

学 位 論 文 題 名

DNA中の8-オキシグアニンの酸化が誘起する周辺残基の損傷に関する研究

学位論文内容の要旨

8-オキシグアニン(以下オキシGと略す。)は発癌をはじめ種々の人の疾患の原因と考えられているDNAの塩基損傷である。また、近年この塩基は通常のDNA塩基に比べて酸化を受け易い性質を持つことが見い出され、この性質は現在では細胞内のDNA中に含まれるオキシGの電気化学的な検出に利用されている。本研究はDNA中のオキシGの酸化に対する反応性を調べることを当初の目的として行われた。その結果、DNA中のオキシGのKMnO₄酸化がその周辺残基の損傷を誘起するという新規なDNA損傷反応を見出し、反応の詳細および反応機構について研究した。また、このような損傷反応の生体類似の酸化系(ヒドロキシルラジカル生成系)での可能性についても検討した。

反応に用いる酸化剤としてはKMnO₄を用いた。この酸化剤は一本鎖DNA中のチミン塩基を選択的に修飾し、続く熱アルカリ処理によって修飾位置で鎖の切断が起こることが知られており、この一連の反応はDNAの塩基配列分析などに利用されている。

<一本鎖DNAの損傷の鎖の切断分析による検出>

初めにオキシGを含む一本鎖DNAとしてヒトc-Ha-ras遺伝子断片のコードン12にオキシGを含むオリゴヌクレオチド基質の5'-末端を³²Pで標識したものについてpH7.0のリン酸緩衝液中KMnO₄酸化を行った後、鎖の損傷を90°C、30分の熱アルカリ(ピペリジン)処理または熱処理のみにより生じる鎖の切断としてゲル電気泳動分析により検出した。その結果、熱処理のみのサンプルについては鎖内のどの残基においても鎖の切断は観察されなかったが、熱ピペリジン処理サンプルについては基質中のオキシG残基において高度の鎖の切断が観察され、オキシGはKMnO₄に対して高い反応性を持ち、熱アルカリに不安定な損傷を与えることがわかった。さらに意外なことにオキシGの5'側隣接位にあるグアニン(G)残基においても高頻度で熱アルカリに不安定な損傷が誘起されていた。このような損傷は、オキシGのかわりにGを含むコントロール鎖においては全く観察されなかった。さらに上記の基質においてオキシGの5'側隣接位の塩基をアデニン(A)、チミン(T)、シトシン(C)に置換した基質について同様の実験を行ったところ、オキシGの酸化は隣接位のT、C、さらに遠隔のG残基の損傷を誘起することがわかった。得られた隣接残基における鎖の切断率から導いた塩基反応性の序列はG>T>Cであった。A残基では鎖の切断は全く観察されなかった。また、基質の3'末端標識体を用いた実験より上記の様な鎖の切断はオキシGの3'側にある残基においても起こることなどが明らかになった。

<一本鎖DNA損傷のヌクレオシド組成分析による検出>

鎖の損傷においては熱アルカリ処理により鎖の切断をもたらさないタイプの損傷も有り得るため、酸化後のオキシG含有DNAを酵素的にヌクレオシドに分解し、逆相HPLC分析によりその組成を未反応の鎖のものと比較した。その結果、酸化後のオリゴマーではオキシGに隣接し

ていた2'-デオキシアデノシン (dA) がかなり (70%) 減少していることがわかった。また、このようなヌクレオシドの減少はコントロール鎖を用いた実験では観察されなかった。これらのことよりオリゴマー中のA残基ではオキソGの酸化により熱アルカリ処理により鎖の切断を起こさないタイプの損傷が起こることがわかった。

＜一本鎖DNAの損傷様式＞

通常のDNAオリゴマーは反応系に添加した大過剰の8-オキソG含有DNAや8-オキソ2'-デオキシグアノシンの酸化によって損傷が誘起されなかったこと、また上記の周辺残基損傷はヒドロキシルラジカルや一重項酸素の捕捉剤により阻害されなかったことから周辺残基の損傷に活性酸素種の関与はなく、その反応様式は分子内反応であることがわかった。

