

自然突然変異の発生における
酸素ラジカルの役割

坂井 亜紀子

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 原核生物分子遺伝学講座

(真木 寿治 教授)

平成18年5月22日提出

目次

第一章 序論	5-12
1. 酸素ラジカルと生物との関係	6
2. 細胞内における酸素ラジカル種の産生	7-8
3. 酸素ラジカル消去系と酸化的 DNA 損傷を修復する機構	9-11
4. 本研究の目的:自然突然変異における酸素ラジカルの役割	12
第二章 材料と方法	13-23
1. 材料	
1-1 菌株	14
1-2 P1 ファージ	14
1-3 試薬・培地・機器	14-16
2. 実験方法	
2-1 終夜培養	17
2-2 P1 ファージを用いた形質導入	17-18
(a) P1 溶原菌の調製	
(b) P1 溶原液による形質導入	
2-3 ミューター活性の判定的測定 (パッチテスト)	19
2-4 染色体上部分二倍体 <i>rpsL</i> 検出系を用いた突然変異頻度の測定	19-20
2-5 変異スペクトラム解析	20-23
a) PCR 法	
a-1) 鋳型 DNA の調整(boil 法)	
a-2) プライマー	
a-3) 反応液の調整及び PCR 反応	
b) アガロースゲル電気泳動	
c) プライマーの除去	
d) DNA 塩基配列の決定	
e) シスター変異排除による変異頻度偏りの補正	
2-6 過酸化水素処理	23
第三章 結果	24-61
1. 完全嫌気培養法の確立	25-43
1-1 アネロパックを用いた嫌気培養法	25-30
a) 酸素濃度の違いによる生育速度の違い	26

b) $\Delta mutMY$ 株および $\Delta mutT$ 株のミューテーター効果を指標としたアネロパック嫌気培養の評価	26-30
1-2 酸素ラジカルバースト時に誘発される突然変異の特徴	31-36
a) 塩基置換変異	32
b) フレームシフト変異	33
c) アリル間組換え変異	35
d) その他の変異	35
1-3 アネロパックを用いた嫌気培養実験のまとめ	35-36
1-4 最小培地を用いた嫌気培養法の検討	36-40
a) 最小培地における酸素濃度の違いによる生育速度の違い	36-37
b) $\Delta mutMY$ 株のミューテーター効果を指標とした最小培地アネロパック嫌気培養の評価	37-38
c) 最小培地での有酸素およびアネロパック嫌気培養時に誘発される <i>rpsL</i> 突然変異のスペクトラム解析	38
d) 最小培地を用いたアネロパック嫌気培養実験のまとめ	38
1-5 三重シールド嫌気培養法を用いた完全嫌気培養の達成	41-43
a) 酸素濃度差による生育速度の違い	41
b) $\Delta mutMY$ 株および $\Delta mutT$ 株のミューテーター効果を指標とした三重シールド嫌気培養の評価	41-42
2. 培地中の酸素の存在が及ぼす <i>rpsL</i> 前進突然変異頻度への影響	44-51
2-1 有酸素培養及び三重シールド嫌気培養条件下で誘発される <i>rpsL</i> 突然変異頻度の解析	44
2-2 有酸素及び三重シールド嫌気培養条件下で誘発される <i>rpsL</i> 突然変異のスペクトラム解析	44-27
a) 塩基置換変異	46
b) フレームシフト変異	46-47
c) アリル間組換え変異	49
d) 欠失変異	49
e) 重複変異	50
f) IS 変異	50
2-3 有酸素培養および三重シールド嫌気培養実験のまとめ	50-51

3.	過酸化水素処理による細胞内酸素ラジカル濃度の上昇が及ぼす <i>rpsL</i> 突然変異への影響	52-61
3-1	過酸化水素処理による生存率の減少	53
3-2	$\Delta mutMY$ 株のミューテーター効果を用いた、過酸化水素処理による細胞内ヒドロキシラジカル濃度上昇の評価	55
3-3	過酸化水素処理が及ぼす <i>rpsL</i> 突然変異頻度への影響	55
3-4	過酸化水素処理により誘発される <i>rpsL</i> 突然変異のスペクトラム解析	57-60
	a) 塩基置換変異	57
	b) フレームシフト変異	58
	c) アリル間組換え変異	60
	d) 欠失変異	60
	e) 重複および IS 変異	60
3-5	過酸化水素処理を用いた実験のまとめ	60-61
第三章	結論	62-68
1.	酸素ラジカルは自然突然変異に影響を与えるのか？	63
2.	酸素ラジカル依存的に誘発される変異の原因	64-66
2-1	245T→A ホットスポット型塩基置換変異について	64-65
2-2	その他のホットスポット変異について	65-66
2-3	ホットスポット以外で誘発される点突然変異について	66
3.	酸素ラジカルに依存しない変異について	67
4.	今後の展望	67-68
第四章	付録表、参考文献	69-105
	付録表	70-99
	参考文献	100-105
	謝辞	106

第一章 序論

1. 酸素ラジカルと生物との関係

細胞のDNAは外部からの薬剤などの処理を行わずとも、生理的環境下でも変化し、加水分解反応、酸化反応、脱アミノ反応やアルキル化反応を受ける。その中でも、酸化反応を引き起こす酸素ラジカル種は、DNAのみならず、タンパク質、脂質にも損傷を与える。酸素ラジカルには、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカルの他にも、一酸化窒素、ペルオキシ亜硝酸イオンなどの酸化窒素化合物といった様々な種類が知られている。これらの酸素ラジカル種と生物との関わり合いは非常に深く、人では各種の炎症性疾患、糖尿病、癌、動脈硬化、神経疾患、虚血性再灌流障害などとの関わりが指摘されている。また、酸素ラジカルによる損傷がパーキンソン病などの老化に伴う疾患に関与している可能性も示唆されてきている[7]。

しかし、生物もそれらの変異原から自己を守るシステムを構築している(図1)。酸素ラジカル自体を消去する機構として、カタラーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)などが知られており、それぞれ過酸化水素、スーパーオキシドを消去する。さらに、これらの防御系を逃れた酸素ラジカルによって発生する酸化的DNA損傷は、MutMやMutYタンパク質などの修復タンパク質により効率よく修復される事が知られている。

好気的な生物は呼吸によりエネルギーを獲得するが、その際に酸素ラジカルを生じる。その為に、上記のように酸素ラジカルによる損傷を抑制する機構を細胞は発達させて来た。また、嫌気性細菌もSODを持つことが知られていることから、生命の誕生の非常に初期にすでに酸素ラジカル防御能を獲得していた事が考えられる。この様に、生物と酸素ラジカルは切り離せない関係にある。

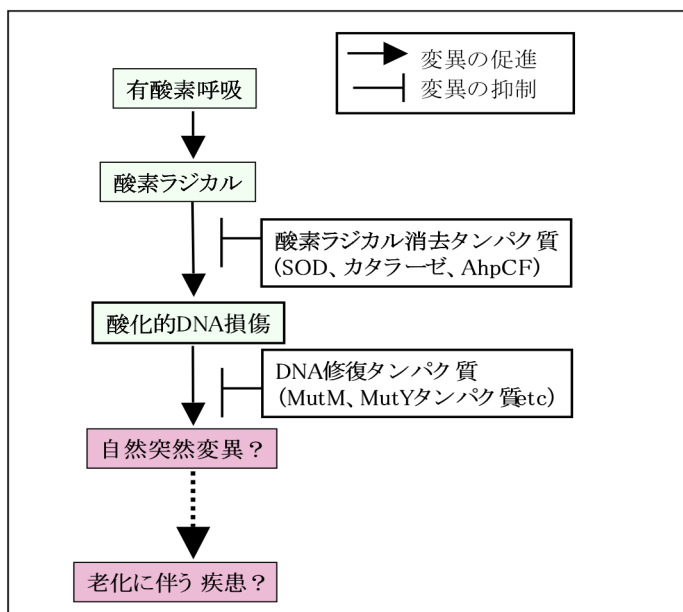


図1 酸素ラジカルによる自然突然変異の誘発を抑制する仕組み

2. 細胞内における酸素ラジカル種の産生

では、生物とは切り離せない関係にある酸素ラジカル種はどのようにして細胞内において産生されるのであろうか？これまでにスーパーオキシドや過酸化水素を積極的に産生するような酵素は見つかっていないが、電子を他の基質に転移する酸化還元酵素によりスーパーオキシドや過酸化水素が生じる事が知られている。この酸化還元酵素はエネルギー産生の為の呼吸鎖に存在する。フラビン酵素などが電子を保持している場合、周辺の酸素が衝突すると電子は FADH_2 から酸素へ移動する事が出来る。つまり、酸素ラジカル種を生じる割合は酸化還元酵素と酸素との衝突頻度に依存している事が推測される[1]。これまでに大腸菌野生株を高圧酸素条件下において生育させた場合、スーパーオキシドを消去する SOD が欠損した株と同じ表現系を示す事が報告されている[2]。これらの結果からも、酸素濃度が高い条件下においては酸素ラジカルが多く産生され、逆に酸素濃度が低い条件下では酸素ラジカルの産生が低くなると予想される。

このようにして生じる酸素ラジカルは、反応性が非常に高い為に生体内の構成成分を損傷する。また、酸素ラジカルの反応性が高いために、その形態も様々に変化する事が知られている(図 2)。上記で記載したように、酸素ラジカルは呼吸により酸素から生じるが、まずスーパーオキシドもしくは過酸化水素が産生される。過酸化水素自体の酸化力はそれほど高くないが、鉄イオンなどの遷移金属とフェントン反応を起こす事によりヒドロキシラジカルが生じる。このヒドロキシラジカルは最も反応性の大きい分子種であるため、細胞内に過剰に鉄イオンが存在すると、過酸化水素と反応してヒドロキシラジカルを生じ、細胞中の DNA を損傷する。そのため、細胞内の鉄濃度は適度に保持される必要があり、鉄イオン濃度の保持には、鉄輸送に関わるオペロンの転写リプレッサーである Fur タンパク質が関与する事が知られている[3]。このように呼吸を行う限り、細胞内では酸素ラジカルが常時存在し、細胞内の構成成分を損傷しうる。

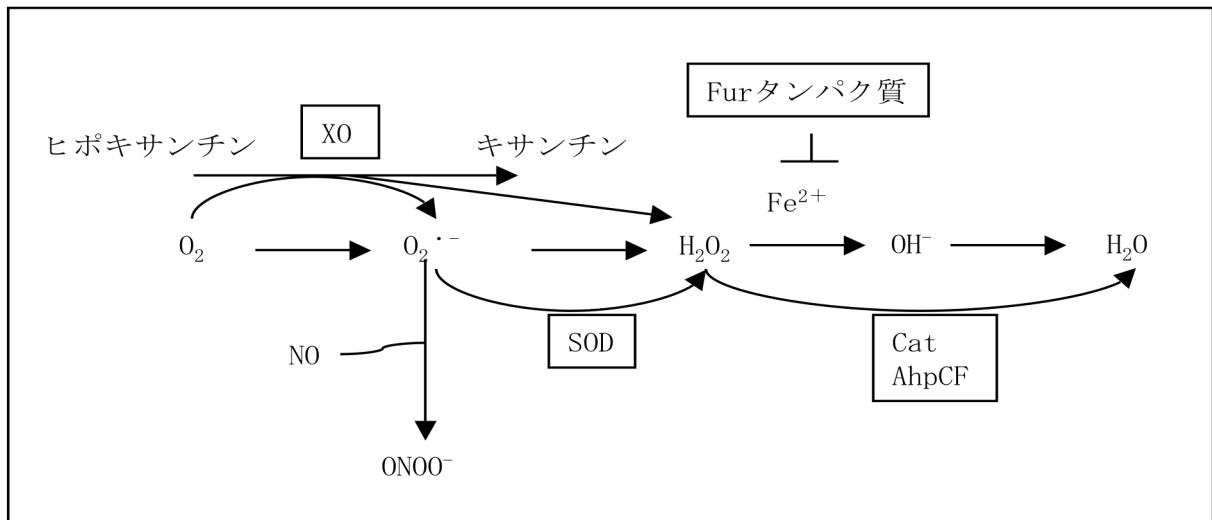


図 2 酸素ラジカルのメタボリックマップ

呼吸により取り込まれた酸素は、電子を保有したフラビン酵素と衝突する事により酸素ラジカルになる。この反応はキサンチンオキシダーゼ(XO)を含む酵素が関与しておこる。この反応により活性酸素として $O_2^{\cdot -}$ (スーパーオキシド)もしくは H_2O_2 (過酸化水素)となる。スーパーオキシドは一酸化窒素(NO)と反応して、高い反応性を持つペルオキシナイトライト($ONOO^-$)が生成される。通常は生じたスーパーオキシドはSODにより不均化して過酸化水素に返還する。生じた過酸化水素はカタラーゼ(Cat)やアルキルヒドロキシペルオキシダーゼ(AhpCF)により水に還元されるが、鉄イオンなどの遷移金属が存在するとフェントン反応によりヒドロキシラジカル(OH^{\cdot})が生じる。細胞内の鉄イオン濃度は通常はFurタンパク質(鉄輸送に関わるオペロンの転写リプレッサー)により必要量に抑えられている。

表 1 大腸菌が持つ主な活性酸素消去系

Cat(カタラーゼ)	HP I (katG) HP II (katE)	主にHP I が働く。過剰量の過酸化水素を消去。 $K_m \geq 5.9mM$
AhpCF(アルキル ヒドロキシ ペルオキシダーゼ)	ahpC, ahpF	生理的濃度の過酸化水素を消去する。 $K_m = 5 \mu M (20 \mu M \text{でsaturate})$
SOD(スーパーオキシド ディスムターゼ)	MnSOD(sodA) FeSOD(sodB) Cu/ZnSOD(sodC)	スーパーオキシドを過酸化水素に変換する。 それぞれのSODタンパク質は状況により制御を受ける。

大腸菌において主に働く活性酸素消去系について示した。活性酸素を消去する機構として、高濃度の過酸化水素にはカタラーゼ、生理的濃度の過酸化水素にはアルキルヒドロキシペルオキシダーゼ、スーパーオキシドに対してはSODが働く。これら三つはさらに複数のタンパク質に分かれ、状況に見合った働きをすることが知られている。

3. 酸素ラジカル消去系と酸化 DNA 損傷を修復する機構

酸素ラジカルは、外部の変異原に曝されない生理的条件下において、生体内でも最たる脅威となる。しかし、細胞はその脅威から防御する機構を持つ。この防御には、前述したように酸素ラジカル種自体を消去する機構と、その機構を逃れて発生した酸化 DNA 損傷を修復する機構がある。

大腸菌において、酸素ラジカル種自体を消去する機構は、2つの異なるカタラーゼと、アルキルヒドロペルオキシダーゼ (AhpCF: *ahpC* と *F* がコード)、3つの SOD が知られている (表 1)。カタラーゼはヒドロキシペルオキシダーゼ I (*katG* がコード)、ヒドロキシペルオキシダーゼ II (*katE* がコード) が知られている [21, 37]。さらに SOD についても MnSOD (*sodA* がコード)、FeSOD (*sodB* がコード)、Cu/ZnSOD (*sodC* がコード) が知られている [38-39]。また AhpCF は近年、生理的濃度の過酸化水素を消去する事が報告され、高い過酸化水素濃度で働くカタラーゼとともに細胞を守る役割を果たしている [34-36]。これらの消去系の発現は状況や場所により異なり、生物は酸素ラジカルに対して状況に応じた様々な防御系を持っており、細胞内の酸素ラジカル濃度は 20nM 以下まで抑制されている。

このように酸素ラジカル濃度は非常に低い濃度に抑えられている事から、酸素ラジカルが DNA に損傷を与える頻度は低いのでは無いかと考える事が出来る。しかし実際には、それらの抗酸化酵素を逃れた酸素ラジカルは DNA に酸化修飾を与えてしまう。現在までに、酸化 DNA 損傷を修復するタンパク質が複数発見されて来ている。これらのタンパク質をコードする遺伝子を欠損させると、大気中の酸素濃度下においても、酸化 DNA 損傷を修復出来ずに野生株と比較して変異頻度の上昇が見られる事が報告されている。このように突然変異を引き起こす事が可能な酸化損傷としては塩基修飾、一本鎖切断、二本鎖切断、DNA 鎖間 (内) クロスリンク、DNA-タンパク質クロスリンクなどが知られている (図 3) [46]。

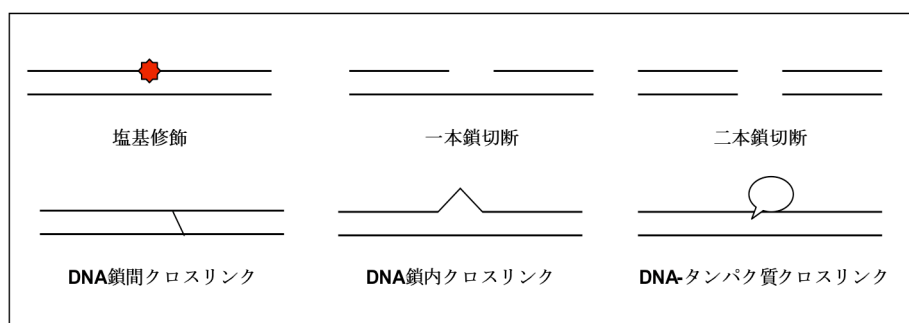


図 3 DNA 上に生じる様々な酸化損傷 酸素ラジカルによって生じる DNA 損傷について示した。酸化 DNA 損傷の種類として、DNA に直接酸素ラジカルが攻撃して生じる塩基修飾などの小さな酸化損傷領域、また脂質やタンパク質と酸素ラジカルが反応して出来る二次的な DNA 損傷などの大きな酸化損傷領域がある。

酸化了的 DNA 損傷のうち、塩基修飾として最も良く研究されており、酸化了的 DNA 損傷の指標として用いられているのは、7,8-Dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) である (図 4A)。8-oxoG は syn 形態や anti 形態を取り、それぞれ複製の際にアデニン、シトシンと安定な対合を形成するため、複製を阻害しない [4]。しかし、8-oxoG がアデニンと対合すると G:C→T:A トランスバージョン変異を引き起こす事が、in vivo と in vitro の両方で知られている [5, 6]。大腸菌には 8-oxoG による変異を抑制する塩基除去修復タンパク質として 2 つのグリコシラーゼの存在が知られている。そのグリコシラーゼの内、MutM タンパク質 (*mutM* がコード) はシトシンと対合した 8-oxoG を除去し、MutY タンパク質 (*mutY* がコード) は 8-oxoG と誤対合したアデニンを除去する [8, 9]。*mutM* と *mutY* 遺伝子に変異が誘発されると、8-oxoG に依存した突然変異を抑制出来ない為に G:C→T:A トランスバージョン変異を、野生型の *mutM* や *mutY* を持つ野生型と比較して高頻度に引き起こす [5, 10]。また、その他にも、ヌクレオチドプール中の 8-oxodGTP を浄化する MutT タンパク質が存在し、*mutT* 遺伝子に変異が誘発された株では、A:T→C:G トランスバージョン変異が野生型と比較して高頻度に誘発される事が報告されている [12-14] (図 4B)。この他にも組換え修復を行う RecA タンパク質や、複製エラー修復タンパクである MutS などの様々な酸化了的 DNA 損傷を修復するタンパク質が、生じた酸化損傷領域の大きさや、損傷のタイプによって使い分けられ、細胞を守っている [11, 15-22] (表 2)。

その他に、急激な酸素ラジカルまたは酸素濃度による変化から細胞を守るメカニズムも存在している。急激な過酸化水素に対しては OxyRS シグナルトランスダクションシステム、さらにスーパーオキシドなどにより SoxRS シグナルトランスダクション、酸素濃度の変化に対して ArcAB システム、FNR システムが働く事が報告されて来ている [23-32]。

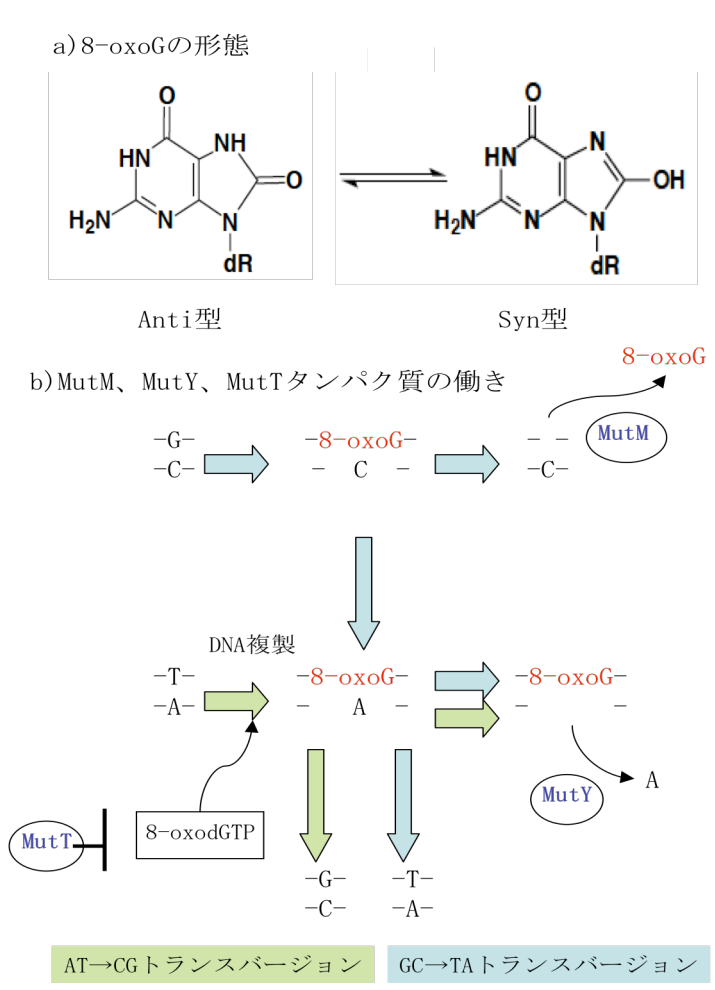


図4 8-oxoG と修復タンパク質の働き

A) 8-oxoG は複製の際にアデニン、シトシンと同じ効率で安定な対合を形成するために G:C→T:A トランスバージョン変異を *in vivo* と *in vitro* で引き起こす。

B) 大腸菌には 8-oxoG による変異を抑制する 2 つのグリコシラーゼの存在が知られている。そのグリコシラーゼの内、MutM タンパク質 (*mutM* がコード) はシトシンと対合した 8-oxoG を除去する。*mutM* 遺伝子に変異が生じると G:C→T:A トランスバージョン変異を引き起こす。また、MutY タンパク質 (*mutY* がコード) は 8-oxoG と誤対合したアデニンを除去する。*mutY* 遺伝子に変異が生じると G:C→T:A トランスバージョン変異を引き起こす。

表2 酸化損傷の大きさと、それぞれの修復経路

酸化損傷領域の大きさ		主な変異抑制経路	
↑	脂質やタンパク質と、酸素ラジカルが反応し、さらにDNAと反応して二次的に生じる。	組換え修復 (RecA)	ヌクレオチド除去修復 (UvrABC) など
	DNAに直接酸素ラジカルが攻撃して生じる。	塩基除去修復 (MutM, MutY, MutT など)	ミスマッチ修復 (MutS など)

4. 本研究の目的：自然突然変異における酸素ラジカルの役割

上記のように酸素ラジカルとその消去系、また酸化 DNA 損傷に対する防御機構が解明されて来た。これらの解明方法としては細胞に酸素ラジカルを発生させるような薬剤や、酸素ラジカルを消去するタンパク質を欠損させた株が用いられて来た。また、酸化 DNA 修復タンパク質を欠損させた株を用い、どのような酸化損傷がどのようなタイプの変異を誘発するのかについて研究が行われて来た [22]。これらの研究によって、様々な酸化ストレスに対する防御機構が多数存在し、酸素ラジカルによって誘発される突然変異を非常に低い割合に抑制している事が明らかとなって来た。

一方、大腸菌細胞中において自然突然変異は 10^{-10} ~ 10^{-9} /塩基対/細胞分裂という低い頻度ながらも確実に誘発されている [40-41]。当研究室における大腸菌を用いた解析により、自然突然変異を誘発する原因は DNA の複製エラーではない事が報告されている [42]。また、近年では老化に伴う疾患と酸素ラジカルの関係がクローズアップされており、酸素ストレスに対する防御機構を逃れた酸素ラジカルが自然突然変異の原因になり細胞機能を損ねているのではないかと予想されている。例えば、ヒトの神経変性疾患の一つであるパーキンソン病患者の脳の黒質から抽出した DNA に 8-oxoG が増加している事が報告されている [7]。これらの報告などから、生理的条件下で生じる酸化 DNA 損傷が蓄積し、変異が誘発されることにより疾患に繋がるのではないかと考えられている。

しかしながら、これまで明確に酸素ラジカルと自然突然変異の関係を明らかにした研究はない。前述したように酸素ラジカルによる突然変異は非常に低い割合まで抑制されており、自然突然変異を誘発する原因になるのかについては疑問が残る。そこで、生理的条件下において自然突然変異に酸素ラジカルが影響しうるのか、またどのようなタイプの変異が酸素ラジカルに依存して誘発されているのかを明らかにする事が、変異の蓄積によると推測される老化や進化を考える上でも非常に重要であると考えた。このような背景から、自然突然変異と酸素ラジカルの関係を明らかにする事を目的として、実験アプローチに最も適した大腸菌を用いた解析を行った。

第二章 材料と方法

1. 材料

1-1 菌株

本研究に用いた菌株は全て大腸菌 K-12 由来であり、それらの遺伝子型などについては表 3 に示した。

表 3 本研究で用いた菌株

菌株	遺伝子型
CC101	<i>ara, gtp-lac5, rpsL, [F lacI378, lacZ461(T→G), proA B] str^r</i> 研究室ストック
CC104	<i>ara, gtp-lac5, rpsL, [F lacI378, lacZ461(C→A), proA B] str^r</i> 研究室ストック
CC101T	<i>mutT::Tn5(kan^r)</i> 以外は CC101 と同様 研究室ストック
CC104MY	<i>mutY11 zgd::tet, mutM::mini-kan</i> 以外は CC104 と同様 研究室ストック
MG1655	LAM- <i>rph-1</i> 研究室ストック
MK811	LAM- <i>rph-1, rpsL (Sm^r) ΔcysJIIH::rpsL</i> 研究室ストック
MK6805	<i>mutY11 zgd::tet, mutM::mini-kan</i> 以外は MK811 と同様 本研究にて作製
MK6806	<i>mutT::kan</i> 以外は MK811 と同様 本研究にて作製

CC101T は MK811 に *mutT::Tn5(kan^r)* の形質を P1 形質導入によって移すために用いた。CC104MY は MK811 に *mutY11 zgd::tet, mutM::mini-kan* の形質を P1 形質導入によって移すために用いた。MG1655 については作成した P1 ファージの感染力の検定用に、CC101 についてはミューテーター効果の検定用に用いた。

1-2 P1 ファージ

P1 ファージは当研究室の P1 ビルレントファージ (1.5×10^9 pfu/ml) を必要に応じて希釈して用いた。

1-3 試薬・培地・機器

一般的な試薬は特に記載のない限り、NaCl、KCl 等の塩類や HCl、NaOH 等の酸、アルカリ、抗生物質は和光純薬工業から購入したものを使用した。培地成分である bacto trypton、bacto yeast extract および bacto agar は Difco 社の製品を使用した。特に記載のない限り、各種培地を作成する際には脱イオン水を用い、その他の各種溶液には MilliQ 水に溶解して調製した。

培地の組成については以下のように調製した。LB 培地[1% (w/v) Bacto tryptone、0.5% Bacto yeast extract、0.5% NaCl]をオートクレーブ滅菌して使用した。また、寒天培地として用いる場合には特に記載のない限り、1.5% (w/v) の濃度で Bacto agar を加えてからオートクレーブ滅菌して使用した。また、Minimal A 培地 [1.05% (w/v) K_2HPO_4 、0.45% (w/v) KH_2PO_4 、0.1% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ 、0.05% (w/v) sodium citrate · 2H₂O, 1mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0005% cysteine, 0.2% (w/v) glucose] もオートクレーブ滅菌して使用するが、下線を示した試薬についてはオートクレーブの後に濾過滅菌をしたものを加えた。さらに、K medium は M9 medium [0.6% Na_2HPO_4 、0.3% KH_2PO_4 、0.05% NaCl、0.1% NH_4Cl] をオートクレーブ滅菌した後、[1% glucose, 1% Casamino Acid, 1 μ g/ml thiamine hydrochloride, 1mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1mM $CaCl_2$] を加える。なお、下線を示した試薬についてはろ過滅菌したものを、下線で示していない試薬についてはあらかじめオートクレーブしたものをオートクレーブした M9 medium に加えた。抗生物質含有の培地が必要な場合は培地をオートクレーブ滅菌後、60°C 以下まで冷却した後添加した。本研究で用いた抗生物質はカナマイシン (Kan)、ストレプトマイシン (Sm)、テトラサイクリン (Tet)、リファンピシリン (Rif) であり、それぞれの最終濃度はストレプトマイシン、リファンピシリン、カナマイシンで 0.5mg/ml もしくは 1.0mg/ml、テトラサイクリンは 50 μ g/ml とした。ストレプトマイシン、カナマイシンは滅菌水に溶解して濃度をそれぞれ 100mg/ml とし、テトラサイクリン、リファンピシリンは 50% のエタノールに溶解して最終濃度をそれぞれ 5mg/ml、10mg/ml とした。これらの溶液は使用直前に調製した。P1 フェージによる形質導入の際に使用した培地は R-top agar [1% trypton、0.8% NaCl、0.1% yeast extract、0.8% agar. : 滅菌後、2ml 1M $CaCl_2$ 、5ml 20% glucose]、及び R-plate [1.2% agar であること以外は R-top agar と同じ] である。

