

氏 名（本籍）                    <sup>あら</sup>新            <sup>い</sup>井            <sup>つよ</sup>剛            <sup>し</sup>士

学 位 の 種 類                    博            士   （ 医    学 ）

学 位 記 番 号                    医            第    3 3 3 0    号

学 位 授 与 年 月 日                平 成 16 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 条 件                学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴                        平 成 9 年 3 月 15 日  
早稲田大学大学院理工学研究科修了

学 位 論 文 題 目                *Ogg1* 遺伝子欠損マウスの樹立による 8-ヒドロキシ  
シグアニンの修復機構と突然変異に与える影響の  
研究

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員                教 授 野 田 哲 生            教 授 小 野 哲 也

教 授 八 重 樫 伸 生

## 論文内容要旨

酸化的 DNA 損傷は、内因的には細胞の酸素代謝によって、外因的には電離放射線や変異原物質、発癌物質によって生み出される活性酸素により引き起こされる。種々の酸化的 DNA 損傷のうち 8-ヒドロキシグアニン (8-OH-G) は発生頻度が高く、アデニンと誤対合することにより突然変異を引き起こすため、発癌や老化に関係していると考えられている。ヒトでは 8-OH-G を修復する酵素として *MMH/OGG1* 遺伝子が存在し、ヒト細胞を用いた実験により OGG1 タンパク質が 8-OH-G を修復する主要な酵素であることが明らかにされてきた。

本論文は、*in vivo* において 8-OH-G の修復に果たす OGG1 の役割について明らかにすることを目的とした。そこで *Ogg1* 遺伝子欠損マウスを作製して詳細な解析を行った。その結果、① OGG1 が 8-OH-G を修復する主要な酵素であること、② 内因性および外因性酸化ストレスにより個体内に形成した 8-OH-G は *Ogg1*<sup>-/-</sup> マウスにおいて修復されないこと、③ 8-OH-G が蓄積した細胞は、DNA 変異の上昇とともに増殖可能であること、を明らかにした。以下にその詳細を示す。

初めに、OGG1 が *in vivo* において 8-OH-G の修復にどの程度寄与しているのか調べるために、*Ogg1* 遺伝子欠損マウスを作製した。50 週令になるまでに *Ogg1*<sup>-/-</sup> マウスは *Ogg1*<sup>+/+</sup> マウスと比べて異常な症状は見られず、また癌の形成も観察されなかった。OGG1 の酵素活性を測定したところ、*Ogg1*<sup>+/+</sup> マウスと比べて、*Ogg1*<sup>+/-</sup> マウス由来の肝臓では活性が半分になっており、*Ogg1*<sup>-/-</sup> マウスではほぼ消失していた。次に肝臓中の 8-OH-G 量を測定したところ、*Ogg1*<sup>+/+</sup> マウス由来の肝臓と比べて *Ogg1*<sup>+/-</sup> マウスでは 8-OH-G 量に有意な差は無かったが、*Ogg1*<sup>-/-</sup> マウスでは 9 週令で 8-OH-G 量が 3 倍に、14 週令では 7 倍に蓄積していた。さらに、16-20 週令で *Ogg1*<sup>+/+</sup> マウスと比べて *Ogg1*<sup>-/-</sup> マウス由来の肝臓中で DNA 変異が 2.3 倍に上昇していた。したがって OGG1 が 8-OH-G を修復する主要な酵素であることが明らかになった。

次に、外因性の慢性的酸化ストレスが加えられた時の 8-OH-G の修復における OGG1 の役割を調べた。酸化剤で腎発癌物質として知られる KBrO<sub>3</sub> を 2g/l の濃度で飲料水として 12 週間与え続けた後、マウスから腎臓を採材した。腎臓中の OGG1 酵素活性を測定したが KBrO<sub>3</sub> 投与による活性の変化は起こらなかった。次に、腎臓中の 8-OH-G 量を測定したところ、投与 *Ogg1*<sup>-/-</sup> マウスでは時間に比例して増加し、投与 *Ogg1*<sup>+/+</sup> マウスの 70 倍、非投与 *Ogg1*<sup>+/+</sup> マウスと比べると 200 倍にまで 8-OH-G 量が蓄積していた。また、8 週間 KBrO<sub>3</sub> を投与後、投与を中止して 4 週間すると *Ogg1*<sup>+/+</sup> と *Ogg1*<sup>+/-</sup> マウス由来の腎臓に蓄積した 8-OH-G 量は正常値にまで減少するが、*Ogg1*<sup>-/-</sup> マウスでは 8-OH-G は大量に蓄積したままであった。この時の DNA 変異を調べたところ、KBrO<sub>3</sub> 投与により mutation frequency が上昇し、*Ogg1* 遺伝子の欠損によりさ

