

低酸素環境下における大腸菌細胞内の  
活性酸素レベルの上昇と酸化 DNA 損傷の誘発

上船 晴香  
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研究室  
(真木 寿治 教授)

平成28年1月19日提出

## 目次

<b>第 1 章 序論</b>	<b>4-16</b>
1. 生物と活性酸素	5
2. 自然突然変異における活性酸素の意義	5-6
3. 大腸菌における活性酸素発生機構	7-9
4. 大腸菌における活性酸素消去機構	10-11
5. 活性酸素による酸化 DNA 損傷と修復機構について	12-13
6. 本研究の目的	14-16
<b>第 2 章 材料と方法</b>	<b>17-34</b>
1. 材料	
① 菌株	18-19
② プラスミド	19
③ プライマー	19-20
④ P1 フェージ	21
⑤ 試薬・培地	21-22
2. 実験方法	
① プラスミド DNA の精製	22-23
② アガロースゲル電気泳動	23
③ プラスミドによる形質転換	23-24
④ P1 フェージを用いた形質導入	24-25
⑤ One-step disruption を用いた遺伝子破壊株の作製	25-27
⑥ 異なる酸素条件による培養方法	27-28
⑦ 自然突然変異頻度の測定	29-30
⑧ レポーター遺伝子アッセイによる GFP 蛍光レベルの測定	31-34
<b>第 3 章 結果</b>	<b>35-66</b>
1. 酸素シフト処理によって酸化 DNA 損傷が上昇する原因の解明	
① <i>rpoB</i> 検出系を用いた酸素シフト処理下での突然変異頻度測定	36-39
② レポーター遺伝子アッセイを用いた過酸化水素レベルの測定	40-43
③ 酸素シフト処理の酸化 DNA 損傷への影響	43-45
④ 好気培養（酸素濃度 4~8%）の影響	45-47
⑤ オキシレース入り LB 培地による嫌気培養	48-49

2. 低酸素環境下において細胞内過酸化水素レベルと酸化 DNA 損傷が増加した原因の解明

- ① シトクロム末端酸化酵素の影響 50-55
- ② フラボタンパク質による酸素の自動酸化の影響 55-58
- ③ 低酸素環境下における過酸化水素はスーパーオキシドを介して発生したのか? 59-64
- ④ 8-oxoG に起因する突然変異にヒドロキシラジカルが関与するのか? 65-66

## 第 4 章 考察 67-78

- 1. 低酸素環境下において活性酸素レベルが上昇し酸化 DNA 損傷の誘発が増加した理由 68-72
- 2. 酸素シフト処理における活性酸素レベルの上昇および酸化 DNA 損傷の誘発 73
- 3. 細胞内 *ahpC*-GFP レベルと酸化 DNA 損傷の関係性 73-75
- 4. 今後の展望 75-78

## 第 5 章 付録 79-81

- 1. 培養時間と *ahpC*-GFP レベルの関係 79-80
- 2. 過酸化水素処理による突然変異頻度への影響 81

## 第 6 章 参考文献 82-88

## 謝辞 89

## 第 1 章 序論

## 1. 生物と活性酸素

活性酸素種 (Reactive Oxygen Species) は、スーパーオキシド ( $O_2^-$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル ( $OH\cdot$ )、一重項酸素 ( $^1O_2$ ) の4種類が知られている。これらの活性酸素は、ミトコンドリアの電子伝達系や、小胞体の電子伝達系、好中球やマクロファージ、炎症などによって生じる[1, 2]。

動物体内における好中球の殺菌作用の過程で生成した活性酸素は、感染症などから体を防御する役割を担っているとされている。好中球は体内に侵入した病原菌を認識し貪食する。貪食された病原体は、好中球が生成するスーパーオキシドによって殺菌される。好中球で産生するスーパーオキシドは、好中球が持つ膜酵素の NADPH オキシダーゼが NADPH を基質として酸素を還元することで生成する[3]。また、植物においては、病原菌が侵入した際に生成するスーパーオキシドによって病原菌を撃退する仕組みが解明されている。これは、病原菌が植物に侵入した際に鞭毛タンパク質などの病原菌由来物質を細胞膜型免疫センサー (EFR) が感知し、EFR とリン酸化酵素 (BAK1) が結合し、互いにリン酸化することで活性化する。この活性型複合体が、BIK1 をリン酸化することで BIK1 が活性化する。さらに、活性型 BIK1 が RBOHD (Respiratory Oxidase Homolog D) をリン酸化によって活性化させ、活性型 RBOHD がスーパーオキシドを生成する。最終的に、感染部位で生成したスーパーオキシドが病原菌を殺菌する[4]。このように動植物は体を防御する仕組みとして、活性酸素を利用している。

その一方で、酸素呼吸を行う生物は、電子伝達系の酸素を水に変換する段階で活性酸素を生成する。酸素呼吸で生成した細胞内の活性酸素は、タンパク質の変性や脂質の酸化、DNA の酸化損傷等を引き起こす。さらに、これらの活性酸素による酸化 DNA 損傷は、癌[5]やアルツハイマー病[6]、パーキンソン病[7]などの疾患に関わることが報告されている。このように、生物が生きるために行っている酸素呼吸が、活性酸素を生成することで細胞を傷つけ、疾患原因となる場合がある。

## 2. 自然突然変異における活性酸素の意義

自然突然変異とは、通常の生育環境において生じる突然変異のことである。突然変異の原因は、DNA 複製の段階で起こる DNA ポリメラーゼの複製エラー、内在性の変異原やヌクレオチドプールの損傷による自然突然変異誘発がある。しかし、生物には損傷乗り越え修復や組換え修復、塩基除去修復などの様々な突然変異の抑制機構が存在するため、自然突然変異の発生は非常に低い頻度で維持される。

自然突然変異の原因として、盛んに研究されてきたのが内在性の変異原である酸化 DNA 損傷の 8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) である。1984 年に、環境変異原や発癌物質と反応させた DNA からスクリーニングによって 8-oxoG は発見された[8]。DNA 上の 8-oxoG は、シトシンとアデニンと水素結合することができ[9]、8-oxoG とアデニンが誤って対合すると G:C→T:A トランスバージョン変異を誘発する[10]。大腸菌

のミューテーターを用いた研究によって、DNA上の8-oxoGによる突然変異誘発を抑制する機構が発見された。これは、大腸菌 *mutM* 欠損株が G:C→T:A トランスバージョン変異を増加させることで見つかった[11]。*mutM* 遺伝子は8-オキシグリコシラーゼをコードし、この酵素はDNA鎖上の8-oxoGとシトシンの対合から8-oxoGを取り除くことができる。同様に大腸菌のミューテーターを用いた研究によって発見されたのが *mutY* 遺伝子である。*mutY* 遺伝子は、アデニン DNA グリコシラーゼをコードしており、この酵素は、MutM タンパク質によって除去されなかった8-oxoGがアデニンと結合した時に、アデニンを特異的に取り除く[12]。*mutM mutY* 遺伝子のミューテーター活性は野生株と比較すると約100倍上昇する。しかし *mutM* 遺伝子単独でのミューテーター活性は野生株と比較して変化がなく、*mutY* 遺伝子のミューテーター活性は約20倍であることから、これら二つの酵素は協調的に働くことが明らかとなった[13]。さらに、別の抑制機構として発見されたのが、ヌクレオチドプール内の8-oxo-7,8-dihydro-2'-dGTP (8-oxodGTP) を特異的に分解する MutT タンパク質である[14]。8-oxodGTPは、ヌクレオチドプールにおける酸化DNA損傷である。8-oxodGTPがDNA鎖上に取り込まれると、A:T→C:G トランスバージョン変異が生じる。MutT タンパク質は、ヌクレオチドプール中の8-oxodGTPを8-oxodGMPに加水分解する8-oxodGTPアーゼ活性を有するため、DNA鎖への8-oxodGTPの取り込みは抑制される。また大腸菌 *mutT* 欠損株において、A:T→C:G トランスバージョン変異は野生株と比較すると1,000~10,000倍まで上昇する[14]。MutMとMutYタンパク質による8-oxoGの修復機構とMutTタンパク質によるヌクレオチドプール中の8-oxodGTP分解、これら2つの突然変異抑制機構によって活性酸素による突然変異は抑制されている。

突然変異と活性酸素の関係についての研究は、細胞にUV照射や活性酸素誘発剤を処理することで、生じたDNA損傷を調べ、さらにどのような突然変異になるかを研究されてきた。当研究室の坂井らは、生理条件下における活性酸素と自然突然変異の関係を、異なる酸素環境で大腸菌を生育することによって調べた。この研究から、通常の有酸素条件下と嫌気条件下で大腸菌を生育した場合、確かに有酸素培養下において細胞内で8-oxoGが生成しており、その損傷をMutMタンパク質とMutYタンパク質が高い効率で修復していることを初めて明らかにした[15]。また野生型の大腸菌において生理的条件下でヒドロキシラジカルに依存した突然変異としてホットスポット型の塩基置換変異が誘発することを示した[15, 16]。このホットスポット型変異は、非常に低い頻度で発生し、8-oxoGや8-dGTP以外の原因で誘発する可能性がある。また、MutMやMutYタンパク質による塩基除去修復やミスマッチ修復、ヌクレオチド修復が関与しない酸化DNA損傷由来の突然変異であると示唆された。大腸菌の生理条件下における酸化DNA損傷の発生や修復の仕組みは、全てを解明できていない。よって、生物の細胞内で発生する活性酸素と自然突然変異の関係を調べることは重要である。

### 3. 大腸菌における活性酸素発生機構

大腸菌の活性酸素の発生経路は、酸素呼吸の電子伝達系におけるシトクロム末端酸化酵素が関与する経路と、フラボタンパク質の自動酸化が関与する経路がある(図1)。

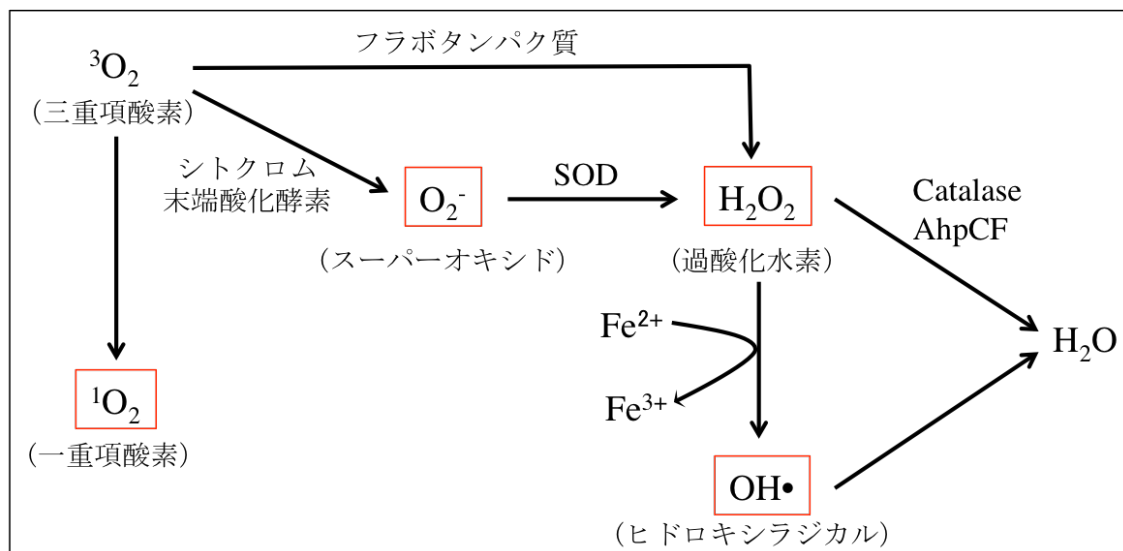


図 1 大腸菌における活性酸素発生経路

活性酸素種は、一重項酸素、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカルが知られている。酸素分子がシトクロム末端酸化酵素やフラボタンパク質から電子を受け取ることでスーパーオキシドまたは過酸化水素となる。スーパーオキシドは SOD によって過酸化水素に消去され、過酸化水素はカタラーゼや AhpCF によって水へ変換されることで無毒化する。また過酸化水素が二価の鉄イオンとフェントン反応するとヒドロキシラジカル生じる。

大腸菌の電子伝達系は、解糖系や TCA 回路で生成された NADH やコハク酸を利用し、複合体 I (NADH : ユビキノン還元酵素)や複合体 II (コハク酸脱水素酵素)がユビキノンを還元する[17] [18]。さらに複合体IV(シトクロム末端酸化酵素)が還元型ユビキノンを利用し、酸素分子を還元することで水に変換する [19]。この段階で酸素分子が過剰に電子を受け取るとスーパーオキシドが発生する。このように酸素を用いてエネルギーを生成する場合、活性酸素が生じる可能性が高いと推測できる。ミトコンドリアに関しては、体内に取り込まれた約 90%の酸素がミトコンドリアで利用され、また消費される酸素分子の 1~5%が活性酸素になると言われている。大腸菌では、活性酸素発生に関与するシトクロム末端酸化酵素は 3 種類存在する(表 2)。これらの酵素の発現レベルは、大腸菌の生育環境の違いによって変化することが報告されている。特に、bo 型と bd-I 型のシトクロム末端酸化酵素においては、酸素濃度によって発現レベルが変化する[20] (表 2)。しかし、シトクロム末端酸化酵素の活性酸素産生における役割や証拠は、まだ解明されていない。

表 1 大腸菌の電子伝達系におけるシトクロム末端酸化酵素（複合体IV）

シトクロム 末端酸化酵素	遺伝子	特徴
bo 型	<i>cyoABCD</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・酸素分圧が高く、対数増殖期の時に高発現（キノンはユビキノン8）</li> <li>・4個のサブユニットから成り、I～IIIのサブユニットはミトコンドリアのシトクロムC酸化酵素の3個のサブユニットと相同</li> </ul>
bd-I 型	<i>cydAB</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・対数増殖期後期から定常増殖期における低酸素環境（酸素濃度2%以下の時）に高発現</li> <li>・酸素濃度5 nM レベルの Km 値をもつ</li> </ul>
bd-II 型	<i>cbdAB</i>	有酸素環境下でグルコース欠乏時に高発現

大腸菌に存在する3種類のシトクロム末端酸化酵素について示した。これらの酵素は酸素濃度や栄養条件で発現レベルが変化するという特徴をもつ。

フラボタンパク質は、FAD や FMN 等のフラビン補酵素を含むタンパク質であり、酸化還元酵素であるグルタチオン還元酵素やリポアミド脱水素酵素、グルタミン酸合成酵素が知られている。フラボタンパク質を介する発生経路では、フラボタンパク質の活性中心に存在する還元型フラビンと酸素が偶発的に衝突することで、過酸化水素またはスーパーオキシドが生成する。大腸菌で存在するフラボタンパク質の中で、主に活性酸素の産生に関わるのがアスパラギン酸オキシダーゼ(*nadB*)とフマル酸還元酵素(*frdAB*)である。大気条件（酸素濃度21%）、最小培地で培養した場合、アスパラギン酸オキシダーゼとフマル酸還元酵素が主に過酸化水素を生成するという報告がある[21, 22]。これらの過酸化水素産生経路について、アスパラギン酸オキシダーゼによる経路について説明する。嫌気環境においてアスパラギン酸オキシダーゼがアスパラギン酸を基質として酸化する際に電子を直接フマル酸に渡す。しかし、有酸素環境下ではTCA回路が活発に働くことでフマル酸が不足するため、フマル酸の代わりに酸素を電子受容体とし、還元することによって過酸化水素が生成すると考えられている(図2A)。また、フマル酸還元酵素については、嫌気環境下では豊富に存在するフマル酸を基質として還元するが、有酸素環境下ではフマル酸が不足するため電子受容体として酸素を利用することで過酸化水素が生成する(図2B) [21]。しかし、通常の場合、細胞膜のキノンやメナキノン、酸化型ユビキノンから電子伝達系のシトクロム末端酸化酵素(Cyd)に電子が移動し、その電子は酸素を水に変換する際に利用される。その結果、多くの電子がシトクロム末端酸化酵素で消費されるため、アスパラギン酸オキシダーゼやフマル酸還元酵素による酸素の還元は抑制されると考えられている。



主な大腸菌の活性酸素発生経路は上記の二つの経路である。しかし、現段階において、大腸菌における活性酸素産生機構の研究は、研究室レベルでの環境における研究しかされていない。そのため、自然環境下における活性酸素産生機構は異なる挙動を示す可能性がある。

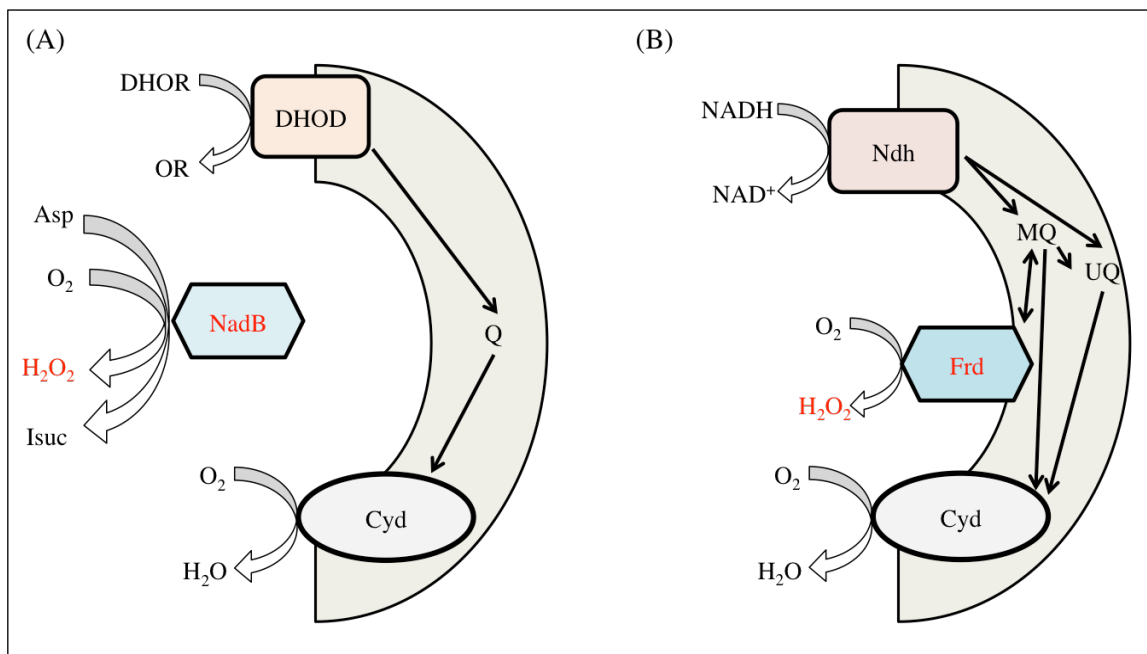


図 2 有酸素環境下におけるフラボタンパク質の活性酸素生成モデル

(A) アスパラギン酸オキシダーゼ(NadB)による活性酸素生成。酸素が存在する場合は、アスパラギン酸(Asp)を酸化する過程において、電子受容体として酸素を利用する場合があります、その結果として過酸化水素が産生する。酸素が還元される段階で過酸化水素が生じる。DHOD: ジヒドロオロト酸オキシダーゼ, DHOR; ジヒドロオロト酸, OR; オロト酸, Q: キノンプール, Isuc: イミノコハク酸, Cyd: シトクロム末端酸化酵素

(B) フマル酸還元酵素(Frd)による過酸化水素生成。有酸素環境において、NADH から電子を受容した NADH デヒドロゲナーゼ(Ndh)が、メナキノン(MQ)、またはユビキノロン(UQ)へ電子を渡す。メナキノンからフマル酸還元酵素に電子が移動すると、酸素を還元し、過酸化水素が生じる。

#### 4. 大腸菌における活性酸素消去系

細胞内で生じた活性酸素は、反応性の高さから細胞の構成成分を損傷する。しかし、生物は活性酸素に対して防御機構を備えている。大腸菌には、スーパーオキシドに対してスーパーオキシドジスムターゼ、過酸化水素に対してアルキルヒドロキシペルオキシダーゼ(AhpCF)とカタラーゼといった消去酵素が存在する(表 2)。

**表 2 活性酸素消去酵素**

スーパーオキシド ジスムターゼ	Cu-ZnSOD ( <i>sodC</i> )	ペリプラズムで発現。 スーパーオキシドを過酸化水素に変換する。
	MnSOD ( <i>sodA</i> )	細胞質で発現し、スーパーオキシドを過酸化水素に変換する。
	FeSOD ( <i>sodB</i> )	MnSOD ( <i>sodA</i> ) は、スーパーオキシドストレスに応答して働く SoxSR システムによって発現が制御される。
カタラーゼ	HPI ( <i>katG</i> )	定常期に発現。過剰に発生した過酸化水素を消去する。 過酸化水素ストレスレギュレーター OxyR タンパク質によって発現を制御される HPI が主に働く。
	HPII ( <i>katE</i> )	
	AhpCF ( <i>ahpC ahpF</i> )	生理的濃度の過酸化水素を消去する。 過酸化水素ストレスレギュレーターである OxyR タンパク質によって発現が制御される。

大腸菌における活性酸素の消去に関わる酵素。スーパーオキシドは3種類の SOD によって消去される。スーパーオキシドは膜を透過することができないため、発生した部位特異的に SOD によって過酸化水素に変換される。過酸化水素は主に2種類のカタラーゼとアルキルヒドロキシペルオキシダーゼによって消去される。

スーパーオキシドは細胞膜を通過できないため、発生した部位における特異的な SOD が働く。ペリプラズム内では、Cu-Zn SOD (*sodC*)、細胞質内では Mn SOD (*sodA*)、Fe-SOD (*sodB*)の3種類がスーパーオキシドの消去に携わる。過酸化水素は細胞膜を通過できるため部位特異的な消去酵素の使い分けはないが、細胞の状態によって使い分けられている。AhpCF は対数増殖期において発現レベルが増加し、過酸化水素が生理的濃度の時に働く[23]。また、カタラーゼは HPI (*katG*)と HPII (*katE*)があり、主に HPI が働いており、過酸化水素が過剰量の場合に消去する。*ahpC* と *katG* は、過酸化水素レギュレーターである OxyR タンパク質によって転写制御され、*katE* は RpoS による発現制御によって定常期においてのみ発現する[24]。

上記の活性酸素消去酵素によって、定常期の大腸菌細胞内はスーパーオキシドを

0.2 nM 以下、過酸化水素を 50 nM 以下という非常に低い濃度で維持すると推定されている[25]。大腸菌細胞内の直接的な活性酸素濃度測定は、非常に困難であると言われているため、上記の細胞内活性酸素濃度の推定は、カタラーゼ及びアルキルヒドロキシペルオキシダーゼといった全ての過酸化水素消去酵素を欠損させた Hpx 株が利用されている。この株は、過酸化水素を水に変換できないため、通常の細胞より過酸化水素濃度が高くなる。Hpx 株の培養細胞を用いてペルオキシダーゼ酵素反応によって過酸化水素を検出し、検出した過酸化水素レベルから求めた過酸化水素産生速度とアルキルヒドロキシペルオキシダーゼによる過酸化水素分解速度によって、細胞内過酸化水素濃度を推定している[23]。しかし、大腸菌の野生株の活性酸素濃度は、Hpx 株と比較して低いと考えられるため、生理条件下における直接的な活性酸素濃度の測定は報告されていない。

## 5. 活性酸素による酸化 DNA 損傷と修復機構について

活性酸素による酸化 DNA 損傷として知られているのが、チミングリコールや DNA 二本鎖切断、8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) 等である。チミングリコールや DNA 二本鎖切断は、複製フォークの進行を阻害する損傷であり、損傷が修復されずにそのままの状態が続くと細胞死を引き起こす。複製阻害型の損傷に対して、損傷乗り越え修復(TLS)や組換え修復が働き、阻害された複製の進行を回復させることが知られている。しかし、損傷乗り越え修復は突然変異を誘発し、組換え修復は染色体異常を引き起こすという問題点がある。それに対して、8-oxoG は複製フォークの進行を阻害しないため複製は継続できるが、高い確率でミスペアを形成することから、複製により損傷が突然変異に固定される。そのため、非常に高い変異原性があると言える。

8-oxoG は、非常に反応性の高い活性酸素であるヒドロキシラジカルによって生成する。ヒドロキシラジカルは過酸化水素と二価の金属イオン（主に鉄イオン）がフェントン反応を引き起こすことで生じ(図 1)、非常に高い酸化力によって直接 DNA を酸化する事が可能である[26, 27]。

8-oxoG は、DNA 複製の段階においてシトシンと対合する頻度と同じ頻度でアデニンと誤対合する(図 3)。さらに、誤対合したアデニンがチミンと対合することによって、GC→TA トランスバージョン変異が引き起こされる(図 4)。つまり、8-oxoG が突然変異を誘発するためには最低でも二回の DNA 複製が必要である。

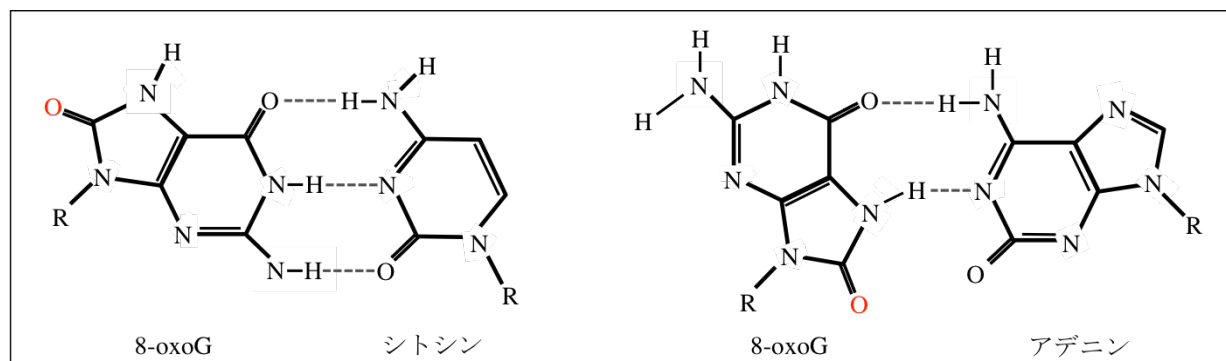


図 3 8-oxoG との対合

左図は 8-oxoG とシトシンの正常な対合であり、右図が 8-oxoG とアデニンの誤対合である。

また、8-oxoGは大腸菌だけでなく、ヒトにおいても生成する事が知られている。そのため、ほとんどの生物には8-oxoGに起因する突然変異を抑制するための除去酵素が存在する。大腸菌においては、8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼ(*mutM*)とアデニン DNA グリコシラーゼ(*mutY*)が、その役割を担っている。またヒトにおいては MutM と MutY のホモログとして、それぞれ OGG1 と MYT が存在する。これらの酵素の働きとしては、MutM が 8-oxoG を DNA 鎖から除去し、MutY が 8-oxoG と誤対合したアデニンを除去する(図 4)。また、これらのグリコシラーゼが協調的に 8-oxoG による突然変異の誘発の発生は低い頻度に抑えられている。また、遺伝学の研究において、*mutM* 遺伝子と *mutY* 遺伝子を欠損させた大腸菌株( $\Delta mutM \Delta mutY$  株)は、8-oxoG に起因する GC→TA トランスバージョン変異を全く修復できないことから、8-oxoG を鋭敏に検出することができるツールとして利用が可能である。さらに、ヒドロキシラジカルによる主な酸化 DNA 損傷は 8-oxoG と言われており、8-oxoG を指標として研究を進めることは、酸化 DNA 損傷全体のレベルを推定することができる。

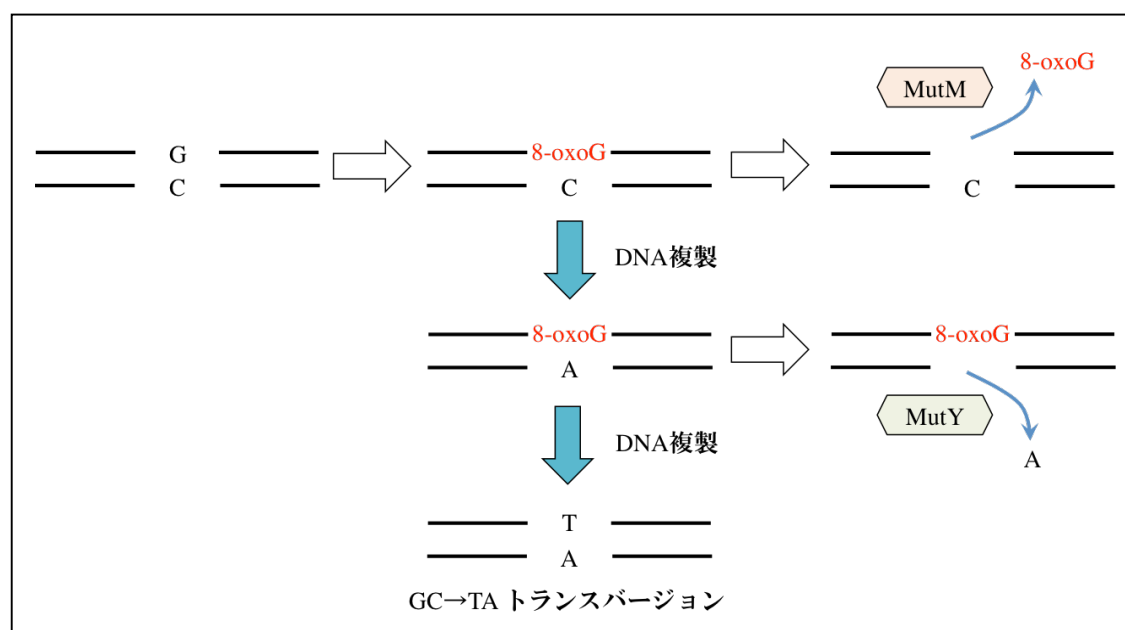


図 4 8-oxoG による突然変異誘発と除去酵素

ヒドロキシラジカルによって生成した 8-oxoG は、DNA 複製の段階で通常であればシトシンと対合するが、同じ割合でアデニンと誤対合する。誤対合したアデニンとチミンが対合することで GC→TA 突然変異が誘発する。8-oxoG 由来の突然変異を抑制するのが MutM と MutY の二種類の酵素であり、MutM は 8-oxoG の除去、MutY は誤対合した A を除去する。これらの DNA グリコシラーゼによって損傷塩基除去後、AP エンドヌクレアーゼとエキソヌクレアーゼが AP 部位を完全に除去する。そして DNA ポリメラーゼ I によって新しい塩基を挿入し、DNA リガーゼによってニックが埋められることで 8-oxoG による損傷が修復される。

