

論文内容の要旨

申請者氏名 蟹江 聡

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ミスマッチ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、大腸菌の染色体で生じる自然突然変異の詳細な解析を行い、特に DNA 損傷による DNA 複製阻害の解消に中心的な役割を果たす組換え修復経路が欠損した *recA* 変異株、DNA 損傷による突然変異誘発に関与する損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ (TLS ポリメラーゼ) の欠損株の解析結果から、自然突然変異における自然 DNA 損傷の意義を検討している。申請者らが開発した染色体 *rpsL* 突然変異検出系では、部分二倍体になっている *rpsL* 遺伝子間の相同組換えの検出が可能であり、その頻度の高さや *recA* 遺伝子に依存する性質から、通常の増殖環境下でも自然突然変異頻度よりも高い頻度で組換え修復を必要とする DNA 複製阻害が生じていることが明らかになった。このことから、自然突然変異のかかなりの部分は自然 DNA 傷害による複製阻害が TLS により解消される過程で発生することが予想された。しかし、大腸菌の 3 種の TLS ポリメラーゼ (Pol II(*polB*), Pol IV(*dinB*), Pol V(*umuDC*)) を欠損させた TLS ポリメラーゼ欠損株での詳細な解析の結果、野生株と TLS ポリメラーゼ欠損株では、変異の発生頻度および発生部位に関して大きな差は見出されず、自然突然変異の発生への TLS の関与は小さいことが示された。興味深いことに、ミスマッチ修復欠損との二重変異株を用いた解析から、Pol IV だけは、複製エラーの結果生じると考えられる 1 塩基の欠失、およびトランジション型塩基置換の約 1/2 の発生に関与することが示された。また、*rpsL* 標的遺伝子上において高頻度で発生しているトランジション型塩基置換の発生部位のいくつかにおいて、Pol IV が大きく関与していることが示され、複製エラーへの大きな関与が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 蟹江 聡

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的 DNA 損傷および突然変異が注目されている。これまでの解析から、酸素呼吸を行う生物の細胞ではゲノム DNA 中に膨大な量の酸化的 DNA 損傷が引き起こされていることが明らかにされており、調べられた全ての生物には酸化的損傷を極めて高い効率で修復する能力が備わっていることも見いだされている。ごく最近になり、酸化的 DNA 損傷は確かに自然突然変異、特にホットスポット型塩基置換変異の主要な原因となっていることが示された。一方、紫外線誘発突然変異の研究などから、DNA 損傷に起因する突然変異の発生には DNA 損傷があっても DNA 合成を続けることができる特殊な DNA ポリメラーゼ、損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ (TLS Pol) が関与することが知られてきた。しかしながら、酸化的 DNA 損傷を含めた生体内で生じる自然 DNA 損傷がどのようにして自然突然変異を引き起こしているのか、それらが生じているとして自然突然変異の発生に TLS Pol がどの程度の寄与をなすのかは不明であった。申請者は、まず、DNA 損傷が DNA 複製を阻害する時に最も高い効率で DNA 複製を再開させる組換え修復に関与する *recA* 遺伝子の変異株を利用することにより、生体内で生じる自然 DNA 損傷の影響は専ら組換え修復により処理され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。さらに、申請者は、大腸菌が持つ 3 種類の TLS Pol の単独欠損株およびそれらを組合わせた二重欠損株、三十欠損株を作成し、それぞれの欠損株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 TLS Pol がどのような影響を及ぼしているかを解明することに挑戦した。その結果、以下の成果をあげている。

1) *recA* 変異株では組換え修復ができなくなると同時に点突然変異、特に 1 塩基フレームシフトの発生頻度が上昇することを初めて明らかにし、このミューテーター効果には TLS Pol の一つである Pol IV が関与することを示した。

2) TLS Pol が全て欠損した大腸菌でも自然突然変異の発生頻度の顕著な変化は見いだされなかった。このことから、自然 DNA 損傷による変異誘導は *recA* が支配する組換え修復により強く抑制されており、自然突然変異の発生には TLS Pol は大きくは関係していないことを示唆した。

3) Pol IV は DNA 複製エラーの発生に関与するが、そのエラーもミスマッチ修復により強く抑制されていることを明らかにした。

以上のように、本論文は自然突然変異の起源に関する重要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。