

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300144

研究課題名（和文） DNA修復欠損マウスを用いた継世代変異を誘発する分子機構の解析

研究課題名（英文） Study of molecular mechanisms of germline mutation by using DNA repair deficient mice

## 研究代表者

大野 みずき (OHNO MIZUKI)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：70380524

## 研究成果の概要（和文）：

酸化 DNA 損傷の修復機構を欠損させたマウス家系を作成し、自然突然変異が各世代で生じ生殖細胞ゲノム変異を効率よく解析できる実験系を樹立した。8-オキソグアニンが哺乳類生殖細胞中で新たに生じる遺伝的変異（特に G から T への一塩基置換）の主要な原因となることをはじめて明らかにした。ヒトにおいても過剰な酸化ストレスを回避し酸化 DNA 損傷を抑制することで加齢や環境要因により上昇する遺伝的リスクの軽減に繋がること示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

We established an “oxidative DNA damage repair deficient inbred mouse line”, which is useful for the efficient detection and analysis of *de novo* germline mutation. We showed the 8-oxoguanine is a major source of *de novo* germline G to T transversion mutation in mammal. To avoid excess oxidative stress and DNA damage may reduce the genetic risk which is increasing with age or induced by environmental factors.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2012年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	12,300,000	3,690,000	15,990,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学、疾患モデル

キーワード：DNA 修復、ゲノム変異、継世代影響、遺伝子改変マウス、DNA 損傷

## 1. 研究開始当初の背景

放射線や化学物質等の外的要因だけでなく、炎症反応や細胞の正常な代謝過程で生じる活性酸素種により、DNA には恒常的に酸化的損傷が生じているが、生物は酸化DNA損傷の修復機構を効率的に稼働させることで遺伝情報を

安定に維持している。個体への過剰な酸化ストレス負荷や修復機構の破綻は体細胞での遺伝子の突然変異を誘発し、癌や老化をはじめ種々の疾病の原因となることが明らかになっている。一方で生殖細胞系列で生じた突然変異は次世代以降に受け継がれる可能性があり、

遺伝性疾患や先天異常の原因ともなる。しかしながら酸化DNA損傷やその修復機構が生殖細胞ゲノム変異に及ぼす影響については明らかになっていなかった。野生型生物において、一世代当たりの自然突然変異の発生頻度は極めて低いレベルに抑えられており実験的解析が困難だった。生殖細胞ゲノムの安定維持におけるDNA損傷と修復機構の役割を明らかにするには、それらの破綻がもたらす次世代への影響についての個体レベルでの解析が必要であった。

## 2. 研究の目的

本研究ではマウスの生殖細胞におけるゲノム変異を抑制する分子メカニズムの解明を目的としている。具体的には活性酸素によって生じるDNA損傷に対する修復機構を欠損したマウスを用いて、自然突然変異が高頻度に発生する家系を樹立し遺伝的影響を解析する。さらに生殖細胞系列における修復関連遺伝子の発現パターン、DNA損傷の程度、染色体変異常、突然変異率の解析、また、生殖細胞系列での突然変異頻度上昇が表現系に及ぼす影響の解析を行い、自然突然変異の主要な原因とそれらに対するDNA修復機構の継世代的影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

酸化損傷塩基の修復機能を欠損したマウスを作成し、世代内交配により複数世代交配を重ねることでinbred家系を樹立し、通常的生活環境下でマウス個体が受ける酸化塩基損傷の継世代的影響を解析する。具体的にはそれらのマウス個体及び細胞を用いて、世代間で生じるゲノム変異の検出、生殖細胞系列におけるDNA損傷、染色体変異、表現型変異についての解析を行う。グアニンの酸化体である8-オキソグアニン (8-oxoG) はシトシンだけでなくアデニンとも対合することが可能なことか