## 6. 本研究の目的

当研究室では、8-oxoG 由来の突然変異を全く抑制できない大腸菌  $\Delta mutM \Delta mutY$  株を用いた研究により、生育環境 (栄養、pH、温度、酸素濃度) の違いが 8-oxoG による突然変異頻度に大きな影響を与えることを見出した。大腸菌において酸化 DNA 損傷の原因である活性酸素の発生原因は、酸素とフラボタンパク質が偶発的に衝突した場合か、シトクロム末端酸化酵素から過剰に電子を受け取った場合と考えたため、細胞内の活性酸素レベルは細胞外の酸素濃度が大きく影響すると推測した。そこで、本研究は活性酸素の発生に直接的に関与する細胞外の酸素濃度に注目した。

以前、当研究室の坂井らは、 $\Delta mutM \Delta mutY$  株を用いて酸素濃度の違いに注目し GC→TA 突然変異を測定した[16]。大腸菌を嫌気チャンバー内で、オキシレースを添加した培地で完全嫌気培養(酸素濃度 0%)をした場合と、大気条件下で酸素培養(21%)した場合、酸素濃度 0.1%で培養後に有酸素環境(21%)にシフトした場合 (以下「酸素シフト処理」とする) の GC→TA 突然変異頻度を測定した(図 5)。その結果、SA811 株 ( $\Delta mutM \Delta mutY$  株)の突然変異頻度は有酸素培養では  $6.5 \times 10^{-6}$  であったが、完全嫌気培養では  $1.6 \times 10^{-8}$  まで低下した(図 6)。したがって、空気中の酸素の影響を排除した場合、8-oxoG に起因する突然変異頻度は  $1.6 \times 10^{-8}$  と非常に低くなったため[15]、細胞内のヒドロキシラジカルも非常に低いレベルであると推測した。しかし、酸素シフト処理を行った場合、突然変異頻度は完全嫌気培養と比較して約 2 万倍上昇した(図 6) [16]。これまで、大腸菌野生株を高圧酸素条件下において培養した場合、SOD 欠損株と同様の表現形を示すことが報告されている[51]。この報告から、細胞内の活性酸素レベルは細胞外の酸素濃度と比例すると予想できる。したがって、酸素シフト処理により GC→TA 変異頻度が上昇した原因は、低酸素環境で順応していた細胞内に大量の酸素が流入したことにより、酸素呼吸や活性酸素消去に不応答や変化が生じ、短時間で大量のヒドロキシラジカルが産生されたことが 8-oxoG 増加の原因であると推定した。また、野生株の GC→TA 突然変異頻度は非常に低く、酸素シフト処理では検出不可能であった(図 6)。よって、大腸菌の MutM と MutY タンパク質は非常に高い修復能があることが示された。これらのことから、酸素濃度の急激な変化は、酸素呼吸や活性酸素消去に大きな影響を与えるが、高い修復能をもつ酵素によって表現形としては現れないと説明できる。

通性嫌気性である大腸菌において環境中の酸素濃度の違いが与える代謝の変化や酸化 DNA 損傷の発生メカニズムを解明することが可能である。さらに、環境中の酸素濃度の変化が酸化 DNA 損傷誘発へ与える影響を調べることは生物学的に重要であると考え、本研究では「酸素シフト処理における 8-oxoG 誘発の分子機構の解明」を目的とした。また、研究の進展に伴い、低酸素環境において細胞内活性酸素レベルと酸化 DNA 損傷の誘発レベルが上昇するという現象を発見したため、「低酸素環境下における過酸化水素レベルの上昇と 8-oxoG 誘発の分子機構の解明」を新たな目的として研究を行った。

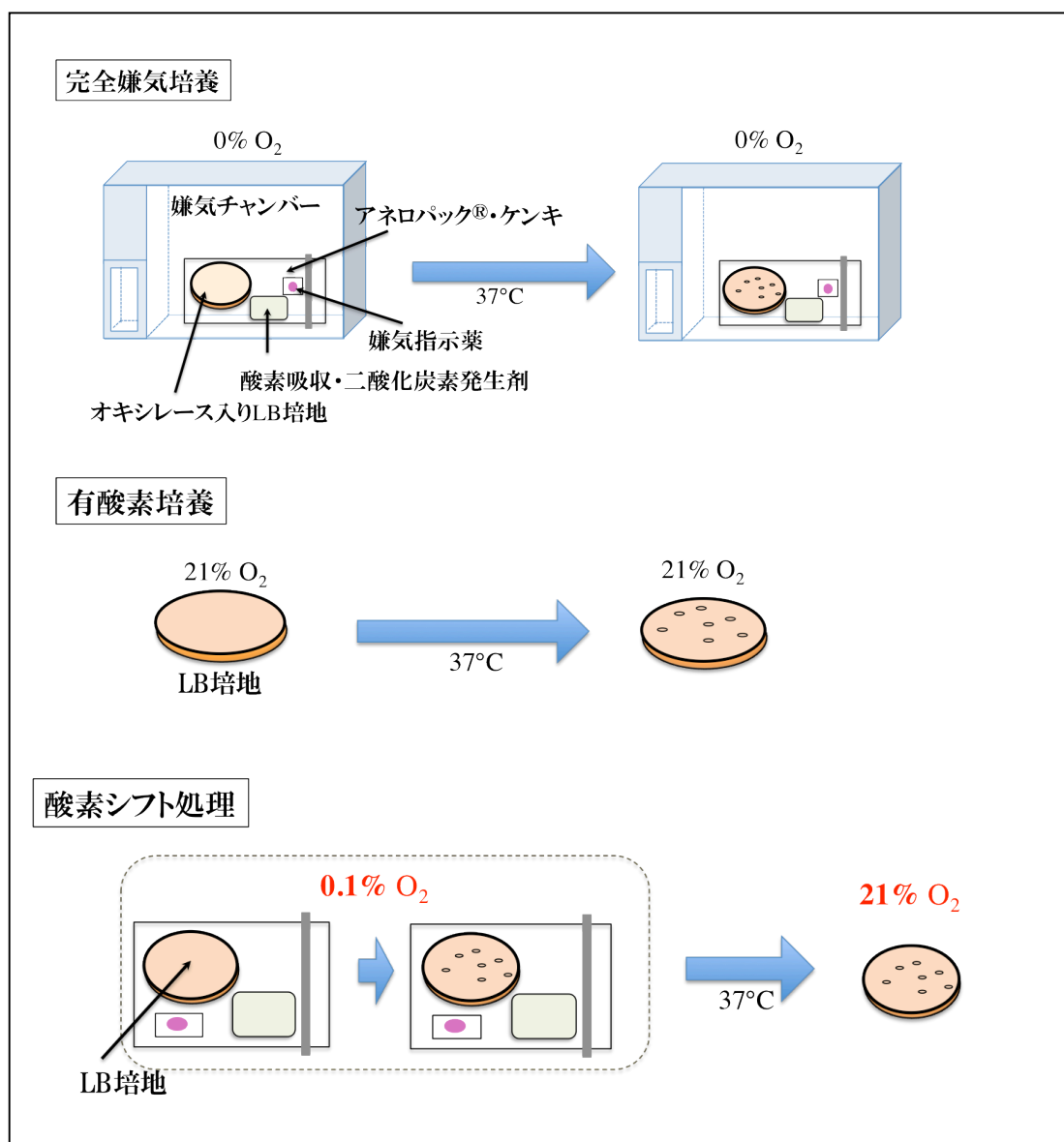


図 5 酸素濃度の違いによる培養方法の違い

完全嫌気培養は、嫌気チャンバー、オキシレース、アネロパック、ケンキ(酸素吸収・二酸化炭素発生剤)、嫌気指示薬を利用して、酸素濃度 0%の環境を作った。また全ての行程を嫌気チャンバー内で行う事で、大腸菌を完全に嫌気状態で培養している。有酸素培養は、研究室において大気中の酸素濃度 (21%) の中で大腸菌を生育させた。酸素シフト処理は、アネロパック、ケンキ(酸素吸収・二酸化炭素発生剤)、嫌気指示薬を利用する事で簡易的に低酸素状態 (0.1%) を作っている。低酸素培養後、有酸素状態に移すことで急激な酸素濃度の上昇に大腸菌を曝した。

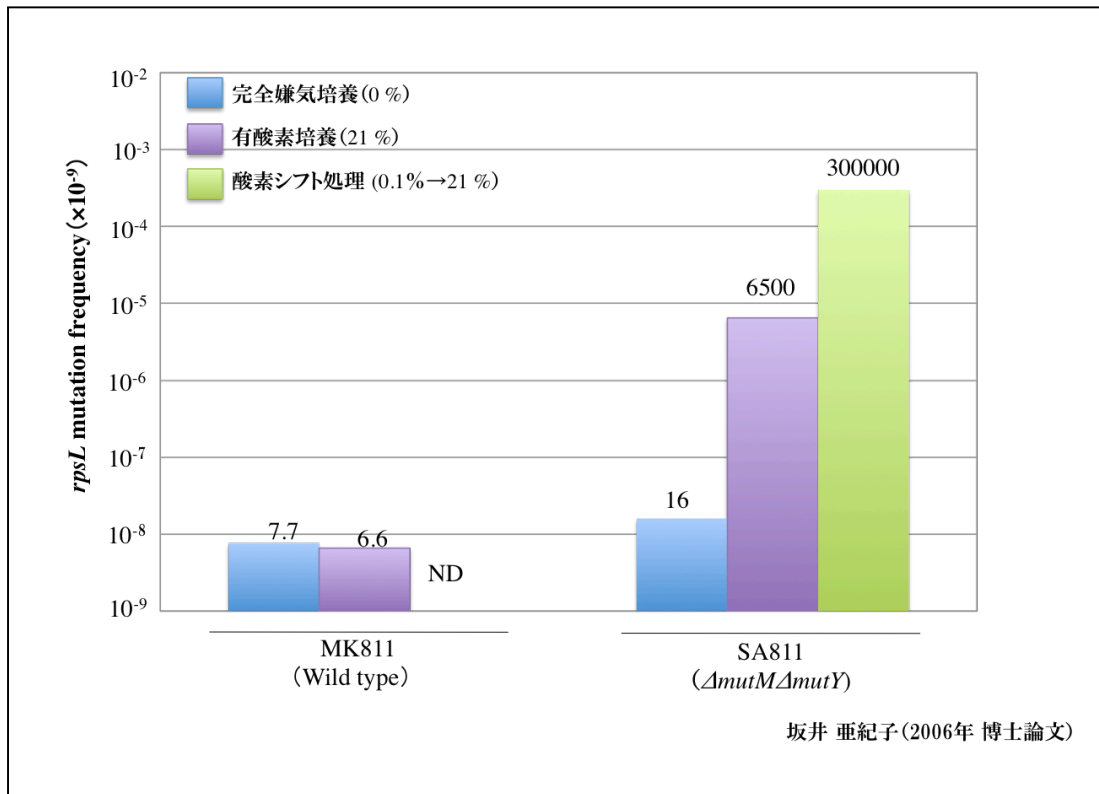


図 6 酸素濃度の違いと 8-oxoG 由来の突然変異頻度

有酸素培養、完全嫌気培養、酸素シフト処理における野生株(MK811)と  $\Delta mutM\Delta mutY$  株(SA811)の GC→TA 突然変異頻度。酸素シフト処理の野生株は検出されなかったため、ND と表示している。 $\Delta mutM\Delta mutY$  株における酸素シフト処理の GC→TA 突然変異頻度は、完全嫌気培養と比較して約 2 万倍であることから、急激な酸素濃度の上昇は酸化 DNA 損傷を爆発的に増加させると考えられる。



## 第2章 材料と方法

## 1. 材料

### ① 菌株

本研究室で使用した菌株は、全て K-12 株由来であり、それらの遺伝子型と由来は表 3 に示した。

表 3 菌株リスト

菌株名	遺伝子型	由来
MG1655	LAM- <i>rph-1</i>	当研究室ストック
MG1655+pTN247	MG1655, pTN247	本研究室にて作製
MG1655+pTN249	MG1655, pTN249	本研究室にて作製
MK7180	MG1655 $\Delta$ <i>mutM</i> , $\Delta$ <i>mutY</i>	当研究室ストック
MK7180+pTN247	MG1655 $\Delta$ <i>mutM</i> , $\Delta$ <i>mutY</i> , pTN247	本研究室にて作製
MK7180+pTN249	MG1655 $\Delta$ <i>mutM</i> , $\Delta$ <i>mutY</i> , pTN249	本研究室にて作製
BM25113	BD792 <i>lacI<sup>q</sup> rrB<sub>T14</sub> <math>\Delta</math>lacZ<sub>WJ16</sub> hsdR514</i> <i><math>\Delta</math>araBAD<sub>AH33</sub> thaBAD<sub>LD78</sub></i>	当研究室ストック
BM25113+pKD13	BM25113, pKD13	当研究室ストック
BM25113+pKD46	BM25113, pKD46	当研究室ストック
MK9300	BM25113 $\Delta$ <i>cyoABCD::km<sup>r</sup></i>	本研究室にて作製
MK9306	MK7180 $\Delta$ <i>cyoABCD::km<sup>r</sup></i>	本研究室にて作製
MK9310	MK7180 $\Delta$ <i>cyoABCD</i>	本研究室にて作製
MK9310+pTN249	MK9310, pTN249	本研究室にて作製
MK9301	BM25113 $\Delta$ <i>cydAB::km<sup>r</sup></i>	本研究室にて作製
MK9305	MK7180 $\Delta$ <i>cydAB::km<sup>r</sup></i>	本研究室にて作製
MK9313	MK7180 $\Delta$ <i>cydAB</i>	本研究室にて作製
MK9313+pTN249	MK9313, pTN249	本研究室にて作製
MK9302	BM25113 $\Delta$ <i>cbdAB::km<sup>r</sup></i>	本研究室にて作製
MK9307	MK7180 $\Delta$ <i>cbdAB::km<sup>r</sup></i>	本研究室にて作製
MK9312	MK7180 $\Delta$ <i>cbdAB</i>	本研究室にて作製
MK9312+pTN249	MK9307, pTN249	本研究室にて作製
MK9326	MG1655 $\Delta$ <i>cyoABCD <math>\Delta</math>cbdAB::km<sup>r</sup></i>	本研究室にて作製
MK9327	MG1655 $\Delta$ <i>cyoABCD <math>\Delta</math>cbdAB</i>	本研究室にて作製
MK9328	MG1655 $\Delta$ <i>cyoABCD <math>\Delta</math>cbdAB <math>\Delta</math>cydAB::km<sup>r</sup></i>	本研究室にて作製
MK9329	MG1655 $\Delta$ <i>cyoABCD <math>\Delta</math>cbdAB <math>\Delta</math>cydAB</i>	本研究室にて作製
MK9329+pTN249	MK9329, pTN249	本研究室にて作製
JW4115	BW25113 $\Delta$ <i>frdA::km<sup>r</sup></i>	本学システム微生物学研究室 森浩禎先生

MK9316	MK7180 $\Delta frdA::km^r$	本研究室にて作製
MK9320	MK7180 $\Delta frdA$	本研究室にて作製
MK9320 + pTN247	MK9320, pTN247	本研究室にて作製
MK9320 + pTN249	MK9320, pTN249	本研究室にて作製
JW2558	BW25113 $\Delta nadB::km^r$	本学システム微生物学研究室 森浩禎先生
MK9318	MK7180 $\Delta nadB::km^r$	本研究室にて作製
MK9323	MK7180 $\Delta nadB$	本研究室にて作製
MK9323+pTN247	MK9323, pTN247	本研究室にて作製
MK9323+pTN249	MK9323, pTN249	本研究室にて作製

## ② プラスミド

本研究で使用したプラスミド名、遺伝子型、由来を表 4 に示した。

表 4 プラスミドリスト

プラスミド名	遺伝子型	由来
pKD46	$\lambda$ Red recombinase, <i>araC-P<sub>araB</sub></i> , Ap <sup>r</sup>	Datsenko <i>et al.</i> , 2000
pKD13	<i>km<sup>r</sup></i> (FRT)	Datsenko <i>et al.</i> , 2000
pCP20	FLP, <i>amp<sup>r</sup></i> , <i>cm<sup>r</sup></i>	Datsenko <i>et al.</i> , 2000
pTN247	<i>soxS</i> -GFP, pSTV29	Nakayashiki <i>et al.</i> , 2013
pTN249	<i>ahpC</i> -GFP, pSTV29	Nakayashiki <i>et al.</i> , 2013

## ③ プライマー

One-step gene disruption 法を用いた遺伝子破壊株の作製で用いたプライマーを表 5 に示した。オリゴマーDNA は Integrated DNA Technologies 社に委託し、HPLC 精製したものを TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA) に溶解して、-30°C で保存した。使用時は、氷上で溶解し、適当な濃度に希釈して用いた。

表 5 遺伝子破壊株作成用プライマーリスト

名称	標的遺伝子	プライマー配列
dCYO-F	<i>cyoABCD</i>	ATGAGACTCAGGAAATACAATAAAAGTTTGGGATGGTTGTC ATTATTTGCAGGCACTGTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
dCYO-R	<i>cyoABCD</i>	TTAGTGCATCATCATGTTGTAGTTGAGGTTCCACATAATCCA GATGGAGCCTACAACCAGATTCCGGGGATCCGTCGACC

dCYD-F	<i>cydAB</i>	TGTGCCACTGACGCTCGGTATGGCGTTCCTGCTGGCCATTAT GGAACGGTCTACGTCCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
dCYD-R	<i>cydAB</i>	TACAGAGAGTGGGTGTTACGTTCAATATCTTCTTTGGTGATA CGACCGAACATTTTCCAGATTCCGGGGATCCGTCGACC
dCBD-F	<i>cbdAB</i>	ATGTGGGATGTCATTGATTTATCGCGCTGGCAGTTTGCTCTG ACCGCGCTGTATCACTTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
dCBD-R	<i>cbdAB</i>	TTAGTACAACCTCGTTTTTCGTTACGGCGGAGAGTTTCTGTTGT CATGCGCCCCACATTTTATTCCGGGGATCCGTCGACC

※下線の引いてある配列は pKD13 上に存在する priming site 1 と相同な領域であり、イタリック体で示した配列は同様に pKD13 上に存在する priming site 4 と相同な領域である。

遺伝子破壊株作製の際に、遺伝子の破壊を確認するために使用したプライマーを表 6 に示した。オリゴマーDNA は Integrated DNA Technologies 社に委託し、HPLC 精製したものを TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA) に溶解して、-30℃で保存した。使用時は、氷上で溶解し、適当な濃度に希釈して用いた。

表 6 遺伝子破壊株確認用プライマー

名称	標的遺伝子	プライマー配列
SA1	<i>mutM</i>	ATCCAGTGTTTCGCCAGCACGT
SA2	<i>mutM</i>	CATCAGGCGCTGATGGCGAAG
SA3	<i>mutY</i>	GTTGCCGGATGCAAGCATGATAAG
SA4	<i>mutY</i>	CTGACCTTCTGCTTCACGTTGC
cCYO-F	<i>cyoABCD</i>	ATAACGCCCTTTTGCAACAG
cCYO-R	<i>cyoABCD</i>	GTAAACACACAACCCGACGCCACA
cCYD-F	<i>cydAB</i>	AAAGAATTAAGGTCAACCG
cCYD-R	<i>cydAB</i>	CGCCCGCAGGGGGCGCTTGTCAT
cCBD-F	<i>cbdAB</i>	GCTTAGCGAGGTATGTCAGT
cCBD-R	<i>cbdAB</i>	ATGTTTCCGCTTTTCATATCTGACA
cFRDA-F	<i>frdA</i>	GCACTCCACGATCGGCAAAG
cFRDA-R	<i>frdA</i>	CTGGGTTTCAGGCCAAACTGC
cNADB-F	<i>nadB</i>	TTCCACGCGCTATCGAAACG
cNADB-R	<i>nadB</i>	CGTGGCAGAGCGGATTAAC

#### ④ P1 フェージ

P1 フェージは、当研究室でストックしている P1 *vir* を必要に応じて希釈して用いた。

#### ⑤ 試薬・培地

##### (a) 試薬

一般的な試薬は、特に記載がない限り、和光純薬工業、ナカライテスク、または Sigma 社から購入したものを使用した。また同様に記載がない限り、培地作製は脱イオン水を用い、その他の試薬の調製には MilliQ 水を使用した。

本研究で使用した ExTaq ポリメラーゼ、dNTP mix、制限酵素は TAKARA 社、rTaq ポリメラーゼは Bio Academia 社製である。

本研究で使用した抗生物質は、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール、リファンピシンである。これらの抗生物質は和光純薬工業から購入した。アンピシリン (Amp) とカナマイシン (Km) は、それぞれ 50 mg/ml になるよう milliQ 水で溶解し、それぞれ最終濃度 50 µg/ml で使用した。またクロラムフェニコール (Cm) とリファンピシン (Rif) は、メタノールでそれぞれ 50 mg/ml、10 mg/ml になるよう溶解し、最終濃度 25 µg/ml と 100 µg/ml で使用した。

GFP 蛍光レベルの測定に使用するサンプル調製のために行うコロニー回収溶液は、1×M9 salts にアジ化ナトリウム (終濃度 2%) を添加したものを使用した。M9 salts は、A Short course in Bacterial Genetics (J. H Miller, 1992) を一部改変して作製した。5×M9 salts は以下のように調製した。【210 mM リン酸水素二ナトリウム( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 110 mM リン酸二水素カリウム( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 43 mM 塩化ナトリウム( $\text{NaCl}$ ), 94 mM 塩化アンモニウム( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )】をオートクレーブ(121°C, 20 分)で高圧蒸気滅菌を行った。使用する際は、オートクレーブ済みの MilliQ 水に希釈し、1×M9 salts として使用した。またアジ化ナトリウムは、20 %(w/v)アジ化ナトリウムになるよう milliQ 水で溶解し、コロニー回収で使用する際は 2 %(w/v)になるよう 1×M9 salts に添加した。

リン酸緩衝生理食塩水は以下のように調製した。【2 mM リン酸二水素カリウム( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 2.7 mM 塩化カリウム( $\text{KCl}$ ), 10mM リン酸水素二ナトリウム二水和物( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 137 mM 塩化ナトリウム( $\text{NaCl}$ )】を pH 7.2 になるよう調製後、0.20 µm フィルター (Sigma 社) を用いて滅菌した。

パラコートは、100 mM になるよう milliQ 水に溶解し、0.20 µm フィルター (ADVANTEC®) で滅菌し、遮光して 4°C で保存した。また培地に添加する際は、必要な濃度に希釈し、オートクレーブ済みの LB 寒天培地を 55°C まで冷やしてから添加した。

## (b) 培地

Bacto Tryptone、Bacto yeast extract および Bacto agar は Difco 社から購入した。LB 培地は以下のように調製した。【1% (w/v) Bacto Tryptone、0.5% (w/v) Bacto yeast extract、1% (w/v) NaCl】を pH 7.0 になるように調製後、オートクレーブにて滅菌して使用した。また LB 寒天培地においては 1.5% (w/v) Bacto agar を加え、オートクレーブ(121°C, 20 分)にて高圧蒸気滅菌を行った。抗生物質を添加する場合は、培地を高圧蒸気滅菌し、55°Cに冷ましてからそれぞれの抗生物質を無菌的に添加した。

P1 ファージによる形質導入に用いた R-top agar は、以下のように調製した。

【1%(w/v) Bacto Tryptone, 0.1 %(w/v) Bacto yeast extract, 0.8%(w/v) NaCl, 0.8%(w/v) Bacto agar】をオートクレーブにて滅菌(121°C, 1 分)し、55°Cまで冷まし、【2.0 mM 塩化カルシウム(CaCl<sub>2</sub>)<sup>※1</sup>, 0.1 % glucose<sup>※2</sup>】をさらに加えた。※1 オートクレーブで滅菌した。※2 フィルター滅菌(0.20 μm)した。またプレートで利用する場合は、上記の組成で Bacto agar の最終濃度 1.2%(w/v)になるように調製した。

## 2. 実験方法

### ① プラスミド DNA の精製

プラスミド DNA の精製は、QIAGEN Plasmid Purification kit (QIAGEN 社製)を使用した。適当な抗生物質を含む 5 ml の LB 液体培地にシングルコロニーを植菌し、37°Cで一晩振とう培養した。適当な抗生物質を含む 100 ml の LB 液体培地に一晚培養液を 200 μl を加え、37°C、200 rpm/min で一晚振とう培養した。この培養液を 5200 rpm、4°Cで 15 分間遠心によって集菌を行った (BECMAN 社, ローターJA25.50)。集菌した菌体を 4 ml の P1 緩衝液 (50 mM Tris-Cl(pH 8.0), 10mM EDTA, 100 μg/ml RNaseA)で懸濁した。ここに 4 ml の P2 緩衝液 (200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)) を加え、転倒混和を行い、室温で 5 分間静置した。冷却し P3 緩衝液を 4 ml 加え、転倒混和し、氷上で 15 分間静置した。これを 13000 rpm、4°Cで 30 分間遠心によって集菌を行った (BECMAN 社, ローターJA25.50)。QIAGEN-tip 100 で 4 ml の QBT 緩衝液 (750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15% イソプロパノール (v/v), 0.15% Triton® X-100 (v/v))を加え、平衡化した。プラスミド DNA を含む遠心上清液を素早く回収し、再度 13000 rpm、4°Cで 15 分間遠心した (BECMAN 社, ローターJA25.50)。得られた遠心上清液を素早く回収し、平衡化した QIAGEN-tip 100 に添加し、自然落下させた。QIAGEN-tip 100 に吸着したプラスミド DNA を洗浄するために、10 ml の QC 緩衝液 (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15% イソプロパノール (v/v))、で 2 回洗浄した。次に 5 ml の QF 緩衝液 (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH 8.5), 15% イソプロパノール (v/v))を QIAGEN-tip 100 に添加することで DNA を溶出した。DNA を沈殿させるため、溶出液に 3.5 ml のイソプロパノール (室温) を添加し、ボルテックスにて混和後、13000 rpm、4°Cで 30 分間遠心し (BECMAN 社, ローターJA25.50)、上清を除去した。さらに DNA ペレットを 2 ml の 70%エタノールで加え洗浄し、13000 rpm、室温で 10 分間遠心後

(BECMAN 社, ローターJA25.50)、上清を除去した。風乾後、プラスミド DNA を 500  $\mu$ l の TE (10mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA) に溶解した。

## ② アガロースゲル電気泳動

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 S (ニッポンジーン社製) を使用した。ゲル濃度は DNA の分子量に応じて 1%~1.2% (w/v) で調製した。緩衝液は TAE 緩衝液(40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA (pH 8.0))を用いた。また泳動は、ミューピット泳動槽 (アドバンス社製) を使用し、電圧 100 V で 30~40 分間通電した。泳動後、DNA を染色するためにアガロースゲルを 0.5  $\mu$ g/ml のエチジウムブロマイド溶液に 30 分間浸した。染色後、UV トランスイルミネーター (アート社製) によってゲルに紫外線を照射し、DNA の観察及び、CCD カメラで撮影した。

## ③ プラスミドによる形質転換法

大腸菌びプラスミドを形質転換導入する場合は、塩化カルシウム法を用いた。また One-step gene disruption の際には効率の良いエレクトロポレーション法を用いた。

### a) 塩化カルシウム法による形質転換

#### i. コンピテントセルの作製

LB 液体培地 5 ml に必要な菌株の単コロニーを接種し、30°Cで一晩回転培養を行った。この一晩培養液を LB 液体培地 100 ml に 1 ml 加え、37°C、250 rpm で O.D.<sub>600</sub> が 0.3~0.4 ( $1 \times 10^8$  cells/ml) に達するまで回転培養した(BECKMAN 社製 DU640 spectrophotometer)。培養液を冷却した滅菌遠心管(50 ml) 2 本に分注し、氷上で 10 分間静置した。4°C、5500 rpm,で 10 分間遠心し (TOMY 社製、MX-307)、上清を完全に除去した。得られた菌体に冷却した MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> 溶液 (80 mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM CaCl<sub>2</sub>) を 30 ml 加え、懸濁した。さらに 4°C、5500 rpm,で 10 分間遠心し (TOMY 社製、MX-307)、上清を完全に除去した。冷却した 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 1 ml を菌体に添加し、再懸濁した。これを滅菌した 1.5 ml のマイクロチューブに 200  $\mu$ l ずつ分注した。

