

酸化損傷プリンヌクレオチドによる変異誘発と その分子機構

学位論文内容の要旨

活性酸素 (ROS)、紫外線、X 線などは、遺伝情報の変化を引きこす変異原として癌などの様々な疾病や老化などを引き起こす要因となる。中でも ROS は内因的に発生して生体内で主に変異を引き起こしていると考えられている。このメカニズムとして、DNA 残基が直接酸化されて生じる損傷に加えて、DNA 前駆体の損傷、すなわち損傷ヌクレオチドの取り込みによる変異誘発経路の重要性が近年の研究により示唆されている。中でも dGTP、dATP の酸化により主に生じる 8-hydroxy-dGTP (8-OH-dGTP) および 2-hydroxy-dATP (2-OH-dATP) という 2 種の酸化損傷プリンヌクレオチドは、特異的な分解酵素によって除去されていること¹や、Y ファミリーと総称される突然変異の誘発に関わる DNA ポリメラーゼのいくつかによって高頻度に誤った塩基に対して取り込まれることが報告される²など、変異の誘発に深く関与している可能性が示されてきている。

このような背景から、本研究では 2-OH-dATP および 8-OH-dGTP の哺乳動物細胞における変異誘発能について明らかにし、生体における変異誘発に対する寄与についての知見を得るため、HeLa 細胞核抽出液を用いた *in vitro* の複製反応、大腸菌の Y ファミリーポリメラーゼ欠損株、さらに siRNA により種々の遺伝子をノックダウンした培養細胞の系を用いて 8-OH-dGTP、2-OH-dATP による変異誘発と、そのメカニズムについての解析を行なった。

HeLa 細胞核抽出液に 100 μ M dNTPs、SV40 large T antigen、鋳型 DNA として SV40 ori および標的遺伝子 *supF* を有するプラスミド pSVKam189 を添加し、2-OH-dATP 存在下で複製反応を行った。反応後、indicator 大腸菌 KS40/pOF105 株をトランスフォームして変異体率を測定した。2-OH-dATP の添加により変異体率が濃度依存的に上昇し、400 μ M 2-OH-dATP 存在下では 4 種の dNTPs のみで複製させたコントロールと比較して約 2 倍の値を示した。このことは、ヒトを含めた哺乳動物細胞中において 2-OH-dATP が内在性変異誘発物質として作用する可能性を示している。シーケンシングによる解析の結果、2-OH-dATP の添加によって引き起こされた塩基置換変異を主に G:C→A:T 変異であった。大腸菌において G:C→T:A 変異が特異的に誘発されることは異なり、哺乳動物細胞の複製系においては 2-OH-dATP は主として 鋳型 DNA 中の C に対して取り込まれ、続く複製の際に dTTP が取り込まれたと推定される。

大腸菌においては、Pol IV および Pol V が Y-family DNA ポリメラーゼとして同定されて

いる。そこでこれらのポリメラーゼの損傷プリンヌクレオチドによる変異誘発に与える影響について調べるため、野生型大腸菌株、Pol IV 欠損株、Pol V 欠損株に対して 2-OH-dATP、8-OH-dGTP を導入し、染色体 *rpoB* 遺伝子変異体率を測定したところ、添加した濃度依存的に変異体率の上昇が観察された。この変異体率の上昇量を各株で比較すると、2-OH-dATP 添加時では、Pol IV 欠損株では変異体率の上昇が抑制され、逆に Pol V の欠損により変異体率の上昇が促進された。一方、8-OH-dGTP の場合には Pol IV の欠損による影響はみられなかったものの、Pol V の欠損により変異体率の上昇が促進されるという結果が得られた。さらにポリメラーゼ活性を欠損した変異体を用いた研究から、Pol IV の 2-OH-dATP による変異誘発の促進作用はポリメラーゼ活性に依存すること、また Pol V の場合にはポリメラーゼ活性を欠損した変異体でも 2-OH-dATP や 8-OH-dGTP による変異誘発を抑制することが示された。

