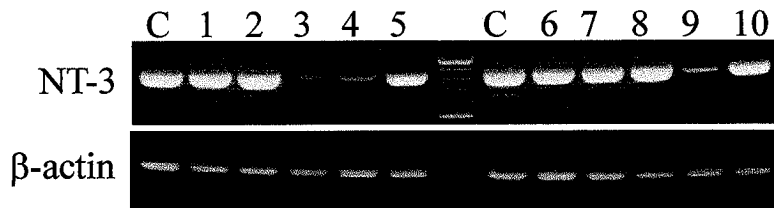


図16

高エネルギーX線がニワトリ胚の NT-3 遺伝子発現に与える影響。照射により極度に NT-3 遺伝子の発現が低下している胚が認められる(レーン3, 4, 9)。ただし、NT-3 遺伝子の発現低下は線量に依存していない。C:対照、レーン1~5:5 Gy 照射群、レーン6~10:8 Gy 照射群

## 高エネルギーX線がニワトリ胚 Pitx2 と Shh 遺伝子の発現に与える影響

孵卵48時間胚に 5 Gy あるいは 8 Gy の高エネルギーX線を照射して、Pitx2 遺伝子発現に与える影響を調べた。照射後2時間および24時間に照射胚から RNA を抽出して、RT-PCR を行った。Pitx2 と Shh は発生の左右差に関わる遺伝子であると考えられている。

結果として、NT-3 遺伝子発現同様 Pitx2 遺伝子発現は X 線照射により影響を受けることがわかった(図17)。胚によってはその発現に変化が認められないが、極度に Pitx2 遺伝子発現が低下している胚が認められた(図17)。同様に、Shh 遺伝子の発現が極度に低下している胚が認められた(図18)。また、NT-3 遺伝子発現への影響とは異なり、Pitx2 遺伝子発現への X 線照射の影響は線量依存性が認められた(図17)。Pitx2 遺伝子の発現が低下した胚は照射後24時間でもその発現程度が回復していないことがわかった(図17)。Shh 遺伝子の発現についても同様であった(図18)。

このことから、X 線照射により発生の左右差に関連する遺伝子の発現低下が起こりうることがわかった。

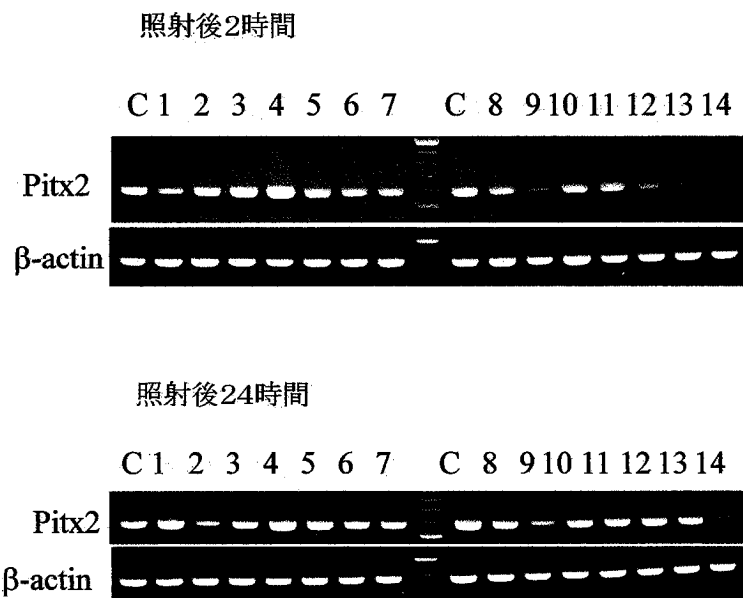


図17

高エネルギーX線がニワトリ胚の Pitx2 遺伝子発現に与える影響。NT-3 遺伝子の発現同様、照射により極度に Pitx2 遺伝子の発現が低下している胚が認められる(照射後2時間:レーン9, 12, 13, 14、照射後24時間:レーン2, 9, 14)。また、Pitx2 遺伝子の発現低下は線量に依存しているように見受けられる。

C:対照、レーン1~7:5 Gy 照射群、レーン8~14:8 Gy 照射群

照射後2時間

C 1 2 3 4 5 6 7 C 8 9 10 11 12 13 14



照射後24時間

C 1 2 3 4 5 6 7 C 8 9 10 11 12 13 14



図18

高エネルギーX線がニワトリ胚の Shh 遺伝子発現に与える影響。Pitx2 遺伝子の発現同様、照射により極度に Shh 遺伝子の発現が低下している胚が認められる（照射後2時間：レーン2, 4, 11, 13、照射後24時間：レーン2, 11）。C: 対照、レーン1~7: 5 Gy 照射群、レーン8~14: 8 Gy 照射群

## 高エネルギーX線がニワトリ胚 BMP2 および Tbx3 遺伝子の発現に与える影響

孵卵48時間胚に 5 Gy あるいは 8 Gy の高エネルギーX線を照射した場合、高率に四肢の異常が発生してくることが判明したので、骨形成に関連するホメオボックス遺伝子である BMP2 遺伝子の発現に与える影響を調べた。また、同様にホメオボックス遺伝子の1つである Tbx3 遺伝子の発現に与える影響も調べた。照射後2時間および24時間で照射胚から RNA を抽出して、RT-PCR を行った。

NT-3 遺伝子、Pitx2 遺伝子や Shh 遺伝子の発現と異なり、放射線によって BMP2 の発現が極度に低下した胚は認められなかった(図18)。このことからX線による四肢の発生異常は BMP2 の特異的に発現低下によるものではないことがわかった。ただし、照射群の照射後2時間の BMP2 の発現程度は、対照と比較すると低下していた(図20)。照射群の BMP2 の発現は、照射後24時間には対照のそれと同レベルにまで回復していた(図20)。

