

論文内容の要旨

申請者氏名 愿 山 郁

遺伝情報の担い手であるDNAが安定に保持されることは、種の存続を保証するために必須である。しかし、DNAに全く変化がなければ進化はありえず、生物は長い歴史の中で生じた様々な環境の変化に対応しきれなかったと考えられる。つまり、DNAは安定に保持される一方で少しずつ変化していく必要がある。自然突然変異とは通常の生育環境下で希に生じる変異の事であるが、これこそがDNAが変化する原動力となってきた。自然突然変異の主な原因は、DNAポリメラーゼによる複製エラーや、細胞内の代謝産物による自然DNA損傷であると考えられている。しかし、これらの原因は直接自然突然変異に結びついているのではない。細胞内には変異を抑制する機構が何重にも備えられているために、これらをすり抜けて残ったわずかな変異が自然突然変異として生物に影響する。このことは、自然突然変異の発生頻度がほとんどの生物で極めて低く保たれていることを意味しており、これまではこの頻度の低さ故に自然突然変異の解析が難しく、その詳細に関しては不明な点が多かった。本研究ではこのような頻度の低い自然突然変異を体系的に多数分離する事が可能になったことから、野生型大腸菌で生じる自然突然変異の特異性と発生メカニズムの検討を目的として実験を行った。これまで、自然突然変異の研究は主にDNAポリメラーゼが引き起こす複製エラーと、細胞活動中に生じる活性酸素や、代謝産物による自然DNA損傷に注目して行われてきた。しかし、実際の細胞内のDNA上では、細胞の維持に必須である様々な反応が盛んに行われているため、自然突然変異に影響を与える因子は他にも存在すると考えられる。例えば、生きている細胞内のDNA上で最も頻繁に働いている酵素はRNAポリメラーゼであり、複製装置と転写装置の衝突や、転写によるDNAのトポロジー変化は、複製フォークの進行などに少なからぬ影響を与えていると考えられる。そこで本研究では、複製フォークの進行方向や転写が自然突然変異の発生に及ぼす影響を調べることによって、自然突然変異が発生するメカニズムについての新たな知見が得られる事を期待し実験を行った。

まず、複製フォークの進行方向に対する転写の方向が自然突然変異の発生に及ぼす影響について検討した。標的遺伝子 (*rpsL* 遺伝子) の転写の向きと複製の向きが同じプラスミドと、互いの向きが逆のプラスミドを作製し、それぞれを野生型大腸菌の中で複製させてから抽出・精製した。次にそのプラスミドDNAを検出用の大腸菌に導入し、標的遺伝子に変異が生じたプラスミドの割合を調べて自然突然変異の発生頻度を測定した。さらに変異体を塩基配列レベルで解析し、変異の種類と部位の同定も行った。その結果、配列置換変異といった特殊な複製エラーに起因する変異は、複製の方向に依存して発生していることが明らかとなった。これは転写の影響と言うよりは、複製方向の違いによって、リーディング鎖合成されるDNA鎖が異なる事に依存した現象であると考えられた。このことは配列置換の発生メカニズムを考える糸口となり、複製装置が停止することが

引き金となって生じる、不完全な逆向き反復配列内での「テンプレートスイッチモデル」を提起した。また、複製の向きが標的遺伝子の方向に対して逆向きの時にのみ、*rpsL* 遺伝子の83番目にAが付加する一塩基フレームシフト変異 (83+A) が多数検出されたことから、この変異は複製の方向に強く依存して生じていると考えられた。さらなる解析からこの変異は、配列置換と同様のメカニズムで生じていることが強く示唆された。これらの結果から、複製に対する転写の向きの違いは自然突然変異の発生に大きな影響を与えないが、複製方向の違いによってリーディング鎖合成されるDNA鎖が異なることは、配列置換変異の発生に影響を与えている事が示唆された。また、一塩基フレームシフトの中にも配列置換と同じメカニズムで生じる変異が含まれていることが明らかになったことから、複製の方向に影響して生じる自然突然変異の中には、配列置換変異型の変異が占める割合が多いと考えられた。

