

氏 名（本籍）	さい 齋	とう 藤	ゆう 祐	すけ 介
学位の種類	博 士（医 学）			
学位記番号	医 博 第 1 8 2 0 号			
学位授与年月日	平 成 1 4 年 3 月 2 5 日			
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻			
学位論文題目	ジーンターゲットィング法によるDNA修復酵素 TDGノックアウトマウス作製とその解析			

（主 査）

論文審査委員	教授 小 野 哲 也	教授 安 井 明
	教授 福 本 学	

## 論文内容要旨

細胞内 DNA には内因性および外因性変異原によりさまざまな損傷が蓄積するが、これらが修復されないと細胞死や突然変異を引き起こすことが知られている。マウス個体において、組織 DNA 上で検出される自然突然変異のうち、最大の割合を占めるのが 5'-CpG-3'配列での G:C→A:T 型塩基置換である。これは、遺伝子発現調節や胚発生などに関与する 5'-CpG-3'配列中の 5-メチルシトシンが脱アミノ化によってチミンに変化することにより G-T ミスマッチが形成され、その後の DNA 複製時にチミンの対面にアデニンが対合することで G:C→A:T 型塩基置換が固定されることが原因のひとつとして考えられている。

TDG (mismatch-specific thymine DNA glycosylase) はこの G-T ミスマッチを認識し、G は切断せずに T のみを除去するグリコシラーゼ活性を持つ DNA 修復酵素である。In vitro の実験から、TDG は G-T ミスマッチだけでなく他のミスマッチ (G-U 等) も認識したり、転写因子 (RAR, RXR, c-Jun) との相互作用が認められることから、自然突然変異の抑制だけでなく遺伝子発現の調節にも重要な役割を担っていることが示唆されているが、これまでに TDG の機能が欠損した細胞もしくはマウス個体の報告がないため、in vitro で解明された機能がどの程度 in vivo にも当てはまるかなど全く分かっていない。そこで私は、in vivo における TDG の機能解析をおこなうために、グリコシラーゼ活性が localize されたエクソン 7~8 にネオマイシン耐性遺伝子を挿入することにより TDG 遺伝子欠損マウスを作製した。TDG ヘテロ欠損マウスは正常に発育し生殖可能であったが、TDG ヘテロ欠損マウスどうしの交配による TDG ホモ欠損マウスは得られなかった。胎生致死時期の詳細を調べたところ、TDG ホモ欠損胎仔は胎生 11.5 日までに肝臓での鬱血を伴って死亡することがわかった。組織学的には頭部の矮小化など全体的な成長遅延が観察されたが致命的と思われるような形態異常は認められなかった。また、胎生 10.5 日では 5'-CpG-3'配列での G-T グリコシラーゼ活性の約 90% を TDG が担っていたが、TDG が失活しても大腸菌 *gpt* 遺伝子を標的とした自然突然変異頻度 ( $6.9 \pm 4.65 \times 10^{-6}$ ) は野生型 ( $5.2 \pm 3.89 \times 10^{-6}$ ) とほとんど変わらなかったことから、これらの解析では TDG ホモ欠損胎仔の致死原因はわからなかった。

だが、TDG ホモ欠損胎仔の表現型や致死時期は転写因子 *GATA3* ホモ欠損胎仔と類似していた。*GATA3* ホモ欠損胎仔では正常な胚発生に必要なとされる胎仔内ノルアドレナリンの欠乏が致死原因であることがわかっている。そこで胎生 10.5 日における TDG ホモ欠損胎仔内ノルアドレナリン量を HPLC で測定した。野生型が  $357 \pm 31$  pg/mg protein, ヘテロ欠損胎仔が  $377 \pm 75$  pg/mg protein であったのに対し、ホモ欠損胎仔では  $62.2 \pm 2.9$  pg/mg protein と、野生型や

ヘテロ欠損胎仔に比べて約1/6にまで減少していた。また同時にノルアドレナリンの前駆体であるドーパミン量と、ドーパミンの前駆体であるL-ドーパ量もHPLCで測定した。ドーパミン量は、野生型が $53.1 \pm 9.8$  pg/mg protein, ヘテロ欠損胎仔が $52.7 \pm 9.7$  pg/mg proteinであったのに対し、ホモ欠損胎仔では $19.5 \pm 7.9$  pg/mg proteinと、野生型やヘテロ欠損胎仔に比べて約1/3にまで減少していたが、L-ドーパ量はヘテロ欠損胎仔が $0.36 \pm 0.01$  ng/mg proteinであったのに対し、ホモ欠損胎仔では $0.76 \pm 0.28$  ng/mg proteinと逆に蓄積していた。よって、TDGホモ欠損胎仔の胎生致死は、L-ドーパ→ドーパミン合成がうまくいかないことに起因したノルアドレナリン量の低下が原因である可能性が考えられた。そこで、ノルアドレナリンの前駆物質であるDOPSを、妊娠したTDGヘテロ欠損マウスに受精成立後6.5日目から飲料水に加えて経口投与したところ、TDGホモ欠損胎仔は胎生14.5日まで生存した。これらの結果から、TDGはDNA修復だけでなく胚発生期におけるカテコールアミン（ドーパミン、ノルアドレナリン）合成にも関与している可能性がある」と結論した。

## 審査結果の要旨

本論文は、DNA 修復酵素である Thymine DNA Glycosylase (TDG) を不活化したマウスを作製・解析した結果、TDG は DNA 修復だけでなく、胚発生でのカテコールアミン合成に関わる機能も保持している可能性があることを示している。マウス個体における自然突然変異のうち、最大の割合を占めるのが 5'-CpG-3'配列での G:C→A:T 型塩基置換であり、また、ガン化した細胞や組織で高頻度に観察される p53 遺伝子の変異でも約半数が 5'-CpG-3'配列での G:C→A:T 型塩基置換であることから、この塩基置換抑制に関わっていると考えられている TDG の機能を *in vivo* で調べることは大変重要である。

本論文では、ジーンターゲット法を用いて TDG 欠損マウスを作製したところ、ホモ欠損が胎生致死であることを見出している。これは TDG が DNA 修復だけでなく胚発生に必須ななんらかの機序にも関与していることを世界で初めて示したものである。その原因として、致死直前胎仔での自然突然変異頻度は増加しなかったが、肝臓での鬱血などの形態学的な観察や、過去に報告されたさまざまなノックアウトマウスの所見との比較を通して、カテコールアミン合成の欠損に注目した点は大変独創的である。このことを、ホモ欠損でのノルアドレナリンとドーパミン量の低下、およびノルアドレナリンの前駆物質である DOPS の投与が TDG ホモ欠損胎仔を胎生致死時期を越えて生存させ得ることから、ノルアドレナリン低下が胎生致死の原因であることを *in vivo* で証明したことは大変評価できる。さらに胎仔内 L-ドーパの定量と L-ドーパでの rescue の結果から、L-ドーパ→ドーパミン変換に TDG が関与している可能性が示唆されており、今後の研究の方向性についても明確なものを提示している。

バックグラウンドの把握も確かであり、論文構成や展開も明快でわかりやすく、全体として高く評価できる内容である。