

酸化損傷ヌクレオチド誘発変異の 塩基除去修復蛋白質による抑制

学位論文内容の要旨

【研究背景】

呼吸、エネルギー代謝などの内在的要因や電離放射線、紫外線などの外在的要因により生体内では活性酸素 (ROS) が生じる。この活性酸素は DNA やその前駆体 (dNTP) と反応することが知られている。これらの損傷を受けたヌクレオチドは、遺伝子上に突然変異を引き起こし、癌や老化、多くの遺伝性疾患の原因となると考えられている。生体はこれらの損傷に対して複数の防御機構を備えている。それらの中で塩基除去修復は、特に活性酸素により生じる DNA 損傷を効率良く除去できる修復機構の一つである。酸化損傷 DNA は、直接 DNA が酸化を受けるとや、ヌクレオチドプール中に生じた酸化ヌクレオチドが DNA ポリメラーゼにより DNA 中に取り込まれることにより生じる。DNA 構成塩基の中でもグアニンは酸化されやすく、8-ヒドロキシグアニン (8-OH-Gua) を生じる。DNA 中に生じた 8-OH-Gua に対しては dCTP だけでなく dATP も取り込まれることが明らかにされており、またヌクレオチドプール中に生じる 8-ヒドロキシ-dGTP (8-OH-dGTP) は DNA ポリメラーゼの基質となり、誤った塩基 (A) に対して取り込まれることが報告されるなど、変異の誘発に関与していることが示唆されている。

本研究では、8-OH-Gua による変異誘発に対する塩基除去修復の関与を明らかにするため、大腸菌の塩基除去修復酵素欠損株、siRNA により塩基除去修復酵素をノックダウンしたヒト由来の培養細胞の系を用いて、酸化損傷による変異誘発とその修復メカニズムの解析を行った。

【結果および考察】

大腸菌における解析

大腸菌塩基除去修復酵素 endonuclease III (Nth) 欠損株 NKJ1002 (*nth*)、endonuclease VIII (Nei) 欠損株 NKJ1003 (*nei*) に塩化カルシウム法を用いて、8-OH-dGTP を導入し、リファンピシン耐性を指標とした *rpoB* アッセイにより変異体率を算出し、コントロール (水処理) の変異体率を差し引くことで、その変異体率の上昇量を各株で比較した。

野生型に比べて *nth* 欠損株において 8-OH-dGTP の導入により誘発された変異体率が 2.7 倍増加し、8-OH-dGTP により誘発される特徴的な変異である A:T から C:G へのトランスバージョン変異体率が増加していた。一方、*nei* 欠損株において誘発変異体率は野生株に比べて増加傾向にあるものの、顕著な変化はみられなかった。しかしながら、*nei* 欠損株においても A:T から C:G への変異の割合が増加していた。

大腸菌の 8-OH-dGTP の分解酵素である MutT と塩基除去修復酵素である、Nth、Nei を二重欠損した大腸菌株 (*mutTlnth*、*mutTnei*) を用いて、同様に *rpoB* アッセイにより自然突然変異体率を調べ、MutT の欠損により内在的に蓄積される 8-OH-dGTP の誘発変異に塩基除去修復欠損が与える影響を調べた。

mutTlnth の二重欠損株において *mutT* の単独欠損株に比べて、自然突然変異体率が 2 倍程度高かった。一方、*mutTnei* 二重欠損株では *mutT* 単独欠損株と同程度の自然突然変異体率しか示さなかった。

以上の結果から、Nth が 8-OH-dGTP が誘発する変異を抑制していることを明らかにした。

哺乳動物細胞における解析

ヒトの塩基除去修復酵素である OGG1、MYH、NTH1、及び NEIL1 を siRNA によりノックダウンした 293T 細胞に、レポーター遺伝子 *supF* を有する複製型プラスミド pZ189-StuI を導入後、浸透圧シフト法により 8-OH-dGTP を細胞に導入した。培養後、細胞から複製されたプラスミドを回収し、指示大腸菌 KS40/pOF105 に導入し、*supF* 変異体率を算出した。

dGTP に比較して 8-OH-dGTP の導入により変異体率が増加した。8-OH-dGTP が誘発する変異は、MYH のノックダウンにより減少した。この結果は、MYH が 8-OH-dGTP による変異誘発を促進していることを示している。また、OGG1、NTH1、NEIL1 をノックダウンした細胞では 8-OH-dGTP 誘発変異体率の顕著な変化は見られなかった。

さらに、OGG1、MYH、NTH1、及び NEIL1 をノックダウンした 293T 細胞に、pZ189-StuI の *supF* 遺伝子中に 8-OH-Gua:C または 8-OH-Gua:A 塩基対を含むプラスミドを導入した。培養後、細胞から複製されたプラスミドを回収し、同様に *supF* 変異体率を算出した。

従来の研究から予想されるように OGG1、MYH をノックダウンした細胞において、8-OH-Gua:C により誘発される変異体率は増加した。さらに、NEIL1、NTH1 をノックダウンした細胞においても 8-OH-Gua:C 誘発変異体率は増加した。これらの結果は、DNA 中に生じた 8-OH-Gua:C により誘発される変異を OGG1、MYH、NTH1 及び NEIL1 が抑制していることを示している。

