

## 論文内容の要旨

申請者氏名 坂井 亜紀子

突然変異、特に自然突然変異の発生は生物進化の原動力であると同時に、遺伝情報の正確な伝達を脅かすことにより細胞機能の低下や欠損、癌や遺伝病などの各種の疾病の原因となっている。したがって、自然突然変異の発生原因や発生過程の解明は生物学のみならず医学においても重要な課題となっている。しかしながら、自然突然変異の起源については不明な点が多い。これまでの研究から、自然突然変異の原因となる前変異損傷の発生には自然放射線や化学変異原などの環境変異原の関与はほとんどなく、細胞に内在する何らかの要因が関与すると考えられている。この内在性の要因として、研究の初期には DNA 複製の際のエラーが注目されたが、複製エラーに特異的に働く mismatches 修復によりほぼ完全に修復されることから、複製エラーは自然突然変異の主要な発生原因でないことが判明した。複製エラー以外の前変異損傷については、DNA 中の塩基が細胞内の代謝産物によって化学変化を起こした自然 DNA 損傷の可能性が考えられるが、細胞にはこれらの自然 DNA 損傷に対する様々な DNA 修復機構が備わっており、実際に自然 DNA 損傷が自然突然変異の発生にどの程度の寄与をしているのかは不明であった。本論文では、大腸菌の *rpsL* 遺伝子を標的とした前進突然変異検出系を用いて、細胞内で生じる酸素ラジカルによる酸化 DNA 損傷が自然突然変異の発生にどのような寄与をなしているのかを検討し、酸化 DNA 損傷に起因する自然突然変異の性格付けを行っている。まず、超嫌氣的培養環境を作出し、その環境下で培養した大腸菌では水酸ラジカルに起因する 8-oxo グアニン損傷が生じないことを示した。次に、その超嫌氣的培養条件で培養した大腸菌で生じる自然突然変異の解析を行い、通常の大気中で培養した大腸菌での自然突然変異の発生頻度や変異の種類、発生部位の特異性と比較することにより、酸素依存的な自然突然変異の存在を明らかにした。さらに、詳細な解析を行った結果、酸素に依存する自然突然変異は主として塩基置換であり、特に *rpsL* 標的遺伝子配列中の 3 カ所の特定部位に高頻度で発生するホットスポット型塩基置換全々と、配列中にランダムに発生する非ホットスポット型変異の内、A:T→T:A および G:C→C:G 変異が大部分を占めていることを見いだしている。好氣的細胞増殖での自然突然変異の約 8 割が酸素に依存していた。また、これらの酸素依存的な自然突然変異が酸素ラジカルに依るものかどうかを検証するために、大腸菌の過酸化水素処理により誘導される突然変異の解析を行っている。その結果、ホットスポット型変異の一部と A:T→T:A および G:C→C:G 変異は過酸化水素により生じる水酸ラジカルにより誘導されることが分かった。以上の結果より、自然突然変異の少なくとも一部分は酸素呼吸で生じる酸素ラジカル、特に水酸ラジカルによる酸化 DNA 損傷に起因することが強く示唆された。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 坂井 亜紀子

ヒトの高発癌家系や早老症の原因遺伝子の解析などから、発癌や老化の原因として酸素ラジカルによる酸化 DNA 損傷および突然変異が注目されている。しかしながら、生体内で酸素呼吸により生じる酸素ラジカルが自然 DNA 損傷をどの程度引き起こしているのかや、それらが生じているとして自然突然変異の発生にどの程度の寄与をなすのかは不明であった。申請者は、酸素ラジカルによって生じる 8-oxo グアニンの修復機構に欠損を持つ大腸菌ミューテーター変異株を利用することにより、生体内で生じる酸素ラジカルが確かに高いレベルの酸化 DNA 損傷を発生させていることを世界で初めて証明することに成功している。これは、申請者が作出した超嫌氣的培養環境を用いて成し遂げられた大きな成果である。さらに、申請者は、この超嫌氣的培養環境で培養した大腸菌で発生する自然突然変異を詳細に解析することにより、自然突然変異の発生に酸素呼吸がどのような影響を及ぼしているかを解明することが可能であろうと考え、長年にわたり解決が困難であった問題に挑戦した。その結果、以下の成果をあげている。

1) 酸素に依存して発生する自然突然変異の存在を初めて明らかにし、それらの大部分が塩基置換変異であることを発見した。申請者が解析に用いた *rpsL* 標的遺伝子配列で生じる好気細胞増殖での自然突然変異の約 8 割が酸素に依存していた。

2) 酸素に依存する塩基置換変異には、*rpsL* 標的遺伝子配列中の 3 カ所の特定部位に高頻度で発生するホットスポット型塩基置換全々と、配列中にランダムに発生する非ホットスポット型変異の内、A:T→T:A および G:C→C:G 変異が含まれることを明らかにした。

3) 酸素に依存して発生する自然突然変異の大部分は大腸菌を過酸化水素処理することにより誘発されることを示し、酸素依存的塩基置換変異は水酸ラジカルによる酸化 DNA 損傷に起因する可能性が高いことを確認した。

4) これまでに見いだされている自然突然変異の抑制機構の特異性を考慮することにより、自然突然変異として現れてくる自然 DNA 損傷は発生頻度が低い稀な種類の DNA 損傷であり、細胞にはそのような低頻度にしか発生しない損傷に対しては抑制機構を発達させていない可能性を考察した。

以上のように、本論文は自然突然変異の起源に関する画期的な発見を行ったもので、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。