＜一本鎖DNA損傷の速度論＞

オキソGの隣接位にG, A, T, Cを含むオリゴマーについてKMnO₄酸化の擬一次反応速度定数を電気泳動の結果をもとに算出した。その結果、基質の酸化速度の大きさの序列はオキソGの隣接位にある塩基の電子供与能の序列 (G > A > T > C) と一致し、オキソG含有DNAの反応性はオキソG隣接位の電子供与能と密接に関連していることがわかった。

＜アペーシック残基を含むDNAの損傷＞

DNA中のオキソGの周辺残基をアペーシックサイト (塩基欠失部位) アナログであるテトラヒドロフラン残基 (F) やヘキサエチレングリコールリンカー (Hex) で置換した基質を用いて酸化後の鎖の損傷をPAGE分析した。その結果、Fで置換した部位での損傷はほとんど起こらなかったがその代わりに置換部位の周辺残基での損傷が新たに誘起された。また、Hexのような長いリンカーを介してオキソG残基と結合したG残基においても損傷が誘起されたが、損傷率はリンカーの鎖長の伸長にともなって減少した。また、この様なG残基での損傷は反応系内へのヌクレオシドの添加によって阻害を受け、その阻害能の序列はdG > dA > dCであった。これらの結果はアペーシック残基で連結された塩基残基間でも上述したメカニズムによる塩基損傷が誘起されることを強く示唆している。

＜オキソG含有二本鎖DNAの損傷＞

オキソG含有DNAとその相補鎖の間で形成させた二本鎖の酸化について鎖の切断分析、ヌクレオシド組成分析を行ったところオキソG含有鎖だけではなく相補鎖においても塩基損傷が起こることがわかった。そのうち最も損傷を受けやすいものはやはりG塩基であった。

今回実験を行った全ての系で塩基損傷の起こりやすさの序列は各塩基の電子供与能の序列と一致した。このことより一本鎖および二本鎖DNAにおける周辺塩基の損傷はレッドックス機構によって誘起されることがわかった。

＜オキソG含有DNAのヒドロキシルラジカルとの反応＞

上記のようなオキソGの酸化による周辺残基の損傷が生体内に存在可能な酸化系でも起こり得るかを調べるためにオキソG含有DNAの酸化をヒドロキシルラジカルの生成系 (電離放射線やUdenfriend系) を用いて行い、同様に鎖の損傷をゲル電気泳動分析により調べた。その結果、Udenfriend系におけるランダムな塩基損傷とは対照的に、電離放射線照射で生成したヒドロキシルラジカルはDNA中のオキソGを選択的に酸化すること、さらにこの酸化は隣接位の塩基、特にGの損傷を増幅するという大変興味深い結果が得られた。このような損傷が生体内で起こればオキソGおよび隣接塩基の損傷体は発癌をはじめ種々の生体内の有害な現象に関与する可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	大 塚	栄 子
副 査	助教授	井 上	英 夫
副 査	教 授	松 田	彰
副 査	助教授	周 東	智

学 位 論 文 題 名

DNA中の8-オキシグアニンの酸化が誘起する周辺残基の損傷に関する研究

DNAが酸化損傷を受けて生成する8-オキシグアニン（オキシソG）残基は突然変異、発癌、老化などの要因として考えられている。

申請者はDNA中のオキシソGの化学反応性について研究を行ってきたが、DNA中のオキシソGのKMnO₄酸化がその周辺残基の損傷を誘起するという新規なDNA損傷反応を見いだした。また、生体類似の酸化系（ヒドロキシラジカル生成系）での反応についても検討し、X線照射によってオキシソGに隣接した塩基が損傷を受けやすいという新しい知見を得た。

1) 一本鎖DNAの損傷の鎖の切断分析による検出

ヒトc-Ha-ras遺伝子断片のコドン12にオキシソGを含む一本鎖DNA 12mer（5'-末端³²P標識体）を基質に用い、pH 7.0のリン酸緩衝液中KMnO₄酸化を行った後、鎖の損傷を90℃、30分の熱アルカリ（ピペリジン）処理により生じる鎖の切断としてPAGE分析により検出した。その結果、基質中のオキシソG残基において高度の鎖の切断が観察され、オキシソGはKMnO₄に対して高い反応性を持ち、熱アルカリに不安定な損傷を与えることがわかった。また、オキシソGの5'側隣接位に