#### ii. プラスミド DNA の導入

コンピテンドセル 200  $\mu$ l にプラスミド DNA (50 ng/10  $\mu$ l) 加え、緩やかに混和し、氷上で 20 分間静置した。42°Cで 90 秒間のヒートショックを与え、すぐに氷上に戻し、2 分間静置した。SOC 培地を 800  $\mu$ l 加え、適当な温度にて 90 分間回転培養を行った。培養後、適当な抗生物質を加えた LB 寒天培地に原液を塗布し、適当な温度で静置培養した。得られらコロニーを選択し、2 回の画線培養にて純化を行った。最後に得られた単コロニーを適当な抗生物質を加えた LB 液体培地にて一晩培養し、培養液に最終濃度 15%になるようにグリセロールを加え、液体窒素を用いて凍結させ、-80°Cで

保存した。

## b) エレクトロポレーション法

### i. コンピテントセルの作製

適当な大腸菌株の単コロニーを LB 液体培地 5 ml に接種し、適当な温度にて一晩回転培養を行った。塩濃度を低下した LB 培地【1.0% Bacto trypton (Difco 社), 0.5% Bacto yeast extract (Difco 社), 0.5% NaCl】100 ml に、一晩培養液 0.5 ml を接種した。BW25113 株を使用する際は、10 mM L-アラビノースを添加した。適当な温度、250 rpm で、O.D.<sub>600</sub> が 0.3~0.4 ( $1 \times 10^8$  cells/ml) に達するまで回転培養した(BECKMAN 社製 DU640 spectrophotometer)。培養後、得られた培養液を冷却した滅菌した 50 ml 遠心管 2 本に分注した。4°C、4100 rpm で 15 分間遠心し (TOMY 社製、MX-307)、上清を除去した。得られた菌体に冷却した 10% グリセロール 50 ml を加え、穏やかに懸濁した。さらに 4°C、4100 rpm で 15 分間遠心し (TOMY 社製、MX-307)、上清を除去し、全量が 200  $\mu$ l になるように冷却した GYT 培地を加え、液体を懸濁した。これを 0.5 ml のマイクロチューブに 40  $\mu$ l ずつ分注した。作製したコンピテントセルは液体窒素を用いて凍結した後、-80°C で保存した。この保存したコンピテントセルは、使用時には氷上で溶解して用いた。

### ii. プラスミド DNA の導入

エレクトロポレーションは、*E. coli* Gene Pulser (Bio-Rad 社製) を用いて行った。コンピテントセル 40  $\mu$ l に、プラスミド DNA を 100 ng/1  $\mu$ l 程度加えてよく混和した。冷却した 0.2 cm 感覚のジーンパルサーキューベット(Bio-Rad 社製) にプラスミド DNA 混和培養液を全量移し、氷上で 1 分間静置した。キューベットをジーンパルサーに設置し、電圧 2.5 kV で通電した。通電後は、すぐに SOC 培地 1 ml をキューベットに加え、これを全て大試験管に移し、適当な温度で 2 時間回転培養を行った。培養後、適当な抗生物質を加えた LB 寒天培地に塗布し、適当な温度で静置培養した。得られたコロニーを純化するために、2 回画線培養を行った。得られた形質転換体を液体培養し、最終濃度 15% になるようにグリセロールを添加し、液体窒素を用いて凍結した後、-80°C で保存した。

## ④ P1 ファージを用いた形質導入

突然変異頻度や GFP 蛍光レベルの測定に用いる菌株の background を揃え、標的遺伝子の破壊菌株を作製するために、P1 ファージを用いて形質導入を行った。

### i. P1 溶菌液の調製

目的の遺伝形質と、遺伝形質を導入した菌を選択できる薬剤マーカーを保持した



donor 菌株を画線培養した。得られた単コロニーを適当な薬剤を含む LB 液体培地 5 ml に接種し、適当な温度で一晩回転培養を行った。5 mM CaCl<sub>2</sub> を含む LB 液体培地 5 ml に培養液 50 μl を加え、適当な温度、160 rpm/min で、O.D.<sub>600</sub> が 0.4~0.5 (1×10<sup>8</sup> cells/ml) に達するまで回転培養した(BECKMAN 社製 DU640 spectrophotometer)。この培養液 1 ml を小試験管に取り、P1 ファージ 1.0×10<sup>7</sup> pfu 程度の P1 ファージを加え、37°C で 20 分間保温し、P1 ファージを donor 菌株に感染させた。P1 ファージ混合液と 55°C で保温していた R-top agar 2.5 ml を緩やかに混合し、すばやく R-plate 上に流し込んだ。プレート表面を上に向けたまま 37°C で 8 時間静置培養を行った。培養後の R-plate 表面の R-top agar をコンラージ棒でかきとり、滅菌済み P.P チューブに移した。プレート表面を LB 液体培地 1 ml で洗浄し、洗浄後の LB 培地も滅菌済み P.P チューブに加えた。そこにクロロホルム 100 μl を加え、ボルテックスにて 30 秒間激しく混和した。さらに 4°C、9000 rpm で 20 分間遠心し(TOMY 社製、MX-307)、上清を P.P チューブに回収した。得られた P1 溶菌液にクルルホルム 40 μl を添加し、4°C で保存した。

## ii. 溶菌液による形質導入

目的の遺伝子形質を導入したい recipient 菌株を LB 寒天培地に画線培養した。得られた単コロニーを LB 液体培地 5 ml に接種し、適当な温度で一晩回転培養を行った。この培養液 1 ml を 1.5 ml の滅菌マイクロチューブに移し、20°C、3000 rpm で 5 分間遠心した(TOMY 社製、MX-307)。上清を完全に取り除き、MC buffer (100 mM MgSO<sub>4</sub>、5 mM CaCl<sub>2</sub>) を 1 ml 加え、再懸濁した。この懸濁液 (1.0×10<sup>9</sup> cells/ml 程度) を 100 μl (1.0×10<sup>8</sup> cells 程度) に対して、P1 ファージを 1.0×10<sup>9</sup> pfu、1.0×10<sup>8</sup> pfu、1.0×10<sup>7</sup> pfu 程度を各々混合し、37°C で 20 分間静置し、recipient 菌株に P1 ファージを感染させた。P1 ファージの感染を停止させるために、1 M クエン酸溶液 (pH 5.5) を 200 μl 加えた。薬剤耐性遺伝子の発現を誘導するために、適当な温度で 1 時間静置培養した。培養後は、薬剤に対して耐性を獲得した菌株の選択を行うために、適当な薬剤を含む LB 寒天培地に培養液を 100 μl ずつ塗布した。LB 寒天培地は適当な温度で、静置培養を一晩行った。得られたコロニーを純化するために、適当な抗生物質を含む LB 寒天培地で画線培養を 2 回行った。得られた単コロニーを液体培養し、培養液に最終濃度 15% になるようにグリセロールを加え、液体窒素を用いて凍結させた後、-80°C で保存した。また作製した菌株は、コロニー PCR によって目的の遺伝子の欠損と薬剤耐性遺伝子の導入を確認した。

## ⑤ One-step gene disruption を用いた遺伝子破壊株の作製

### (a) 標的遺伝子と薬剤耐性遺伝子の組換えに用いる断片の作製

シトクロム末端酸化酵素欠損株の作製は、Vasiliy A. Portnoy *et al.* (2008) を参考とし

[28]、プラスミド DNA pKD13 に存在するカナマイシン耐性遺伝子と、その両側に位置する FLP recognition target site を挟んで外側に位置する Priming site 1 の 20 bp、または Priming site 1 の 20 bp を 3'側にして、破壊する遺伝子の近辺領域に相同な 60 bp の配列を 5'側に配置した 80 bp の長さのプライマーを設計した(表 5) [29]。鋳型に利用した pKD13 は「2-①プラスミド DNA の調整」に記載した通りに調製した。

PCR 反応は、5 units/ $\mu$ l Ex Taq polymerase (TAKARA 社)、10 $\times$  Ex Taq buffer、dNTP mix、適当なプライマー (表 5)、鋳型 DNA である pKD13 を用いて行った。反応は 20  $\mu$ l で行い、最終濃度は【1 $\times$  Ex Taq buffer, 0.2 mM dNTP mix, 各 0.4 pmol/10  $\mu$ l プライマー, 1.5 $\times$ 10<sup>-2</sup> U/ $\mu$ l, 1-10 ng/10  $\mu$ l pKD13】とした。反応には Gene Amp PCR System 9600(PERKIN ELIMEX 社製)を用いた。反応条件は 95 $^{\circ}$ C、1 分間、【変性反応：95 $^{\circ}$ C、30 秒、アニーリング反応：55 $^{\circ}$ C、30 秒、伸長反応：72 $^{\circ}$ C、1.5 分】を 30 サイクル繰り返して行い、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分反応させた。PCR 反応後はアガロースゲル電気泳動により、目的の位置にバンドが増幅したことを確認した。

PCR 産物中の鋳型 DNA (pKD13)を除去するために *DpnI* 処理を行った。PCR 産物 50  $\mu$ l に対して、*DpnI* (20 U/ $\mu$ l)を 1 $\mu$ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。反応後、PCR 反応液中のタンパク質を除去するために、フェノール抽出とエタノール沈殿を行い、得られた DNA 断片を TE buffer に溶解した。

## (b) 欠損株の作製

目的の遺伝子を破壊した遺伝子株を作成するために「2-⑤-(a) 標的遺伝子と薬剤耐性遺伝子の組換えに用いる断片の作製」にて作製した DNA 断片を大腸菌株 BW25113 に導入した。BW25113 株は  $\lambda$  Red recombinase をコードする領域が存在し、pKD46 というアラビノースの添加により発現が誘導されるプラスミドを保持している。このため導入した DNA 断片中の Km 体制遺伝子と染色体 DNA 上の不活化する遺伝子を組み換えるために用いた。DNA 断片の導入には、「エレクトロポレーション法」を用いた。pKD46 の発現のために、コンピテントセルの作製には培養液に 10mM L-アラビノースと 100  $\mu$ g/ml アンピシリンを加えた。また培養温度は 30 $^{\circ}$ C で行った。また 1 回の形質転換に用いる DNA 量は 100  $\mu$ g/ml 程度とし、形質転換後の培養も 30 $^{\circ}$ C で行った。形質転換を行った培養液は、適当な抗生物質を含む LB 寒天培地上に塗布し 37 $^{\circ}$ C で培養し、pKD46 を除去した。目的の形質転換体を得るために、適当な抗生物質を含み LB 寒天培地で再度角栓培養した。得られた単コロニーを液体培養し、培養液に最終濃度 15%になるようにグリセロールを加え、液体窒素によって凍結させ、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

突然変異頻度測定と活性酸素レベル測定に利用する菌株の background を揃えるために、MG1655 株を用いて目的の遺伝子形質を持つ菌株を作製した。手法は「2-④ P1 フェージを用いた形質導入」に記載した通りに行った。またシトクロム末端酸化酵素三重欠損株の作製は、*cyoABCD*、*cbdAB*、*cydAB* の順番で遺伝子欠損株を作製した。また作製した菌株については、各段階で、コロニー PCR により表 6 のプライマーを用

いて目的遺伝子の欠損とカナマイシン耐性遺伝子の導入の確認を行った。

### (c) 薬剤耐性遺伝子の除去

目的の遺伝子が不活化した大腸菌株を得るために用いたカナマイシン耐性遺伝子をポップアウトするために、FLPを発現することができるプラスミドである pCP20 の形質転換導入を行った。実験操作は「2-③ (a) 塩化カルシウム法による形質転換」に記載した通りに行い、1回の形質転換には 100 ng 程度のプラスミド DNA を用いた。pCP20 の形質転換導入後は、クロラムフェニコールを含む LB 寒天培地に塗布し、30°C で一晚培養した。得られた形質転換体を 30°C で画線培養し、同時にカナマイシン感受性になっていることを確認した。次に pCP20 を脱落させるために、43°C で画線培養後、クロラムフェニコール感受性になっていることを確認した。作製した菌株について標的遺伝子が欠損していることとカナマイシン耐性遺伝子がポップアウトしていることを確認するために表 6 のプライマーを用いてコロニー PCR により確認した。

## ⑥ 異なる酸素条件による培養方法

本研究では、有酸素環境（酸素濃度 21%）、低酸素環境（酸素濃度 0.1%）、微好気環境（酸素濃度 4~8%）、オキシレース含有培地による嫌気環境によって培養を行った。また低酸素環境において培養後、有酸素環境に大腸菌細胞を移動する酸素シフト処理を行った。

### (a) 有酸素培養（酸素濃度 21%）

有酸素培養は通常の研究室内（大気条件）の酸素濃度での培養である。O<sub>2</sub>メーター（BIONIX 社）を用いて、実験室の酸素濃度を測定した結果、約 21%であった。大腸菌を塗布した LB 寒天培地は、そのままの状態によって 37°C で静置培養した。

### (b) 低酸素培養（酸素濃度 0.1%）

低酸素環境を作り出すために、ケンキ、嫌気指示薬、アネロパック（袋）、密閉リップ（全て三菱ガス化学株式会社製）を利用し、製造元の指示に従った。ケンキは、酸素吸収・二酸化炭素発生剤である。ケンキを用いると 1 時間前後でアネロパック内の酸素濃度を 0.1% にまで低下させ、二酸化炭素ガスを 20% 程度に満たすことで酸素濃度 0.1% を維持することができる。また嫌気指示薬は色によって酸素濃度を観察することができ、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。低酸素培養を行う場合は、使用する前の LB 寒天培地をアネロパック内で脱酸素処理を 3 日間行った。培養する大腸菌株を  $1/3 \times 10^6$  に希釈し、100  $\mu$ l を脱酸素処理した LB 寒天培地に塗布した（希釈倍率は細胞が 100 細胞程度になるようにした）。アネロパック内に菌液を塗布した寒天培地、嫌気指示薬、ケンキの順に入れ、密閉リップでア

ネロパックを密閉した。ケンキはアルミの袋から取り出すとすぐに反応が始まるため、袋から取り出してから1分以内に密閉した。寒天培地等が入ったアネロパックは、プレートが傾かないように37°Cで静置培養した。

#### (c) オキシレース含有培地による嫌気培養

培地中の脱酸素処理を行うオキシレースは Oxyrase for Agar (Oxyrase 社製) を使用し、製造元の指示に従った。オキシレースは-10~-20°Cでラベルの使用期限まで長期保存が可能であり、5回冷解凍ができる。解凍を行う場合は4°Cで一晩静置した。オキシレースを加えたLB寒天培地を作製する際は、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で溶解し、45~48°Cまで冷やした。その後、室温まで温めた Oxyrase for Agar を寒天培地の総量の10%量をフラスコ壁面に沿わせながら加えた。その後すぐにディッシュに適量分配した。その際に気泡がディッシュに存在する場合は、ピペットマンで取り除いた。オキシレース添加培地はすぐに角形ジャー(アネロパック用)に入れ、ケンキによって脱酸素処理を3日間行った。大腸菌株の培養は、「⑥(c) 低酸素培養(酸素濃度0.1%)」に記載した培養と同じ方法で行った。

#### (d) 微好気培養(酸素濃度4~8%)

微好気環境は、微好気、アネロパック(袋)、密閉クリップ(全て三菱ガス化学株式会社製)を利用し、製造元の指示に従った。また微好気培養の酸素濃度を確認するためにBIONIX社のO<sub>2</sub>メーターを使用した。微好気は酸素吸収・二酸化炭素発生剤であり、1時間前後で酸素濃度を6~12%、炭酸ガス濃度を5~8%にする。使用する前のLB寒天培地をアネロパック内で微好気を使用して脱酸素処理を3日間行った。培養する大腸菌株を $1/3 \times 10^6$ に希釈し、100 μlを脱酸素処理したLB寒天培地に塗布した。アネロパック内に菌液を塗布した寒天培地、O<sub>2</sub>メーター、微好気の順に入れ、密閉クリップでアネロパックを密閉した。微ケンキと同様に好気はアルミの袋から取り出すとすぐに反応が始まるため、袋から取り出してから1分以内に密閉した。寒天培地等が入ったアネロパックは、プレートが傾かないように37°Cで静置培養した。またO<sub>2</sub>メーターによってアネロパック内の酸素濃度を随時確認した結果、酸素濃度4~8%の範囲内で維持されていた。

#### (e) 酸素シフト処理(酸素濃度0.1%から21%への移行)

酸素シフト処理は当研究室の坂井らの報告を参考に行った[16]。酸素シフト処理は、低酸素培養(酸素濃度0.1%)した大腸菌細胞を有酸素培養(酸素濃度21%)にシフトする処理である。低酸素培養は「2-⑥(b) 低酸素培養(酸素濃度0.1%)」に記載の通りに行った。出現したコロニーの直径が1.5 mm ( $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9$  cells/ml)に達したら培養をやめ、アネロパックからプレートを取り出した。5分間、プレートを有酸素環境(酸素濃度21%)に曝した後、冷却したLB培地で全てのコロニーを回収し、生菌数測定と変異頻度測定用の寒天培地塗布を行うまでの操作は全て氷上で行った。

## ⑦自然突然変異頻度の測定

### (a) *rpoB* 検出系による突然変異頻度の測定方法

突然変異頻度を測定する菌株を LB 寒天培地に画線し、37°Cで一晩培養した。得られた単コロニーを LB 培地 5 ml に接種し、37°Cで回転培養を一晩行った。この培養液を LB 培地で  $1/3 \times 10^6$  に希釈し、100  $\mu$ l を LB 寒天培地に塗布した（希釈倍率は細胞が 100 細胞程度になるようにした）。希釈液を塗布した LB 寒天培地を 37°Cで静置培養した。希釈液を塗布した LB 寒天培地の培養については「2-⑥ (a) 異なる酸素条件による培養方法」に記載した通りに行った。コロニーの直径が 1.5 mm になるまで培養し ( $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9$  cells/ml)、冷却した LB 液体培地 5 ml で全てのコロニーを回収した。以後、リファンピシンを含む LB 培地に塗布するまで、細胞の増殖を抑制するために回収した菌体は氷上で操作した。回収した菌液を、1 枚のプレート上に適当なコロニー数が得られる濃度まで希釈した。また必要があれば濃縮を行った。生菌数測定には LB 寒天培地、変異体数測定にはリファンピシンを含んだ LB 培地を用いて、それぞれの菌液をプレート上に塗布した(図 7)。生菌数測定には、希釈系列を独立に 3 つ立て、各々 2 枚の LB 寒天培地に塗布した。また変異体数の測定には、リファンピシン含有 LB 寒天培地 3 枚または 4 枚に塗布した。菌液を塗布した寒天培地について、生菌数測定のため菌液を塗布した LB 寒天培地は 37°Cで一晩静置培養し、変異体数測定のため菌液を塗布したリファンピシン含有 LB 寒天培地は遮光して、37°Cで 24 時間静置培養を行った。培養後、各々の寒天培地に出現したコロニー数を測定し、培養液 1 ml あたりの生菌数と変異体数を算出した。さらに算出した 1 ml あたりの変異体数を生菌数で割った値を突然変異頻度とした。この一連の過程を 1 実験区とし、各実験区で求めた突然変異頻度の中央値を各菌株または条件の突然変異頻度とした。

### (b) 中央値の統計解析 (Mann-Whitney 検定)

有意差検定には *Nonparametric Statistics for The Behavioral Science* (Siegel, 1956) に記載されている Mann-Whitney の U-検定法を用いた。

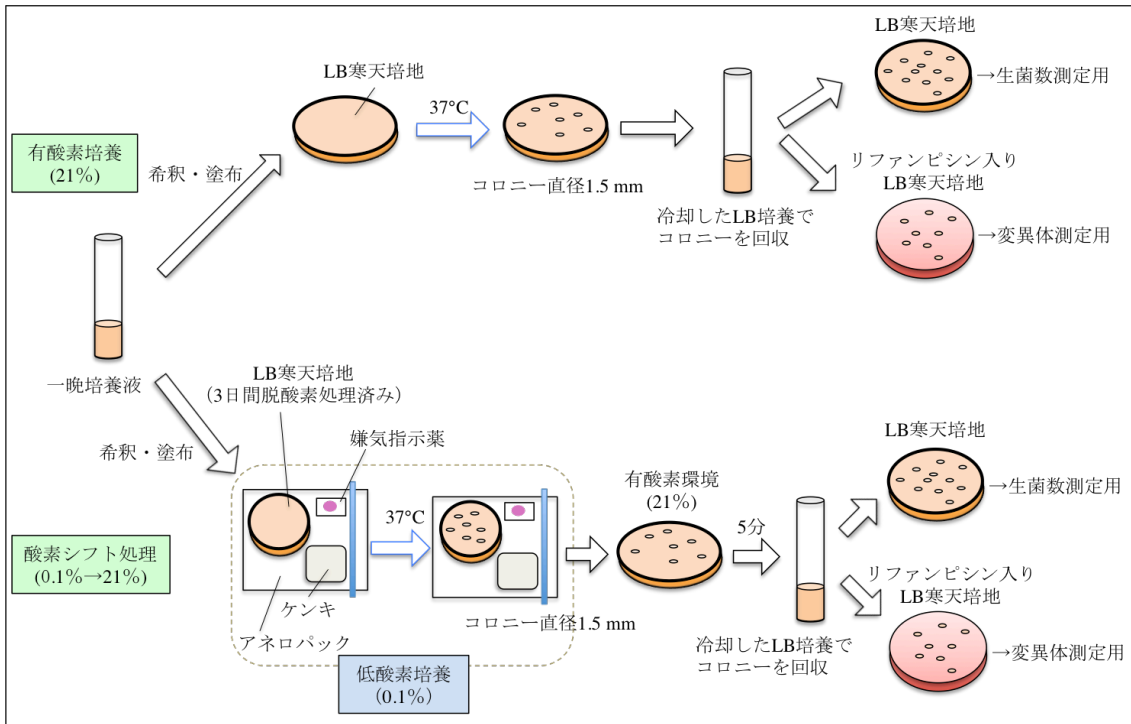


図 7 有酸素培養と酸素シフト処理の突然変異測定方法

上段は有酸素培養（21%）、下段は酸素シフト処理（0.1%から 21%への移行）における突然変異頻度の測定方法である。

## ⑧ レポーター遺伝子アッセイによる GFP 蛍光レベルの測定

### (a) GFP 蛍光レベルにおける *ahpC* 遺伝子と *soxS* 遺伝子の転写レベルの解析

GFP 蛍光レベルを測定することで *ahpC* 遺伝子と *soxS* 遺伝子の転写レベルを測定した。また、*ahpC* 遺伝子と *soxS* 遺伝子の転写レベルは、それぞれ細胞内の過酸化水素レベルとスーパーオキシドレベルを反映する。その原理を以下で説明する。

*ahpC* 遺伝子は、過酸化水素ストレスレギュレーターである OxyR タンパク質によって転写が制御される。OxyR タンパク質に存在する 2 つの SH 基が過酸化水素のセンサーとなる。過酸化水素によって片方の SH 基が SOH 基に酸化され、さらに、酸化されていない SH 基と SOH 基が反応し、最終的に、ジスルフィド結合を形成し、OxyR タンパク質の構造が変化する。この構造の変化によって、OxyR レギュロンのプロモーター領域に結合することができ転写が促進される。*ahpC* 遺伝子は、OxyR タンパク質による転写制御下にある[30] [31]。つまり、活性酸素の OxyR タンパク質の酸化によって *ahpC* 遺伝子の転写が促進するため、*ahpC* 遺伝子の転写レベルは過酸化水素レベルを反映する(図 8)。

*soxS* 遺伝子は、SoxSR システムとして働く SoxS タンパク質をコードする。*soxS* 遺伝子の転写制御を行うのが SoxR 二量体であり、SoxR 二量体はスーパーオキシドによって酸化し、*soxS* 遺伝子の転写を促進する。*soxR* タンパク質の単量体は各々 [2Fe-2S]<sup>+</sup> クラスターを持ち、このクラスターがスーパーオキシドによって酸化し、[2Fe-2S]<sup>2+</sup> となることで *soxS* 遺伝子の転写が促進する[30] [31]。さらに、SoxS タンパク質の転写制御下には *sodA* 遺伝子等が存在する。スーパーオキシドによって、酸化した SoxR が *soxS* 遺伝子の転写を促進するため、*soxS* 遺伝子の転写レベルは細胞内のスーパーオキシドレベルを反映すると考えられる(図 9)。

上記の *ahpC* 遺伝子と *soxS* 遺伝子の転写制御機構を利用して、過酸化水素レベルとスーパーオキシドレベルを解析した。Venus GFP 領域の上流に各々の遺伝子のプロモーター領域と N 末端側の領域 (30~60 塩基) を配列したプラスミド (*ahpC*-GFP プラスミド; pTN249, *soxS*-GFP プラスミド; pTN247) を大腸菌株に導入した[32] [33]。*ahpC*-GFP プラスミドを導入した菌株の GFP 蛍光レベルは細胞内過酸化水素レベルを反映し(図 8)、*soxS*-GFP プラスミドを導入した菌株の GFP 蛍光レベルは細胞内スーパーオキシドレベルを反映する(図 9)。

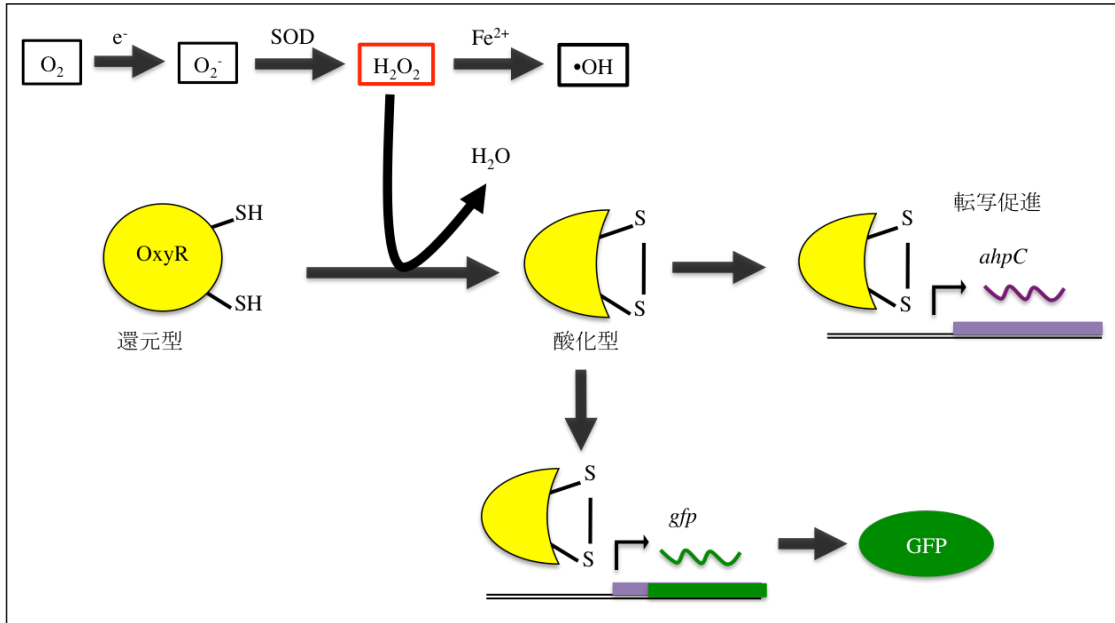


図 8 OxyR の転写制御を利用した GFP 発現機構

過酸化水素によって酸化された OxyR タンパク質が *ahpC* 遺伝子の転写を促進する。*ahpC* 遺伝子のプロモーター領域と N 末端領域の下流に *gfp* 遺伝子を配置することで、GFP 蛍光レベルが過酸化水素レベルを反映する。

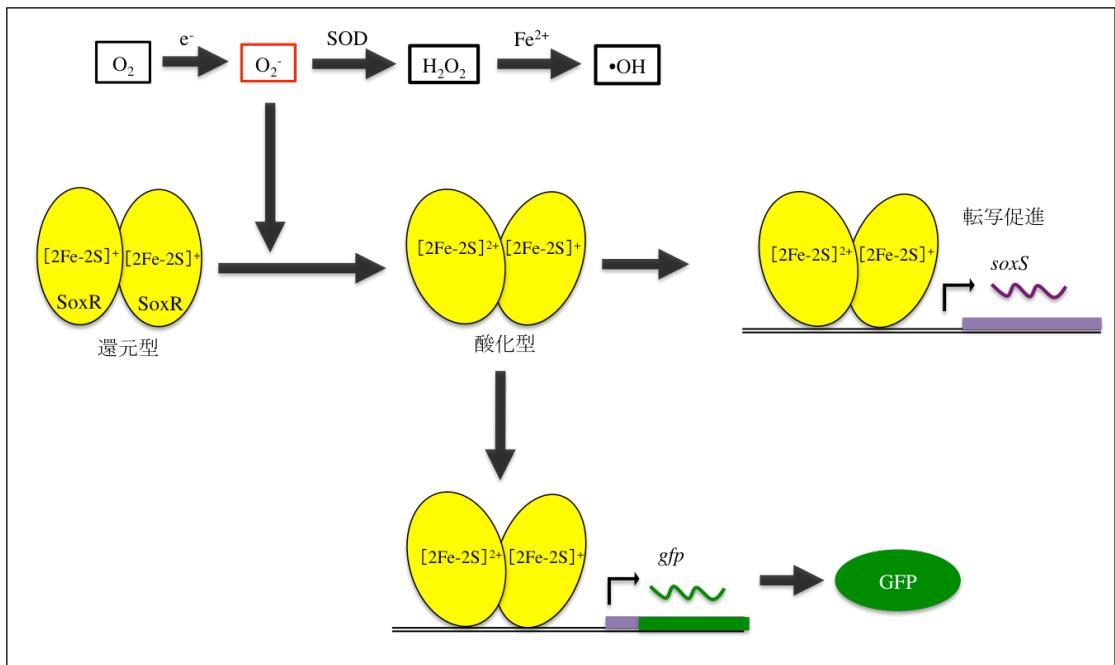


図 9 SoxR の転写制御を利用した GFP の発現機構

過酸化水素によって酸化された SoxR タンパク質が *soxS* 遺伝子の転写を促進する。*soxS* 遺伝子のプロモーター領域と N 末端領域の下流に *gfp* 遺伝子を配置することで、GFP 蛍光レベルが細胞内スーパーオキシドレベルを反映する。



