

論文内容の要旨

申請者氏名 沙魚川 公子

DNA は常に安定性を求められる一方で、通常の生育環境下においてさえ、様々な要因により損傷を受けている。このようにして生じた自然 DNA 損傷は、複製や転写を阻害するとともに、自然突然変異を引き起こし、がん、遺伝病、老化等の原因になる。このため細胞には DNA 修復機構が存在し、自然 DNA 損傷による突然変異を抑制している。本研究では、自然突然変異の発生と抑制の分子機構について解明することを目的とし、DNA 修復機構の一つであるヌクレオチド除去修復 (NER) に着目した。

NER は大腸菌からヒトまで高度に保存された重要な修復機構で、大腸菌では UvrA₂B₂ による認識段階、UvrC、D による損傷 DNA の除去、DNA ポリメラーゼ I (Pol I) による修復 DNA 合成を経て、損傷を取り除くことが知られている。損傷の認識は DNA 鎖のゆがみを指標とするため、様々な種類の損傷に働くことができ、多様な未知の自然 DNA 損傷の修復についても、重要な働きをする可能性が考えられた。そこで、NER が自然突然変異の抑制に寄与するのかについて調べることにした。まず、野生株、NER 欠損株と NER 過剰発現株を用いて、通常の生育条件下における自然突然変異の発生頻度を解析した。その結果、予想に反し、すべての NER 欠損株の変異頻度は野生株の半分程度まで低下し、過剰発現株では大きく上昇した。これらのことから、通常の生育条件下において NER は、自然突然変異を抑制するよりもむしろ誘発することが示唆された。

そこで次に、NER による自然突然変異の誘発メカニズムとして、通常の生育条件下では、NER を必要とする損傷がそれほどないために、①修復の不必要な DNA 鎖上で過剰な修復反応が生じ、②修復 DNA 合成時の複製エラーが自然突然変異の原因になっているという仮説を考えた。まず、①NER 過剰発現株では、DNA 鎖上の損傷を増やさなくても、必要以上の修復反応が起こるのかについてギャップ形成から調べた。その結果、NER 過剰発現株ではギャップ形成が上昇することが明らかになった。次に、②修復 DNA 合成時の Pol I の複製エラーが自然突然変異の一部の原因になっている可能性について調べた。具体的には、複製エラーを起こしやすい Pol I の校正機能の欠損株とさらに NER の欠損、過剰発現を加えた大腸菌株を用いて変異頻度を調べた。その結果、Pol I の校正機能の欠損株では、野生株に比べ変異頻度が大きく上昇した。また、さらに NER の欠損を加えると変異頻度が部分的に低下し、NER の過剰発現を加えると変異頻度がさらに上昇した。これらの結果から、NER による過剰な修復反応と修復 DNA 合成時に生じる複製エラーが、自然突然変異の一部の原因になっていることが強く示唆された。

DNA 修復機構は、損傷を除き元通りにする機構と考えられているが、修復 DNA 合成を行えば低頻度ではあるものの複製エラーが生じる。以上の事実から、自然突然変異の新たな誘発経路として DNA 修復機構の関与が、本研究において初めて示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 沙魚川 公子

自然突然変異の原因と発生機構の解明は、進化の原動力の理解につながる生物学の基本的な問題であるとともに、発がんや遺伝病の研究の基本的な問題として医学においても重要である。しかしながら、極めて低い頻度でしか生じない自然突然変異の研究は容易ではなく、その真の発生原因については不明な点が多い。これまでに、DNA複製エラーに加えて、酸素ラジカルなどの内在性変異原による自然 DNA 損傷が自然突然変異の発生原因となりうることが示されているが、これらの前変異損傷のほとんど全てがミスマッチ修復機構や塩基除去修復機構により取り除かれるために自然突然変異の主要な原因とはならないことも明らかにされている。したがって、特定の修復機構の対象にならない発生頻度が低い未知の前変異損傷が自然突然変異の原因ではないかという推論がなされており、その少なくとも一部分は酸素ラジカルによる何らかの DNA 損傷であることも判明している。本研究は、そのような未知の自然 DNA 損傷の除去も含めて、ヌクレオチド除去修復 (NER) 機構が自然突然変異の抑制に対してどのような役割を果たしているのかを明らかにすることを目的として行われた。NER に関わる遺伝子の欠損株と過剰発現株を作製して、自然突然変異頻度を精査した結果、予想とは逆に、欠損株では変異頻度の低下、過剰発現株では変異頻度の上昇が見いだされた。このことから、申請者は NER の何らかの作用が自然突然変異の原因となっていると結論した。突然変異の検出と解析に用いた標的遺伝子に限定はされるが、自然に発生する塩基置換のほぼ半数は NER に依存することになる。申請者は、次に、NER がどうして自然突然変異を引き起こすのかを検討している。まず、ヌクレオチド除去修復の過剰発現により、SOS 応答が強く誘導されることを見だし、染色体 DNA 上の DNA 損傷が増加しない場合でも NER の活性レベルを上昇させるだけで細胞内に単鎖 DNA を多量に産み出せることを示した。これは、損傷がない DNA に対しても NER が作用することができることを意味する。したがって、NER が低レベルでしか発現していない細胞の染色体 DNA でも、時間に応じて NER 反応が生じる可能性が強く示唆された。さらに、変異誘発には NER の修復 DNA 合成が関与する可能性を考えて、DNA ポリメラーゼ I の校正機能欠損変異を作成して仮説の検討を行った所、実際に修復 DNA 合成のエラーが NER に依存する自然突然変異の発生に関与することを見いだした。これらのことから、自然突然変異の少なくとも塩基置換の発生には、不必要な NER 反応の際の修復 DNA 合成のエラーが重要な役割を果たしていることを示した。

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。