酸素ラジカル過多の条件下を作成するための 30% 過酸化水素はシグマアルドリッチ社のものを購入し、過酸化水素反応を止める為のカタラーゼは WORTHINGTON 社の 0.62mgP/ml を購入した。

脱酸素処理に用いたアネロパック、密閉クリップ、ケンキ、嫌気指示薬は三菱ガス化学株式会社のもを購入し、製造元の指示に従った。ケンキは酸素吸収剤であり、1 時間前後で袋内の酸素濃度を 0.1% にまですることが出来る。また嫌気指示錠については色の変化で酸素濃度を観察することが出来、ピンク色になると酸素濃度が

0.1%程度になったことが分かる。アネロパック嫌気培養法では、培地を使用する3日前にアネロパック内で脱酸素処理を行った。

また、三重シールド嫌気条件下(図 5)での実験を行うための嫌気チャンバーは Bactron 社のものを購入した。嫌気チャンバー内は混合ガス(水素 5%、炭酸ガス 5%、窒素ガス 90%、ガス純度 99.999%)で満たされている。チャンバー内に残存する酸素は自動カタリストと手動カタリストにより限界まで除去した。手動カタリストは再利用が可能で、嫌気チャンバー使用毎に 170℃、二時間乾熱を行った。チャンバー内への物品の出し入れは全て空気置換部屋(エアロック)内で、通常気体を混合ガスへの置換作業を 3~5 回してから行った。培地中の脱酸素処理を行う Oxyrase は Oxyrase 社のものを購入した。固形培地には Oxyrase for Agar を、液体培地には Oxyrase for Broth をそれぞれ用いている。それぞれ-10~-20℃で長期保存可能であり、5 回冷解凍可能である(ラベルの使用期限まで)。なお、解凍時は 4℃で一晩保存する。4℃の保存では 30 日間で限度である。また、Oxyrase により脱酸素処理を行う LB プレートの作成方法としては、通常より 10%水を少なくして調製した培地をオートクレーブ後、45~48℃に冷却した。その後室温まで暖めた Oxyrase for Agar を調製の最終段階の 10%量を冷却した培地に、フラスコの壁に沿わせながら加えた。その後すぐに dish に適量分配し、その際気泡が dish に存在していればピペットで取り除いた。Agar が固まった後、一時間クリーンベンチ内で蓋をはずして乾燥させた。その後すぐにケンキ、嫌気指示薬の入ったアネロパック内にプレートを入れ、密閉クリップで密閉後、嫌気チャンバーのインキュベーター内に保存した。チャンバー内でさらに 3 日間脱酸素処理を行った後、プレートを使用した。また、Oxyrase for broth については使用する 1 日前に、ファルコンチューブに分注した 5ml の培地に対し 100ul の解凍した Oxyrase for broth を加え、ふたを緩めた状態でケンキ、嫌気指示薬を入れたアネロパック内に密封した。その後、嫌気チャンバー内の 37℃インキュベーター内で保存し、実験に用いた。脱酸素処理を行うときはこれらの製品を全てセットとして用いた。

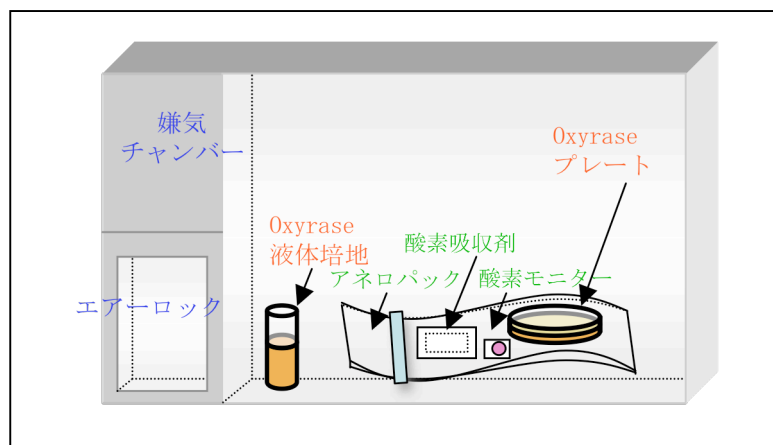


図 5 三重シールド嫌気培養に用いる嫌気チャンバー、アネロパック、oxyrase

2. 実験方法

2-1 終夜培養

大腸菌の培養に関しては、*Molecular cloning*(Sambrook *et al.*, 1989)に従って行った。特に記載のない限り、終夜培養液は菌株のグリセロールストックを LB プレートで画線培養して得られたシングルコロニーを 5ml の LB 培養液に植菌して 37°C で 14 時間回転培養して作成した。

2-2 P1 フェージを用いた形質導入

A short course in bacterial genetics (Miller, 1992)の記載に従って、P1 フェージを用い野生株大腸菌への *mutT* および *mutMY* 欠損形質導入をそれぞれ行った。

a) P1 溶原菌の調製

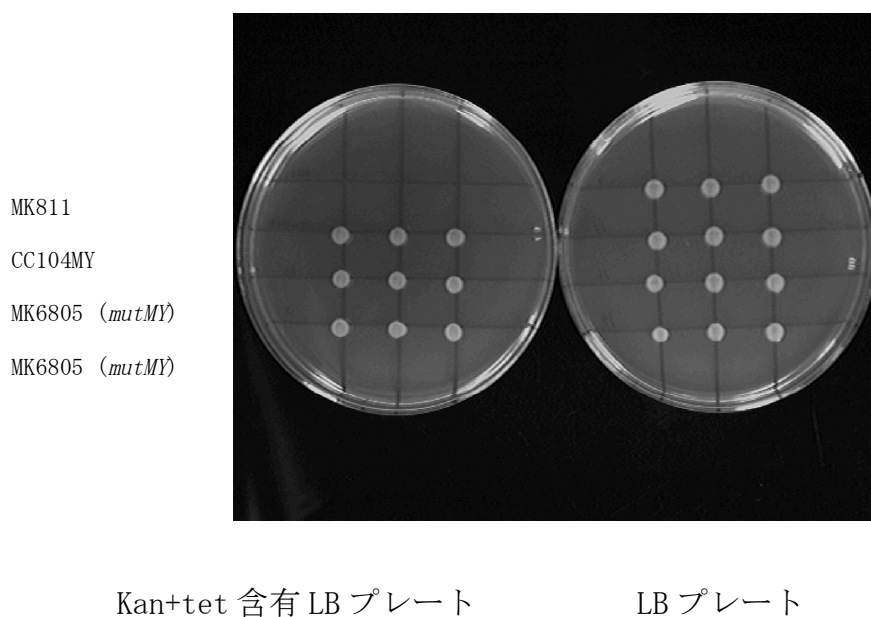
$\Delta mutT$ および $\Delta mutMY$ 供与菌 (CC101T および CC104MY) のグリセロールストックを LB プレートで画線培養したものからシングルコロニーを得て、5ml の LB 培地で終夜培養液を作成した。この CC101T および CC104MY の終夜培養液を 1/50 希釈したものを、 5×10^{-3} CaCl₂ 含有 LB 培地 5ml に加え、生菌数が $1 \sim 2 \times 10^8$ cells/ml になるまで 37°C の water bath で振とう培養を行った。この生菌数については、培養液の濁度から推測した。この培養液 1ml に、大腸菌数の 1/10 の pfu である 1×10^7 pfu/ml の P1 フェージを加え、37°C の water bath で 20 分間振とう培養して P1 フェージを MK1017 に感染させた。この感染液に 60°C の R-top agar を 2.5ml 加え、すぐに R-plate 上に流し込んだ。R-top agar が凝固した後、37°C で終夜培養した。終夜培養後、R-top agar と、残った R-top agar を回収するために R-plate をリンスした 1ml の LB 培養液の両方をポリプロピレン製の遠心管に回収した。これにクロロフォルムを p200 のピペットマンで約 5 滴加え、vortex で強く攪拌した。この混和物を 10000rpm、15 分、4°C の条件で遠心分離して得た上清を、別のクロロフォルムで殺菌したポリプロピレン製の遠心管に回収し、さらにクロロフォルムを 1~2 滴加えた。これを P1 溶菌液とした。*mutT* については一度のこれら一連の操作で $\Delta mutT$ を導入できるが $\Delta mutMY$ については一度では出来ないためまず、 $\Delta mutY$ の形質導入確認後、これら一連の操作をもう一度行い、さらに $\Delta mutM$ の形質導入を行った。

b) P1 溶菌液による形質導入

得られた $\Delta mutT$ 、 $\Delta mutMY$ の P1 溶菌液をそれぞれ受容菌株 (MK811) に感染させて形質導入を行った。MK811 の終夜培養液を作成し、遠心 (5000rpm、5 分、4°C) で菌体を沈殿させ、その上清を除き、MC 緩衝液 (0.1M MgSO₄、5mM CaCl₂) を等量加えて再懸濁した。この懸濁液 0.1ml に、P1 溶菌液を 3 倍、30 倍希釈してそれぞれ 0.1ml 添加

し、37°Cの water bath で 20 分間静置後、0.2ml のクエン酸緩衝液 (pH5.5) を加えた。さらにこの混合液を 37°C の water bath で 1.5 時間振とう培養した。 $\Delta mutM$ はカナマイシン、 $\Delta mutY$ はテトラサイクリン、 $\Delta mutT$ はカナマイシン耐性遺伝子をマーカーとして持つために (図 6 では $\Delta mutMY$ のみ示した)、培養液のうちの 0.1ml を $\Delta mutT$ についてはカナマイシン含有 LB 寒天培地に塗布し、 $\Delta mutMY$ についてはカナマイシン、テトラサイクリン含有 LB 寒天培地に塗布し、37°C で終夜培養を行った。このようにして得られたシングルコロニーをさらにそれぞれの薬剤含有 LB 寒天培地に画線培養し、さらにこのシングルコロニーを LB プレートに画線培養した。こうして得られたシングルコロニーを LB 培地において 37°C で終夜培養し、得られた培養液 0.9ml と 30% グリセロール液を等比で混合させ -80°C で保存し、これをグリセロールストックとした。このようにして得られた株は $\Delta mutT$ を MK6806、 $\Delta mutMY$ を MK6805 と命名し、今後はこれらの株を *mutT* 株、*mutMY* 株と呼ぶ。

図 6 耐性マーカーによる薬剤抵抗性の確認



mutMY 二重変異株を作成するために菌株 CC104MY から *mutM* および *mutY* の形質を、P1 ファージを用いて野生株 (MK811) に導入した。CC104MY 上の *mutM*、*mutY* はそれぞれカナマイシン、テトラサイクリン耐性遺伝子をマーカーとして持つために、この形質を第一の指標とした。左のプレートが薬剤含有 LB 寒天培地、右のプレートが LB 寒天培地である。

2-3 ミューテーター活性の半定量的測定（パッチテスト）

作成した株のうち、リファンピシンを含む寒天培地で菌を培養し、野生株と比較して自然突然変異頻度が最も上昇した株を選択した。調べる菌体を LB 培地に植菌し、37°Cで終夜振とう培養した。その培養液 5 μ l を LB 寒天培地とカナマイシン含有 LB 寒天培地にそれぞれスポットし、37°Cで一晩静置して培養した。スポット中で増殖したカナマイシン耐性菌のコロニーの観察により相対的な突然変異頻度を半定量的に観察した。

2-4 染色体上部分二倍体 *rpsL* 検出系を用いた突然変異頻度の測定

本研究室では自然突然変異の発生と抑制の分子機構を明らかにするために、遺伝学的、生化学的解析が行われている。その解析手段として *rpsL* 遺伝子を用いて研究を行っており、*rpsL* 変異検出系は前進突然変異を検出できる(図7)。

rpsL 遺伝子は抗生物質であるストレプトマイシンの結合が可能である大腸菌のリボソームサブユニットの S12 をコードする。野生型の *rpsL* 遺伝子を持つ細胞はストレプトマイシン存在下では転写が阻害される為に、ストレプトマイシンに対して感受性を示す(Sm^s)。しかし、*rpsL* 遺伝子の開始コドンから 127 番目のアデニンをシトシンに置換すると(*rpsL127*)、リボソームタンパク質の機能は保持したまま、ストレプトマイシンに対して抵抗性となる。この変異型の形質は野生型に対して劣性である。染色体上部分二倍体 *rpsL* 自然突然変異検出系では Sm^r の染色体上に野生型 *rpsL* 標的遺伝子を挿入して部分二倍体とした細胞を用い、この細胞は挿入した野生型の性質が優性を示すために Sm^s である。ここで、標的遺伝子である挿入 *rpsL* 遺伝子に変異が生じるとその変異細胞は Sm^r を示す。

さらに、染色体上に二倍体の *rpsL* 遺伝子を有することによって、それぞれの *rpsL* 遺伝子同士で allele 間組換えを行うことも知られている [9]。allele 間組換えは、野生型 *rpsL* が変異型 *rpsL127* 遺伝子とアリル間組み換え修復を行う事により、野生型 *rpsL* 遺伝子の 127 番目の塩基が C→A に変換される事から検出可能である。このように、二倍体 *rpsL* 遺伝子を用いた解析は、野生型 *rpsL* 標的遺伝子に変異が生じても生育可能である為にストレプトマイシン含有 LB 寒天培地で選択が可能であり、変異を偏り無く検出できる非常に優れた実験系である。

実験方法としては突然変異頻度を測定したい各株をグリセロールストックから LB 寒天培地に画線培養してシングルコロニーを得て、さらにそのシングルコロニーから終夜培養を作製した。この終夜培養液を LB (もしくは Minimal A(MM)培地) で 10⁶ に希釈し、脱酸素処理を行った LB 寒天培地 (もしくは MM 寒天培地) と、脱酸素処理を行わなかった LB 寒天培地 (もしくは MM 寒天培地) に塗布した。この寒天培地を 37°Cで一晩静置して培養した。その後、生育したコロニーをそれぞれ LB (もしくは MM 培

地) 5ml で懸濁し、得られた懸濁液の濁度を測定した。その濁度からそれぞれの菌数を換算し、100 個程度になるように希釈した菌液を LB 寒天培地、適度の量の原液をストレプトマイシン含有 LB 寒天培地(もしくはストレプトマイシン含有 MM 寒天培地)に塗布した (図 7)。

脱酸素処理を行わない寒天培地を用いた実験はコントロールとして行っている。また 37°C で全ての細胞が同等程度の大きさのコロニーになるまで静置培養後、出現したコロニーから全体の形質転換体の菌数を測定した。ストレプトマイシン耐性となった変異型 *rpsL* 遺伝子を持つ細胞数を全体の菌体数で割り、変異頻度を測定した。

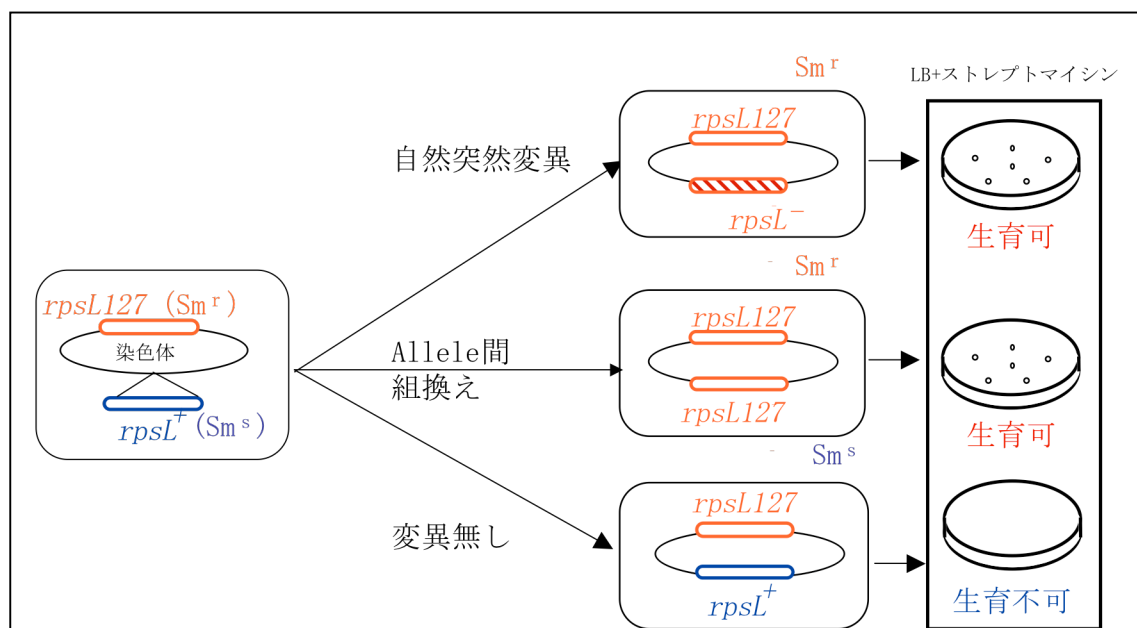


図 7 *rpsL* 前進突然変異検出系

2-5 変異スペクトラム解析

a) PCR 法

a-1) 鋳型 DNA の調製(boil 法)

前項で述べたアンピシリン・ストレプトマイシン含有 LB プレート上に出現したコロニーを各実験区から滅菌したつまようじを用いて無作為に複数個選出し、PCR チューブに分注した 20 μ l の TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mMEDTA) に懸濁した。懸濁液を 99°C、3 分間加熱後、遠心 (500rpm、10 分間、室温) し、その上清を PCR の鋳型 DNA とした。

a-2) プライマー

プライマーの合成に関しては、日本製粉株式会社に製造委託した。使用したプライマー配列を以下に示す。

dFOR21 (5' -CAGCCAGATGGCCTGGTG-3' 18mer)

dFOR4 (5'-TGACTGGTCAAATTTTCGAACG-3' 21mer)

これらのプライマーで *rpsL* 標的遺伝子のプロモーター領域から停止コドンまでを増幅することが出来る。

a-3) 反応液の調製及び PCR 反応

PCR 反応に用いた 10×PCR buffer、dNTP mix、*Taq* DNA ポリメラーゼは TAKARA 社の製品を用いた。また、PCR 反応には Gene Amp PCR System9600 (PERKIN ELMER 社) あるいは同 9700 を使用した。PCR 反応の耐熱性 DNA ポリメラーゼには *Taq* DNA ポリメラーゼ (TAKARA 社) を用いた。PCR 反応液に適切な 2 種類のプライマーと (最終濃度各 1pmol/ μ l) 前述した鋳型 DNA を 1 μ l 加えた状態で最終濃度は 10mM Tris/HCl (pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、各 200 μ M dNTP、 1.5×10^{-3} U/ μ l *Taq* DNA polymerase とし、反応を行った。全反応液量は 10 μ l とした。反応条件は用いたプライマーにより異なる。

b) アガロース電気泳動

基本的な操作は全て *Molecular Cloning* (Sambrook *et al.*, 1989) に従った。

アガロースは Agarose L03 (TAKARA) を用い、ゲル濃度は DNA の分子量に応じて 1.0~2.0% (w/v) で使用した。緩衝液は TAE 緩衝液 (40mM Tris-acetate, 2mM EDTA (pH8.0)) を用いた。泳動はすべて ミューピッド泳動槽 (コスモ・バイオ社) を用い、電圧 100 V で 20~40 分通電した。泳動後、0.5 μ g/ml のエチジウム ブロマイド水溶液に 20~30 分間浸して DNA を染色し、UV トランスイルミネーター (アート社製) を用いてゲルに紫外線を照射して、DNA を観察した。泳動像は CCD カメラで撮影した。

c) プライマーの除去

DNA 配列を決定するために PCR 産物からプライマーを除去する必要があるために、PCR Products Pre-Sequence Kit を用い、製造元の指示に従って PCR 産物の精製を行った。Exonuclease 1 および Shrimp Alkaline Phosphatase については Kit 付属のものを用いた。反応液の最終濃度に関しては Exonuclease 1 については 0.0001875unit/ μ l、Shrimp Alkaline Phosphatase については 0.000375unit/ μ l とした。37°C で 30 分間、酵素反応を行った後、81°C で 30 分間の熱処理を行い、酵素活性を失活させた。

d) DNA 塩基配列の決定

rpsL 標的遺伝子にどのような変異が有るのかを具体的に配列レベルで調べるために DNA 塩基配列を DYEnamic ET Terminator for MegaBACE (amersham pharmacia 社) を用いて決定した。鋳型 DNA は PCR 法によって増幅された PCR 産物をさらにサイ

クルシークエンス産物をゲル濾過カラムで精製したものを使用した。電気泳動、蛍光ラベルの検出、解析は amersham pharmacia 社の DNA シーケンサーである Mega BACE 1000 を用いた。

e) シスター変異排除による変異頻度偏りの補正

rpsL 突然変異解析を行うと、全体の実験区のうち 1-2 実験区のみ一つの塩基もしくは一つの領域に偏って変異が誘発される場合があり、我々はこれらをシスター変異と呼んでいる。シスター変異が誘発するメカニズムとして、数百細胞から 10^8 細胞まで分裂する際に分裂の初期段階で変異が誘発されると、最終的に全体の細胞に対しその変異細胞が占める割合が多くなる。その結果、初期に誘発された変異頻度が高くなる。変異頻度に差があるか如何は、行った実験の実験区数と検体数に依存するが、おおよそ 2.5 から 3 倍程度の頻度の開きがある場合に差があると考えている。しかし、シスター変異が含まれていると正確な頻度の開きが測定できないために、シスター変異を排除する必要がある。そこで行った実験すべてにおいてシスター変異を排除して変異頻度の補正を行った。

排除方法について有酸素培養を行った野生株 6 バッチ目の結果から詳しく記載する(次ページ図)。6 バッチ目では塩基置換変異 (TA→AT) および run 領域での addition 変異からシスター変異が検出された。その他の変異ではシスター変異は検出されていない。シスターが検出された変異は、下記に記載する様な計算方法により頻度の補正を行うが、その他の変異は全く補正を行わない。そのため、下記に示すように TA→AT 変異ではシスター排除計算は、コロニーカウントで得た全体の変異頻度からシスターを除いた値から再度計算を行うが、組換え型などは全体の変異頻度は 0.82×10^{-6} の計算式で行っている。

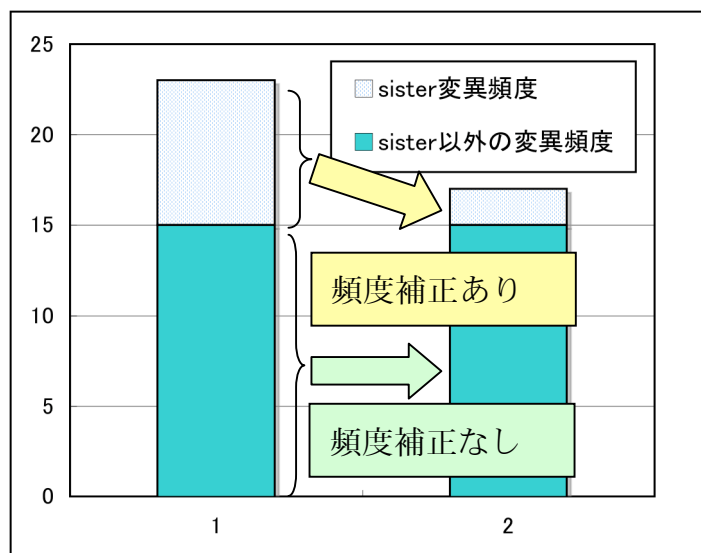
6 バッチ目の実験区では TA→AT 変異として 25 変異が検出された。このうち 21 検体で特異的な三カ所に偏っている変異がみられた。そして、これらの部位の突然変異は他のバッチでは検出されない。そのため、この変異はシスター変異と同定した。この結果を排除する為に全検体数 96 検体から、シスター変異として検出された 21 検体を引き ($96-21=75$)、さらに 6 バッチ目の変異頻度である 0.45×10^{-6} からシスター変異 21 検体を引いて頻度を算出した ($0.45 \times 10^{-6} \times 75/96=0.35 \times 10^{-6}$)。ここで得られる 0.35×10^{-6} を全体の変異頻度と考え、TA→AT 変異頻度を再度算出した ($0.35 \times 10^{-6} \times 4/75=0.019 \times 10^{-6}$)。また、同じく 6 バッチ目で検出された run 部位での一塩基挿入フレームシフト変異も 127 と 128 の間に二検体が検出されている。この部位の変異はシスターである可能性が高いと考え、全検体数 96 から一検体を引き ($96-1=95$)、6 バッチ目の変異頻度である 0.45×10^{-6} からシスター変異 1 検体を引いた頻度を算出した ($0.45 \times 10^{-6} \times 95/96=0.45 \times 10^{-6}$)。さらにシスターを除いた後の run の addition の検

体数である2検体の頻度を求めた ($0.45 \times 10^{-6} \times 2/95 = 0.0094 \times 10^{-6}$)。

以上の計算方法によりシスター変異による頻度の高い見積もりを排除した。シスター変異頻度を引いて得た値(TA→ATは 0.019×10^{-6} 、runの additionは 0.0094×10^{-6})と、補正を全く加えなかった変異頻度(その他の変異頻度は 0.32×10^{-6})を合計して、全体の変異頻度(0.35×10^{-6})として算出した。

例：6 バッチ目の変異頻度補正

	計算式	変異頻度
AT→TA 変異	$0.45 \times 10^{-6} \times (75/96) \times (4/75)$	0.019×10^{-6}
Run 部位での一塩基挿入変異	$0.45 \times 10^{-6} \times (95/96) \times (2/95)$	0.0094×10^{-6}
その他の変異	$0.45 \times 10^{-6} \times (\text{検出数}/96)$	



2-6 過酸化水素処理

IMLAY等の方法[20]にいくつかの改変を加えて実験を行った。L brothで終夜培養した菌液を適度に希釈し、 10^5 程度の細胞をK mediumに接種して37°Cで振とう培養した。 1×10^7 to 4×10^7 CFU/ml K medium ($OD_{600} = 0.04$)まで培養させた後、培養液5mlに蒸留水で希釈した過酸化水素(1mM)を加え(無処理は何も加えない)、さらにそれぞれを30分間37°C振とう培養により処理した。過酸化水素の反応は $2 \mu\text{g}$ 相当に希釈したカタラーゼを処理、無処理ともに加えて終了させた。これらの細胞を遠心し(Beckman JA20.1 5573rpm×15min(4000g))、ペレットを、カタラーゼを含むL brothで再懸濁した。このwashは二回行った。Washした細胞を37°Cで 10^8 程度まで振とう培養し、LB plateとストレプトマイシンを含むLB培地にプレーティングして、LB培地の細胞は12時間後、ストレプトマイシンを含むLB培地は24時間後にカウントし、変異頻度を測定した。

第三章 結果

1. 完全嫌気培養法の確立

自然突然変異の発生における酸素ラジカルの影響を解析するためのアプローチとして、完全に酸素が存在しない嫌気培養条件下での培養時に検出される突然変異を解析し、大気中での通気培養（酸素濃度 20%）で生じる突然変異と比較することを考えた。これまでに酸素の存在が酸素ラジカルの発生に不可欠であり、酸素濃度が低いほど生じる酸素ラジカルが少ない事が報告されている[1]。そのため、大気中での通気培養条件下(有酸素培養条件下)で誘発される変異と、酸素が存在しない嫌気培養条件下で誘発する変異を比較すれば、どのような変異が、どの程度の頻度で酸素により誘発されているのかが明らかになると予想した（図 8）。このアプローチは生理的条件下で誘発される酸素あるいは酸素ラジカルに依存する突然変異の解明に最も有効であると考えられたが、完全に酸素を除去した嫌気培養条件下での突然変異の解析はこれまでに行われていない。そこで、本研究において完全に嫌気培養を行う事の出来る実験系の確立を試みた。