## (b) 低酸素培養と酸素シフト処理の GFP 蛍光レベル測定方法の違い

### i. 低酸素培養

低酸素環境による培養は「2-⑥ (b) 低酸素培養」に記載の通りに行った。出現したコロニーの直径が 1.5 mm ( $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$  cells/ml) に達したら、37°Cのインキュベーターから取り出し、アネロパック内にプレートを入れたまま、氷の入ったアイスボックスに入れ、低温室で1時間静置した。これは、低酸素環境に適応したままの細胞を得るために行い、細胞を冷却することで細胞内代謝を停止させた。細胞の冷却後、低温室でアネロパックからプレートを取り出し、すぐに最終濃度 2%のアジ化ナトリウムを加えた 1×M9 溶液 (室温) 5 ml で全てのコロニーを回収した。

### ii. 酸素シフト処理

酸素シフト処理は低酸素培養後の大腸菌を有酸素環境にシフトした際に、細胞内の酸素濃度を急激に上昇させる処理である。「2-⑥ (b) 低酸素培養」に記載の通りに行った。出現したコロニーの直径が 1.5 mm ( $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$  cells/ml) に達したら、37°Cのインキュベーターから取り出した。有酸素環境に大腸菌細胞をシフトするために、アネロパックからプレートを取り出した。酸素シフト処理による効果を調べるために、酸素シフト処理後に GFP タンパク質が十分に発現することが重要である。そこで、酸素シフト処理後、フタを開けたプレートを 37°Cで 20 分間静置した。そして最終濃度 2%のアジ化ナトリウムを加えた 1×M9 溶液 5 ml で回収した。

## (c) GFP 蛍光レベルの測定方法

GFP 蛍光レベルを *ahpC*-GFP、または *soxS*-GFP 領域が存在するプラスミド(表 4)、それぞれ pTN249 または pTN247 を導入した大腸菌株を、測定したい酸素条件下で培養した。培養は「2-⑥ 異なる酸素条件による培養方法」の記載の通りに行った。GFP 蛍光レベルの測定は、「2-⑦ 自然突然変異頻度の測定」と同様の条件において GFP 蛍光レベルを測定するために、それぞれの酸素条件においてコロニーの直径が 1.5 mm になるまで培養した。コロニーの大きさによる *ahpC*-GFP レベルの変化は「第 5 章 付録 図 3 2」、低酸素培養における *ahpC*-GFP レベルの変化は「第 5 章 付録 図 3 3」に示した。培養後、低酸素培養と酸素シフト処理における GFP 蛍光レベル測定のために行った処理を「2-⑧ (b) 低酸素培養と酸素シフト処理の GFP 蛍光レベル測定方法の違い」に記載した。測定したい酸素条件下において培養し、出現した全てのコロニーを最終濃度 2%のアジ化ナトリウムを加えた 1×M9 溶液 5 ml で回収した。アジ化ナトリウムは ATPase 阻害剤であるため[34]、大腸菌に処理すると ATP 合成を阻害する。つまり ATP 合成を阻害することによって細胞分裂を阻害し、各々の酸素条件下で発現した GFP 量のままで大腸菌細胞を固定した。アジ化ナトリウムを加えた 1×M9 溶液で回収した菌体 (O.D.<sub>600</sub> が 1.0 程度) を 1.5 ml マイクロチューブに移し、リン酸緩衝生理食塩水 (PH 7.2) で  $10^3$  希釈した。アジ化ナトリウムによる細胞の固

定後 30 分で GFP 蛍光レベルの測定を行った(図 10)。GFP 蛍光レベルの測定は、Accuri™ C6 Flow Cytometer (BD 社製) を利用し、測定方法は製造元に従った。GFP 蛍光レベルの測定には、488 nm のアルゴンレーザーと 515~545 nm の光学フィルター (FL1) を利用した。また、フィラメント状でない単一の細胞の GFP 蛍光レベルを測定するために、FSC (細胞の大きさ) と SSC (細胞内小器官や膜構造に由来する細胞の複雑さ) によってフィラメント状の細胞を除去した[32] [33]。GFP 蛍光レベルは、それぞれの条件において 3 実験区以上測定し、各々の菌株において *ahpC*-GFP、または *soxS*-GFP を導入したプラスミドを持たない菌株の GFP 蛍光レベルを background として差し引き、その値の平均値を算出した。この平均値をそれぞれの条件による GFP 蛍光レベルとした。

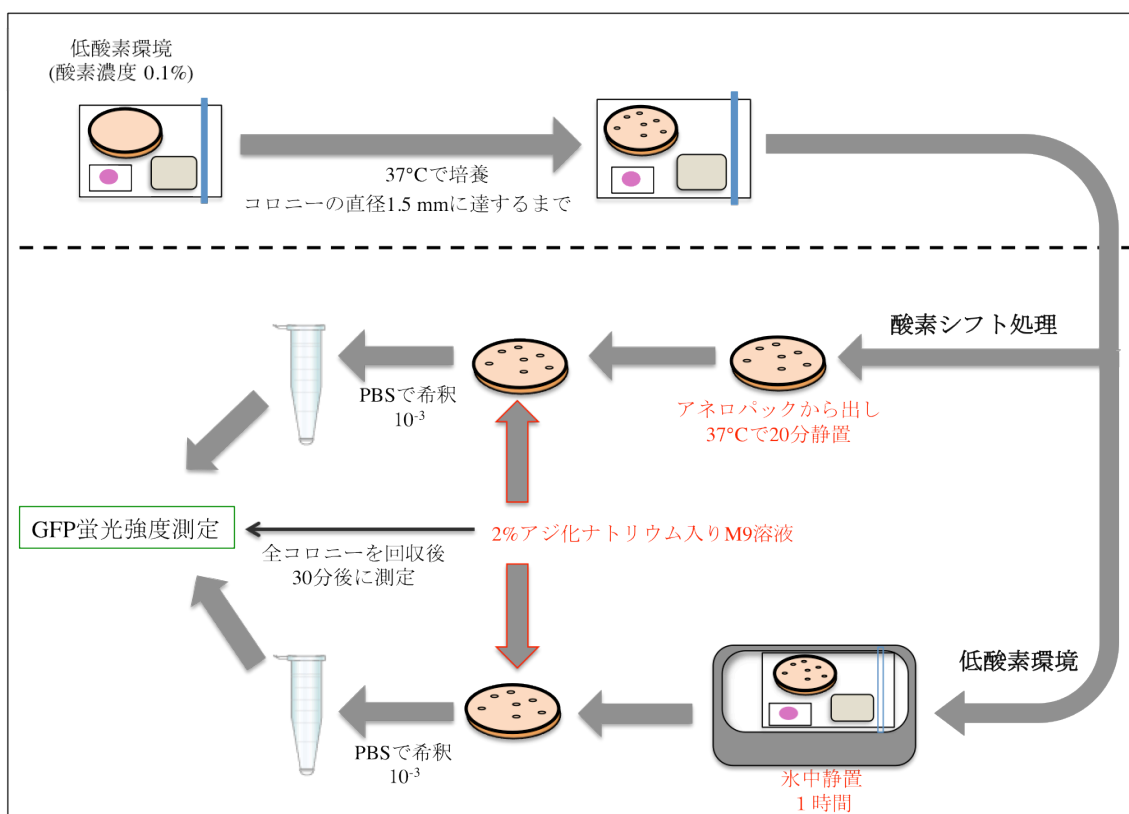


図 10 酸素シフト処理と低酸素環境における GFP 蛍光レベル測定方法

酸素シフト処理と低酸素培養における GFP 蛍光レベルの測定方法について示した。酸素シフト処理と低酸素環境における GFP 蛍光レベル測定方法の違いは、酸素シフト処理はアネロパックからプレートを取り出した後 37°C で 20 分間静置し、低酸素環境はアネロバックに入れたまま (低酸素環境を維持した状態) で 1 時間、氷中に静置したという点である。

## 第 3 章 結果

## 1 酸素シフト処理によって酸化 DNA 損傷が上昇する原因の解明

### ① *rpoB* 検出系を用いた酸素シフト処理下での突然変異頻度測定

完全嫌気培養における  $\Delta mutM\Delta mutY$  株の GC→TA 突然変異頻度は検出が不可能なレベルにまで低下していたにも関わらず、酸素シフト処理による GC→TA 突然変異頻度は完全嫌気培養と比較して約 2 万倍の上昇を示した[16]。この結果から、低酸素環境(約 0.1%)から有酸素環境(21%)への移行により、細胞内のヒドロキシラジカルレベルが上昇し、それに伴い 8-oxoG 量が増加したと考えた。この結果を示した坂井らが用いた突然変異頻度の測定方法は、*rpsL* 検出系である。この検出系は、染色体上に *rpsL* 遺伝子の部分二倍体が存在する大腸菌株を用いて突然変異頻度を測定する。染色体上に *rpsL* 遺伝子の部分二倍体が存在することで塩基置換変異のみでなく、アリル間組換えやフレームシフト、付加、欠失などの様々な突然変異を検出することができる。そして得られた変異体の *rpsL* 遺伝子領域をシーケンス解析することで突然変異の種類を解析することができ、各々の突然変異の種類による突然変異頻度を算出することができる。

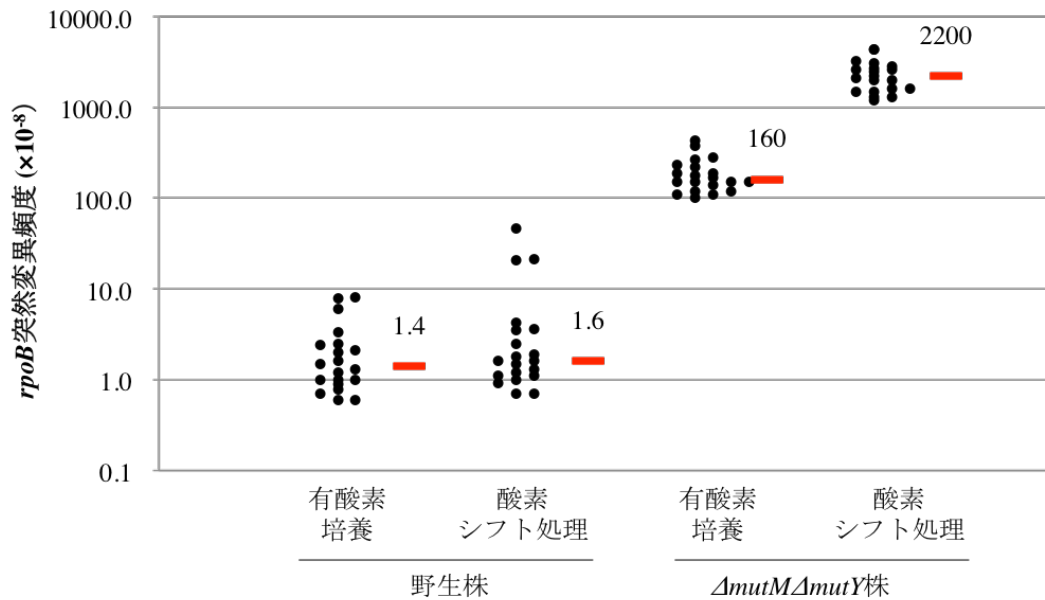
本研究は、8-oxoG を全く修復できない  $\Delta mutM\Delta mutY$  株を利用するため、GC→TA トランスバージョン変異頻度を鋭敏に検出することができる。そこで、GC→TA トランスバージョン変異を検出するために、塩基置換変異のみを検出できる *rpoB* 検出系を利用することにした。また、坂井らが報告した酸素シフト処理の影響が *rpsL* 遺伝子にのみ特異的に見られる現象でなく、普遍的に起こる現象か調べることにした。

#### (a) 酸素シフト処理による酸化 DNA への影響

野生株と  $\Delta mutM\Delta mutY$  株の有酸素培養における生育時間は 14 時間であり、低酸素培養における生育時間は 50 時間であった。大腸菌は、有酸素環境では酸素呼吸によって ATP 合成をするが、0.1%の低酸素培養下では嫌気呼吸を行っていると考えられる。そのため低酸素環境における総 ATP 合成量は、有酸素培養と比較して低下すると予想した。 $\Delta mutM\Delta mutY$  株の酸素シフト処理における突然変異頻度( $2200 \times 10^{-8}$ )は、有酸素環境( $180 \times 10^{-8}$ )と比較すると約 14 倍上昇した(図 11)。よって酸素シフト処理は、有酸素環境下で培養し続けるよりも短時間で 8-oxoG 量を顕著に増加させると示唆した。つまり、有酸素培養(21%)で 14 時間培養し続けるよりも、低酸素環境 (0.1%)で適応していた細胞を有酸素環境へシフトさせるの方が、短時間で顕著に細胞内活性酸素レベルが上昇すると示された。

一方で、野生株の突然変異頻度は、有酸素培養( $1.4 \times 10^{-8}$ )と酸素シフト処理( $1.6 \times 10^{-8}$ )の両方の環境において同程度であった。また、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株の酸素シフト処理における突然変異頻度は、野生株と比較すると 1380 倍の上昇を示した。つまり、大腸菌の MutM タンパク質と MutY タンパク質は、酸素シフト処理によって生じる大量の 8-oxoG を完全に修復する事が可能であると示した。よって、MutM タンパク質と

MutY タンパク質は高い修復能を持ち、爆発的に増加した 8-oxoG を短時間で完全に修復することによって GC→TA トランスバージョン変異の誘発を抑制した。



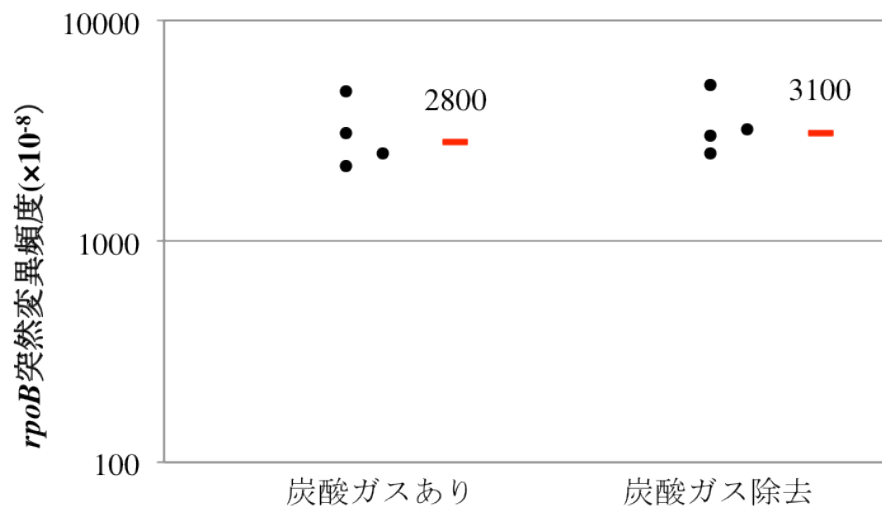
	有酸素培養 野生株	酸素シフト処理 野生株	有酸素培養 $\Delta mutM \Delta mutY$ 株	酸素シフト処理 $\Delta mutM \Delta mutY$ 株
実験区数	20	20	20	20
中央値 ( $\times 10^{-8}$ )	1.4	1.6	160	2200
相対比	【1】	【1.1】	〈1〉	〈14〉

図 11 酸素シフト処理の突然変異への影響

有酸素培養および酸素シフト処理における野生株と  $\Delta mutM \Delta mutY$  株の突然変異頻度。それぞれ 20 実験区ずつ測定し、各々の突然変異頻度を黒のドット、中央値を赤のバーで示した。

## (b) 炭酸ガスの酸化 DNA への影響

酸素シフト処理に用いる低酸素培養は、アネロパック、ケンキ（酸素吸収・二酸化炭素発生剤）、嫌気指示薬を用いて、約 0.1%という低酸素環境を作り出した(図 7)。用いた酸素吸収・二酸化炭素発生剤は、アネロパック内の酸素濃度 0.1%以下まで低下させ、炭酸ガス濃度を 20%程度に満たすことで低酸素状態を維持することができる。これまでに、大腸菌細胞内において二酸化炭素と活性酸素（過酸化水素とヒドロキシラジカル）が反応することによって、酸化ストレスの上昇や、8-oxoG 誘発レベルの上昇が見られたという報告がある[49]。そこで、アネロパック内の炭酸ガス濃度が上昇することで、突然変異に影響が見られる可能性があると考えた。炭酸ガスの突然変異頻度への影響を調べるために、水酸化ナトリウムが二酸化炭素と反応し炭酸水素ナトリウムと水を生成する化学反応に注目した。水酸化ナトリウムを浸したキムワイプをシャーレに入れ、*ΔmutMΔmutY* 株を塗布したプレートと一緒にアネロパック内に設置した。水酸化ナトリウムと二酸化炭素の反応が起こる状態で低酸素培養を行い、酸素シフト処理による突然変異頻度を測定した。水酸化ナトリウムによる炭酸ガスの除去を確認するために、低酸素培養後の水酸化ナトリウムを含んだキムワイプの pH を測定した結果、pH は 7 であった。この結果から、アネロパック中の水酸化ナトリウムによる二酸化炭素の除去が示された。炭酸ガス除去処理を行った場合( $2800 \times 10^{-8}$ )と、行わなかった場合( $3100 \times 10^{-8}$ )の突然変異頻度は、有意な差が見られなかった(図 12)。また、炭酸ガス除去処理を行った場合と行っていない場合における大腸菌の生育時間は 50 時間であり、生育に大きな差は見られなかった。この結果から、低酸素培養によって生じる炭酸ガスは、突然変異頻度に影響を与えない事が示された。



	炭酸ガスあり	炭酸ガス除去
実験区数	4	4
中央値 ( $\times 10^{-8}$ )	2800	3100
培養時間	50時間	50時間

図 12 炭酸ガスの突然変異への影響

低酸素培養の炭酸ガスの突然変異頻度への影響。炭酸ガス除去処理を行った場合と行っていない場合、各々4実験区ずつ測定した。各々の突然変異頻度を黒のドット、中央値を赤のバーで示した。

## ② レポーター遺伝子アッセイを用いた過酸化水素レベルの測定

炭酸ガスは 8-oxoG に起因する突然変異に大きな影響がないことを示した。しかし、酸素シフト処理における突然変異頻度の上昇について、酸化 DNA 損傷が突然変異として固定するまでの時間に対して疑問が生じた。

大腸菌は、1 回の DNA 複製に短くとも 30 分必要である。酸化 DNA 損傷が、突然変異として固定するためには最低でも 2 回の複製が必要である。つまり、酸素シフト処理によって生じた酸化 DNA 損傷が突然変異として固定するためには、少なくとも 1 時間必要である。しかし、酸素シフト処理において、低酸素環境から有酸素環境にシフト後、コロニーを回収するまでの時間は 5 分間である。コロニー回収に用いた LB 培地は冷却しており、さらに、リファンピシンプレートに塗布後は、DNA 複製を行うことができないと考えられる。よって、コロニー回収を行うまでの 5 分間で、酸素シフト処理によって生じた 8-oxoG を GC→TA トランスバージョン変異として検出できるのかどうか疑問が生じた。この問題は、*rpoB* 遺伝子に生じた 8-oxoG が突然変異として固定せずに転写・翻訳を介して、リファンピシンに抵抗性をもった RpoB タンパク質として発現したのではないかと考えた。

また、坂井らの研究によって、嫌気チャンバーを利用した完全嫌気培養での GC→TA 突然変異頻度が測定された。その結果、完全嫌気培養下における GC→TA トランスバージョンは検出できない値まで低下していた。この結果から、完全に酸素がない状態(0%)において 8-oxoG は生成していないと示唆されるため、完全嫌気培養では細胞内で活性酸素も発生しないと考えられる。本研究における低酸素環境(0.1%)においても、完全嫌気培養と同様に細胞内では活性酸素は生成していないと予想した。

よって、酸素シフト処理によって突然変異頻度が上昇した原因は、急激な酸素濃度の変化によって酸素呼吸や活性酸素消去系に変化が生じたことで、細胞内活性酸素レベルが上昇したと考えた。そこで、酸素シフト処理によって細胞内活性酸素レベルが上昇するのかどうか確認することにした。

### (a) 酸素シフト処理と有酸素環境における細胞内過酸化水素レベル

大腸菌の細胞内活性酸素レベルを調べるために、レポーター遺伝子アッセイを利用した過酸化水素レベル解析に注目した。過酸化水素レベルを測定するために、有酸素環境および酸素シフト処理における 1 細胞あたりの *ahpC*-GFP レベルを測定した。*ahpC*-GFP レベルは、1 細胞あたりの *ahpC* 転写量を示す。*ahpC* 遺伝子の転写調節因子は OxyR タンパク質である。OxyR タンパク質は、過酸化水素によって還元し、活性型 OxyR タンパク質が *ahpC* 遺伝子の転写を促進する。したがって、*ahpC* 転写レベルは、還元型 OxyR タンパク質レベルを示すため、結果として *ahpC*-GFP レベルは細胞内過酸化水素レベルを反映する。

酸素シフト処理で突然変異頻度が上昇した原因は、細胞内ヒドロキシラジカルレベルが上昇したためであると予想した。大腸菌におけるヒドロキシラジカルレベルの直



接的な測定は困難であるため、前駆体である過酸化水素レベルが上昇するかを調べた。*ahpC*-GFP を挿入したプラスミド pTN149 を導入した  $\Delta mutM\Delta mutY$  株を利用し、酸素シフト処理と有酸素培養における *ahpC*-GFP レベルを比較した。

酸素シフト処理によって生成した過酸化水素レベルを測定するために、酸素シフト処理後のプレートを 37 度で 20 分間培養した。20 分間の培養により、酸素シフト処理によって生成した過酸化水素が OxyR タンパク質を還元し、*ahpC* 遺伝子の転写が促進されることで GFP タンパクが十分に発現できると考えた。有酸素培養と酸素シフト処理の *ahpC*-GFP レベルを解析した結果、酸素シフト処理の *ahpC*-GFP レベルは有酸素培養と比較して約 11 倍上昇した(図 13)。完全嫌気培養(酸素濃度 0%) の突然変異頻度は、8-oxoG による GC→TA トランスバージョン変異は検出不可であった[15]。よって酸素濃度 0.1% の低酸素培養において 8-oxoG 生成レベルは非常に低いと考えられるため、酸素シフト処理によって細胞内過酸化水素レベルが上昇したと示唆した。

低酸素環境において細胞内過酸化水素レベルは非常に低いと予想したが、実際に低酸素環境において細胞内過酸化水素レベルが低下するのか確認する必要があると考えた。

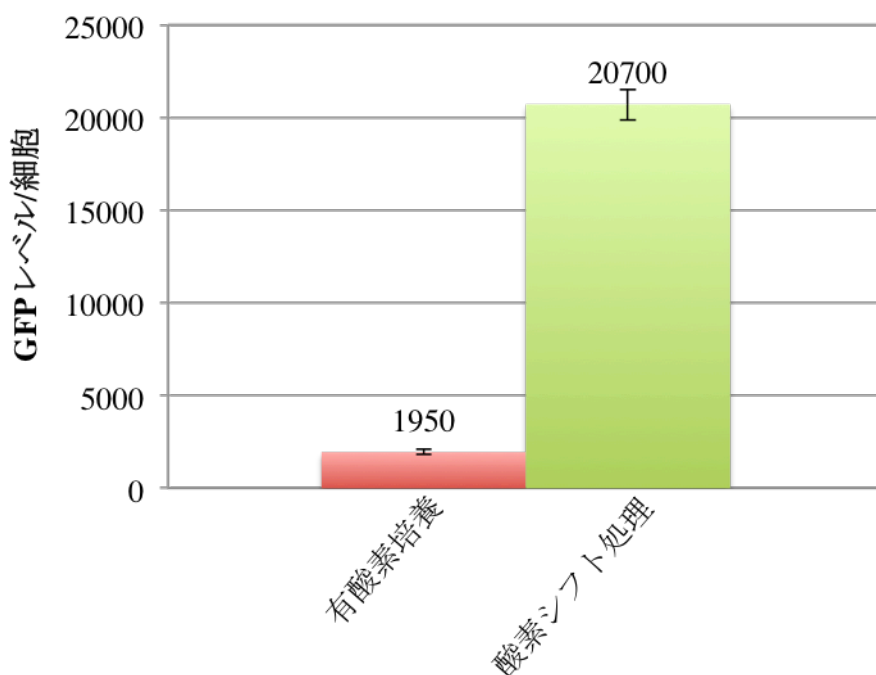


図 13 酸素シフト処理における細胞内 *ahpC*-GFP レベル

$\Delta mutM\Delta mutY$  株における有酸素培養および酸素シフト処理下での細胞 1 個あたりの *ahpC*-GFP レベル。有酸素培養は 9 バッチ、酸素シフト処理は 15 バッチの平均を示した。

## (b) 低酸素培養における細胞内過酸化水素レベル

低酸素環境（酸素濃度 0.1%）における細胞内活性酸素レベルは、有酸素環境と比較して非常に低いレベルであると予想した。さらに、酸素シフト処理の *ahpC*-GFP レベルの結果から、酸素シフト処理によって、急激に細胞内過酸化水素レベルが上昇し、8-oxoG による突然変異頻度が顕著に増加したと考えた。また一方で、酸素シフト処理を行ってから、冷却した LB 培地でコロニーを回収するまでの時間は 5 分間しかなく、酸素シフト処理で生じた DNA 損傷が突然変異として固定できるのかという疑問をもった。酸素シフト処理によって細胞内過酸化水素レベルが上昇したという仮説と、酸素シフト処理によって生じた DNA 損傷が 5 分間で突然変異として固定できるのかという疑問を解決するために、低酸素環境における *ahpC*-GFP レベルを測定した。低酸素環境の状態で大腸菌細胞を得るために、氷の入ったアイスボックス内で 1 時間氷冷した。つまり、細胞を冷却することで代謝活動を抑制し、低酸素環境から有酸素環境にシフトした際の酸素呼吸を抑制した。この処理によって、低酸素環境で適応した状態の細胞を採取することができる。さらに、全てのコロニーを回収する際に用いた M9salts 溶液は、アジ化ナトリウム(最終濃度 2%)を添加した。アジ化ナトリウムは ATP 合成阻害剤である。よって、大腸菌細胞にアジ化ナトリウムを加えると ATP 合成が阻害されるため、結果として細胞分裂ができず、低酸素環境で順応したままの状態の細胞を得ることができる。

1 時間の冷却処理とアジ化ナトリウムの添加によって、低酸素状態で適応した大腸菌細胞を採取し、*ahpC*-GFP レベルを測定した。低酸素環境の *ahpC*-GFP は非常に低いレベルになり、さらに有酸素培養と比較して低い値になると予想していた。しかし結果は予想に反して、低酸素培養の *ahpC*-GFP レベルは、有酸素培養と比較して約 9.2 倍上昇した(図 14)。また低酸素培養の *ahpC*-GFP レベルは、酸素シフト処理と比較して約 1.2 倍の低下が示された。この結果から、酸素シフト処理によって細胞内の過酸化水素レベルが低酸素環境と比較して上昇していることが示された。しかしその一方で、酸素濃度 0.1%という低い酸素濃度において、非常に高い細胞内過酸化水素レベルであることが示された。この結果から、酸素シフト処理によって 8-oxoG 由来の突然変異頻度が有酸素培養と比較して約 14 倍上昇した原因の多くは低酸素培養で生じた 8-oxoG が原因ではないかと考えた(図 11)。その理由は、酸素シフト処理によって誘発した酸化 DNA 損傷が、突然変異として固定できる時間が 5 分間のためである。5 分間では、突然変異として固定するために必要な 2 回の DNA 複製を行うことができないと考えた。よって、有酸素培養と比較して約 14 倍上昇した突然変異頻度の原因は、酸素シフト処理の効果ではなく、低酸素培養中に生じた 8-oxoG に起因するものと予想した。

