

博士(薬学) 堀 美香

学位論文題名

酸化損傷ヌクレオチド誘発変異に対する
DNA修復関連蛋白質の影響

学位論文内容の要旨

[序論]

生物は、好気的代謝の副産物である活性酸素に常に暴露され続けている。活性酸素以外にもX線、紫外線などの環境変異原によりDNAに化学的修飾が生じ、損傷DNAが生成される。損傷DNAの蓄積は、変異の誘発や発癌、さらには神経変性や老化の一因と考えられている。また、これらの変異原はDNA前駆体(デオキシリボヌクレオシド三リン酸)をも酸化し、損傷DNA前駆体を生成させると考えられる。DNA前駆体はDNAよりも酸化されやすいと考えられており、DNA前駆体の酸化は変異誘発に大きく関与している可能性がある。一方で、生物は変異の誘発を抑制する機構を備えている。DNA中に生じた損傷は、種々のDNA修復酵素により除去される。一方、ヌクレオチドプール中に生じた損傷DNA前駆体は、(1)DNA中に取り込まれる前に、ヌクレオチドプール浄化酵素により一リン酸体に分解されるか、(2)DNA中に取り込まれた後、DNA修復酵素により除去されると考えられる。ヌクレオチドプール浄化酵素MutT蛋白質を欠損した大腸菌では野生型の大腸菌と比較して変異率が10-130倍上昇し、また、MutTのホモログであるMTH1蛋白質の欠損したマウスでは、肝臓における発癌率が3倍上昇することが報告されている。このように、ヌクレオチドプール浄化酵素は試験管内における酵素活性に加え、*in vivo*において酸化損傷ヌクレオチドの除去に実際に関与していることが示されている。一方、生細胞において(2)の仮説を証明するデータは未だ報告されていない。

本研究は、活性酸素等により生ずる酸化損傷ヌクレオチドが誘発する変異に、DNA修復関連蛋白質が生細胞でどのように関与しているのかを明らかにすることを目的とした。大腸菌におけるヌクレオチドプール浄化酵素Orf17の機能、続いて哺乳動物細胞のヌクレオチドプール浄化酵素の酸化損傷ヌクレオチド誘発変異に対する影響、DNA修復酵素UvrABCの酸化損傷ヌクレオチド誘発変異に対する影響、さらに8-hydroxy-dGTP(8-OH-dGTP)の二次酸化体の大腸菌における変異誘発能を調べた。

[結果及び考察]

1. 大腸菌におけるヌクレオチドプール浄化酵素Orf17の機能

ヌクレオチドプール浄化酵素に特徴的な"phosphohydrolase module/MutT signature"を有するOrf17蛋白質を精製し、基質特異性について検討した。その結果、Orf17蛋白質が

8-hydroxy-dATP (8-OH-dATP) とその二リン酸体である 8-hydroxy-dADP を試験管内で一リン酸体に加水分解し、ヌクレオチドプール浄化酵素として機能することを初めて明らかにした。しかしながら、本研究において、8-OH-dATP を直接細胞に導入する方法により、大腸菌における変異原性は低い可能性が示され、Orf17 蛋白質の上記活性の生物学的意義の解明には至らなかった。

大腸菌 Orf17 蛋白質は試験管内において 8-OH-dGTPase 活性をも有しており、大腸菌内では Orf135、GTP Cyclohydrolase II と共に MutT のバックアップ酵素として 8-OH-dGTP を分解し、変異の誘発を抑制している可能性を示した。

2. 哺乳動物細胞のヌクレオチドプール浄化酵素の酸化損傷ヌクレオチド誘発変異に対する影響

siRNA を用いたノックダウンの系により、哺乳動物細胞のヌクレオチドプール浄化酵素 MTH1、MTH2、NUDT5 が酸化損傷ヌクレオチド 8-OH-dGTP により誘発される変異を抑制しているのか否かを、ヒト 293T 細胞を用いて検討した。その結果、NUDT5 ではコントロール siRNA 導入時と比較して、8-OH-dGTP により誘発される A:T → C:G 変異が増加していた。このことから、哺乳動物細胞では NUDT5 が細胞内の 8-hydroxy-dGDP を分解することにより、三リン酸体 8-OH-dGTP により誘発される変異を抑制している可能性が示唆された。

3. 大腸菌ヌクレオチド除去修復酵素 UvrABC の酸化損傷ヌクレオチド誘発変異に対する影響

DNA ポリメラーゼにより酸化損傷ヌクレオチドが取り込まれた後、UvrABC が酸化損傷ヌクレオチド誘発変異を抑制するのか否かを検討した。*uvrA* 及び *uvrB* 欠損大腸菌に酸化損傷ヌクレオチドを直接導入し変異率を算出した。その結果、予想に反して、UvrA や UvrB の欠損により、酸化損傷ヌクレオチドにより誘発される変異が低下していた。UvrC の欠損においては、UvrA や UvrB の欠損時のような顕著な変異体率の低下は観察されなかった。これらのことから、UvrA と UvrB はヌクレオチド除去修復とは異なる未知のメカニズムによって、変異の誘発を促進している可能性を示した。