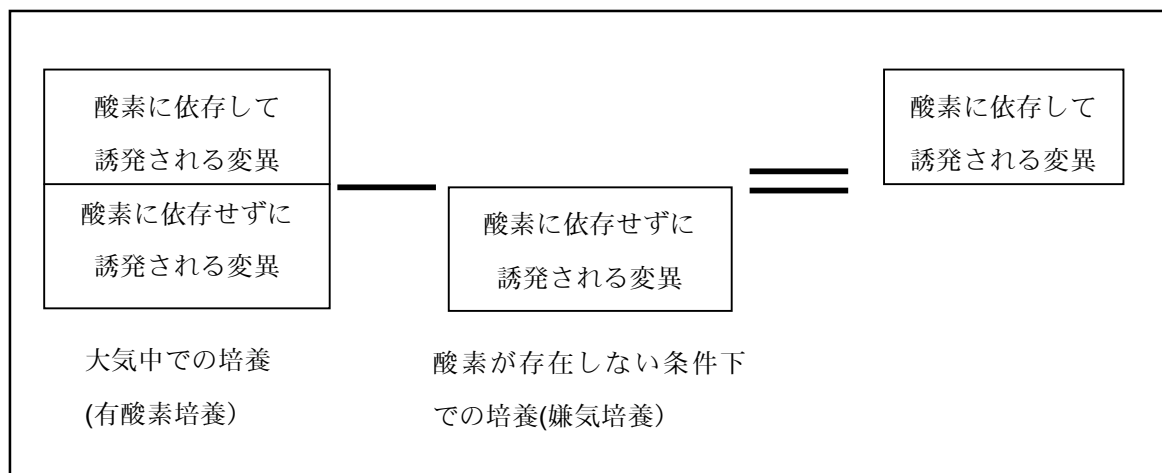


図 8 酸素に依存した自然突然変異解析のアプローチ

1-1 アネロパックを用いた嫌気培養法の検討

嫌気培養法として最初に、容易に嫌気培養条件を作成する事が出来るアネロパックを用い、細胞を酸素から遮断した環境を作製して実験を行った。アネロパックはガス不透性フィルムパック内に酸素吸収剤、さらにパック内の酸素濃度を色により定性的に判定出来る酸素モニター指示錠を含んでいる（材料と方法参照）。アネロパックを用いた嫌気培養法はアネロパック嫌気培養と名付けた。

a) 酸素濃度の違いによる生育速度の違い

まず、有酸素培養およびアネロパック嫌気培養における酸素濃度の違いが、生育速度に影響を与えるのかを調べる事を目的として、それぞれの条件下における培養により細胞が一定数まで増殖する時間を測定した。

その結果、培養開始時の菌数（100 細胞程度）から 10^8 cells/ml 程度になるまでの培養時間は有酸素培養条件下の場合 10 時間であるのに対し、アネロパック嫌気培養条件下では 48 時間を要した。この結果から、酸素濃度が低い状態では生育速度に著しく大きな遅延が起こる事が明らかとなった。

酸素濃度の違いにより生育速度が異なる理由として以下の二つの可能性が示唆された。一つ目の可能性としては、ATP 産生量の違いである。大腸菌は好気性、嫌気性の両方の性質を持ち合わせた通性嫌気性細菌であり、酸素が存在するときは好氣的段階の呼吸を行い、ATP を多く生産することが出来る。一方嫌氣的段階の呼吸の場合は生産する ATP が好氣的段階の呼吸と比較して少ない。ATP は細胞が生育するときに必要なエネルギー源であり、多く生産できるほど細胞分裂が活発に行える。二つ目の可能性は培地中の pH 値の違いである。嫌氣的条件下では細胞は解糖系によりエネルギーを獲得するが、その際に乳酸が発生する。発生した乳酸は培地中の pH 値を下げる事が予想された。そのためアネロパック嫌気培養条件下で生育した細胞は、有酸素培養条件下で生育した細胞より生育速度が遅かったと考えられた。

b) $\Delta mutMY$ 株および $\Delta mutT$ 株のミューテーター効果を指標としたアネロパック嫌気培養の評価

次に、アネロパック嫌気培養条件下で生育した細胞において誘発される変異が、酸素に依存していない事を確認する必要がある。そこで、どの程度完全に近い嫌気培養であるかを確認する実験を行った。細胞内の酸素ラジカル濃度を測定する上で、最も簡便な方法は機器による測定である。しかしながら、現在の技術では生体内で発生する微量の酸素ラジカルを正確に測定出来るまでには至っていない。そこで我々は、酸素ラジカルによる DNA 損傷が修復できない $\Delta mutMY$ 株および $\Delta mutT$ 株のミューテーター活性を指標とすることで嫌気培養の評価を行った。

$\Delta mutMY$ 株は酸素ラジカルにより生じる DNA 中の 8-oxoG が修復出来ずに、結果として GC→TA のトランスバージョン型塩基置換変異を誘発すると考えられている。また $\Delta mutT$ 株はヌクレオチドプール中の 8-oxodGTP を加水分解することができない事から結果として AT→CG トランスバージョン変異を非常に高頻度に誘発する事が知られている [5, 10, 12-14]。実際に有酸素培養の野生株と $\Delta mutMY$ 株、 $\Delta mutT$ 株における *rpsL* 前進変異頻度を測定した結果、両方の変異株は野生株と比較して変異頻度が高く、それぞれ 14 倍、88 倍であった (表 4A)。この変異頻度の上昇は、これまで知られてい

る $\Delta mutMY$ 株、 $\Delta mutT$ 株のプラスミド上での *rpsL* 変異検出系での変異頻度の上昇率とほぼ一致していた[8]。

次に、アネロパック嫌気培養法により野生株、 $\Delta mutMY$ 株および $\Delta mutT$ 株を培養し、*rpsL* 変異頻度測定を行った。アネロパック嫌気培養法により嫌気培養条件の作成に成功しているならば、酸素が存在しない事から酸素ラジカルの発生が抑えられ、酸化的DNA 損傷も発生していないはずである。この場合、酸化的DNA 損傷に依存した $\Delta mutMY$ 株、 $\Delta mutT$ 株のミューター効果は抑制され、 $\Delta mutMY$ 株、 $\Delta mutT$ 株の*rpsL* 変異頻度は野生株と同程度になる事を期待した。実際にアネロパック嫌気培養条件下において、野生株、 $\Delta mutMY$ 株、 $\Delta mutT$ 株の*rpsL* 突然変異頻度を測定した結果、 $\Delta mutMY$ 株と $\Delta mutT$ 株の変異頻度は共に、野生株と比較して360倍、9.3倍と予想と反して大きく上昇していた(表4A)。この結果から、大腸菌をアネロパック嫌気培養条件下で培養すると、酸素ラジカルが予想とは逆に大幅に増加している可能性が示唆された。しかし、これらの突然変異頻度の上昇が酸素ラジカルによって発生した8-oxoGに依存していたのかについては分からない。そこで、野生株の他に、変異頻度上昇が顕著に見られた $\Delta mutMY$ 株において誘発された*rpsL* 変異のシーケンス解析を行い、8-oxoGに依存して誘発される変異(GC→TA トランスバージョン型塩基置換変異)がさらに強まっているのかについて調べた(表4B)。その結果、有酸素培養条件下では $\Delta mutMY$ 株において誘発されるGC→TA 変異頻度は、同じく有酸素培養を行った野生株と比較して990倍高かったが、アネロパック嫌気培養条件下ではこの頻度の上昇率はさらに高く、45000倍であった。また、GC→TA 変異はアネロパック嫌気培養を行った $\Delta mutMY$ 株において誘発される*rpsL* 変異頻度の全体の91%を占めていた。この結果から、アネロパック嫌気培養条件で見られた $\Delta mutMY$ 株の*rpsL* 突然変異頻度の上昇は、8-oxoGが大量に発生した事に起因する事が示唆された。これらの結果から、アネロパック嫌気培養条件下では、有酸素培養条件下で生育した細胞と比較してさらに多くの酸素ラジカルが発生している可能性が示唆された。

以上の $\Delta mutMY$ 株による解析から、有酸素培養条件下と比較してアネロパック嫌気培養条件下では、酸素ラジカルがさらに増加している可能性が考えられた。一方で、有酸素培養条件下において、野生株と比較して、 $\Delta mutT$ 株で誘発される*rpsL* 変異頻度上昇(88倍)ほどには、アネロパック嫌気培養条件下では頻度の上昇(9.3倍)は大きくない事も明らかとなった(表4A)。さらに、野生株では有酸素培養、アネロパック嫌気培養条件下において生育した際には突然変異頻度に差は見られなかったが、 $\Delta mutT$ 株は有酸素培養時と比較してアネロパック嫌気培養条件下では突然変異の頻度の低下が見られた。 $\Delta mutT$ 株を用いた実験で見られた変異頻度の低下は、アネロパック嫌気培養がある程度効果があった事を示唆していると考えられた。

では、なぜアネロパック嫌気培養条件下において、有酸素培養条件下と比較してより多くの酸素ラジカルが発生したのであろうか。可能性として二つの推測が出来ると考えた。一つ目の可能性は、アネロパック中で大腸菌を培養中に培地中に含まれる低濃度の酸素が、大気中の酸素濃度において培養を行う時よりも、何らかの原因によって細胞にとって酸化 DNA 損傷を発生しやすい。二つ目の可能性として、アネロパック中において大腸菌を培養している場合には酸素ラジカルの発生は抑えられているが、変異アッセイを行う際に細胞をアネロパックから大気中に取り出して実験を行うために、急激に酸素濃度が変化し、細胞がその変化に対応出来ずに多くの酸化 DNA 損傷を発生するというものである。

後述するように（三重シールド嫌気培養条件下での実験結果）、酸素濃度が低い培養条件下では、発生する酸化 DNA 損傷は低く抑えられる事が明らかとなった。そのため、アネロパック嫌気培養を用いた場合に過剰に酸素ラジカルが発生する原因として、二番目の可能性が妥当であり、実験の途中段階にアネロパックを用いた嫌気培養条件下から大気中の酸素に曝される条件下に移行する事によって、酸素ラジカルの爆発的増加（バースト）が起こる事が考えられた（図 9）。細胞内での酸素ラジカルに対する防御機構は、嫌気培養条件下では低下する。しかし、嫌気培養条件から大気中に移行させると細胞は有酸素呼吸、もしくは酸素と培地中に含まれる酸素ラジカル発生因子が反応を始め、細胞内の酸素ラジカル濃度が上昇する。上昇した酸素ラジカルに対する防御機構が働き始める前に酸化 DNA 損傷によって誘発された突然変異が固定されるのではないかと推測した。

さらに、 $\Delta mutT$ 株では有酸素培養条件下と比較して、アネロパック嫌気培養条件時に誘発される *rpsL* 突然変異頻度が上昇しなかったのに対し、 $\Delta mutMY$ 株では大幅に変異頻度の上昇が見られた理由として以下のことを推測した。 $\Delta mutT$ 株のミューテーター効果の原因となるヌクレオチドプールに対する酸化損傷は、多く存在する dGTP の中のある程度の割合に限られ、複製で取り込まれる 8-oxodGTP は全 dGTP の取り込み量と比較して少ないと考えられた。一方、DNA に対する影響は修復が行われない限り損傷は残り、常に変異を誘発する危険があると考えられた。この考察から、酸素ラジカルのバーストが起こった場合に *rpsL* 変異頻度に対する影響は、 $\Delta mutMY$ 株では非常に大きく、 $\Delta mutT$ 株ではほとんど影響が見られなかったものと推測した。

また、野生株では有酸素培養条件下、アネロパック嫌気培養時において変異頻度には差は見られなかった。この結果から、野生株では急激に発生する酸素ラジカルに適切に対処するような防御機構を働かせ、変異を抑制している可能性が示唆された。

表4 $\Delta mutMY$ 株および $\Delta mutT$ 株のミューテーター効果を指標としたアネロパック嫌気培養の評価

A) *rpsL* 突然変異頻度

	<i>rpsL</i> 前進突然変異頻度 ($\times 10^{-6}$)	
	有酸素培養	アネロパック培養
WT	0.58 (1)	0.91 < 1 >
$\Delta mutMY$	8.1 (14)	330 < 360 >
$\Delta mutT$	51 (88)	8.5 < 9.3 >

B) GC→TA 塩基置換変異頻度

<i>rpsL</i> 変異	WT		$\Delta mutMY$	
	有酸素培養	アネロパック嫌気培養	有酸素培養	アネロパック嫌気培養
GC→TA				
検出数/全検体数	3/422	0/89	384/480	83/91
変異頻度 ($\times 10^{-6}$)	0.0066	ND < 0.010	6.5	300
比	1.0	ND < 1.5	990	45000

有酸素培養およびアネロパック嫌気培養条件下で誘発される野生株、 $\Delta mutMY$ 株、 $\Delta mutT$ 株の *rpsL* 変異頻度から、アネロパック嫌気培養法の評価を行った。A) 野生株、 $\Delta mutMY$ 株、 $\Delta mutT$ 株を有酸素培養条件下およびアネロパック嫌気培養条件下において誘発される大腸菌 *rpsL* 前進突然変異頻度を示した。B) 野生株、 $\Delta mutMY$ 株における GC→TA 塩基置換変異の全検体数あたりの検出数、さらに変異頻度を示した。変異頻度は有酸素培養条件下では野生株 6 実験区、 $\Delta mutMY$ 株、 $\Delta mutT$ 株はそれぞれ 5 実験区、アネロパック嫌気培養は全ての株で 3 実験区の平均値を示した。比は有酸素培養条件下の野生株の頻度を 1 とした時の相対値を示している。また、ND は検出されなかった事を示しており、不等号で示した数値は 1 検体検出された時の変異頻度を示している。

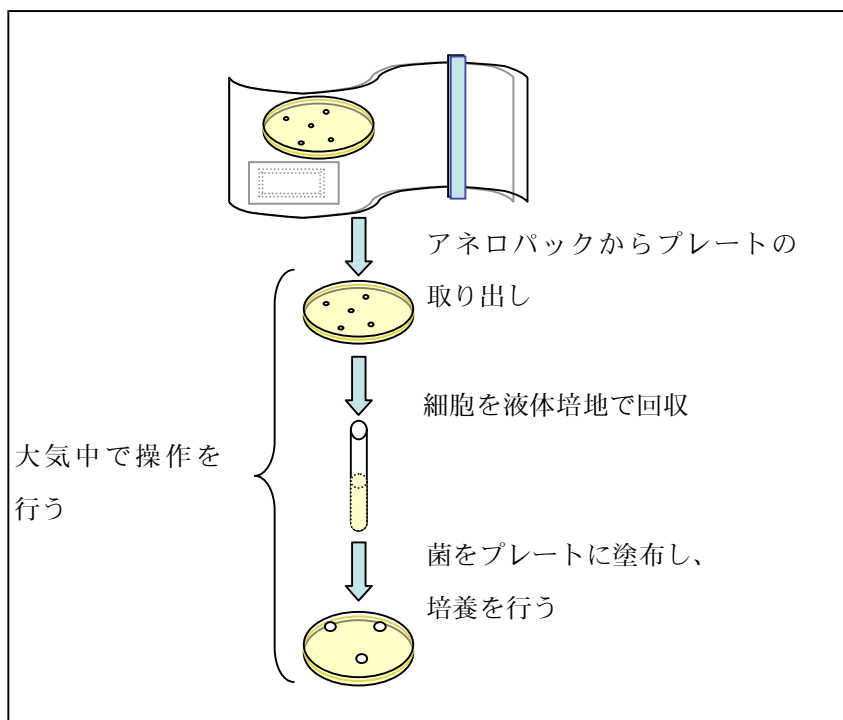


図9 アネロバック嫌気培養条件の実験プロトコル

アネロバック嫌気培養条件の実験プロトコルを示した。アネロバック中で嫌気培養を行っている間では酸素ラジカルは発生しないが、アネロバックからプレートを取り出し、薬剤プレートに塗布するまでの段階で酸素ラジカルが増加しているのではないかと推測した。

1-2 アネロパック嫌気培養により誘発される突然変異の特徴

これまでに酸素ラジカルがバーストするような状況として、高等真核生物の虚血性再灌流が知られている。虚血とは血流が途絶えたときに生体内で生じる低酸素症の一つであり、酸素濃度が低い状況で引き起こされる低酸素ストレスが引き起こされる。この後、再び血液が灌流する時に酸化障害が誘発される事が報告されている。虚血性再灌流による細胞障害にはアポトーシスなど細胞内の複雑な経路が絡み合い、解釈は簡単ではない。今回のアネロパック嫌気培養法では大腸菌を用いてはいるが、虚血性再灌流の際に生じる DNA 損傷を明らかにする手がかりが得られると考えた。そこで、大腸菌野生株においてアネロパックを用いた嫌気培養条件下から大気中に移行することによって発生する酸素ラジカルがバーストが、DNA に対してどのような変異を誘発し、細胞機能を損なうのかについて詳細な解析を行った。

その結果、野生株における有酸素培養条件および、アネロパックを用いた嫌気培養条件下から有酸素培養条件下への移行（以後、アネロパック酸素シフト培養条件と省略）時における変異の頻度を比較した結果、最も頻度に差が見られたのはアリル間組換えであった（図 10）。これらの変異の詳細な解析結果については以下で述べる。

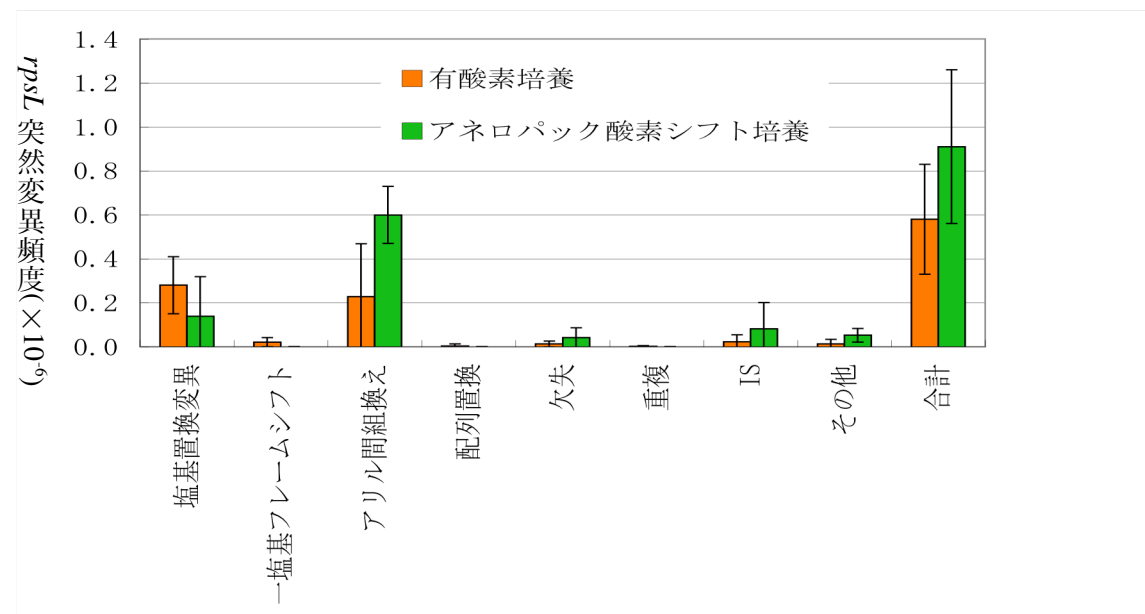


図 10 有酸素培養およびアネロパック酸素シフト培養条件下において誘発される変異の種類別変異頻度

有酸素培養条件下およびアネロパック酸素シフト培養条件下で大腸菌野生株において誘発される変異スペクトラム解析の結果を示した。変異頻度では有酸素培養は 6 実験区、アネロパック酸素シフト培養条件は 3 実験区の平均値を示しており、エラーバーは SD 値を示している。

a) 塩基置換変異

野生株において、有酸素培養条件下で誘発される塩基置換変異を誘発された部位ごとに分類すると、偏って変異が誘発されている部位が三つ検出された(表 5A、参考図 1A)。これらは *rpsL* 遺伝子の開始コドンから 82 番目の C→A トランスバージョン型塩基置換変異、245 番目の T→A または T→G トランスバージョン型塩基置換変異であり、これをそれぞれ 82C→A、245T→A または 245T→G と名付け、*rpsL* 遺伝子上で誘発されるホットスポット型塩基置換変異(ホットスポット変異)とした。82C→A、245T→G はそれぞれ塩基置換変異頻度全体の 5%、245T→A は 75% を占める変異である。特に 245T→A は *rpsL* 遺伝子内で誘発される全ての変異頻度の 36% を占める非常に強いホットスポット変異であった。これらの事から、自然条件下で生じる *rpsL* 突然変異はホットスポット変異が大きな割合を占めている事が明らかとなった。また、ホットスポット変異以外の塩基置換変異を種類別に分類すると、それぞれの塩基置換変異のタイプにおいて変異頻度に大きな差は見られなかった。

次に、大腸菌野生株において有酸素培養条件とアネロパック酸素シフト培養条件下で誘発される変異の比較を行った。その結果、有酸素培養条件下と比較して、アネロパック酸素シフト培養条件下で誘発される変異頻度に上昇が見られたのはトランジション変異のみで GC→TA 変異頻度は上昇しなかった。この結果から、アネロパック酸素シフト培養条件では DNA に含まれる 8-oxoG の量は上昇するが、野生株においては細胞中の MutM、MutY タンパク質が急激に増加した 8-oxoG に対応し、変異を抑制出来ると考えられた。

また、前述したように $\Delta mutMY$ 株では有酸素培養条件下と比較して、アネロパック酸素シフト培養条件下では、*rpsL* 突然変異頻度の上昇が見られた。この変異頻度の上昇は 8-oxoG に依存して誘発された GC→TA トランスバージョン型塩基置換変異に依存していると考えられたが、他の変異についても酸素ラジカルのバーストにより変異頻度の上昇が見られるかについて塩基置換変異の詳細な解析を行った。その結果、GC→TA 変異以外にも 82C→A ホットスポット変異、GC→AT トランジション型塩基置換変異頻度が、有酸素培養条件下と比較して、アネロパック酸素シフト培養条件において上昇していた。ただし、GC→AT 塩基置換変異については検出数が 1 検体のみであるために実際に変異頻度が上昇していたのかについて言及する事は困難である。また、82C→A ホットスポット変異はそれぞれのバッチで 1-2 検体検出されており、酸素ラジカルのバーストにより変異頻度は上昇したと考えた。変異頻度が上昇した理由は、82C→A ホットスポット変異は GC→TA トランスバージョン型塩基置換変異に分類される。そのため、酸素ラジカルがバーストする条件下で 82C→A ホットスポット変異頻度が上昇する理由として、8-oxoG が影響すると考えられた。

b) フレームシフト変異

野生株では有酸素培養条件下において、一塩基フレームシフト変異が検出される頻度は非常に低い。フレームシフト変異を詳しく分類すると、一塩基付加(addition)、一塩基欠失(deletion)に分けられ、さらに変異が誘発する部位の周辺配列が同一塩基内(run)もしくは異種塩基間(non-run)と四種類に分けられる(表 5B、参考図 1B)。有酸素培養条件下で誘発されたフレームシフト変異を、これら四種類に分類した結果、野生株ではそれぞれの変異の種類に大きな差は見られなかった。また、 $\Delta mutMY$ 株においても、それぞれのフレームシフト変異の分類では大きな差は見られなかった。一方、野生株におけるアネロパック酸素シフト培養条件においてフレームシフト変異は検出されず、 $\Delta mutMY$ 株においても1検体のみの検出数である事から評価は困難であるが、少なくとも酸素ラジカルのバーストにより、フレームシフト変異に大きな影響は与えない事が示唆された。

表5 野生株および $\Delta mutMY$ 株において、有酸素培養およびアネロパック嫌気培養条件下で誘発される点突然変異の詳細

A) 塩基置換変異

		野生株		$\Delta mutMY$ 株	
		アネロパック		アネロパック	
		有酸素培養	嫌気培養	有酸素培養	嫌気培養
ホットスポット	82C→A	0.014	ND<0.010	0.084[1]	15[180]
	245 T→A	0.21	ND<0.010	0.28	ND<3.6
	245 T→G	0.014	ND<0.010	0.023	ND<3.6
トランジション	A:T→G:C	0.0056 (1)	0.079 (14)	0.057	ND<3.6
	G:C→A:T	0.014 (1)	0.060 (4.3)	0.049[1]	2.9[59]
トランスバージョン	G:C→T:A	0.0066	ND<0.010	6.5[1]	300[46]
	G:C→C:G	0.011	ND<0.010	0.011	ND<3.6
	T:A→A:T	0.011	ND<0.010	ND<0.017	ND<3.6
	A:T→C:G	0.0043	ND<0.010	0.013	ND<3.6
合計		0.28 (1)	0.14 (0.50)	7.0[1]	320[46]

B) フレームシフト変異

		野生株		$\Delta mutMY$ 株	
		アネロパッ		アネロパッ	
		有酸素培養	ク嫌気培養	有酸素培養	ク嫌気培養
一塩基付加	at run	0.006	ND<0.010	0.081	ND<3.6
	at non-run	ND<0.0015	ND<0.010	0.10	ND<3.6
一塩基欠失	at run	0.0054	ND<0.010	ND<0.017	ND<3.6
	at non-run	0.009	ND<0.010	0.11[1]	2.9[26]
合計		0.021	ND<0.010	0.29[1]	2.9[10]

有酸素培養およびアネロパック嫌気培養時に野生株、 $\Delta mutMY$ 株において *rpsL* 遺伝子上で誘発された点突然変異の詳細を示している。A) 塩基置換変異を種類別に分類し、それぞれの変異頻度を示した。B) フレームシフト変異を種類別に分類し、それぞれの変異頻度を示した。括弧内の数字は有酸素培養条件下で検出された変異頻度を1とした時の相対値を示している。NDは検出されなかった事を示しており、不等号で表記している値は全実験検体数あたり一つ検出されたと想定した時の変異頻度である。

c) アリル間組換え変異

野生株におけるアリル間組換え頻度は、有酸素培養条件下と比較してアネロパック酸素シフト培養条件下では9.1倍上昇していた(図10)。アリル間組換えはRecAタンパク質が関与する組換え修復により同一染色体上にある変異型 *rpsL* 遺伝子と一部、同一の配列を持つ事で検出される(図7)。組換えにより修復が行われるような損傷は、複製ポリメラーゼの進行を阻害すると考えられている。そのため、酸素ラジカルのバーストにより複製を阻害する損傷が発生する可能性が示唆された。酸素ラジカルによって生じる酸化DNA損傷としては、チミングリコールやDNA-タンパク質のクロスリンクなどが知られており、これらのような損傷が大量に発生したと推測した。また、有酸素培養時に野生株と $\Delta mutMY$ 株においてアリル間組換え頻度に差が見られなかった理由としては、 $\Delta mutMY$ 株においてDNA中に存在する8-oxoGの量が増えるが、8-oxoGはDNA複製の進行を阻害しない事が示唆され、この結果はこれまでの報告と一致している。また、 $\Delta mutMY$ 株における酸素ラジカルのバースト条件下でアリル間組換えが検出されなかった理由は、変異のほとんどを塩基置換変異が占めるため、検出されにくかったと考えられた。

d) その他の変異

欠失、重複、ISなどでは大きな差は見られなかったことから、酸素ラジカルのバーストによりこれらの変異は誘発されにくい可能性が考えられた(図10)。

1-3 アネロパックを用いた嫌気培養実験のまとめ

嫌気培養の作成を行うために、アネロパックを用いて嫌気培養条件下の確立を試みた。しかし予想と反して、有酸素培養条件下と比較してアネロパック嫌気培養法では、酸素ラジカルが大幅に増えている可能性が示唆されるような結果を得た。酸素ラジカルがバーストするような条件下では塩基置換変異を誘発する8-oxoGなどが多く発生するが、野生株では損傷を修復するための十分な修復機構を働かせる事も示唆された。また、酸素ラジカルのバーストにより複製を停止させるような酸化的DNA損傷も発生している事が示唆された。複製を停止させるようなDNA損傷に対しては、細胞は組換え修復や損傷乗り越え型DNA複製により複製を再開させる。通常これらの変異回避機構はエラーフリーであるが、損傷乗り越え型DNA複製に関与するポリメラーゼはエラーを引き起こしやすいタンパク質であり、変異は誘発されやすい状況にあると予想された。これらの考察から、酸素ラジカルがバーストするような条件下では大部分の酸化的DNA損傷を修復しているが、潜在的に変異が引き起こされやすい状況にあり、細胞の持つ防御機構を超える酸素ラジカルが発生した場合には、細胞機能を失う恐れが

あるのではないかと推測した。

1-4 最小培地を用いたアネロパック嫌気培養法の検討

アネロパックを用いた嫌気培養法ではアネロパック中で培養した細胞を大気中に移行する際に酸素ラジカルのバーストが起こる可能性が示唆された。このアネロパック酸素シフト条件の詳細な解析から、複製を停止させるような酸化的 DNA 損傷の存在が示唆された。これらの結果から、アネロパックを用いた嫌気培養は酸素ラジカルを排除する方法としては不十分であり、酸素ラジカルが増加する原因を取り除く事が重要であると考えた。そこで、バーストの原因の一つとして、培地中に含まれる鉄イオンが重要なのではないかと推測した。培地中に鉄イオンが豊富に存在すると、細胞内に取り込まれ、電子伝達系から生じた過酸化水素とフェントン反応によりヒドロキシラジカルが発生する事が知られている。また、もう一つの原因としてアネロパック中から大気中に移行してから、薬剤プレートに塗布するまでの間に発生した酸化的 DNA 損傷が変異として固定される事により酸化的 DNA 損傷の影響が大幅に増加したのではないかと考えた。*rpsL* 遺伝子中に突然変異が誘発されるとストレプトマイシンに対して抵抗性を示す。通常、*rpsL* 遺伝子上に損傷が発生してもその損傷がそのまま変異として固定されている訳ではない。そのため、*rpsL* 遺伝子上に変異として損傷が固定されていない細胞はストレプトマイシンに対して感受性を示す。これらの理由から、アネロパックで培養中に *rpsL* 遺伝子中に損傷が発生しても複製により変異として固定されないならば、ストレプトマイシンプレートに塗布後、プレートでの生育は理論上不可能なはずである。そこで、アネロパック培養から大気中に細胞を取り出した際に発生すると考えられる酸素ラジカルのバーストを抑えるには、ストレプトマイシンプレートに塗布するまでの間に複製が起らない実験を構築するべきであると考えた。

