

称号及び氏名	博士(獣医学) 山本 亮平
学位授与の日付	平成20年3月31日
論文名	「マウス臓器の細胞核に存在する新規チミングリコール DNA グリ コシラーゼ活性タンパクの分離と分析」
論文審査委員	主査 久保 喜平 副査 竹内 正吉 副査 小森 雅之 副査 松山 聡

論文要旨

緒言

遺伝情報を記録しているDNAは、生理的な条件下においても加水分解や酸化を受け、常にDNA鎖切断や塩基損傷の危険にさらされている。代表的な酸化損傷塩基として知られる7,8-dihydro-8-oxoguanineやthymine glycol (TG) は、点突然変異などを誘発し、腫瘍や様々な疾患だけでなく老化にも関与すると考えられている。これらの酸化損傷塩基は、大腸菌から哺乳類にいたる幅広い生物において、主に塩基除去修復（以下BER）経路によって修復されている。BER経路では、まず損傷塩基に特異的なDNAグリコシラーゼにより損傷が除去され、脱塩基部位（apurinic/apyrimidinic site、以下APサイト）が形成される。哺乳類においては、DNA鎖を切断するリアーゼ活性を付随しない（1価性）DNAグリコシラーゼが、生理的条件下で形成される多くの損傷塩基を除去しており、主要な修復機構であると考えられる。

しかしながら、哺乳類のTG-DNAグリコシラーゼ（TGG）はNTH1とNEIL1しか知られていないため、これらのリアーゼ活性を付随する（2価性）DNAグリコシラーゼによってTGは修復されると考えられてきた。しかしながら、マウスNEIL1（mNEIL1）が核に局在することに対し、大部分のマウスNTH1（mNTH1）がミトコンドリアに局在すると考えられていることから、マウス由来細胞の核内に生じたTGを除去するタンパクは、mNEIL1のみとなる。

本研究では、マウス臓器由来の細胞核中に新しい1価性TGG活性が存在することを明らかにした。また、マウス肺由来細胞の核内においては、本活性がmNEIL1と同様に主要な活性であることを明らかにした。さらに、マウス臓器由来の単離核に対する高張処理や、カラ

ムクロマトグラフィーによる1価性TGG活性タンパクの分離を行ない、その生化学的性質を解明した。

第1章 高張処理により肝臓由来の細胞核から抽出されるTGG活性の解析

マウスでは、mNTH1 とmNEIL1 の二つのTGGのみが同定されている。近年、mNTH1 欠損マウスの肝臓由来細胞の核抽出液内に 2 種類のTGG活性タンパクが存在することが報告されたことから、mNTH1 とmNEIL1 以外のTGG活性タンパクの存在が示唆された。しかしながら、その 2 種類のTGG活性はいずれも、TGオリゴヌクレオチド基質を切断する活性を示した。第 1 章では、Jc1:ICRマウス肝臓由来細胞の核内に存在する、二つの既知TGG以外のTGG活性について検索した。肝臓由来細胞から単離した核に、高塩濃度の緩衝液による処理を行い、核膜孔を通過する低分子量のタンパクを抽出する方法で、核抽出液を取得した。これに続いて、強陽イオン交換カラム (以下UNO-S1 カラム) クロマトグラフィーを行い、その溶出画分と³²P 標識TGオリゴヌクレオチド基質を反応させた。反応終了後、反応液を等分し、それぞれ加熱群と非加熱群とした。加熱群には、91 mM NaOH存在下で、70°Cにて 5 分間加熱処理を行った。この加熱処理により、APサイトを持つオリゴヌクレオチド基質は切断される。各溶出画分の加熱群と非加熱群の反応産物を、7 M尿素入り 20%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離し、Bio-Imaging Analyzer Systemにてオートラジオグラムを得た。その結果、非加熱群にmNTH1 やmNEIL1 などによるものと考えられる切断産物が見られた。一方、加熱群には、非加熱群よりも多量の切断産物が観察された。この加熱処理による切断産物の増加は、基質切断を伴わないAPサイトの存在を示し、マウス肝臓由来の細胞核内に 1 価性TGG活性が存在することが示唆された。