一方で、8-OH-Gua:A 塩基対を含むプラスミドの変異体率は MYH のノックダウンにより減少したが、OGG1、NTH1、NEIL1 のノックダウンでは変異体率の変化はみられなかった。このことは、MYH が 8-OH-Gua:A の A を除くことで G:C へ変換していることを示している。

[結論]

活性酸素により生じる酸化損傷である 8-OH-Gua について大腸菌と哺乳動物細胞を用いて変異誘発と塩基除去修復酵素の関連についての解析を行った。

大腸菌では Nth が、8-OH-dGTP により誘発される変異を抑制していることを示した。またヒト培養細胞では、OGG1、MYH に加えて NEIL1、NTH1 も DNA 中の 8-OH-Gua による変異誘発を抑制する作用があることを明らかにした。さらに、MYH は 8-OH-Gua:A 形成による 8-OH-dGTP 誘発変異を促進していることが示唆された。

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	松田彰
副査	教授	有賀寛芳

学位論文題名

酸化損傷ヌクレオチド誘発変異の 塩基除去修復蛋白質による抑制

鈴木哲矢君は、酸化損傷ヌクレオチドが誘発する変異に対する塩基除去修復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、生体内で内在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。鈴木君は、生細胞に酸化損傷ヌクレオチド/酸化損傷塩基を含むプラスミド DNA を導入する方法を用いて、様々な研究を行った。

まず、鈴木君は、ヌクレオチドプール中に生じる酸化 dGTP である 8-ヒドロキシ-dGTP (8-OH-dGTP) に着目し、大腸菌の塩基除去修復酵素欠損株に 8-OH-dGTP を導入し、誘発される変異を解析した。大腸菌塩基除去修復酵素 endonuclease III (Nth) 欠損株 NKJ1002 (*nth*)、endonuclease VIII (Nei) 欠損株 NKJ1003 (*nei*) に塩化カルシウム法を用いて 8-OH-dGTP を導入し、*rpoB* アッセイにより変異体率を算出した。その結果、鈴木君は、*nth* 欠損株においては野生型に比べて 8-OH-dGTP 誘発変異体率が約 2.7 倍増加することを見出した。8-OH-dGTP により誘発される変異である A:T→C:G トランスバージョンの割合も同時に増加していた。また、*nei* 欠損株においては、誘発変異体率は野生株に比べて増加傾向にあるものの顕著ではなかった。しかし、*nei* 欠損株においても A:T→C:G トランスバージョンの割合が増加していた。さらに鈴木君は、主要な 8-OH-dGTP 分解酵素を欠損しているために内在的に 8-OH-dGTP が細胞内に蓄積していると考えられる *mutT* 株に着目し、Nth や Nei 欠損の影響を調べた。その結果、*mutT/nth* 二重欠損株においては *mutT* の単独欠損株に比べて自然突然変異体率が 2 倍程度高いことを見出した。一方、*mutT/nei* 二重欠損株では、*mutT* 単独欠損株と同程度の自然突然変異体率しか示さなかった。以上の結果から、鈴木君は、Nth が 8-OH-dGTP 誘発変異を主として抑制していると結論づけた。

次に鈴木君は、siRNA により塩基除去修復酵素をノックダウンしたヒト由来の 293T 細胞を用いて、ヒト塩基除去修復酵素と 8-ヒドロキシグアニン (8-OH-Gua、G 由来の酸化損傷塩基)/8-OH-dGTP が誘発する変異との関連を調べた。293T 細胞の塩基除去修復酵素 (OGG1、MYH、NTH1、及び NEIL1) を siRNA によりノックダウンし、レポーター遺伝子 *supF* 遺伝子中に 8-OH-Gua を含む複製型プラスミドを導入した。その結果、OGG1、MYH をノックダウンした細胞において、8-OH-Gua によって誘発された変異体率は増加した。さらに、鈴木君は、NTH1、NEIL1 をノックダウンした場合においても 8-OH-Gua 誘発変異体率が増加することを見出した。これらの結果は、DNA 中に生じた 8-OH-Gua により誘発される変異を OGG1、MYH、NTH1 及び NEIL1 の 4 種の塩基除去修復酵素が抑制していることを示しており、鈴木君は予想外の知見を得た。

最後に、鈴木君は、OGG1、MYH、NTH1、及び NEIL1 をノックダウンした 293T 細胞に、*supF* 遺伝子を含む複製型プラスミドと 8-OH-dGTP を導入した。培養後、細胞から複製されたプラスミドを回収し、指示大腸菌 KS40/pOF105 に導入し、*supF* 変異体率を算出した。その結果、MYH のノックダウンにより、8-OH-dGTP 誘発変異は減少した。また、OGG1、NTH1、NEIL1 をノックダウンした場合には、8-OH-dGTP 誘発変異体率に顕著な変化は観察されなかった。以上の結果から、鈴木君は、MYH が 8-OH-dGTP による変異誘発を促進していること、及び、OGG1、NTH1、NEIL1 の 8-OH-dGTP 誘発変異を抑制する機能は低いことを明らかにした。

以上、鈴木哲矢君は、活性酸素により生じる酸化損傷である 8-OH-Gua/8-OH-dGTP が誘発する変異に関して、大腸菌とヒト細胞の塩基除去修復酵素との関連を明らかにした。酸化損傷は、内在的要因や様々な外在的要因により生ずる活性酸素の作用により生成し、変異・癌・神経変性・老化などとの関連が指摘されている。鈴木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。

よって鈴木哲矢君は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格のあるものと認める。