続いて培養細胞における変異誘発について調べた。COS-7 細胞に SV40 ori および標的遺伝子 *supF* を有するプラスミドを 8-OH-dGTP と共に Lipofectamine を用いて導入した。複製されたプラスミドを回収して *supF* 変異体率の測定および変異スペクトルの解析を行った。8-OH-dGTP、もしくは同量の dGTP を導入した場合において変異体率に有意な差はみられなかった。しかしながら個々の誘発変異について比較すると、A:T→C:G 変異は dGTP 導入では検出されなかったのに対し、8-OH-dGTP 導入の場合は高頻度に観察された。また細胞から抽出した DNA 中の 8-OH-Gua 量を ECD-HPLC 法により定量したところ、8-OH-dGTP を導入した細胞では dGTP 処理群と比較して 8-OH-Gua 量が増加していた。これらの結果から、三リン酸体の損傷ヌクレオチドである 8-OH-dGTP の直接導入により、COS-7 細胞において 8-OH-dGTP が DNA 中に取り込まれ、A:T→C:G 変異が高頻度に誘発されることが示された。

さらに siRNA による遺伝子のノックダウンを行なうため、ヒト腎臓由来の 293T 細胞を用い、ヌクレオチドの導入方法もプラスミドとの共導入から、ヌクレオチドを単独で導入可能な浸透圧による方法を確立した。はじめに浸透圧法により 8-OH-dGTP を導入し、変異誘発を調べた。未処理のコントロールと比較して、2 mM 8-OH-dGTP で 15 分処理した細胞では変異体率が 4-5 倍上昇した。次に siRNA による各遺伝子のノックダウンを調べた。MTH1、pol η、pol ι、pol κ、MSH2 についてウエスタンブロッティング法により、また Rev1、Rev3 (pol ζ) について RT-PCR 法により、それぞれタンパク質、mRNA 量の減少を確認した。これらの siRNA をプラスミドと共導入し、24 hr 後に浸透圧法により 8-OH-dGTP を導入した。48 hr 後に回収して *supF* 変異体率を比較したところ、Pol η、Rev1 においてコントロールよりも変異の誘発が抑制された。精製 Pol η は 8-OH-dGTP 誤って取り込みやすい²ことから、細胞内での 8-OH-dGTP の取り込みに関与していることが推定される。また Rev1 は種々の Y ファミリーポリメラーゼと結合することが知られており、Pol η を複製 foci に局在させることでアダプター分子として変異誘発を促進している可能性が考えられる。

本研究により、2-OH-dATP の大腸菌における変異誘発には Pol IV が促進的に、Pol V は抑制的に関与していること、また哺乳動物細胞においては G:C→A:T 変異が誘発される可能性が示された。一方 8-OH-dGTP の変異誘発についても、大腸菌 Pol V は抑制的に働くこと、また哺乳動物細胞では pol η および Rev1 が変異の誘発に関与していることを明らかとなった。

Refs. 1) Fujikawa et al.(1999)*JBC* 274,18201-18205. 2) Shimizu et al.(2003)*EMBO Rep.* 4, 269-273.

学位論文審査の要旨

主 査	助教授	紙 谷 浩 之
副 査	教 授	原 島 秀 吉
副 査	教 授	有 賀 寛 芳
副 査	助教授	松 本 健 一

学 位 論 文 題 名

酸化損傷プリンヌクレオチドによる変異誘発と その分子機構

佐藤和哉君は、酸化損傷プリンヌクレオチドである 2-hydroxy-dATP (2-OH-dATP) 及び 8-hydroxy-dGTP (8-OH-dGTP) の変異誘発能に関する研究を行った。これらのヌクレオチドは、生体内で内因的に発生する活性酸素によりヌクレオチドプール中で生ずると考えられる化合物である。佐藤君は、細胞抽出液を用いる試験管内複製反応や生細胞を用いて様々な研究を行った。

