

P1-038

出芽酵母を用いた過酸化水素による Loss of Heterozygosity 誘発機構の解析

土居明紀子、大学保一、遠藤金吾、布柴達男、山本和生
東北大院・生命科研・分子生命

Mechanisms for hydrogen peroxide-induced loss of heterozygosity in *Saccharomyces cerevisiae*

Doi Akiko, Daigaku Yasukazu, Endo Kingo, Nunoshiba Tatsuo, and Yamamoto Kazuo
Dep. of Biomol. Sci., Grad. Sch. of Life Sci., Tohoku Univ.

【緒言】

二倍体細胞である機能の突然変異体を分離すると、その機能を担う2つの遺伝子座のどちらにも同じ変異が起きているものが観察される。これは一方の染色体上の遺伝子に生じた突然変異が、もう一方の染色体の正常な遺伝子に転移したために見られるもので、Loss of Heterozygosity (LOH) と呼ばれる。がん抑制遺伝子などにこの現象が起きると、遺伝子がホモで欠損した状態となり、細胞のがん化に寄与することになる。我々は昨年の大会において、出芽酵母2倍体細胞を用いたLOH検出系を確立し、報告した。そこで本研究では、LOHの誘発機構を明らかにすることを目的とした。そこで組換え修復に関わるとされるRad51やRad52、さらには非相同末端結合修復に関わるyKu70の破壊株を作成し、LOH誘発におけるそれらの機能の役割を検討した。また我々はAmes試験陰性の発がん物質であるOPPやその誘導体のDHBP、またベンゼン代謝物のbenzoquinoneやhydroquinoneにLOH誘導性を見いだしている（渡辺ら、本大会で発表）が、これらの物質は細胞内で金属を介したredox cycleにより活性酸素を生成することが報告されている。従って、それらの化合物によるLOH誘発への活性酸素の寄与の可能性を明らかにするために、本研究ではLOH誘発剤として過酸化水素を採用した。

【方法】

実験にはLOH検出用の出芽酵母2倍体細胞YAS101/106 (*CAN1/can1Δ*) とそのRad51やRad52、yKu70遺伝子破壊株を用いた。Rad51やRad52、yKu70の破壊は、まず、それぞれの遺伝子を含むDNA断片をクローニングし、それぞれのコーディング領域にURA3遺伝子を挿入したのち、LOH検出用のマーカーをもつ1倍体のMAT α 株 (YAS101) およびMATa株 (YAS106) に導入し、相同組換えによる破壊株を分離した。それらをmatingすることでそれぞれの遺伝子をホモに破壊した株を作成した。

作成した2倍体細胞を過酸化水素存在下または非存在下で15時間30°Cにおいて培養し、

a) カナバニン抵抗性への変異を指標に*CAN1/can1Δ* から*can1Δ/can1Δ*への変異株を分離することでLOH頻度を求めた。

b) *CAN1*遺伝子を挟むように導入した*ADE2*、*LYS2*マーカーの喪失を利用しLOHの機構を確認した。

c) *ADE2*、*LYS2*マーカーを喪失しない変異体の場合、*CAN1*領域のPCR産物のサイズを指標に、小さい範囲で生じた遺伝子転換なのか、*can1Δ*とは独立に*CAN1*に生じた点突然変異なのかを特定した。

【結果および考察】

野生株を過酸化水素処理すると、量一効果関係を伴うLOHの誘導が見られた。その機構を調べると、自然発生LOHは相同染色体間の交叉が最も高頻度でみられた。過酸化水素処理をすることにより、いずれの頻度も上昇したが、相同染色体間交叉が最も高頻度であった。

非相同末端結合修復に関わるyKu70の欠損株の過酸化水素に対する感受性は、野生株と比べ大きな違いは見られず、LOHの誘導も、野生株同程度の量一効果関係を伴うLOHの誘導が見られた。その機構に関しては、自然発生、過酸化水素処理の何れの場合も野生株とほぼ同等であった。以上の結果から、yKuの関与する非相同末端結合修復の機能は、過酸化水素によるDNA損傷に対してはほとんど寄与していないと考えられる。

一方、*rad52Δ*株では、自然発生LOH頻度が野生株よりも高く、その機構は、野生株で高かった相同染色体間交叉や遺伝子転換が大きく減少し、代わりに染色体の喪失が上昇した。過酸化水素処理の場合、*rad52Δ*株は野生株に比べ、極めて高感受性を示した。LOHの誘発については現在解析中であるが、これまでに得られた結果では、50%生存率を与える濃度での誘発頻度を比較すると、野生株では自然発生LOH頻度の7~8倍程度の誘発が見られたのに対し、*rad52Δ*株では2倍程度の誘導しか見られなかった。その濃度でのLOH機構は、染色体喪失を除き自然発生の場合とほぼ同じで、染色体喪失のみ過酸化水素処理により2倍程度増加した。

また*rad51Δ*株については現在検討中である。

以上の結果は、過酸化水素によるDNA損傷がLOHを誘導すること、そのDNA損傷の修復に組み換えが重要であるとともにこの機能が主に相同染色体間交叉によるLOH誘発に寄与していることを示している。通常、分裂初期には高頻度で相同組み換えが起こり、その後染色体が均等に分配される。しかし*rad52Δ*株では組換えの欠損により、染色体の不分離が生じるため、本実験系でも染色体の喪失が高頻度で観察され、過酸化水素処理はその不分離をわずかに助長したものと考えられる。