Tbx3 は照射群として遺伝子の発現低下が著しかった遺伝子である。特に 5 Gy 照射群の照射後2時間で発現低下が著しかった(図19)。発現低下は線量依存性ではないが、さらなる検討が必要と思われる。Tbx3 遺伝子の発現低下も、照射後24時間で対照群の発現レベルにまで回復していたが、8 Gy 照射群については照射後24時間で対照レベルに比較して発現過剰が認められた(図20)。これはリバウンドによるものかも知れないが、これについてもさらなる検討が必要と思われる。

照射後2時間

C 1 2 3 4 5 6 7 C 8 9 10 11 12 13 14



照射後24時間

C 1 2 3 4 5 6 7 C 8 9 10 11 12 13 14



図18

高エネルギーX線がニワトリ胚のBMP2遺伝子発現に与える影響。NT-3、Pitx2遺伝子や Shh 遺伝子の発現とは異なり、照射により極度に BMP2 遺伝子の発現が低下している胚は認められない。C:対照、レーン1~7:5 Gy 照射群、レーン8~14:8 Gy 照射群

照射後2時間

C 1 2 3 4 5 6 7 C 8 9 10 11 12 13 14



図19

高エネルギーX線がニワトリ胚のTbx3遺伝子発現に与える影響。5 Gy照射群の胚は照射により極度にTbx3遺伝子の発現が低下していた。C:対照、レーン1～7:5 Gy照射群、レーン8～14:8 Gy照射群

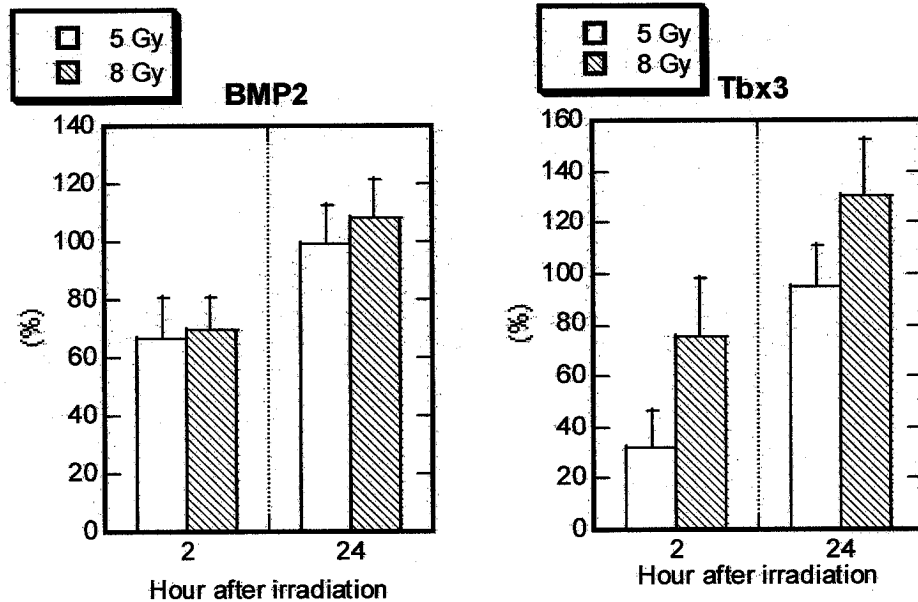


図20

高エネルギーX線がニワトリ胚のBMP2遺伝子とTbx3発現に与える影響。照射後2時間の照射群の胚は、BMP2遺伝子の発現が低下している。Tbx3遺伝子については、5 Gy照射群の照射後2時間の胚の発現低下が著しい。どちらの遺伝子についても、照射後24時間で、その発現は対照レベルに回復している。Tbx3遺伝子については対照に比較して発現過剰が認められる。

C:対照、レーン1～7:5 Gy照射群、レーン8～14:8 Gy照射群

## Cf<sup>252</sup> がマウス胚の NT-3、Pitx2 および Ets-2 遺伝子発現に与える影響

妊娠 7.5 日に Cf<sup>252</sup> を 0.75 Gy 照射した胚につき、妊娠 10.5 日胚の NT-3、Pitx2 および Ets-2 遺伝子の発現を調べた。照射群の胚から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。NT-3 は神経堤細胞の生存因子として考えられている。また、Pitx2 は左右非対称性発生に関連する因子と考えられている。さらに、Ets-2 は心臓の発生にも密接に関連すると考えられている。

結果として、これらの遺伝子の発現状況は、胚により異なっており、全体として対照と比較して、特にその発現が低下している結果は得られなかったが、これらの遺伝子の発現が極端に低下している胚が認められた(図21、22)。特に Ets-2 遺伝子の発現が極端に低下していた(図21、22)。また、発現そのものは低下していなくても、Pitx2 の突然変異が疑われる胚も認められた(図21)。ただし、変異が疑われる例は1例のみで、他の遺伝子群についても、遺伝子変異が疑われる例は認められなかった。