そこで、培地中の鉄イオン濃度が低く、かつ細胞の倍加時間がこれまで用いた LB 培地よりも遅い、最小培地を用いれば酸素ラジカルのバーストが抑制され、アネロパックにより嫌気培養を行う事が出来るのではないかと考え、最小培地を用いた実験を行った。

a) 最小培地における酸素濃度の違いによる生育速度の違い

最小培地での生育において、酸素濃度が生育時間にどの程度影響するのかを明らかにする為に実験を行った。その結果、前述しているように LB 培地を用いた実験では 100 細胞程度から 10^8 程度になるまでの培養時間は 10 時間であったが、野生株、 $\Delta mutMY$ 株ともに最小培地を用いて有酸素培養条件下で生育させた時は 48 時間であったが、アネロパックを用いて培養した結果、LB を用いたアネロパック嫌気培養と同じく 48 時間であった (data not shown)。

有酸素培養条件下において、LB 培地と比較して最小培地では生育速度に 4.8 倍の違いが見られた。培養時間が伸びた理由として、培地中のアミノ酸の差が考えられた。LB 培地を用いた際には生育に必須なアミノ酸が周囲に十分にあり、酸素があればより早く生育出来る。しかし、最小培地には用いている株が合成する事の出来ない必須アミノ酸のみを添加しているのみで、それ以外は自ら作り出す事が必要となると考えられた。最小培地を用いた有酸素培養とアネロパックによる嫌気培養において培養速度が変わらなかった理由としては、有酸素培養条件下での有酸素呼吸によりアミノ酸を合成しながら生育するのと比較して、嫌気培養条件下において発酵によりアミノ酸を合成しながら生育するのと差がない可能性が示唆された。また、最小培地で生育した細胞をアネロパックから培地を大気中に取り出した後、ストレプトマイシンプレートに塗布するまでの時間を LB 培地での倍加時間である 30 分から 140 分程度にのぼした事により、実験の途中段階での複製を大幅に削減出来ると考えた。

b) $\Delta mutMY$ 株のミューテーター効果を指標とした、最小培地でのアネロパック嫌気培養の評価

最小培地を用いたアネロパックによる嫌気培養法によって、酸化 DNA 損傷が抑制出来るのかを明らかにする事を目的として実験を行った。嫌気培養条件の評価は、LB 培地を用いたアネロパック嫌気培養実験と同じく、酸素ラジカルによって DNA 中に発生する 8-oxoG が修復出来ない $\Delta mutMY$ 株を用いて実験を行った。今回、 $\Delta mutT$ 株を用いなかった理由としては、LB 培地を用いたアネロパック嫌気培養の結果から、 $\Delta mutMY$ 株が非常に鋭敏に酸素ラジカルの存在を感知出来ると考えたからである。

最小培地を用いたアネロパック嫌気培養条件下で生育した $\Delta mutMY$ 株の *rpsL* 変異頻度を測定した結果 (13×10^{-6})、有酸素培養条件下 (74×10^{-6}) と比較して 5.7 倍低下していた (表 6)。この結果から、最小培地を用いた実験では、LB 培地を用いた実験と比較して、アネロパック嫌気培養において酸素ラジカルの発生がある程度抑制されるのではないかと考えられた。しかし、最小培地を用いたアネロパック嫌気培養条件において $\Delta mutMY$ 株の変異頻度は、アネロパック培養を行った野生株と比較して 30 倍高い結果となった。変異頻度が同程度にならなかった事から、最小培地を用いたアネロパック嫌気培養では嫌気培養には不十分である事が明らかとなった。

次に、LB 培地と最小培地上で生育時に野生株および $\Delta mutMY$ 株において誘発される *rpsL* 突然変異の頻度に差が見られるのかについて解析を行った。有酸素培養条件下において野生株では LB 培地と最小培地では頻度はほぼ同程度であったが、 $\Delta mutMY$ 株の変異頻度は LB 培地と最小培地ではそれぞれ 8.1×10^{-6} と 74×10^{-6} であり、最小培地を用いた実験では LB 培地よりも細胞内の酸化 DNA 損傷の量が多い事が示唆された (表 4、表 6)。この結果から、有酸素培養条件下では、富栄養培地である LB 培地と比較し

て、必要最低限の栄養のみで構成された最小培地で生育する方が細胞内で発生する酸素ラジカルが多い事が示唆された。最小培地で生育時に酸素ラジカルがより多く発生する原因として以下の可能性が考えられた。

本研究で用いている菌株はシステインの合成欠損株である。そのため、最小培地にはシステインのみを加え、その他のアミノ酸は添加しておらず、細胞は生育もしくは分裂する為に必要なタンパク質を構成するアミノ酸を自ら作り出さなくてはならない。そのため、有酸素培養条件下では LB と比較して最小培地では生育速度が遅く、代謝が活発になり、活性酸素の産生が多くなると予想された。

c) 最小培地での有酸素およびアネロパック嫌気培養時に誘発される *rpsL* 突然変異のスペクトラム解析

全体の突然変異頻度の結果から、最小培地を用いたアネロパック嫌気培養法では酸素ラジカルを排除出来ない事が明らかとなった。しかし $\Delta mutMY$ 株の変異頻度が有酸素培養条件下と比較して低下している事から、LB 培地を用いたアネロパック嫌気培養とは異なり、ある程度は酸素ラジカルの発生が抑制されている事が示唆された。そこで、酸素ラジカルが自然突然変異にどのような影響を与えるのかを予測するために、酸素ラジカルの発生が比較的低い今回の最小培地上での有酸素培養およびアネロパック嫌気培養で誘発された変異を解析し、比較を行った。

その結果、ほとんどの変異が有酸素と比較してアネロパック嫌気培養で頻度の低下が見られた(図 11)。さらに、塩基置換変異とフレームシフト変異の詳細な解析を行った結果、ほとんど全てのタイプの変異が抑制されている事が示唆された(data not shown)。以上の結果から、酸素ラジカルが若干低下する条件下においても、変異頻度の低下が見られる事から、酸素ラジカルは自然突然変異の発生に関与する可能性が示唆された。

d) 最小培地を用いたアネロパック嫌気培養実験のまとめ

LB 培地を用いたアネロパック嫌気培養条件では酸素ラジカルが大幅に増えていたと考えられたため、酸素ラジカルによる影響を排除するために最小培地を用いてアネロパック培養を行った。その結果、有酸素培養条件下と比較してある程度は酸素ラジカルによる影響を抑制出来たが、完全に酸素を排除する必要があると考えた。また、酸素が少ないと考えられた今回の実験条件下において、大腸菌で誘発される *rpsL* 突然変異を詳細に解析した結果、多くの変異の頻度が有酸素培養条件下と比較して減少していた事から、酸素の存在が自然突然変異に影響するのではないかと予想された。

表 6 最小培地における、有酸素培養条件およびアネロパック嫌気培養条件下で誘発される *rpsL* 突然変異頻度

	<i>rpsL</i> 前進突然変異頻度 ($\times 10^{-6}$)	
	有酸素培養(最小培地)	アネロパック嫌気培養(最小培地)
野生株	0.93 (1)	0.44 <1>
$\Delta mutMY$ 株	74 (80)	13 <30>

WT、 $\Delta mutMY$ 株の有酸素培養条件下およびアネロパック嫌気培養条件下（最小培地）において誘発される *rpsL* 前進突然変異頻度を示した。変異頻度は全て 3 実験区の平均値を示した。括弧内の数字はそれぞれの条件下における野生株の変異頻度を 1 とした時の相対値を示している。

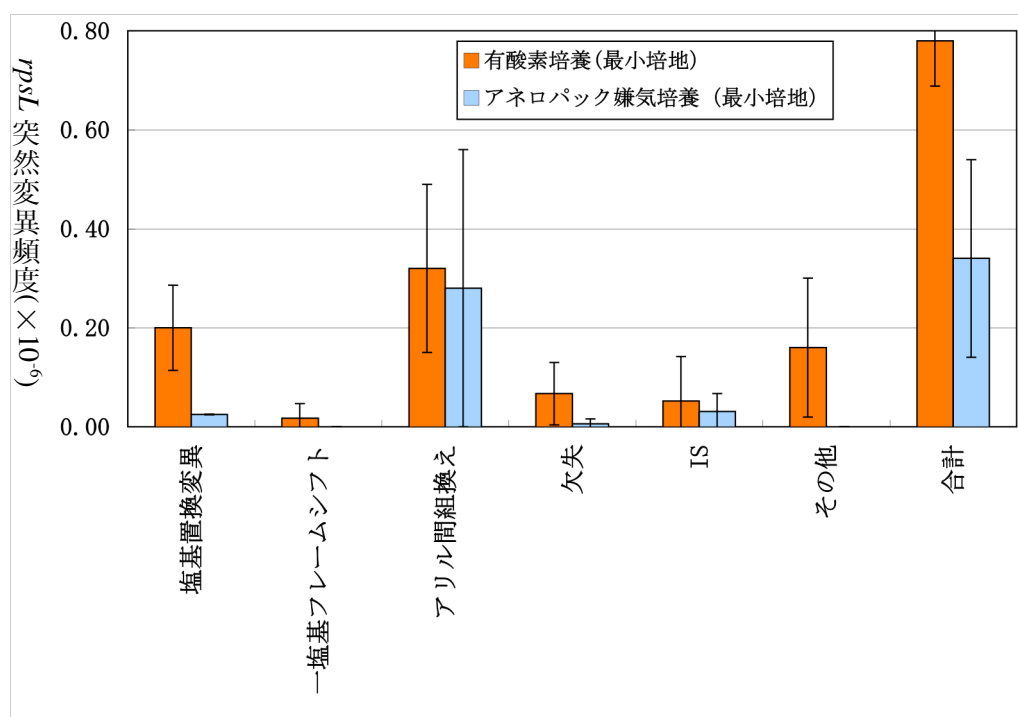


図 11 最小培地における有酸素培養およびアネロパック培養条件下において誘発される変異の種類別変異頻度

有酸素培養条件下および最小培地を用いたアネロパック嫌気培養条件下において、大腸菌野生株において *rpsL* 遺伝子上で誘発される変異スペクトラム解析結果。変異頻度は全て 3 実験区の結果を、エラーバーは SD 値を示している。

表7 野生株および $\Delta mutMY$ 株において、最小培地を用いた有酸素培養およびアネロパック嫌気培養条件下で誘発される点突然変異の詳細

A) 塩基置換変異

		野生株		$\Delta mutMY$ 株	
		有酸素培養 (最小培地)	アネロパック培養 (最小培地)	有酸素培養 (最小培地)	アネロパック培養 (最小培地)
ホットスポット	82C→A	0.020	ND <0.062	1.1[1]	0.50[0.45]
	245 T→A	0.020	ND <0.062	ND <1.1	0.11
	245 T→G	ND <0.018	ND <0.062	ND <1.1	ND <0.16
トランジション	A:T→G:C	0.016(1)	0.0098(0.61)	ND <1.1	ND <0.16
	G:C→A:T	0.094(1)	0.011(0.12)	3.4	ND <0.16
トランスバージョン	G:C→T:A	0.034	ND <0.062	68[1]	12[0.18]
	G:C→C:G	0.017	ND <0.062	ND <1.1	ND <0.16
	T:A→A:T	ND <0.018	ND <0.062	ND <1.1	ND <0.16
	A:T→C:G	ND <0.018	0.0039	ND <1.1	ND <0.16
	合計	0.78(1)	0.34(0.44)	72[1]	14[0.19]

B) フレームシフト変異

		野生株		$\Delta mutMY$ 株	
		有酸素培養 (最小培地)	アネロパック培養 (最小培地)	有酸素培養 (最小培地)	アネロパック培養 (最小培地)
一塩基付加	at run	ND <0.018	ND <0.0062	ND <1.1	ND <0.16
	at non-run	ND <0.018	ND <0.0062	ND <1.1	ND <0.16
一塩基欠失	at run	0.0170	ND <0.0062	ND <1.1	ND <0.16
	at non-run	ND <0.018	ND <0.0062	ND <1.1	ND <0.16
	合計	0.017	ND <0.0062	ND <1.1	ND <0.16

最小培地において有酸素培養およびアネロパック嫌気培養により生育した野生株および $\Delta mutMY$ 株の点突然変異の詳細。A) 塩基置換変異についての詳細な解析結果を示した。B) フレームシフト変異についての詳細な解析結果を示した。ND は検出されなかった事示しており、それぞれ不等号で示した数字は一検体のみ検出された場合の変異頻度を表している。

1-5 三重シールド嫌気培養法を用いた嫌気培養法の達成

これまでの、LB 培地および最小培地を用いたアネロパック嫌気培養実験法では酸素ラジカルの発生を抑制出来なかった。この原因の一つとして、アネロパック中では酸素ラジカルの影響はある程度は抑制されているが、嫌気培養条件下において生育した細胞を大気中に取り出し薬剤プレートに塗布するまでの間に、酸素ラジカルがバーストするような事態が生じ、変異頻度が上昇する事が考えられた。さらに、貧栄養環境下では代謝が活性化する為に最小培地を用いる事が却って酸素ラジカルを増加させる原因になるのではないかと推測された。以上の考察から、実験の一連の操作全てを嫌気培養条件下で実施するために、酸素を含まない密閉機器である嫌気チャンバー中で実験を行った。さらに、富栄養培地である LB 培地を用いるが、アネロパック以外にも培地中の酸素を出来る限り除去するために、培地中の酸素ラジカルを水に変換出来る oxyrase を用いた。また、嫌気チャンバー内においても細胞培養を完全嫌気培養条件下の維持を保証する為にアネロパックを用いた。これら嫌気チャンバー、oxyrase、アネロパックの三つを複合的に用いた三重シールド嫌気培養を行った。

a) 酸素濃度の違いによる生育速度の違い

酸素の有無により生育時間がどの程度異なるのかを調べる為に、有酸素培養条件下および三重シールド嫌気培養条件下で細胞が一定数まで増殖する時間を測定した。その結果、培養開始時の菌数（100 細胞程度）から 10^8 程度になるまでの培養時間は有酸素の場合 10 時間であるのに対し、三重シールド嫌気培養法を用いた嫌気培養では 72 時間を要した。この結果から、酸素が無い状態では生育速度に著しく大きな遅延が起こる事が示された。

酸素濃度が低下すると、生育速度の遅延が見られる事はアネロパックを用いた実験でも同じ結果を得ている。しかし、LB 培地を用いたアネロパック嫌気培養では生育時間が 48 時間であるのに対し、三重シールド嫌気培養では 72 時間と大幅な遅延が見られた。この結果は、oxyrase を加えてさらに培地中の酸素を除去した三重シールド嫌気培養が、非常に低い酸素濃度である可能性を示唆していると考えられた。

b) $\Delta mutMY$ および $\Delta mutT$ 変異のミューテーター効果を指標とした三重シールド嫌気培養の評価

三重シールド嫌気培養が完全嫌気培養である事を確認する為に、これまでに用いて来た方法と同じく、酸素ラジカルによる DNA 損傷が修復できない $\Delta mutMY$ 株および $\Delta mutT$ 株のミューテーター効果を指標とすることで評価を行った。嫌気培養条件下では酸素が存在せず、酸素ラジカルの発生が抑えられ、酸化 DNA 損傷も発生していないはずである。この場合、酸化損傷に依存した $\Delta mutMY$ 株、 $\Delta mutT$ 株のミューテーター

効果は抑制される事を期待した。

実際に、作製した三重シールド嫌気培養法で野生株、 $\Delta mutMY$ 株、 $\Delta mutT$ 株を培養し、変異頻度測定を行った結果、 $\Delta mutMY$ 株と $\Delta mutT$ 株の変異頻度は野生株と同程度まで抑制できた(表 8A)。さらに三重シールド嫌気培養を行った際に誘発される、 $\Delta mutMY$ 株および $\Delta mutT$ 株の特異的なミューテーター効果である塩基置換変異(それぞれ GC→TA、AT→CG 変異)は、有酸素培養条件下で誘発される変異と比較して顕著に抑制されていた(表 8B)。以上の結果から作成した三重シールド嫌気培養法を用いて完全嫌気培養を行う事に成功した。さらに、これまでは直接的な証拠が得られていなかった、 $\Delta mutMY$ 株、 $\Delta mutT$ 株のミューテーター効果は細胞内で酸素ラジカルにより生じる 8-oxoG ヌクレオチドの変異原生による事を世界で初めて明らかに出来た。

表8 $\Delta mutMY$ 株および $\Delta mutT$ 株のミューテーター効果を指標とした三重シールド嫌気培養法の評価

A) *rpsL* 突然変異頻度

	<i>rpsL</i> 前進突然変異頻度 ($\times 10^{-6}$)	
	有酸素培養	三重シールド嫌気培養
野生株	0.58 (1)	1.4 <1>
$\Delta mutMY$ 株	8.1 (14)	1.6 <1.1>
$\Delta mutT$ 株	51 (88)	1.7 <1.2>

B) GC→TA および AT→CG 塩基置換変異頻度

<i>rpsL</i> 変異	野生株		$\Delta mutMY$ 株		$\Delta mutT$ 株	
	有酸素培養	三重シールド嫌気培養	有酸素培養	三重シールド嫌気培養	有酸素培養	三重シールド嫌気培養
GC→TA						
検出数/全検体数	3/422	3/456	384/480	1/119	0/480	0/119
変異頻度 ($\times 10^{-6}$)	0.0066	0.0077	6.5	0.016	-	-
比	1.0	1.2	990	2.4	-	-
AT→CG						
検出数/全検体数	3/422	2/456	1/480	0/119	377/480	1/119
変異頻度 ($\times 10^{-6}$)	0.0044	0.0056	0.023	-	41	0.0047
比	1.0	1.3	5.2	-	9300	1.1

有酸素培養および三重シールド嫌気培養条件下で誘発される野生株、 $\Delta mutMY$ 株、 $\Delta mutT$ 株の *rpsL* 変異頻度から、三重シールド嫌気培養法の評価を行った。A) 野生株、 $\Delta mutMY$ 株、 $\Delta mutT$ 株を有酸素培養条件下および三重シールド嫌気培養条件下において誘発される大腸菌 *rpsL* 前進突然変異頻度を示した。B) 野生株、 $\Delta mutMY$ 株における GC→TA 塩基置換変異の全検体数あたりの検出数、さらに変異頻度を示した。変異頻度は有酸素培養条件下では野生株 6 実験区、 $\Delta mutMY$ 株、 $\Delta mutT$ 株はそれぞれ 5 実験区、三重シールド嫌気培養は全ての株で 5 実験区の平均値を示した。比および括弧で示した数字は有酸素培養条件下の野生株の頻度を 1 とした時の相対値を示している。

2. 培養中の酸素の存在が及ぼす *rpsL* 前進突然変異への影響

2-1 有酸素培養および三重シールド培養条件下における *rpsL* 突然変異頻度の解析

酸素ラジカルが自然突然変異の変異頻度にどの程度影響しているかを明確にする目的で、大腸菌野生株を有酸素培養、および完全嫌気培養が証明された三重シールド嫌気培養条件下で生育させ、それぞれの条件下において誘発される変異頻度の比較を行った(表 8A)。その結果、有酸素と比較して三重シールド嫌気培養条件下では変異頻度が若干上昇していたが、ほとんど変わらない程度であった。全体の変異頻度がほとんど変わらない理由として、以下の二つの可能性が考えられた。一つ目の可能性は大気中において存在する程度の酸素濃度は自然突然変異の発生に影響しないことである。二つ目は酸素の存在は自然突然変異の発生に影響するが、それぞれの変異のタイプにおける変異頻度が低下と上昇したものがあり、それらの合計として算出される変異頻度は一見して変わらないように思われる可能性が考えられた。そこで、これらの可能性を検討する為に有酸素培養および三重シールド嫌気培養条件下で培養した大腸菌野生株の *rpsL* 遺伝子上で誘発された変異スペクトラムを解析し、酸素の存在が突然変異の誘発に影響するのかについて実験を行った。

2-2 有酸素および三重シールド嫌気培養条件下で誘発される *rpsL* 遺伝子変異のスペクトラム解析

酸素の存在が自然突然変異の誘発に影響する事を明らかにする事を目的として、有酸素培養および三重シールド嫌気培養条件下で培養した大腸菌野生株において誘発される *rpsL* 遺伝子の変異スペクトラム解析を行った。その結果、全体の変異頻度が有酸素と比較して嫌気で若干上昇していた原因は、アリル間組換え頻度が三重シールド嫌気培養条件下で大幅に上昇していた事に起因する事が明らかになった(図 12)。また、塩基置換変異頻度は有酸素培養と比較して三重シールド嫌気培養条件下で低下、フレームシフト変異、欠失変異頻度などは三重シールド嫌気培養条件下で若干上昇しているようであった。以上の結果から、前述した二つ目の可能性として示したように、酸素の存在は自然突然変異の発生に影響を与えている事が明らかとなった。次にそれぞれのタイプの変異についてさらに詳細な解析を行い、どのような変異が酸素の存在により誘発されているのかを明らかにした。

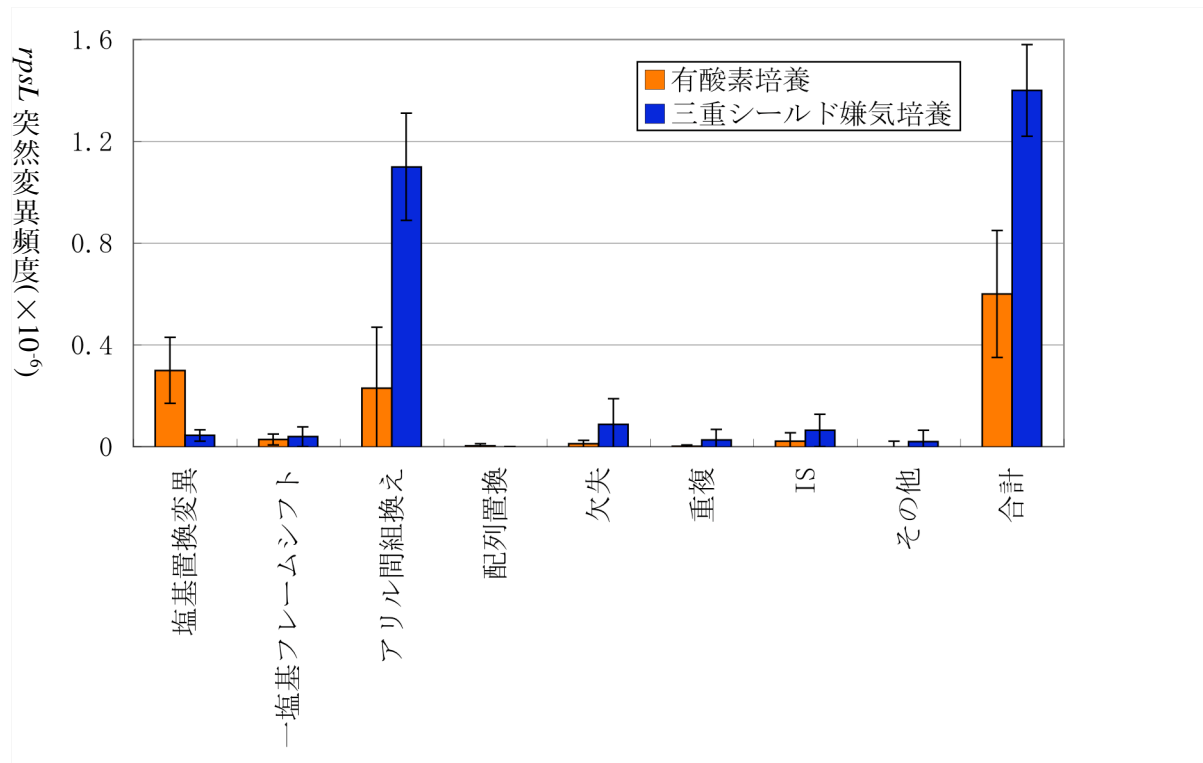


図 12 有酸素培養および三重シールド嫌気培養条件下で誘発される *rpsL* 突然変異の種類別変異頻度

有酸素条件下および三重シールド嫌気培養条件下における野生株の変異スペクトラム解析結果。変異頻度は有酸素培養では 6 バッチ、無酸素培養では 5 バッチにおいて検出された変異を種類別に分類を行い、頻度の平均値を示した。エラーバーは SD 値を示している。

a) 塩基置換変異

これまでに、酸素ラジカルが塩基置換変異を誘発する事が報告されている。これらの報告は細胞内の酸素ラジカル濃度が上昇するような薬剤を処理した研究や、酸化 DNA 変異を修復するタンパク質を欠損した細胞において塩基置換変異が高頻度に誘発される事を示す研究に基づいている。さらに、本研究において有酸素培養条件下で誘発される変異の中で最も大きな割合(48%)を占めているのは塩基置換変異であり、酸素呼吸により発生した酸素ラジカルが塩基置換変異を誘発し、自然突然変異発生の重要な原因となっているという推測が出来る。しかしながら、生理的酸素濃度の時において酸化 DNA 修復タンパク質は非常に効率よく働いており、野生株において酸化的 DNA 損傷が自然突然変異に影響するかについては明らかとなっていないのが現状である。そこで本研究で確立した完全嫌気培養と、有酸素培養条件下において誘発される塩基置換変異について詳細な解析を行った。

前述しているように、有酸素培養条件下で誘発される塩基置換変異のほとんどは 82C→A、245T→A または 245T→G であり、特に 245T→A ホットスポット変異は全体の突然変異頻度の 36%、また塩基置換変異頻度全体の 75%を占める強力な変異であった。

次に三重シールド嫌気培養時に誘発される塩基置換変異を詳細に解析し、有酸素培養条件下で誘発される塩基置換変異頻度との比較を行った。その結果、表 9A に示すように有酸素培養条件下で誘発される変異のうち、非常に大きな割合を占めていたホットスポットが嫌気培養条件下では全く検出されなかった。さらにホットスポット以外の塩基置換変異では、GC→CG と AT→TA トランスバージョン変異が有酸素培養と比較して三重シールド嫌気培養条件下では頻度が有意に低下していた。このトランスバージョン変異の頻度はそれぞれ塩基置換変異頻度全体の 4%を占めていた。一方、これら二つのトランスバージョンとホットスポット変異以外の塩基置換変異は有酸素培養条件、三重シールド嫌気培養条件に関わらず変異頻度に大きな差は見られなかった。以上の結果から、自然条件下において *rpsL* 遺伝子上で誘発されるホットスポット変異などの特定のタイプの塩基置換変異は酸素の存在に依存して誘発され、これらのタイプの変異は塩基置換変異頻度全体の 95%という非常に高い変異頻度を占めている事が示された。

b) フレームシフト変異

フレームシフト変異が誘発される原因として、現在までに誤りがち DNA ポリメラーゼによる損傷乗り越え修復(TLS)や複製ポリメラーゼによるスリッページの関与が示唆されている。しかし、実際に自然条件下で誘発されるフレームシフト変異に酸素ラジカルが関与するかについては明らかとなっていない。そこで、有酸素培養および三

重シールド嫌気培養条件下において *rpsL* 遺伝子内で誘発されるフレームシフト変異について詳細な解析を行った(表 9B)。その結果、有酸素倍用と比較して三重シールド嫌気培養条件下で頻度の低下が観察された変異は、non-run における一塩基欠失であった。この変異は有酸素培養条件下において検出されたフレームシフト変異 14 検体のうち 5 検体を占めていたが、三重シールド嫌気培養条件下で検出されたフレームシフト変異 13 検体中全く検出されなかった。他のタイプのフレームシフト変異は有酸素培養と比較して三重シールド嫌気培養条件下で頻度が同程度、もしくは上昇していた。run での一塩基付加は有酸素、嫌気培養条件で差は見られなかったが、non-run での一塩基付加、run での一塩基欠失は有酸素培養と比較して三重シールド嫌気培養条件下では変異頻度が上昇した。特に run での一塩基欠失は有酸素培養条件下では 14 検体中全く検出されなかったが、三重シールド嫌気培養条件下では 13 検体中 6 検体と約半分を占めていた。

以上の結果から、フレームシフト変異は酸素の存在によって誘発される変異もあるが、逆に嫌気培養条件下にする事により特定のタイプのフレームシフト変異が誘発される可能性が示唆された。

表 9 有酸素培養および三重シールド嫌気培養条件下で誘発される点突然変異の詳細

A) 塩基置換変異

		有酸素培養	三重シールド嫌気培養
ホットスポット	82C→A	0.014	ND<0.0029
	245 T→A	0.21	ND <0.0029
	245 T→G	0.014	ND <0.0029
トランジション	A:T→G:C	0.0057 (1)	0.0031 (0.54)
	G:C→A:T	0.014 (1)	0.025 (1.8)
トランスバージョン	G:C→T:A	0.0095 (1)	0.0077 (0.77)
	G:C→C:G	0.017	ND <0.0029
	T:A→A:T	0.015 (1)	0.0025 (0.17)
	A:T→C:G	0.0044 (1)	0.0056 (1.3)
合計		0.30 (1)	0.044 (0.15)