4. 8-OH-dGTP の二次酸化体の変異原性の検討

近年、8-hydroxyguanine の二次酸化体である spiroiminodihydantoin (Sp) や guanidinohydantoin (Gh) が生成することが報告された。これらは、8-hydroxyguanine に比較して非常に高い変異原性を有する可能性が示唆されている。しかしながら、8-OH-dGTP の二次酸化体である dSpTP や dGhTP を用いた生細胞における評価や DNA 修復関連蛋白質の関与についての研究は皆無であった。そこで、二次酸化体を dGTP の酸化反応により調製し、大腸菌における変異原性を検討した。その結果、dSpTP や dGhTP は大腸菌においては変異の誘発に大きくは関与していないことと、既知のヌクレオチドプール浄化酵素によって分解されないことを明らかにした。

[まとめ]

酸化損傷ヌクレオチドの誘発する変異に対して、DNA 修復関連蛋白質は、細胞内で互いに補完しあって機能しており、複数の蛋白質が変異の誘発を抑制している可能性が考え

られる。また、その中には予想外の機能を示すものが存在する可能性が考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 紙 谷 浩 之

副 査 教 授 原 島 秀 吉

副 査 教 授 横 沢 英 良

副 査 准教授 川 原 裕 之

学 位 論 文 題 名

酸化損傷ヌクレオチド誘発変異に対する DNA 修復関連蛋白質の影響

堀美香さんは、酸化損傷ヌクレオチドが誘発する変異に対する DNA 修復関連蛋白質の影響を解明することを目的に本研究を行った。酸化損傷ヌクレオチドは、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。堀さんは、試験管内酵素反応や生細胞に酸化損傷ヌクレオチドを導入する方法を用いて様々な研究を行った。

まず、堀さんは、酸化損傷ヌクレオチドを分解するヌクレオチドプール浄化酵素に特徴的な “phosphohydrolase module/MutT signature” を有する大腸菌 Orf17 蛋白質を精製し、その基質特異性について検討した。その結果、Orf17 蛋白質が試験管内で 8-hydroxy-dATP (8-OH-dATP) とその二リン酸体である 8-hydroxy-dADP (8-OH-dADP) を一リン酸体に加水分解し、ヌクレオチドプール浄化酵素として機能しうることを明らかにした。さらに堀さんは、Orf17 蛋白質が、8-hydroxy-dGTP (8-OH-dGTP) やその二リン酸体 8-hydroxy-dGDP (8-OH-dGDP) を分解する活性をも有していることを見出した。アンチセンス RNA により Orf17 蛋白質の発現を抑制した大腸菌に 8-OH-dATP を直接に導入したものの、おそらくは 8-OH-dATP の大腸菌における変異原性が極めて低いために、Orf17 蛋白質の 8-OH-dAT(D)P 分解活性の生物学的意義の解明には至らなかった。しかし、大腸菌の 8-OH-dGTP 分解酵素である MutT 蛋白質を欠損している細胞に Orf17 蛋白質を発現させると変異頻度が低下したことから、Orf17 蛋白質が

MutT 蛋白質のバックアップ酵素として作用し、8-OH-dGTP を分解している可能性を示した。

次に堀さんは、siRNA を用いてヒトのヌクレオチドプール浄化酵素 MTH1・MTH2・NUDT5 をノックダウンした細胞に 8-OH-dGTP を導入する方法により、上記のヌクレオチドプール浄化酵素が 8-OH-dGTP により誘発される変異を抑制しているのか否かを検討した。その結果、NUDT5 をノックダウンした細胞では、コントロールと比較して、8-OH-dGTP が誘発する A:T→C:G 変異が増加することを見出した。NUDT5 蛋白質は、8-OH-dGDP を分解することが報告されていることから、ヒト細胞では NUDT5 蛋白質が細胞内の 8-OH-dGDP を分解することにより、その三リン酸体 8-OH-dGTP が誘発する変異を抑制している可能性が明らかとなった。

次に堀さんは、大腸菌ヌクレオチド除去修復酵素、UvrABC が酸化損傷ヌクレオチド誘発変異に対して、どのような影響を与えるかを検討した。当初は、DNA ポリメラーゼにより酸化損傷ヌクレオチドが取り込まれた後、UvrABC が酸化損傷塩基を除去することにより変異を抑制すると予想していたが、*uvrA* 及び *uvrB* 欠損大腸菌に酸化損傷ヌクレオチドを直接導入し変異率を算出した結果、UvrA や UvrB の欠損により、酸化損傷ヌクレオチドが誘発する変異が低下していた。一方、UvrC の欠損においては、UvrA や UvrB の欠損時のような顕著な変異体率の低下は観察されなかった。さらに、堀さんは、試験管内において、UvrABC が酸化損傷塩基を含む二本鎖 DNA を切断しないことを見出した。これらのことから、堀さんは、UvrA と UvrB がヌクレオチド除去修復とは異なる未知のメカニズムによって、変異の誘発を促進している可能性を示した。

最後に堀さんは、8-OH-dGTP の二次酸化体を dGTP の酸化反応により調製し、大腸菌における変異原性を検討した。その結果、3 種の二次酸化体は大腸菌における変異原性が低いことと、4 種のヌクレオチドプール浄化酵素 (MutT、Orf17、Orf135、MTH1) によっては分解されないことを明らかにした。

以上、堀美香さんは、酸化損傷ヌクレオチドの誘発変異に対する DNA 修復関連蛋白質の影響に関して、種々の興味深い事実を明らかにした。堀さん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。