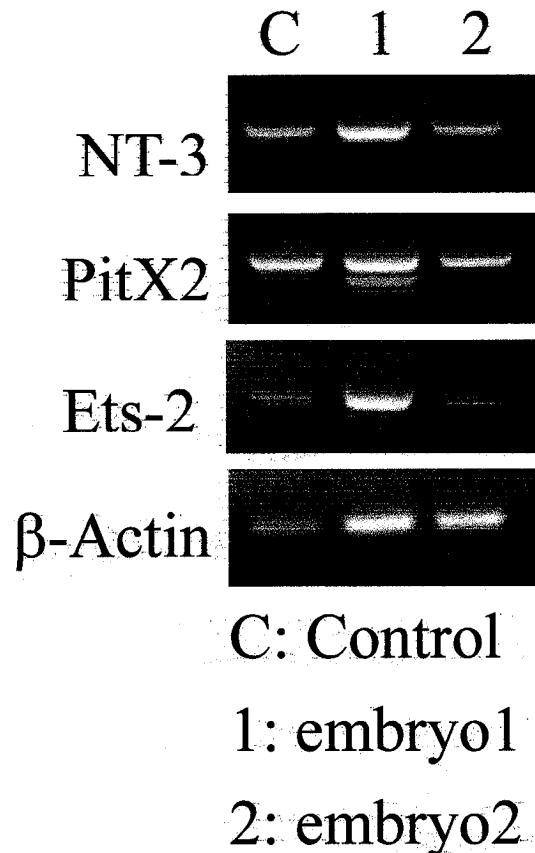


図21

Cf<sup>252</sup> 照射による NT-3、Pitx2 および Ets-2 遺伝子の発現の変化。Embryo1 では発現そのものは低下していないが、Pitx2 は2つのバンドが認められ、この遺伝子が突然変異を起こした可能性が示唆される。Embryo2 では、これらの遺伝子の発現が低下している。特に、Ets-2 遺伝子の発現は極端に低下している。

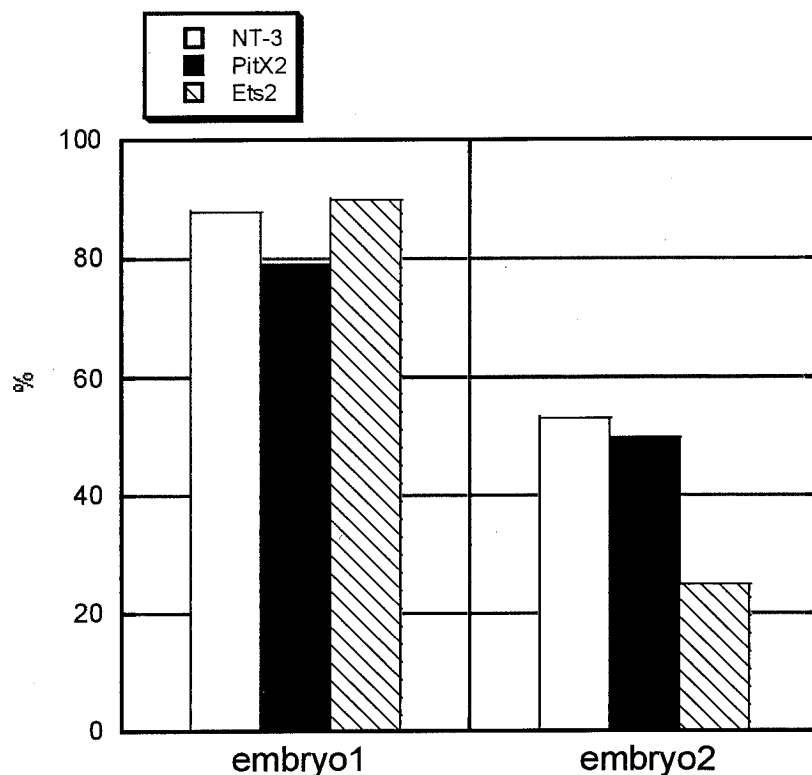


図22

Embryo1 では NT-3、Pitx2 および Ets-2 遺伝子の発現そのものは低下していない。Embryo2 では、これらの遺伝子の発現は 1/2 以下に低下している。特に、Ets-2 遺伝子の発現は極端に低下している。

### 結論

異常の結果から、放射線照射により、NT-3 遺伝子の発現が障害を受ける可能性が示唆された。放射線照射による神経系異常は NT-3 遺伝子の発現異常のみが原因とは考えられないが、その発現異常が大きく関与している可能性が示唆された。

中性子線の照射により、左右軸の障害が引き起こされることがわかった。また、左右差の決定に関連する遺伝子の発現にも影響が現れる例も判明した。しかし、一般的には放射線照射により、種々の遺伝子発現に影響が認められるものの、特定の遺伝子に変異が起こることはないことがわかった。

## 高エネルギーX線による p53, ATM および RAD51 遺伝子の発現誘導について

### 要旨

電離放射線照射による DNA 損傷に対して、細胞は種々の修復行動を行う。本研究では、電離放射線が DNA 修復システムに関連する遺伝子の発現にあたる影響を調べた。p53 は放射線照射に対して細胞分裂を G<sub>1</sub> 期で停止させるか、あるいはアポトーシスに導く。ATM は p53 の活性化と安定化に寄与する。RAD51 は DNA を相同組換えによって修復する。そこで、高エネルギーX線 5 Gy および 8 Gy をニワトリ胚に照射して、p53, ATM および RAD51 遺伝子の発現がどのように変化するか RT-PCR 法を使用して調べた。照射後 24 時間では、p53 および ATM 遺伝子の発現は対照に比較して低下していた。特に ATM 遺伝子発現量は対照の 1/2 以下に低下していた。一方で、RAD51 遺伝子は照射群において、1.5 倍から 2 倍発現量の増加が認められた。このことから、放射線照射により、DNA 損傷の修復に関連する遺伝子の発現が増加することがわかった。このことは RAD51 の転写調節メカニズムを解明する上で興味深い。これらの遺伝子の発現増加については線量依存性が認められ、8 Gy 照射群での発現量増加が 5 Gy 照射群のそれを上回った。また、p53 遺伝子や ATM 遺伝子の発現量低下については、抑制的な転写調節が働いた結果なのか、あるいは照射によるダメージの結果であるのか判断はできない。P53 遺伝子産物そのものは増加することがわかっているため、抑制的な転写調節が作用するとは考えにくい。しかし、これらの因子は修復システムのコアになる機能を有しており、放射線照射により突然変異を起こした因子が増加することを避けるようなメカニズムが細胞内には存在するのかもしれない。本研究から、p53 や ATM に関しては、放射線照射による転写誘導は起こらず、DNA 障害時点において細胞内に現存しているそれらの産物を最大限利用するようなメカニズムが機能していることが予想される。また、ATM が RAD51 の転写調節の上流に位置する可能性が示唆される。

