

氏名	なか はら たけ ひさ 中 原 岳 久
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2255 号
学位授与の日付	平 成 12 年 7 月 24 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	大腸菌における GC-CG transversion 型突然変異の抑制機構の研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 山 岸 哲 教 授 米 井 脩 治 教 授 佐 藤 矩 行

### 論 文 内 容 の 要 旨

DNA 複製のエラーに伴うミスマッチや、放射線や活性酸素による塩基損傷によって塩基置換突然変異が誘発される。一方、細胞はこれらのミスマッチや塩基損傷を修復する機構を備えている。これらの修復系の遺伝子の機能が失われると自然突然変異の頻度が増大する。MutS ミスマッチ修復系は、トランジションの原因となるミスマッチはよく認識するが、トランスバージョンの原因となる C-C ミスマッチはほとんど認識できない。このことは、GC→CG の生成を抑制する別の修復系の存在を示唆している。また、活性酸素や放射線などによって GC→CG トランスバージョンの頻度は顕著に増大する。このことは、GC→CG トランスバージョンの原因となる DNA 損傷が存在すること、細胞にはそれを修復する機構があることを示唆している。

申請者は二つの方向からこの修復機構の解明を試みた。その一つは、突然変異の中間段階で生じる C-C ミスマッチを認識するタンパク質の同定、もう一つは、GC→CG トランスバージョンの自然突然変異頻度を増大させるミューテーター株を大腸菌から分離することである。

まず、C-C ミスマッチを認識するタンパク質の存在を大腸菌の抽出液を用いたゲルシフト法で検討した。その結果、C-C ミスマッチに特異的に結合するタンパク質が存在することが確認できた。このタンパク質を同定するため、様々な変異株から得られた抽出液を用いてゲルシフトを行った結果、検出される二本のバンドのうち、よりシフトする方が *mutM* 欠損株では消失した。さらに、MutM を精製し、このタンパク質が C-C ミスマッチに結合することを証明した。もう一方のバンドを形成するタンパク質はこの方法では同定できなかった。そこで、このタンパク質を FPLC を用いて精製した。精製したタンパク質の N 末端のアミノ酸配列を調べた結果、Val-Asp-Lys-Arg-Glu-?-Tyr-Thr-Lys-Glu であった。この配列を大腸菌 ORF データベースで検索した結果、FabA タンパク質のアミノ酸配列と一致した。大腸菌 *fabA* 変異株から調整した抽出液を用いたゲルシフトアッセイでは、対応するバンドの消失が確かめられた。これらの結果から、申請者は MutM, FabA は C-C ミスマッチの修復に関与していると結論した。さらに、酵母およびヒトの OGG1 タンパク質 (MutM ホモログ) も C-C ミスマッチに結合する性質を持つことを明らかにした。

次に、GC→CG トランスバージョンのミューテーター株を作成した。トランスポゾンランダムに大腸菌 CC103 のゲノムに挿入し、得られた約 4 万個のコロニーを P-Gal と X-Gal を含んだグルコース最小培地にレプリカし、パピールを多く生じるコロニーを選択した。この株からゲノム DNA を回収し、トランスポゾンの持つ抗生物質耐性を指標にして、この遺伝子を含む周辺領域をクローニングした。トランスポゾンの末端配列を利用してその境界部分の塩基配列を解析したところ、原因遺伝子は *mutY* 遺伝子であることが分かった。そこで、MutY タンパク質を精製し基質特異性を検討したところ、MutY はこれまで知られていた 8-オキソグアニン (8-oxoG)-アデニンだけでなく、8-oxoG-グアニン塩基対にも結合できた。さらに、MutY は 8-oxoG-アデニン塩基対からアデニンを除去する活性に加えて、8-oxoG-グアニン塩基対からグアニンを除去する活性を持つことを明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

自然突然変異は、DNA複製のエラーによって生じる塩基ミスマッチあるいは自然に発生する活性酸素によって生じる。細胞にはこの種のDNA損傷を修復する様々な経路や防御機構が存在する。しかしながら、G-C塩基対からC-G塩基対への突然変異（GC→CGトランスバージョン）の原因や修復経路はこれまでほとんど理解されていなかった。その自然突然変異頻度はその他の塩基置換に比べて低いので、強い抑制が働いていると考えられる。申請者の研究は、このGC→CGトランスバージョンを抑制する修復経路を解明しようとしたものである。

申請者は、まず、ゲルシフト法を用いてシトシンを含むミスマッチ、とくにC-Cミスマッチに強く結合する二種類の異なるタンパク質の同定に成功した。一つは、MutMであり、もう一つはFabAであることが分かった。MutMは*in vitro*で8-オキソグアニン、チミングリコールなどの塩基酸化体を認識してDNAから除去するDNAグリコシラーゼの活性を持つ。ところが、申請者の研究では、精製したMutMはC-Cのミスマッチを持つDNAを切断しなかった。申請者は、MutMはC-Cミスマッチを認識して結合することができるがミスマッチを修復するためにはDNAを切断する他の酵素が必要であると考察している。つまり、MutMはいくつかのタンパク質で構成されるC-Cミスマッチ修復機構の一要素だと考えている。

酵母およびヒトのOGG1タンパク質は8-オキソグアニンの修復酵素として同定された。本研究は、これらの酵素がC-Cのミスマッチを認識できることを示した。OGG1はアミノ酸配列中に大腸菌MutMとのホモロジーはない。したがって、C-Cミスマッチとの結合は、本来のこれらのタンパク質の機能に依存することを示している。この点については、さらに生化学的な検討が続けられるべきである。また、本研究で明らかになったMutM、FabAの新しい酵素活性が*in vivo*で実際にGC→CGトランスバージョンの抑制に働いていることの実証が少し不足しているが、今後、本人に課せられた問題である。

申請者の研究は、これまでその原因、抑制や修復の機構がよく分からなかったGC→CGトランスバージョンについていくつかの多くの重要な知見を提供した。GC→CGトランスバージョンのミューテーター株を分離することに初めて成功し、MutYタンパク質が8-オキソグアニンとグアニンのミスマッチを修復することによってGC→CGトランスバージョンを抑制することも明らかにした。これらの研究の学問上の意義は大きく、申請者の学術研究に対する熱意と能力の高さが十分に推察できた。よって、本論文は京大博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成12年5月29日添付論文に報告されている研究業績を中心に、関連分野に関する試問を行った結果、適切に解答が得られたので合格と認定した。