

点突然変異とは DNA や RNA の配列において 1 つのヌクレオチドが別のヌクレオチドへと置換する遺伝子の変異である。この点突然変異の発生要因に DNA 損傷がある。これまでに研究されてきた様々な突然変異を引き起こす DNA 損傷の多くは DNA 塩基に化学物質が付加したものや、DNA 塩基の構造と似た構造をもったものがほとんどである。

この DNA 損傷が修復されなかった場合、複製過程において誤った情報が取り込まれ、突然変異の発生に繋がり、プリン塩基からプリン塩基、ピリミジン塩基からピリミジン塩基へと置換することを *transversion*、プリン塩基からピリミジン塩基、ピリミジン塩基からプリン塩基へと置換することを *transition* という。変異の原因となる DNA 損傷によって発生する点突然変異のパターンは多岐に渡る。その中でも G:C→C:G *transversion* や G:C→T:A *transversion* は、リボフラビン存在下における紫外線照射によって発生する点突然変異として優先的に検出される。この、G:C→C:G *transversion* や G:C→T:A *transversion* の優位性は他の酸化条件の日光照射、メチレンブルー存在下における可視光照射、Fe²⁺イオン共存、過酸化水素添加、ペルオキシラジカル発生条件、ジオキセタン添加条件、 γ 線照射、喫煙曝露などでもみられる。この2つの点突然変異においてどちらも G:C 塩基対が発生の起点になっていること、グアニンとシトシンのうち酸化電位が低いグアニンが酸化されやすいことから G:C→C:G *transversion* や G:C→T:A *transversion* の発生にはグアニン酸化損傷が関与しているのではないかと考えられる。

そして実際に、G:C→T:A *transversion* は、8-Oxo-7,8-dihydroguanine (8oxoG)などにより引き起こされることが知られている。一方、G:C→C:G *transversion* を引き起こす可能性のあるものは、2,5-diamino-4H-imidazol-4-one (Iz) や 2,2,4-triamino-5(2H)-oxazolone (Oz)、spiroiminodihydantoin (Sp)、guaniidinohydantoin (Gh)と限られた DNA 損傷しか知られていない。しかし、Iz や Oz は平面性を有しているが熱安定性が低い DNA 損傷であり、Sp や Gh は安定であるが、平面性を有していないため π スタッキングによる安定性に不利が生じる。熱安定性を有し、かつ、平面性を有しているといった2つの要素を満たす DNA 損傷はまだ知られていない。また、G:C→C:G *transversion* を引き起こすには DNA 損傷の相手側にグアニンを挿入する必要がある。

そのためには DNA ポリメラーゼ中の *catalytic pocket* にピリミジン:プリンを組み合わせと似た塩基面積となる必要がある。DNA 損傷とグアニンがピリミジン:プリン塩基対に近い条件を満たすには、DNA 損傷がピリミジンよりも小さい構造でないといけない。そこで本研究では分子量の小さい DNA 損傷である Urea (Ua)や新たに発見した X、X の

生成効率改善のための Iz の収率増強について解析を行った。

第 1 章ではチミンおよびグアニンから生成する DNA 損傷 Ua について DNA ポリメラーゼを用いた塩基取り込みおよび損傷乗越え反応について解析を行った。Ua は古くに発見報告のあった DNA 損傷であるが、損傷の相補鎖への塩基取り込みおよび損傷乗り越えの解析が意外にも Klenow fragment exonuclease⁻ や DNA ポリメラーゼ β でしか行われていなかった。そこで複製中 DNA ポリメラーゼの DNA ポリメラーゼ α や δ 、 ϵ 、損傷乗り越え DNA ポリメラーゼである DNA ポリメラーゼ η と ζ を用いて Ua に対する塩基取り込みおよび損傷乗り越えについて解析した。その結果、Ua の相補鎖側への塩基取り込みでは、DNA ポリメラーゼ α や δ 、 ζ ではアデニンが、DNA ポリメラーゼ η は 4 つの塩基すべてを取り込み、DNA ポリメラーゼ ϵ は塩基を取り込まなかった。また、損傷乗り越えでは DNA ポリメラーゼ α がコントロールと比較して低効率ながらも乗り越え伸長し、DNA ポリメラーゼ η はコントロールと同じ効率で乗り越え伸長した。しかし、DNA ポリメラーゼ δ や ϵ 、 ζ は乗り越えずに伸長反応を停止した。このことから、Ua は DNA ポリメラーゼによる伸長反応を停止する DNA 損傷であり、DNA ポリメラーゼ η で停止を回避することができることを明らかにした。

