

# ゲノム多型及び遺伝病の成因としての自然DNA酸化損傷とその修復機構の破綻

●中別府雄作

九州大学・生体防御医学研究所

## 〈研究の目的と進め方〉

近年のゲノム配列の解析から、ゲノム配列には個体差、すなわち遺伝子多型が存在することが明かとなり、疾患との関連から大掛かりなスクリーニングが展開している。遺伝子多型の中で最も頻度が高いものが一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) であるが、その成因に関する研究はまだほとんど手つかずの状態である。また、遺伝病の原因となる突然変異も多型と同じメカニズムで生じる可能性があるがその解明は全く手付かずである。

本研究では、SNPの成因の1つとしてヒトゲノム上に恒常的に存在する8-oxoGの存在様式とその原因を明らかにするとともに、SNPデータベースをもとに8-oxoGにより引き起こされる塩基置換、すなわちG:C to T:A並びにA:T to C:Gトランスポージョンのゲノム上の頻度と分布を解析し、8-oxoGの存在部位との関連を解析した。

## 〈研究開始時の研究計画〉

### ① ヒト染色体上の8-oxoGのマッピング

複数のボランティアから採血した末梢血中のリンパ球を分離後、PHA存在下で72時間培養後分裂中期の細胞を調製し、8-oxoGを蛍光免疫染色法により染色体上にマッピングする。

### ② ヒトSNPの塩基置換スペクトラムの解析

公開されているSNPデータベースの中で8-oxoGに起因する可能性の高いG/TとA/C塩基置換部位を他の塩基置換と区別して染色体上にマッピングする。このG/TとA/C塩基置換と8-oxoGの染色体上の分布の相関性を検定する。

### ③ マウス細胞における8-oxoG分布の解析

C57BL/6野生型マウスとOGG1<sup>+/+</sup>、OGG1<sup>-/-</sup>マウスの末梢血リンパ球における8-oxoGの分布を解析し、マウスのSNPの分布と8-oxoGの分布について比較する

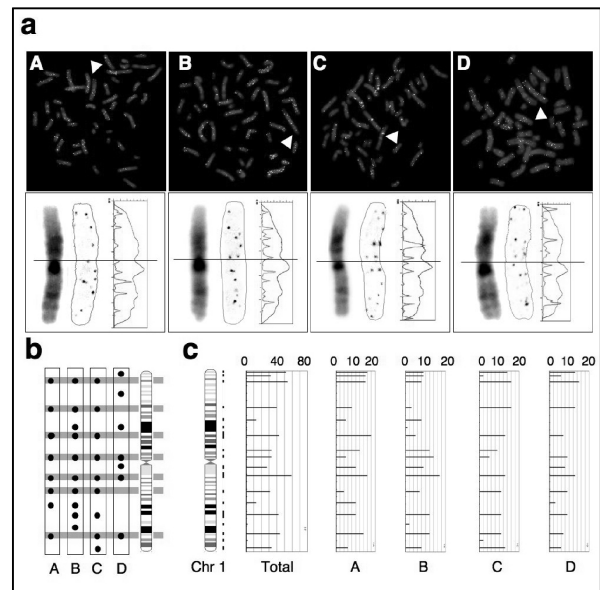
## 〈研究期間の成果〉

グアニンの酸化体である8-オキシグアニン (8-oxoG) はシトシンだけでなくアデニンとも対合するために塩基置換の原因となることが明らかになっている。

我々は、まず(1)ほ乳動物細胞を用いて蛍光抗体染色法による単一細胞レベルでの8-oxoGの動態の観察とHPLC-MS/MSによる物理的定量法を併用して、高い精度で安定に8-oxoGを検出できる条件を確立した。この方法を用いて、4名のボランティアからの末梢血リンパ球の染色体標本を作製し、ゲノムワイドな8-oxoGの存在領域を同定しその頻度を求めた。その結果、ヒト染色体上には個体間で共通に8-oxoGが高頻度に存在する領域が100ヶ所以上存在することが明らかになった。これらの8-oxoGの染色体上の分布をイデオグラム上にマッピングした。

2) Kangら(2000)のdeCODEデータベースから染色体ごとの組み換え部位と頻度の分布図を作製し、8-oxoGが高頻度に存在する領域と比較解析した。その結果、各染色体上の組換え頻度と8-oxoGの分布密度の間で高い相関

性が認められた。さらに各染色体上での8-oxoG分布と高頻度組換え部位の分布とを比較した結果、8-oxoGが分布する領域では組換え頻度が高い傾向が認められた。次に、またNCBIで公開されている一塩基多型 (SNP) の情報をもとに塩基置換のスペクトラム別にそれぞれの存在部位と頻度分布を計算し、イデオグラムに対応したSNPの頻度分布図を作成した。イデオグラム上の8-oxoGの分布マップとの比較解析から、8-oxoGの分布する領域の近傍にSNPが高頻度頻に存在する領域が認められた。特に、8-oxoGが存在する領域においてはグアニンが関与する塩基置換の頻度が有意に高いことがわかった。以上の結果は、ヒト染色体上に普遍的に存在する8-oxoGが減数分裂期の組換えとSNPの生成の両方に影響を及ぼしていることを示しており、定常状態でゲノム上に存在する8-oxoGがヒトゲノムの多様性を生み出す原動力になっている可能性を示唆する。(3) マウスの精巢の組織切片を用いて、減数分裂期の生殖細胞においても8-oxoGの検出を試み、ヒトリンパ球におけるレベルとほぼ同程度の8-oxoGが検出された。



## 〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究成果をGenome Research誌に投稿したところ、8-oxoGのヒト染色体上における分布について初めて網羅的に解析した研究として評価され、突然変異の発生に重要な貢献をもたらすと評価された。現在、SNPおよび組換え頻度との比較について最新のデータベースでの比較を改訂として要求されている。

## 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初、計画の③として、「マウス細胞における8-oxoG分布の解析」を予定していたが、ヒトゲノムデータの再解析にかなりの時間を要したため、1年間の研究期間ではマウスの精巢の組織切片を用いて、減数分裂期の生殖

細胞においても8-oxoGの検出を行うにとどまってしまった。

#### 〈今後の課題〉

ゲノム中の8-oxoGの蓄積レベルをコントロールする遺伝子として、MTH1とOGG1、さらに8-oxoGによる突然変異を制御する遺伝子としてMUTYHに注目し、それぞれの欠損マウスを樹立しているのが、現在C57BL/6野生型マウスとこれらの変異マウスの末梢血リンパ球における8-oxoGの分布を解析し、マウスのSNPの分布と8-oxoGの分布について比較する予定である。この結果と今回のヒトの結果を比較することにより、より直接的に8-oxoGの蓄積とSNP生成や組換えとの因果関係を明らかにできると考えている。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

##### 1) 論文

1. Mizuki Ohno, Tomofumi Miura, Masato Furuichi, Yohei Tominaga, Daisuke Tsuchimoto, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu. A genome-wide distribution of 8-oxoguanine correlates with the preferred regions for recombination and single nucleotide polymorphism in human genome. Genome Research (under revision).