らに上昇していた。また DNA 上に大量に蓄積した 8-OH-G により GC→TA や欠失変異が増えていた。以上より慢性的外因性酸化ストレスにより形成した 8-OH-G は *Ogg1*<sup>-/-</sup> マウスにおいて修復されないことが示唆された。

最後に、*in vivo* で蓄積した 8-OH-G が増殖する細胞に与える影響を調べた。KBrO<sub>3</sub> 投与により *Ogg1*<sup>-/-</sup> マウスにおいて 8-OH-G は腎臓だけでなく肝臓でも蓄積し、投与中止後も減少しない。そこで投与後のマウスを用いて部分肝切除を行い、肝臓の再生を調べたところ、投与後の *Ogg1*<sup>-/-</sup> マウスの肝臓の再生能はコントロールマウスの再生能と差が無かった。また、投与した *Ogg1*<sup>-/-</sup> マウスの肝臓の再生後の mutation frequency は再生前と比べて 3.5 倍にまで上昇した。これは正常値の 6.2 倍にもなる。この肝再生の際に生じた DNA 変異はほとんどが GC→TA であった。したがって 8-OH-G が蓄積した細胞は、DNA 変異の上昇とともに増殖可能であることが示唆された。

以上のことから、*Ogg1* 遺伝子欠損マウスでは曝された内因性および外因性酸化ストレスに依存して 8-OH-G が蓄積し、一度蓄積すると減少しないことから、*in vivo* において OGG1 が 8-OH-G を修復する主要な酵素であること、さらには 8-OH-G の蓄積した細胞は増殖能を有し、増殖に伴い DNA 変異が増加することが明らかになった。したがって *Ogg1* 遺伝子の不活性化は高い発癌リスクとなりうることが示唆された。

## 審査結果の要旨

酸化 DNA 損傷は、内因的には細胞の酸素代謝によって、外因的には電離放射線や変異原物質、発癌物質によって生み出される活性酸素により引き起こされる。種々の酸化 DNA 損傷のうち 8-ヒドロキシグアニン (8-OH-G) は発生頻度が高く、アデニンと誤対合することにより突然変異を引き起こすため、発癌や老化に関係していると考えられ、多くの研究がなされてきた。しかし生体内での 8-OH-G 量の変化と 8-OH-G が遺伝情報に与える影響についてはまだ不明な点が多い。

本論文では、*in vivo* において 8-OH-G の修復酵素 OGG1 の役割について明らかにすることを目的とし、Ogg1 遺伝子欠損マウスを作製して次の様な解析を行った。

初めに、作製した Ogg1 遺伝子欠損マウスは 50 週令になるまでに発癌等異常な症状は見られなかった。肝臓を用いた解析によると、Ogg1<sup>-/-</sup>マウスでは OGG1 酵素活性がほぼ消失し、Ogg1<sup>+/+</sup>マウスと比べて 8-OH-G 量が 14 週令で 7 倍に、DNA 変異が 2.3 倍にそれぞれ上昇していた。したがって OGG1 が 8-OH-G を修復する主要な酵素であることが明らかになった。

次に、酸化剤 KBrO<sub>3</sub> を 12 週間投与し、腎臓中の 8-OH-G 量を測定したところ、投与 Ogg1<sup>-/-</sup>マウスでは投与期間に比例して 8-OH-G 量が増加し、投与 Ogg1<sup>+/+</sup>マウスの 70 倍にまで蓄積した。また、Ogg1<sup>-/-</sup>マウスでは投与中止後も 8-OH-G は蓄積したままであった。DNA 変異も有意に上昇しており、GC→TA や欠失変異が増えていた。以上より慢性的外因性酸化ストレスにより形成した 8-OH-G は Ogg1<sup>-/-</sup>マウスにおいて修復されないことが示唆された。

最後に、KBrO<sub>3</sub> 投与により Ogg1<sup>-/-</sup>マウス肝臓にも 8-OH-G は蓄積し、投与中止後も減少しない。そこで投与後のマウスを用いて部分肝切除を行ったところ、投与 Ogg1<sup>-/-</sup>マウスの肝臓の再生能は正常であった。一方、肝再生後の mutation frequency は再生前と比べて 3.5 倍にまで上昇し、そのほとんどが GC→TA であった。したがって 8-OH-G が蓄積した細胞は、DNA 変異の上昇とともに増殖可能であることが示唆された。

以上のことから、Ogg1 遺伝子欠損マウスでは曝された内因性および外因性酸化ストレスに依存して 8-OH-G が蓄積し、一度蓄積すると減少しないことから、*in vivo* において OGG1 が 8-OH-G を修復する主要な酵素であること、さらには 8-OH-G の蓄積した細胞は増殖能を有し、増殖に伴い DNA 変異が増加することが明らかになった。したがって Ogg1 遺伝子の不活性化は高い発癌リスクとなりうることが示唆された。

上記の内容から本論文は学位論文として適当であると考えられる。