### 序言

電離放射線を照射すると、細胞は DNA 損傷の修復のために G<sub>1</sub> 期で分裂を停止するか、あるいは DNA の損傷が不可逆である場合はアポトーシスを引き起こす<sup>1)</sup>。G<sub>1</sub> 期での分裂停止およびアポトーシスには p53 が関与していることが古くから知られていた<sup>1)</sup>。p53 は転写活性を持ち、p21<sup>WAF1</sup> の発現を誘導した場合は G<sub>1</sub> 期での分裂停止が起こり、Bax や p53AIP1 の発現を誘導した場合にアポトーシスが起こらしい<sup>2,3)</sup>。これらの発現調節の違いは p53 の互いに異なる場所のアミノ酸残基のリン酸化により調節されていると考えられている<sup>3~7)</sup>。

DNA 損傷による細胞内の p53 の蓄積は、p53 の発現調節によるものではなく、N 末にあるセリン残基のリン酸化により p53 が安定化するために引き起こされる<sup>5~8)</sup>。最近、p53 の安定化と活性化は ATM (Ataxia Telangiectasia-mutated) を介して引き起こされることが判明してきた<sup>9~11)</sup>。ATM 遺伝子は AT (毛細血管拡張性小脳失調症) の原因遺伝子の正常型遺伝子として単離されたものであり、その産物は 370 kD 程度の分子量を持つリン酸化酵素である<sup>12,13)</sup>。さらに、DNA 損傷により活性化した ATM は Chk2 を活性化し、Chk2 が p53 をリン酸化する系の存在も判明してきた<sup>10,11,14)</sup>。しかし、放射線照射による DNA 損傷において、ATM の転写がどのように調節されるのか、あるいは p53 の転写そのものがどのように変化するかということについては不明な点が多い。

一方で、細胞には放射線照射により損傷を受けた DNA を修復するシステムが存在する。RAD51 は DNA の 2 重らせん切断を相同組換えにより修復する酵素である<sup>15)</sup>。RAD51 は大腸菌の RecA と呼ばれ



る酵素と非常に相同性が高い構造を有しており<sup>16)</sup>、DNA 修復システムは進化的に高度に保持されてきたシステムであるらしい<sup>15,17)</sup>。ところが高等細胞において、DNA 損傷によりどのように RAD51 が発現してくるのかそのメカニズムについては良く知られていない。RAD51 は ATM や p53 と相互作用を有しているとする報告もあるが<sup>18~20)</sup>、詳細はよくわからない。そこで、本研究ではニワトリ胚に高エネルギー X 線を照射して、p53、ATM および RAD51 遺伝子の発現がどのように変化するか検討した。

## 材料と方法

### 高エネルギー X 線照射と RNA 抽出

ホワイトレグホン有精卵を 37.5 度湿潤空气中で 72 時間孵卵した。有精卵は Linac にて 6 Mev の高エネルギー X 線を 5 Gy (実質照射線量 5.2 Gy)あるいは 8 Gy (実質照射線量 8.6 Gy)照射した。照射後 2 時間および 24 時間に胚を取り出し、Total RNA を RNeasy (Quagen, Valencia CA, USA)を使用して抽出した。

### RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)

RNA から逆転写反応により cDNA を作成した。逆転写反応には M-MLV 逆転写酵素 (GibcoBRL, Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD, USA)、9 mer ランダムプライマー (Takara, Tokyo, Japan) および OligoT6 プライマー (Toyobo, Tokyo, Japan)を使用した。PCR プライマーは GenBank から得た p53、ATM および RAD51 のニワトリ遺伝子配列から設計した。上流プライマーと下流プライマーは以下のとおりである。

#### P53

5'AGACCACCAAACGGCACAC3'                      5'TCCCTCCACCTTCACACG3'

#### ATM

5'CCCTGCTGTGTGGTTTGAG3'                      5'ATCCTCTGGTCCCTGCTGT3'

#### RAD51

5'GAGGAGGTGGAGAAGGAAAA3'                      5'TCAGGAAGGCAAGGAGAGT3'

p53 および ATM の PCR におけるアニーリングは 55.5 度で 1 分、RAD51 は 57 度で 1 分、計 35 サイクル反応を行った。

PCR 産物の電気泳動象はスキャナーでデジタル化し、Sicon Image (Ver. β4.0.2) にて数値化した。ベータアクチンの PCR 産物も同様に測定し、補正に使用した。

## 結果

照射後 2 時間については、発育が十分でない有精卵が多く、十分な RNA を安定して抽出することができなかった。そのため予備的な結果しか得られなかった(図 23)。RT-PCR は p53 遺伝子についてのみ行った。5 Gy 照射群は 5 個の胚から RNA を得たが、8 Gy 照射群では 1 個の胚からのみ RNA を得ることができた。5 Gy 照射群での p53 の発現にはばらつきが大きく、対照に比較して 130%程度発現量が増加している胚もあったが、ほとんど発現が認められない胚も 3 個あった(図 23)。もともと、これらの胚は抽出できた RNA 量も少なかった。8 Gy 照射群の 1 個の胚は対照に比較して発現量が増加していた(図 23)。

