

ROS による DNA 損傷と突然変異の話

- *Mth1, Ogg1, Mutyh* 三重欠損マウスからの示唆 -

作見邦彦

(元)九州大学・生体防御医学研究所・脳機能制御学分野

2014 年、われわれは *Mth1, Ogg1, Mutyh* 三重欠損マウスを用いて「DNA 中の 8-オキソグアニン (8-oxoG) が生殖細胞自然突然変異の原因のひとつである」ことを報告した⁽¹⁾。ここでは活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) によって生じると考えられている 8-oxoG の蓄積が個体にどのような表現型をもたらすのかを紹介し、ヒトと突然変異について考えるための材料を提供したい。

生体に関する話題の中で ROS という単語は、スーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、過酸化水素と一重項酸素の 4 種を指すことが多い。前者 2 つは分子内に不対電子を持つ酸素ラジカルであり、後者 2 つは不対電子を持つラジカルではないが反応性が高い分子である。ラジカルとは乱暴な言い方をすれば、本来安定な分子の最外殻電子に過不足が生じて不安定になった状態 (不対電子が生じ反応性が増した状態) と考えることができる。ラジカルは過不足が生じた電子を他の分子とやり取りすることで安定化するため、非常に反応性が高い性

質を持つ。ROS の特徴に関しては世に多数の解説が出ているのでそちらを参照していただきたいが⁽²⁾、ここで指摘しておきたいのは、①遺伝子の本体である DNA に作用して DNA 損傷の原因となる性質を持つこと、②放射線、化学物質等、生体に対する外界からの作用によって生じるだけでなく、エネルギー産生等、細胞の生命活動に伴い生体内で常時産生されていることである。

生体内で産生される ROS の大部分は体を構成している各細胞のミトコンドリアで発生している。酸素呼吸を行う実体であるミトコンドリアでは生体内の約 95% の酸素を消費し、その 1~3% が ROS に変換されていると考えられている。一方、炎症部位では免疫系の好中球・マクロファージなど貪食細胞がミトコンドリアとは独立にスーパーオキシドを産生し、殺菌の役割を担っている。

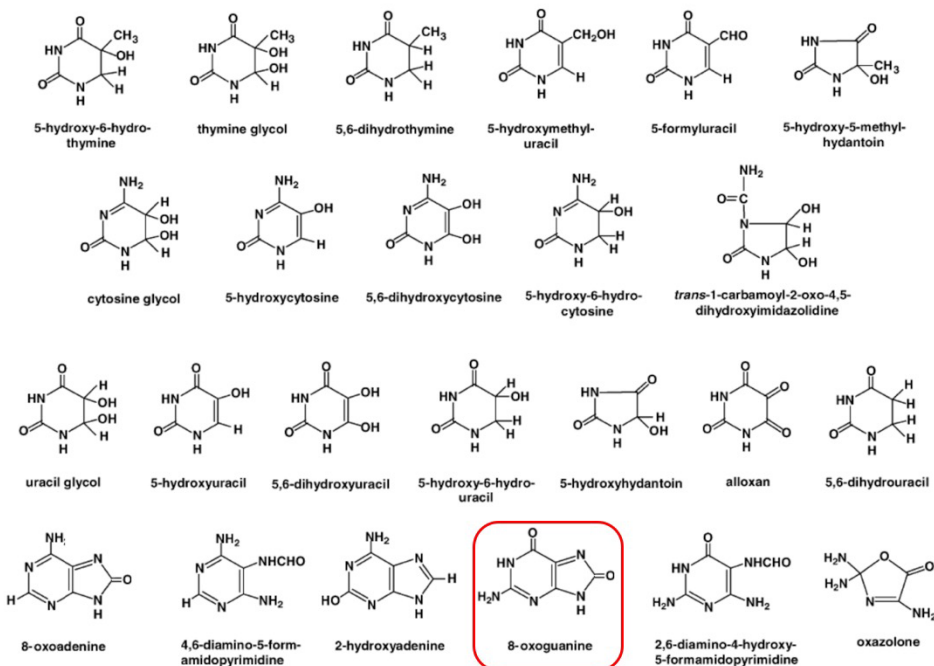
ミトコンドリアでは、電子伝達系の経路において複合体 I と III から伝達中の電子の一部が漏れ出し、それが酸素分子を 1 電子還元することで、ROS であるスーパーオキシドが発生することが知られている。発生したスーパーオキシドはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD : superoxide dismutase) と呼ばれる酵素によってすぐに過酸化水素と水に変換、解毒される。過酸化水素がさらに 1 電子還元されることでヒドロキシラジカルが生じるが、この分子は活性酸素種の中でも非常に反応性が高く、核酸、タンパク質、脂質や糖などの生体分子を

