

氏 名	やま だ まさ き 山 田 真 希
学位(専攻分野)	博 士 (エネルギー科学)
学位記番号	エ ネ 博 第 53 号
学位授与の日付	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	エ ネ ル ギ ー 科 学 研 究 科 エ ネ ル ギ ー 社 会 ・ 環 境 科 学 専 攻
学位論文題目	環境因子—酸化窒素の生体内動態に関する分子論的研究

(主 査)
論文調査委員 教 授 牧 野 圭 祐 教 授 尾 形 幸 生 教 授 吉 川 暹

論 文 内 容 の 要 旨

遺伝情報を担う DNA は様々な環境因子により損傷を受け、この蓄積は発ガンを始めとする種々の遺伝病の要因である。環境汚染因子としてよく知られている一酸化窒素 (NO) は、重要な生理活性化合物として生体内で生産されることが明らかにされているが、炎症部位等で局所的に多量に生産される NO が DNA 損傷を引き起こし発ガン密接に関係する、という見方がある。本研究論文は、NO によって DNA 中に生じる新規損傷の発見、生成メカニズム、催奇性・細胞死との関係、細胞内生成検出法開発、を分子レベルで論じた結果をまとめており、五章からなっている。主な内容は以下の通りである。

第一章は序論で、NO の自然界での発生、生体内での生成機構と生理活性を概説し、一方で反応性の高いフリーラジカルとしての特徴を示し、溶存酸素との反応により、酸化剤である二酸化窒素 (NO_2) や強力なニトロソ化剤として知られる三酸化二窒素 (N_2O_3) を生じる機構を示している。これらの窒素酸化物による DNA 分子損傷に関する過去の報告を網羅し、これらを背景に研究の目的を述べている。

第二章では、NO あるいは同様に N_2O_3 を活性種として生じる亜硝酸による DNA 損傷に関する研究結果を述べており、(1)デオキシシチジン (dCyd) のデオキシウリジンへの変化の過程で、ジアゾエート中間体 (dCyd-diazoate) を経ること、(2)1の結果を基に、デオキシグアノシン (dGuo) からの新規損傷デオキシオキザノシン (dOxo) 生成における中間体が dGuo-diazoate であることを発見し、(3)dGuo から dOxo およびデオキシキサントシン (dXao) を生じる反応機構が、従来から知られていた脱アミノ化反応とは異なり、dGuo-diazoate 中間体を経る極めて複雑な機構によるものであることを見いだして、全反応機構を解明している。また、(4)実際の発ガン系に密接に関係するガン抑制遺伝子 p53 遺伝子 CpG site の構成成分の一つ 5-メチルデオキシシチジンからもジアゾエート体が生成し、新規な塩基対変異機構が存在しうること、(5)塩素イオン存在下では dGuo-diazoate から 2-クロロイノシンが生成すること、(6)酸素混合比が大きく NO_2 が主活性種の場合、dXao に加え、8-ニトログアニン、8-ニトロキサントシン、 N^2 -ニトロデオキシグアノシン等のニトロ化合物が、ジアゾエート中間体を経由しない副反応によって生じること、等を明らかにし、NO による発ガンとの関係を詳しく報告している。

第三章では、第二章で明らかにした DNA 損傷に起因する直接的塩基対変異誘発および核内架橋形成による間接的効果に関する研究結果を述べており、(1)dOxo の N-グリコシド結合は dGuo と同程度で dXao より44倍も安定であり、既存修復酵素では認識・除去されないため、DNA 中で長期間保存されること、(2)dOxo 三リン酸が、DNA ポリメラーゼによる鎖伸長時に、鋳型対向鎖の C および T の向かい側に取り込まれ、G・C → A・T 塩基対変異を誘発する可能性のあること、(3)dOxo がアミノ基をもつ核内に存在する化合物と架橋反応し、複製阻害や塩基対変異を誘発する可能性が高いこと、(4)ジアゾエート中間体も同様にアミノ基をもった化合物と反応し、複製阻害や塩基対変異を誘発する可能性が高いこと、等を明らかにし、発ガンおよび細胞死との関係を報告している。

