

氏 名	キム 金 貴 花
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 3042 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 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	理 学 研 究 科 生 物 学 専 攻
学位論文題目	ホヤおよび線虫の酸化的 DNA 損傷の修復に関わるタンパク質の構造と生物学的機能に関する研究

論文調査委員 (主 査)
教授 米 井 脩 治 教授 片 山 一 道 教授 佐 藤 矩 行

論 文 内 容 の 要 旨

DNA の酸化的塩基損傷はおもに塩基除去修復によって修復される。塩基除去修復は、塩基損傷、AP サイト、ミスマッチャー一本鎖切断の修復に関与している。塩基除去修復は DNA グリコシラーゼによる塩基損傷の DNA からの除去によって開始される。DNA グリコシラーゼは損傷塩基に特異的であり、これまでにそれぞれの酸化的塩基損傷の修復に関与する数種類の DNA グリコシラーゼが同定されている。生物の修復システムを理解するには、新たな修復酵素の同定とともに、既知の修復酵素の生体内で果たす役割や特性を解明することが重要な研究課題である。本研究では、ホヤおよび線虫を用いて DNA 修復酵素の生体内で果たす役割の解明や新たな修復酵素の同定を目的として行われた。

はじめに、カタユウレイボヤでの 8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼの同定と構造および機能に関して研究を行った。Ogg1 はグアニンの酸化的損傷である 8-オキソグアニンを認識し、DNA から除去する DNA グリコシラーゼである。本研究では、ホヤではじめて Ogg1 タンパク質のホモログ (CiOgg1) を同定し、CiOgg1 タンパク質のホヤの組織での分布について調べ、精巣で CiOgg1 が高いレベルで発現する結果を得た。さらに、CiOgg1 の発現を抑制させると発生ができなくなることが観察された。この結果は、これまでに行われたマウスなどの生物での Ogg1 ノックアウト実験では得られなかった結果であった。ホヤでの CiOgg1 タンパク質が生体内できわめて重要な酵素であることを示唆している。

次に、線虫 (*C. elegans*) の cDNA ライブラリーから酸化的 DNA 損傷の修復に関わる新たなクローンを検索した。まず、大腸菌 *mutM mutY* (DNA グリコシラーゼ欠損変異株) に cDNA ライブラリーを導入し、リファンピシン抵抗性への自然突然変異の頻度を相補する候補遺伝子を選択した。その中で、線虫の betaNAC (beta subunit of nascent polypeptide-associated complex) タンパク質をコードする遺伝子 EGD1 (enhancer of GAL4 DNA binding) の導入が大腸菌のリファンピシン抵抗性への突然変異を強く抑制する結果を得た。しかし、8-オキソグアニン、チミングリコール、5-ホルミルウラシル損傷をそれぞれ含むオリゴヌクレオチドに対する DNA 切断活性は検出できなかった。これらの結果から、betaNAC タンパク質は、MutM のような DNA グリコシラーゼとの間に機能的ホモロジーは持っていないが、酸化的 DNA 損傷の修復に何らかの重要な機能を持っていることが分かった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

活性酸素は呼吸の副産物として細胞内で常に生じているが、電離放射線や多くの環境化学物質によっても産生する。活性酸素が DNA に反応すると強い酸化反応をひきおこし、鎖切断を起こしたり、8-オキソグアニンなどの塩基酸化体を生成し、それらが癌、神経障害や老化を起こすものになると考えられている。生物は、このような DNA の非特異的酸化による障害を抑制するため、DNA に生じた損傷を修復する機構を備えている。DNA の酸化的塩基損傷はおもに塩基除去修復によって修復される。DNA グリコシラーゼはそれぞれの損傷塩基を特異的に認識して DNA から除去する、塩基除去修復の過程で最初に働く重要な酵素である。強い突然変異誘発作用を示す 8-オキソグアニンは、ヒト細胞など多くの細胞で、8-

8-オキシグアニン-DNA グリコシラーゼ (Ogg1) によって DNA から除去される。申請者の研究は、生物の発生や老化の過程で起こる活性酸素による障害とその抑制における Ogg1 などの DNA グリコシラーゼによる DNA 修復の役割について明らかにすることを目的として進められたものである。本研究で、申請者は、ホヤと線虫を用いて Ogg1 および新規の 8-オキシグアニン修復酵素の同定を行った。その結果、カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) でのヒト Ogg1 のホモログを同定し、その構造と基質特異性がよく保存されていることを明らかにした。精製した CiOgg1 蛋白質はシトシンと対合する 8-オキシグアニンを特異的に認識できた。申請者は、さらに、受精卵にモルフォリノオリゴを投与して CiOgg1 の発現を抑制すると幼生への発生ができなくなることを観察した。Ogg1 をノックアウトしたマウスでは欠損の表現型が観察されないとするこれまでの報告と比較すると、このホヤでの結果はきわめて興味深い。ただし、その結論を導くためにはまだ多くのより確かな手法での追試が必要であることが指摘された。次に、線虫 (*C. elegans*)、分裂酵母など Ogg1 を持たない生物では 8-オキシグアニンはどのようにして修復されるのか、これが申請者の二番目の研究の背景にあった。そこで、線虫の cDNA ライブラリーから、8-オキシグアニンの修復酵素を欠失した大腸菌が示す高頻度の自然突然変異をレスキューする cDNA を検索した結果、いくつかのクローンを得た。その中で、申請者は nascent polypeptide-associated complex の β サブユニット (betaNAC) をコードする cDNA に注目した。精製した betaNAC 蛋白質は Ogg1 とは異なり 8-オキシグアニンを除去する DNA グリコシラーゼの活性は検出できなかった。この蛋白質の DNA 修復における機能はまだ明らかになっていないが、申請者がこれから取り組む研究課題となるものである。

酸化ストレスに対する DNA 修復酵素の果たす役割や機能などまだ解明されていない課題も多い。その理由の一つは、未同定の修復酵素がまだ存在しており、これらの複数の酵素がお互いにバックアップしているために特定の DNA グリコシラーゼの欠損の影響が明らかにならないことがある。細胞内で DNA グリコシラーゼの活性を持つ未発見の酵素の同定とその機能解析をしない限り、塩基損傷の生物作用も塩基除去修復の機能も部分的にしか解明したことにはならないであろう。また、生物の胚発生、個体発生や老化において DNA 塩基の酸化は不断に起こり、それらは塩基除去修復によって防御されていると考えられている。発生過程における DNA 修復の役割について明らかにしようとする申請者の試みは審査委員の共通した高い評価を得た。

申請者の研究は、DNA 修復の研究に大きな貢献をするものである。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。本論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。