照射後 24 時間の p53 遺伝子の発現は、対照に比較して低下していた(図 24)。5 Gy 照射群ではおお

むね対照の 70%程度、8 Gy 照射群では 88%程度であった。ただし、8 Gy 照射群においては対照より発現が増加している胚も認められた(図24)。照射群の ATM 遺伝子の発現は、対照群に比較して、p53 遺伝子の発現よりもさらに低下していた。特に 5 Gy 照射群では対照の 1/2 以下まで平均発現が低下していた。興味あることに、8 Gy 照射群では、5 Gy 照射群に比較して ATM 遺伝子の発現低下の程度が小さく、おおむね対照の 75%程度であった(図24)。

一方で、RAD51 遺伝子は、X線照射により発現量が増加していた。特に 8 Gy 照射群においては、対象の 2倍程度平均発現量が増加していた(図24)。対照の 300%近い発現量を示す胚も認められた(図24、RAD51 泳動レーン:10)。

照射群における p53、ATM および RAD51 遺伝子の平均発現量に関しては、線量依存性を示す傾向にあった。しかしながら、照射線量が高い群において、それぞれの遺伝子の平均発現量が高い傾向を示している(図24)。ただし、それぞれの遺伝子の 5 Gy 照射群における平均発現量と 8 Gy 照射群における平均発現量との間に t 検定で有意差は認められなかった( $p>0.05$ )。

照射群では、p53、ATM あるいは RAD51 遺伝子の発現には、個々の胚の間でばらつきが認められた。例えば、5 Gy 照射群のある胚では、p53 遺伝子の発現が極めて低く、ATM 遺伝子に至ってはほとんど発現が認められなかったが、RAD51 遺伝子はよく発現していた(図24、泳動レーン:5)。逆に、8 Gy 照射群のある胚では、p53 と ATM 遺伝子の発現は認められたにもかかわらず、RAD51 遺伝子の発現はほとんど認められなかった(図24、泳動レーン:9)。RAD51 遺伝子の発現量に関しては、5 Gy 照射群と 8 Gy 照射群の分散に優位差が認められた(F 検定  $p<0.05$ )。

対照群の p53 遺伝子発現のばらつきについて検討した結果、74 時間(照射後 2 時間の対照)と 96 時間解卵群内(照射後 24 時間の対照)の p53 遺伝子発現量のばらつきは、それぞれの群において平均発現量のおおむね $\pm 10\%$ 程度であった。それぞれの群の発現量の分散に対し F 検定した結果、分散に差は認められなかった( $p>0.1$ )。また、t 検定の結果も  $p>0.1$  であり、対照群間の p53 遺伝子発現量に有意差は認められなかった。対照群の ATM と RAD51 遺伝子の発現量のばらつきについては検討していない。

## 考察

本研究の結果、高エネルギーX線照射によって p53 遺伝子と ATM 遺伝子の発現が低下することがわかった。放射線照射により、発生中の個体には種々の異常が生じることはよく知られているが、実際に同様の条件における照射により、ニワトリ胚に全身の発育遅延、小肢、無肢、あるいは小眼球症を中心とした顔面異常が引き起こされる(研究室データ not shown)。これらの異常は、全身、あるいは肢芽や眼球原基の細胞・組織の発生遅延・障害によって引き起こされるわけであるが、異常発生メカニズムと p53 遺伝子あるいは ATM 遺伝子の発現低下との関連が興味深い。

DNA 損傷を与えたときに細胞内に活性化した p53 がすみやかに蓄積してくること、あるいは細胞内で p53 を過剰誘導すると G<sub>1</sub> 期での停止やアポトーシスが増加することから、放射線照射による DNA 損傷を受けたとき、細胞は p53 を介してその分裂を G<sub>1</sub> 期で停止するかあるいは細胞をアポトーシスに誘導すると考えられている<sup>1)</sup>。G<sub>1</sub> チェックポイントのメカニズムに関しては比較的良く解明されている。活性化 p53 は転写活性を有しており、p21<sup>WAF1</sup>を誘導する<sup>21)</sup>。p21<sup>WAF1</sup>は Cdk (cyclin-dependent kinase) inhibitor であり、Cdk の作用を抑制することで G<sub>1</sub> 期での分裂停止を引き起こすと考えられている。実際に、P21<sup>WAF1</sup>が結合した cyclin A/Cdk2 複合体の活性は、P21<sup>WAF1</sup>が結合していない複合体の活性よりもかなり低下していることが示されている<sup>21)</sup>。

p53 によるアポトーシスの誘導メカニズムはより複雑で、p53 の転写活性に依存しないアポトーシス誘導システムも報告されている<sup>1)</sup>。しかし p53 が転写因子として発現を調節している遺伝子は数多く<sup>22)</sup>、最近ではその転写活性が関与していると思われるアポトーシスへの誘導システムが判明しつつある<sup>23)</sup>。たとえば、P53 は Bax 遺伝子を発現させることによりアポトーシスを誘導することが知られている<sup>2)</sup>。より最近では、Oda ら<sup>3)</sup>により p53 が p53AIP1 遺伝子を発現しアポトーシスを誘導する証拠が示された。これらはミトコンドリア膜電位を低下させ、チトクローム C の放出を促進する。その結果活性化されたカスパーゼにより、CAD (caspase activated DNase)が活性化し、DNA を切断することによりアポトーシスにいたると考えられている。

