

DNA 修復機構の

欠損マウスを用いた自然突然変異の解析

大野みずき（九州大学 医学研究院 基礎放射線医学分野）

自然突然変異の解析

ゲノムとはその生物の全遺伝情報の最小セットを意味し、DNA はその遺伝情報を担う物質である。DNA を安定に維持し、遺伝情報を正確に娘細胞へ伝えることは正常な個体の機能を保つために重要である。しかし、放射線や化学物質等の外的要因により、あるいは細胞の生命活動の過程で副産物的に生じる活性酸素種等の内的要因により日々多くの DNA 損傷が生じている (Ames et al., 1995, PNAS)。そのため、大腸菌からヒトまでほぼ全ての生物には DNA 損傷の種類に対応して複数の DNA 修復機構が備えられており、損傷を受けた DNA は効率的に修復される。突然変異の発生頻度はその細胞での「DNA 複製の正確さ」に加えて「DNA 損傷の発生頻度と DNA 修復の効率」に影響されると考えられるが、通常的生活環境下で自然に発生する突然変異の頻度や種類に後者がどの程度寄与しているのかは不明であり、また、生物種、生存環境、細胞や臓器の種類などによって変化することも予測される。

そこで我々の研究グループでは、哺乳類での自然突然変異の発生と抑制のメカニズムを明らかにし、発がんや次世代への影響を解析するために、特定の DNA 修復機構を欠損させたマウスを複数系統作成し、体細胞と生殖細胞に生じる突然変異の研究を行なっている。これまでに変異原物質の暴露がなくても、酸化 DNA 修復機構の不全により自然発がん頻度が上昇することを明らかにしており、このことは生体内で自然発生する活性酸素種によって恒常的に酸化 DNA 損傷が発生していること、酸化 DNA 損傷が自然突然変異の原因の一つである可能性を示した (Tsuzuki et al., 2007, Cancer Science, Ohno et al., 2006, Genome Res., Ohno et al., 2014, Sci. Rep.)。変異原の暴露や DNA 修復機構の不全による高い変異率の元では遺伝情報の変化が起きやすく、細胞機能の破綻を招き、結果として体細胞ではがんや老化を引き起こし、生殖細胞では生殖効率の低下や遺伝病の発生原因となると考えられる。DNA 修復機構不全マウスを用いると、通常野生型マウスでは観察できない低いレベルの変異原の影響を可視化でき、DNA 損傷の種類や生体影響に関する基礎データが得られるという

利点がある。

生殖細胞ゲノムでの変異

ゲノムの変異には、塩基の置き換わり（塩基置換）、塩基の欠失/挿入、特定の配列の繰返し数の変化（マイクロサテライト配列など）、さらに染色体の構造的変化や数的変化などが含まれる。塩基置換や小さな変異は主に DNA 複製時のエラー、DNA 損傷、およびその修復の過程で生じると考えられる。体細胞でのゲノム変異はその個体の健康に悪影響を及ぼすが子孫には伝わらない。生殖細胞ゲノムに生じた変異だけが配偶子を経て後世の子孫に伝わる可能性がある。体細胞分裂の際には遺伝情報を正確に複製する事が最も重要であるが、新しい個体を生み出す過程では遺伝情報の安定維持とともに多様性の獲得もまた要求されている。ほ乳類では、配偶子形成過程での相同染色体組換えやその後の受精により、親とは異なった塩基配列の組み合わせを生み出し、積極的に多様性を確保している。生物にとって、ゲノムに多様性を持たせ個体間での差を生み出す事は、環境の変化に対応し種を維持する手段として重要な意味を持っている。

近年の塩基配列解析技術の進歩によりヒトゲノムの全容が明らかになった。複数の個体由来の配列情報を比較すると、塩基配列が高度に保存されている領域が検出される一方で、個人によって塩基配列に相違が認められる領域が約 0.1%程度存在することがわかった。これらの配列の相違は、個人間での表現型や性質の違いを生み出す要因となっており、病気との関連や薬に対する感受性を知る上で重要な情報となっている。このような個人間での塩基配列の違いはいつどこで生じたのか？たとえばヒト集団中に存在するある塩基多型の発生源を祖先を遡ってたどり、変異を片方のアレルに持つ最初の 1 個体を同定することができた場合、その個体の元になる配偶子が親の体内で形成される過程のどこかで変異が新たに生じたと考えられる。このように新たに生殖細胞で生じ、子に伝わった変異を *de novo germline mutation* (dGM) と言い、現在の次世代シーケンス解析では親子のゲノムを比較解析し、親の体細胞ゲノム中には存在せず、子のゲノムでのみ見つかる塩基配列の違いとして抽出することができる。

ヒトでは dGM 率は 1.2×10^{-8} /塩基/世代で、毎世代ごとに約 70 個程度の新たな塩基置換型変異が子で生じる計算となる (Kong A, *Nature*, 2012)。近年の