第 2 章 肺由来の細胞核に存在する TGG 活性の解析

DBA1 マウスの様々な臓器の細胞核抽出液に含まれる総TGG活性量には差があり、肝臓は低い活性量を示す臓器群に分類され、一方、脾臓や肺は高活性臓器群に分類される。異なるTGG活性量に対応して、mNTH1 とmNEIL1 のmRNA量に臓器間で差があると予想された。しかしながら、mNTH1 のmRNA量に臓器間で大きな差は認められなかった。これに対して、mNEIL1 のmRNA量は肝臓で多く、脾臓や肺では少ない結果が示され、総TGG活性量のそれと反対の傾向を示した。以上のことから、高いTGG活性量を示しながらも、相対的にmNEIL1 mRNA発現量が少ない脾臓や肺には、mNTH1 やmNEIL1 以外のTGG活性が多く含まれていることが期待される。第 2 章では、肺由来細胞核の高張処理抽出液、および、高張処理後の核から抽出した核内タンパク画分 (以下NE画分) についての解析を行った。さらに、基質を切断した活性の種類を知るために、切断産物の 3'-末端構造の解析を行った。高張処理抽出液とNE画分を³²P標識TGオリゴヌクレオチド基質と反応させた結果、3 種類の切断産物が観察された。これらは、mNTH1 などに付随するβリナーゼ活性と、mNEIL1 などに付随するβδリナーゼ活性によりそれぞれ形成されるβ産物とδ産物、および、δ産物に3'-ホスファターゼが作用して形成されたと考えられる3'-OH産物であった。高張処理抽出液の非加熱群において、これら 3 種類の切断産物が多く見られた。このことから、核内に存在したβリナーゼや多く

のmNEIL1 および 3'-ホスファターゼが、高張処理により核から抽出されたと考えられた。NE画分では、加熱処理による δ 産物の増加が最も顕著に見られた。アルカリ条件下での加熱処理は、APサイトを持つ基質を切断して、主に δ 産物を生じることが知られている。これらのことは、NE画分の反応産物中に、1 価性TGG活性の産物であるAPサイトが最も多く存在することを意味し、NE画分に多量の見かけ上の 1 価性TGG活性が分画されたと考えられる。高張処理抽出液およびNE画分に含まれる、総 1 価性TGG活性量の総TGG活性量に対する割合は 39%に達した。1 価性TGG活性は、少なくともマウス肺由来の細胞核において、主要なTGG活性の一つであると示唆された。

第 3 章 1 価性 TG-DNA グリコシラーゼ活性の分離とその特性の解析

マウス肝臓と肺由来の細胞核内には新たな 1 価性TGG活性が存在し、その活性は高い総TGG活性を示す肺由来の細胞核内に、多く存在することが明らかとなった。第 3 章では、肺に加えて、高い総TGG活性を示した脾臓からNE画分を取得し、ハイドロキシアパタイトカラム（以下CHAカラム）と、UNO-S1 カラムあるいはゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる 1 価性TGG活性タンパクの分離を行い、その特性を解明した。脾臓由来の高張処理抽出液とNE画分を³²P標識TGオリゴヌクレオチド基質と反応させた結果、加熱処理による δ 産物の増加量は、NE画分において最も顕著に見られ（高張処理抽出液の 5 倍）、脾臓から取得したNE画分に、多量の見かけの 1 価性TGG活性が存在することが示された。次に、NE画分のCHAカラムクロマトグラフィーを行い、その溶出画分を用いて、³²P標識TGオリゴヌクレオチド基質の切断実験と抗mNEIL1 ポリクローナル抗体を用いたウェスタン・ブロット分析を行った。その結果、CHAカラムクロマトグラフィーにより、1 価性TGG活性はmNEIL1 と分離されることが示された。しかしながら、APサイトを持つオリゴヌクレオチド基質の切断実験と、NaBH₄によるリアーゼ-³²P標識基質複合体形成実験から、1 価性TGG活性を示すCHAカラム溶出画分中にはリアーゼ活性が存在することが示された。そこで、これらのCHAカラム活性画分のUNO-S1 カラムクロマトグラフィーを行い、その溶出画分を用いて、TGあるいはAPサイトを持つ³²P標識オリゴヌクレオチド基質の切断実験と、NaBH₄処理によるリアーゼ-³²P標識基質複合体形成実験を行った。その結果、1 価性TGG活性を示すUNO-S1 カラム溶出画分中にリアーゼがほとんど認められず、UNO-S1 カラム画分に見られたTGG活性は、本質的に 1 価性活性であることが明らかとなった。