DNA 損傷による細胞内への p53 の蓄積は、p53 遺伝子の発現が誘導されるのではなく、p53 の安定化によることが判明している<sup>1)</sup>。p53 の N 末側には前癌遺伝子産物である Mdm2 が結合している。Mdm2 はユビキチンに親和性があり、そのため p53 は S1 プロテオソーム系において分解される。細胞内で p53 の p21<sup>WAF1</sup> に対する転写因子としての活性化は、セリン残基のリン酸化により引き起こされることが判明していたが、安定化もセリン残基のリン酸化によることが報告されている<sup>5~7)</sup>。つまり、ヒト p53 の場合、Ser15 のリン酸化により p21 に対する転写活性を示すようになるが、それには Ser20 のリン酸化が必要で、これらのセリン残基がリン酸化することにより Mdm2 が p53 から解離することが判明した<sup>5~7)</sup>。マウス p53 の場合、Ser18 がヒト p53 の Ser15 に相当するが、DNA 障害によりやはりこのセリン残基がリン酸化される<sup>24)</sup>。アポトーシス誘導系における転写活性の場合には Ser46 のリン酸化が必要であるとの報告もある<sup>3,4)</sup>。

今回の実験によれば、放射線照射により p53 の発現が低下することから、p53 の蓄積には p53 の安定化が極めて重要であることが示唆される。ただし、単一系の細胞を用いた実験と異なり、個体内には分化程度が大きく異なる細胞が存在するため、照射群の個体内で本当に p53 が蓄積しているかどうかタンパクレベルでの確認が必要である。

一方、p53 の Ser15 と Ser20 のリン酸化は ATM によって引き起こされることが判明している<sup>9,10,25)</sup>。ATM 遺伝子の変異は AT (毛細血管拡張性小脳失調症)を引き起こす。AT は常染色体劣勢遺伝病で、神経細胞変性、免疫不全、悪性リンパ腫等の易発症性、早老、放射線高感受性を特徴とする。そのため、ATM が何らかの形で DNA 修復システムに関与していることが指摘されていた。ATM が欠損した細胞系では p53 の Ser15 と Ser20 のリン酸化が起こらないので、ATM は直接 p53 のリン酸化酵素として機能していると考えられていた。ところが最近、ATM は Chk2 の Thr68 をリン酸化して活性化し<sup>11,14)</sup>、活性化した Chk2 により p53 の Ser20 がリン酸化されることが判明した<sup>26)</sup>。Chk2 は Cdc2 の Ser216 をリン酸化することによりその活性を阻害し、その結果 Cdc2 の脱リン酸化が起こらず、細胞を G<sub>2</sub> 期で停止させることが知られていた<sup>27)</sup>。さらに最近、ATM は Mdm2 を直接リン酸化するという報告が Maya らによってなされた<sup>28)</sup>。その報告によると、Mdm2 の C 末端側にある Ser395 が DNA 障害依存性に活性化してくる ATM によってリン酸化されるらしい。彼らは、Ser395 がリン酸化された Mdm2 は p53 を核から細胞質へ輸送する能力が低減しており、その結果 p53 の分解が抑制されるのではないかと仮説している。このように、p53 を介する DNA 修復システムのかかなり上流にある遺伝子が ATM であるが、それ自身の発現メカニズムについてはよくわかっていない。

今回の実験では、放射線照射により ATM 遺伝子の発現が大きく低下した。これは我々の予想に反した結果であった。ATM 量が低下すれば、p53 の安定化が促進されないため、p53 の蓄積が起こらず、分裂停止あるいはアポトーシスという細胞の防御システムが機能しないことになる。このことから、放射線照射により ATM が増加するのではなく、未知のメカニズムによりリン酸化酵素として活性化するのではないかと考えられる。ATM 遺伝子はサイズが比較的大きいため<sup>12,13)</sup>、放射線による損傷を受けやすいかもし

れない。細胞修復の要となる因子が変異を起こすことは細胞環境にとっては好ましくないであろう。つまり、修復に関して細胞は、放射線照射による傷害を受けるまでに転写・翻訳を完了していた因子を有効利用するようなメカニズムを有しているのかもしれない。さらに大胆に仮説すれば、放射線照射後これらの遺伝子に対する転写活性を抑制するようなメカニズムの存在も視野に入れる必要がある。ただし、放射線照射により胚内の細胞が回復しがたいほどの障害を受けたという可能性も残されるため、照射直後、あるいは照射後24時間以降におけるこれらの遺伝子の発現状況も検討する必要がある。さらに、5 Gy照射群よりも8 Gy照射群のほうがATMの発現量が高いという結果は、上記したような仮説に矛盾しており、今後の検討が必要である。照射個体内のATM量がどのように推移するかということも今後の検討課題である。

一方で、今回の実験から、放射線照射によりRAD51遺伝子の発現量が増加することがわかった。放射線照射によりDNAはその2重らせん鎖の切断という重篤な障害をこうむり得る。このようなDNA2重らせん鎖の切断を修復する酵素の1つがRAD51である<sup>15,17,29</sup>。

RAD51は、大腸菌で相同組換えを行う修復酵素として知られているRecA遺伝子の相同遺伝子として単離された<sup>16</sup>。多くの種ではRAD51遺伝子と相同性の高い遺伝子が存在するため、この遺伝子は進化的に保持されているらしい<sup>15,17</sup>。したがって、RAD51遺伝子はニワトリ細胞にも存在することが確認されている<sup>30</sup>。この酵素はDNA上でらせん状フィラメントを構成しており、DNAの相同組換えはそのらせん状フィラメントを介して行われる<sup>16,31</sup>。つまり、RAD51は損傷を受けてむき出しになったDNAの1本鎖を認識してフィラメントを形成し、活性化する。ただし、RAD51の相同組換えの分子メカニズムについては明らかではない。しかしながら、RAD51遺伝子の欠損は染色体の断裂を引き起こし、致死性である<sup>32</sup>ことから、RAD51が非常に重要な修復酵素であることは間違いない。