酸化する性質を持ち危険性が高いため、グルタチオンペルオキシダーゼやカタラーゼ等、別の抗酸化酵素系によって、生体にとって安全な水分子へと還元される。このように細胞は、活性酸素を消去する一連の抗酸化酵素系によって生命活動に伴い発生する ROS から自身を防御している。これらの機能を喪失した場合、例えば Mn-SOD (SOD2, ミトコンドリア型) の遺伝子を欠損するとマウスは致死性となり、この酵素が個体の生存に必須であることを示している。その他の抗酸化酵素をコードする遺伝子の遺伝子欠損マウスもそれぞれ特徴的な病状、表現型を呈することから、個体が健康に生存するために、各々の酵素が必要な役割を果たしていること、正常な個体ではこれらが有効に機能しているため（少なくとも観察できる範囲では）ROS に起因する弊害を抑制できていることがわかる。

では、生体内で発生し、消去できなかった ROS が生体に与える影響を考えてみよう。実際、過酸化脂質や酸化 DNA は加齢に伴いその量が増加し、老化のマーカーとして用いられているという事実があり、ROS の発生は生体内で完全に抑えられているというわけではない。ROS の標的となる多様な生体分子の中でも DNA は、遺伝情報を担う分子であり、傷害が一旦突然変異として固定されてしまえば、代謝による機能回復を望めずその影響が子々孫々にまで継続するという特徴を有している。ROS で生じる酸化損傷塩基はこれまでに報告さ

これだけでも20種類以上あり、今後さらに増加することが予想される⁽³⁾。これらの中には直接突然変異の原因となるもの、DNA複製を阻害して細胞周期に影響するものから、いまだ影響が不明なものまで様々なものが存在する。しかし簡便な検出や定量的方法が確立しているものは少なく、それぞれの相対的、絶対的な存在量は不明で、このことが各損傷塩基の生物学的意義を明らかにする際の妨げとなっている。

核酸塩基の活性酸素による酸化修飾



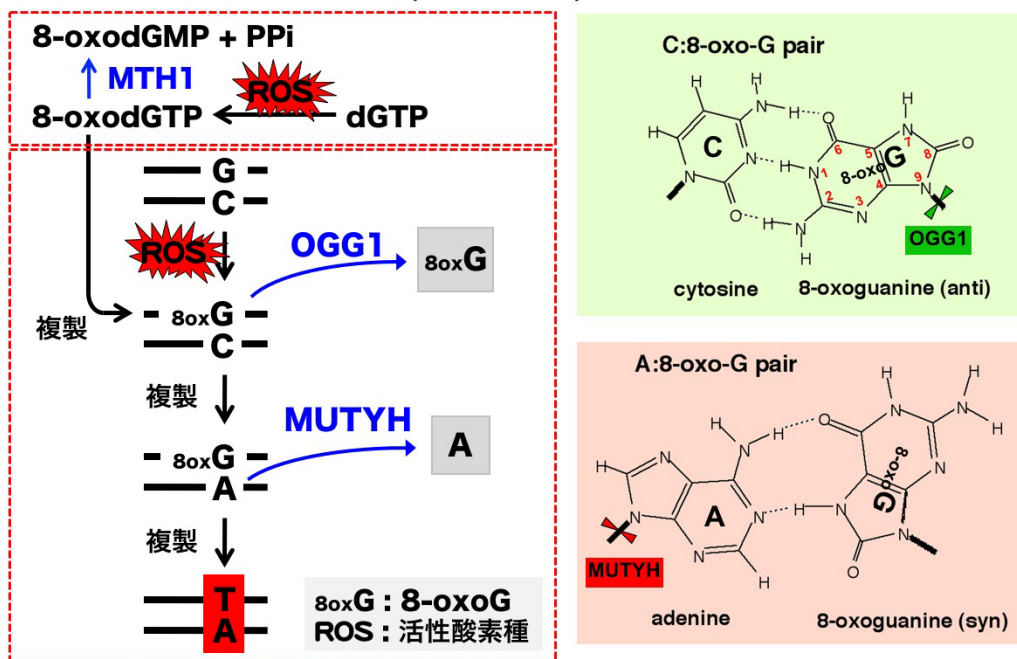
Cooke MS et al., FASEB J., 2003. (doi: 10.1096/fj.02-0752rev)