NE画分よりも、2,697倍以上高い 1 価性 TGG 活性の比活性を示した UNO-S1 カラム溶出画分を用い、同活性の至適反応条件を求めた。その結果、1 価性 TGG 活性は、KCl 濃度 100-150 mM、pH 7-8 において最も高い活性を示し、また、20 mM までの EDTA に耐性を示した。

0 mMから 10 mMの間のEDTA存在下で、マウス肺由来のNE画分と³²P標識TGオリゴヌクレオチド基質を反応させた結果、EDTA濃度が上昇するにつれて、非加熱群の切断産物、特に 3'-OH 産物量は約 5.5 倍減少し、加熱処理による δ 産物の増加量は約 4.2 倍上昇した。このことは、加熱処理により出現する δ 産物の大部分が、1 価性TGG活性によって生じたAPサイトがさらに切断された結果であることを示す。したがって、第 2 章で示した、マウス肺由来細胞の核内における見かけの 1 価性TGG活性の割合は、明らかに低く見積もられており、この活性がマウス肺由来の細胞核内の主要なTGG活性であることが示唆された。

また、マウス肺由来NE画分のCHAカラムクロマトグラフィーおよびゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行った。最も高い1価性TGG活性を示した画分のSDS-PAGE分析後、検出したタンパクバンドのMALDI-TOF質量分析により、Advanced glycosylation end product-specific receptor precursor、Annexin 1、Guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2-like 1、Lung carbonyl reductase、Hemoglobin subunit beta-2が同定された。

総括

マウスゲノム中に生じた酸化ピリミジン損傷を除去する活性として、既知の二つの2価性TGG (mNTH1、mNEIL1) の他に、新しい1価性TGG活性が存在することを発見した。また、この活性は、マウス肺由来の細胞核内において、ほぼ唯一のTGG活性タンパクと考えられていたmNEIL1と同等かそれ以上のTGG活性を示した。これまで、TGなどの酸化ピリミジン損傷の多くは2価性TGGによって除去されると考えられてきたが、1価性TGG活性の存在が明らかとなったことで、酸化ピリミジン損傷の修復を担う新たなBER経路の存在が示唆された。このことから、酸化ピリミジン損傷に対して3つのBER経路が存在することになるが、DNAが酸化ストレスにさらされた際に、糖-リン酸骨格損傷の有無に応じて、これらのBER経路のいずれかが選択されると考えられる。一方、生理的条件下で形成される他の型の損傷塩基の大部分は、1価性DNAグリコシラーゼにより除去されている。以上のことから、高度な酸化ストレスにさらされるなどの緊急時には2価性DNAグリコシラーゼが主として働くが、生理的条件下で形成される損傷塩基に対しては、より共通性の高い1価性DNAグリコシラーゼを用いた修復経路が主体となることが予想される。

審査結果の要旨

DNAの酸化損傷塩基は、幅広い生物種において、主に塩基除去修復(BER)経路によって修復されている。BER経路は、特異的なDNAグリコシラーゼが損傷塩基を除去することより開始される。哺乳類においては、主にリアーゼ活性を付随しない(1価性)DNAグリコシラーゼを含む経路が、生理的条件下で形成される多様な損傷塩基の修復に働いている。一方、哺乳類のチミングリコール(TG)-DNAを基質とするグリコシラーゼ(TGG)は、リアーゼ活性を付随するNTH1とNEIL1しか知られておらず、TGは専らこれらによって修復されると考えられてきた。本研究では、マウス臓器由来の細胞核中の新しい1価性TGG活性の存在を明らかにし、その生化学的性質を解明した。得られた成果は以下の通りである。