第四章では、細胞内で生成した dOxo 検出法の開発結果を述べており、キャピラリー電気泳動法を用いた検出法、さらに

はアミノ基を有する蛍光プローブを用いたラベル化による dOxo の高選択的・高感度検出法を開発し、結果をまとめている。
第五章では、本論文の各章で得られた知見を総括して結論としている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、主要環境汚染因子でありかつ生体内で重要な生理活性化合物として生産される一酸化窒素 (NO) と遺伝子との相互作用について、生成する DNA 中の新規損傷、損傷生成機構、損傷の塩基対変異への影響、細胞内生成検出を分子レベルで実験的に研究した成果をまとめたものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

1) NO (あるいは同様に三酸化二窒素 (N_2O_3) を活性種として生じる亜硝酸) によるデオキシシチジン (dCyd) のデオキシウリジンへの既知変化過程では、ジアゾエート中間体 (dCyd-diazoate) が生成することを発見し、この結果を基礎に、デオキシグアノシン (dGuo) からの新規損傷デオキシオキザノシン (dOxo) およびデオキシキサントシン (dXao) への変化の過程でも、dGuo-diazoate を中間体とした反応が支配することを発見した。これらの新しい機構の解明によって、NO による損傷の形成が、従来から受け入れられていた単純な脱アミノ化反応によるものではなく、ジアゾエート中間体を経る極めて複雑な反応機構によるものであることを発見して、全反応機構を解明した。ジアゾエート中間体を経る反応は、 N_2O_3 を活性種とした NO による遺伝子損傷すべてに共通する主反応である。また、この反応機構が、実際の発ガンに密接に関係するガン抑制遺伝子 p53 遺伝子中に存在する CpGsite の構成成分の一つ 5-メチルデオキシシチジンにも適応されることを明らかにし、この遺伝子中に新規な塩基対変異機構が存在していることを明らかにした。さらには、塩素イオン存在下では dGuo-diazoate から 2-クロロイノシンが生成することを発見し、NO が従来考えられていたよりも発ガンと遙かに密接に関係することを明らかにした。

2) 酸素混合比が大きいときに生じる NO_2 が主活性種の場合は、dXao が生成するのに加え、8-ニトログアニン、8-ニトロキサンチン、 N^2 -ニトロデオキシグアノシン等のニトロ化合物が、ジアゾエート中間体を経由しない副反応によって生じることを明らかにし、1 の結果と併せて、NO による遺伝子損傷の全貌を明らかにした。

3) dOxo の N-グリコシド結合が dGuo と同程度に安定で dXao より 44 倍も安定であり、しかも既存修復酵素では認識・除去されないため、DNA 中で長期間保存される重篤な傷害である可能性を明らかにした。また、dOxo 三リン酸合成法を開発し、これを用いて DNA ポリメラーゼによる鎖伸長反応を行い、dOxo 三リン酸が鋳型対向鎖の C および T の向かい側に取り込まれ、 $\text{G} \cdot \text{C} \rightarrow \text{A} \cdot \text{T}$ 塩基対変異を誘発する可能性のあることを明らかにした。さらには、dOxo がアミノ基と高い反応性をもつことを明らかにし、核内に存在する化合物の多くがアミノ基をもつことから、さらに高い塩基対変異能をもつことを明らかにした。

4) ジアゾエート中間体が dOxo と同様にアミノ基と高い反応性をもつことを明らかにし、核内化合物と架橋反応することによって塩基対変異ならびに複製阻害に深く関係することを明らかにした。3 および 4 の結果は、亜硝酸培地において Uvr エンドヌクレアーゼ欠損株が示す高い突然変異率と低い生存率を初めて理論的に説明したものである。

5) 細胞内で生成した dOxo 検出法として、高い pH 域で行うキャピラリー電気泳動法を提唱し、さらには dOxo のアミノ基との反応性を利用して、アミノ基を有する蛍光プローブを用いた DNA の直接ラベル化と酵素分解の組み合わせによる高選択的・高感度検出法を開発した。

以上、本論文は、一酸化窒素と発ガンとの関わりに分子レベルで取り組み、生体にとって重篤な遺伝子損傷生成の可能性を初めて明らかにしたものであり、得られた成果は学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって本論文は、博士 (エネルギー科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 14 年 1 月 18 日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。