これらの中で8-oxoGは検出、定量が可能な量がDNA中に存在すること、突然変異の原因になること、修復酵素とその遺伝子が報告されていること、抗体やLC-MS等、多様な検出手段が確立していることなどから酸化損傷塩基のモ

デルとして研究が進んでいる。ここでは哺乳動物で観察された 8-oxoG に起因する突然変異と、その発生を防御するために働く 3 種類の酵素について紹介する。

グアニン塩基の 8 位の炭素に例えばヒドロキシラジカルが作用すると 8-ヒドロキシングアニン (8-オキソ-7,8-ジヒドログアニン) が生じるが、生体内では安定な互変異性体である 8-oxoG の形を取ると考えられている。このグアニンの酸化が 2 本鎖 DNA 中でおきると G:C ペアが 8-oxoG:C ペアになる。DNA 複製時、8-oxoG は 9 位の窒素とデオキシリボースの炭素の間の C-N 結合が回転することで syn 型をとり、シトシン (C) ではなくアデニン (A) と対合が可能になる性質を持つ。このようにして 8-oxoG が A と対合した場合、DNA 複製後には DNA 中に 8-oxoG:A ペアが生じることになる。次の DNA 複製時、この 8-oxoG:A ペアを構成する 8-oxoG は C または A と対合し、8-oxoG:C または 8-oxoG:A ペアを生じる一方で、8-oxoG と対合していた A には T が対合し T:A ペアが生じる。すなわち、G:C ペアの G が酸化される事で、2 回の DNA 複製を経て、G:C から T:A へのトランスバージョン突然変異が発生することになる。8-oxoG:C または 8-oxoG:A ペアと異なり T:A ペアは正常な 2 本鎖 DNA の構成成分であり、安定で、以降傷害として認識、修復されることはない。

8-oxoGに起因する突然変異を抑制する酵素 MTH1, OGG1, MUTYH



このような 8-oxoG に起因する突然変異の発生を防止するため、生物は複数の対抗手段を有している。ヒトやマウスでは 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1), adenine-DNA glycosylase (MUTYH), 8-oxodGTPase (MTH1) の 3 種類の酵素が知られており、それぞれ *OGG1*, *MUTYH*, *MTH1* 遺伝子にコードされている (スライド 10)。OGG1 は DNA 中の 8-oxoG:C ペアから 8-oxoG 塩基を切り出す DNA グリコシラーゼであり、MUTYH は DNA 中の 8-oxoG:A ペアからアデニン塩基(A)を切り出す DNA グリコシラーゼである。また、MTH1 は DNA 合成の基質である dGTP の酸化体、8-oxodGTP を分解することで DNA 中への 8-oxoG の取り込みを防止しているヌクレオチド分解酵素である。