B) フレームシフト変異

		有酸素培養	三重シールド嫌気培養
一塩基付加	at run	検出数/全検体数	5/14
		変異頻度(×10 ⁻⁶)	0.0061
	non-run	検出数/全検体数	0/14
		変異頻度(×10 ⁻⁶)	ND <0.0015
一塩基欠失	at run	検出数/全検体数	4/14
		変異頻度(×10 ⁻⁶)	0.0054
	non-run	検出数/全検体数	5/14
		変異頻度(×10 ⁻⁶)	0.0091
変異頻度合計		0.021	0.022

有酸素培養および三重シールド嫌気培養により生育した野生株において誘発される点突然変異の詳細を示した。A) 塩基置換変異についての詳細な解析結果を示した。B) フレームシフト変異についての詳細な解析結果を示した。ND は検出されなかった事を示しており、それぞれ不等号で示した数字は一検体のみ検出された場合の変異頻度を表している。

c) アリル間組換え変異

これまで組換え修復が行われるような損傷は、複製ポリメラーゼの進行が止まるような損傷であると考えられており、修復には RecA タンパク質が関与する。これまでに *recA* 変異株に過酸化水素処理を行うと、野生型大腸菌と比較して生存率が低い事が報告されている[20]。また、本研究において大腸菌野生株を酸素ラジカルがバーストすると考えられる条件下において培養した際に（アネロパック酸素シフト培養）、有酸素培養条件下と比較してアリル間組換え変異が 10 倍上昇していた事からも、酸素ラジカルが複製の進行を止めるような損傷を発生させる原因になる事が予想された。実際に、有酸素条件下において誘発される突然変異を解析すると、野生株ではアリル間組換え変異が全体の突然変異の頻度の内 40%を占めていた。さらに、酸素ラジカルの発生がある程度抑制出来ると考えられた最小培地を用いたアネロパック嫌気培養では、有酸素培養と比較してアリル間組換え頻度の低下が見られた。この結果から、複製を止めるような損傷が酸素に依存して発生しており、自然条件下でのアリル間組換え変異を誘発する大きな原因になっているのではないかと予想した。この予想が正しければ、有酸素培養と比較して、三重シールド嫌気培養条件下で誘発されるアリル間組換え頻度は低下しているのではないかと推測した。

実際に有酸素培養および三重シールド嫌気培養条件下で誘発されるアリル間組換え頻度を比較した結果、予想と反して有酸素培養と比較して三重シールド嫌気培養条件下で誘発されるアリル間組換え頻度は上昇していた(図 12)。また、先に述べた特定のタイプのフレームシフト変異頻度が三重シールド嫌気培養を行う事により上昇していた事と考え合わせると、三重シールド嫌気培養条件下において酸素に依存しない何らかの損傷が発生している可能性が示唆された。詳しくは考察で述べる。

d) 欠失変異

欠失変異の誘発には様々なメカニズムが報告されており、その抑制するメカニズムの一つに組換え修復に必要な RecA タンパク質が担っている事は既に報告している[44]。しかし、自然条件下において誘発される欠失変異の原因に、酸素が関与しているのかについては明らかになっていない。そこで酸素の存在が欠失変異の誘発に影響を及ぼすのかを明らかにする事を目的として有酸素培養および三重シールド嫌気培養条件下での欠失変異頻度の比較を行った。

その結果、アリル間組換え変異と同様、有酸素と比較して嫌気培養条件下において欠失変異頻度は 7.3 倍上昇していた(図 12)。この結果から、特定のタイプのフレームシフト変異やアリル間組換え変異とともに、欠失変異を誘発するような損傷が嫌気培養条件下で上昇している可能性が示唆された。

e) 重複変異

重複変異はある程度の長さの配列が直列もしくは逆向きの反復配列で挿入される変異である。重複変異が誘発される原因に酸素による DNA 損傷が関与するののかについては明らかとなっていないため、有酸素培養および三重シールド嫌気培養によって誘発される重複変異頻度の比較を行った。

その結果、有酸素培養と比較して三重シールド嫌気培養条件下では変異頻度が 17 倍上昇していた(図 12)。この結果もアリル間組換え頻度などと同様に、嫌気培養条件下において特異的な変異が上昇している可能性を示唆していると考えられた。

f) IS 変異

IS 変異はトランスポゾンによって様々な部位に特異的な配列が挿入され、タンパク質の機能を欠損させる。これまでに IS 変異は AT が豊富な部位が標的になりやすいと考えられていた[47]。このように配列に依存した IS 変異誘発のメカニズムは知られていたが、酸素の存在に依存して IS 変異が誘発されるのかについての報告はない。そこで、有酸素培養条件下および三重シールド嫌気培養条件下における IS 変異の頻度の比較を行った。

その結果、有酸素培養と比較して三重シールド嫌気培養条件下では IS 変異頻度は 4 倍上昇していた(図 12)。この結果から、無酸素培養条件下では IS 変異が誘発されやすい事が示唆された。

2-3 有酸素培養および三重シールド嫌気培養実験のまとめ

三重シールド嫌気培養法により、完全に酸素の影響を除去出来た。この嫌気培養法と大気中での培養である有酸素培養条件において生育した大腸菌野生株で誘発される *rpsL* 突然変異頻度とその変異スペクトラム解析を行った。その結果、全体の *rpsL* 突然変異頻度は三重シールド嫌気培養と有酸素培養条件ではほとんど差が見られず、逆に三重シールド嫌気培養条件下では変異頻度が若干上昇しているようであった。また、*rpsL* 遺伝子上で誘発された変異について詳細な解析を行った結果、それぞれの実験条件下で誘発される様々な変異の頻度は、有酸素培養および三重シールド嫌気培養条件下で異なる事から、酸素の存在が変異の誘発に影響を及ぼす事が明らかとなった。また、有酸素培養条件下と比較して、三重シールド嫌気培養条件下で誘発された変異頻度が低下していた変異は、ホットスポット型塩基置換変異(82C→A、245T→A、245T→G)、AT→TA、GC→CG トランスバージョン型塩基置換変異、non-run での一塩基欠失フレームシフト変異であった。これらの変異は酸素の存在に依存して誘発されている事が示唆された。一方、有酸素培養と比較して三重シールド嫌気培養条件下で変異頻度が上昇していた変異も検出された。変異頻度の上昇が観察された変異は、non-run

での一塩基欠失フレームシフト変異以外のフレームシフト変異、アリル間組換え変異、欠失変異、重複変異、IS 変異であった。これらの変異は嫌気培養条件下で特異的な発生する損傷に依存して変異が誘発されている可能性が示唆された。

3. 過酸化水素処理による細胞内酸素ラジカル濃度の上昇が及ぼす *rpsL* 突然変異への影響

前述したように、大気中の培養である有酸素培養条件下と三重シールド嫌気培養条件下において誘発される *rpsL* 突然変異の詳細な解析を行った結果、ホットスポットを含めた特定の塩基置換変異および non-run での一塩基欠失フレームシフト変異が酸素の存在に依存して変異が誘発される事が示唆された。しかし、これらの解析結果はあくまで酸素の存在に依存したものであり、必ずしも酸素ラジカルによる影響であると証明された訳ではない。

これまでに当研究室では酸素ラジカル消去系変異株 ($\Delta sodAB$ 株、 $\Delta katEG$ 株、 $\Delta ahpCF$ 株)、および細胞内のヒドロキシラジカル産生に関わる鉄イオンの細胞内流入を制御出来ない変異株 (Δfur 株) を用いた解析が行われてきた[43]。これらの変異株はほとんどが野生株と比較して *rpsL* 突然変異の頻度が上昇していた。そこで実際に、これらの変異株を大気中で培養させたときに、細胞内において酸素ラジカルが上昇するのかを *mutMY* 変異によるミューター活性を利用して確認した結果、驚くべき事に Δfur 株のみに *mutMY* 変異による相乗的な頻度上昇が見られた。 $\Delta mutMY$ 株の変異頻度は細胞内の 8-oxoG の量に依存し、さらに 8-oxoG が生じる主な原因はヒドロキシラジカルによると考えられている。そのため、酸素ラジカル消去系に関与するタンパク質を欠損させただけでは細胞内のヒドロキシラジカル濃度は上昇せず、 Δfur 株の細胞のみにヒドロキシラジカルの量が増加していると予想された。これらの酸素ラジカルの減少に関わると考えられるタンパク質を欠損させた大腸菌株において有酸素培養条件下で誘発される *rpsL* 突然変異を詳細に解析した結果、酸素の存在に依存して誘発される事が示唆された GC→CG や AT→TA トランスバージョン型塩基置換変異、non-run での一塩基欠失フレームシフト変異頻度は、野生株と比較してほとんどの変異株において頻度の上昇が見られた。一方、有酸素培養を行ったときに *rpsL* 遺伝子上で検出される大腸菌野生株のホットスポット変異である 245T→A 塩基置換変異は Δfur 変異株のみに、野生株と比較して上昇が見られた。以上の結果から、酸素ラジカルの発生を抑制出来ない変異株は、細胞内の酸素ラジカル濃度が上昇すると考えられるが、それぞれの変異株において発生する酸素ラジカルは同一では無い事が示唆された。さらに、245T→A ホットスポット型塩基置換変異頻度の上昇が見られたのは Δfur 変異株であった事から、自然突然変異の誘発にはヒドロキシラジカルが関与するのではないかと言う可能性が残された。

しかし、 Δfur 変異株では *mutMY* 変異により頻度がさらに上昇する結果が報告されているが、鉄イオンの過剰流入に依存した結果であり、実際にはヒドロキシラジカルが関与していないと言う可能性も残された。そこで細胞内のヒドロキシラジカル濃度

を上昇させる別の方法として、細胞外から過酸化水素処理を行い、過酸化水素処理を行わないときに誘発される *rpsL* 突然変異を比較する事によって、ヒドロキシラジカルの影響を検討した。

3-1 過酸化水素処理による生存率の減少

これまでに細胞内の酸素ラジカル濃度を上昇させる方法として過酸化水素処理はよく用いられている。そこで、Imlay 等の方法(20)を改良して実験系を作製した。まず、過酸化水素濃度依存的に細胞の生存率がどの程度減少するのか、さらに変異株によって生存率が変化するのかを確認するために生存率の測定を行った。

その結果、野生株は過酸化水素濃度に応じて生存率が低下した(図 13A)。また、過酸化水素濃度は最高 10mM まで処理し、全ての濃度に置いて濃度依存的に生存率が低下する事を確認した(data not shown)。さらに、過酸化水素濃度依存的に頻度は上昇するが(図 13B)、一定以上の過酸化水素濃度になると変異頻度はある程度以上は上昇しない結果も得た。

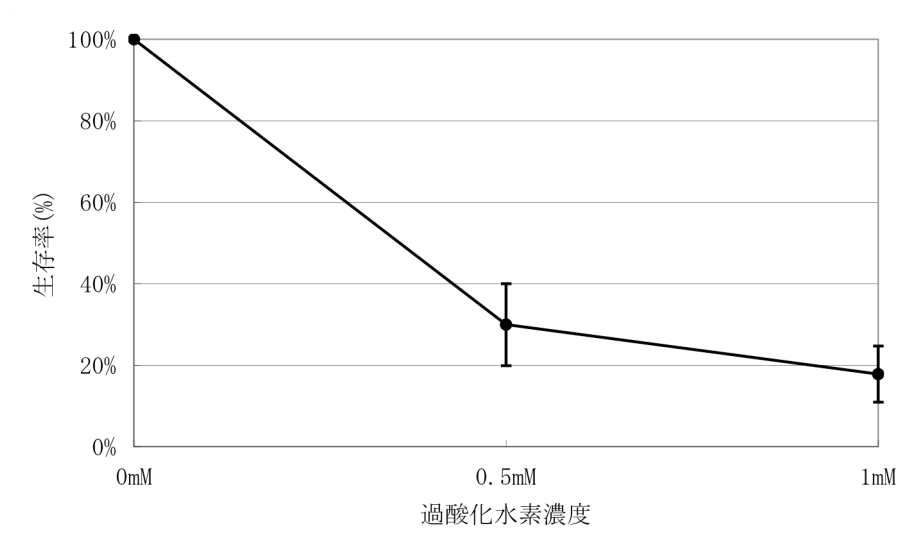


図 13 A) 過酸化水素処理による大腸菌の生存率の変化

大腸菌野生株に過酸化水素を 0mM (無処理)、0.5mM、1mM 処理した時の生存率を示した。無処理時の菌数を 100%とした時の相対的なパーセンテージを示している。これらの結果は 5 バッチの結果の平均値を示している。

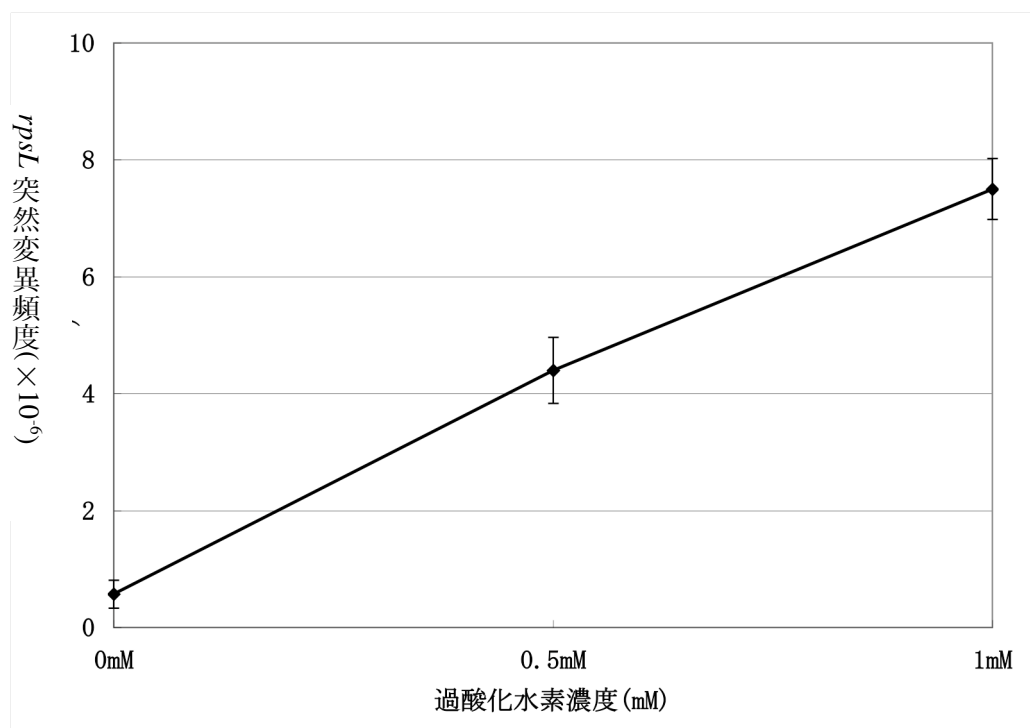


図 13 B) 過酸化水素処理による大腸菌 *rpsL* 突然変異頻度の変化

大腸菌野生株に過酸化水素を 0mM (無処理)、0.5mM、1mM 処理した時の *rpsL* 突然変異頻度の変化を示した。0.5mM の変異頻度は 2 バッチ、その他の変異頻度は 5 バッチの結果の平均値を示している。

3-2 $\Delta mutMY$ 株のミューテーター効果を用いた、過酸化水素処理による細胞内ヒドロキシラジカル濃度上昇の評価

これまでに細胞内の酸素ラジカル濃度を上昇させる方法として過酸化水素処理は良く用いられる手段である。過酸化水素処理により様々なタイプの変異が誘発される事から、細胞内で酸素ラジカルが上昇し、DNA 損傷を発生させている事が示唆されている。しかし、実際に *in vivo* において過酸化水素処理によりヒドロキシラジカルが上昇する事を示唆する報告は少ない。そこで今回用いた過酸化水素処理が細胞内のヒドロキシラジカル濃度の上昇に繋がるのかを確認する事を目的として $\Delta mutMY$ 株のミューテーター効果を指標とした実験を行った。その結果、 $\Delta mutMY$ 株に過酸化水素処理すると、過酸化水素無処理の大腸菌で誘発される *rpsL* 突然変異と比較して全体の変異頻度が 2.1 倍上昇した。さらに $\Delta mutMY$ 株の 8-oxoG に依存したミューテーター効果である GC→TA トランスバージョン型塩基置換変異も実験を行った全ての実験区で頻度の上昇が見られた (data not shown)。以上の結果から、過酸化水素処理により細胞内の 8-oxoG が上昇し、8-oxoG を発生する原因のヒドロキシラジカルが上昇したと考えた。

3-3 過酸化水素処理が及ぼす *rpsL* 突然変異頻度への影響

次に、実際に野生株において過酸化水素処理を行い、細胞内の酸素ラジカル濃度が上昇する事によって *rpsL* 突然変異頻度に差が見られるかについて解析を行った。

その結果、全体の突然変異頻度は 13 倍上昇していた (図 14)。また、この突然変異頻度の上昇は過酸化水素濃度依存的であった (図 13B)。これまでに過酸化水素処理を行う事により細胞内 DNA に酸化損傷が誘発される事が示唆されて来ており、これらの報告と一致する結果を得た。これらの報告では、様々な DNA 損傷修復欠損株や標的遺伝子を用い、どのタンパク質が過酸化水素処理による酸化的 DNA 損傷修復に関与するか、また過酸化水素処理によりどのような部位に変異が誘発されやすいかを中心に研究が進められて来た。酸化 DNA 損傷の修復メカニズムについては多くの事が明らかとなって来ているが、酸化損傷による変異部位については標的遺伝子によりその特徴が異なり、今回用いた *rpsL* 遺伝子での突然変異を他の遺伝子を用いた解析結果から予測する事は困難である。そこで過酸化水素処理を行って突然変異が誘発された *rpsL* 遺伝子のスペクトラム解析を行った。スペクトラム解析は酸素の存在に依存して誘発される突然変異が実際に酸素ラジカルに依存して誘発されるのか、さらに、過酸化水素処理により誘発される全ての突然変異の特徴を明らかにする事、以上の二点の観点から解析を行った。

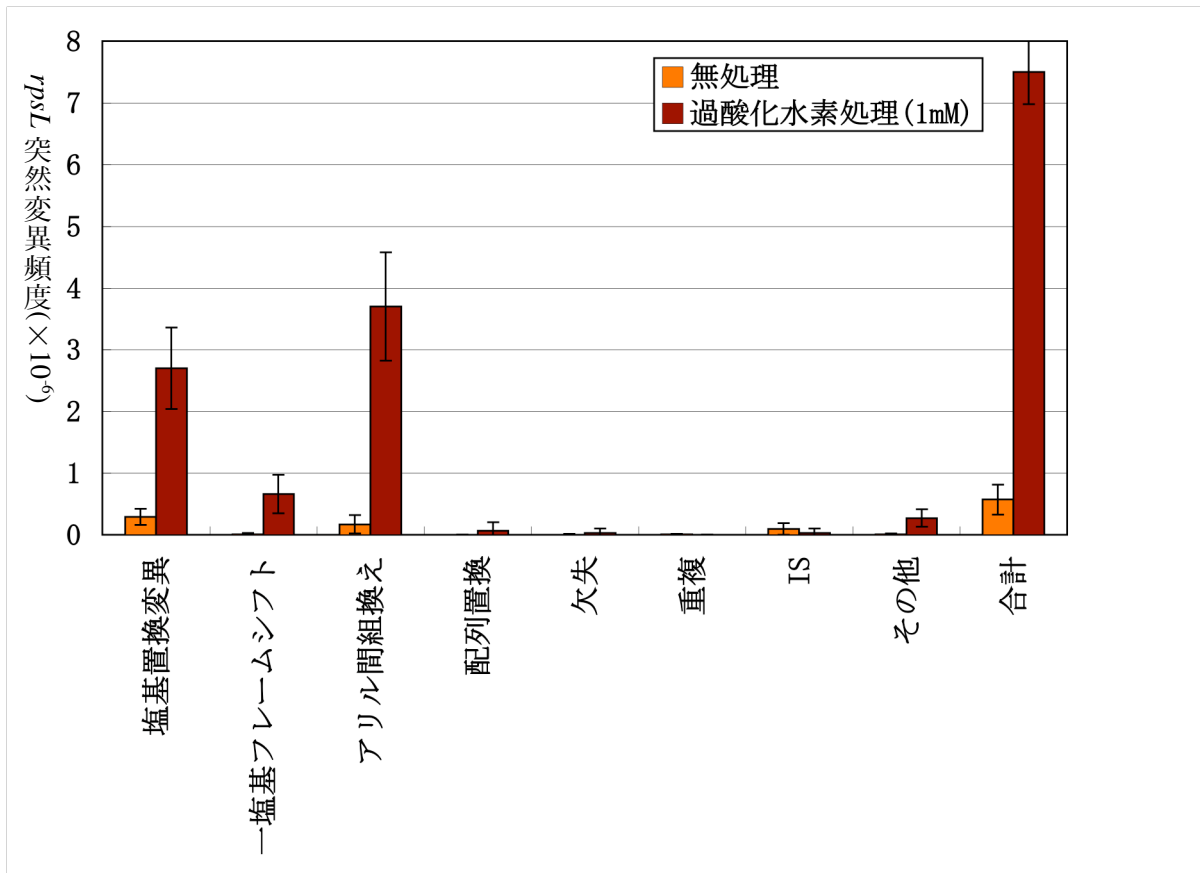


図 14 過酸化水素無処理および過酸化水素処理 (1mM) を行ったときに誘発される *rpsL* 突然変異の種類別変異頻度

過酸化水素無処理および過酸化水素処理を行った大腸菌野生株内で誘発される *rpsL* 突然変異の種類別変異頻度について示した。それぞれの実験区は独立した 5 実験区の平均を示している。また、エラーバーは SD 値を示している。

3-4 過酸化水素処理により誘発される *rpsL* 突然変異のスペクトラム解析

これまでの実験結果から、有酸素および嫌気培養時に検出される変異頻度を比較した結果、塩基置換変異（ホットスポット型（82C→A、245T→A、245T→G）、AT→TA、GC→CG）、フレームシフト変異（non-run での一塩基欠失）が酸素の存在に依存して変異が誘発されている事が示唆された。そこでこれらの変異が過酸化水素処理による細胞内の酸素ラジカル過剰条件下において、過酸化水素無処理と比較して *rpsL* 突然変異頻度が上昇するのかについて詳細な解析を行った。

その結果、アリル間組換え、塩基置換変異、一塩基フレームシフト変異、重複変異頻度が上昇していた(図 14)。特に検体数が多く有意な頻度上昇で最も顕著であったものはアリル間組換えであった。これらの特徴についてさらに詳細な解析を行った。

a) 塩基置換変異

野生株に過酸化水素処理(1mM)を行ったときに誘発される塩基置換変異を、過酸化水素処理を行わなかったときの突然変異頻度と比較した結果、82C→A、245T→G ホットスポットおよび AT→CG を除く全てのタイプの塩基置換変異頻度が上昇している事が明らかとなった(表 10A)。

245T→A は有酸素培養条件下では最もよく検出される変異であり、酸素の存在に依存して変異が誘発される事は前述している。この変異は過酸化水素処理により頻度が2倍上昇していた。この上昇率は他のタイプの塩基置換変異が大幅に上昇している事から一見、差が小さいように思われる。しかし、過酸化水素処理により最も頻度が上昇した GC→TA 変異でも一つの塩基部位あたりの頻度の上昇は 0.014×10^{-6} であり、この頻度上昇と比較して、245T→A 変異頻度の上昇である 0.19×10^{-6} は遥かに大きい(data not shown)。この事から、過酸化水素処理により細胞内で上昇した酸素ラジカルにより 245T→A ホットスポットが誘発される事が示唆された。

82C→A、245T→G ホットスポットおよび AT→CG が過酸化水素により変異が誘発されなかった理由として、二つの可能性が考えられた。一つはこれら三つの変異がヒドロキシラジカルに依存していない可能性である。二つ目の可能性は、過酸化水素処理の時間が30分と短く、これらの変異が誘発されるに十分な時間ではなかった事である。さらに、酸素の存在に依存して誘発されると考えられた AT→TA および GC→CG 変異は過酸化水素処理により頻度が上昇していた。以上の結果から、酸素に依存して誘発される変異のうち、245T→A ホットスポット、AT→TA と GC→CG トランスバージョン変異は過酸化水素処理によって上昇したヒドロキシラジカルに依存して誘発されている可能性が示唆された。

b) フレームシフト変異

野生株において過酸化水素処理を行った結果、無処理と比較してフレームシフト変異は66倍上昇していた(表10B)。これまでに有酸素および嫌気培養条件を用いた比較により、酸素の存在に依存して誘発される変異はnon-runの一塩基欠失である事が分かった。そこで、フレームシフト変異の詳細な解析を行った結果、non-runの一塩基欠失を含む、全てのタイプのフレームシフト変異頻度の上昇が、過酸化水素により見られた。この結果から、non-runの一塩基欠失変異は過酸化水素処理によって上昇したヒドロキシラジカルにより誘発される可能性が示唆された。また、他の変異を詳細に解析すると、過酸化水素処理を行わない状況で検出されるフレームシフト変異はそれぞれのタイプで変異頻度に大きな差は見られなかった。しかし、過酸化水素処理を行った結果、deletionに頻度の大きな偏りが見られた。この結果は、過酸化水素処理によりDNA中に生じた損傷が一塩基欠失を誘発するような損傷が多数発生する可能性を示唆していた。

表 10 過酸化水素無処理および過酸化水素処理により誘発される点突然変異

A) 塩基置換変異

		無処理	過酸化水素処理(1mM)
ホットスポット	82C→A	0.029	ND<0.023
	245 T→A	0.20(1)	0.39(2.0)
	245 T→G	0.015(1)	ND<0.023
トランジション	A:T→G:C	0.030(1)	0.25(8.3)
	G:C→A:T	ND<0.0029	0.62
トランスバージョン	G:C→T:A	0.0040(1)	0.77(190)
	G:C→C:G	ND<0.0029	0.28
	T:A→A:T	0.0051(1)	0.39(76)
	A:T→C:G	0.0091(1)	0.019(2.1)
合計		0.29(1)	2.7(9.3)

B) フレームシフト変異

		無処理	過酸化水素処理(1mM)
一塩基付加	at run	検出数/全検体数	1/4
		変異頻度(×10 ⁻⁶)	0.0017
	at non-run	検出数/全検体数	1/4
		変異頻度(×10 ⁻⁶)	0.0035
一塩基欠失	at run	検出数/全検体数	2/4
		変異頻度(×10 ⁻⁶)	0.0052
	at non-run	検出数/全検体数	0/4
		変異頻度(×10 ⁻⁶)	ND<0.0029
変異頻度合計		0.010	0.66

表 10 A) 過酸化水素無処理および処理時に野生株において検出される塩基置換変異を種類別に分類し、それぞれの変異頻度を示した。括弧内の数字は有酸素条件下で検出された変異頻度を 1 とした時の相対値を示している。ND で示した変異は検出されなかった事を示しており、不等号で表記している値は全実験検体数あたり一つ検出されたと想定した時の変異頻度である。

B) 過酸化水素無処理および処理時に野生株において検出されるフレームシフト変異を種類別に分類し、それぞれの全検体数あたりの検出数および、変異頻度を示した。括弧内の数字は有酸素条件下で検出された変異頻度を 1 とした時の相対値を示している。ND で示した変異は検出されなかった事を示しており、不等号で表記している値は全実験検体数あたり一つ検出されたと想定した時の変異頻度である。

c) アリル間組換え変異

有酸素と嫌気培養条件下におけるアリル間組換え頻度を比較した結果、予想と反して嫌気培養条件下において頻度が上昇する結果を得た。この結果から、嫌気培養条件下において組換え修復が必要な DNA 損傷が増加しているとの考察をしたが、実際に細胞内に複製を阻害するような DNA 損傷が発生した際に、アリル間組換え頻度が上昇するのかの確認を行った。

その結果、過酸化水素無処理と比較して、処理ではアリル間組換え頻度が 22 倍と大きく上昇していた(図 14)。これまでに、酸素ラジカルによって複製を止めるような損傷は複数知られている。これらの報告から、過酸化水素処理によりチミングリコールのような複製停止型の損傷が出来たと考えられた。また、この結果から、嫌気培養条件下で組換え頻度が上昇するのは複製停止型の損傷が増える可能性が支持されたと考えられた。

d) 欠失変異

欠失変異は過酸化水素処理により頻度が 8.8 倍上昇していた(図 14)。この結果はこれまでのシフト条件や最小培地を用いた酸素ラジカル上昇に伴う欠失変異頻度の上昇と一致している。このことから、酸素ラジカルに依存して欠失変異が増加する事が示唆された。

e) 重複および IS 変異

有酸素および嫌気培養条件下では重複、IS ともに嫌気培養条件下の方が、若干変異頻度が上昇していた(図 14)。しかし、過酸化水素処理によりこれらの変異頻度は上昇しなかった。この結果から、重複や IS を誘発する損傷は過酸化水素処理によって発生しない可能性が示唆された。

3-5 過酸化水素を用いた実験のまとめ

当研究室における報告から、有酸素培養条件下において誘発される *rpsL* 突然変異のうち、大きな割合を占める 245T→A ホットスポット型塩基置換変異は、酸素ラジカルの中でもヒドロキシラジカルが関与しているのではないかという考察がなされた。そこで本研究により大腸菌の細胞外から過酸化水素処理を行い、細胞内のヒドロキシラジカル濃度を上昇させる条件を作成して、実際にホットスポット変異の誘発にヒドロキシラジカルが関与するのかについて解析を行った。その結果、ほとんどのタイプの変異頻度が上昇していた。特にアリル間組換え型変異頻度は過酸化水素処理により大きく上昇していた。また過酸化水素処理によって、酸素に依存して誘発する事が示