あるグアニン (G) 残基においても高頻度で損傷が起こることが明かとなった。このような損傷は、オキソGのかわりにGを含むコントロール鎖においては全く観察されなかった。オキソGの5' 側隣接塩基をアデニン (A)、チミン (T) あるいはシトシン (C) に置換した基質について同様の実験を行ったところ、オキソGの酸化は隣接位のT, C、さらに遠隔のG残基の損傷を誘起することがわかった。得られた隣接残基における鎖の切断率から導いた塩基反応性の序列はG > T > Cであった。A残基では鎖の切断は全く観察されなかった。

2) 一本鎖DNA損傷のヌクレオシド組成分析による検出

熱アルカリ処理により鎖の切断をもたらさないタイプの損傷も有り得るため、酸化後のオキソG含有DNAを酵素的にヌクレオシドに分解し、逆相HPLC分析によりその組成を未反応の鎖のものと比較した。その結果、酸化後の基質ではオキソGに隣接していた2' -デオキシアデノシン (dA) が相当減少していることがわかった。このように、DNA中のA残基ではオキソGの酸化により熱アルカリ処理により鎖の切断を起こさないタイプの損傷が起こることが判明した。

3) 一本鎖DNAの損傷様式と損傷の速度論

通常のDNAオリゴマーは共存させた大過剰の8-オキソG含有DNAや8-オキソ-2' -デオキシグアノシンの酸化によって損傷が誘起されなかったこと、また上記の周辺残基損傷はヒドロキシルラジカルや一重項酸素の捕捉剤により阻害されなかったことから、周辺残基の損傷に活性酸素種の関与はなく、その反応様式は分子内反応であることが示された。

オキソGの隣接位にG, A, T, Cを含むオリゴマーについてKMnO₄酸化の擬一次反応速度定数をPAGE分析により求めた。その結果、基質の酸化速度の大きさの序列はオキソGの隣接位にある塩基の電子供与能の序列 (G > A > T > C) と一致し、オキソG含有DNAの反応性はオキソG隣接位の電子供与能と密接

に関連していることを明かにした。

4) アベーシック残基を含むDNAの損傷

オキシGの周辺残基をアベーシックサイトアナログであるテトラヒドロフラン残基 (F) やヘキサエチレングリコールリンカー (Hex) で置換した基質を用いて酸化後の鎖の損傷をPAGE分析した。その結果、Fで置換した部位での損傷はほとんど起こらなかったが、その代わりに置換部位の周辺残基での損傷が新たに誘起された。また、Hexのような長いリンカーを介してオキシG残基と結合したG残基においても損傷が誘起されたが、損傷率はリンカーの鎖長の伸長にともなって減少した。また、この様なG残基での損傷は反応系内へのヌクレオシドの添加によって阻害を受け、その阻害能の序列は $dG > dA > dC$ であった。

5) オキシG含有二本鎖DNAの損傷

オキシG含有鎖を含むDNA二本鎖の $KMnO_4$ 酸化を検討した結果、オキシG含有鎖だけではなく相補鎖においても塩基損傷が起こることが明かとなり、塩基で最も損傷を受けやすいものはやはりグアニンであった。

3)、4)、5) で述べた結果から、オキシG残基の周辺塩基の損傷はレドックス機構によって誘起されることが結論された。

6) オキシG含有DNAのヒドロキシルラジカルとの反応

オキシGの酸化による周辺残基の損傷が生体内に存在可能な酸化系でも起こり得るかを調べるために、オキシG含有DNAの酸化をヒドロキシルラジカルの生成系(電離放射線、Udenfriend系)を用いて行った結果、Udenfriend系におけるランダムな塩基損傷とは対照的に、電離放射線で生成したヒドロキシルラジカルはDNA中のオキシGを選択的に酸化すること、さらにこの酸化は隣接位の塩基、特にGの損傷を増幅するということが明らかとなった。

以上の研究は博士(薬学)の学位を受けるのに十分値するものと認めた。