

論文内容の要旨

申請者氏名 藤 井 慎 吾

原核および真核細胞の DNA 複製酵素による複製エラーについては、それらの高い忠実度およびバックグラウンド変異の低い鋳型 DNA の調製が困難なために、試験管内 DNA 複製系での解析がほとんど進んでいない。言い換えると、バックグラウンド変異の十分に低い鋳型 DNA の調製ができれば、複製エラーの検出が可能となる。従来のファージミドを用いた鋳型となる一本鎖環状 DNA (ssDNA) を生物学的に調製する方法では、バックグラウンドの変異頻度を十分に下げることができない。しかし、細胞内で増幅した二本鎖のプラスミド DNA (dsDNA) の状態なら、バックグラウンドの変異頻度を十分に下げることができる。そこで、dsDNA を鋳型とする試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系 (*oriC* 系) と *rpsL* 前進突然変異検出系とを組み合わせ、大腸菌の複製酵素である DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素 (DNA pol III HE) によって誘発される複製エラーの検出を試みた。この産物 DNA の変異頻度は 1.9×10^4 であり、鋳型 DNA のバックグラウンド変異と比較して 50 倍の変異頻度の上昇が観察された。さらに、これらの変異の内容を塩基配列レベルで解析したところ、複製エラーに起因する突然変異としては同じ塩基の並んだラン配列上での一塩基フレームシフトが最も高頻度に発生していることが明らかになった。その次に高頻度に発生する変異は塩基置換であったが、それらの発生部位や種類から大部分は鋳型上の損傷塩基に起因して誘発されたものと予想された。その他に二塩基フレームシフト、大きな欠失、重複、配列置換が検出され、鋳型 DNA との比較からこれらの変異は複製反応中に誘発された変異であると推定された。これらについてもほとんどが鋳型 DNA の特定の配列、特に繰り返し配列を介して発生していた。

oriC プラスミド複製系では複製エラーが発生する際に二本鎖 DNA のどちらの配列を鋳型にして生じたのかは不明であるため、ssDNA を鋳型にした新しい複製エラー検出系を開発した (二連続 ssDNA → dsDNA 複製系)。しかしながら、この実験系で検出された変異のうち、塩基置換と一塩基フレームシフトの大部分は鋳型上の損傷塩基に起因して誘発されたものであると推定された。この二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で誘発された変異と *oriC* プラスミド複製系で誘発された変異とを比較すると、少なくとも一塩基フレームシフトの忠実度は複製フォークの方が低かった。特に、ラン配列での +1 フレームシフトは、プライマー伸長反応に比べて複製フォークでは 23 倍も忠実度が低下していた。この結果から、同じ複製酵素を用いても複製様式の違いが複製酵素の忠実度に影響を与えることが強く示唆された。さらに、この新しい実験系を用いて校正機能が欠損した複製酵素による複製エラーについても詳細な解析を進めた。その結果、校正機能が働く前の DNA ポリメラーゼによるミスペアの形成には極めて強い鋳型配列特異性が存在することが明らかになった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 藤 井 慎 吾

本論文は大腸菌の複製装置および複製酵素によるDNA複製の忠実度を生化学的に解析したものである。自然突然変異の発生には様々な要因が関与するが、中でもDNA複製装置による染色体複製の際の複製エラーがもっとも重要な発生原因であると考えられる。複製エラーはさらに3つの異なる要因により発生することが知られており、その一つは複製装置のDNAポリメラーゼによる合成エラーである。この種の複製エラーは細胞内の修復機構、特にミスマッチ修復系により極めて高い効率で取り除かれ、次の回の複製で突然変異に固定されるものは極めて低頻度であることが明らかにされている。複製エラーを誘発する残りの要因は、細胞内での反応性に富む中間代謝物質によるDNAおよび基質ヌクレオチドの自然損傷である。これらは、DNA複製に参画する前に細胞内の修復機構や変異原性ヌクレオチド浄化機構により除去され、複製エラーの発生が未然に防がれていることが知られている。このように、細胞には多数かつ多様な変異抑制機構が存在しており、そのために自然突然変異は極めて低い頻度に保たれている。近年のミューテーター遺伝子群およびそれらの遺伝子産物の解析から、これらの変異抑制機構の生化学的プロセスや発がんや細胞死における重要性などが次々と明らかにされている。しかしながら、複製エラーの発生機構そのものについては極めて知見が少ない。その最も大きな理由は、細胞内に存在する変異抑制機構が極めて多数のパスウェイから成るためにミューテーター変異株での突然変異の解析は変異抑制機構の内の一つあるいはいくつかのパスウェイの欠損の効果を調べるに留まらざるを得ないからである。このことから、*in vitro*でのDNA複製系で生じる突然変異を調べるのが有効なアプローチと考えられてきた。しかし、これまでの試験管内DNA複製系では鋳型に用いる単鎖環状ファージDNA標品中に含まれる高頻度のバックグラウンド変異のために、それ自身高い複製忠実度を持つ複製型DNAポリメラーゼの複製エラーに起因する突然変異は検出することが不可能であった。本論文では、二本鎖環状のプラスミドDNAを用いたoriCプラスミド試験管内複製系およびプラスミドDNAを酵素学的に単鎖環状化して複製酵素による二連続複製反応を用いた実験系を新たに開発することにより、これまで不可能であった複製装置および複製酵素の複製エラーを検出することに成功している。さらに、複製エラーにより特定の標的遺伝子に生じた突然変異を多数分離し、塩基配列レベルでの詳細な解析を実施し、複製エラーの発生におよぼす鋳型DNA配列の影響を多方面から明らかにしている。

以上のように、本論文は自然突然変異の分子機構の解明に新たな道を切り開き、その成果は学術上、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。