われわれの実験結果と異なり、哺乳動物細胞では、電離放射線によりRAD51の転写は誘導されないという報告がある<sup>20</sup>。つまり、放射線により誘導されるATMやc-AblによりRAD51がリン酸化され、その結果RAD51はRAD52と結合してその複合体の蓄積が起こるらしい<sup>20,33</sup>。実際、c-AblはRAD51のThy54をリン酸化する<sup>34</sup>。しかし、c-AblによるRAD51のリン酸化はRAD51のDNAへの結合を阻害するらしく<sup>34</sup>、RAD51の活性抑制に働いていると予想される。一方最近、ATM<sup>-/-</sup>細胞においては、ATM<sup>+/+</sup>細胞以上に放射線照射によるRAD51のフォーカスの形成が認められるという報告がなされた<sup>35</sup>。彼らの実験によると、放射線を照射した場合、ATM<sup>+/+</sup>細胞ではより短時間にRAD51が蓄積してくるが、照射後時間がたてば、ATM<sup>-/-</sup>細胞のRAD51蓄積量のほうが大きくなる。この報告は、放射線照射によりATMの発現が低下した場合、RAD51の発現が上昇するという我々の実験結果を部分的に補佐している。つまり、RAD51のリン酸化のみならず、その転写誘導に何らかの形でATMが関与している可能性が示されたわけである。彼らは、ATM<sup>-/-</sup>細胞において照射後RAD51がより蓄積するのは、G<sub>1</sub>停止が起これないために修復されていないDNAが蓄積してくる結果ではないかと推察している。そうであるならば、ATMの発現低下の程度が高ければ、RAD51の発現誘導も上昇するはずであり、この点については我々の実験結果と一致しない。また、腫瘍細胞では、RAD51遺伝子の転写が活性化しており、RAD51が細胞内に正常細胞の2~7倍蓄積しているという結果も報告されている<sup>36</sup>。これらの細胞内でのRAD51は活性が低下しているらしいが、この報告では、RAD51蓄積の結果、腫瘍細胞は細胞死を抑制されるのではないかと仮説している。我々の実験結果とこれらの報告からは、放射線照射によるRAD51の転写誘導を引き起こすメカニズムの存在が予想される。このようなメカニズムの解明が今後の検討課題であると思われる。

## 文献

1. Abraham, R. T. (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Develop.* **15**: 2177-2196.
2. Chong, M. J., M. R. Murray, et al. (2000) Atm and Bax cooperate in ionizing radiation-induced apoptosis in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 889-894.
3. Oda, K., H. Arakawa, et al. (2000). *p53AIP1*, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* **102**: 849-862.
4. Zhu, J., W. Zhou, et al. (1998) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**: 13031-13036.
5. Chehab, N. H., A. Malikzay, et al. (1999) Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **23**: 13777-13782.
6. Shieh, S.-Y., Y. Taya, et al. (1999) DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *EMBO J.* **18**: 1815-1823.
7. Unger, T., T. Juven-Gershon, et al. (1999) Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J.* **18**: 1805-1814.
8. Ullrich, S. J., K. Sakaguchi, et al. (1993) Phosphorylation at Ser-15 and Ser-392 in mutant p53 molecules from human tumors is altered compared to wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5954-5958.
9. Banin, S., L. Moyal, et al. (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**: 1674-1677.
10. Nakagawa, K., Y. Yata, et al. (1999) Requirement of ATM in phosphorylation of the human p53 protein at serine 15 following DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2828-2834.
11. Matsuoka, S., G. Rotman, et al. (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 10389-10384.
12. Chen, G. and Y.-H. P. Lee (1996) The product of the *ATM* gene is a 370-kDa nuclear phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* **271**: 33693-33697.
13. Savitsky, K., M. Platzer, et al. (1997) Ataxia-telangiectasia: structural diversity of untranslated sequences suggests complex post-transcriptional regulation of *ATM* gene expression. *Nucl. Acids Res.* **25**: 1678-1684.
14. Lee, S. A., A. Dritschilo, et al. (2001) Role of ATM in oxidative stress-mediated c-Jun phosphorylation in response to ionizing and CdCl<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* **276**: 11783-11790.
15. Cartwright, R., A. M. Dunn, et al. (1998) Isolation of novel human and mouse genes of the *recA/RAD51* recombination-repair gene family. *Nucl. Acids Res.* **26**: 1653-1659.
16. Benson, F. E., A. Stasiak, et al. (1994) Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *EMBO J.* **13**: 5764-5771.
17. Gupta, R. C., L. R. Bazemore, et al. (1997) Activities of human recombination protein Rad51. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 463-468.
18. Sturzbecher, H. W., B. Donzelmann, et al. (1996) p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J.* **15**: 1992-2002.
19. Buchhop, S., M. K. Gibson, et al. (1997) Interaction of p53 with the human Rad51 protein. *Nucl. Acids*

