

論文内容の要旨

申請者氏名 Le Thi Lan Anh

活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) は好気性生物での自然突然変異の主要な原因であることが示されている。ROS の中でもヒドロキシラジカルは DNA と反応して酸化 DNA 損傷を引き起こし、点突然変異や染色体異常を誘発する。DNA 損傷による突然変異の誘発や染色体異常、細胞死を防ぐ仕組みとして、全ての生物は DNA 修復機構を有しており、その主要な経路としては塩基除去修復 (BER)、ヌクレオチド除去修復 (NER)、組換え修復が知られている。申請者が所属する研究室では、大腸菌細胞内で生じる ROS と酸化 DNA 損傷のレベルが培養の条件 (糖やアミノ酸などの栄養条件、酸素濃度、培地の pH) に大きく影響されることが見いだされた。しかし、このような培養条件の変化においても大腸菌での塩基置換変異の発生頻度はほとんど変化しない。これは、大腸菌細胞が持つ酸化 DNA に対する DNA 修復の能力が極めて高いことを示唆する。一方で、酸化 DNA 損傷を大量に生み出す培養条件において、染色体異常の発生が影響を受けるかどうかは全く不明であった。そこで、申請者は、自発的相同組換えの発生頻度を指標として、酸化 DNA 損傷のレベルが大きく異なる培養条件での染色体異常の発生を解析することとした。また、酸化 DNA 損傷に対する BER や NER と組換え修復のそれぞれの役割と、各経路同士の関係を明らかにすることを目的として研究を開始した。

大腸菌の *rpsL* 遺伝子を利用した自発的相同組換えの発生頻度を正確に測定する分子遺伝学的方法を開発し、それを用いた詳細かつ体系的な遺伝学的解析から以下の結果を得た。1) M9 グルコース培地での培養や LB 培地での低酸素培養では、酸化 DNA 損傷の発生が LB 培地での好気培養に比べて約 10 倍に上昇するが、自発的相同組換えの発生頻度も約 5 倍程度に上昇する。2) この自発的組換え頻度の上昇は酸化 DNA 損傷が原因である。3) NER 欠損変異株での自発的組換え頻度は LB 培地での好気培養では野生株と同じレベルであるが、M9 グルコース培地での好気培養や LB 培地での低酸素培養においては野生株の 4 倍に上昇する。4) BER 欠損変異株での自発的組換え頻度は LB 培地での好気培養でも野生株の 9 倍に上昇し、M9 グルコース培地での好気培養や LB 培地での低酸素培養においても野生株の 7 倍に上昇する。4) NER と BER の両方が欠損した変異株での自発的組換え頻度は LB 培地での好気培養でも野生株の 100 倍に上昇し、M9 グルコース培地での好気培養や LB 培地での低酸素培養においても野生株の 100 倍に上昇する。これらの結果から、自発的相同組換えに起因する染色体異常の発生には栄養や酸素濃度が影響を及ぼすこと、染色体異常の発生原因として酸化 DNA 損傷が重要な役割を果たしていること、自然状態で発生する酸化 DNA 損傷の発生は膨大であるが NER と BER が相互補完的にほぼ完璧に修復していることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Le Thi Lan Anh

本論文は、染色体異常を引き起こす DNA の自発的相同組換えの発生原因と抑制機構について、大腸菌を用いた詳細な分子遺伝学的解析を行ったものである。自然環境で増殖する細胞での自発的相同組換えの発生原因については、これまで実証的な研究がなされてこなかったが、本研究により、酸化 DNA 損傷が重要な発生原因であることが初めて明らかとなった。酸素除去試薬を用いた実験では、実験室での標準的な培養条件 (LB 培地を用いた好気培養) において、自発的相同組換えの原因の約半分は酸化 DNA 損傷であることを示唆する結果を得ている。酸化 DNA 損傷の発生頻度が約 10 倍に上昇する M9 グルコース培地での好気培養や LB 培地での低酸素培養などの培養条件では、自発的相同組換えのほとんどの発生原因は酸化 DNA 損傷であることを推論している。さらに、自発的相同組換えの発生頻度が M9 グルコース培地や低酸素培養で数倍上昇することから、染色体異常 (再編) の発生は培養環境の影響を受けることを初めて示している。これは、生物進化や発がんプロセスを理解する上で極めて重要な発見と考えられる。従来の遺伝学では、突然変異や染色体再編は細胞増殖に依存して発生率はほぼ一定と考えられてきた。しかし、点突然変異とは異なり、染色体異常の発生率は生物が増殖する環境の違いにより変動することが本研究で明らかとなり、遺伝的な変化速度に関する概念を再考する必要性が生まれたことになる。

通常増殖環境で発生する酸化 DNA 損傷に対する DNA 修復機構の研究については、従来の理解では塩基除去修復 (BER) が主として働いていることになっていたところを、ヌクレオチド除去修復 (NER) も BER と相互補完的に酸化 DNA 損傷の修復を行っていることを初めて明らかにしている。BER と NER の両方が欠損した場合には、修復されない複製ブロック型の酸化 DNA 損傷が組換え修復により修復されることになり、自発的相同組換え頻度が野生株の 100 倍程度に上昇することを発見している。これは、従来想像されていたレベル以上に大量の酸化 DNA 損傷が細胞内で発生していること、また、BER と NER の 2 つの修復経路により、ほぼ完璧に修復が行われて自発的染色体異常の発生を強く抑制していることを意味する。

以上のように、本論文は自発的染色体再編 (異常) の発生原因と抑制機構の実体を解明したものであり、特に酸化 DNA 損傷が自発的染色体異常の発生に重要であること、およびその抑制に NER が関与することを初めて明らかにした。また、生物が増殖する環境と遺伝的変化の相互作用について新たな知見をもたらし、進化や発がんプロセスについて新たな見方が必要であることを示している。本研究の成果は遺伝学や進化学の基本的な概念の変更などの学術上、さらには発がん細胞微小環境の関係の解明などの応用上の点で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。