ら、2回の複製を経て、G>T変異を引き起こすことが明らかになっている。*Ogg1*遺伝子がコードするOGG1は塩基除去修復の酵素で、DNA中に存在する8-oxoGを除去する活性を有し、欠損によりゲノム中に8-oxoGが蓄積し塩基置換頻度が上昇する。*Mth1*遺伝子産物であるMTH1は8-oxo-dGTPを分解する活性を持ち、DNA中屈の取り込みを抑制している。*Mutyh*遺伝子はDNA複製の過程で8-oxoGに対して誤って取り込まれたアデニンを除去する活性を持つMUTYHをコードしている。これら三つの酵素が協調的に働くことで、8-oxoGに起因する突然変異を効率的に防いでいる。従ってこれら三つの遺伝子を全て同時に欠損させたマウスでは8-oxoGに起因する突然変異が体細胞だけでなく生殖細胞系列でも有意に上昇することが期待される。

- (1) (*Ogg1*<sup>-/-</sup>, *Mth1*<sup>-/-</sup>, *Mutyh*<sup>-/-</sup>) トリプルノックアウトマウス家系の作成および維持と、表現型の解析。
- (2) 8-oxoGの定量的計測
- (3) 変異表現型の遺伝様式解析のための遺伝学的交配実験。
- (4) 染色体変異、アレイCGH解析
- (5) 生殖細胞ゲノム変異のシーケンス解析

## 4. 研究成果

(*Ogg1*<sup>-/-</sup>, *Mth1*<sup>-/+</sup>, *Mutyh*<sup>-/+</sup>) 同士の交配により得られた1組のトリプルノックアウトマウス (*Ogg1*<sup>-/-</sup>, *Mth1*<sup>-/-</sup>, *Mutyh*<sup>-/-</sup>) ペアを用いて交配を行い、兄弟姉妹交配を基本とする世代内交配により第8世代まで飼育した。HPLC-MS/MSにて8-oxoG量の計測を行ったところ、トリプルノックアウトマウスでは野生型に比較して生殖臓器を含む各臓器で8-oxoGの蓄積を認めた (図1)。

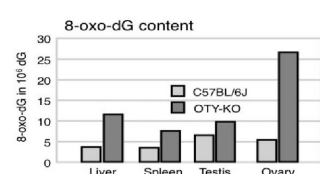


図1)

8-oxoGの  
定量解析

トリプルノックアウトマウスはトリプルヘテロマウスおよび野生型に比較して短命で15ヶ月以内にほとんどのマウスが死亡した(図2)。

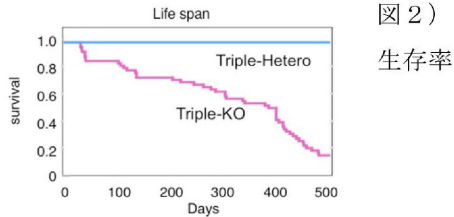


図2) 生存率

また、死亡率は世代が進むごとに増加した。成長後の死因の主原因は種々の臓器由来の原発性腫瘍と考えられ、体細胞突然変異率の上昇が推測された。

さらに、産仔数が世代を減るごとに低下し、離乳前死亡率は世代を減るごとに上昇し(図3)、結果的に最も先端の世代では生殖可能な個体を得ることが困難であった。

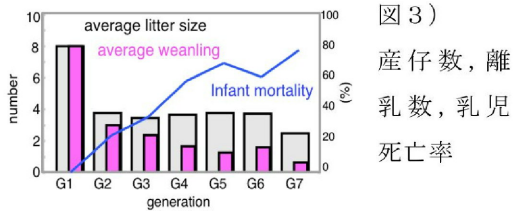


図3) 産仔数, 離乳数, 乳児死亡率

第2世代以降で先天性の水頭症を呈する個体が複数匹生まれ、第1世代の特定の親マウスの生殖細胞中での *de novo* 突然変異が原因である可能性が示唆されたため、遺伝学的交配実験によりこの水頭症が常染色体優性遺伝であることを確認し、キャリア個体を同定した(図4)。

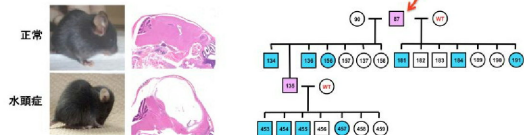


図4) 水頭症マウスと HE 染色(左)と交配実験による遺伝形式の確認(右)。第2世代の赤矢印のマウス(*de novo* mutation: ピンク)を野生型と交配すると水頭症が生まれた。第三世代のキャリア個体(ピンク)を野生型と交配すると同様に水頭症個体を得られた。

