



8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) DNA glycosylase and APlyase activities of hOGG1protein and their substrate specificity

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 新村, 和也 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1093

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 240号	学位授与年月日	平成10年 3月26日
氏名	新村和也		
論文題目	8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) DNA glycosylase and APlyase activities of hOGG1 protein and their substrate specificity (hOGG1蛋白質の8-ヒドロキシグアニンDNAグリコシラーゼ活性及びAPリアーゼ活性と、その基質特異性)		

博士(医学) 新村和也

論文題目

8-hydroxyguanine (7, 8-dihydro-8-oxoguanine) DNA glycosylase and APlyase activities of hOGG1 protein and their substrate specificity

(hOGG1蛋白質の8-ヒドロキシグアニン DNA グリコシラーゼ活性及び AP リアーゼ活性と、その基質特異性)

論文内容の要旨

[はじめに]

自然突然変異の発生や抑制に関与するDNA修復酵素遺伝子には、ミスマッチ修復を司る遺伝子や損傷DNAを修復する遺伝子などが知られている。このうち一部のミスマッチ修復酵素遺伝子は発がん感受性に関与することが知られており、マイクロサテライトDNA領域の複製異常は感受性のマーカーとも考えられている。他のDNA修復酵素もその異常ががんを引き起こす可能性が考えられるため、そのヒト遺伝子の単離・解析が待たれている。

放射線やある種の科学物質のみならず、通常の代謝によっても生体内で活性酸素が生じる。活性酸素が生体に及ぼす作用のうち、DNAの酸化は突然変異を引き起こし発がんにつながる。このDNAの酸化的障害のうち、酸化型グアニン残基である8-ヒドロキシグアニン (oh^8Gua) は、DNA中でアデニンとも対合してしまうため、高頻度にGからTへの変異を引き起こす結果となる。この oh^8Gua をDNA中から除去する酵素遺伝子として、大腸菌では *mutM* 遺伝子が、酵母では *OGG1* 遺伝子が単離されているが、ヒトではまだ明らかではない。そこでヒト *OGG1* 相同遺伝子 (*hOGG1*) を単離し、その oh^8Gua 除去修復能について検討した。

[材料ならびに方法]

酵母 *OGG1* と相同性の高いESTを探索し、得られたESTクローンをプローブとして、HeLa細胞cDNAライブラリーから *hOGG1* 遺伝子を単離した。*hOGG1* 遺伝子の発現についてはノーザンブロット法で、染色体上の位置についてはFISH法で解析した。

次に *hOGG1* の oh^8Gua 除去修復能を検討するために、GST-*hOGG1* 融合蛋白質とその基質と考えられる oh^8Gua を含む二本鎖DNAを作製した。この *hOGG1* 蛋白質と基質との反応産物をゲルシフト分析、HPLC-ECD解析、DNA切断解析に用いた。DNA切断解析では、中央の12番目に oh^8Gua を含む23塩基の二本鎖DNAの5'側あるいは3'側をアイソトープ標識して、ポリアクリルアミドゲルに泳動した。また、 oh^8Gua と対合する塩基をシトシン、アデニン、チミン、グアニンに換えたものを作製し、 oh^8Gua の基質特異性についても検討した。

更に、大腸菌 *mutM mutY* 欠損株 YG5132 でみられる高い自然突然変異率が、*hOGG1* を含むプラスミドを YG5132 へ形質転換させることにより低下するかどうかを、リファンピシン耐性コロニー数の頻度を指標として検討した。

[結果および考察]

1. 構造、発現、位置: HeLa細胞のcDNAライブラリーのスクリーニングの結果得られた遺伝子は全長1583bp、オープン・リーディング・フレームは1035bpで、345個のアミノ酸をコードし、酵母 *OGG1*