された 245T→A ホットスポット変異、GC→CG、AT→TA、non-run の一塩基欠失フレームシフト変異頻度の上昇が見られた。この結果から、過酸化水素処理により細胞内で発生したヒドロキシラジカルは DNA を損傷し、複製を停止させるような DNA 損傷などを産生している事が示唆された。さらに 245T→A ホットスポット変異、GC→CG、AT→TA、non-run の一塩基欠失フレームシフト変異は有酸素培養条件下で生じるヒドロキシラジカルに依存して誘発される可能性が示唆された。

第四章 考察

1. 酸素ラジカルは自然突然変異に影響を与えるのか？

本研究の目的は自然突然変異の誘発に酸素ラジカルが関与するかを明らかにする事である。これまでに酸素ラジカルと DNA 損傷の関係について広く研究がなされてきた。細胞に酸素ラジカルを発生させる薬剤を用い、DNA にどのような傷が発生し、どのような変異が誘発されるか、またどのような修復タンパク質が関与するかを主流として研究が行われ、様々な事が明らかとなってきた。しかし過剰な ROS 存在下やミューテーター変異株で酸素ラジカルによる DNA 突然変異が誘発される事は報告されてきているが、実際に自然条件下で誘発される自然突然変異に酸素ラジカルがどの程度影響しているのかについての報告は無い。そこで本研究では自然突然変異と酸素ラジカルの関係を調べる方法として通常の有酸素培養と、嫌気条件下で生じる DNA 変異を比較した。

今回作成した完全嫌気培養の方法はこれまでになく、有酸素と嫌気培養の比較を行う事を初めて可能にした。この実験方法を用いると、*mutMmutY* 変異株のミューテーター効果がほぼ完全に抑制された事から、作成した嫌気培養が完全に無酸素である事を確認した。またこの研究から、確かに有酸素条件下では細胞内で 8-oxoG が発生しており、MutM と MutY タンパク質がそれを高い効率で修復している事が初めて明らかになった。この事をふまえて、有酸素および嫌気培養条件下で生育可能な大腸菌を用い、*rpsL* 遺伝子を標的遺伝子として実験を行った。また、比較実験として過酸化水素処理により細胞内の酸素ラジカルが過剰になる条件を作製した。さらに、当研究室において細胞内のヒドロキシラジカル濃度が上昇する *fur* 変異株を用いた解析も行われており、この結果も併せて比較を行った [43]。

これらの嫌気、有酸素、および酸素ラジカル過剰条件下で誘発される DNA 突然変異を比較した結果、245T→A ホットスポット、AT→TA、GC→CG 塩基置換変異さらに non-run における 1 塩基欠失フレームシフト変異が主に生理的条件下で生じるヒドロキシラジカルに依存している事が示唆された。これらの変異は自然突然変異全体の 46%と大半を占めており、自然条件下で誘発される突然変異に酸素ラジカルは影響を与えている可能性が示唆された。また一方で、無酸素および有酸素条件下で頻度に差が見られなかった変異が存在する事から酸素ラジカルに依存しないと考えられる変異も誘発されている事が示された。このような変異については後述する。しかし、他の遺伝子においても、自然突然変異の起源に酸化損傷がどの程度関与しているか、また酸素ラジカル以外の原因により誘発される突然変異の原因についてはさらなる検討が必要である。

2. 酸素ラジカル依存的に誘発される変異の原因

2-1 245T→A ホットスポット型塩基置換変異について

245T→A 変異は自然突然変異全体では 36%、さらに点突然変異全体では 70%を占める強力な突然変異であり、ヒドロキシラジカルにより変異が誘発される事が示唆された。しかし、有酸素条件下でホットスポット変異となる原因については現段階では明らかになっていない。245T→A がホットスポット変異として検出される理由として以下の可能性を考えた。

1. 変異抑制タンパク質は存在するが、修復を上回る損傷が発生する。
2. 修復タンパク質が存在しない。
3. 1 もしくは 2 により残った損傷が固定される際に、これまで知られている複製ポリメラーゼもしくは損傷乗り越え修復ポリメラーゼが関与する。

まず、1 および 2 の可能性を検討する為に、当研究室で解析を行っている塩基除去修復 (MutM、MutY タンパク質) やミスマッチ修復 (MutS タンパク質)、ヌクレオチド除去修復 (UvrABC) などの修復機構が 245T→A を抑制出来るかを比較した。その結果、これらの修復機構は変異抑制に関与していない事が明らかとなった (unpublished data)。また、細胞内で比較的高頻度に発生する 8-oxoG は、MutM や MutY タンパク質により 99.99%以上の効率で抑制される結果を得ている (data not shown) 事から、損傷が多すぎて修復が追いつかない可能性は排除出来ると考えた。これらの結果から、245T→A を誘発する損傷に対する修復機構は存在しない可能性も示唆された。しかし、高頻度で発生する損傷が修復されずに 245T→A が生じたとすると、検出されるほとんどの変異が 245T→A に偏るはずである。今回、野生株で 245T→A 変異が誘発される割合は、全体の変異頻度から算出して 35%であり、割合としては多いものの大部分を占めていると言う訳ではない。そのため、もし特異的な修復系が存在しないのであれば、損傷の発生自体はあまり高頻度ではなく、むしろ低頻度の部類であろうと予想した。

一方、245T→A は *fur* 変異および過酸化水素処理により頻度の上昇が見られる。しかし、過酸化水素処理濃度を 1mM 以上処理しても、一定濃度で頻度上昇は止まる (data not shown)。さらに、*fur* 変異株にさらに過酸化水素処理を行っても、無処理と比較して頻度上昇は見られなかった (data not shown)。このように細胞内の酸素ラジカル濃度上昇に伴い際限なく頻度上昇が見られる訳ではない。以上の結果から、245T→A を誘発する原因は、生じる損傷としては比較的マイナーな損傷であり、過酸化水素と鉄イオンの他に、頻度上昇を制限する因子が存在している可能性が示唆された。

次に、3 の可能性を検討する為に、どのポリメラーゼが 245T→A 変異の固定に重要であるかと言う観点から、当研究室で行われた様々なポリメラーゼ変異株の解析結果を比較した。その結果、これまで知られている Pol II、Pol IV や Pol V を含む損傷乗り越え修復タンパク質はこのホットスポット変異の誘発や抑制に関与していない結果

が出ている(蟹江ら, unpublished data)。しかし、損傷が変異として固定されるにはエラープロンな DNA ポリメラーゼの関与は濃厚であると考えた。これまでにエラープロンポリメラーゼである損傷乗り越え修復タンパク質は、RecA タンパク質が関与する SOS 誘導により発現が上昇する事が知られている。そこで、過酸化水素処理による SOS 誘導により発現が誘導されるポリメラーゼが 245T→A ホットスポットの変異誘発に関与するのではないかと推測した。そこで *recA* 変異株に過酸化水素処理を行い、損傷は増えるが SOS 誘導は起こらない条件下において 245T→A 変異頻度が上昇するかについて実験を行なった。その結果、1mM の過酸化水素処理を行っても 245T→A の頻度に差は見られなかった(data not shown)。この結果から、245T→A 変異を固定するポリメラーゼは SOS 応答の下流には存在しないタンパク質である可能性が残された。以上の結果から、SOS 応答の下流に存在しない、DNA ポリメラーゼ I あるいは III、さらにはこれまでに知られていないポリメラーゼが 245T→A 変異の固定に関与する可能性が残された。

また、どのような損傷によりホットスポット変異が誘発されるのかについても明らかとなっていない。これまでに当研究室において 245T→A ホットスポットが誘発される配列である GATC を GAAC に塩基置換を導入した結果、ホットスポット変異が誘発されない結果を得ている[愿山 unpublished data]。元の配列である GATC はアデニンにメチル化を受ける部位であり、メチルアデニンがヒドロキシラジカル依存的に損傷を受けたときに、未知の損傷が生じ、ホットスポット変異になる可能性も考えられた。

以上の考察から、高い頻度で発生する DNA 損傷については、細胞は防御機構や変異抑制機構を発達させてきたが、逆に低い頻度でしか発生しない DNA 損傷については、その修復機構が発達しなかった可能性が考えられた。また、245T→A ホットスポット変異はこれまでに知られている修復酵素が修復できない損傷によって誘発され、複製酵素あるいは未知の TLS タンパク質により変異として固定される可能性が示唆された。

2-2 その他のホットスポット変異について

また、245T→A 以外の酸素依存的に誘発される 82C→A、245T→G ホットスポット変異の原因についても現在の段階では明らかでない。これらの変異は過酸化水素処理および *fur* 変異によって変異頻度は上昇しなかった。この結果から、ヒドロキシラジカル以外の酸素ラジカルによりこれらの変異が誘発される可能性が考えられた。また、この二つの変異がどのような損傷によって誘発されるのかについても明らかではない。本研究において 82C→A および 245T→G 変異はそれぞれ $\Delta mutMY$ 株および $\Delta mutMY$ 株において野生株と比較して頻度の上昇が見られた(それぞれ 6 倍、100 倍)。しかし、MutM や MutY および MutT タンパク質の修復効率は今全て 99%以上であり、さらに 82C→A や 245T→G 変異はそれぞれの変異株において他の部位と同程度の割合で誘発されてい

た。この結果から、82C→A や 245T→G に特に多くの損傷が生じている訳ではなく、MutM などのタンパク質が修復を取りこぼした可能性は否定出来ると考えた。この結果から、有酸素条件下において 82C→A や 245T→G がホットスポット変異となる原因は 8-oxoG や 8-oxodGTP 以外の原因で誘発されると考えられた。これまでに当研究室における解析から、これらの変異誘発には酸化的損傷の中でもスーパーオキシドや、糖代謝の中間産物であるグリコールアルデヒドの酸化体（グリオキサール）が関与する可能性が示唆されている。245T→G の変異頻度は、スーパーオキシドを除去できない変異株 (Δ *sodAB*) では野生株と比較して約 4 倍上昇していた[43]。また、82C→A については野生株にグリコールアルデヒドを添加すると変異頻度が約 4 倍上昇した[48]。これらの報告から、ホットスポットとなる原因はヒドロキシラジカルのみではなく、様々な酸素ラジカルの高い反応性により変異が誘発されると考えられた。

2-3 ホットスポット以外で誘発される点突然変異について

GC→CG、AT→TA トランスバージョン塩基置換変異、そして non-run での一塩基欠失フレームシフト変異はホットスポット変異とは異なりその誘発部位はランダムであった。この結果から、ホットスポット変異とは異なり、周辺配列に依存して誘発されやすいという事は無く、*rpsL* 遺伝子以外の遺伝子上でもこれらの変異が酸素ラジカル依存的に誘発される可能性が示唆された。

3. 酸素ラジカルに依存しない変異について

以上のように、自然突然変異に酸素ラジカルによる損傷が関与している事が示唆されたが、一方で酸素ラジカルに依存しない変異も自然突然変異の原因である可能性も示唆された。酸素ラジカルに依存しない損傷には二つの可能性が考えられた。一つは、無酸素特異的な損傷が発生している可能性である。有酸素培養と比較して嫌気培養では、一塩基フレームシフトや欠失、重複変異など変異頻度が上昇している変異が複数検出されている。また無酸素条件下では allelic recombination も顕著に上昇していた。この原因の一つにニトロソ化因子による DNA のアルキル化や脱アミノが可能性の一つとして考えられる。これまでに酸素濃度が低くなる stationary phase でニトロソ化因子による損傷が起こる可能性が示唆されてきた。しかし、ニトロソ化因子の関与を示唆するにはさらなる研究が必要である。また、このように無酸素条件下に特異的な損傷が発生している場合、有酸素と無酸素で同じ、もしくは無酸素培養時の方が高い変異頻度で検出されるような変異については、無酸素と有酸素でそれらの変異の誘発原因が異なる可能性も考えられる。そのため、このような変異は酸素ラジカルに依存していないとは断定できない。もう一つの可能性は、有酸素条件下で発生する酸素ラジカル以外の損傷が存在する可能性である。これまでに我々は自然突然変異の誘発原因について様々な研究を行ってきたが、複製エラーやエラープローンな損傷乗り越え修復が自然突然変異に関与しない事が明らかになっているため、それ以外の何らかの原因で突然変異が誘発される事が予想された。これら二つの片方あるいは両方の可能性が、酸素ラジカル以外による自然突然変異の原因であると考えられた。

今回の結果は大腸菌 *rpsL* 遺伝子を用いた結果であるが、*rpsL* 遺伝子で検出されたホットスポットを含む複数の塩基置換変異、non-run での一塩基欠失フレームシフト変異になりうる配列は *rpsL* 遺伝子以外にも複数存在する事は想像できる。そのため、DNA 領域全体で酸素ラジカルが修復困難な損傷を引き起こし、自然突然変異の原因になる事はあり得る事であると考えている。この結果により、酸素呼吸獲得が突然変異を誘発し進化の起爆剤となった可能性や、呼吸依存的な突然変異の蓄積が老化に伴う疾患に関与する事を強く示唆する事が出来ると考えている。

4. 今後の展望

まず、*rpsL* 遺伝子において酸素ラジカルが自然突然変異に影響する事を報告したが、他の遺伝子についてもこの結果が得られるのかを確認する必要がある。これまでに主に塩基置換変異の検出を行う事の出来る *rpoB* 遺伝子を標的とした解析を有酸素および無酸素条件下において行ったが、バッチ毎の頻度の振れ幅が大きく、さらに無酸素条件下では頻度が低く薬剤添加プレートに生育しないバッチも存在した(data not shown)。そのため、*supF* 遺伝子など他の標的遺伝子を用いた解析

を行う必要がある。

さらに、245T→Aの原因についての追及も必要であると考えている。前述したように、245T→Aの原因として現段階ではメチルアデニンが関与しているのではないかと予想している。そこでメチル化を行う事が出来ない *dam* 欠損株を用いた解析が当研究室で行われた[45]。しかし、*dam* 欠損株ではミスマッチ修復が新生鎖と鋳型鎖の区別が出来ず、アリル間組換え変異が高頻度に誘発される事から、ホットスポット変異はほとんど検出されず、頻度の測定を行う事が出来なかった。そこで、*dam* 変異株の解析規模を拡大し 245T→Aの原因について追求する必要がある。

また、完全嫌気培養条件下においてアリル間組換えが上昇した事も興味深い結果である。低酸素条件下では酸素の代わりに窒素が電子受容体になる事が報告されている。電子を受け取った窒素はDNAをニトロソ化する可能性も報告されていることから、無酸素条件下ではDNAのニトロソ化による損傷は組換え修復により修復されている可能性が示唆された。また、ニトロソ化されたDNAはEndIVヌクレアーゼタンパク質(*nfo*がコード)によって修復される事も知られている。そこで、無酸素条件下において実際にDNAのニトロソ化が生じているのかについて、*nfo* 欠損株を用いた解析を行う必要がある。

最後に、これまでの無酸素培養の解析では、細胞外の酸素を除去する事で細胞内の酸素ラジカルを消去していた。しかし、実際に呼吸依存的に生じた酸素ラジカルによりDNAが損傷されるのかについてはまだ確定は出来ないと考えた。そこで、生理的濃度の過酸化水素を消去出来るアルキルヒドロキシペルオキシダーゼ(AhpCF)を過剰発現させ、細胞内の酸素ラジカルを限界まで抑制しようと試みた(data not shown)。しかしながら、AhpCFタンパク質を過剰発現させた $\Delta mutMY$ 株のミューター効果は過剰発現をしなかった $\Delta mutMY$ 株と比較して頻度は減少しない事が明らかとなった。また野生株においてAhpCFの過剰発現を行い、スペクトラム解析を行った結果、過剰発現を行わなかった野生株と比較して全ての変異において差は見られなかった。この結果から、AhpCFタンパク質の過剰発現では細胞内の酸素ラジカル除去は出来ない可能性が考えられた。今後は、医学などに応用する観点からも生体内の酸素ラジカルを抑制出来る方法について検討を行って行く必要があると考えられた。

第四章 付録表、参考文献

付録表

表：本研究において解析を行った実験結果について表に示した。*rpsL* 遺伝子上で検出された変異の個数と、それぞれの変異の種類別変異頻度を示している。ND は検出されなかったことを示している。赤で示した数字はシスター変異が検出されたことを示しており、数字はシスター変異を排除した後の変異頻度を示している。

図：*rpsL* 遺伝子上で誘発された変異の変異スペクトラムを示した。配列は *rpsL* 遺伝子を示しており、配列中の下線はプロモーター領域(-35、-10 配列)、SD 配列、開始配列、終結配列を示している。各実験区は色に分けて表記した。

参考表 1 有酸素培養条件下において大腸菌野生株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

有酸素野生株の変異の種類別検出数と変異頻度

各実験区の*rpsL*前導突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Ave
Mutation frequency(×10 ⁻⁶)	1.0	1.4	1.3	0.32	0.63	0.45	0.85

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored							Mutation frequency(×10 ⁻⁶)						ave ± SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Total	#1	#2	#3	#4	#5	#6	
組換え型														
1点型(128A→C)	0	18	2	4	2	16	42	ND	0.26	0.027	0.013	0.013	0.075	0.065 ± 0.10
2点型(-22G→A,128A→C)	37	10	8	38	19	11	123	0.39	0.15	0.11	0.13	0.12	0.052	0.16 ± 0.12
塩基置換														
ホットスポット1(82C→A)	0	0	0	0	0	0	0	0.010	0.015	0.014	0.0033	0.026	0.014	0.014 ± 0.0074
ホットスポット2(245T→A)	0	0	0	0	0	0	0	0.19	0.34	0.31	0.14	0.16	0.10	0.21 ± 0.0954
ホットスポット3(245T→G)	0	0	0	0	0	0	0	ND	0.015	0.027	0.0033	0.013	0.023	0.014 ± 0.0107
上記以外	0	0	0	0	0	0	0	0.052	0.088	0.095	0.0067	0.040	0.028	0.051 ± 0.0610
1塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	0	0.031	0.015	0.041	0.0033	0.020	0.014	0.021 ± 0.013
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換	2	0	0	0	0	0	2	0.021	ND	ND	ND	ND	ND	0.0035 ± 0.0085
欠失														
タイプ1(dr)	3	0	1	0	1	3	8	0.031	ND	0.014	ND	0.0066	0.014	0.011 ± 0.012
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	1	1	ND	ND	ND	ND	ND	0.0047	0.00078 ± 0.0019
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
未同定	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
重複														
クラス1	0	0	0	0	0	2	2	ND	ND	ND	ND	ND	0.0094	0.0016 ± 0.0038
クラス2	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS														
IS1	2	0	0	2	3	1	8	0.021	ND	ND	0.0067	0.020	0.0047	0.0086 ± 0.0094
IS5	0	4	0	2	2	0	8	ND	0.058	ND	0.0067	0.013	ND	0.013 ± 0.023
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	4	1	0	0	0	1	6	0.042	0.015	ND	ND	ND	0.0047	0.010 ± 0.016
変異なし	0	0	0	0	2	0	2	ND	ND	ND	ND	0.013	ND	0.0022 ± 0.0054
Total	96	96	96	96	96	96	576	0.78	0.95	0.64	0.31	0.45	0.35	0.58 ± 0.25

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored							Mutation frequency(×10 ⁻⁶)						ave ± SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Total	#1	#2	#3	#4	#5	#6	
Transition														
A:T→G:C	0	0	2	0	1	0	3	0	0	0.027	0	0.0066	0	0.0056 ± 0.011
G:C→A:T	1	0	4	0	2	1	8	0.010	0	0.054	0	0.013	0.0047	0.014 ± 0.021
total	1	0	6	0	3	1	11	0.010	0	0.081	0	0.020	0.0047	0.019 ± 0.031
Transversion														
G:C→T:A	1	2	0	0	0	0	3	0	0.029	0	0	0	0	0.0066 ± 0.0118
G:C→C:G	0	3	1	2	0	0	6	0	0.044	0.014	0.0067	0	0	0.011 ± 0.017
T:A→A:T	3	0	0	0	2	4	9	0.031	0	0	0	0.013	0.019	0.011 ± 0.013
A:T→C:G	0	1	0	0	1	1	3	0	0.015	0	0	0.0066	0.0047	0.0043 ± 0.0058
total	4	6	1	2	3	5	21	0.042	0.088	0.014	0.0067	0.020	0.023	0.032 ± 0.030
Hot spot														
82C→A	1	1	1	1	4	3	11	0.010	0.015	0.014	0.0033	0.026	0.014	0.014 ± 0.0074
245 T→A	18	23	23	42	24	22	152	0.19	0.34	0.31	0.14	0.16	0.10	0.21 ± 0.095
245 T→G	0	1	2	1	2	5	11	0	0.015	0.027	0.0033	0.013	0.023	0.014 ± 0.0107
total	19	25	26	44	30	30	174	0.20	0.36	0.35	0.15	0.20	0.14	0.23 ± 0.10
Total	24	31	33	46	36	36	206	0.25	0.45	0.45	0.15	0.24	0.17	0.28 ± 0.13

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored							Mutation frequency(×10 ⁻⁶)						ave ± SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Total	#1	#2	#3	#4	#5	#6	
Addition														
at run	2	0	0	0	1	2	5	0.021	0	0	0	0.0066	0.0094	0.0061 ± 0.0082
at non-run	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ± 0
total	2	0	0	0	1	2	5	0.021	0	0	0	0.0066	0.0094	0.0061 ± 0.0082
Deletion														
at run	0	1	0	0	2	1	4	0.0000	0.015	0	0	0.013	0.0047	0.0054 ± 0.0068
at non-run	1	0	3	1	0	0	5	0.010	0	0.041	0.0033	0	0	0.0091 ± 0.016
total	1	1	3	1	2	1	9	0.010	0.015	0.041	0.0033	0.013	0.0047	0.014 ± 0.014
Total	3	1	3	1	3	3	14	0.031	0.015	0.041	0.0033	0.020	0.014	0.021 ± 0.013

参考表 2 有酸素培養条件下において大腸菌 $\Delta mutMY$ 株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

本実験有酸素mutMY変異株の変異の種類別検出数と変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	Ave
Mutation frequency($\times 10^{-6}$)	6.2	11	12	5.3	6.1	8.1

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave \pm SD
組換え型												
1点型(128A \rightarrow C)	0	0	1	0	1	2	ND	ND	0.13	ND	0.064	0.038 \pm 0.056
2点型(-22G \rightarrow A,128A \rightarrow C)	1	1	1	1	0	4	0.065	0.11	0.13	0.055	ND	0.072 \pm 0.050
塩基置換												
ホットスポット1(82C \rightarrow A)	2	1	3	2	1	9	0.13	0.11	0.38	0.11	0.06	0.16 \pm 0.12
ホットスポット2(245T \rightarrow A)	9	2	5	5	4	25	0.58	0.23	0.63	0.28	0.25	0.39 \pm 0.19
ホットスポット3(245T \rightarrow G)	0	1	0	0	0	1	ND	0.11	ND	ND	ND	0.023 \pm 0.051
上記以外	75	74	84	83	78	394	4.8	8.5	11	4.6	5.0	6.7 \pm 2.7
1塩基フレームシフト	7	6	0	1	5	19	0.45	0.69	ND	0.055	0.32	0.30 \pm 0.28
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
欠失												
タイプ1(dr)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
未同定	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
重複												
クラス1	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS												
IS1	0	2	0	0	1	3	ND	0.23	ND	ND	0.064	0.059 \pm 0.10
IS5	0	0	0	0	1	1	ND	ND	ND	ND	0.064	0.013 \pm 0.028
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND \pm 0.00
トランスポゾン	1	7	2	3	3	16	0.065	0.80	0.25	0.17	0.19	0.29 \pm 0.29
その他	1	2	0	1	2	6	0.06	0.23	ND	0.06	0.13	0.10 \pm 0.09
変異なし	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	96	96	96	96	96	480	6.2	11	12	5.3	6.1	8.1 \pm 3.1

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave \pm SD
Transition												
A:T \rightarrow G:C	0	2	0	1	0	3	ND	0.23	ND	0.055	ND	0.057 \pm 0.10
G:C \rightarrow A:T	0	0	1	1	1	3	ND	ND	0.13	0.055	0.064	0.049 \pm 0.052
total	0	2	1	2	1	6	ND	0.23	0.13	0.11	0.064	0.11 \pm 0.08
Transversion												
G:C \rightarrow T:A	72	72	83	80	77	384	4.7	8.3	10	4.42	4.89	6.5 \pm 2.7
G:C \rightarrow C:G	0	0	0	1	0	1	0.00	ND	ND	0.055	ND	0.011 \pm 0.025
T:A \rightarrow A:T	0	0	0	0	0	0	0.00	ND	ND	ND	ND	ND
A:T \rightarrow C:G	1	0	0	0	0	1	0.06	ND	ND	ND	ND	0.01 \pm 0.03
total	73	72	83	81	77	386	4.7	8.3	10	4.5	4.9	6.5 \pm 2.6
Hot spot												
82C \rightarrow A	2	1	0	2	1	6	0.13	0.11	ND	0.11	0.064	0.084 \pm 0.053
245 T \rightarrow A	10	2	0	5	4	21	0.65	0.23	ND	0.28	0.25	0.28 \pm 0.23
245 T \rightarrow G	0	1	0	0	0	1	ND	0.11	ND	ND	ND	0.023 \pm 0.051
total	12	4	0	7	5	28	0.78	0.46	ND	0.39	0.32	0.39 \pm 0.28
Total	85	78	84	90	83	420	5.49	8.9	11	5.0	5.3	7.0 \pm 2.5

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave \pm SD
Addition												
at run	0	3	0	0	1	4	ND	0.34	ND	ND	0.06	0.081 \pm 0.15
at non-run	0	2	0	0	4	6	ND	0.23	ND	ND	0.25	0.10 \pm 0.13
total	0	5	0	0	5	10	ND	0.57	ND	ND	0.32	0.18 \pm 0.26
Deletion												
at run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
at non-run	6	1	0	1	0	8	0.39	0.11	ND	0.055	ND	0.11 \pm 0.16
total	6	1	0	1	0	8	0.39	0.11	ND	0.055	ND	0.11 \pm 0.16
Total	6	6	0	1	5	18	0.39	0.69	ND	0.055	0.32	0.29 \pm 0.28

参考図 2A) 塩基置換変異



参考図 2B) フレームシフト変異



参考表 3 有酸素培養条件下において大腸菌 $\Delta mutT$ 株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

有酸素 $\Delta mutT$ の変異の種類別検出数と変異頻度

各実験区の *rpsL* 前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	Ave
Mutation frequency($\times 10^{-6}$)	39	29	76	51	59	51

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave \pm SD
組換え型												
1点型(128A \rightarrow C)	17	7	6	17	4	51	6.9	2.1	4.8	9.0	2.5	5.1 \pm 2.9
2点型(-22G \rightarrow A,128A \rightarrow C)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
塩基置換												
ホットスポット1(82C \rightarrow A)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ホットスポット2(245T \rightarrow A)	1	3	0	1	2	7	0.41	0.91	ND	0.53	1.23	0.61 \pm 0.47
ホットスポット3(245T \rightarrow G)	26	8	3	1	2	40	11	2.4	2.4	0.53	1.2	3.4 \pm 4.1
上記以外	51	78	87	76	87	379	21	24	69	40	53	41 \pm 20
1塩基フレームシフト												
1塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2塩基フレームシフト												
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換												
配列置換	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
欠失												
タイプ1(dr)	0	0	0	1	0	1	ND	ND	ND	0.53	ND	0.11 \pm 0.24
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
未同定	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
重複												
クラス1	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS												
IS1	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS5	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	1	0	0	0	1	2	0.41	ND	ND	ND	0.61	0.20 \pm 0.29
変異なし	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	96	96	96	96	96	480	39	29	76	51	59	51 \pm 18