第 2 章では第 3 章で述べる X についての解析を効率的に行うため、前駆体である Iz の収率を改善するため青色 LED 光源を用いた解析を行った。これまではトランスイルミネーター(照射強度: 6.5 mW/cm^2)を用いて Iz の生成を行っていたが、Iz の最大生成率(30%)になるのが 60 分と時間がかかっていた。そこで、450 nm の青色 LED 光源を用いた Iz の生成を解析したところ、照射強度 27.5 mW/cm^2 と 68.8 mW/cm^2 、照射時間 2 分にて 35%という Iz の最高収率が得られた。しかし、照射強度が高くなると Iz の収率が下がることも明らかにした。そこで、照射強度を弱めた状態で照射時間における Iz の収率を解析することで適切な照射強度と照射時間を検討することにした。その結果、450 nm の LED 光源で照射強度 27.5 mW/cm^2 で 2 分照射した時が Iz を短時間で効率的に生成できる条件だと明らかにした。

第 3 章では新規 DNA 損傷 X についての解析を行った。高温条件下における Oz の熱分解を解析していたところ、Oz とは異なる生成物を見出した。この生成物が過去に報告された DNA 損傷とは異なる分子量であることを明らかにした。質量解析と ms/ms 解析の結果から生成物を同定した。この X は pH 条件によって生成率が変化し、pH 7-9 では X の生成率は 30%を超え、pH 4-6 と pH 10 では 30%以下となる結果となった。

次に DNA ポリメラーゼを用いた塩基取り込みおよび損傷乗越えについての解析を行ったところ、X の相補鎖側に対して主にグアニンが共通して取り込まれることが判明した。そして、損傷乗り越えでは損傷乗り越え DNA ポリメラーゼである DNA ポリメラー

ゼ η や ζ だけでなく複製中心の DNA ポリメラーゼ α や δ , ε でも X を乗り越えた。このことから X が DNA 複製において G:C—C:G transversion を引き起こしうる DNA 損傷の可能性が示唆される。

そこで、2 本鎖 DNA における X:G の熱的安定性を解析したところ、X と 4 つの塩基では X:G の T_m 値が高かったが、天然の C:G 塩基対とそのミスマッチ(C:C、C:A、C:T)における T_m 値の差ほど優位な差はなかった。このことから標準的な B 型 2 本鎖 DNA において X:G の組み合わせは安定性にそれほど寄与していないと考えられる。一方、DNA ポリメラーゼはグアニンを優先的に挿入したことから、複製時の特殊な構造が X:G の安定化に繋がり、グアニンが優位に取り込まれたのかもしれないと考えている。

X:G の特異的な安定性が 2 本鎖では見られなかったが、DNA ポリメラーゼによる複製において、共通して X に対してグアニンを優先的に挿入することは間違いない。そこで X が修復される DNA 損傷なのか明らかにする必要がある。まずは、DNA 損傷の発見に用いられるホットピペリジン処理によって X が切断されるのか解析した。その結果、ピペリジンに対して X は、8oxoG と同程度に安定であることを明らかにした。

X がピペリジンに対して安定であることから、似た切断メカニズムを持つ修復酵素に対しても安定である可能性がある。そこで Fpg や Nei、Nth を用いて X に対する切断反応を解析した。Nei や Nth では X に対する選択性は見られず、X の除去に関わっていない可能性がある。しかし、Fpg は X と 4 つの塩基の組み合わせの中で X:C のみを選択的に、かつ高い切断活性を示した。このことから Fpg は G:C から X:C が生成した時に速やかに X を除去する役割を有している可能性が示唆される。

以上の結果から、生体内の条件に近い pH で生成する X は DNA ポリメラーゼによる伸長反応をあまり阻害しない DNA 損傷であり、DNA ポリメラーゼの結果だけで判断すると主に G:C—C:G transversion を起こしうる突然変異性が高い損傷である可能性が示唆される。そして Fpg は X が発生した直後の X:C 塩基対の状態修復を行ない、遺伝子の変異が固定化されるのを防いでいるものと考えられ、Fpg は 8oxoG よりも X をターゲットとした修復酵素である可能性が非常に高い。一方で、Nei は Oz と変わらない低い切断活性であったことから X の修復には関与しておらず、Nth では Oz よりも切断活性が高いが、正確な修復には関わらないと考えられる。

最後に第 1 章から第 3 章までで得られた知見をまとめることで、本論文の総括とした。