例えば OGG1 を持たないマウスの肝臓では DNA 中の 8-oxoG の量は野生型マウスの 6 倍程度にまで上昇する。これらはいずれも大腸菌において自然突然変異頻度が上昇するという表現型を呈するミューター突然変異の原因遺伝子として同定された遺伝子のホモログ、あるいはオーソログであり、1990 年代前半に相次いでクローニング、報告された。

我々は哺乳動物における自然突然変異の制御機構について研究するため、これら 3 種類それぞれの酵素の遺伝子欠損マウスを作成、解析を行なっている。ここでは *Mth1*, *Ogg1*, *Mutyh* 三重欠損マウスの解析から明らかになったことについて紹介したい。

8-oxoG は生殖細胞自然突然変異の原因のひとつである

8-oxoG に起因する突然変異を解析するため、この突然変異の発生を防止する役割を持つと考えられる 3 種類の酵素をコードする遺伝子 *Mth1*, *Ogg1*, *Mutyh* の 3 つの遺伝子、全てを欠損させた *Mth1*, *Ogg1*, *Mutyh* 三重欠損マウス (TOY-KO マウス) を作成した。これらの遺伝子産物は 8-oxoG の産生には影響を与えないことから、TOY-KO マウスは生体内で自然発生している 8-oxoG

(産生量は野生型マウスと同程度) を修復できないことに起因する 8-oxoG の蓄積, 突然変異の蓄積とその結果を個体レベルで鋭敏に検出することが可能なマウスと考えることができる。

このマウスの家系解析から以下のことが明らかになった⁽¹⁾。

1. 世代を超えて伝わる変異形質 (水痘症, 涙腺腫瘍など) が複数, 新たに出現した。
2. 腫瘍の自然発生が高頻度に (全体の 35%の個体) 観察された。
3. 生殖細胞突然変異の発生頻度がヒトと比べて約 1.7 倍, マウスの野生型と比較すると約 4.0 倍にまで上昇し, その 99%が G to T transversion 変異だった。
4. 家系図上で生殖細胞突然変異の新規発生, 伝達と変異の固定, あるいは消失を観察することができた (新規 SNP の実験的な再現)。
5. これらの生殖細胞突然変異は mitosis で生じると考えられる。
6. 大腸菌と異なり, 8-oxodGTPase 欠損によって上昇することが予想された A to C transversion 変異の発生頻度の上昇は観察されなかった。

これらの結果は,

- I. 8-oxoG は、生殖細胞系列の細胞に新規に発生し、世代を超えて伝わる自然突然変異の原因分子であること、
- II. *Ogg1*, *Mth1*, *Mutyh* の3つの遺伝子が協調的に働く事によって、生殖細胞ゲノム中で8-oxoGによって誘発される突然変異を効率よく抑制していること、
- III. マウスには大腸菌とは異なる8-oxodGTPに起因するA to C transversion変異を抑制するメカニズムが存在すること

を示している。また、ROSの発生環境がグアニンの酸化を促し、その結果、突然変異頻度が上昇、生物集団の遺伝的多様性の拡大を加速し、種のレベルで進化の原動力になっている可能性も示唆される。

しかし、自然突然変異頻度の上昇が個体レベルの生存にとって有利に働くとは限らない。これら *Mth1*, *Ogg1*, *Mutyh* の3つの遺伝子欠損が個体寿命に与える影響を検討した実験結果は、高すぎる自然突然変異頻度が個体寿命を短縮させることを示唆している。突然変異の発生頻度と寿命にどの程度相関があるのか、正確な情報は今後の研究を待つ必要があるが、私は個体レベルでは突然変異の発生を抑制することが健康寿命の延長につながると考えている。

ヒトと突然変異

ここからは報告されているヒトのデータを用いて、ヒトにとっての突然変異の意味について考えてみたい。ヒトを含め生物は、多くの突然変異発生の原因となる事象に囲まれて暮らしている。宇宙線、紫外線、放射線や種々の化学物質への暴露等、体外の要因だけでなく、生命活動に必須の細胞内エネルギー生産に伴う ROS の発生やその他反応性分子の産生は遺伝子の本体である DNA 分子の傷害につながる。さらに DNA 分子自体が含有する化学的性質に起因する変異発生のリスクなどから、現在のところ生きていく上で突然変異の発生は不可避なものと考えられている。