第一章では、高張処理によりJcl:ICRマウスの肝臓由来の細胞核から抽出されるTGG活性を解析した。³²P標識TGオリゴヌクレオチド基質を用いて、イオン交換カラム(UNO-S1)クロマトグラフィー画分中に主鎖切断を伴わない脱塩基産物を検出し、1価性TGGの存在を明らかにした。

第二章では、マウス肺由来の細胞核に存在するTGG活性の解析を行った。肺や脾臓は肝

臓に比べてはるかに高い核内 TGG 活性を示す。既知の二つのマウス TGG のうち、mNEIL1 のみが細胞核に分布すると考えられている。ところが、その mRNA 量は、肺や脾臓に比べて肝臓の方が高く、肺や脾臓の細胞核は新たな 1 価性 TGG をより多く含むと期待される。肺由来細胞核の高張処理抽出液および高張処理後の核抽出画分（NE 画分）の処理により、 β リアーゼ産物、 δ リアーゼ産物、 δ 産物に 3'-ホスファターゼが作用して形成されたと考えられる 3'-OH 産物の 3 種類の切断産物が観察された。アルカリ加熱処理を行うと、1 価性 TGG 活性によって形成された脱塩基部位が切断され、 δ リアーゼ産物の顕著な増加が観察された。高張処理抽出液および NE 画分に含まれる、総 1 価性 TGG 活性量の総 TGG 活性量に対する割合は 39%に達した。したがって、1 価性 TGG 活性は、マウス肺由来の細胞核において、主要な TGG 活性の一つであることがしめされた。

第三章では、1 価性TG-DNAグリコシラーゼ活性の精製とその特性の解析を行った。まず、高い総TGG活性を示した脾臓からNE画分を取得し、ハイドロキシアパタイトカラム（以下CHAカラム）とUNO-S1 クロマトグラフィーの組み合わせによる精製を行った。この結果、CHAカラムにより 3'-OH産物形成活性が除かれ、その後、UNO-S1 カラムにより、リアーゼ産物が除かれることが明らかとなった。各精製段階におけるゲルシフトアッセイの結果、NE画分に認められた二つのリアーゼー基質複合体は、精製画分中には全く認められなくなった。また、抗mNEIL1 ポリクロナール抗体により、各精製段階における活性画分中のmNEIL1 量を調べた結果、これがCHAカラムによりほとんど除かれていることが明らかとなった。UNO-S1 カラム溶出画分は、NE画分と比較して、2,697 倍以上高い 1 価性TGG活性の比活性を示した。この画分を用い、同活性の至適反応条件を求めた。その結果、1 価性TGG活性は、KCl濃度 100-150 mM、pH 7-8 において最も高い活性を示し、また、20 mMまでのEDTAに耐性を示した。1 価性TGG活性が、高いEDTA耐性を示すことから、種々の濃度のEDTA存在下で、マウス肺由来のNE画分と³²P標識TGオリゴヌクレオチド基質を反応させた結果、EDTA濃度が上昇するにつれて、3'-OH産物量は減少し、1 価性TGG活性は約 4.2 倍上昇した。以上の結果は、マウス肺由来NE画分中のTGG活性の大部分がマウス肺由来NE画分中のTGG活性の大部分が 1 価性TGG活性に由来することを示唆する。そこで、このNE画分のCHAカラムおよびゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行い、1 価性TGG活性画分中タンパクのMALDI-TOF質量分析を行った。この結果、Advanced glycosylation end product-specific receptor precursor、Annexin 1、Guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2-like 1、Lung carbonyl reductase、Hemoglobin subunit beta-2 が同定された。

以上、本研究は、マウス臓器由来の細胞核内に、新奇な 1 価性 TGG 活性が存在することを初めて明らかにし、生理的条件下にあっては、これが mNEIL1 を凌ぐ、主要な活性であることを示した。さらに、その生化学的性質を明らかにし、候補タンパクの解析を行った。これらの成果は、獣医学および医学の放射線科学分野の発展に貢献するものであり、最終試験の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。