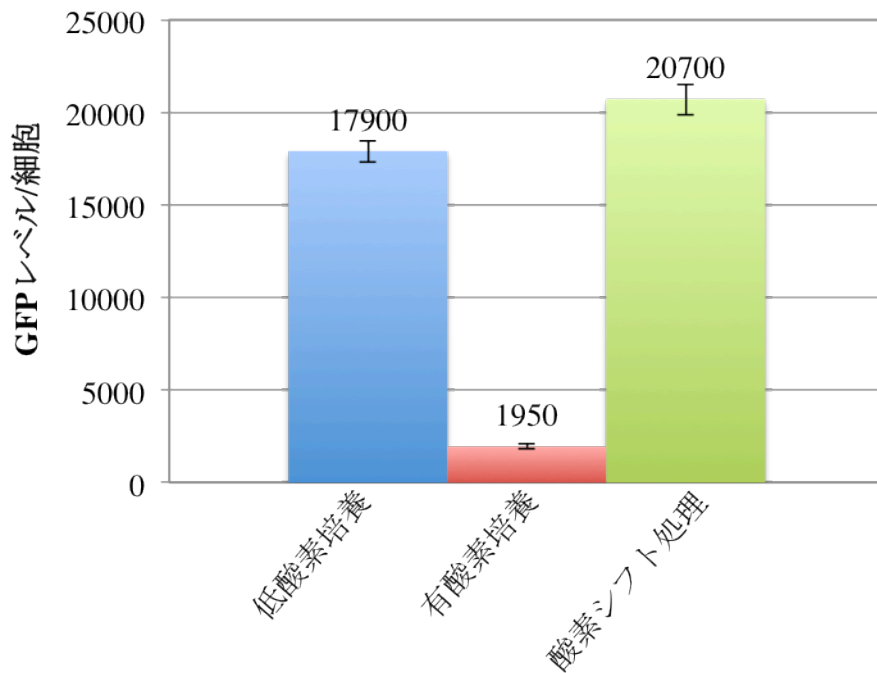


図 14 低酸素培養における細胞内 *ahpC*-GFP レベル

$\Delta mutM \Delta mutY$  株における低酸素環境下での細胞内 *ahpC*-GFP レベル。低酸素培養は 15 バッチ、有酸素培養は 9 バッチ、酸素シフト処理は 15 バッチの平均を示した。

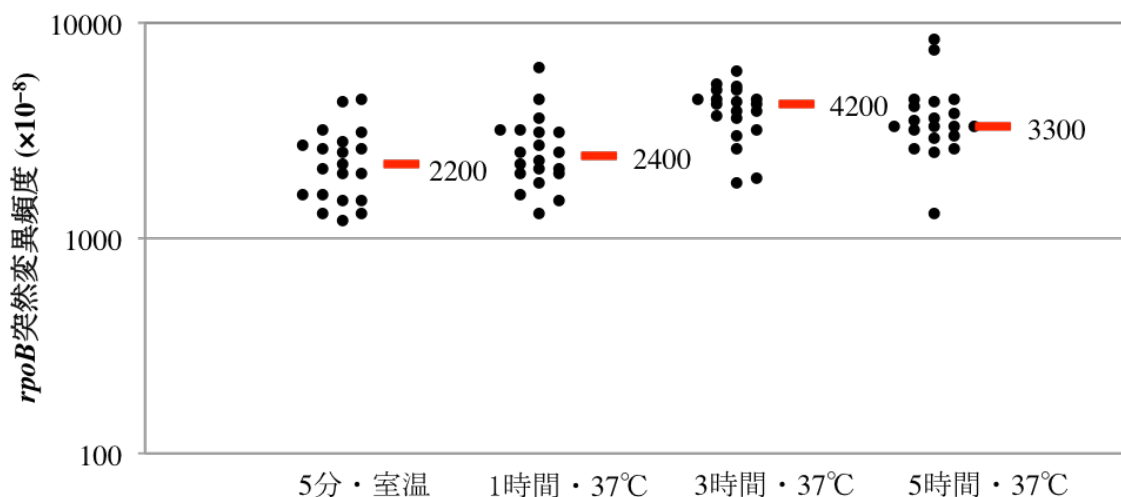
### ③ 酸素シフト処理の酸化 DNA 損傷への影響

低酸素培養における細胞内過酸化水素レベルおよび 8-oxoG 由来の突然変異頻度の上昇が示された。しかし、酸素シフト処理によって細胞内 *ahpC*-GFP レベルは、低酸素培養と比較し上昇した(図14)。よって、酸素シフト処理の突然変異頻度への効果は、複製時間を与えることで確認できると考えた。生成した 8-oxoG を突然変異頻度として測定するためには、少なくとも 2 回の複製が必要である。そこで、酸素シフト処理の効果を調べるために、酸素シフト処理後のプレートを 37°C で培養し、複製時間を与えることによって突然変異頻度への影響を調べた。

酸素シフト処理の効果を調べるために、 $\Delta mutM \Delta mutY$  株を用いて酸素シフト処理を行い、培養後のプレートを 37°C で 1 時間、3 時間、5 時間培養し、それぞれの突然変異頻度を測定した。酸素シフト処理を行ってから 1 時間培養した場合( $2400 \times 10^{-8}$ )は、5 分間放置したプレート( $2200 \times 10^{-8}$ )と同程度の突然変異頻度であった(図 15)。さらに 5 分間放置した場合の突然変異頻度( $2200 \times 10^{-8}$ )と比較して、3 時間培養した場合( $4300 \times 10^{-8}$ )は約 2 倍上昇し、5 時間培養した場合( $3300 \times 10^{-8}$ )は約 1.5 倍であった(図 15)。この結果から、酸素シフト処理によって生じた 8-oxoG は、3 時間培養すると突然変

異として十分に固定すると示された。対数増殖期における複製は、1回につき30分程度である。しかし、酸素シフト後からコロニー回収を行うまでの時間が5分間と1時間の場合、どちらの場合においても突然変異頻度に大きな差は見られなかった。

これらの結果から、低酸素培養と酸素シフト処理を区別するために解析方法の違いを表7にまとめた。突然変異頻度として酸素シフト処理の効果进行调查の際には、酸素シフト処理後のプレートを37°Cで3時間培養し、突然変異頻度を測定した。低酸素培養については、アネロパックから取り出した後すぐに冷やしたLB液体培地で全コロニーを回収し、突然変異頻度を測定した。また細胞内 *ahpC*-GFP レベルの測定は、酸素シフト処理の場合においては酸素シフト処理後のプレートを37°Cで20分間静置した細胞を用いた。また低酸素培養はプレートを入れたままのアネロパックを氷の入ったアイスボックスに1時間放置した細胞を利用した。



	5分・室温	1時間・37°C	3時間・37°C	5時間・37°C
実験区数	20	20	20	20
中央値 ( $\times 10^{-8}$ )	2200	2400	4200	3300
相対比	1	1.09	1.91	1.5

図 15 酸素シフト処理の突然変異頻度への効果

酸素シフト処理後の複製時間の違いによる  $\Delta mutM \Delta mutY$  株の突然変異頻度への影響。全て LB プレート上で培養し、酸素シフト処理後にそれぞれの処理を行った。室温で5分間放置、37°Cで1時間、3時間、5時間培養した場合の突然変異頻度を20実験区ずつ測定した。各々の突然変異頻度を黒のドット、20実験区の中央値を赤にバーで示した。

表 7 酸素シフト処理と低酸素培養の違い

	<i>ahpC</i> -GFP 蛍光レベルの測定	突然変異頻度測定
酸素シフト処理	低酸素培養後、アネロパックから取り出し 37°C で 20 分間放置	低酸素培養後、アネロパックから取り出し 37°C で 3 時間放置
低酸素培養	低酸素培養後、アネロパックに入れたまま氷の入ったアイスボックス内で 1 時間放置	低酸素培養後、アネロパックから取り出し、すぐに冷やした LB 培地で全コロニーを回収

実験上の酸素シフト処理と低酸素培養の違いを示した。

#### ④ 微好気培養（酸素濃度 4～8%）の影響

低酸素環境下（酸素濃度 0.1%）において、細胞内過酸化水素レベル及び 8-oxoG に起因する突然変異頻度の上昇が示された。この結果が、低酸素環境に対して特異的に起きる現象なのか、それとも酸素濃度の減少に伴って細胞内活性酸素レベル上昇及び突然変異頻度誘発が増加するのか調べることにした。

酸素濃度 0.1% と 21% の間の酸素濃度で培養を行うために、微好気培養用の酸素吸収・二酸化炭素発生剤を用いた。これは、酸素濃度 6～12%、炭酸ガス濃度 5～8% に維持できる。また、低酸素培養は嫌気指示薬を指標として用いたが、微好気培養は酸素濃度測定器を利用し酸素濃度を確認しながら培養を行った。 $\Delta mutM\Delta mutY$  株を微好気環境下で培養した結果、酸素濃度は 4～8% であり、生育時間は 14～16 時間であった。

##### (a) 細胞内過酸化水素レベルへの影響

酸素濃度 4～8% の微好気培養下における細胞内 *ahpC*-GFP レベルを測定した。その結果、酸素濃度 4～8% の *ahpC*-GFP レベルは、有酸素培養よりも約 1.6 倍低下した。さらに、低酸素環境の *ahpC*-GFP レベルと比較して 14.3 倍低下した。この結果から、酸素濃度 21% から酸素濃度が減少するに伴って細胞内過酸化水素レベルも低下することが示された(図 16)。つまり、酸素濃度 0.1% の極めて低い酸素濃度の場合において、細胞内過酸化水素レベルの上昇が見られると示唆した。しかし、低酸素環境 0.1% から 4% の酸素濃度のどの段階において、細胞内過酸化水素レベルが上昇するのか検討できなかった。

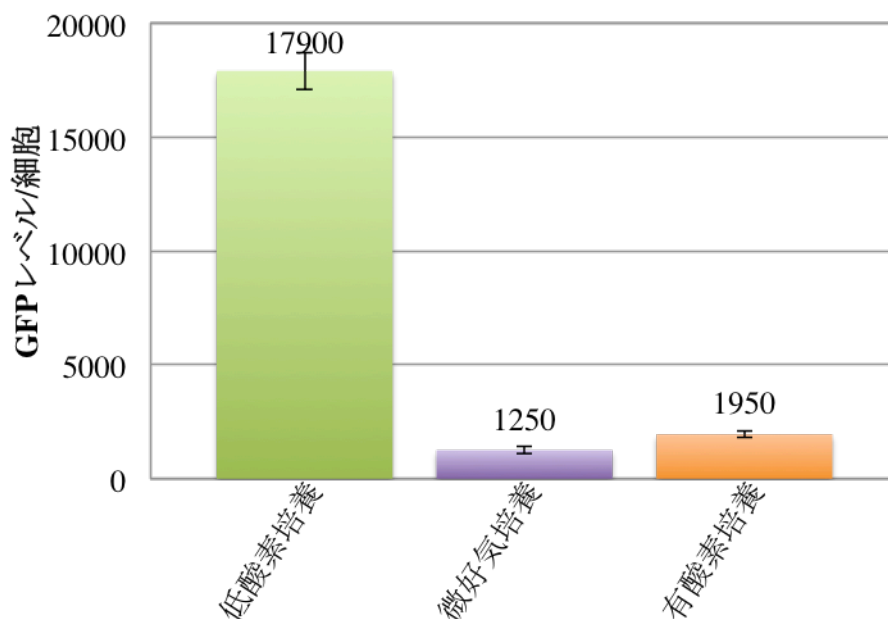
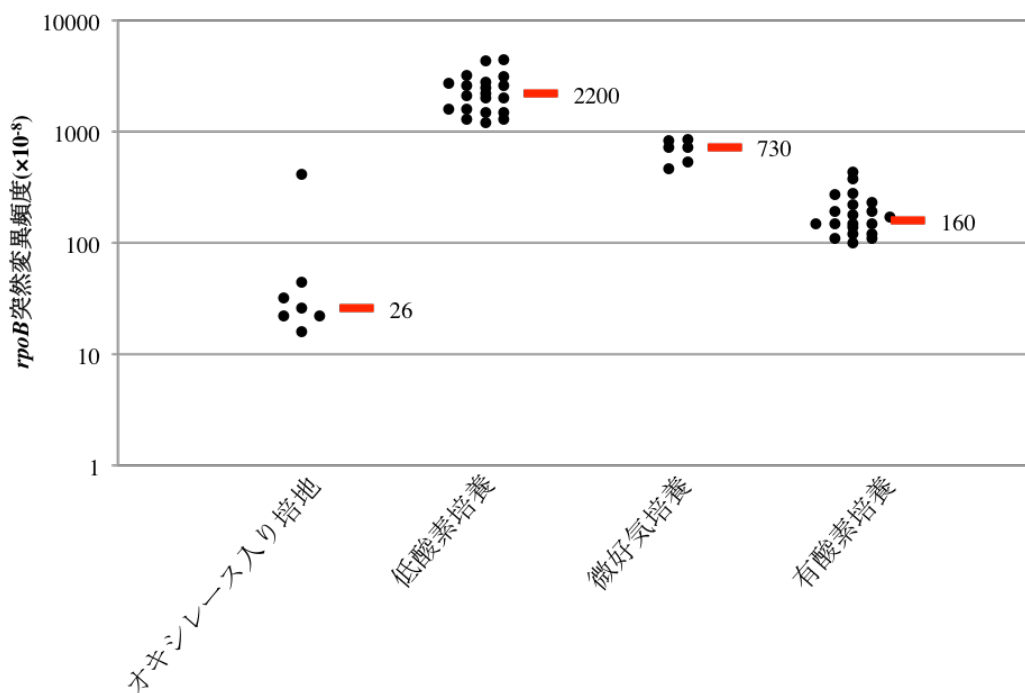


図 16 微好気培養（酸素濃度 4～8%）の *ahpC*-GFP レベルへの影響

微好気培養（酸素濃度 4～8%）における *ahpC*-GFP レベル。低酸素培養（酸素濃度 0.1%）は 15 バッチ、微好気培養は 6 バッチ、有酸素培養は 9 バッチの平均を示した。

### (b) 酸化 DNA 損傷への影響

微好気培養（酸素濃度 4～8%）における  $\Delta mutM\Delta mutY$  株の突然変異頻度を測定した。細胞内 *ahpC*-GFP レベルが有酸素培養下と比較して低下したことから、細胞内活性酸素レベルも低下し、8-oxoG 生成量も低下すると予想した。そのため、微好気培養において突然変異頻度は有酸素環境よりも低下すると考えた。微好気培養下における突然変異頻度 ( $730 \times 10^{-8}$ ) は、有酸素培養 ( $160 \times 10^{-8}$ ) と比較して約 4.6 倍上昇し、低酸素環境 ( $2200 \times 10^{-8}$ ) と比較して約 3 倍低下した(図 17)。この結果から、通常の大気条件である酸素濃度 21% より低い酸素濃度である 4～8% において細胞内過酸化水素レベルの低下が示されたが、8-oxoG 生成量は上昇するという矛盾が生じた。一方で、*ahpC*-GFP レベルと 8-oxoG の顕著な上昇は、低酸素環境において特異的に見られる現象と示された。よって細胞内過酸化水素レベルと 8-oxoG 生成レベルの上昇は、酸素濃度 4% 以下の限りなく酸素濃度が低い時に起こる現象であることが示唆された。



	オキシレース入り培地／低酸素培養	低酸素培養 0.1%	微好気培養 4～8%	有酸素培養 21%
実験区数	7	20	6	20
中央値 ( $\times 10^{-8}$ )	26	2200	730	160
培養時間	38時間	50時間	16時間	14時間

図 17 酸素濃度の違いによる突然変異頻度への影響

微好気培養（酸素濃度 4～8%）およびオキシレース入り LB 培地／低酸素培養による突然変異頻度。微好気培養は 6 実験区、オキシレース入り LB 培地／低酸素培養は 7 実験区、低酸素培養と有酸素培養は 20 実験区の突然変異頻度を測定した。また 1 実験区ずつの突然変異頻度を黒のドット、中央値を赤のバーで示した。

## ⑤ オキシレース入り LB 培地による嫌気培養

低酸素培養において、活性酸素生成に関係する酸素源は2つあると考えた。1つ目はアネロパック内に存在する0.1%存在する酸素、2つ目は寒天培地中に含まれる酸素である。そこで、低酸素培養で存在する酸素を除去するためにオキシレースを用いた。オキシレースは、大腸菌から採取した膜に存在する酵素であり、酸素を水に変換することができる。LB培地にオキシレースを加えたLBプレートに $\Delta mutM\Delta mutY$ 株を塗布し、アネロパック、酸素吸収・二酸化炭素発生剤、嫌気指示薬を用いて嫌気培養を行った。酸素を除去した場合の細胞内 *ahpC*-GFP レベルおよび突然変異頻度が通常の低酸素培養と比較して低下するか調べた。

### (a) 細胞内過酸化水素レベルへの影響

オキシレースを利用した嫌気培養によって、細胞内過酸化水素レベルは有酸素培養および低酸素培養よりも低下すると予想した。これまでにヌクレオチドプール内の8-oxodGTPを8-oxodGMPに分解することができない、つまり8-oxodGTPに起因する突然変異を検出することができる $\Delta mutT$ 株を用いて、オキシレース入りLB培地で突然変異頻度を測定した。その結果 $\Delta mutT$ 株の突然変異頻度は検出できないレベルにまで低下したという報告がある[15,16]。8-oxodGTPは、ヒドロキシラジカルによって生成するヌクレオチドプール上の酸化DNA損傷である。つまり、酸素が除去されたオキシレース入りの培地上では、活性酸素は生成せず、酸化DNA損傷も生成しないと予想できる。この報告からオキシレースを利用すると8-oxodGTPに起因する突然変異が検出されなかったため、オキシレースの利用は嫌気チャンバーを用いた完全嫌気培養と同様の効果が得られると期待した。よってオキシレース入りLB培地上において $\Delta mutM\Delta mut$ 株の細胞内 *ahpC*-GFP レベルおよび突然変異頻度は顕著に低下すると予想した。

しかし、結果は予想に反して、オキシレース入りLB培地による嫌気培養の*ahpC*-GFPレベルは、有酸素培養と比較して約4倍上昇し、低酸素環境と比較して約2倍低下した(図18)。確かにオキシレース添加培地を利用すると、低酸素培養と比較して*ahpC*-GFPレベルは低下したため、細胞内過酸化水素レベル低下したと考えられる。しかし有酸素環境と比較すると細胞内過酸化水素レベルは上昇を示した。



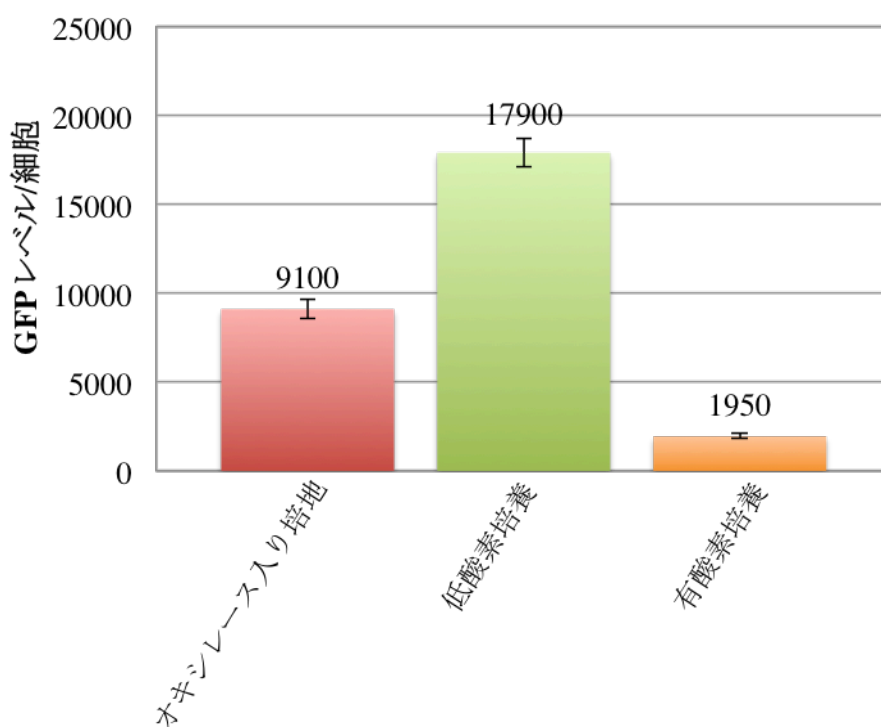


図 18 オキシレース入り培地における *ahpC*-GFP レベル

オキシレース入り LB 培地、低酸素培養、有酸素培養の細胞内 *ahpC*-GFP レベル。オキシレース入り LB 培地 11 バッチ、低酸素培養 15 バッチ、有酸素培養 9 バッチの平均値を示した。

### (b) 酸化 DNA 損傷への影響

オキシレース入り培地における  $\Delta mutT$  株の突然変異頻度が顕著に低下することから[35]、 $\Delta mutM \Delta mutY$  株の突然変異頻度も有意に低下すると予想した。オキシレース入り培地による  $\Delta mutM \Delta mutY$  株の突然変異頻度( $26 \times 10^{-8}$ )は、有酸素培養( $120 \times 10^{-8}$ )と比較して約 4.6 倍低下し、低酸素環境( $2200 \times 10^{-8}$ )と比較すると約 85 倍低下した(図 17)。この結果から、オキシレースを利用した嫌気培養において 8-oxoG レベルは有意に低下することが示された。嫌気チャンバーを用いた GC→TA 変異頻度と比較して高い頻度となった理由は、培地中の酸素は除去したが空气中 0.1%の酸素による活性酸素の生成と、完全嫌気培養でみられたホットスポット型変異の誘発、活性酸素に依存しない DNA 損傷による突然変異の誘発[16]が原因と考えられる。また *ahpC*-GFP レベルは高いレベルであったにも関わらず、突然変異頻度が低下する原因は解明できていない。

## 2 低酸素環境下において細胞内過酸化水素レベルと酸化 DNA 損傷が増加した原因の解明

低酸素環境下において、細胞内過酸化水素レベルと 8-oxoG に起因する突然変異の顕著な上昇が示された。これまで、細胞外の酸素濃度の上昇に比例して、大腸菌細胞内の活性酸素レベルが上昇すると考えられてきたため、この結果は予期しない発見であった。低酸素環境において細胞内過酸化水素レベルおよび酸化 DNA 損傷が増加した原因を探ることは、嫌気環境から有酸素環境まで幅広い酸素濃度で生育することができる通性嫌気性細菌の大腸菌にとって生物学的な研究の進展に重要であると考えた。また、癌組織の深部は低酸素状態であることから、癌細胞においても活性酸素の生成レベルが上昇している可能性がある。また、低酸素環境下において、骨格筋で活性酸素の生成が誘導されるという報告がある[50]。よって、低酸素環境下で大腸菌の細胞内過酸化水素レベルおよび酸化 DNA 損傷が増加する原因を調べることは、癌の発生メカニズムや治療等の研究や、動物細胞における活性酸素の生成についての研究に貢献できると考えた。よって、本研究は低酸素環境下において大腸菌細胞内の活性酸素レベルの上昇と、酸化 DNA 損傷が生成するメカニズムの解明を目的とした。

### ① シトクロム末端酸化酵素の影響

大腸菌は、3種類のシトクロム末端酸化酵素を持つことが知られている。これらの末端酸化酵素は、生育環境の違いによって発現レベルが変化する。有酸素環境（酸素濃度 21%）において発現レベルが最も上昇するのは bo 型シトクロム末端酸化酵素 (*cyoABCD*) であり、低酸素環境において発現レベルが最も上昇するのは bd-I 型シトクロム末端酸化酵素 (*cydAB*) である。また、炭素源とリン酸の欠乏時に発現レベルが上昇するのは bd-II 型シトクロム末端酸化酵素 (*cbdAB*) である [20]。低酸素環境下で突然変異頻度が上昇した原因は、低酸素環境において細胞内で最も発現レベルが上昇し、活発に働く bd-I 型シトクロム末端酵素が活性酸素を生成するためと予想した。また bo 型シトクロム末端酸化酵素は有酸素環境において発現レベルが上昇することから低酸素環境における発現レベルは低く、また富栄養培地である LB 培地を用いたため bd-II 型シトクロム末端酸化酵素の発現レベルも低いと予想した。つまり LB 培地を用いた低酸素環境において、bo 型と bd-II 型のシトクロム末端酸化酵素は、電子伝達系の働きに対して大きな効果はなく、活性酸素生成にも影響しないと予想した。シトクロム末端酸化酵素の効果を調べるために、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株をバックグラウンドとして、それぞれの末端酸化酵素の単独欠損株を作製し、細胞内過酸化水素レベルと酸化 DNA 損傷への影響を調べた。また全ての末端酸化酵素の影響を調べるために、野生株をバックグラウンドにシトクロム末端酸化酵素三重欠損株を作製し、細胞内過酸化水素レベルと酸化 DNA 損傷への影響を調べた。

### (a) 単独欠損株の細胞内過酸化水素への影響

低酸素環境において発現レベルが上昇する bd-I 型シトクロム末端酸化酵素(*cydAB*)が、低酸素環境において活性酸素を生成した原因と考えた。よって  $\Delta cydAB \Delta mutM \Delta mutY$  株の *ahpC*-GFP レベルは  $\Delta mutM \Delta mutY$  株と比較して低下すると予想した。また  $\Delta cyoABCD \Delta mutM \Delta mutY$  株や  $\Delta cbdAB \Delta mutM \Delta mutY$  株は、bd-I 型シトクロム末端酸化酵素(*cydAB*)が活発に働くため、*ahpC*-GFP レベルが上昇するのではないかと考えた。

低酸素環境下におけるシトクロム末端酸化酵素単独欠損株の *ahpC*-GFP レベルを測定した結果、 $\Delta cydAB \Delta mutM \Delta mutY$  株(bd-I 型シトクロム末端酸化酵素欠損株)の *ahpC*-GFP レベルは、 $\Delta mutM \Delta mutY$  株と比較して 1.13 倍低下した。 $\Delta cyoABCD \Delta mutM \Delta mutY$  株と  $\Delta cbdAB \Delta mutM \Delta mutY$  株の *ahpC*-GFP レベルは上昇すると予想していたが、それぞれ 1.1 倍、1.18 倍低下した(図 19)。3 つの単独欠損株において *ahpC*-GFP レベルはわずかに低下を示した。よって低酸素環境において 3 つのシトクロム末端酸化酵素は過酸化水素産生に大きな影響を与えないことが示唆された。

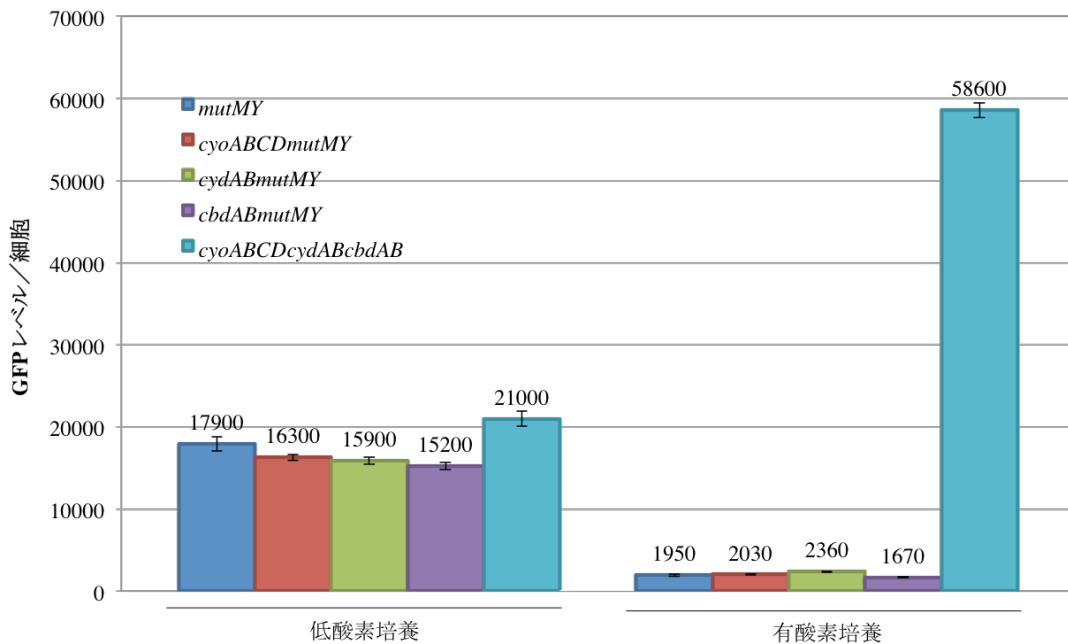


図 19 シトクロム末端酸化酵素による *ahpC*-GFP レベルへの影響

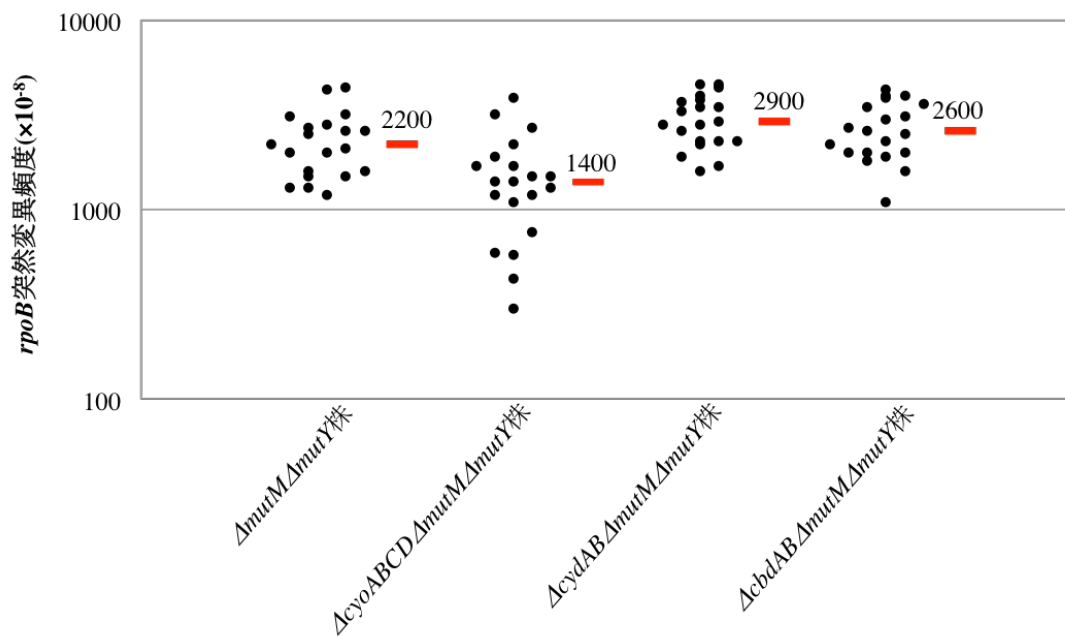
低酸素培養および有酸素培養下におけるシトクロム末端酸化酵素欠損株による細胞内 *ahpC*-GFP レベル。 $\Delta mutM \Delta mutY$  株の低酸素培養は 15 バッチ、有酸素培養は 9 バッチ、 $\Delta cyoABCD \Delta mutM \Delta mutY$  株と  $\Delta cydAB \Delta mutM \Delta mutY$  株、 $\Delta cbdAB \Delta mutM \Delta mutY$  株の低酸素培養および有酸素培養はそれぞれ 9 バッチ、 $\Delta cyoABCD \Delta cydAB \Delta cbdAB$  株の低酸素培養は 12 バッチ、有酸素培養は 6 バッチ行い、平均値を示した。