では、実際の突然変異頻度とはどの程度のものであろうか？

2017 年に報告された論文⁽⁴⁾によるとヒトの生殖細胞突然変異頻度は 3.3×10^{-11} 変異/bp/細胞分裂、体細胞突然変異頻度は 2.66×10^{-9} 変異/bp/細胞分裂と報告されている（スライド 42）。理論的に考えると突然変異頻度が $1/2n$ （2 倍体細胞のゲノムサイズ）より大きい場合、1 回の分裂（DNA 複製）あたり 1 個以上の突然変異が発生することになる⁽⁵⁾。両者を比較すると、ヒトの体細胞では 1 回の分裂あたり 16.6 個、マウスの体細胞では 45 個の突然変異が発生して

いる計算になる（スライド 43）。つまり体細胞分裂では、細胞分裂に際し毎回変異が発生、蓄積し、結果として個体を形成する細胞集団はゲノム配列レベルでは完全なモザイク状態にあるといえる。この論文の報告に従えば生殖細胞系列の変異出現頻度はそれよりかなり少なく、細胞分裂あたり 1 個以下であると計算できる。

Mutation rate (mutation/bp/replication) > 1/2n

→ 細胞分裂ごとに 1 個以上の変異が発生する。

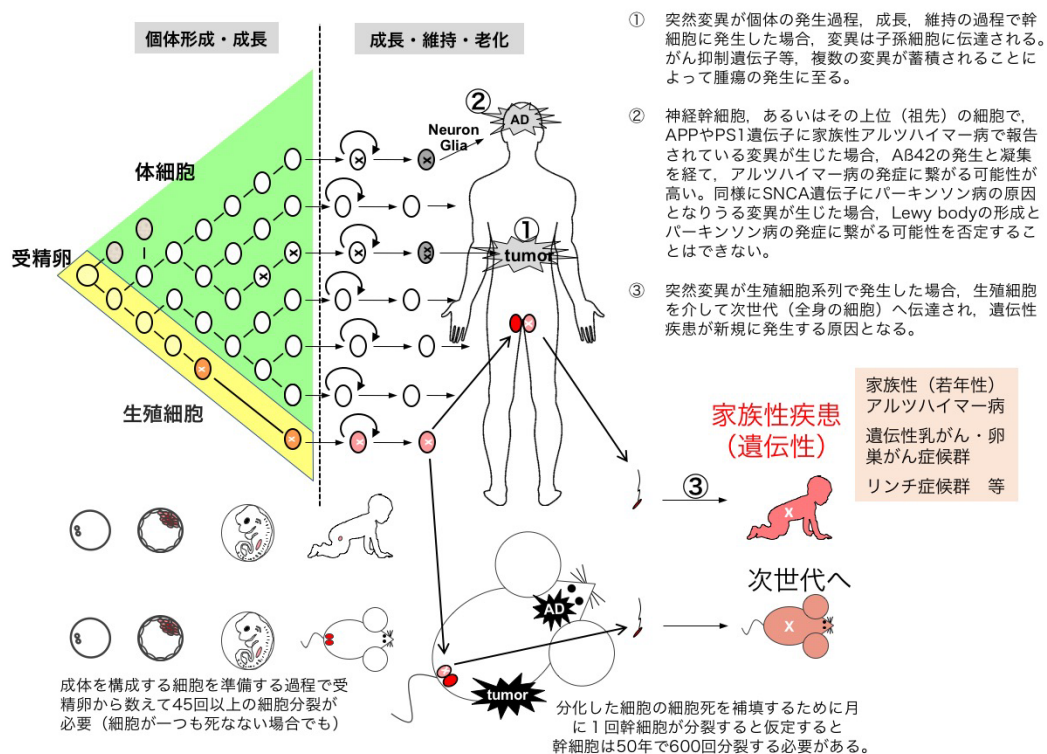
	Genome size (bp)	1/2n	Somatic mutation rate (reported)	Estimated mutation number/mitosis
human	3.06 x 10 ⁹	0.16 x 10 ⁻⁹	2.66 x 10 ⁻⁹	16.6
mouse	2.73 x 10 ⁹	0.18 x 10 ⁻⁹	8.1 x 10 ⁻⁹	45