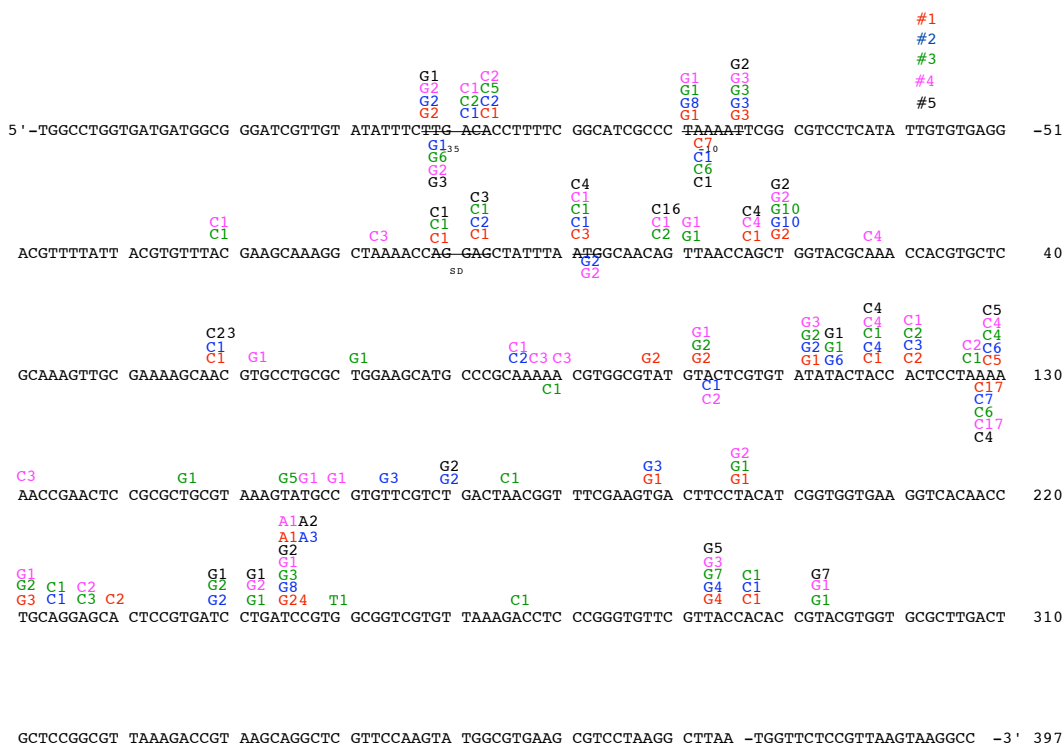
Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave \pm SD
Transition												
A:T \rightarrow G:C	0	0	1	1	0	2	ND	ND	0.79	0.53	ND	0.26 \pm 0.37
G:C \rightarrow A:T	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	0	0	1	1	0	2	ND	ND	0.79	0.53	ND	0.26 \pm 0.37
Transversion												
G:C \rightarrow T:A	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G:C \rightarrow C:G	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T:A \rightarrow A:T	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A:T \rightarrow C:G	51	78	86	75	87	377	21	24	68	40	53	41 \pm 20
total	51	78	86	75	87	377	21	24	68	40	53	41 \pm 20
Hot spot												
82C \rightarrow A	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
245 T \rightarrow A	1	3	0	1	2	7	0.41	0.91	ND	0.53	1.23	0.61 \pm 0.47
245 T \rightarrow G	26	8	3	1	2	40	11	2.4	2.4	0.5	1.2	3.4 \pm 4.1
total	27	11	3	2	4	47	11	3.3	2.4	1.1	2.5	4.0 \pm 4.0
Total	78	89	90	78	91	426	32	27	71	41	56	45 \pm 18

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave \pm SD
Addition												
at run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Deletion												
at run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND

参考図 3A)塩基置換変異



参考表 4 アネロパック嫌気培養条件下において大腸菌野生株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

無酸素→有酸素野生株(LB)の変異の種類別検出数と変異頻度

各実験区の *rpsL* 前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	Ave
Mutation frequency($\times 10^{-6}$)	0.62	0.82	1.3	0.91

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
組換え型								
1点型(128A→C)	20	20	13	53	0.43	0.55	0.56	0.51 \pm 0.074
2点型(-22G→A,128A→C)	1	4	3	8	0.021	0.11	0.13	0.087 \pm 0.058
塩基置換								
ホットスポット1(82C→A)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
ホットスポット2(245T→A)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
ホットスポット3(245T→G)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
上記以外	2	1	8	11	0.043	0.027	0.35	0.14 \pm 0.18
1塩基フレームシフト	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
欠失								
タイプ1(dr)	0	1	0	1	ND	0.027	ND	0.0091 \pm 0.016
タイプ2(ir)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
未同定	2	2	0	4	0.043	0.055	ND	0.032 \pm 0.029
重複								
クラス1	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
クラス2	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
IS								
IS1	0	1	4	5	ND	0.027	0.17	0.067 \pm 0.093
IS5	2	0	0	2	0.043	ND	ND	0.014 \pm 0.025
1.2kIS	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
その他	2	1	2	5	0.043	0.027	0.087	0.052 \pm 0.031
変異なし	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Total	29	30	30	89	0.62	0.82	1.3	0.91 \pm 0.35

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
Transition								
A:T→G:C	1	0	5	6	0.021	ND	0.22	0.079 \pm 0.12
G:C→A:T	1	1	3	5	0.021	0.027	0.13	0.060 \pm 0.061
total	2	1	8	11	0.043	0.027	0.35	0.14 \pm 0.18
Transversion								
G:C→T:A	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
G:C→C:G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
T:A→A:T	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
A:T→C:G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Hot spot								
82C→A	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
245 T→A	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
245 T→G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Total	2	1	8	11	0.043	0.027	0.35	0.14 \pm 0.18

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
Addition								
at run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Deletion								
at run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND

参考図 4 様々な変異

-O2→+O2・LB・WT塩基置換、欠失変異



参考表 5 アネロパック嫌気培養条件下において大腸菌 $\Delta mutMY$ 株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

無酸素→有酸素 $\Delta mutMY$ 変異株(LB)の変異の種類別検出数と変異頻度

各実験区の *rpsL* 前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	Ave
Mutation frequency($\times 10^{-6}$)	360	270	350	327

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
組換え型								
1点型(128A→C)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
2点型(-22G→A,128A→C)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
塩基置換								
ホットスポット1(82C→A)	1	1	2	4	12	8.7	23	15 \pm 7.7
ホットスポット2(245T→A)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
ホットスポット3(245T→G)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
上記以外	29	29	26	84	348	253	303	301 \pm 48
1塩基フレームシフト	0	1	0	1	ND	8.7	0	2.9 \pm 5.0
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
欠失								
タイプ1(dr)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
タイプ2(ir)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
未同定	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
重複								
クラス1	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
クラス2	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
IS								
IS1	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
IS5	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
1.2kIS	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	2	2	ND	ND	23	8 \pm 13
変異なし	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Total	30	31	30	91	360	270	350	327 \pm 49

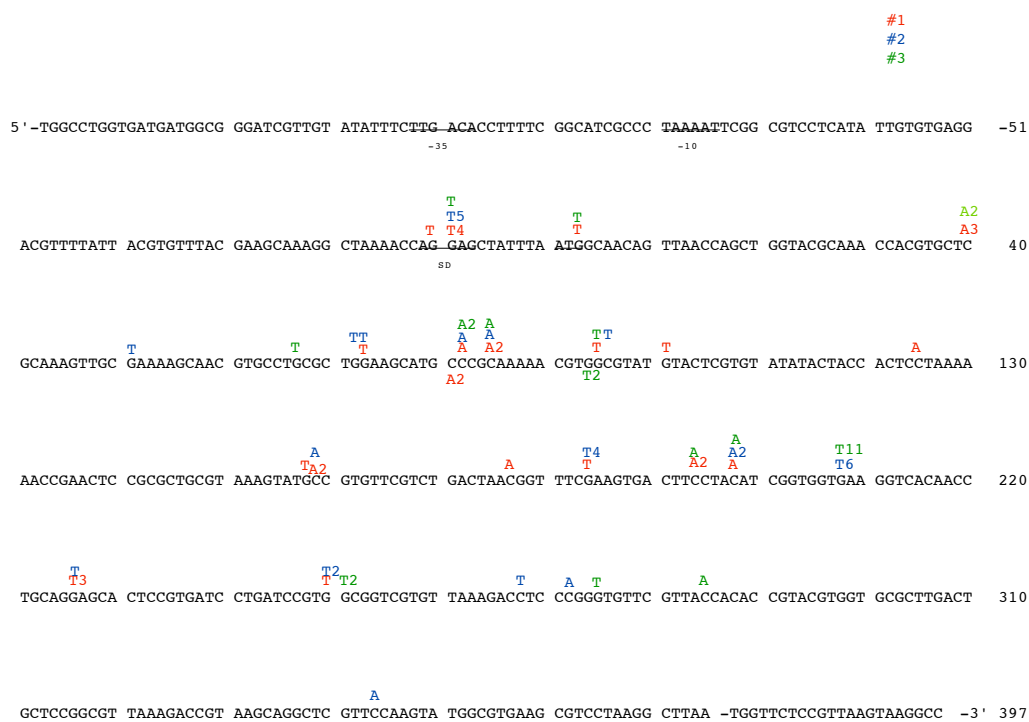
Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
Transition								
A:T→G:C	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
G:C→A:T	0	1	0	1	ND	8.7	ND	2.9 \pm 5.0
total	0	1	0	1	ND	8.7	ND	2.9 \pm 5.0
Transversion								
G:C→T:A	29	28	26	83	348	244	303	298 \pm 52
G:C→C:G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
T:A→A:T	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
A:T→C:G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	29	28	26	83	348	244	303	298 \pm 52
Hot spot								
82C→A	1	1	2	4	12	8.7	23	15 \pm 7.7
245 T→A	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
245 T→G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	1	1	2	4	12	8.7	23	15 \pm 7.7
Total	30	30	28	88	360	261	327	316 \pm 50

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
Addition								
at run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Deletion								
at run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	1	0	1	ND	8.7	ND	2.9 \pm 5.0
total	0	1	0	1	ND	8.7	ND	2.9 \pm 5.0
Total	0	1	0	1	ND	8.7	ND	2.9 \pm 5.0

参考图 5 塩基置換変異



参考表 6 最小培地を用いた有酸素において大腸菌 $\Delta mutT$ 株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

有酸素（最小培地）野生株の変異の種類別検出数と変異頻度

各実験区の*rpsL*前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	Ave
Mutation frequency($\times 10^{-6}$)	1.2	0.72	0.93	0.95

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
組換え型								
1点型(128A→C)	3	6	5	14	0.16	0.36	0.24	0.25 \pm 0.10
2点型(-22G→A,128A→C)	1	0	3	4	0.052	ND	0.15	0.066 \pm 0.074
塩基置換								
ホットスポット1(82C→A)	0	1	0	1	ND	0.060	ND	0.020 \pm 0.035
ホットスポット2(245T→A)	0	1	0	1	ND	0.0600	ND	0.020 \pm 0.035
ホットスポット3(245T→G)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
上記以外	3	3	3	13	0.052	0.18	0.15	0.13 \pm 0.066
1塩基フレームシフト	1	0	0	1	0.052	ND	ND	0.017 \pm 0.030
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
欠失								
タイプ1(dr)	1	0	2	7	0.052	ND	0.099	0.050 \pm 0.033
タイプ2(ir)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
未同定	1	0	0	1	0.052	ND	ND	0.017 \pm 0.030
重複								
クラス1	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
クラス2	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
IS								
IS1	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
IS5	3	0	0	3	0.16	ND	ND	0.052 \pm 0.090
1.2kIS	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
その他	6	1	2	9	0.31	0.060	0.098	0.16 \pm 0.14
変異なし	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Total	23	12	19	54	0.89	0.72	0.74	0.78 \pm 0.092

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
Transition								
A:T→G:C	0	0	1	1	ND	ND	0.049	0.016 \pm 0.028
G:C→A:T	1	3	1	9	0.052	0.18	0.049	0.094 \pm 0.075
total	5	3	2	10	0.052	0.18	0.10	0.11 \pm 0.065
Transversion								
G:C→T:A	1	0	1	2	0.052	ND	0.049	0.034 \pm 0.0023
G:C→C:G	1	0	0	1	0.052	ND	ND	0.017 \pm 0.030
T:A→A:T	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
A:T→C:G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	2	0	1	3	0.10	ND	0.049	0.051 \pm 0.039
Hot spot								
82C→A	0	1	0	1	ND	0.060	ND	0.020 \pm 0.035
245 T→A	0	1	0	1	ND	0.060	ND	0.020 \pm 0.035
245 T→G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	2	0	2	ND	0.12	ND	0.040 \pm 0.069
Total	7	5	3	15	0.16	0.30	0.15	0.20 \pm 0.086

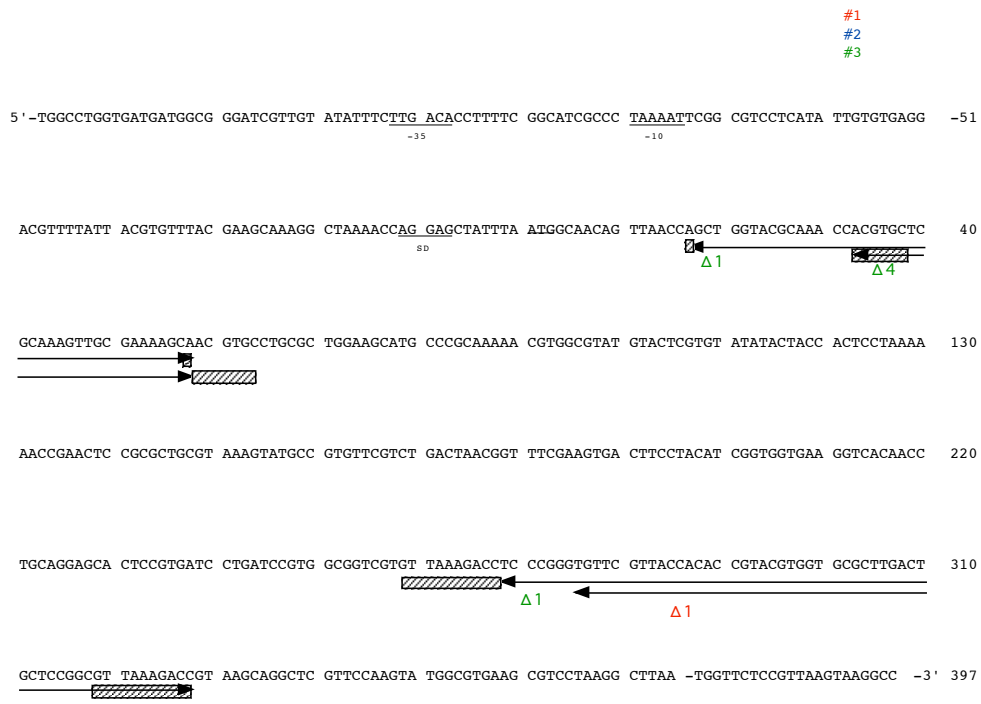
Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
Addition								
at run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Deletion								
at run	1	0	0	1	0.052	ND	ND	0.017 \pm 0.030
at non-run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	1	0	0	1	0.052	ND	ND	0.017 \pm 0.030
Total	1	0	0	1	0.052	ND	ND	0.017 \pm 0.030

参考图 6A) 塩基置換変異



参考图 6B) 欠失変異



参考表 7 最小培地を用いたアネロパック嫌気培養条件下において大腸菌野生株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

アネロパック (最小培地) 野生株の変異の種類別検出数と変異頻度

各実験区の *rpsL* 前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	Ave
Mutation frequency($\times 10^{-6}$)	0.13	0.66	0.53	0.44

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
組換え型								
1点型(128A \rightarrow C)	7	12	5	24	0.083	0.26	0.088	0.15 \pm 0.10
2点型(-22G \rightarrow A,128A \rightarrow C)	1	2	19	22	0.012	0.044	0.34	0.13 \pm 0.18
塩基置換								
ホットスポット1(82C \rightarrow A)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
ホットスポット2(245T \rightarrow A)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
ホットスポット3(245T \rightarrow G)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
上記以外	3	1	1	19	0.035	0.022	0.018	0.025 \pm 0.0093
1塩基フレームシフト	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
配列置換								
欠失	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
タイプ1(dr)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
タイプ2(ir)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	1	1	ND	ND	0.018	0.0059 \pm 0.010
未同定	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
重複								
クラス1	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
クラス2	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
IS								
IS1	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
IS5	0	1	4	5	ND	0.022	0.071	0.031 \pm 0.036
1.2kIS	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
変異なし								
0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Total	11	30	30	71	0.13	0.35	0.53	0.34 \pm 0.20

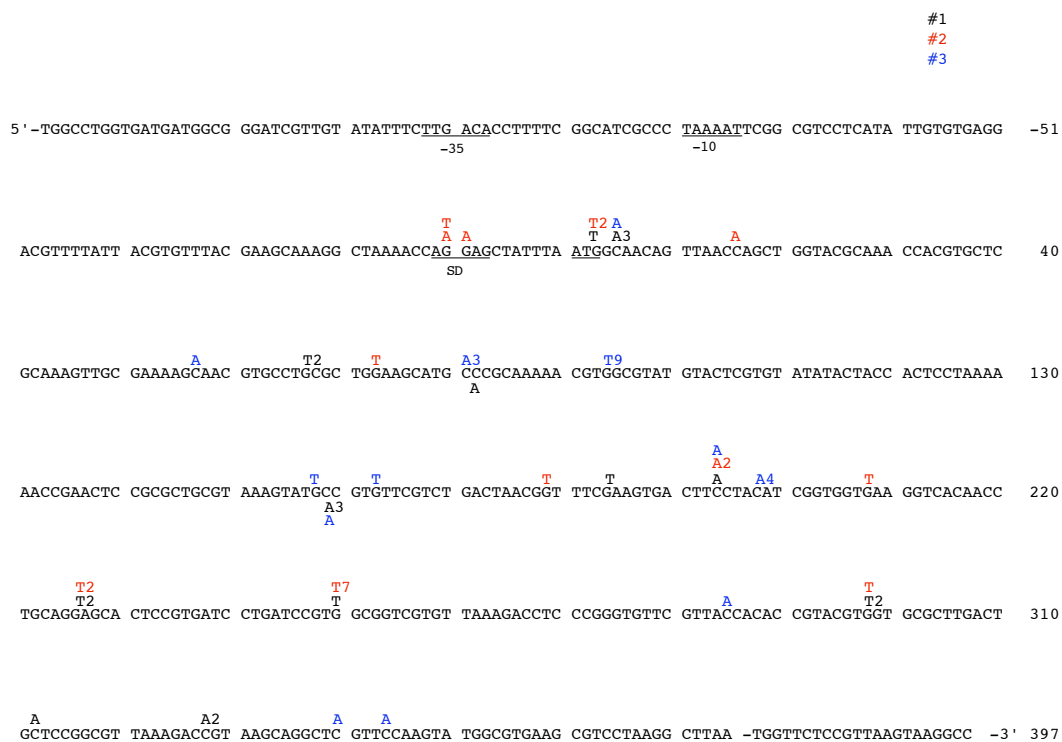
Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
Transition								
A:T \rightarrow G:C	1	0	1	2	0.012	ND	0.018	0.0098 \pm 0.0041
G:C \rightarrow A:T	1	1	0	16	0.012	0.022	ND	0.011 \pm 0.0072
total	2	1	1	18	0.024	0.022	0.018	0.021 \pm 0.0031
Transversion								
G:C \rightarrow T:A	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
G:C \rightarrow C:G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
T:A \rightarrow A:T	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
A:T \rightarrow C:G	1	0	0	1	0.012	ND	ND	0.0039 \pm 0.0068
total	1	0	0	1	0.012	ND	ND	0.0039 \pm 0.0068
Hot spot								
82C \rightarrow A	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
245 T \rightarrow A	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
245 T \rightarrow G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Total	3	15	1	19	0.035	0.022	0.018	0.025 \pm 0.0093

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
Addition								
at run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Deletion								
at run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND

参考図 7 塩基置換変異



参考表 8 最小培地を用いた有酸素培養条件下において大腸菌 $\Delta mutMY$ 株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

有酸素（最小培地） $\Delta mutMY$ 変異株の変異の種類別検出数と変異頻度

各実験区の*rpsL*前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	Ave
Mutation frequency($\times 10^{-6}$)	54	89	78	74

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
組換え型								
1点型(128A→C)	0	1	0	1	ND	3.6	0.0	1.2 \pm 2.1
2点型(-22G→A,128A→C)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
塩基置換								
ホットスポット1(82C→A)	1	0	0	1	3.2	ND	ND	1.1 \pm 1.8
ホットスポット2(245T→A)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
ホットスポット3(245T→G)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
上記以外	16	24	25	65	51	85	78	71 \pm 18
1塩基フレームシフト	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
欠失								
タイプ1(dr)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
タイプ2(ir)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
未同定	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
重複								
クラス1	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
クラス2	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
IS								
IS1	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
IS5	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
1.2kIS	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
変異なし	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Total	17	25	25	67	54	89	78	74 \pm 18

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
Transition								
A:T→G:C	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
G:C→A:T	1	2	0	3	3.2	7.1	0.0	3.4 \pm 3.6
total	1	2	0	3	3.2	7.1	0.0	3.4 \pm 3.6
Transversion								
G:C→T:A	15	22	25	62	48	78	78	68 \pm 18
G:C→C:G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
T:A→A:T	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
A:T→C:G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	15	22	25	62	48	78	78	68 \pm 18
Hot spot								
82C→A	1	0	0	1	3.2	ND	ND	1.1 \pm 1.8
245 T→A	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
245 T→G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	1	0	0	1	3.2	ND	ND	1.1 \pm 1.8
Total	17	24	25	66	54	85	78	72 \pm 16

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
Addition								
at run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Deletion								
at run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND

参考図 8 塩基置換、欠失変異

#1
#2
#3

5' -TGGCCTGGTGATGATGGCG GGATCGTTGT ATATTTCTFG ~~ACACCTTTTC~~ GGCATCGCCC ~~FAAAATTCGG~~ CGTCCTCATA TTGTGTGAGG -51
-25 -10

ACGTTTTATT ACGTGTTTAC GAAGCAAAGG CTAAAACCAG ~~GAGCTATTTA~~ ATGGCAACAG TTAACCAGCT GGTACGCAA CCACGTGCTC 40
SD

GCAAAGTTGC GAAAAGCAAC GTGCTGCGC TGGAAAGCATG ^CCCGCACAAA CGTGGCGTAT GFACTCGTGT ATATACTACC ACTCCTAAAA 130

AACCGAACTC ^ACGCGCTGCGT AAAGTATGCC GTGTTCTGTCT GACTAACGGT TTCGAAGTGA ^{T15}CFTCCTACAT CGGTGGTCAA GGTACACAAC 220
↔
Δ1

TGCAGGAGCA ^GCTCCGTGATC CTGATCCGTG GCGGTCGTGT TAAAGACCTC ^CCCGGTGTTC GTTACCACAC CGTACGTGGT GCGCTTGACT 310

GCTCCGGCGT TAAAGACCGT AAGCAGGCTC GTTCCAAGTA TGGCGTGAAG CGTCCTAAGG CTTAA -TGGTTCCTCCGTTAAGTAAGGCC -3' 397

参考表 9 最小培地を用いたアネロパック培養条件下において大腸菌 $\Delta mutMY$ 株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

アネロパック (最小培地) $\Delta mutMY$ 変異株の変異の種類別検出数と変異頻度

各実験区の*rpsL*前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	Ave
Mutation frequency($\times 10^{-6}$)	26	10	5	14

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
組換え型								
1点型(128A \rightarrow C)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
2点型(-22G \rightarrow A,128A \rightarrow C)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
塩基置換								
ホットスポット1(82C \rightarrow A)	1	2	0	3	0.87	0.65	0.00	0.50 \pm 0.45
ホットスポット2(245T \rightarrow A)	0	1	0	1	ND	0.32	ND	0.11 \pm 0.19
ホットスポット3(245T \rightarrow G)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
上記以外	28	21	29	78	24	6.8	5.0	12 \pm 11
1塩基フレームシフト	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
欠失								
タイプ1(dr)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
タイプ2(ir)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
未同定	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
重複								
クラス1	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
クラス2	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
IS								
IS1	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
IS5	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
1.2kIS	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
その他	1	7	0	8	0.87	2.3	ND	1.0 \pm 1.1
変異なし	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Total	30	31	29	90	26	10	5.0	14 \pm 11

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
Transition								
A:T \rightarrow G:C	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
G:C \rightarrow A:T	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Transversion								
G:C \rightarrow T:A	28	21	29	78	24	6.8	5.0	12 \pm 11
G:C \rightarrow C:G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
T:A \rightarrow A:T	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
A:T \rightarrow C:G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	28	21	29	78	24	6.8	5.0	12 \pm 11
Hot spot								
82C \rightarrow A	1	2	0	3	0.87	0.65	ND	0.50 \pm 0.45
245 T \rightarrow A	0	1	0	1	ND	0.32	ND	0.11 \pm 0.19
245 T \rightarrow G	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	1	3	0	4	0.87	0.97	ND	0.61 \pm 0.53
Total	29	24	29	82	25	7.7	5.0	13 \pm 11

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored				Mutation frequency($\times 10^{-6}$)			
	#1	#2	#3	Total	#1	#2	#3	ave \pm SD
Addition								
at run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Deletion								
at run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
Total	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND

参考图 9 塩基置換変異

#1
#2
#3

5' -TGGCCTGGTGATGATGGCG GGATCGTTGT ATATTTCTTG ACACCTTTTC GGCATCGCCC TAAAAATTCGG CGTCCTCATA TTGTGTGAGG -51
-35 -10

ACGTTTTATT ACGTGTTTAC GAAGCAAAGG CTAAAACCGG GAGCTATTTA ATGGCAACAG TTAACCAAGCT GGTACGCAAA CCACGTGCTC 40
SD

GCAAAGTTGC GAAAAGCAAC GTGCTGCGC TGGAAAGCATG CCGCAAAAA CGTGGCGTAT GFACTCGTGT ATATACTACC ACTCCTAAAA 130
A A A

AACCGAACTC CGCGCTGCGT AAAGTATGCC GTGTTTCGTCT GACTAACGGT TTCGAAGTGA CTTCCTACAT CGGTGGTGAA GGTCACAACC 220
T

TGCAGGAGCA CTCCGTGATC CTGATCCGTG GCGGTCGTGT TAAAGACCTC CCGGGTGTTC GTTACCACAC CGTACGTGGT GCGCTTGACT 310
T

GCTCCGGCGT TAAAGACCGT AAGCAGGCTC GTTCCAAGTA TGGCGTGAAG CGTCCTAAGG CTTAA -TGGTTCCTCCGTTAAGTAAGGCC -3' 397
A A A

参考表 10 三重シールド嫌気培養条件下において大腸菌野生株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

無酸素野生株の変異の種類別検出数と変異頻度(sister除く)

各実験区の*rpsL*前変異突然変異頻度

Section No.	WT	#2	#3	#4	#5	Ave
Mutation frequency($\times 10^{-6}$)	1.5	1.3	1.2	1.9	1.2	1.4

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					ave \pm SD
	WT	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
組換え型												
1点型(128A \rightarrow C)	51	63	59	51	48	272	0.80	0.85	0.74	1.0	0.60	0.80 \pm 0.15
2点型(-22G \rightarrow A,128A \rightarrow C)	22	14	18	15	18	87	0.34	0.19	0.23	0.30	0.23	0.26 \pm 0.063
塩基置換												
ホットスポット1(82C \rightarrow A)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND \pm #DIV/0!
ホットスポット2(245T \rightarrow A)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND \pm #DIV/0!
ホットスポット3(245T \rightarrow G)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND \pm #DIV/0!
上記以外	0	0	0	0	0	0	0.047	0.014	0.076	0.048	0.038	0.045 \pm 0.022
1塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	0.094	0.014	ND	0.024	0.063	0.039 \pm 0.039
2塩基フレームシフト	0	0	3	0	0	3	ND	ND	0.038	ND	ND	0.008 \pm 0.017
配列置換												
欠失	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ1(dr)	4	1	5	0	1	11	0.063	0.014	0.063	ND	0.013	0.030 \pm 0.030
タイプ2(ir)	0	1	1	1	0	3	0.000	0.014	0.013	0.024	ND	0.010 \pm 0.010
タイプ3(rなし)	0	4	0	0	0	4	ND	0.054	ND	ND	ND	0.011 \pm 0.024
未同定	0	3	2	1	8	14	ND	0.041	0.025	0.020	0.100	0.037 \pm 0.038
重複												
クラス1	6	0	0	2	0	8	0.094	ND	ND	0.040	ND	0.027 \pm 0.041
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS												
IS1	0	3	1	0	2	6	ND	0.041	0.013	ND	0.025	0.016 \pm 0.017
IS5	4	5	1	7	3	20	0.063	0.068	0.013	0.14	0.038	0.064 \pm 0.047
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	0	0	8	8	ND	ND	ND	ND	0.10	0.020 \pm 0.045
変異なし	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	0	0	0	0	0	0	1.5	1.3	1.2	1.6	1.2	1.4 \pm 0.18

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					ave \pm SD
	WT	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
Transition												
A:T \rightarrow G:C	1	0	0	0	0	1	0.016	ND	ND	ND	ND	0.0031 \pm 0.0070
G:C \rightarrow A:T	1	0	3	2	2	8	0.016	ND	0.038	0.048	0.025	0.025 \pm 0.019
total	2	0	3	2	2	9	0.031	ND	0.038	0.048	0.025	0.028 \pm 0.018
Transversion												
G:C \rightarrow T:A	0	1	1	0	1	3	ND	0.014	0.013	ND	0.013	0.0077 \pm 0.0070
G:C \rightarrow C:G	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND \pm 0.0000
T:A \rightarrow A:T	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.013	ND	ND	0.0025 \pm 0.0056
A:T \rightarrow C:G	1	0	1	0	0	2	0.016	ND	0.013	ND	ND	0.0056 \pm 0.0078
total	1	1	3	0	1	6	0.016	0.014	0.038	ND	0.013	0.016 \pm 0.014
Hot spot												
82C \rightarrow A	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND \pm 0.0000
245 T \rightarrow A	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND \pm 0.0000
245 T \rightarrow G	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND \pm 0.0000
total	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND \pm 0.0000
Total	3	1	6	2	3	15	0.047	0.014	0.075	0.048	0.038	0.044 \pm 0.022