次に転写強度の違いが自然突然変異の発生に与える影響について調べた。転写調節が可能なアラビノースプロモーターの下流に標的遺伝子である *rpsL* 遺伝子を配置したプラスミドを作成して、野生型大腸菌内で転写が活発な時と抑制されている時、また転写と複製の方向が同じ時と逆の時に生じる自然突然変異について解析した。アラビノースプロモーターを用いて転写を誘導した場合と抑制した場合に生じた変異を比較した時には、複製と転写の向きが同じでも逆でも、転写による大きな違いは見られなかった。次にアラビノースプロモーターよりも転写活性が強い *rmB* プロモーターを用いて同様の実験を行ったところ、複製と転写の方向が同じ場合には、転写の強さに依存して *rpsL* 遺伝子の79番目のTがGに変化する塩基置換 (79T→G) の頻度が40倍以上上昇し、また複製と転写の方向が逆の場合には83番目にAが付加する変異 (83+A) の頻度が10倍上昇していることが明らかになった。前述したように、83+A変異は配列置換型の変異であることがわかっており、また79T→G変異に関しても、新たに配列置換型の変異である可能性が高いことが示されたため、強力な転写はある特異的な配列置換の頻度を上昇させていると考えられた。これは転写の頻度が上昇すると複製装置が停止しやすくなる状況が増え、テンプレートスイッチによる複製エラーが誘発されたためではないかと推測される。以前に我々の研究室では、ミスマッチ修復が1または2塩基が変化するタイプの配列置換変異を修復出来ることを明らかにしていたが、予想しなかったことに、転写によって誘発されていた配列置換型の79T→Gや83+A変異は、ミスマッチ修復によって直されないという結果を得た。このことは、これら二つの変異の中間体は損傷を含んだミスペアを形成しているために、ミスマッチ修復によって直されない事を意味しているのではないかと考えられ、転写とDNA損傷が何らかの関わりを持っている可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 愿 山 郁

突然変異はゲノム情報の維持および生物進化を考える上で最も基本的な問題である。また、癌や各種の遺伝病などの遺伝子疾患はヒトゲノム上での様々な遺伝子に生じた突然変異が原因となっている。これらのことから、突然変異の発生や制御の分子機構の解明は生物学上の問題にとどまらず医学の上でも重要な課題となっている。本論文は、大腸菌細胞を用いて自然突然変異の発生におよぼす複製フォークの進行および転写の影響を明らかにすることを目的として、新たな実験・解析系の開発とそれらを用いた自然突然変異のスペクトラム解析を行ったもので、以下の成果をあげている。

1) 複製フォークの進行方向に対する変異検出用の標的遺伝子の方向が異なる二種類のプラスミドを作成し、それらの細胞内での増幅に伴って発生する自然突然変異の頻度および変異の部位や種類について大規模な解析を行った。その結果、ほとんどの種類の突然変異の発生が複製フォークの進行方向に影響を受けることを明らかにした。

2) 上記の解析の過程で、配列置換変異の極性が複製フォークに強く依存することを見出し、配列置換発生の分子モデルとしてリーディング鎖合成の伸長末端がラギング鎖合成の鋳型にスイッチする「鋳型スイッチモデル」を提唱した。

3) 野生型大腸菌で発生する一塩基フレームシフト変異の種類や分布を詳細に解析し、それらの内で発生頻度の高いものは配列置換と同様のメカニズムで発生していることを明らかにした。さらに、これらはミスマッチ修復機構により修復されないことを示し、通常の複製エラーとは異なる前変異損傷に由来することを明らかにした。

4) 標的遺伝子の転写レベルを3段階に制御した状態でプラスミドを増幅させる場合での突然変異の発生を解析する実験系を確立した。この系を用いて自然突然変異の解析を行った結果、ミスマッチ修復が修復することができる複製エラーの発生には転写レベルの違いは大きな影響を及ぼさないが、野生型大腸菌での自然突然変異には極めて高い転写レベルの時に初めて発生する種類の変異が存在することを明らかにした。これらの変異は配列置換型のメカニズムで発生しており、ミスマッチ修復により抑制されないことも示した。

以上のように、本論文は大腸菌野生株の自然突然変異の発生に関して世界で初めて体系的な解析を行い、それらの構造的特徴や発生機序を詳細に明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。