

氏 名	よね くら しん いち ろう 米 倉 慎 一 郎
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3211 号
学位授与の日付	平 成 19 年 11 月 26 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 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	DNA 修復酵素 SpNth1 の基質特異性および酸化ストレス誘導性遺伝子の解析

論文調査委員	(主 査) 准教授 張 秋 梅	教 授 佐 藤 矩 行	教 授 今 福 道 夫
--------	--------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

DNA の酸化は、細胞での代謝過程で、あるいは放射線や種々の環境物質によって生じる活性酸素との反応で起こり、8-オキシグアニン (8-oxoG) や5-ホルミルウラシル (5-foU) などの塩基損傷を生成して、突然変異や発がんを起こす原因になる。生物が生存を続けるためにはDNAの酸化を防ぐことが必要である。細胞には、生じた活性酸素の消去、酸化された生体分子の再還元、DNA損傷の修復などのシステムが大腸菌からヒトまでよく保存されている。8-oxoGには強い変異原性があり、大腸菌のMutM, MutYタンパク質、ヒトのOgg1, MYHなどのそれぞれのホモログは、8-oxoGをDNAから除去するグリコシラーゼであり、酸化ストレスによって生じる突然変異を抑制している。しかし、分裂酵母にはMutMやOgg1のホモログは存在しない。このような種では、8-oxoGをどの酵素が認識してDNAから除去しているのか。MutMやMutYの働きを別のグリコシラーゼが相補している可能性がある。申請者は、分裂酵母のNthホモログ (SpNth1) が、5-foUおよび5-ヒドロキシメチルウラシルに対して強いグリコシラーゼ活性をもつことを見だし、さらに、8-oxoGをも基質とすることを証明した。SpNth1遺伝子が大腸菌の*nth nei*株に導入すると、この二重変異株の活性酸素に対する高感受性と、高い自然突然変異を抑制することを見いだした。一方、細胞内で過剰の活性酸素が発生すると、細胞は、そのシグナルをDNAに伝達して必要な防御遺伝子の発現を誘導する。大腸菌ではスーパーオキシド (O_2^-) に対する応答はSoxRSの二つのタンパク質によって制御されている。申請者は、新規に同定した複数のSoxRSレギュロン (制御下の遺伝子) について詳しい解析を行い、最も重要である*soi-9*の本体を解明した。この遺伝子は染色体地図上約30分近くに位置する*ydbK*で、この遺伝子を欠損する変異株は O_2^- 増産剤であるメナジオンに高い感受性を示した。この遺伝子はNADPHビルビン酸オキシドリダクターゼをコードし、酸化ストレスから細胞を防御する重要な役割を果たしていることが明らかになった。

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産生しているが、電離放射線や多くの環境化学物質によっても細胞内で生成する。活性酸素がDNAと反応すると強い酸化反応をひき起こし、鎖切断や酸化的塩基損傷を生じる。とくにグアニンの酸化体である8-オキシグアニン (8-oxoG) は強い突然変異誘発作用があり、活性酸素の生物作用における代表的なDNA損傷の一つである。多くの生物では8-oxoG-DNAグリコシラーゼ (Ogg1, 大腸菌ではMutM) が8-oxoGをDNAから除去し酸化されたDNAを修復する。ところが、分裂酵母*S. pombe*ではOgg1, MutMのホモログはともに存在していない。しかも、*S. pombe*で同定されているDNAグリコシラーゼはエンドヌクレアーゼIIIのホモログであるNth1だけであった。そこで、申請者は、*S. pombe*のような生物では、SpNth1が大腸菌やヒトのNth1に比べてより幅広い基質特異性を持ち、8-oxoGを修復することができるのではないかと考えて、SpNth1遺伝子をクローニングし、酵素タンパク質を精製した。その結果、SpNth1がチミンのメチル基の酸化体である5-ホルミルウラシルおよび5-ヒドロキシメチルウラシルをDNAから除去すること、さらに、ピリミジン酸化体に比べると活性は少し低い、8-oxoGを認識してDNAから除去できることを初めて見

いだした。とくに、相手側がA、Gのとき強い活性を示すことから、鋳型鎖のA、Gの向かい側に転入された8-oxoGを修復して、その突然変異作用を抑制することが示唆され、申請者の研究はDNA修復の機構解明に重要な知見を提供したと評価された。

次に、申請者は、酸化ストレスに応答する遺伝子発現の誘導の機構解明に取り組み、大腸菌に特殊なミューファージを感染させる方法を考案して、複数の新規のスーパーオキシド誘導性遺伝子（*soi* 遺伝子）の同定に成功した。そのなかで、とくに重要な *soi-9* 遺伝子を詳しく解析し、*soi-9* 遺伝子が *ydbK* 遺伝子と同じであること、その遺伝子産物はピルビン酸オキシドリダクターゼであることを明らかにした。さらに、*ydbK* 遺伝子を欠損する細胞が活性酸素に高い感受性を示すことから、申請者は、*ydbK* 遺伝子が活性酸素防御において重要な機能を果たすと結論している。活性酸素に対する細胞の防御システムでは、まだ不明な点が多く、申請者の見いだしたこれらの知見は、活性酸素の生物作用とその防御酵素の研究に大きな貢献であると審査委員が一致して高く評価した。

申請者の研究は、DNA修復の研究、とくに酸化的塩基損傷を認識するDNAグリコシラーゼの反応機構および細胞の酸化ストレス応答に対する防御と誘導機構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。本論文および参考論文に報告されている研究業績を中心にして、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。