

平成 10 年度

厚生科学研究費補助金長寿科学総合研究事業

総括研究報告書

研究課題：老化個体に蓄積する突然変異の

質的特異性の解析

東北大学医学部

小 野 哲 也

老化個体に蓄積する突然変異の質的特異性の解析

小野哲也 (東北大学医学部ゲノム生物学分野教授)

新生仔期と老化期(2 カ月令)の Muta マウス脳、皮膚、睪丸に見出される自然突然変異体について標的遺伝子である lacZ の DNA 塩基配列を決定し、変異の質を比較検討した。その結果、2 つの時期でほとんど変わらないこと、また 3 つの臓器間でもほぼ同じであることが分かった。このことは老化に伴って蓄積する突然変異の原因が胎仔期と出生後の加齢過程で変わらないことを示唆するものである。

A. 研究目的

老化に伴う突然変異蓄積速度が遅いことを確かめている脳、皮膚、睪丸での新生仔期及び老化期(2 カ月令)に見出される突然変異を分離し、それらの DNA 塩基配列を決定し、変異の質が老化過程で変化するかどうかを解析するのが目的である。

B. 研究方法

出生直後及び 23 カ月令の Muta マウスそれぞれ 3 匹から脳、皮膚、睪丸を取り出した。ただし新生仔期の睪丸はまだ分化が始まっていないので、これに関しては 2 カ月令のものを使った。皮膚は背中 of 皮膚を脱毛後 3~4 cm²切り出した。DNA を抽出後、パッケージングにより lacZ 遺伝子を入ファージの形で回収し、P-gal 存在下で E. coli C 株(lacZ⁻, galE⁻)に感染、増殖させ、現れたプ

ラークを変異を含んだファージとして分離した。変異体はさらに X-gal を分解しないことを確かめた上で DNA を抽出し、lacZ 部分を 6 つの DNA 断片として PCR で増幅後、各フラグメントについて didexy 法により塩基配列を決定した。

得られた塩基配列を GenBank に登録された lacZ 遺伝子の塩基配列と比較することにより変異を同定した。

C. 研究結果

3 つの臓器について各エイジで 37~47 個の変異体について塩基配列を決めた結果、以下のことが分かった。

1. 最も高い頻度で見られるのは 1 塩基置換であり全体の 80%以上を占める。
2. 1 塩基置換の中で頻度の高いのは CpG 配列での G:C→A:T 変異であった(全体の

50%~85%)。

3. 少数ではあるが欠失と挿入も見られた。それらは端に 1 塩基以上のくり返し配列をもっていた。
4. 老若による差及び臓器による差はみられなかった。ただし老化した脳では G:C→T:A の transversion 変異の頻度が新生仔のものより高い傾向を示した。

D. 考察

突然変異の頻度は老化に伴って増加するが、その質は老若で余り変わらないことが分かった。これは変異の原因が類似していることを示唆している。しかもそれは細胞分裂の多い皮膚や睾丸でも、分裂の少ない脳でも変わらないことから、細胞分裂に伴う DNA 複製とは余り関係しないと推測される。もしそうであれば、DNA の損傷とその修復過程が重要ではないかと推測される。変異の中で最も頻度の高かった CpG 配列での G:C→A:T transition は、いくつかの状況証拠から C の 5 の位置のメチル化、4 の位置の脱アミノ化による 5 メチルシトシンのチミンへの変化、チミンとアデニンの対合というシナリオが作られている。確かに lacZ 遺伝子の CpG 配列はほとんどメチル化されていると思われる。但し、生体内ではチミンが生じた時点で G:T ミスマッチが生じることになり、しかもこれは DNA ミスマッチ修復や G:T ミスマッチ修復の基質となるものである。従って上記のシナリオが正しいとすると老化に伴う突然変異増加はこの修復能力の低下によっても説明し得ることになる。これらは今後の課題である。

E. 結論

Muta マウスの脳、皮膚、睾丸で老化に伴って蓄積する突然変異の質は若年期のものと類似したものであった。このことは突然変異生成のメカニズムが老若で変わらないことを示唆している。今後は見出された突然変異の原因を探るのが課題となる。因みに活性酸素に特異的であるとされる変異は必ずしも多くはなかったので、それ以外の理由を考慮する必要があるだろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Y. Hosoi, M. Kawamura, T. Ono, et al.: Sensitization of cells to ionizing radiation by chlorin e6Na. *Radiation Oncol. Investigat.*, 6:151-156, 1998.
- ② Y. Hosoi, H. Miyachi, T. Ono, et al.: A phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin induces radioresistant DNA synthesis and sensitizes cells to bleomycin and ionizing radiation. *Int. J. Cancer*, 78:642-647, 1998.
- ③ R. Tawa, Y. Kimura, T. Ono, et al.; Effects of X-ray irradiation on genomic DNA methylation levels in mouse tissues. *J. Radiat. Res.*, 39: 271-278, 1998.

2. 学会発表

- ① 小野哲也、池畑広伸ら、老化に伴って蓄積する突然変異の質の解析。日本基礎老化学会第 21 回大会、東京、1998.
- ② 小野哲也、活性酸素ストレスの生体への影響。第 7 回放射線生物学ワークショップ

- ブ、長崎、1998.
- ③堀口美恵子、小野哲也、祖父尼俊雄ら、トランスジェニックマウス $gpt\Delta$ を用いた紫外線誘発突然変異の *in vivo* 解析。環境変異原学会、大阪、1998.
- ④ T. Ono: Age-dependent accumulation of spontaneous mutation. '98 International Symposium on Aging and Neurodegenerative Diseases, Seoul, 1998.
- ⑤小野哲也、中村慎吾、池畑広伸、X 線照射した MutaTM マウスにみられる突然変異の質の解析。日本放射線影響学会第 41 回大会、長崎、1998.
- ⑥池畑広伸、小野哲也、Muta マウスによる UV 誘発突然変異の *in vivo* 解析。日本放射線影響学会第 41 回大会、長崎、1998.
- ⑦中村慎吾、一政祐輔、小野哲也ら、Ingeno Mouse を用いた X 線誘発突然変異の検出とその問題点。日本放射線影響学会第 41 回大会、長崎、1998.
- ⑧池畑広伸、小野哲也、個体の老化に伴って蓄積する突然変異。第 8 回放射線生物学ワークショップ、仙台、1998.