## (b) 単独欠損株の酸化 DNA 損傷への影響

低酸素環境において bd-I 型シトクロム末端酸化酵素が過酸化水素生成に大きく影響すると考えたため、 $\Delta cydAB\Delta mutM\Delta mutY$  株の 8-oxoG 生成量も増加し突然変異頻度は上昇すると予想した。しかし 3 つのシトクロム末端酸化酵素欠損株の *ahpC*-GFP レベルから、低酸素環境下においてシトクロム末端酸化酵素は過酸化水素の生成に大きな影響を与えないと示唆された。この結果から、突然変異頻度においても  $\Delta mutM\Delta mutY$  株と同程度であると予想した。

低酸素環境における突然変異頻度を測定した結果、 $\Delta cydAB\Delta mutM\Delta mutY$  株と突然変異頻度( $2900 \times 10^{-8}$ )は、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株( $2200 \times 10^{-8}$ )と比較して 1.32 倍上昇した(図 20)。これらの突然変異頻度は有意差があったが、変異頻度自体に大きな差は見られなかった。また予想に反して  $\Delta cyoABCD\Delta mutM\Delta mutY$  株の突然変異頻度( $1400 \times 10^{-8}$ )が、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株( $2200 \times 10^{-8}$ )と比較して 1.57 倍低下した(図 20)。この結果から  $\Delta cyoABCD\Delta mutM\Delta mutY$  株の細胞内 *ahpC*-GFP レベルは、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株の *ahpC*-GFP レベルと同程度であったことから、細胞内過酸化水素レベルが 8-oxoG の生成レベルに反映しない場合があることを示した。 $\Delta cbdAB\Delta mutM\Delta mutY$  株の突然変異頻度( $2600 \times 10^{-8}$ )については、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株と有意な差は見られなかった。*ahpC*-GFP レベルの結果から、 $\Delta cbdAB\Delta mutM\Delta mutY$  株と  $\Delta mutM\Delta mutY$  株の *ahpC*-GFP レベルに大きな差がなかったため、8-oxoG 生成レベルも大きな差が示されなかった。

低酸素環境における生育時間について、 $\Delta cydAB\Delta mutM\Delta mutY$  株が約 120 時間、 $\Delta cyoABCD\Delta mutM\Delta mutY$  株が約 40 時間、 $\Delta cbdAB\Delta mutM\Delta mutY$  株が 50 時間であった。 $\Delta mutM\Delta mutY$  株の生育時間が 50 時間であったことから(図 20)、 $\Delta cydAB\Delta mutM\Delta mutY$  株は生育時間が 2.4 倍増加、 $\Delta cyoABCD\Delta mutM\Delta mutY$  株は 1.25 倍減少、 $\Delta cbdAB\Delta mutM\Delta mutY$  株は生育時間に影響はないと示された。この結果から  $\Delta cydAB\Delta mutM\Delta mutY$  株の生育時間が長くなった理由は、低酸素環境において最も発現レベルが上昇し、活発に働く bd-I 型シトクロム末端酸化酵素が欠損したことで ATP 合成量が低下したためと推測した。



	$\Delta mutM \Delta mutY$ 株	$\Delta cyoABCD \Delta mutM \Delta mutY$ 株	$\Delta cydAB \Delta mutM \Delta mutY$ 株	$\Delta cbdAB \Delta mutM \Delta mutY$ 株
実験区数	20	20	20	20
中央値 (×10 <sup>-8</sup> )	2200	1400	2900	2600
培養時間	50時間	40時間	約120時間	50時間

図 20 シトクロム末端酸化酵素の突然変異頻度への影響

$\Delta mutM \Delta mutY$  株、 $\Delta cyoABCD \Delta mutM \Delta mutY$  株、 $\Delta cydAB \Delta mutM \Delta mutY$  株、 $\Delta cbdAB \Delta mutM \Delta mutY$  株における低酸素培養での突然変異頻度への影響。それぞれ 20 実験区ずつ突然変異頻度を測定し、各々の突然変異頻度を黒のドット、20 実験区の中央値を赤のバーで示した。

### (c) シトクロム末端酸化酵素三重欠損株の過酸化水素レベルへの影響

3種類のシトクロム末端酸化酵素の単独欠損株において、細胞内 *ahpC*-GFP レベルと突然変異頻度に大きな差は見られなかった。その原因は、1種類のシトクロム末端酸化酵素が欠損した場合においても、他の2種類のシトクロム末端酸化酵素が末端酸化酵素としての働きを補ったことで、活性酸素生成量に大きな差が見られなかったと考えた。そこで電子伝達系のシトクロム末端酸化酵素を全て欠損させた場合、大腸菌は嫌気呼吸を行うと予想した。つまり解糖系と TCA 回路のみが働き、電子伝達系における酸素の還元は行われなくなるため、結果としてシトクロム末端酸化酵素によって生成する活性酸素量が減少すると予想した。

シトクロム末端酸化酵素の影響を調べるために、野生株を background とし3種類のシトクロム末端酸化酵素の三重欠損株を作製した。 $\Delta cydAB$  株を作製した段階で生育時間が約 120 時間を超え、非常に生育が悪かった。さらに全てのシトクロム末端酸化酵素を欠損させると嫌気呼吸しか行えず、ATP 合成量も減少することから生育が顕著に悪くなると予想した。この理由から、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株ではなく、野生株を元に三重欠損株を作製した。 $\Delta cyoABCD\Delta cbdAB\Delta cydAB$  株の生育時間は、有酸素環境において 20 日間を超え、低酸素環境では 3 日間と短くなった。有酸素環境での生育が非常に悪く、寒天培地が乾燥し割れることから大腸菌への乾燥ストレスの影響を考慮し、有酸素培養は 3 日間と決め、実験を行った。

本研究では、 $\Delta mutM\Delta mutY$  欠損株を主に用いて研究を行った。しかし  $\Delta cyoABCD\Delta cbdAB\Delta cydAB$  株は *mutM* 遺伝子と *mutY* 遺伝子をもつ。MutM と MutY タンパク質のグリコシラーゼ活性において活性酸素生成に関与するという報告は现阶段では見つかっていない。しかし、 $\Delta mutM\Delta mutY$  欠損株と野生株の細胞内活性酸素レベルに差が見られる可能性があるため、低酸素環境における *ahpC*-GFP レベルを測定し比較した。その結果、 $\Delta mutM\Delta mutY$  欠損株と野生株の *ahpC*-GFP レベルに大きな差が見られなかったため、細胞内過酸化水素レベルについても変化はないと示唆した(図 21)。この結果から、 $\Delta cyoABCD\Delta cbdAB\Delta cydAB$  株の *ahpC*-GFP レベルは  $\Delta mutM\Delta mutY$  株と比較した。

低酸素環境における  $\Delta cyoABCD\Delta cbdAB\Delta cydAB$  株の *ahpC*-GFP レベルは、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株と比較して約 1.2 倍上昇した(図 19)。予想に反して、低酸素環境におけるシトクロム末端酸化酵素三重欠損株の細胞内過酸化水素レベルの上昇が示された。さらに有酸素環境における *ahpC*-GFP レベルは、低酸素環境と比較すると約 2.8 倍上昇した(図 19)。つまり有酸素環境下において細胞内過酸化水素レベルは低酸素環境よりも高いレベルであることが示された。

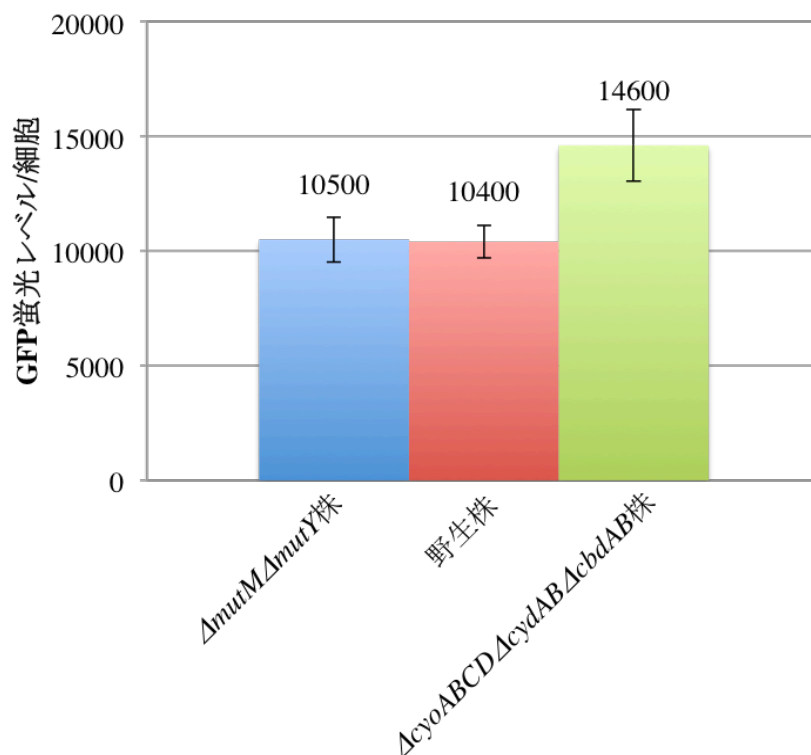


図 21  $\Delta mutM\Delta mutY$  株と野生株の *ahpC*-GFP レベル

低酸素環境における  $\Delta mutM\Delta mutY$  株と野生株、 $\Delta cyoABCD\Delta cydAB\Delta cbdAB$  株の細胞内 *ahpC*-GFP レベル。 $\Delta mutM\Delta mutY$  株と野生株は各々4 バッチ、 $\Delta cyoABCD\Delta cydAB\Delta cbdAB$  株は2 バッチの平均値を示した。

## ② フラボタンパク質による酸素の自動酸化の影響

有酸素環境における大腸菌の主な活性酸素発生経路は、フラボタンパク質を介した経路と言われている。電荷を帯びたフラボタンパク質と酸素が偶然衝突することで酸素が還元し活性酸素が生じる。フラボタンパク質の中で、アスパラギン酸オキシダーゼ (NadB) やフマル酸還元酵素 (Frd) は、細胞内の大部分の過酸化水素を生成するという報告がある[21]。そこで低酸素環境下においても、アスパラギン酸オキシダーゼとフマル酸還元酵素が過酸化水素の生成に大きな影響を与えているのではないかと考えた。 $\Delta mutM\Delta mutY$  株を元に各々のフラボタンパク質欠損株を作製し、*ahpC*-GFP レベルおよび突然変異頻度を測定した。低酸素環境における生育時間は、 $\Delta nadB\Delta mutM\Delta mutY$  株が 60~72 時間、 $\Delta frdA\Delta mutM\Delta mutY$  株が 54 時間であり、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株と比較すると生育速度が低下した。

### (a) 細胞内過酸化水素レベルへの影響

アスパラギン酸オキシダーゼ( $\Delta nadB\Delta mutM\Delta mutY$ 株)およびフマル酸還元酵素( $\Delta frdA\Delta mutM\Delta mutY$ 株)が、低酸素環境下において活性酸素生成に大きな影響を与えるのであれば、細胞内 *ahpC*-GFP レベルは  $\Delta mutM\Delta mutY$  株と比較して低下すると予想した。

$\Delta nadB\Delta mutM\Delta mutY$  株の *ahpC*-GFP レベルは、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株と同程度であった(図 22)。つまり、低酸素環境下においてアスパラギン酸オキシダーゼは過酸化水素生成に大きな影響を与えないと示唆された。しかし、 $\Delta frdA\Delta mutM\Delta mutY$  株の *ahpC*-GFP レベルは、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株と比較して約 1.5 倍低下した(図 22)。よってフマル酸還元酵素は低酸素環境における過酸化水素生成に関与しており、全体の約 32%の過酸化水素産生に関与していると示された。

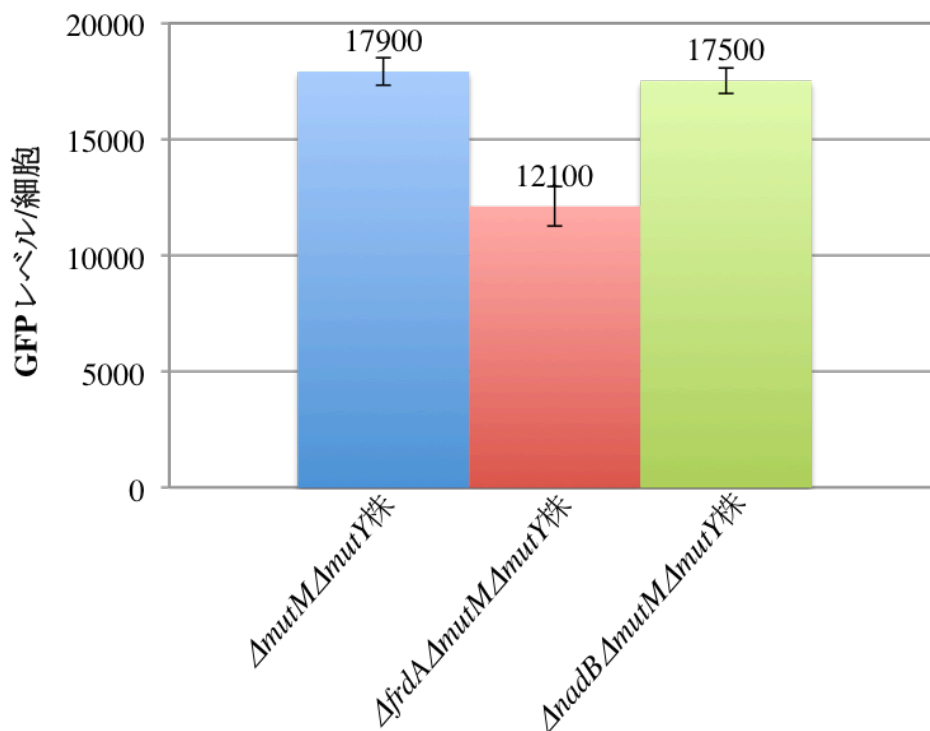


図 22 フラボタンパク質による細胞内 *ahpC*-GFP レベルへの影響

低酸素培養における  $\Delta mutM\Delta mutY$  株、 $\Delta frdA\Delta mutM\Delta mutY$  株、 $\Delta nadB\Delta mutM\Delta mutY$  株の細胞内 *ahpC*-GFP レベル。 $\Delta mutM\Delta mutY$  株と  $\Delta nadB\Delta mutM\Delta mutY$  株は 15 バッチ、 $\Delta frdA\Delta mutM\Delta mutY$  株は 12 バッチの平均値を示した。

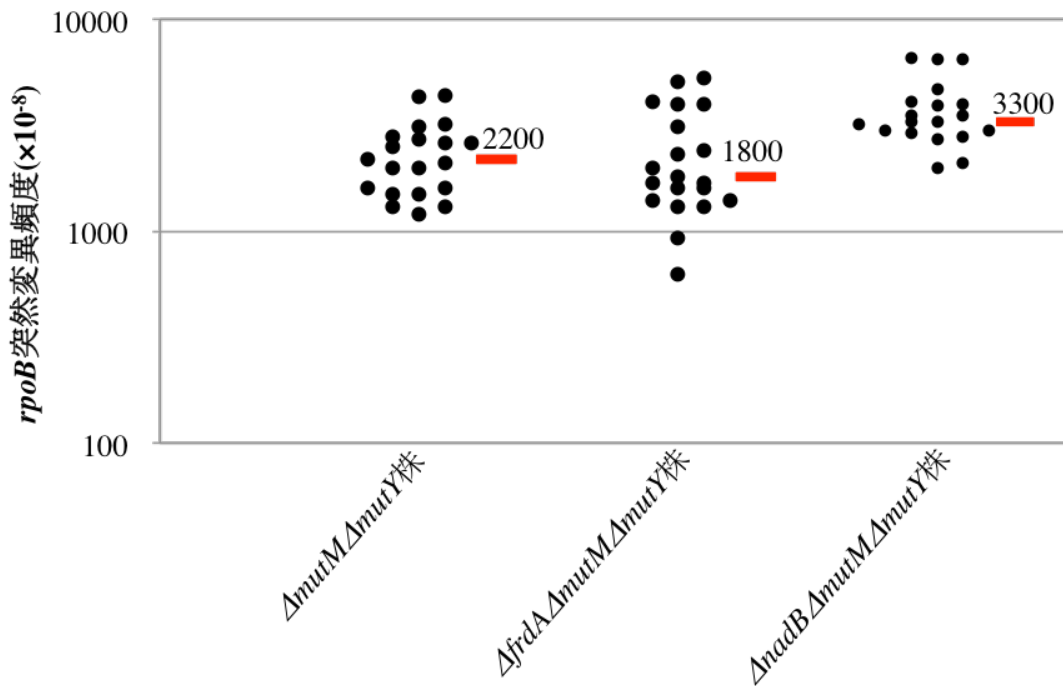


## (b) 酸化 DNA 損傷への影響

細胞内 *ahpC*-GFP レベルの解析結果から、低酸素環境における過酸化水素産生にフマル酸還元酵素が大きく関わっていることが示された。この結果から、 $\Delta frdA \Delta mutM \Delta mutY$  株の 8-oxoG 生成量も低下すると考えられるため、突然変異頻度は  $\Delta mutM \Delta mutY$  株と比較して低下すると予想した。また  $\Delta nadB \Delta mutM \Delta mutY$  株の細胞内 *ahpC*-GFP レベルが、 $\Delta mutM \Delta mutY$  株と同程度であったことから 8-oxoG に起因する突然変異頻度に差はないと予想した。

$\Delta frdA \Delta mutM \Delta mutY$  株の突然変異頻度 ( $1800 \times 10^{-8}$ ) は、 $\Delta mutM \Delta mutY$  株 ( $220 \times 10^{-8}$ ) と比較し 1.2 倍の低下が見られたが有意差はなかった(図 23)。細胞内過酸化水素レベルは  $\Delta mutM \Delta mutY$  株と比較して 32% 低下したが、突然変異頻度で差はなかった。この結果は、bo 型シトクロム末端酸化酵素欠損株 ( $\Delta cyoABCD \Delta mutM \Delta mutY$  株) の細胞内 *ahpC*-GFP レベルが高いにも関わらず、8-oxoG レベルの低下を示した結果(図 19, 図 20)と同様に、*ahpC*-GFP レベルが 8-oxoG レベルを反映しない場合があることを示した。アスパラギン酸オキシダーゼについての結果は予想に反して、 $\Delta nadB \Delta mutM \Delta mutY$  株の突然変異頻度は、 $\Delta mutM \Delta mutY$  株と比較し 1.5 倍上昇し、この差は有意であった(図 23)。細胞内過酸化水素レベルは  $\Delta nadB \Delta mutM \Delta mutY$  株と  $\Delta mutM \Delta mutY$  株に大きな差はなかったが、8-oxoG の生成量で差が生じた。

この結果から、低酸素環境下でフマル酸還元酵素が細胞内過酸化水素の 32% を産生していると示した。しかし 8-oxoG の生成には、フマル酸還元酵素が生成した過酸化水素の効果は見られなかった。



	<i>ΔmutMΔmutY</i> 株	<i>ΔfrdA ΔmutMΔmutY</i> 株	<i>ΔnadB ΔmutMΔmutY</i> 株
実験区数	20	20	19
中央値 ( $\times 10^{-8}$ )	2200	1800	3300
培養時間	50時間	54時間	60~72時間

図 23 フラボタンパク質による酸化 DNA 損傷への影響

低酸素培養における *ΔmutMΔmutY* 株、*ΔfrdAΔmutMΔmutY* 株、*ΔnadBΔmutMΔmutY* 株の 8-oxoG に起因する突然変異頻度。*ΔmutMΔmutY* 株、*ΔfrdAΔmutMΔmutY* 株は各々 20 実験区、*ΔnadBΔmutMΔmutY* 株は 19 実験区行った。それぞれの突然変異頻度を黒のドット、中央値を赤のバーで示した。

### ③ 低酸素環境下における過酸化水素はスーパーオキシドを介して発生したのか？

大腸菌細胞内の過酸化水素は、シトクロム末端酸化酵素が酸素を還元することによって生じるスーパーオキシドを介する経路と、フラボタンパク質による自動酸化によって酸素から生じる経路がある。低酸素環境において3種類それぞれのシトクロム末端酸化酵素が過酸化水素生成へ影響を与えなかったことから、シトクロム末端酸化酵素がスーパーオキシド生成へ与える影響も少ないと考えた。しかし、フラボタンパク質のフマル酸還元酵素に過酸化水素産生は全体の32%を占めるといった結果が得られた。フラボタンパク質による酸素の還元は過酸化水素だけでなく、スーパーオキシドも生成するとされている。よって、低酸素環境において過酸化水素産生がスーパーオキシドを介して生じるのか、それともスーパーオキシドを介さずに生じるのか調べることにした。

#### (a) 低酸素環境におけるスーパーオキシドレベルの測定

$\Delta mutM \Delta mutY$ 株のスーパーオキシドレベルの解析は、*ahpC*-GFPレベルの解析と同様の原理を利用したレポーター遺伝子解析をおこなった。スーパーオキシドレベルは*soxS*-GFPレベルを測定する。*ahpC*-GFPレベルが過酸化水素レベルを反映することに対して、*soxS*-GFPレベルはスーパーオキシドレベルを反映する。これは、*soxS*遺伝子がスーパーオキシドにより活性化する転写調節因子のSoxRタンパク質によって転写促進されることを利用している。よって、細胞質でスーパーオキシドが発生するとSoxRタンパク質を介して*soxS*-GFPの転写が促進するため、GFPレベルを測定することで細胞内スーパーオキシドレベルを測定することができる。低酸素培養下における*soxS*-GFPレベルを測定した結果、低酸素培養の*soxS*-GFPレベルは有酸素培養と比較して約3.8倍の上昇を示した(図24)。つまり、低酸素培養下における過酸化水素の生成は、スーパーオキシドを介する経路も存在することが示された。また、過酸化水素の前駆体であるスーパーオキシドのレベルが低酸素環境において上昇することから、確かに低酸素環境において活性酸素レベルが上昇することを示した。

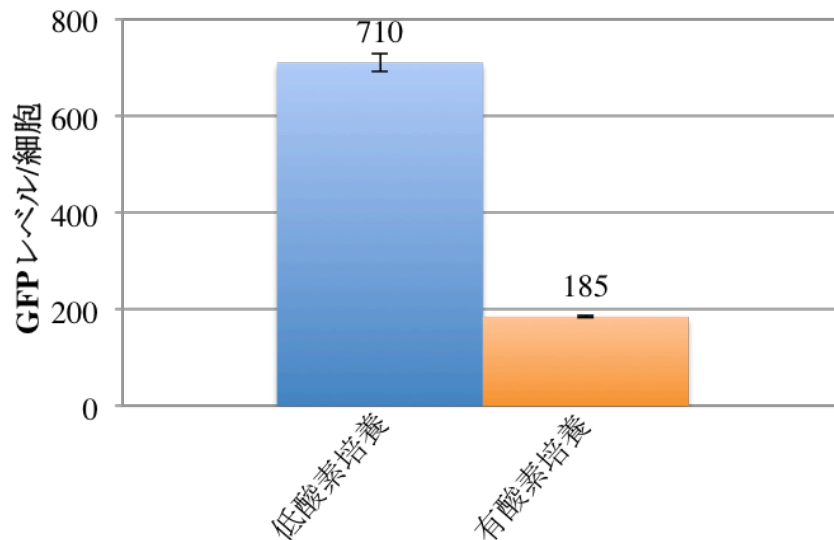


図 24 低酸素培養におけるスーパーオキシドレベル

$\Delta mutM\Delta mutY$  株の低酸素培養および有酸素培養における *soxS*-GFP レベル。それぞれ 9 バッチずつ行い、平均値を示した。

#### (b) フマル酸還元酵素によるスーパーオキシド産生への影響

フラボタンパク質による酸素の自動酸化で生じる活性酸素は、主に過酸化水素であるがスーパーオキシドも生成することが知られている。しかし、生成したスーパーオキシドは SOD によって素早く過酸化水素に変換される。そこで、フマル酸還元酵素によって生成される過酸化水素はスーパーオキシドを介して生じるのか、それとも酸素から直接生じるのか調べることにした。有酸素培養におけるフマル酸還元酵素は酸素を還元し過酸化水素を生成することが知られている。よって、低酸素環境においてもスーパーオキシドを介さずに過酸化水素が生成すると考えた。つまり、フマル酸還元酵素欠損株( $\Delta frdA\Delta mutM\Delta mutY$  株)の *soxS*-GFP レベルは、有酸素環境と比較して低下すると予想した。また、アスパラギン酸オキシダーゼは、低酸素環境において過酸化水素産生に影響しないことが示された。しかし、スーパーオキシドの産生に関与している可能性があるため、*soxS*-GFP レベルを測定した。

低酸素環境下において  $\Delta frdA\Delta mutM\Delta mutY$  株の *soxS*-GFP レベルを測定した結果、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株と同程度の *soxS*-GFP レベルを示した(図 25)。つまり、低酸素環境下ではフマル酸還元酵素はスーパーオキシドの生成レベルに影響を与えないと示唆できる。 $\Delta nad\Delta mutM\Delta mutY$  株の *soxS*-GFP レベルも  $\Delta mutM\Delta mutY$  株と同程度であったことから、低酸素環境においてアスパラギン酸オキシダーゼはスーパーオキシド産生に影響しないことが示された(図 25)。

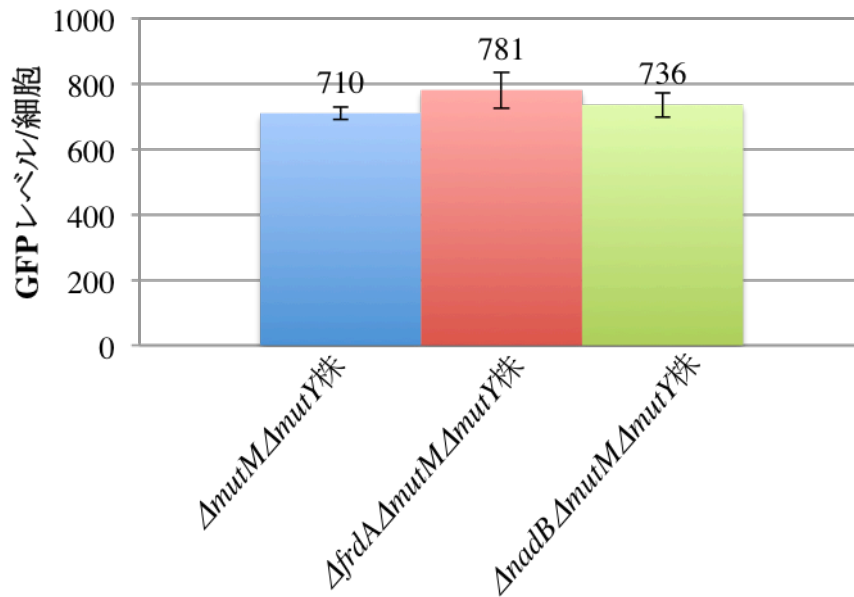


図 25 フラボタンパク質のスーパーオキシドレベルへの影響

低酸素培養における  $\Delta mutM \Delta mutY$  株と  $\Delta frdA \Delta mutM \Delta mutY$  株、 $\Delta nadB \Delta mutM \Delta mutY$  株の *soxS*-GFP レベル。それぞれ 9 バッチずつ行い、平均値を示した。