さらに第3世代以降では小眼球症、無眼球症、腹部の白斑(常染色体優性遺伝であることを確認)など変異表現型を示す個体が検出された。以上、世代の進行に伴い増加する死亡率、減少する仔の数、遺伝性の先天性変異表現型の増加はこのトリプルノックアウトマウスの家系では生殖細胞系列で自然突然変異頻度が上昇している可能性および、世代を経る度に新たな変異が生じ後世代の個体のゲノム中に蓄積している可能性が示唆された。

次に家系内で生じた染色体変異、ゲノム変異の検出を行った。第1世代と第5世代の複数匹のマウスの染色体分析を行ったところ、顕微鏡レベルでは染色体の構造異常や数の異常は認められなかった。アレイ CGH の結果より、ゲノムの数十カ所で小さな欠失またはコピー数変異が生じていることが示唆された。そこで、各ブランチ最先端の世代から3個体を選択し(図5)、次世代シーケンサー(SOLiD™ 4 System)による全エクソンの配列解析、および MassArray 解析を行い、各個体に蓄積された変異を同定した(理研権藤博士チームに依頼)。

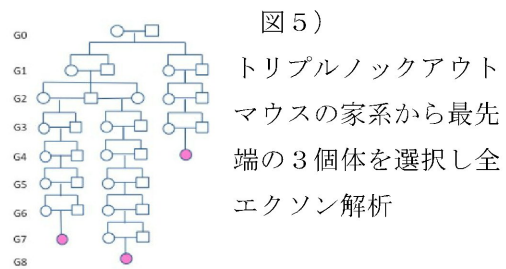


図5)

トリプルノックアウトマウス家系から最先端の3個体を選択し全エクソン解析

各個体100個程度の変異が同定され、そのうちの98%以上が8-oxoGに起因するG→Tトランスポージョン変異だった。アミノ酸置換を起こす非同義置換は同義置換に比較して4倍以上多く、タンパク質構造や変化量を変化させる可能性のある終止コドンの追加やスプライスサイトの変異も検出された。変異発生個体の同定のためにそれぞれの祖先をさかのぼって変異箇所シーケンス解析を行っ

たところ、祖先の世代で新たに生じた変異が遺伝的に受け継がれていることが証明された。また、両親では検出されない *de novo* 生殖細胞変異は平均 16 個/個体だったことから、概算するとこのトリプルノックアウトマウスの家系では、 $2 \times 10^{-7}$ /塩基対/世代の率で変異が生じている計算になる。これは野生型の 10 倍近い値と考えられる。この実験系は生殖細胞ゲノムの自然突然変異率を野生型の 10 倍に上昇させ、少ない世代数で効率的な解析を可能にしたと言う点で哺乳類でははじめての例である。

以上の結果より、ヌクレオチドの酸化や DNA の直接酸化によって核ゲノム DNA に蓄積した 8-oxoG はマウス生殖細胞ゲノム中で次世代に伝わる突然変異を誘発することが示唆された。また、*Ogg1*, *Mth1*, *Mutyh* の 3 つの遺伝子が協調的に働き、生殖細胞ゲノム中で 8-oxoG に起因する突然変異を効率よく抑制することで、自然突然変異の発生率を低く抑えていることが明らかになった。大腸菌で発見された「酸化損傷 DNA に起因するゲノム変異を抑制するシステム」は哺乳類においても生殖細胞系列での自然突然変異を抑制し、広く生物種の表現型と遺伝子型の安定維持に寄与していることが明らかとなった。

さらに G→T 変異の大部分は酸化ストレスで生じる 8-oxoG に起因すると考えられるため、G→T 変異の分布や頻度に注目することで、生物種の進化の過程での地球環境変化による酸化ストレスが生物ゲノムへ与えた影響の程度を推測することができるだろう。また、酸化ストレスは環境因子によっても生じるが、感染や疾病によって起こる炎症などの生体内での反応によっても生じることから、効率的に酸化ストレスおよび酸化 DNA 損傷を防ぐことは健康的な生殖機能に重要であり、将来的には生殖医療を含めた臨床分野への貢

