

学位記号	博(薬)第43号	論文提出者	氏名 鈴木 雅代
学位論文題名 グアニン酸化損傷オキサゾロンに対する DNA ポリメラーゼ反応の解析			
学位の種類 博士(薬学)			
審査委員	専攻等	職名	氏名
	(主査) 生体防御学	教授	岩田 誠
	(副査) 学習院大学 大学院自然科学研究科 生命科学専攻・分子生物学	教授	花岡 文雄
	(副査) 生体防御学	准教授	大岡 嘉治
	(副査) 微生物学	准教授	大島 隆幸

学位論文内容および審査の要旨

酸化ストレスによる DNA への点突然変異の誘導は、発がんの直接的な原因となりうる。DNA 塩基の中ではグアニンが最も酸化され易く、その酸化損傷は、アデニンやグアニンの誤った取り込みによる G:C-T:A トランスバージョンおよび G:C-C:G トランスバージョンの発生要因となる。グアニン酸化損傷産物のうち、これまで最も研究されてきた 8 オキソグアニン(8-oxoG)は G:C-T:A トランスバージョンを引き起こす。一方、GC-C:G トランスバージョンを引き起こすグアニン酸化損傷としては、オキサゾロン(Oz)が最も重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかし、その詳細については不明の点が多く残されていた。

本論文では、この G:C-C:G トランスバージョンを引き起こす要因としての Oz に着目し、Oz を含む DNA 二本鎖の歪みを解析した上で、さらに種々の DNA ポリメラーゼ反応の鋳型としてどのような塩基を重合させるかについて詳細に解析した。

第1章(序論)では、がん遺伝子である *K-ras* 遺伝子のコドン 12、13 で G:C-C:G トランスバージョンが高頻度に行っていることなどの例を挙げて、この変異の重要性をまず述べている。そして、G:C-C:G トランスバージョン発生機構における Oz の重要性と Oz の産生機序について解説し、さらに Oz を含む損傷 DNA に対する多種のポリメラーゼによる反応解析が重要であることを述べて、本論文の主旨を説明している。

第2章では計算科学の手法を用い、グアニンの各種酸化損傷とグアニンとの塩基対の安定化エネルギーを算出し、所属講座の Kino 等の数種の DNA ポリメラーゼを用いた実験結果の説明を試みた。その結果、イミノアラントイン(Ia)、グアニンジヒダントイン(Gh)、スピロイミノダントイン(Sp)、そして Oz の順にグアニンとの安定化エネルギーが低下する、すなわち Oz:G 塩基対は必ずしも安定ではないという結果となり、塩基対の安定性だけでは、Kino らの実験結果が説明できないことが明らかになった。

第3章では前章に引き続いて計算科学的な解析を行い、グアニンとグアニン酸化損傷との塩基対を中心に含む 3 塩基対の DNA 二本鎖モデルの不安定化エネルギーを算出した。その結果、当該塩基対だけでなく、その前後の塩基対の種類によって DNA 二本鎖の安定性が影響を受けること、そして 5'側が A:T で 3'側が G:C の場合をモデルとしてこの隣接する塩基対の両方を考慮すると、G:Oz を含む DNA 二本鎖の歪みは、G:Ia や G:Sp を含む DNA の歪みよりも小さいことが判明した。これは、過去の数種の DNA ポリメラーゼによる損傷乗り越え DNA 合成の効率についての Kino 等の実験結果と一致するものであった。

第4章では、幅広く各種の DNA ポリメラーゼを発現・精製し(一部は市販品を使用)、それらを用いて Oz に対する塩基の取り込みの特異性を調べ、さらに反応速度論的な解析を行った。その結果、REV1 と Pol ζ が Oz を含む DNA の複製に重要であり、前者は Oz に対して C を重合し、遺伝情報の保持に働くことが分かった。一方、後者は Oz に対して G、A、T、C のいずれをも重合し、突然変異を誘発することが分かった。その他の DNA ポリメラーゼ、Pol δ (p125 単体および full complex)、Pol ι 、Pol κ はいずれも Oz に対して低い効率でしか塩基の取り込みを起こさないが、起こした際には、誤った塩基を重合した。

第5章では、Oz を含む塩基対の安定性が DNA の伸長反応にどのような影響を与えるかを、プライマー伸長反応と Oz を含む DNA 二本鎖の熱変性実験で調べた。その結果、DNA ポリメラーゼの種類(Pol β 、Klenow 断片、Pol η)によらず、Oz:G 塩基対を越えて伸長する効率が Oz:C、Oz:A、Oz:T 塩基対の場合よりも高いことが分かった。また熱力学的な安定性においても、Oz:G 塩基対は Oz:C、Oz:A、Oz:T 塩基対よりも有意に高いことが明らかとなった。

第6章では、鋳型 DNA に Oz が連続して存在する場合の各種 DNA ポリメラーゼのプライマー伸長反応への影響を調べた。その結果、Klenow 断片、Pol α 、Pol β 、Pol ι 、REV1 は Oz 連続配列の 3'側の Oz に対して辛うじて一塩基を取り込むが、5'側の Oz に対する塩基の

取り込みは強く阻害されることが判明した。Pol κ は 3'側の Oz に対してでさえ塩基の取り込みが見られなかった。一方、Pol η は 3'または 5'側の Oz で停止し、Pol ζ は誤りがちではあるが、Oz 連続配列を乗り越えた DNA 合成を行えることが分かった。

これらの結果を総合して、Oz が特に真核生物において G:C-C:G トランスバージョンの発生に強く関与していることが示唆された。

1) 論文審査結果の要旨

本論文は、計算科学と生化学・分子生物学を上手く組み合わせることで、グアニン酸化損傷オキサゾロンが、G:C-C:G トランスバージョンによる DNA 点突然変異の発生機序にきわめて重要な役割を果たすことを強く示唆した。また、オキサゾロンを含む DNA の複製には、Pol ζ と REV1 が重要であること、そして前者が点突然変異を誘導するのに対し、後者は遺伝情報の保持に働くことが示唆され、酸化ストレスによる DNA 点突然変異誘導とその制御に新たな端緒を開く可能性があり、意義深い。これらの結論を導くためのデータは、質、量ともに十分であり、また、参考文献を適切に引用しており、理解しやすい論文といえる。

よって本論文は博士(薬学)の学位に相応しいものとする。