- Res. **25**: 3868-3874.
20. Chen, G., S.-S. F. Yuan, et al. (1999) Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J. Biol. Chem.* **274**: 12748-12752.
  21. Cai, K. and B. D. Dynlacht (1998) Activity and nature of p21<sup>WAF1</sup> complexes during the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12254-12259.
  22. Yu, J., L. Zhang, et al. (1999) Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14517-14522.
  23. Chao, C., S. Saito, et al. (2000a) p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *EMBO J.* **19**: 4967-4975.
  24. Chao, C., S. Saito, et al. (2000b) Phosphorylation of murine p53 at Ser-18 regulates the p53 responses to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 11936-11941.
  25. Canman, C. E., D.-S. Lim, et al. (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **281**: 1677-1679.
  26. Shieh, S.-Y., J. Ahn, et al. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes & Develop.* **14**: 289-300.
  27. Chehab, N. H., A. Malikzay et al. (2000) Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G<sub>1</sub> by stabilizing p53. *Genes & Develop.* **14**: 278-288.
  28. Maya, R., M. Balass, et al. (2001) ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 in serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes & Develop.* **15**: 1067-1077.
  29. Kohn, K. W. (1999) Molecular interaction map of the mammalian cell cycle control and DNA repair systems. *Mol. Biol. Cell* **10**: 2703-2734.
  30. Bezzubova, O., A. Shinohara, et al. (1993) A chicken RAD51 homologue is expressed at high levels in lymphoid and reproductive organs. *Nucl. Acids Res.* **21**: 1577-1580.
  31. Yu, X., S. A. Jacobs, et al. (2001) Domain structure and dynamics in the helical filaments formed by RecA and Rad51 on DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 8419-8424.
  32. Sonoda, E., M. S. Sasaki, et al. (1998) Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J.* **17**: 598-608.
  33. Kharbanda, S., Z.-M. Yuan, et al. (1998) Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene* **17**: 3309-3318.
  34. Yuan, Z.-M., Y. Huang, et al. (1998) Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **273**: 3799-3802.
  35. Morrison, C., E. Sonoda, et al. (2000) The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *EMBO J.* **19**: 463-471.
  36. Raderschall, E., K. Stout, et al. (2002) Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells. *Cancer Res.* **62**: 219-225.

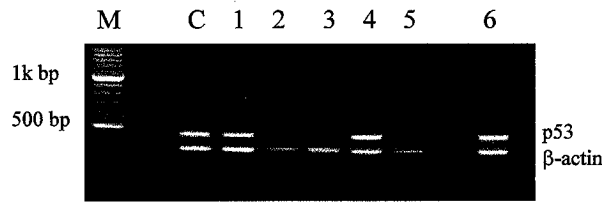


図23

照射後2時間のp53遺伝子の発現。5 Gy照射群のp53遺伝子の発現にはばらつきがみられた。対照に比較して発現が増加している胚もあったが(レーン:4)、3個の胚ではほとんど発現が認められない(レーン:2, 3, 5)。8 Gy照射群では対照に比較して発現量が増加していた(レーン:6)。M: Marker, C: 対照、1~5:5 Gy照射群、6: 8 Gy照射群。対照に関しては、対照群のRNAを混合してPCRをおこなっているため、平均的発現量を示している。

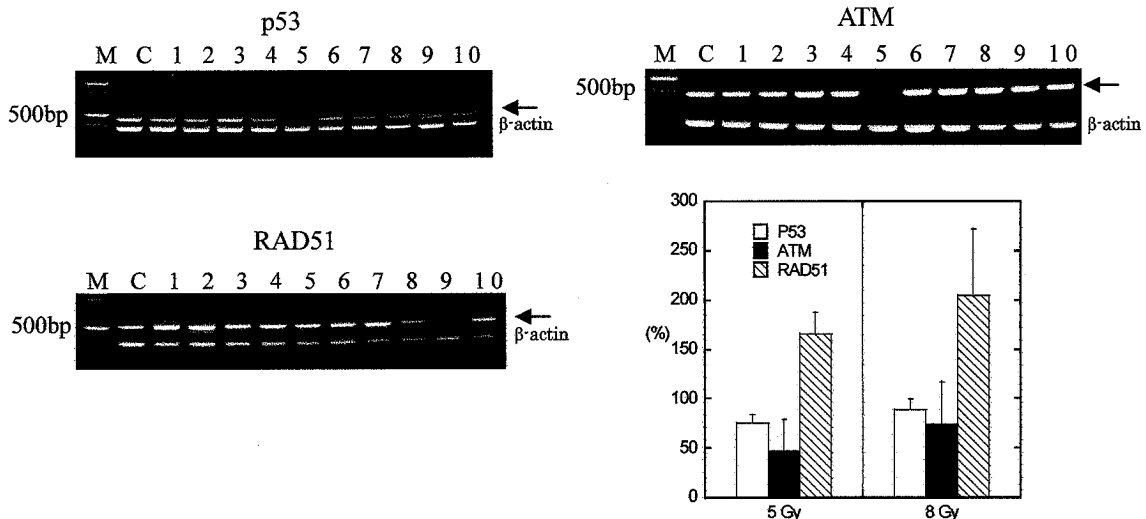


図24

X線照射後24時間のp53、ATM、RAD51遺伝子の発現。X線照射によりp53、ATM遺伝子の平均発現量は低下している。特にATM遺伝子の平均発現量は著しく低下している。一方で、RAD51遺伝子の平均発現量はX線照射により上昇している。特に8 Gy照射群では対象の2倍発現の増加が認められた。電気泳動像からは、8 Gy照射群のRAD51の発現は低いように思われるが、 $\beta$ -actin発現量で補正した結果、グラフに示す発現量が得られた。それぞれの遺伝子の発現低下あるいは発現上昇には線量依存性が認められるが、8 Gy照射群の発現量のほうが5 Gy照射群の発現量より高いのが特徴的である。ただし、5 Gy照射群と8 Gy照射群でのそれぞれの遺伝子の発現量の間には5%有意水準で有意差は認められなかった。PCR産物を見る限り、照射群では胚により発現量にばらつきが認められる。例えば、5 Gy照射群のある胚では(レーン:5)、p53遺伝子は発現量が極めて低く、ATM遺伝子の発現はほとんど認められないが、RAD51遺伝子はよく発現している。一方、8 Gy照射群のある胚では(レーン:9)、RAD51遺伝子は発現していないが、p53とATM遺伝子の発現は認められる。グラフは、対象の発現量を100%としてそれぞれの遺伝子の発現量の割合を示している。電気泳動のレーン:M: マーカー、C: 対象、1~5:5 Gy照射群、6~10:8 Gy照射群。矢印はそれぞれの遺伝子のPCR産物を示す。