	Genome size (bp)	1/2n	Germline mutation rate (reported)	Estimated mutation number/mitosis
human	3.06 x 10 ⁹	0.16 x 10 ⁻⁹	3.3 x 10 ⁻¹¹	0.21
mouse	2.73 x 10 ⁹	0.18 x 10 ⁻⁹	1.2 x 10 ⁻¹⁰	0.67

Milholland B. et al. Nat Commun. (2017) 8: 15183. doi: 10.1038/ncomms15183.
Sakumi K. Genes Genet Syst. (2019) 94(1): 3-12. doi: 10.1266/ggs.18-00055.

さて、ヒトの個体は 1 個の受精卵が分裂、増殖し、分化することで形成される。37 兆個とも言われる成人を形成する細胞数に至るためには、全ての細胞が死なずに生存したと仮定しても 45 回以上の細胞分裂を必要とする。実際には個々の細胞には寿命があり、寿命を迎えた細胞は、絶えずそれぞれの幹細胞

から新たに供給され、その供給は個体が生存する限り継続して行われなければならない。単純化して考えると、例えば分化した細胞の寿命が7日の組織では50年で2600回以上、幹細胞が分裂する必要がある。分裂毎に16個の変異が蓄積すると仮定するとそれぞれ4万個以上の変異が蓄積した数百億の幹細胞が体を支えていることになる。このような条件下では、ある一つの細胞のゲノム上に、発癌に必要とされる遺伝子セットの全ての変異が蓄積する状況が個体の中のどこかで現れても不思議ではないだろう（スライド41）。



別の視点から考えると、がんに限らず家族性（遺伝性）の疾患で原因遺伝子が明らかなのは、孤発性の症例では特定組織における体細胞変異が原因となっ

ている可能性も示唆される。現在、原因不明とされる疾患の中から、遺伝子（時に複数）の体細胞変異が発症の原因だったとされる疾患が、今後出現するかもしれない。

さて、加齢に伴い突然変異が蓄積すること自体は避けられないとしても、その発生頻度を例えば半分に抑制することができれば、現状（20歳から30年間の間に蓄積した突然変異によって）50歳で発病しているがんの発症を80歳まで遅延させることができるのではないだろうか。禁煙、減酒など些細な生活習慣の改善の積み重ねで、がんに限らず多くの遺伝子源性的疾患の発症の遅延化は可能なことに思える。そしてそれは高年齢層のQOLの向上に直接つなげることができるだろう。少なくともこれまでの研究からは、突然変異頻度の上昇が個体レベルにおいて生存に有用であるという研究結果は（一部の免疫系システムを除いて）得られていない。自然突然変異頻度が上昇しているマウスの研究から得られた結果は、若い頃からの突然変異の発生を抑制・回避する生活習慣の小さな積み重ねが、長寿命と個々の健康維持につながることを示唆している。

参考資料

1. Ohno M. et al., 8-oxoguanine causes spontaneous *de novo* germline mutations in mice. Sci Rep. (2014) 4: 4689. DOI: 10.1038/srep04689.

2. <https://www.toho-u.ac.jp/sci/bio/column/0790.html>
3. Cooke MS. et al., Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* (2003) 17(10): 1195-1214. doi: 10.1096/fj.02-0752rev.
4. Milholland B. et al., Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice. *Nat Commun.* (2017) 8: 15183. doi: 10.1038/ncomms15183.
5. Sakumi K. Germline mutation: de novo mutation in reproductive lineage cells. *Genes Genet Syst.* (2019) 94(1): 3-12. doi: 10.1266/ggs.18-00055.