まず、佐藤君は、ヒト HeLa 細胞抽出液と SV40 large T 抗原を用いる試験管内複製反応の系を用いて、2-OH-dATP の変異誘発能を調べた。鋳型 DNA として、SV40 ori 及び標的遺伝子 *supF* を有するプラスミドを添加し、2-OH-dATP 存在下で複製反応を行った。反応後、複製されたプラスミドを大腸菌 KS40/pOF105 株に導入して変異体率を測定したところ、2-OH-dATP の添加により変異体率が濃度依存的に上昇すること、及び、2-OH-dATP の添加によって塩基置換変異（主に G:C→A:T 変異）が誘発されることを見出した。この結果は、ヒトを含めた哺乳動物細胞中において 2-OH-dATP が内在性変異誘発物質として作用する可能性を示している。

次に佐藤君は、大腸菌の Y ファミリー DNA ポリメラーゼである DNA ポリメラーゼ (Pol) IV 及び V が 2-OH-dATP・8-OH-dGTP の誘発する変異に関連しているかを調べた。野生型大腸菌株、Pol IV 欠損株、Pol V 欠損株に対して 2-OH-dATP・8-OH-dGTP を導入し、染色体 *rpoB* 遺伝子変異体率を測定したところ、添加濃度依存的な変異体

率の上昇を観察した。この変異体率の上昇量を各株で比較すると、Pol IV 欠損株では 2-OH-dATP 添加時の変異体率の上昇が抑制され、逆に Pol V の欠損により変異体率の上昇が促進された。一方、8-OH-dGTP の場合には Pol IV の欠損による影響はみられなかったものの、Pol V の欠損により変異体率の上昇が促進されるという結果が得られた。さらにポリメラーゼ活性を欠損した変異体を用いた研究から、Pol IV の 2-OH-dATP による変異誘発の促進作用はポリメラーゼ活性に依存すること、また Pol V の場合にはポリメラーゼ活性を欠損した変異体でも 2-OH-dATP や 8-OH-dGTP による変異誘発を抑制することを明らかとした。

最後に佐藤君は、2-OH-dATP・8-OH-dGTP の哺乳動物細胞における変異誘発能について調べた。カチオニック脂質を用いてアフリカミドリザル COS-7 細胞に SV40 ori 及び標的遺伝子 *supF* を有するプラスミドと 2-OH-dATP・8-OH-dGTP を共導入し、複製されたプラスミドを回収して *supF* 変異体率及び変異スペクトルの解析を行った。その結果、8-OH-dGTP 導入により A:T→C:G 変異が高頻度に誘発されることを見出した。一方、2-OH-dATP 導入の影響は観察されなかった。さらに siRNA による遺伝子ノックダウンのため、ヒト 293T 細胞を用いる実験を行った。その際に、ヌクレオチドの導入方法を浸透圧法に変更した。8-OH-dGTP を導入し変異誘発を調べたところ、コントロールと比較して変異体率が 4-5 倍上昇した。次に siRNA による各遺伝子のノックダウンの影響を調べた。ウエスタンブロッティング法により MTH1・pol η ・pol ι ・pol κ ・MSH2 の蛋白質量の減少を、RT-PCR 法により Rev1・Rev3 (pol ζ) の mRNA 量の減少を確認した。これらの siRNA をプラスミドと共導入した後に 8-OH-dGTP を浸透圧法により導入した。プラスミドを回収して *supF* 変異体率を比較したところ、Pol η ・Rev1 においてコントロールよりも変異の誘発が抑制されていた。精製 Pol η は 8-OH-dGTP を誤って取り込みやすいことが示されており、細胞内でも 8-OH-dGTP の取り込みに関与していることが推定される。また Rev1 は種々の Y ファミリー DNA ポリメラーゼと結合することが知られており、Pol η を複製 foci に局在させることで変異誘発を促進している可能性が考えられる。

以上、佐藤和哉君は、酸化損傷プリンヌクレオチドによる変異誘発とその分子機構を明らかにした。佐藤君の研究を基盤として、さらなる研究の展開が可能であると思われる。いずれの審査委員も、博士の学位の授与に十分な研究を行ったものと判断した。