献が期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) 大野みずき, 酸化損傷塩基がほ乳類ゲノムに及ぼす影響, 福岡医学雑誌, 総説 2010. 04.
- (2) Tsuzuki, T., Piao, J., Isoda, T., Sakumi, K., Nakabeppu, Y., Nakatsu, Y. Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice (Note). Health Physics, 100, 293-294 (2011) 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- (1) 大野みずき, 作見邦彦、福村龍太郎、権藤洋一、田口健一、續輝久、中別府雄作, 酸化損傷塩基の修復機構を欠損するマウス家系の解析, 第 35 回日本分子生物学会, 2012. 12. 15. 福岡
- (2) 大野みずき, 作見邦彦、福村龍太郎、権藤洋一、續輝久、中別府雄作, 酸化損傷塩基の修復機構は生殖細胞ゲノム変異を抑制し同系交配によるマウスの表現型の安定性に寄与する, 日本環境変異原学会第 41 回大会, 2012. 11. 29. 静岡
- (3) Mizuki Ohno, Kunihiko Sakumi, Teruhisa Tsuzuki, Yusaku Nakabeppu, Influence of 8-oxoguanine on mitotic and meiotic chromosome, The 10th International Symposium on Chromosomal Aberrations, 2012. 10. 20. Italia
- (4) 大野みずき, 作見邦彦、福村龍太郎、権藤洋一、續輝久、中別府雄作, ワークショップ 8-オキソグアニンの修復機構を欠損するマウスは、生殖細胞ゲノム中の突然変異頻度の上昇と遺伝性の変異形質を

- 呈する, 日本遺伝学会第 84 回大会, 2012. 09. 25. 福岡
- (5) Mizuki Ohno, Megumi Nakanishi, Teruhisa Tsuzuki, A study of radiation-induced oxidative DNA damage and its repair in mouse intestine, 日本分子生物学会第 34 回年会, 2011. 12. 15. 横浜
- (6) 大野みずき, 中西恵美, 續輝久, マウス腸管における放射線誘発酸化 DNA 損傷の解析, 日本環境変異学会, 2011. 11. 21. 東京
- (7) 大野みずき, 中西恵美, 續輝久, マウス小腸における放射線誘発酸化損傷塩基の解析, 日本放射線影響学会, 2011. 11. 17. 神戸
- (8) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 中西恵美, 續輝久, 中別府雄作, 8-oxoguanine は DNA 鎖切断を誘発することで減数分裂期の相同染色体組換え頻度を上昇させる, 日本遺伝学会, 2011. 09. 21. 京都
- (9) Mizuki Ohno, Megumi Nakanishi, Teruhisa Tsuzuki, A study of radiation-induced oxidative DNA damage and its repair in mouse tissues, 14th International Congress of Radiation Research, 2011. 08. 29. Poland
- (10) 大野みずき, 作見邦彦, 續輝久, 中別府雄作, 8-oxoguanine は DNA 鎖切断を誘発することで減数分裂期の相同染色体組換え頻度を上昇させる, 第 33 回日本分子生物学会年会, 2010. 12. 08. 神戸
- (11) 大野みずき, 中西恵美, 作見邦彦, 古市正人, 中別府雄作, 續輝久, 酸化損傷 DNA が生殖細胞ゲノムに及ぼす影響, 日本環境変異原学会, 2010. 11. 16. 筑波
- (12) 大野みずき, 中西恵美, 中津可道, 續輝久, 低 LET 放射線による核酸の損傷とその修復機構: 腸管と精巣における解析, 日本放射線影響学会, 2010. 10. 20. 京都

〔図書〕(計 1 件)

大野みずき, 續輝久, 中山書店, DNA 修復酵素遺伝子-酸化的 DNA 損傷の修復系を中心として一、生命科学研究の戦略: 疾患モデルマウスと表現型解析 著書 2011. 12

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biophys.med.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大野みずき (OHNO MIZUKI)

九州大学・大学院医学研究院・基礎放射線医学分野

研究者番号: 70380524

### (2) 研究分担者

續輝久 (TSUZUKI TERUHISA)

九州大学・大学院医学研究院・基礎放射線医学分野

研究者番号: 40155429

### (3) 研究分担者

中津可道 (NAKATSU YOSHIMICHI)

九州大学・大学院医学研究院・基礎放射線医学分野

研究者番号: 00207820