

氏 名	はし ぐち かず なり 橋 口 一 成
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2508 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	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	大腸菌と出芽酵母における DNA グリコシラーゼの基質特異性に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 今 福 道 夫 教 授 佐 藤 矩 行 教 授 米 井 脩 治

論 文 内 容 の 要 旨

塩基除去修復システムは多くの損傷 DNA の修復に関与する除去修復の一つであり、損傷塩基、AP サイト、塩基ミスマッチ、そして一本鎖切断の修復に関与している。塩基除去修復の初期反応で働く DNA N-グリコシラーゼは損傷塩基などを特異的に認識し、塩基とデオキシリボースをつなぐ N-グリコシド結合を加水分解する。このような DNA グリコシラーゼは損傷特異的であるが、その基質はただ一つではない。さらに個々の基質は複数の DNA グリコシラーゼによって認識、除去されることもわかってきた。今後、大腸菌からヒトにまで高度に保存されている塩基除去修復システムを理解していく上で、DNA グリコシラーゼの基質特異性を明らかにしていくことは大変重要なことであると申請者は考えた。そこで、本研究では、まず大腸菌と出芽酵母を用いて、既知の DNA グリコシラーゼにおける基質特異性を検討することとした。

申請者は、まず初めに大腸菌の MutY タンパク質の 2-ヒドロキシアデニン (2-ohA と略す) に対する修復活性について調べた。2-ohA はアデニンの酸化的損傷の一つで強い突然変異原性がある。しかし、この損傷を DNA から除去する修復酵素はまだ同定されていなかった。申請者は、この酸化的塩基 2-ohA を 1 か所だけ含む 24-mer のオリゴヌクレオチドを化学合成し、これを用いてゲルシフトアッセイを行なったところ、2-ohA/T を除く 2-ohA/G、2-ohA/A、2-ohA/C それぞれのミスペアへの MutY タンパク質の特異的な結合活性が検出された。また DNA 切断アッセイにより、MutY タンパク質が DNA 中の 2-ohA/G ミスペアから 2-ohA を除去する DNA グリコシラーゼ活性をもつことがわかった。この結果から、細胞内のヌクレオチドプールで dATP の酸化によって生じた 2-ohA が DNA 複製の際にグアニンの向かい側に取り込まれた場合、生じた 2-ohA/G ミスペアから 2-ohA を除去することによって MutY タンパク質は突然変異を抑制することを申請者は提唱した。

次に、出芽酵母における酸化損傷塩基 8-オキシグアニン (8-oxoG) の新規の修復酵素を同定した。野生株の抽出液から 8-oxoG を含む DNA に対する 2 種類の結合タンパク質が検出された。その 1 つは Msh2-Msh6 タンパク質によるものであったが、もう 1 つはこれまでに同定されている DNA グリコシラーゼとは異なる種類の新規の 8-oxoG 修復酵素であることがわかった。

さらに G:C → C:G 突然変異の要因となる C/C ミスマッチを修復する DNA グリコシラーゼについて調べた。大腸菌 MutM タンパク質は DNA 中の C/C ミスペアへ結合する活性をもつこと、さらにこのミスペアからシトシンを除去する DNA グリコシラーゼ活性も有することを明らかにした。本研究で取り扱った MutM、MutY タンパク質は従来、8-oxoG を特異的に認識する DNA グリコシラーゼであるとされてきたが、申請者の研究は、これらの酵素がさらに幅広い基質特異性をも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る塩基酸化体

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。塩基除去修復システムは多くの損傷 DNA の修復に関与する除去修復の一つであり、その初期過程で働く DNA グリコシラーゼは塩基酸化体など認識し、DNA からそれらを除去する。DNA グリコシラーゼの作用は損傷の種類に特異的であるが、ただ一つではない。しかも、個々の基質は複数の種類の DNA グリコシラーゼによって認識されることが最近になって明らかになってきている。原核生物から真核生物に高度に保存されている DNA グリコシラーゼの反応機構や生物学的意義を理解していく上で、DNA グリコシラーゼの基質特異性を解明することは重要である。申請者の研究は、まず大腸菌と出芽酵母を用いて、この基質特異性の問題について検討したものである。

申請者は、まず初めに大腸菌の MutY タンパク質の 2-ヒドロキシアデニン (2-ohA) に対する修復活性を調べた。この損傷を DNA から除去する修復酵素は大腸菌でもヒト細胞でもまだ同定されていない。申請者は、この 2-ohA を任意の部位に 1 か所だけ含む 24-mer のオリゴヌクレオチドを化学合成し、これを用いてゲルシフトアッセイを行なったところ、2-ohA/G, 2-ohA, 2-ohA/C の塩基ミスマッチへの MutY タンパク質の特異的な結合活性が検出された。さらに、MutY タンパク質が DNA 中の 2-ohA/G ミスペアから 2-ohA を除去する DNA グリコシラーゼ活性をもつことを明らかにした。申請者は、これらの結果から、細胞内で生じた 2-ohA が DNA 複製の際に G の向かい側に取り込まれた場合、2-ohA/G ミスマッチから 2-ohA を除去することによって突然変異を抑制しているというモデルを提唱した。

申請者は、さらに G:C → C:G 突然変異の要因となる C/C ミスマッチを修復する DNA グリコシラーゼについて調べた。GC → CG トランスポージョンの原因やその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 トランスポ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。その結果、大腸菌の MutM タンパク質は DNA 中の C/C ミスペアへ結合し、このミスペアからシトシンを除去する DNA グリコシラーゼ活性を有することを明らかにした。申請者の研究は、この酵素がさらに幅広い基質特異性をもつことを明らかにした。

申請者は、さらに、酸化損傷塩基 8-オキシグアニン (8-oxoG) を認識する出芽酵母の新規の修復酵素を同定した。野生株の抽出液から 8-oxoG を含む DNA に対する 2 種類の結合タンパク質が検出された。その 1 つは Msh2-Msh6 タンパク質によるものであったが、もう 1 つはこれまでに同定されている DNA グリコシラーゼとは異なる種類の新規の 8-oxoG 修復酵素であることを明らかにした。

本研究で明らかになった基質特異性が *in vivo* で実際に突然変異の抑制に働いていることの実証が少し不足しているが、DNA 修復研究における意義は大きい。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、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。