報告では dGM 率 (/塩基/複製)は、体細胞変異率 (/塩基/複製)に比較してほぼ一桁低い値を示す事、また体細胞と生殖細胞では、変異のスペクトルや変異サイトに差があることが示された (Milholland B, et al., *Nat Commun.* 2017)。しかし例えば、複製エラー以外にも生殖細胞特異的な変異誘発原因はあるのか、またどの DNA 修復系が生殖細胞で優位に働くかなど、依然として dGM 率を規定する機構には不明な点が多いため、dGM の発生と抑制に関する分子メカニズムを哺乳動物の個体レベルで理解する必要がある (Ohno M., *Genes Genet.* 2019)。

DNA 損傷の種類によって異なる DNA 修復機構が働く

DNA 修復機構は「塩基除去修復」「DNA ミスマッチ修復」「ヌクレオチド除去修復」さらに「DNA 鎖切断の修復」に大別される。塩基除去修復は酸化、アルキル化、メチル化などの修飾塩基や脱塩基部位を修復対象とする。DNA ミスマッチ修復は主に DNA 複製の際に生じたミスマッチ塩基対と繰り返し配列でのスリッページにより生じた小さなループ構造を認識し修復する。ヌクレオチド除去修復は紫外線によるピリミジンダイマーや種々の化学物質による比較的大きな損傷や架橋を対象とする。DNA 鎖切断の修復には複数の修復系が存在し、単鎖切断と二重鎖切断、または細胞周期のちがいなどによって異なる機構が働く。異なる変異原は異なる DNA 損傷を誘発し、結果として特徴的な変異のパターンを示すことがあるため、近年ではヒトのがん細胞での体細胞変異のパターンを解析し、がん細胞の成長過程のヒストリーを推測するためのフットプリントとしても利用されている (Alexandrov et al., *Nature*, 2014)。

放射線や化学物質による生体影響を解析する際には、変異原の種類や効果による DNA 損傷タイプ、対応する DNA 修復機構、DNA 損傷応答 (細胞死経路の活性化)、及びその帰結を総合的に理解した上で適切な解析系を用いることが重要である。

酸化 DNA 損傷の修復機構を欠損したマウス家系を用いた dGM の検出と解析の例

我々はこれまでに、哺乳動物での自然突然変の原因として、活性酸素による酸化 DNA 損傷に注目し研究を行っており、その一例を紹介する。DNA 中の 4 種の塩基のうちグアニンは最も酸化還元電位が低く (すなわち酸化されやすい)、内在性または外因性の活性酸素種により容易に酸化され 8 位の炭素に酸

素が付加した 8-オキシグアニンが生じる。8-オキシグアニンは比較的安定に DNA 中に存在し、DNA 複製の過程でシトシンだけでなくアデニンとも対合する。これが修復されなければ次の複製の際にアデニンに対してチミンが取り込まれ、結果的に G から T へのトランスバージョン変異が誘発される。このことはすでに大腸菌のミューテーター株の解析や哺乳類の培養細胞の実験系で明らかになっていたが、個体レベルでの遺伝的影響に関しては解析例がなかった。そこで 8-オキシグアニンの修復と変異抑制に関わる 3 つの遺伝子 Mth1, Ogg1, Mutyh を全て欠損させたマウス (TOY-KO) を作出し、自然に発生する酸化損傷塩基によって誘発される生殖細胞突然変異と家系内で発生する種々の変異表現型の解析を行なった。TOY-KO マウス家系ではがんや遺伝病 (水頭症、目の形態異常、毛色変異) などが高頻度に発生し、産仔数が減り、出生後死亡率が上がり 8 世代目で家系の維持ができなくなった。このマウス家系ではゲノム中の 8-オキシグアニン : アデニンの誤対合に起因する G→T トランスバージョン変異の頻度が選択的に上昇していた。dGM 率 / bp / 世代は野生型マウスの約 37 倍にも達し、配偶子形成過程で内在性の酸化ストレスによって多くの突然変異が発生していること、酸化 DNA の修復機構が配偶子ゲノムの安定維持に重要であること、突然変異率の上昇により生殖効率の低下や変異表現型の発生頻度が増加することが実験的に示された。

放射線の生体影響、特に次世代影響評価への応用の可能性

我々は酸化 DNA 損傷の修復機構以外にも複数の DNA 修復機構を欠損させたマウス系統を維持しており、それらは効率的な変異検出系の構築や環境変異原物質などの遺伝的世代影響評価において有効に利用できると考えている。受精卵から配偶子に至る分化や増殖の過程で、核ゲノムの状況 (例えば、遺伝子発現、DNA メチル化、クロマチン、ヒストン修飾、DNA 複製、DNA 修復などの状態) は劇的に変化する。それぞれの段階では変異の発生要因、変異抑制の機構が異なることが予測される。DNA 修復機構欠損マウスを利用した親仔ゲノム解析により、配偶子形成過程における環境変異原への感受性の差などを理解することができるかもしれない。また、ごく低頻度な体細胞変異を定量的に検出するための有効な手段として権藤博士と真木博士が開発した *rpsL* レポーター遺伝子のトランスジェニックマウスを用いた解析系が挙げられるが (当該マウスは当研究室で維持している)、この系と次世代シーケンサーを併用した変異解析パイ

プラインを構築することにより、低線量・低線量率放射線の生体影響の理解へ向けた実験的解析が可能になるのではないかと考えている。