

氏名・(本籍)	わた なべ たか し 渡 辺 貴 志
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	理博第1972号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科, 専攻	東北大学大学院理学研究科(博士課程)生物学専攻
学位論文題目	大腸菌のDNA酸化損傷における突然変異生成機構の研究
論文審査委員	(主査) 教授 山本和生 教授 水野健作 助教授 布柴達男

## 論文目次

要旨	pp1-2
序論	pp3-6
第一章 <i>mutM mutY</i> 欠損株の点突然変異生成	pp7-15
第二章 <i>mutM mutY</i> 欠損株で高頻度に変異が生じる塩基とその塩基の周辺配列の影響	pp16-24
第三章 8-oxoGをバイパス合成する際のDNAポリメラーゼにおける忠実度と周辺配列の影響	pp24-30
第四章 MutM/Fpg及びMutY修復酵素の8-oxoG及びデニンの除去効率とその周辺配列の影響	pp30-37
考察	pp38-49
謝辞	pp50
引用文献	pp51-54

## 論文内容要旨

生物の全遺伝情報を担っているDNAは様々な内的, 外的要因により損傷を受けている。このようなDNA損傷によって細胞死や突然変異が生じると, 結果として発がんや様々な疾患を引き起こす。細胞の内的要因によって引き起こされるDNA損傷に酸化損傷があり, 特に主要な酸化損傷の一つに7,8-dihydro-8-oxoguanine(8-oxoG)が知られている。8-oxoGはG(グアニン)が酸化することによって生じ, DNA複製で本来C(シトシン)と対合するところをA(アデニン)と対合する。その結果G:C→T:A変異を引き起こす。このように8-oxoGは突然変異を高頻度に誘発する。DNA損傷に起因した変異は, 損傷が修復されずにDNA上に存在している間にDNAポリメラーゼが損傷の向かい側に誤った塩基を挿入することによって

生じる。つまり変異は損傷に対する修復効率と複製の正確さ（忠実度）に依存して生じることが分かる。

本研究では、DNAポリメラーゼが8-oxoGの向かい側に塩基を挿入するとき、8-oxoGの周辺配列が塩基挿入の忠実度に影響を与えるか、またFpg/MutM及びMutY修復酵素による8-oxoGの除去効率が、周辺配列によって変化するかということを調べることで、これらの過程が突然変異生成に与える影響を明らかにしようと考えた。

初めに8-oxoG修復欠損株（*mutM mutY*欠損）を用いて、8-oxoGに起因する変異を観察した。その結果、5'-AGA、5'-AGG及び5'-GGAのGの部位でG:C→T:A変異が高頻度に行っていることが分かった。つまり変異が特定の塩基に局在することが示唆され、これらの変異はグアニンの両サイトにプリン基がある時に生じやすいという仮説を立てた。

次にその仮説の真偽を明らかにするために、G:C→T:A変異が高頻度で起こった塩基（ホットスポット）の一つに注目した。このサイトの5'、3'の両側にはAが存在する(5'-AGA)。このサイトの3'側の塩基をT、G、Cに変化させて5'-AGA、5'-AGT、5'-AGG、5'-AGC配列を作成し、8-oxoG修復欠損株(*mutM mutY*欠損)に導入してホットスポットの周辺配列が変異の局在に関与しているかどうかを調べた。その結果、3'側の塩基がプリン基の時はピリミジン基の時よりも変異が生じやすいことが分かった。

では何故、Gの3'側にプリン基が存在するとき変異が生じやすいのか。一つの可能性として、8-oxoGをDNAポリメラーゼがバイパス合成する時、3'側にプリン基が存在すると、よりAを挿入しやすいことが考えられる。つまり、損傷の周辺配列によって、ポリメラーゼの忠実度が変化する結果、ホットスポットが生じることが考えられる。この点を明らかにするために、Gに8-oxoG(Q)を持った5'-AQA、5'-AQT、5'-AQG、5'-AQC配列を作成し、これらを8-oxoG修復欠損株に導入した。そしてDNAポリメラーゼの忠実度が8-oxoGの3'側の塩基の違いによって変化するかを調べた。その結果、3'側にA、T、G、Cのどの塩基があっても変異頻度に違いはなかった。つまりDNAポリメラーゼが8-oxoGをバイパス合成する時、周辺配列はその忠実度に影響しないことが分かった。

最後にFpg/MutM及びMutY修復酵素の活性が8-oxoGの周辺配列に影響を受けるかどうかを調べた。つまり8-oxoGの周辺配列の違いによってDNA修復のされやすさに違いがあるかを観察した。その結果、Fpg/MutMは3'側の塩基がCの時は他の塩基の時より活性が低いことが分かった。またMutYは3'側の塩基がAの時は他の塩基に比べて切断されにくいことが分かった。

以上のことから8-oxoGに起因する突然変異は配列特異的に生じ、その変異生成はDNAポリメラーゼの忠実度に依存しないが修復酵素の塩基除去効率に依存することが明らかになった。さらに8-oxoG修復欠損株においても変異は配列特異的に生じることから、DNAポリメラーゼの忠実度にも修復酵素の塩基除去効率にも依存しない配列特異的な変異生成があると考えられる。このことから化学的に8-oxoGが生じやすい配列が存在することが示唆される。

## 論文審査の結果の要旨

細胞の行う酸素代謝の結果、DNA上に7,8-dihydro-8-oxoguanine(8-oxoG)等の酸化損傷が作られる。8-oxoGは、ガンや老化の原因損傷となることが示唆されており、その生物影響の研究が世界中で展開されている。

渡辺貴志は、8-oxoGによる突然変異生成について、次の4点の仮説を検証した。

- 1) 8-oxoGに起因する変異が特定の塩基配列に局在するかどうかを調べるために、8-oxoG修復欠損株 (*mutM mutY*欠損株)で生じた変異体の配列を解析した結果、特定の4箇所に変異が局在した。この部位では、PuGPu配列中央のGがホットスポットになっていた。そこで、変異はプリン基に囲まれたグアニンで生じやすいという仮説を提案した。
- 2) この仮説の真偽を明らかにするために、ホットスポット配列AGAに注目した。この配列の3'側の塩基をT、G、Cに変化させたAGA、AGT、AGG、AGO配列を作り、変異率を調べたところ、3'側の塩基がプリン基の時はピリミジン基の時よりも変異が生じやすいこと即ち、前後の塩基配列に影響されることが分かった。
- 3) 変異生成が前後の塩基配列に影響される原因として、ポリメラーゼの忠実度が塩基配列に影響される可能性を検証した。8-oxoGを持つ4つの配列を人工合成し、それを鋳型とした突然変異を調べたところ、3'側の塩基がA、T、G、Cの時に各々13.8%、13.1%、16.1%、11.9%であった。つまりDNAポリメラーゼが8-oxoGをバイパス合成する時、周辺配列はその忠実度に影響しないことが分かった。
- 4) 8-oxoG修復酵素の活性と周辺配列について調べた。8-oxoGの3'側の塩基がA、T、G、Cの時、Fpg/MutMは各々22.9%、23.2%、24.7%、9.4%の割合で切断し、MutYは各々0.03%、5.82%、1.89%、2.53%の割合で切断した。Fpg/MutMは3'側の塩基がシトシンの時は活性が低いこと、MutYは3'側の塩基がアデニンの時は活性が低いことが分かった。

本論文で渡辺貴志は、8-oxoGのバイパス合成はホットスポット生成に関与しないこと、8-oxoG修復酵素が関与することを明らかにした。これらの成果は自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を備えていることを示している。したがって、渡辺貴志提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。