と38%の相同性を示した。*hOGG1* 遺伝子は各臓器に普遍的に発現し、染色体上では3p26.2に位置していた。

2. oh^8Gua 除去修復能：ゲルシフト分析では、泳動が遅延した oh^8Gua を含む二本鎖DNAがGST-hOGG1蛋白質と反応した場合に認められ、hOGG1蛋白質による oh^8Gua 特異的な結合が示唆された。また、HPLC-ECD解析では、GST-hOGG1蛋白質と oh^8Gua を含む二本鎖DNAの反応産物から、 oh^8Gua の標準試料と同時間にピークが認められた。熱で不活化したGST-hOGG1蛋白質やGST蛋白質の場合には、ピークは認められず、hOGG1蛋白質により、 oh^8Gua がグリコシル結合部で切り取られることが示唆された。また、反応産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動し、切断産物の移動度を検討した。5'側をアイソトープ標識した場合、主要な切断産物は12塩基のマーカールとほぼ同位置にあり、また11塩基のマーカールより低く、GST-*mutM*による主要な切断産物と同位置にかすかな切断産物が認められた。また、3'側をアイソトープ標識した場合、主要な切断産物は5'側にリン酸基のついた11塩基のマーカールと同位置に認められた。以上の両側標識の結果から、hOGG1蛋白質が oh^8Gua 残基の主に3'側で、また弱く5'側でリン酸基をつけずに切断すると考えられた。二本鎖DNAの oh^8Gua と対合する塩基を変えた場合の基質特異性については、ゲルシフト分析、HPLC-ECD解析、DNA切断解析とも、 oh^8Gua と対合する塩基がシトシンやチミンの場合に oh^8Gua が除去されやすいことが示された。
3. 自然突然変異抑制能：大腸菌CC104に対しCC104の*mutM mutY*欠損株YG5132では、リファンピシン耐性コロニー数の増加、即ち自然突然変異率の上昇が見られた。このYG5132をhOGG1を含むプラスミドで形質転換するとコロニー数の減少がみられた。このことからhOGG1の自然突然変異抑制能が示唆された。

〔結論〕

単離した*hOGG1* 遺伝子は同時期に世界の数カ所で解析が進められ、発表されている。hOGG1蛋白質の oh^8Gua 除去修復能として、 oh^8Gua のグリコシル結合部を切断することと、 oh^8Gua 残基の主に3'側で、また弱く5'側でリン酸基をつけずに切断することが考えられた。また、この oh^8Gua 除去修復能により自然突然変異が抑制されると考えられた。このことから、*hOGG1* 遺伝子が大腸菌*mutM*や酵母*OGG1* 遺伝子と同様 oh^8Gua 除去修復能を有するヒト相同遺伝子であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

我々の体の細胞は絶え間なく種々の刺激にさらされている。活性酸素、化学物質、放射線などにより、DNAの塩基は酸化されたり、構造変化を受けたりする。そのうち酸化による変化が注目されている。DNAの酸化的障害のうちでグアニンが酸化されて生じる酸化型グアニン残基である8-ヒドロキシグアニン(oh^8Gua)はDNAのなかでアデニンとも対合してしまうので、高頻度でGからTへの変異がおきる。この oh^8Gua をDNAから除去する酵素遺伝子として大腸菌では*MutM*遺伝子が、酵母では*OGG1* 遺伝子が見い出されている。今回申請者らは、*OGG1* ヒト相同遺伝子(*hOGG1*)を単離した。

これを用いてGST-hOGG1融合蛋白質とその基質である oh^8Gua を含む二本鎖DNAを作成した。hOGG1蛋白質と oh^8Gua を含む基質を反応させ、その産物をHPLC-ECD及びゲル電気泳動で解析した。hOGG1蛋白質は oh^8Gua を含む基質と結合し、 oh^8Gua と5炭糖の間で切断し、またその5炭糖の3'側でも切断することを見出した。5'側ではリン酸を含まない部分で弱い切断が認められた。

また大腸菌CC104にたいしCC104の*mutM mutY*欠損株YG5132ではリファンピシン耐性コロニー数の

増加、即ち自然突然変異率の上昇が見られた。この YG5132 を *hOGG1* を含むプラスミドで形質転換するとコロニー数の減少が見られる。つまり *hOGG1* には自然突然変異の抑制能があることが示唆された。

申請者の仕事は今までヒトでは見い出されていなかった DNA 修復酵素の *hOGG1* を見出し、この遺伝子由来の蛋白質を得たこと、さらにこの酵素が $oh^8\text{Gua}$ を切り出し、その主要な切断部位が 5 炭糖との結合部位とその 3' 側の部位であることを確定したことである。

次にこの論文に関する次のような質問が出された。

- 1) ヒトの *OGG1* 蛋白質はどのようにして得られたか
- 2) *hOGG1* も 5' 側でどの程度切断するのか
- 3) 修復時ポリメラーゼとリガーゼはどのように作用するか
- 4) 個々の異常な塩基にたいし特異的な酵素が存在するのか
- 5) *hOGG1* の異常と発癌が関係するというデータは得られているのか
- 6) 遺伝子の不安定性の定義は何か
- 7) 遺伝子の不安定性も遺伝的に決まっているのか
- 8) 主論文と副論文の関連は何か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 高 田 明 和
副査 教授 鈴 木 修 副査 教授 村 上 彰