### (c) パラコート添加培地におけるスーパーオキシドレベルの解析

低酸素環境における過酸化水素産生経路を探るために、スーパーオキシド発生剤を用いてスーパーオキシドが *soxS*-GFP レベルと *ahpC*-GFP レベル、酸化 DNA 損傷にどのような影響を与えるのか調べた。大腸菌にパラコート进行处理すると細胞内においてスーパーオキシドが生成する[36] [37]。パラコート処理をした大腸菌の細胞内 *soxS*-GFP レベルと *ahpC*-GFP レベルを測定することで、*soxS*-GFP レベルと *ahpC*-GFP レベルの関係性を調べ、さらに、低酸素環境における *soxS*-GFP レベルと *ahpC*-GFP レベルを比較することで低酸素環境における過酸化水素の経路を推測した。細胞内スーパーオキシドレベルが上昇すると SOD により素早く過酸化水素に変換されるため過酸化水素レベルも上昇すると考えられる。つまり、パラコート濃度依存的に細胞内スーパーオキシド産生量が増加するため、結果として過酸化水素レベルも上昇すると予想した。また、パラコートによるスーパーオキシド生成量が増加した際の過酸化水素レベルは、低酸素環境における過酸化水素レベルと同程度まで上昇するのではないかと考えた。

培養方法は、パラコート濃度 0, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$  の LB プレートを用いて有酸素培養を行った。パラコート入り培地における  $\Delta mutM \Delta mutY$  株の生育時間は、パラコート濃度が 1  $\mu\text{M}$  の時は 14 時間であり、10 $\mu\text{M}$  と 100 $\mu\text{M}$  の時は 17 時間であった。パラコート濃度が高いことで細胞内スーパーオキシドレベルが上昇し生育障害を受けたと考えた。*soxS*-GFP レベルは、パラコート濃度依存的に上昇した。特に、パラコート濃度 100  $\mu\text{M}$  における *soxS*-GFP レベルは有酸素培養/LB プレートの時と比較し

て約 7.1 倍の上昇を示した。また、低酸素環境/LB プレートにおける *soxS*-GFP レベルは、有酸素培養/パラコート濃度 100  $\mu\text{M}$  の時と比較して約 3 倍の低下を示した (図 26)。

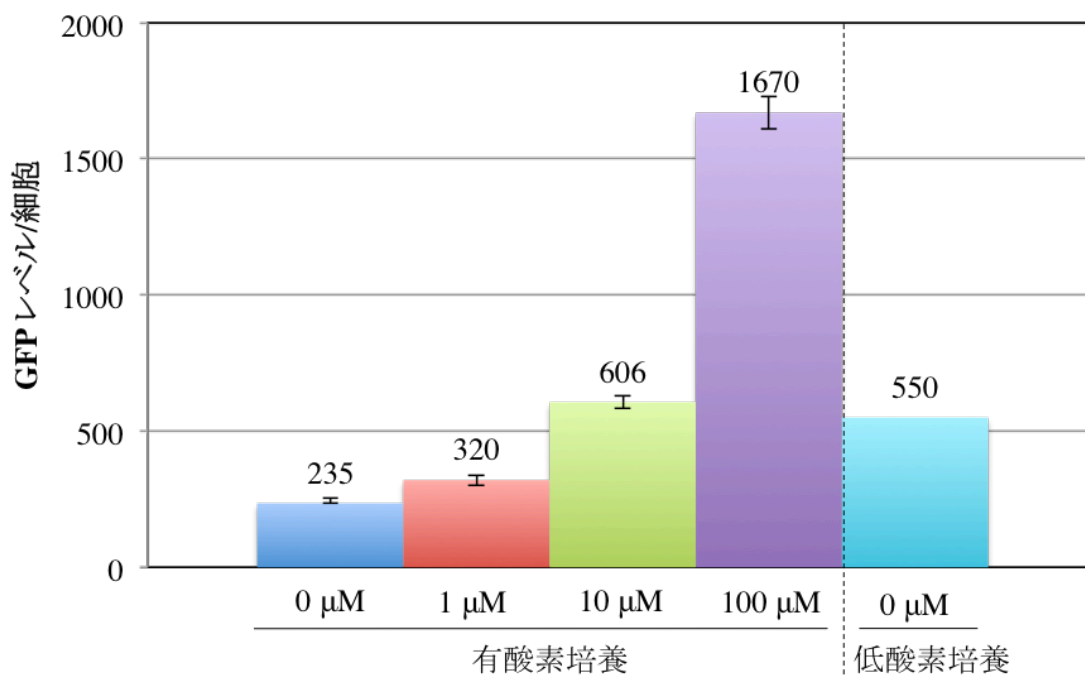


図 26 パラコート処理によるスーパーオキシドレベル

*ΔmutMΔmutY* 株のパラコートを各々 0, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$  処理した場合による有酸素培養と低酸素培養における *soxS*-GFP レベル。パラコート処理を行った場合は各々 6 バッチ、低酸素培養は 9 バッチの測定を行い、平均値を示した。

#### (d) パラコート添加培地における過酸化水素レベルの解析

パラコート添加 LB 培地における *soxS*-GFP レベルの測定結果から、パラコート濃度 100  $\mu\text{M}$  の *soxS*-GFP レベルは、低酸素環境下と比較して約 3 倍上昇するという結果が得られた。つまりパラコート濃度 100  $\mu\text{M}$  の時、細胞内のスーパーオキシドレベルは、低酸素環境と比較して約 3 倍高いことを示している。よって、パラコート濃度 100  $\mu\text{M}$  における過酸化水素レベルは、低酸素環境における過酸化水素レベルと比較して高い値になると予想した。そこで、パラコート添加培地における細胞内 *ahpC*-GFP レベルを測定し、低酸素環境における *ahpC*-GFP レベルと比較することによって過酸化水素発生経路を推測した。有酸素環境/パラコート添加 LB 培地で培養した

結果、細胞内 *ahpC*-GFP レベルはパラコート濃度依存的に上昇した(図 27)。しかし、各々のパラコート濃度に対して *ahpC*-GFP レベルの上昇率は小さかった。この結果から、大腸菌細胞内で生じるスーパーオキシドが過酸化水素生成に与える効果は小さいと示された。

ここで、低酸素環境/LB プレートにおける *ahpC*-GFP レベルと比較を行った。その結果は予想に反して、低酸素環境/LB プレートにおける *ahpC*-GFP レベルは有酸素環境/パラコート濃度 100  $\mu\text{M}$  と比較して約 5.2 倍高かった(図 27)。つまり、スーパーオキシドレベルはパラコート添加培地の方が低酸素環境と比較して約 3 倍の上昇が見られたが、過酸化水素レベルについては低酸素環境の方がパラコート添加培地よりも約 5.2 倍の上昇を示した(図 26, 27)。この結果から、低酸素環境によって生成する過酸化水素の大部分はスーパーオキシドを介さず、酸素を直接還元する事によって生じる可能性が高いと示唆された。

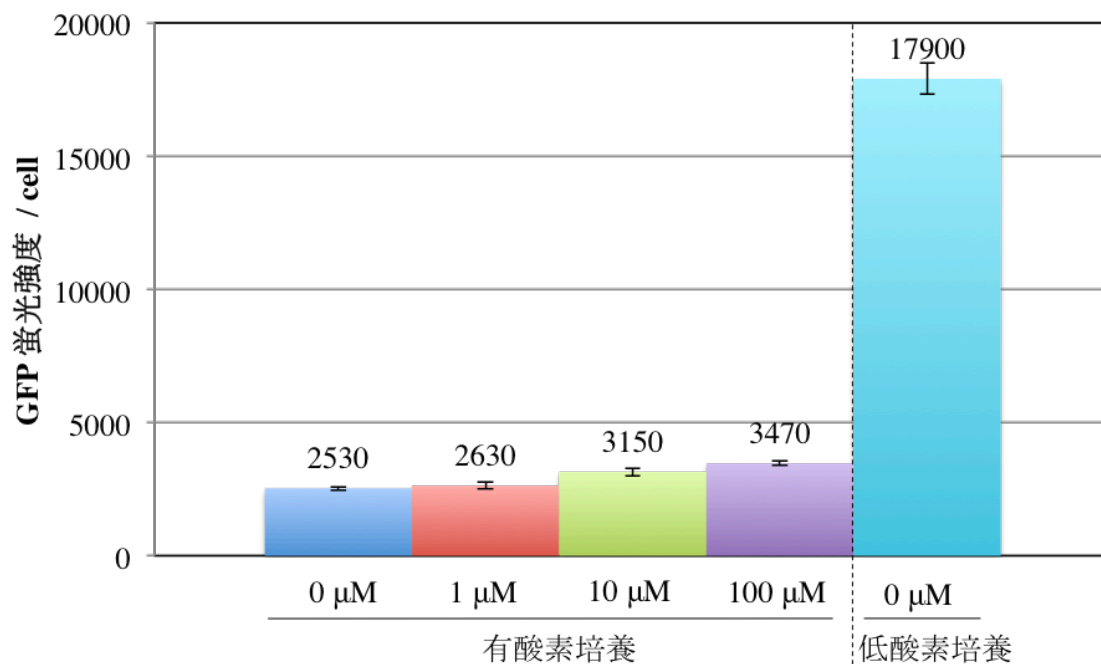


図 27 パラコート処理による過酸化水素レベルへの影響

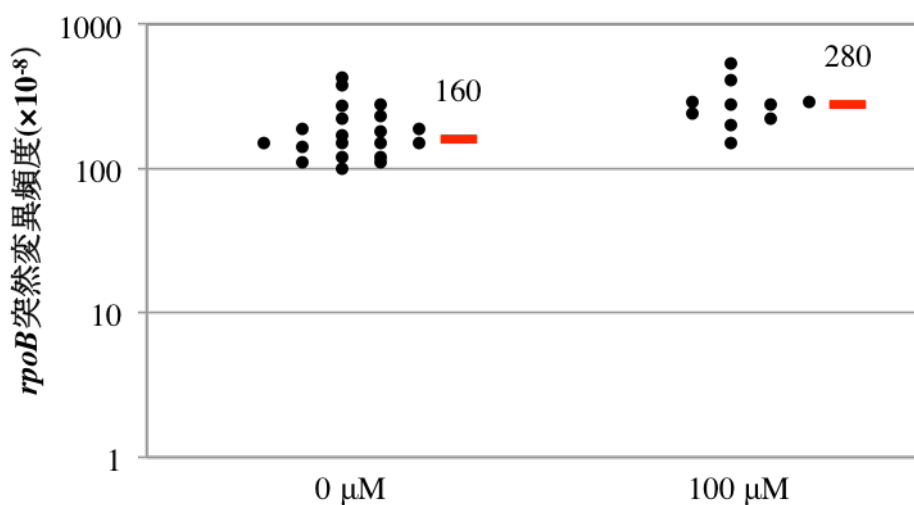
*ΔmutMΔmutY* 株のパラコートを各々 0, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$  処理した場合による有酸素培養と低酸素培養における *ahpC*-GFP レベル。パラコート処理を行った場合は各々 3 バッチ、低酸素培養は 9 バッチの測定を行い、平均値を示した。

(e) パラコート添加培地における酸化 DNA 損傷への影響

低酸素環境において、スーパーオキシドが過酸化水素の生成に与える影響は小さいと示唆された。このことから、スーパーオキシドが 8-oxoG に与える影響も小さいと考えた。そこで、スーパーオキシドが 8-oxoG 生成に与える影響について調べるために、最も *soxS*-GFP レベルが高かったパラコート濃度 100  $\mu\text{M}$  を添加した LB 培地において  $\Delta\text{mutM}\Delta\text{mutY}$  株の突然変異頻度を測定した。

有酸素培養/パラコート濃度 100  $\mu\text{M}$  の突然変異頻度( $280 \times 10^{-8}$ )は、有酸素培養/LB プレート( $160 \times 10^{-8}$ )と比較して約 1.8 倍上昇した(図 28)。有酸素培養/パラコート濃度 100  $\mu\text{M}$  の *soxS*-GFP レベルは、有酸素培養/LB プレートと比較して約 7.1 倍上昇していたことから、スーパーオキシドは 8-oxoG 生成に大きな影響を与えない事が示された。

このことから、低酸素環境における過酸化水素生成はスーパーオキシドを介さず酸素を直接還元する経路が大部分を占め、さらにスーパーオキシドが 8-oxoG 生成に大きな影響を与えないことが示された。



パラコート濃度	0 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
実験区数	20	10
中央値 ( $\times 10^{-8}$ )	160	280
培養時間	14時間	17時間

図 28 パラコート処理による酸化 DNA 損傷への影響

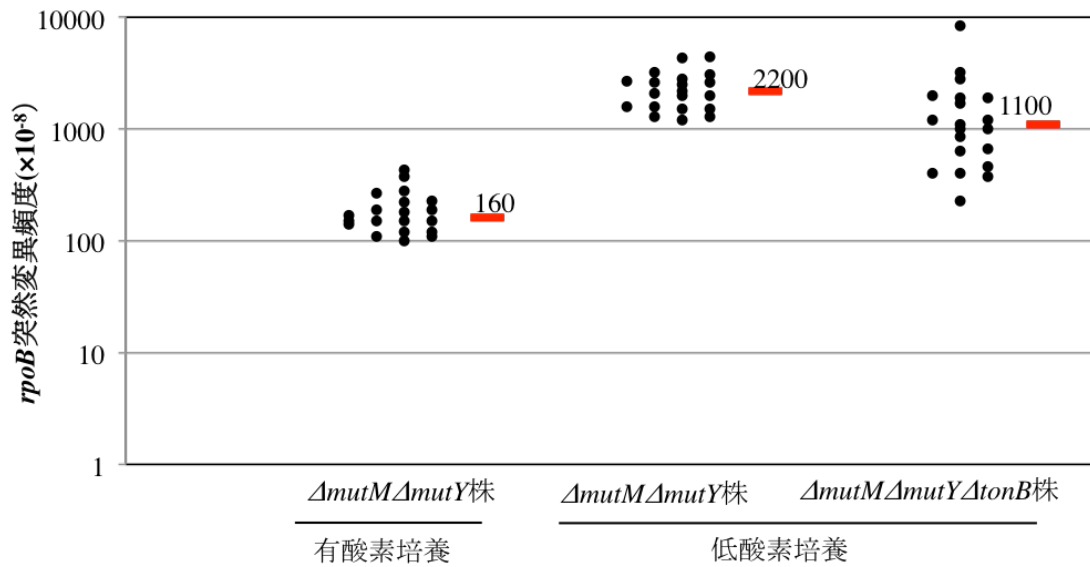
有酸素培養における 100  $\mu\text{M}$  パラコート添加培地とパラコート未処理培地の 8-oxoG 由来の突然変異頻度。100  $\mu\text{M}$  パラコート添加培地を 10 実験区、未処理培地を 10 実験区測定した。各々の突然変異頻度を黒のドット、中央値を赤のバーで示した。



#### ④ 8-oxoG に起因する突然変異にヒドロキシラジカルが関与するのか？

低酸素環境において活性酸素レベルが上昇し、8-oxoG に起因する突然変異頻度の上昇が示された。この結果から、低酸素環境においてヒドロキシラジカルが発生し、8-oxoG を生成したのか調べることにした。大腸菌細胞内のヒドロキシラジカルの定量は困難であることから、ヒドロキシラジカルが過酸化水素と二価鉄によってフェントン反応にて生成することに注目した。細胞内の鉄イオンが減少すれば、ヒドロキシラジカル生成量が減り、8-oxoG 生成量も低下すると考えた。そこで、大腸菌の鉄の取り込みに関与する TonB タンパク質を欠損させた株 ( $\Delta tonB \Delta mutM \Delta mutY$  株) を用いて、低酸素環境において突然変異頻度が  $\Delta mutM \Delta mutY$  株と比較して低下するか調べた。TonB を欠損した大腸菌は、細胞外から鉄の取り込みを行うことができないため[38]、細胞内の遊離した二価鉄の濃度が低下し、過酸化水素とフェントン反応によって生成するヒドロキシラジカル量が減少すると予想した。

低酸素環境における  $\Delta tonB \Delta mutM \Delta mutY$  株生育時間は 96 時間であった。これは細胞外からの鉄イオンの供給を阻害したことにより、鉄を利用した代謝や酵素活性が低下したことで生育阻害を示したと考えた。 $\Delta tonB \Delta mutM \Delta mutY$  株の突然変異頻度は、 $\Delta mutM \Delta mutY$  株と比較し 2 倍低下し、有酸素培養の  $\Delta mutM \Delta mutY$  株と比較し約 6.9 倍であった(図 29)。この結果から、細胞内への鉄イオンの供給を阻害した場合、フェントン反応に利用できる鉄が減少することでヒドロキシラジカル産生量が低下し、結果として 8-oxoG 生成レベルが低下したと考えた。つまり、低酸素環境においてヒドロキシラジカル量が増加したことで酸化 DNA 損傷が増加したと示された。



	<i>ΔmutMΔmutY</i> 株 有酸素培養	<i>ΔmutMΔmutY</i> 株 低酸素培養	<i>ΔmutMΔmutYΔtonB</i> 株 低酸素培養
実験区数	20	20	20
中央値 ( $\times 10^{-8}$ )	160	2200	1100
培養時間	14時間	50時間	96時間

図 29 鉄の酸化 DNA 損傷への影響

有酸素培養における *ΔmutMΔmutY* 株と、低酸素培養における *ΔtonBΔmutMΔmutY* 株と *ΔmutMΔmutY* 株の 8-oxoG に起因する突然変異頻度。各々 20 実験区ずつ測定し、1 つの変異頻度を黒のドット、中央値を赤のバーで示した。

## 第4章 考察

## 1. 低酸素環境下において活性酸素レベルが上昇し酸化 DNA 損傷の誘発が増加した理由

### ① 酸素濃度 0.1%で活性酸素の生成は可能なのか？

低酸素環境 (0.1%) は、有酸素環境 (21%) と比較すると酸素濃度が 210 倍低い。低酸素環境は、有酸素環境と比較して少ない酸素源で大量の活性酸素を生成することが可能なのか？酸素濃度 0.1%は、モル濃度に換算すると 45  $\mu\text{M}$  である。一見低く見える酸素濃度であるが、大腸菌が嫌気呼吸に切り替わる培地中の酸素濃度は 1~4  $\mu\text{M}$  であると報告があり[39]、大腸菌の K-12 株が酸素濃度 3 nM の時においてシトクロム末端酸化酵素を用いて好氣的に生育が可能という報告がある[40]。つまり、酸素濃度 0.1%という環境は、大腸菌にとっては有酸素呼吸によって ATP 合成を行い生育できる環境であると考えられる。また、酸素は細胞膜を透過し拡散するため、酸素濃度 0.1%という低酸素濃度は活性酸素を生成するために十分な量の酸素が存在する環境であると考えられる。よって、酸素濃度 0.1%という環境下で空気中の酸素を用いて、活性酸素を生成することは可能である。

しかし、有酸素環境における生育時間は 14 時間であり、低酸素環境で 50 時間であった。低酸素環境において、本当に有酸素呼吸を行っているならば生育時間が有酸素環境と同程度になるのではないかと考えた。大腸菌野生株を酸素濃度 210  $\mu\text{M}$  から 12  $\text{mmol min}^{-1}\text{l}^{-1}$  で低酸素環境にシフトした場合、クエン酸回路に関わる遺伝子の転写レベルの低下、コハク酸脱水素酵素の転写レベルが低下する代わりにフマル酸還元酵素の転写レベルの上昇、*cydAB* 遺伝子 (bd-I 型シトクロム末端酸化酵素) と嫌気環境下でアルコール発酵等に関わる還元酵素の転写レベルが上昇するという報告がある[41]。この報告から、本研究の 0.1%という低酸素環境は、*cydAB* 遺伝子 (bd-I 型シトクロム末端酸化酵素) は発現していることから酸素を用いて有酸素呼吸を行うが、主なエネルギー合成経路を嫌気呼吸に移行する段階であると考えた。つまり、低酸素環境の大腸菌細胞は嫌気呼吸を行うが、有酸素環境と比較すると有酸素呼吸による ATP 合成量が低下するため、総 ATP 合成量が低下し、生育速度が低下したと考えた。

### ② フマル酸を介した活性酸素産生機構

有酸素環境においてフラボタンパク質であるフマル酸還元酵素とアスパラギン酸オキシダーゼが主に過酸化水素の生成に関わっていると報告があった[21] [22]。そのため、低酸素環境において細胞内過酸化水素レベルが上昇した原因は、これら 2 つのフラボタンパク質が関わっているのではないかと予想した。これらの酵素の欠損株において、各々の細胞内 *ahpC*-GFP レベルを測定した結果、 $\Delta\text{mutM}\Delta\text{mutY}$  株と比較して  $\Delta\text{nadB}\Delta\text{mutM}\Delta\text{mutY}$  株は変化がなかったが、 $\Delta\text{frdA}\Delta\text{mutM}\Delta\text{mutY}$  株は約 32%低下した (図 22)。よって、フマル酸還元酵素は、低酸素環境下における全体の過酸化水素の 32%を生成に関与していると考えた。

フマル酸還元酵素は、嫌気環境下においてフマル酸をコハク酸に還元する酵素であ

るが、有酸素環境において酸素を還元しスーパーオキシドと過酸化水素を生成する。また、細胞内にコハク酸が過剰に存在する場合、フマル酸還元酵素におけるスーパーオキシドの生成が抑制され、過酸化水素の生成に切り換わるという報告がある[22][42]。つまり、酸素濃度 0.1% の条件下において、大腸菌は嫌気的な代謝と好気的な代謝を行っていると考えたため、嫌気な代謝によって細胞内のコハク酸量が増加すると考えた。さらに、低酸素環境下において  $\Delta frdA\Delta mutM\Delta mutY$  株の *soxS*-GFP レベルは、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株と同程度であった[図 25]。つまり、低酸素環境において、フマル酸還元酵素はスーパーオキシドの生成に大きな影響を与えないと示唆される。この結果から、低酸素環境において大腸菌細胞は、嫌気的な代謝によってコハク酸を合成し、その結果として、フマル酸還元酵素が過酸化水素を産生したと考えた。

また、大腸菌野生株を定常期まで嫌気培養後、酸素濃度 10  $\mu$ M の低酸素環境下にシフトし 60 分後、フマル酸還元酵素の発現レベルが嫌気培養と比較すると 0.44 倍となったという報告がある[43]。本研究における低酸素環境下のフマル酸還元酵素も嫌気環境と比較して発現レベルが低いと考えられる。しかし、有酸素環境と比較すると、低酸素環境の方がフマル酸還元酵素は高い転写レベルである[41]。よって低酸素環境においてフマル酸還元酵素が有酸素環境と比較して過酸化水素レベルが上昇したと考えた。

### ③ シトクロム末端酸化酵素は活性酸素の生成を抑制するのか？

大腸菌は、3 種類のシトクロム末端酸化酵素が存在し、それらは電子伝達系で電子受容体として酸素を還元し水に変換する。また、酸素を水に還元する際にスーパーオキシドを生成すると言われている。そのため、低酸素環境において発現レベルが上昇する bd-I 型シトクロム末端酸化酵素(*cydAB*)が活性酸素産生を行っていると考え、 $\Delta cydAB\Delta mutM\Delta mutY$  株の細胞内 *ahpC*-GFP レベルは低下すると予想した。しかし、低酸素環境におけるシトクロム末端酸化酵素の 3 種類の単独欠損株は、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株と比較して *ahpC*-GFP レベルに大きな差はなかった(図 19)。さらに、低酸素環境と有酸素環境におけるシトクロム末端酸化酵素三重欠損株の *ahpC*-GFP レベルは、 $\Delta mutM\Delta mutY$  株と比較して上昇した(図 19)。そこで、シトクロム末端酸化酵素三重欠損株で *ahpC*-GFP レベルが上昇した原因と、単独欠損株で *ahpC*-GFP レベルが変化しなかった原因について考察した。

シトクロム末端酸化酵素三重欠損株は、M9 グルコース培地において野生株と比較すると酸素の取り込みが 85% 低下し、さらに NADH デヒドロゲナーゼ (*ndh*) とキノールモノオキシゲナーゼ (*YgiN*) の発現レベルが上昇することでユビキノンのサイクルを形成するという報告がある[28]。この報告から、シトクロム末端酸化酵素三重欠損株は、好気環境で解糖系と TCA 回路が働くと考えられる。好気環境において TCA 回路で生成した NADH は、NADH デヒドロゲナーゼによって酸化され、その電子はキノンが受け取る。シトクロム末端酸化酵素が存在する場合は、キノンから電子を受け取り、酸素 1 分子に対して 4 個のプロトンが移動し水に変換される。しかし、シト

シトクロム末端酸化酵素が存在しない場合は、電子伝達を行うことができない。つまり、電子受容体を失ったキノンから YgiN へ電子が移動し、さらに酸素に電子が1個移動することでスーパーオキシドが生成すると考えられる。細胞質で生成したスーパーオキシドは、すぐに SOD によって過酸化水素に変換される。本研究において、有酸素培養下でシトクロム末端酸化酵素三重欠損株を培養した場合、細胞内 *ahpC*-GFP レベルが  $\Delta mutM\Delta mutY$  株と比較して30倍上昇した(図19)。この結果から、シトクロム末端酸化酵素によって酸素を移動できなかった電子が大量にリークし、リークした電子が YgiN のような酸化還元酵素によって酸素に移動することでスーパーオキシドが生成し、さらに SOD によって変換されることで大量の過酸化水素が生成したと考えた。低酸素環境下においても、シトクロム末端酸化酵素三重欠損株の *ahpC*-GFP レベルが野生株と比較して約1.2倍上昇した(図19)。よって、低酸素環境においてシトクロム酸化酵素からリークした電子は、フマル酸還元酵素等の酸化還元酵素によって酸素に移動し活性酸素になったと考えられる。しかし、シトクロム末端酸化酵素三重欠損株の低酸素環境における *ahpC*-GFP レベルは、有酸素培養と比較すると約2.8倍の低下を示した(図19)。このような結果となる理由は2つあると考えた。1つ目は、リークした電子を受け取る酸素自体が少ないためである。つまり、有酸素環境の酸素濃度は、低酸素環境と比較して210倍高いことから、酸素が電子を受け取る頻度が高いと考えた。2つ目は、有酸素環境の方が電子のリークが多いためと考えた。有酸素環境と比較して、低酸素環境は有酸素呼吸に関連する酵素の発現レベルに低下が見られ、さらに嫌気呼吸に関連する酵素の発現レベルが高くなる[41]。つまり、有酸素環境の方が、有酸素呼吸によって ATP 合成を盛んに行っているため、電子伝達が盛んに働くことでリークする電子が多いと考えた。

低酸素環境において単独欠損株の過酸化水素レベルが  $\Delta mutM\Delta mutY$  株と大きな差がなかったのは、3種類のシトクロム末端酸化酵素のうちのどれか1つが欠けたとしても、他の酵素によって働きを補う事ができるためと考えた。つまり、解糖系や TCA 回路によって NADH や  $FADH_2$  が運搬した電子を、効率良く酸素を還元することにより、フラボタンパク質への過剰な電子のリークを防いでいると考えた。その結果、単独欠損株において活性酸素の生成が抑制されたと考えられる。

#### ④ 低酸素環境における活性酸素産生経路と酸化 DNA 損傷誘発

低酸素環境下における活性酸素の発生機構と酸化 DNA 損傷誘発に関するモデルを図にまとめた(図30)。解糖系、クエン酸を通して生成した NADH から NADH デヒドロゲナーゼへ電子が移動し、さらにメナキノンやユビキノンへ電子が移動する。有酸素環境下においてはキノンからシトクロム末端酸化酵素に電子が移動することでフマル酸還元酵素への過剰な電子のリークは抑制される(図31)。しかし、低酸素環境下では、メナキノンから電子がフマル酸還元酵素に移動し、さらに電子受容体として酸素を用いることで過酸化水素が産生すると考えられる。また、低酸素環境において TCA 回路におけるフマル酸からコハク酸への反応が進行することで、コハク酸が蓄積

し、フマル酸還元酵素は過酸化水素を生成すると考えた。また、生成した過酸化水素によって OxyR タンパク質が活性化し、AhpC の転写が促進することで過酸化水素のスキャベンジャー酵素の発現レベルが上昇した(図 30)。さらに、細胞内の過酸化水素が二価鉄とフェントン反応することでヒドロキシラジカル生成量が増加し、酸化 DNA 損傷が増加したと考えた。