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					ave \pm SD
	WT	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
Addition												
at run	2	1	0	0	0	3	0.031	0.014	ND	ND	ND	0.0090 \pm 0.014
at non-run	2	0	0	1	1	4	0.031	ND	ND	0.024	0.013	0.014 \pm 0.014
total	4	1	0	1	1	7	0.063	0.014	ND	0.024	0.013	0.022 \pm 0.024
Deletion												
at run	2	0	0	0	4	6	0.031	ND	ND	ND	0.050	0.016 \pm 0.023
at non-run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND \pm 0.0000
total	2	0	0	0	4	6	0.031	ND	ND	ND	0.050	0.016 \pm 0.023
Total	6	1	0	1	5	13	0.094	0.014	ND	0.024	0.063	0.039 \pm 0.039

参考表 11 三重シールド嫌気培養条件下において大腸菌 $\Delta mutMY$ 株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

-02mutMYの変異の種類別検出数と変異頻度

各実験区の*rpsL*前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	Ave
Mutation frequency($\times 10^{-6}$)	0.91	1.1	1.9	2.3	1.8	1.6

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					ave \pm SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
組換え型												
1点型(128A→C)	14	14	14	15	11	68	0.53	0.64	1.1	1.4	0.83	0.91 \pm 0.37
2点型(-22G→A,128A→C)	3	2	2	0	9	16	0.11	0.092	0.16	ND	0.68	0.21 \pm 0.27
塩基置換												
ホットスポット1(82C→A)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ホットスポット2(245T→A)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ホットスポット3(245T→G)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
上記以外	1	1	3	0	0	5	0.038	0.046	0.24	ND	ND	0.064 \pm 0.10
1塩基フレームシフト	1	0	1	0	2	4	0.038	ND	0.079	ND	0.15	0.053 \pm 0.06
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
欠失												
タイプ1(dr)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
未同定	1	4	1	4	1	11	0.038	0.18	0.079	0.38	0.08	0.15 \pm 0.14
重複												
クラス1	1	0	0	1	0	2	0.038	ND	ND	0.096	ND	0.027 \pm 0.042
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS												
IS1	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS5	2	1	2	2	0	7	0.076	0.046	0.16	0.19	ND	0.094 \pm 0.079
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	0	0	1	1	ND	ND	ND	ND	0.075	0.015 \pm 0.034
Tn	1	2	1	2	0	6	0.038	0.092	0.079	0.19	ND	0.080 \pm 0.072
Total	24	24	24	24	24	120	0.91	1.1	1.9	2.3	1.8	1.6 \pm 0.58

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					ave \pm SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
Transition												
A:T→G:C	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.079	ND	ND	0.016 \pm 0.035
G:C→A:T	1	1	1	0	0	3	0.038	0.046	0.079	ND	ND	0.033 \pm 0.034
total	1	1	2	0	0	4	0.038	0.046	0.16	ND	ND	0.048 \pm 0.065
Transversion												
G:C→T:A	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.079	ND	ND	0.016 \pm 0.035
G:C→C:G	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T:A→A:T	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A:T→C:G	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.079	ND	ND	0.016 \pm 0.035
Hot spot												
82C→A	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
245 T→A	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
245 T→G	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	1	1	3	0	0	5	0.038	0.046	0.24	ND	ND	0.064 \pm 0.099

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					ave \pm SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
Addition												
at run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.079	ND	ND	0.016 \pm 0.035
total	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.079	ND	ND	0.016 \pm 0.035
Deletion												
at run	1	0	0	0	2	3	0.038	ND	ND	ND	0.15	0.038 \pm 0.065
at non-run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	1	0	0	0	2	3	0.038	ND	ND	ND	0.15	0.038 \pm 0.065
Total	1	0	1	0	2	4	0.038	ND	0.079	ND	0.15	0.053 \pm 0.063

参考図 11 様々な変異



参考表 12 三重シールド嫌気培養条件下において大腸菌 $\Delta mutT$ 株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

無酸素 $\Delta mutT$ の変異の種類別検出数と変異頻度

各実験区の *rpsL* 前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	Ave
Mutation frequency($\times 10^{-6}$)	0.89	0.56	3.0	2.2	1.6	1.7

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave \pm SD
組換え型												
1点型(128A \rightarrow C)	16	14	14	16	16	76	0.59	0.33	1.8	1.5	1.1	1.0 \pm 0.59
2点型(-22G \rightarrow A,128A \rightarrow C)	4	3	5	3	5	20	0.15	0.070	0.63	0.28	0.33	0.29 \pm 0.21
塩基置換												
ホットスポット1(82C \rightarrow A)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ホットスポット2(245T \rightarrow A)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ホットスポット3(245T \rightarrow G)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
上記以外	0	2	0	2	2	6	ND	0.047	ND	0.18	0.13	0.073 \pm 0.082
1塩基フレームシフト	1	0	2	0	0	3	0.037	ND	0.25	ND	ND	0.057 \pm 0.11
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
欠失												
タイプ1(dr)	0	1	1	0	0	2	ND	0.023	0.13	ND	ND	0.030 \pm 0.054
タイプ2(ir)	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.13	ND	ND	0.025 \pm 0.056
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
未同定	0	1	0	0	0	1	ND	0.023	ND	ND	ND	0.0047 \pm 0.010
重複												
クラス1	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.13	ND	ND	0.025 \pm 0.056
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS												
IS1	2	1	0	0	0	3	0.074	0.023	ND	ND	ND	0.020 \pm 0.032
IS5	1	2	0	2	1	6	0.037	0.047	ND	0.18	0.067	0.067 \pm 0.070
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	0	1	0	1	ND	ND	ND	0.09	ND	0.018 \pm 0.041
変異なし	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	24	24	24	24	24	120	0.89	0.56	3.0	2.2	1.6	1.7 \pm 0.99

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave \pm SD
Transition												
A:T \rightarrow G:C	0	0	0	1	1	2	ND	ND	ND	0.092	0.067	0.032 \pm 0.044
G:C \rightarrow A:T	0	1	0	1	1	3	ND	0.023	ND	0.092	0.067	0.036 \pm 0.041
total	0	1	0	2	2	5	ND	0.023	ND	0.18	0.13	0.068 \pm 0.085
Transversion												
G:C \rightarrow T:A	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G:C \rightarrow C:G	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T:A \rightarrow A:T	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A:T \rightarrow C:G	0	1	0	0	0	1	ND	0.023	ND	ND	ND	0.0047 \pm 0.010
total	0	1	0	0	0	1	ND	0.023	ND	ND	ND	0.0047 \pm 0.010
Hot spot												
82C \rightarrow A	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
245 T \rightarrow A	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
245 T \rightarrow G	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	0	2	0	2	2	6	ND	0.047	ND	0.18	0.13	0.073 \pm 0.082

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave \pm SD
Addition												
at run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Deletion												
at run	1	0	2	0	0	3	0.037	ND	0.25	ND	ND	0.057 \pm 0.11
at non-run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	1	0	2	0	0	3	0.037	ND	0.25	ND	ND	0.057 \pm 0.11
Total	1	0	2	0	0	3	0.037	ND	0.25	ND	ND	0.057 \pm 0.11

参考図 12 様々な変異

#1 #5
#2 #6
#3
#4



参考表 13 過酸化水素無処理時において大腸菌野生株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

過酸化水素処理(0mM)野生株の変異の種類別検出数と変異頻度

各実験区の*rpsL*前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	Ave
Mutation frequency(×10 ⁻⁶)	0.62	0.84	0.27	1.0	0.64	0.67
	1月7日	1月24日	9月7日	9月7日	10月7日	

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency(×10 ⁻⁶)					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave ± SD
組換え型												
1点型(128A→C)	4	3	4	6	0	17	0.051	0.053	0.034	0.19	ND	0.065 ± 0.071
2点型(-22G→A,128A→C)	7	8	1	7	2	25	0.089	0.14	0.0084	0.22	0.040	0.10 ± 0.083
塩基置換												
ホットスポット1(82C→A)	0	0	0	4	1	5	0.00	0.00	0.00	0.13	0.020	0.029 ± 0.054
ホットスポット2(245T→A)	22	17	7	2	14	62	0.28	0.30	0.059	0.063	0.28	0.20 ± 0.12
ホットスポット3(245T→G)	3	1	0	0	1	5	0.038	0.018	0.000	0.000	0.020	0.015 ± 0.016
上記以外	2	2	1	3	2	10	0.025	0.035	0.0084	0.094	0.040	0.040 ± 0.032
1塩基フレームシフト	0	2	2	0	0	4	0	0.035	0.017	0	0	0.010 ± 0.016
2塩基フレームシフト	1	1	0	0	0	2	0.013	0.018	ND	ND	ND	0.0060 ± 0.0034
配列置換	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
欠失												
タイプ1(dr)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	1	0	0	0	1	ND	0.018	ND	ND	ND	0.0035 ± 0.0078
未同定	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
重複												
クラス1	0	0	0	0	1	1	ND	ND	ND	ND	0.020	0.0040 ± 0.0089
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS												
IS1	8	2	10	0	0	20	0.10	0.035	0.084	ND	ND	0.044 ± 0.034
ISS	1	6	0	4	0	11	0.013	0.11	ND	0.13	ND	0.049 ± 0.060
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	4	0	0	4	ND	ND	0.034	ND	ND	0.0068 ± 0.015
変異なし	1	0	0	0	0	1	0.013	ND	ND	ND	ND	0.0025 ± 0.0057
Total	49	48	32	32	32	0	0.62	0.75	0.24	0.81	0.42	0.57 ± 0.24

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency(×10 ⁻⁶)					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave ± SD
Transition												
A:T→G:C	0	1	0	3	2	6	0	0.018	0	0.094	0.040	0.030 ± 0.039
G:C→A:T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ± 0
total	0	1	0	3	2	6	0	0.018	0	0.094	0.040	0.030 ± 0.039
Transversion												
G:C→T:A	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.020	0.0040 ± 0.0089
G:C→C:G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ± 0
T:A→A:T	2	0	0	0	0	2	0.025	0	0	0	0	0.0051 ± 0.011
A:T→C:G	0	1	1	0	1	2	0	0.017	0.008	0	0.020	0.0091 ± 0.0093
total	2	1	1	0	0	4	0.025	0.017	0.0084	0	0	0.018 ± 0.015
Hot spot												
82C→A	0	0	0	4	1	5	0	0	0	0.13	0.020	0.029 ± 0.054
245 T→A	22	17	7	2	14	62	0.28	0.30	0.059	0.063	0.28	0.20 ± 0.12
245 T→G	3	1	0	0	1	5	0.038	0.018	0	0	0.020	0.015 ± 0.016
total	25	18	7	6	16	72	0.32	0.32	0.059	0.19	0.32	0.24 ± 0.12
Total	27	20	8	9	18	82	0.34	0.35	0.068	0.28	0.40	0.29 ± 0.13

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency(×10 ⁻⁶)					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave ± SD
Addition												
at run	0	0	1	0	0	1	0	0	0.0084	0	0	0.0017 ± 0.0038
at non-run	0	1	0	0	0	1	0	0.018	0	0	0	0.0035 ± 0.0078
total	0	1	1	0	0	2	0	0.018	0.0084	0	0	0.0052 ± 0.0078
Deletion												
at run	0	1	1	0	0	2	0	0.018	0.0084	0	0	0.0052 ± 0.0078
at non-run	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ± 0
total	0	1	1	0	0	2	0	0.018	0.0084	0	0	0.0052 ± 0.0078
Total	0	2	2	0	0	4	0	0.035	0.017	0	0	0.010 ± 0.016

参考表 14 過酸化水素処理時(1mM)において大腸菌野生株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

H2O2(1mM)野生株の変異の種類別検出数と変異頻度

各実験区の*rpsL*前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	Ave
Mutation frequency($\times 10^{-6}$)	7.0	8.2	7.5	8.4	7.7	7.8

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					ave \pm SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
組換え型												
1点型(128A→C)	32	9	12	15	9	77	1.6	1.5	1.9	2.6	2.2	2.0 \pm 0.46
2点型(-22G→A,128A→C)	29	10	11	14	6	70	1.4	1.7	1.7	2.5	1.4	1.7 \pm 0.42
塩基置換												
ホットスポット1(82C→A)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ホットスポット2(245T→A)	10	3	2	1	2	18	0.49	0.51	0.31	0.18	0.48	0.39 \pm 0.15
ホットスポット3(245T→G)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
上記以外	50	19	12	14	7	102	2.4	3.2	1.9	2.5	1.7	2.3 \pm 0.61
1塩基フレームシフト	18	4	4	1	4	31	0.88	0.68	0.63	0.18	0.96	0.66 \pm 0.31
2塩基フレームシフト	1	0	0	0	0	1	0.049	ND	ND	ND	ND	0.0097 \pm 0.022
配列置換	0	0	2	0	0	2	ND	ND	0.31	ND	ND	0.063 \pm 0.14
欠失												
タイプ1(dr)	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.16	ND	ND	0.031 \pm 0.070
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
未同定	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
重複												
クラス1	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS												
IS1	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS5	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.16	ND	ND	0.031 \pm 0.070
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	4	1	1	2	2	10	0.19	0.17	0.16	0.35	0.48	0.27 \pm 0.14
変異なし	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	144	48	48	48	32	320	7.0	7.9	7.2	8.2	7.2	7.5 \pm 0.52

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^6$)					ave \pm SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
Transition												
A:T→G:C	2	2	0	2	2	8	0.10	0.34	ND	0.35	0.48	0.25 \pm 0.16
G:C→A:T	18	2	3	4	3	30	0.88	0.34	0.47	0.70	0.72	0.62 \pm 0.21
total	20	4	3	6	5	38	0.97	0.68	0.47	1.1	1.2	0.88 \pm 0.30
Transversion												
G:C→T:A	17	8	3	4	2	34	0.83	1.4	0.47	0.70	0.48	0.77 \pm 0.37
G:C→C:G	5	3	2	2	0	12	0.24	0.51	0.31	0.35	ND	0.28 \pm 0.11
T:A→A:T	6	4	4	2	0	16	0.29	0.68	0.63	0.35	ND	0.39 \pm 0.20
A:T→C:G	2	0	0	0	0	2	0.10	0	ND	ND	ND	0.019 \pm 0.069
total	30	15	9	8	2	64	1.46	2.56	1.4	1.40	0.48	1.5 \pm 0.74
Hot spot												
82C→A	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
245 T→A	10	3	2	1	2	18	0.49	0.51	0.31	0.18	0.48	0.39 \pm 0.15
245 T→G	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	10	3	2	1	2	18	0.49	0.51	0.31	0.18	0.48	0.39 \pm 0.15
Total	60	22	14	15	9	120	2.9	3.8	2.2	2.6	2.2	2.7 \pm 0.66

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^6$)					ave \pm SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
Addition												
at run	0	1	0	0	0	1	0	0.17	ND	ND	ND	0.034 \pm 0.12
at non-run	1	0	0	0	0	1	0.049	0	ND	ND	ND	0.010 \pm 0.034
total	1	1	0	0	0	2	0.049	0.17	0	0	0	0.044 \pm 0.074
Deletion												
at run	9	1	2	1	1	14	0.44	0.17	0.31	0.18	0.24	0.27 \pm 0.11
at non-run	8	2	2	0	3	15	0.39	0.34	0.31	ND	0.72	0.35 \pm 0.19
total	17	3	4	1	4	29	0.83	0.51	0.63	0.18	0.96	0.62 \pm 0.30
Total	18	4	4	1	4	31	0.88	0.68	0.63	0.18	0.96	0.66 \pm 0.31

参考表 15 過酸化水素無処理時において大腸菌 $\Delta mutMY$ 株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

H2O2(0mM) $\Delta mutMY$ の変異の種類別検出数と変異頻度

各実験区の *rpsL* 前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	Ave
Mutation frequency($\times 10^{-6}$)	22	24	36	27	43	30

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					ave \pm SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
組換え型												
1点型(128A \rightarrow C)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2点型(-22G \rightarrow A,128A \rightarrow C)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
塩基置換												
ホットスポット1(82C \rightarrow A)	1	0	2	0	0	3	0.69	ND	3.0	ND	ND	0.74 \pm 1.3
ホットスポット2(245T \rightarrow A)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ホットスポット3(245T \rightarrow G)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
上記以外	30	24	21	22	17	114	21	24	32	25	33	27 \pm 5.3
1塩基フレームシフト	0	0	1	0	0	1	ND	ND	1.5	ND	ND	0.30 \pm 0.67
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
欠失												
タイプ1(dr)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
未同定	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
重複												
クラス1	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS												
IS1	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS5	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	1	0	0	2	5	8	0.69	ND	ND	2.3	9.8	2.5 \pm 4.1
変異なし	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	32	24	24	24	22	126	22	24	36	27	43	30 \pm 8.8

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					ave \pm SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
Transition												
A:T \rightarrow G:C	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G:C \rightarrow A:T	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Transversion												
G:C \rightarrow T:A	30	23	21	22	17	113	21	23	32	25	33	27 \pm 5.5
G:C \rightarrow C:G	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T:A \rightarrow A:T	0	1	0	0	0	1	ND	1.0	ND	ND	ND	0.20 \pm 0.45
A:T \rightarrow C:G	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	30	24	21	22	17	114	21	24	32	25	33	27 \pm 5.3
Hot spot												
82C \rightarrow A	1	0	2	0	0	3	0.7	ND	3.0	ND	ND	0.74 \pm 1.3
245 T \rightarrow A	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
245 T \rightarrow G	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	1	0	2	0	0	3	0.69	ND	ND	ND	ND	0.74 \pm 1.3
Total	31	24	23	22	17	117	21	24	35	25	33	28 \pm 5.9

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					ave \pm SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
Addition												
at run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Deletion												
at run	0	0	1	0	0	1	ND	ND	1.5	ND	ND	0.30 \pm 0.67
at non-run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	0	0	1	0	0	1	ND	ND	1.5	ND	ND	0.30 \pm 0.67
Total	0	0	1	0	0	1	ND	ND	1.5	ND	ND	0.30 \pm 0.67

参考表 16 過酸化水素処理時(1mM)において大腸菌 $\Delta mutMY$ 株で誘発される *rpsL* 突然変異の検出数と変異頻度

H2O2(1mM) $\Delta mutMY$ の変異の種類別検出数と変異頻度

各実験区の*rpsL*前変異突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	Ave
Mutation frequency($\times 10^{-6}$)	63	56	58	76	62	63

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					ave \pm SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
組換え型												
1点型(128A \rightarrow C)	0	2	1	1	3	7	ND	4.7	2.4	3.2	7.8	3.6 \pm 2.9
2点型(-22G \rightarrow A,128A \rightarrow C)	1	0	0	1	2	4	2.0	ND	ND	3.2	5.2	2.1 \pm 2.2
塩基置換												
ホットスポット1(82C \rightarrow A)	1	2	0	0	1	4	2.0	4.7	0.0	0.0	2.6	1.8 \pm 2.0
ホットスポット2(245T \rightarrow A)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ホットスポット3(245T \rightarrow G)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
上記以外	29	19	23	22	18	111	57	44	56	70	47	55 \pm 10
1塩基フレームシフト	1	1	0	0	0	2	2.0	2.3	ND	ND	ND	0.86 \pm 1.2
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
欠失												
タイプ1(dr)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
未同定	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
重複												
クラス1	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS												
IS1	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS5	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
変異なし	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	32	24	24	24	24	128	63	56	58	76	62	63 \pm 7.8

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					ave \pm SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
Transition												
A:T \rightarrow G:C	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G:C \rightarrow A:T	0	0	0	1	1	2	ND	ND	ND	3.2	2.6	1.2 \pm 1.6
total	0	0	0	1	1	2	ND	ND	ND	3.2	2.6	1.2 \pm 1.6
Transversion												
G:C \rightarrow T:A	27	17	23	20	17	104	53	40	56	63	44	51 \pm 9.4
G:C \rightarrow C:G	1	2	0	0	0	3	2.0	4.7	ND	ND	ND	1.3 \pm 2.1
T:A \rightarrow A:T	1	0	0	0	0	1	2.0	ND	ND	ND	ND	0.39 \pm 0.88
A:T \rightarrow C:G	0	0	0	1	0	1	ND	ND	ND	3.2	ND	0.63 \pm 1.4
total	29	19	23	21	17	109	57	44	56	67	44	53 \pm 9.5
Hot spot												
82C \rightarrow A	1	2	0	0	1	4	2.0	4.7	ND	ND	2.58	1.8 \pm 2.0
245 T \rightarrow A	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
245 T \rightarrow G	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	1	2	0	0	1	4	2.0	4.7	ND	ND	2.6	1.8 \pm 2.0
Total	30	21	23	22	19	115	59	49	56	70	49	56 \pm 8.5

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency($\times 10^{-6}$)					ave \pm SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
Addition												
at run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Deletion												
at run	1	1	0	0	0	2	2.0	2.3	ND	ND	ND	0.86 \pm 1.2
at non-run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	1	1	0	0	0	2	2.0	2.3	ND	ND	ND	0.86 \pm 1.2
Total	1	1	0	0	0	2	2.0	2.3	ND	ND	ND	0.86 \pm 1.2

参考文献

- [1] J.A. Imlay (2003) Pathways of oxidative damage, *Annu Rev Microbiol* 57 395-418.
- [2] D.E. Boehm, K. Vincent and O.R. Brown (1976) Oxygen and toxicity inhibition of amino acid biosynthesis, *Nature* 262 418-420.
- [3] K. Hantke Iron and metal regulation in bacteria(2001), *Curr Opin Microbiol* 4 172-177.
- [4] G.W. Hsu, M. Ober, T. Carell and L.S. Beese (2004) Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase, *Nature* 431 217-221.
- [5] M.L. Michaels, C. Cruz, A.P. Grollman and J.H. Miller (1992) Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 7022-7025.
- [6] K.C. Cheng, D.S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura and L.A. Loeb (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A---C substitutions, *J Biol Chem* 267 166-172.
- [7] J. Fukae, M. Takanashi, S. Kubo, K. Nishioka, Y. Nakabeppu, H. Mori, Y. Mizuno and N. Hattori (2005) Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders, *Acta Neuropathol (Berl)* 109 256-262.
- [8] T. Tajiri, H. Maki and M. Sekiguchi (1995) Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*, *Mutat Res* 336 257-267.
- [9] M. Cabrera, Y. Nghiem and J.H. Miller (1988) *mutM*, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G.C----T.A transversions, *J Bacteriol* 170 5405-5407.

- [10] Y. Nghiem, M. Cabrera, C.G. Cupples and J.H. Miller (1988) The *mutY* gene: a mutator locus in *Escherichia coli* that generates G.C---T.A transversions, Proc Natl Acad Sci U S A 85 2709-2713.
- [11] M.E. Hagensee and R.E. Moses (1989) Multiple pathways for repair of hydrogen peroxide-induced DNA damage in *Escherichia coli*, J Bacteriol 171 991-995.
- [12] H. Maki and M. Sekiguchi (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis, Nature 355 273-275.
- [13] R.G. Fowler, J.A. Erickson and R.J. Isbell (1994) Activity of the *Escherichia coli mutT* mutator allele in an anaerobic environment, J Bacteriol 176 7727-7729.
- [14] R.G. Fowler and R.M. Schaaper (1997) The role of the *mutT* gene of *Escherichia coli* in maintaining replication fidelity, FEMS Microbiol Rev 21 43-54.
- [15] J.T. Reardon, T. Bessho, H.C. Kung, P.H. Bolton and A. Sancar (1997) In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients, Proc Natl Acad Sci U S A 94 9463-9468.
- [16] Y. Saito, F. Uraki, S. Nakajima, A. Asaeda, K. Ono, K. Kubo and K. Yamamoto (1997) Characterization of endonuclease III (*nth*) and endonuclease VIII (*nei*) mutants of *Escherichia coli* K-12, J Bacteriol 179 3783-3785.
- [17] M.C. Earley and G.F. Crouse (1998) The role of mismatch repair in the prevention of base pair mutations in *Saccharomyces cerevisiae*, Proc Natl Acad Sci U S A 95 15487-15491.
- [18] J. Zhao and M.E. Winkler (2000) Reduction of GC --> TA transversion mutation by overexpression of MutS in *Escherichia coli* K-12, J Bacteriol 182

5025–5028.

[19] B. Weiss (2001) Endonuclease V of *Escherichia coli* prevents mutations from nitrosative deamination during nitrate/nitrite respiration, *Mutat Res* 461 301–309.

[20] J.A. Imlay and S. Linn (1986) Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide, *J Bacteriol* 166 519–527.

[21] J.A. Imlay and S. Linn (1987) Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide, *J Bacteriol* 169 2967–2976.

[22] S. Bjelland and E. Seeberg (2003) Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation, *Mutat Res* 531 37–80.

[23] T. Nunoshiba, T. deRojas-Walker, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum and B. Demple (1993) Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 9993–9997.

[24] Y. Jeon, Y.S. Lee, J.S. Han, J.B. Kim and D.S. Hwang (2001) Multimerization of phosphorylated and non-phosphorylated ArcA is necessary for the response regulator function of the Arc two-component signal transduction system, *J Biol Chem* 276 40873–40879.

[25] Y.S. Lee, J.S. Han, Y. Jeon and D.S. Hwang (2001) The arc two-component signal transduction system inhibits in vitro *Escherichia coli* chromosomal initiation, *J Biol Chem* 276 9917–9923.

[26] D.T. Verhamme, J.C. Arents, P.W. Postma, W. Crielaard and K.J. Hellingwerf (2002) Investigation of in vivo cross-talk between key two-component systems of *Escherichia coli*, *Microbiology* 148 69–78.

[27] E. Yamamura, E.H. Lee, A. Kuzumaki, N. Uematsu, T. Nunoshiba, M. Kawata

and K. Yamamoto (2002) Characterization of spontaneous mutation in the delta soxR and SoxS overproducing strains of *Escherichia coli*, J Radiat Res (Tokyo) 43 195-203.

[28] T. Nunoshiba, T. DeRojas-Walker, S.R. Tannenbaum and B. Demple (1995) Roles of nitric oxide in inducible resistance of *Escherichia coli* to activated murine macrophages, Infect Immun 63 794-798.

[29] A. Martinez and R. Kolter (1997) Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps, J Bacteriol 179 5188-5194.

[30] S. Dukan and T. Nystrom (1999) Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells, J Biol Chem 274 26027-26032.

[31] M. Manchado, C. Michan and C. Pueyo (2000) Hydrogen peroxide activates the SoxRS regulon in vivo, J Bacteriol 182 6842-6844.

[32] D. Georgellis, O. Kwon and E.C. Lin (2001) Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria, Science 292 2314-2316.

[33] S. Akasaka and K. Yamamoto (1994) Hydrogen peroxide induces G:C to T:A and G:C to C:G transversions in the supF gene of *Escherichia coli*, Mol Gen Genet 243 500-505.

[34] L. Chen, Q.W. Xie and C. Nathan (1998) Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) protects bacterial and human cells against reactive nitrogen intermediates, Mol Cell 1 795-805.

[35] L.C. Seaver and J.A. Imlay (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*, J Bacteriol 183 7173-7181.

[36] S. Park, X. You and J.A. Imlay (2005) Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of *Escherichia coli*, Proc Natl Acad Sci U S A 102 9317-9322.

- [37] B. Gonzalez-Flecha and B. Dimple (1997) Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*, J Bacteriol 179 382-388.
- [38] A. Carlioz and D. Touati (1986) Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life?, Embo J 5 623-630.
- [39] A.S. Gort, D.M. Ferber and J.A. Imlay (1999) The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*, Mol Microbiol 32 179-191.
- [40] J.W. Drake (1969) Comparative rates of spontaneous mutation, Nature 221 1132.
- [41] R.M. Schaaper, B.N. Danforth and B.W. Glickman (1986) Mechanisms of spontaneous mutagenesis: an analysis of the spectrum of spontaneous mutation in the *Escherichia coli lacI* gene, J Mol Biol 189 273-284.
- [42] 蟹江聡 (平成 13 年)大腸菌染色体上に挿入した *rpsL* 標的遺伝子に生じる自然突然変異:複製エラーとミスマッチ修復の特異性 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科修士論文
- [43] 中西真里 (平成 16 年)自然突然変異の発生に及ぼす活性酸素の影響 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科修士論文
- [44] 坂井亜紀子 (平成 14 年)自然突然変異の発生に及ぼす酸素ラジカルの役割 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科修士論文
- [45] 澤井知子 (平成 17 年)大腸菌 *dam* 遺伝子欠損変異株で生じる遺伝的不安定性 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科修士論文
- [46] P. Moller and H. Wallin (1998) Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product, Mutat Res 410 271-290.

[47] J. Meyer, S. Iida and W. Arber (1980) Does the insertion element IS1 transpose preferentially into A+T-rich DNA segments? *Mol Gen Genet* 178 471-473.

[48] 安野志津 (平成 17 年) スーパーオキシドが関与する突然変異誘発の分子機構
奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科修士論文

謝辞

本研究を行うにあたり、始終御指導・御助言、さらに研究材料の惜しみない援助を頂きました真木寿治教授に深く感謝いたします。また、秋山晶広助教授、真木智子助手、梅津桂子助手、愿山郁氏には本研究への御助言を頂き、深く感謝いたします。さらに本研究を行う上での環境整備をして頂いた中嶋淑美秘書に深く感謝いたします。研究室の皆様には公私共々に様々なご協力を頂き、深く感謝いたします。最後に、長過ぎる学生生活を心配してくれた両親ですが、最後まで暖かい激励を頂きました。家族に深く感謝いたします。