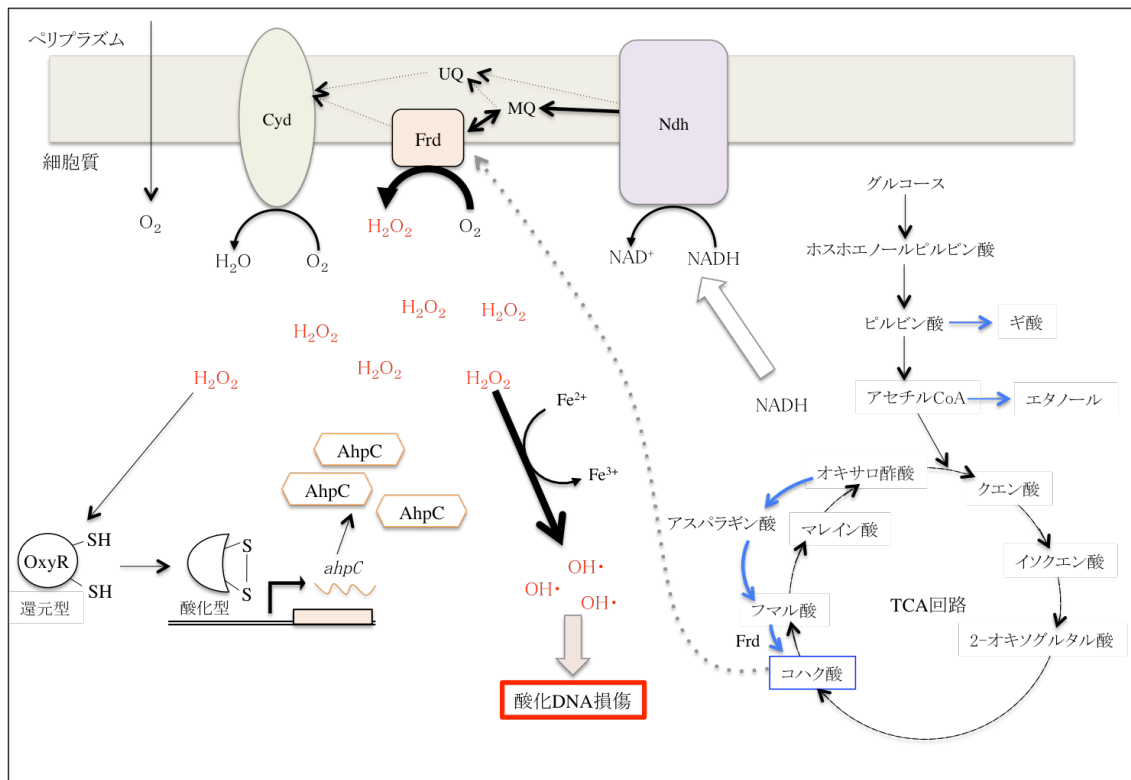


図 30 低酸素環境における活性酸素産生及び酸化 DNA 損傷誘発モデル

酸素濃度 0.1% の環境においても有酸素環境が可能であることから、解糖系やクエン酸回路から生成した NADH 等の電子伝達体を利用して、NADH デヒドロゲナーゼ (Ndh) を介してメナキノンに電子伝達する。さらにフマル酸還元酵素 (Frd) がメナキノンから電子を受け取り、酸素を還元することで過酸化水素が生成する。ここで低酸素環境下では嫌氣的な代謝によってコハク酸が蓄積する。コハク酸によってフマル酸におけるスーパーオキシドの生成が、過酸化水素の生成に切り替えられる。有酸素環境ではキノンからシトクロム末端酸化酵素 (Cyd) へ電子が移動したが、低酸素環境においては電子がフマル酸還元酵素に移動し、過酸化水素が生じると考えた。また大量に生成した過酸化水素が OxyR タンパク質を活性化することで、*ahpC* 遺伝子の転写が促進し、さらに AhpC タンパク質の発現レベルが上昇する。また過酸化水素と二価鉄がフェントン反応することでヒドロキシラジカルが発生し、酸化 DNA 損傷が誘発する。

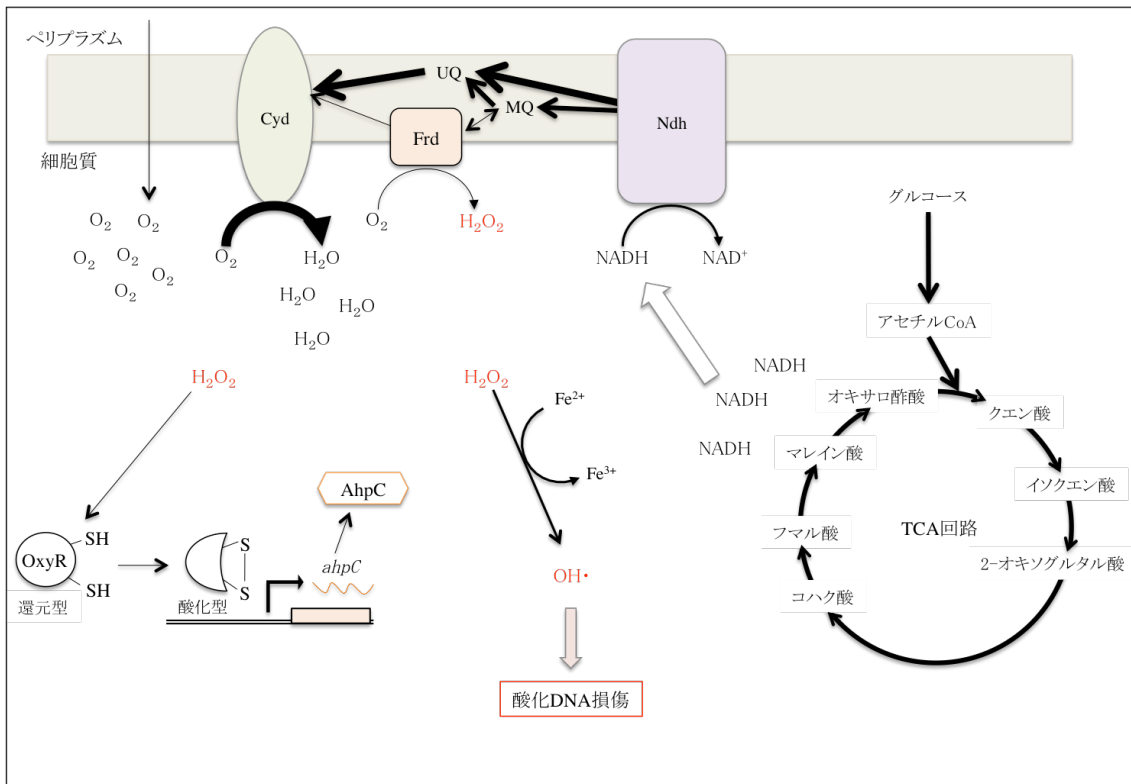


図 31 有酸素環境下における活性酸素産生及び酸化 DNA 損傷誘発モデル

有酸素環境における大腸菌は有酸素呼吸を行い、ATP 合成を行う。解糖系やクエン酸回路から生成した NADH 等の電子伝達体を利用して、NADH デヒドロゲナーゼ (Ndh) を介してキノンに電子伝達する。さらにキノンから電子がシトクロム末端酸化酵素 (Cyd) に移動し、4 個のプロトンで酸素を還元し水に変換する。しかしキノンからフマル酸還元酵素に電子が移動した場合は、酸素が還元され過酸化水素が生成する。多くの場合はシトクロム末端酸化酵素に電子が移動するため、過酸化水素の生成は抑制される。フマル酸還元酵素によって産生した過酸化水素は、OxyR タンパク質を活性化し、*ahpC* 遺伝子の転写が促進することで Ahp タンパク質が発現する。また過酸化水素と二価鉄がフェントン反応によってヒドロキシラジカルを生成し、酸化 DNA 損傷が誘発する。



## 2. 酸素シフト処理における活性酸素レベルの上昇および酸化 DNA 損傷の誘発

当研究室の坂井らは、酸素シフト処理の GC→TA トランスバージョン変異頻度が、嫌気チャンバーを利用した完全嫌気培養と比較して約 2 万倍上昇することを示した [16]。本研究では、*rpoB* 遺伝子をターゲットにした塩基置換変異のみを検出できる突然変異頻度測定法を用いて、酸素シフト処理における  $\Delta mutM\Delta mutY$  株の突然変異頻度を測定した。その結果、確かに有酸素環境と比較して約 14 倍上昇した(図 11)。しかし、低酸素環境において *ahpC*-GFP レベルの上昇が見られたため(図 12)、この酸化 DNA 損傷の増加は低酸素環境において誘発した可能性が高いと考えた。さらに、酸素シフト処理後の *ahpC*-GFP レベルが、低酸素環境と比較して約 1.2 倍上昇していたことから、低酸素環境から有酸素環境への急激な酸素濃度の増加によって過酸化水素レベルが上昇したということを示した(図 14)。つまり、酸素シフト処理は活性酸素レベルを上昇させる効果があると示された。よって、酸素シフト処理における酸化 DNA 損傷への効果は、DNA 複製時間を与えることで確認できると考えた。その結果、酸素シフト処理後 3 時間培養すると突然変異頻度が約 2 倍上昇した (図 15)。この結果から、酸素シフト処理で生成した酸化 DNA 損傷を突然変異として固定するために 3 時間必要ということがわかった。酸化 DNA 損傷が突然変異として固定するために 2 回の DNA 複製が必要であるが、通常の大腸菌の複製時間は 30 分と言われている。つまり、酸素シフト処理後の複製時間は通常よりも長い時間が必要と考えられる。坂井らの研究から、大腸菌野生株の酸素シフト処理による突然変異は、アリル間組換えが最も多いということが示されている [16]。この結果から、酸素シフト処理によって塩基置換変異だけでなく、複製フォークの進行を阻害する損傷が生じたため、複製を開始するまでに時間が必要であったと考えた。

## 3. 細胞内 *ahpC*-GFP レベルと酸化 DNA 損傷の関係性

レポーター遺伝子アッセイを用いた過酸化水素(*ahpC*-GFP)レベルの測定と  $\Delta mutM\Delta mutY$  株の 8-oxoG に起因する突然変異頻度の測定において、*ahpC*-GFP レベルと突然変異頻度の増減に相対性が見られない場合があった。細胞内の過酸化水素レベルが上昇すれば 8-oxoG の誘発も増加すると予想していた。なぜなら、細胞内過酸化水素レベルが上昇すれば 8-oxoG 生成の原因であるヒドロキシラジカルレベルも上昇すると考えたためである。しかし、酸素濃度 4~8%/ $\Delta mutM\Delta mutY$  株、オキシレース入り培地/ $\Delta mutM\Delta mutY$  株、低酸素環境/ $\Delta cyoABCD\Delta mutM\Delta mutY$  株、低酸素環境/ $\Delta nadB\Delta mutM\Delta mutY$  株の条件において、*ahpC*-GFP レベルと 8-oxoG に起因する突然変異頻度に相対性が見られなかった。例えば、酸素濃度 4~8%/ $\Delta mutM\Delta mutY$  株は有酸素環境と比較すると *ahpC*-GFP レベルが約 1.4 倍低下したにも関わらず、突然変異頻度は約 4.6 倍上昇した(図 16, 17)。この結果から、細胞内過酸化水素レベルと酸化 DNA 損傷の誘発は、単純な相対関係ではないことが示された。よって、過酸化水素

レベルが酸化 DNA 損傷を完全に反映しない原因について①突然変異頻度の測定限界、②AhpCF やカタラーゼ以外の過酸化水素消去酵素、③細胞内に存在する鉄の 3 つの観点から考察した。

1 つ目の突然変異頻度の測定限界について、なぜ過酸化水素レベルと酸化 DNA 損傷の矛盾が生じたか考察した。有酸素環境/野生株の *rpoB* 突然変異頻度を測定した結果、 $1.4 \times 10^{-8}$  であった。しかし、低酸素環境/ $\Delta mutM \Delta mutY$  株の突然変異頻度は  $2.2 \times 10^{-5}$  であり、非常に高い頻度で突然変異が誘発した。この時の細胞内 *ahpC*-GFP レベルは 17900 であり、有酸素環境/ $\Delta mutM \Delta mutY$  株と比較すると約 9.2 倍と非常に高いレベルであった。よって、低酸素環境/ $\Delta mutM \Delta mutY$  株は、大腸菌において細胞内過酸化水素レベルと突然変異頻度が高い状態であると考えられる。特に、最も高い突然変異頻度を示したのは、0.5% グルコース添加 LB 培地/酸素シフト処理の  $1.1 \times 10^4$  であり [44]、それ以上の突然変異頻度は確認されていない。つまり、突然変異頻度は測定限界が存在し、高い突然変異頻度における活性酸素への影響を考察する場合、活性酸素レベルの差を突然変異として検討することが困難であると考えた。

2 つ目は、AhpCF やカタラーゼ以外の消去酵素の関与について、これまでに、AhpCF やカタラーゼ以外で過酸化水素の消去機能を持つ酵素が発見された。大腸菌のアルコールデヒドロゲナーゼ E (*adhE*) は、主に嫌気環境においてアルコールをアルデヒドにする働きがあるが、好気環境下において過酸化水素の消去に関わるという報告がある [45]。アルコールデヒドロゲナーゼ E のように、通常の機能とは別の過酸化水素消去活性をもつ未知の酵素が、大腸菌に存在する可能性がある。つまり、低酸素環境においては OxyR タンパク質により転写促進された *ahpC* と *katG* の発現レベルが上昇するが、別の過酸化水素消去活性を持つタンパク質の活性や発現については調べられていない。*ahpC*-GFP レベルに対して酸化 DNA 損傷が相対的でなかった場合、AdhE のような未知の消去酵素によって水への変換率が影響を受け、それに伴ってヒドロキシラジカル生成量が増加することで、酸化 DNA 損傷生成レベルと *ahpC*-GFP レベルが相対的に反映しなかったと考えた。

3 つ目の可能性は、細胞内に存在する鉄の影響である。8-oxoG の原因であるヒドロキシラジカルは、過酸化水素と二価鉄によって生成される。よって、細胞内の鉄の量や、鉄の分布によりヒドロキシラジカルの生成量は変化すると考えた。ヒドロキシラジカルは、反応性が非常に高いが、寿命は短い。そのため、DNA を酸化するためには染色体 DNA の近くでヒドロキシラジカルの生成が必要である。つまり、染色体 DNA の近くに二価鉄イオンが存在しなければならない。これまでに、二価鉄が DNA 鎖の RGGG 配列のグアニンに隣接するグアニンの N7 の位置に結合しやすいという報告がある [46]。つまり、RGGG 配列の近くに鉄が豊富に存在する場合は、ヒドロキシラジカルの発生により 8-oxoG 生成量が増加すると考えた。また、本研究において、細胞外からの鉄の取り込みを阻害する  $\Delta tonB \Delta mutM \Delta mutY$  株における低酸素環境の突然変異頻度を測定した結果、 $\Delta mutM \Delta mutY$  株と比較して 2 倍の低下を示した。この結果から、細胞内に存在する鉄の分布と量が 8-oxoG 生成レベルに大きな影響を与えるため、

過酸化水素レベルと 8-oxoG 量に相対性が見られなかったと考えた。

上記のように、細胞内過酸化水素レベルと酸化 DNA 損傷の誘発は、単純な相対関係ではないことが示された。よって、今後は別の活性酸素レベル測定方法による細胞内活性酸素レベルの測定と酸化 DNA 損傷の解析方法が必要であると考えた。また、嫌気チャンバーとオキシレースを利用した完全嫌気培養によって、*ahpC*-GFP レベルと 8-oxoG 量が低下するか調べることによって、*ahpC*-GFP レベルと 8-oxoG 量の相関性を示す必要がある。

#### 4. 今後の展望

① 本研究は、有酸素環境と低酸素環境における大腸菌細胞内の過酸化水素レベルを調べるために、レポーター遺伝子アッセイを用いた GFP レベルの測定を行った。大腸菌の OxyR タンパク質は、過酸化水素により酸化することで活性化し、*ahpC* 遺伝子の転写を促進する。よって、*ahpC* 遺伝子の転写レベルは、細胞内の過酸化水素レベルを反映する。このレポーター遺伝子アッセイによる過酸化水素レベルの解析方法は、簡便であり、さらに生理条件下での過酸化水素レベルの比較を行えるという利点がある。*soxS*-GFP レベルについては、パラコート濃度依存的に上昇を示したことから、細胞内のスーパーオキシドレベルと *soxS*-GFP レベルは相対性があると示された(図 26)。一方で、*ahpC*-GFP レベルについては、LB 液体培地に 1 mM 過酸化水素を処理した場合は、処理していない場合と比較して約 1.8 倍上昇したが、過酸化水素濃度 1 mM 以上の濃度において *ahpC*-GFP レベルは上昇を示さなかった。また、LB 寒天培地に過酸化水素を添加し培養した場合の *ahpC*-GFP レベルは、過酸化水素を添加していない LB 培地と大きな差が見られなかった[52]。この結果から、細胞外から過酸化水素を処理した場合、過酸化水素の濃度と *ahpC*-GFP レベルは相関性を示さない条件があると判明した。さらに、LB 寒天培地において有酸素環境下で *mutMmutY* 欠損株を直径 1.5 mm になるまでコロニーを培養後、LB 液体培地で全てのコロニーを回収後の菌液に過酸化水素の処理を行い、突然変異頻度を測定した結果、過酸化水素処理の有無による変異頻度の変化は見られなかった(第 5 章 付録 図 34)。よって、突然変異頻度についても、細胞外の過酸化水素濃度と 8-oxoG 量は、相関性を示さなかった。これは、過酸化水素が大腸菌の外膜を通過し、ペリプラズム領域で YdeD タンパク質が放出したシステインによって過酸化水素を水に変換する機構や[53]、別の過酸化水素消去機構や排出機構によって、細胞外の過酸化水素に対して細胞内の過酸化水素レベルを低いレベルに維持すると考えた。その結果、ヒドロキシラジカル生成量は増加せず、8-oxoG 生成量も変化しなかったと考えた。よって、細胞外から過酸化水素を処理する場合は、細胞内の *ahpC*-GFP レベルと酸化 DNA 損傷として検出することが困難である。本研究は、*ahpC*-GFP レベルの測定で細胞内過酸化水素レベルを観察したため、今後はレポーターアッセイ以外の解析方法を用いて再現性を示す必要がある。蛍光プローブ試薬を用いた活性酸素検出方法や抗酸化能の増減を観察する酸化ストレスマーカーを用いた方法、OxyR タンパク質の酸化還元型をウエスタンブロッティ

ングにより区別することで過酸化水素を検出する方法等において、低酸素環境下における大腸菌細胞内の活性酸素検出方法を検討する必要がある。

② 本研究は、MG1655 株を由来として、MutM や MutY、シトクロム末端酸化酵素、フラボタンパク質の遺伝子欠損株を作製した。MG1655 株は、一般的な大腸菌を用いた研究に利用される K-12 株由来である。よって、低酸素環境下において MG1655 株で見られた細胞内過酸化水素レベルの上昇は、K-12 株由来の大腸菌株においても幅広く見られる現象ではないかと考えた。しかし、多剤排出トランスポーターが存在する大腸菌や、O157 等の病原性大腸菌においては、低酸素環境下における細胞の挙動が異なる可能性がある。そのため、今後は多剤耐性大腸菌や病原性大腸菌における低酸素環境下で過酸化水素レベルの検討が必要と考えた。

また、本研究は低酸素環境下において大腸菌細胞内の活性酸素レベルが上昇した原因は、約 0.1 %の酸素濃度において酸素呼吸と嫌気呼吸を同時に行うことにより、結果として過酸化水素生成量が増加したと考えた。そこで、大腸菌だけでなく、酸素呼吸と嫌気呼吸を行う生物においても同様の現象が見られる可能性がある。活性酸素は、DNA に限らず、タンパク質や脂質等の細胞の構成成分を損傷する。低酸素環境における大腸菌の 8-oxoG は、MutM と MutY によって完全に修復されたが、タンパク質や脂質、8-oxoG 以外の酸化 DNA 損傷について、今回は調べられていないため過酸化水素レベルの上昇によって障害が起きていた可能性がある。よって、今後は大腸菌だけでなく、酵母や動物細胞等において、低酸素環境下における活性酸素レベルの研究や、それに伴う酸化損傷について調べる必要があると考えた。

③ 大腸菌はフマル酸還元酵素を含め酸化還元に関わる酵素が豊富に存在する。本研究では、フマル酸還元酵素が過酸化水素産生に関わることを示したが、低酸素環境における過酸化水素全体の 32%である。つまり、残りの 68%の原因については分かっていない。フマル酸還元酵素や活性酸素抑制機構の活性等を調べることで、低酸素環境において活性酸素レベルが上昇した原因を調べる必要がある。また、過酸化水素は、鉄-硫黄クラスターの損傷に関与し[47]、スーパーオキシドは mononuclear な鉄の mismetallation[48]を引き起こす。これらの酵素の損傷により、酵素活性の低下や代謝の阻害が引き起こされる。活性酸素は DNA の酸化だけでなく、酵素活性等にも影響を与える事から、細胞内代謝に大きな影響を与えるため、低酸素環境において過酸化水素レベルが上昇した原因を探ることは生物の生命維持にとって重要と考えた。

④ シトクロム末端酸化酵素は、有酸素環境において大部分の過酸化水素生成を抑制することを示唆した(図 19)。しかし、低酸素環境においては 15%程度の抑制であった(図 19)。なぜシトクロム末端酸化酵素は、低酸素環境において過酸化水素の生成を抑制しなかったのかという疑問が生じた。そこで、低酸素環境は、電子がシトクロム末端酸化酵素に移動するよりもフマル酸還元酵素に移動しやすい環境と考えた。そのため、今後は低酸素環境における電子の移動や、シトクロム末端酸化酵素とフマル酸還元酵素の活性について調べる必要があると考えた。また、低酸素環境においてフマル酸還元酵素とシトクロム末端酸化酵素の転写レベルが、有酸素環境と比較して上昇して

いるのか調べる必要がある。

⑤ *frdA**mutMmutY* 欠損株の *ahpC*-GFP レベルが、*mutMmutY* 欠損株と比較して低下することを示したが、Frd タンパク質以外のタンパク質による影響を調べるために *frdA* 遺伝子を挿入したプラスミドを導入した *frdA**mutMmutY* 欠損株によって相補性の確認をする必要がある。また、Frd タンパク質は膜に存在するため、*frdA* 遺伝子の欠損により細胞膜の構造が変化している可能性がある。細胞膜の構造の変化によって、膜に存在するトランスポーターや代謝に関与する酵素の働きが変化する可能性がある。よって、今後は Frd タンパク質の活性部位を欠損させた株を利用することによって、過酸化水素レベルが低下することを確認する必要がある。

⑥ オキシレース添加培地による嫌気培養を行った結果、低酸素環境と比較して突然変異頻度は非常に低い頻度にまで低下したが、*ahpC*-GFP レベルは半分程度しか低下しなかった。この結果から、酸化 DNA 損傷と過酸化水素の関係は非常に複雑な関係であると考えられる。よって、今後は嫌気チャンバーとオキシレースを用いた完全嫌気培養において、酸化 DNA 損傷と細胞内過酸化水素レベルを測定する必要がある。また、酸素濃度 4~8%における過酸化水素レベルは、有酸素環境と比較して低下した。この結果から、酸素濃度がどの程度まで低下すると低酸素環境 (0.1%) の活性酸素レベルのような活性酸素レベルの上昇が見られるのか調べる必要がある。

⑦ 低酸素環境における大腸菌の培養は、富栄養培地である LB 寒天培地を用いた。活性酸素に関与する研究の多くは、液体の最小培地を用いることが多い。これは、細胞内の活性酸素生成経路や消去機構が栄養条件に影響を受ける可能性があるためである。LB 寒天培地での酸素シフト処理による *mutMmutY* 欠損株の突然変異頻度は、M9 グルコース培地と比較して約 6.7 倍の上昇を示した[44]。この結果から、酸素シフト処理において活性酸素の生成レベルは培地の種類によって大きく変化すると考えられるため、低酸素環境においても活性酸素の生成レベルは培地の影響を受けると考えた。また、寒天培地と液体培地による違いは、栄養分の取り込みや酸素の取り込みにも関与すると考えられる。これらのことから、低酸素環境において培地の種類や栄養条件について検討が必要であると考えた。

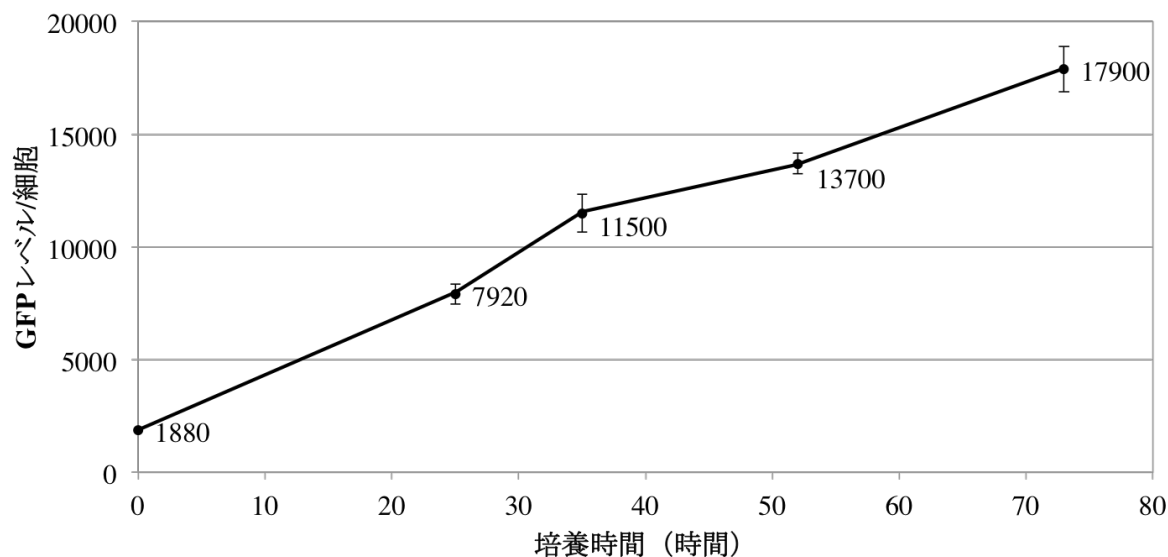
⑧ 本研究では細胞内活性酸素レベルと 8-oxoG に起因する突然変異頻度を測定することにより、細胞内代謝や酸化 DNA 損傷全体を観察した。低酸素環境において活性酸素レベルの上昇が見られ、その影響を *mutMmutY* 欠損株で調べた結果、酸化 DNA 損傷も顕著に増加していた。しかし、野生株における酸化 DNA 損傷による突然変異頻度は、MutM タンパク質および MutY タンパク質の高い修復能によって低い頻度に抑制された。つまり、低酸素環境における細胞内のストレスは著しく上昇しているにも関わらず、遺伝情報を維持する能力が非常に高いと考えられる。このことから、低酸素環境において遺伝情報を守る能力が高いにも関わらず、活性酸素生成を抑制する機能が存在しないのかという疑問が生じた。大腸菌は通性嫌気性細菌であり、動物の腸など、非常に酸素濃度が低い場所で生育する場合がある。よって、低酸素環境において活性酸素の生成抑制機構について追究することは、大腸菌の生命活動において重

要であると考えられる。近年、活性酸素をシグナル分子として能動的に産生するという報告がある。例えば、8-ニトロ-cGMP によるセンサータンパク質の S-グアニル化がある。これは、活性酸素と一酸化窒素(NO)が反応し、産生した活性窒素種(RNOS)によって 8-ニトロ-cGMP が生成する。8-ニトロ-cGMP が、タンパク質のシステイン残基に存在する SH 基と反応し、cGMP 構造を付加するセンサータンパク質 S-グアニル化を引き起こすことで、細胞内の酸化還元状態の恒常性を維持するという報告がある[54]。また、感染や炎症における生体防御等にも関わっている。このように、活性酸素は細胞内でシグナル分子として、細胞の増殖や分化、代謝などの制御に関与すると考えられている。これらのことから、低酸素環境下において、大腸菌細胞内で生成した過酸化水素は、シグナル分子として能動的に産生された可能性がある。

また、大腸菌の OxyR タンパク質のレギュロンは、過酸化水素の除去に関与するアルキルヒドロキシペルオキシダーゼ(*ahpCF*)とカタラーゼ G(*katG*)だけでなく、ヘム合成段階でプロトポリンに二価鉄を付加するフェロキレターゼ(*hemH*)や、二価鉄の取り込みを制御する Fur タンパク質(*fur*)、鉄の貯蔵によって損傷から DNA を守る Dps 複合体(*dps*)等が存在する。OxyR タンパク質が転写制御に関与する遺伝子は、約 40 遺伝子あり、酸化ストレスから細胞を守る働きを持つタンパク質が多く存在する。また、機能が未知のタンパク質をコードする遺伝子も存在する。機能が未知のタンパク質が、低酸素環境下で細胞内過酸化水素レベルの上昇に伴い、OxyR の転写促進によって大量に発現し、低酸素環境における細胞の恒常性を維持する可能性があると考えた。また、低酸素環境において生成した過酸化水素が別のシグナル分子として働く可能性がある。低酸素環境下における過酸化水素レベルの上昇は、本研究において初めて発見された現象である。そのため、低酸素環境において遺伝情報を守る能力が高いにも関わらず、活性酸素生成を抑制する機能が見られないという矛盾についての解明は、活性酸素がシグナル分子として働く可能性があるという点において、今後の研究の進展に期待できる。

## 第 5 章 付録

### 1. 培養時間と *ahpC*-GFP レベルの関係



コロニーの直径 (mm)	0	0.5	1.0	1.5	2.0
GFPレベル/細胞	1880	7920	11500	13700	17900
総対比	1.0	4.2	6.1	7.3	9.5
培養時間 (時間)	0	25	35	52	73

図 32 コロニーのサイズと *ahpC*-GFP レベルの関係

低酸素環境下で *ahpC*-GFP プラスミドを導入した野生型大腸菌株 (MG1655) を培養し、コロニーの直径が 0.5 mm、1.0 mm、1.5 mm、2.0 mm まで生育した場合の 1 細胞あたりの GFP レベルを測定した。コロニーの直径が 1.0 mm と 2.0 mm まで生育した場合は各々 3 実験区、0.5 mm と 1.5 mm まで生育した場合は各々 6 実験区ずつ測定した結果の平均値を示した。コロニーサイズに対する培養時間は、それぞれ 25、35、52、73 時間であった。また、0 時間は有酸素培養の GFP レベルを示した。

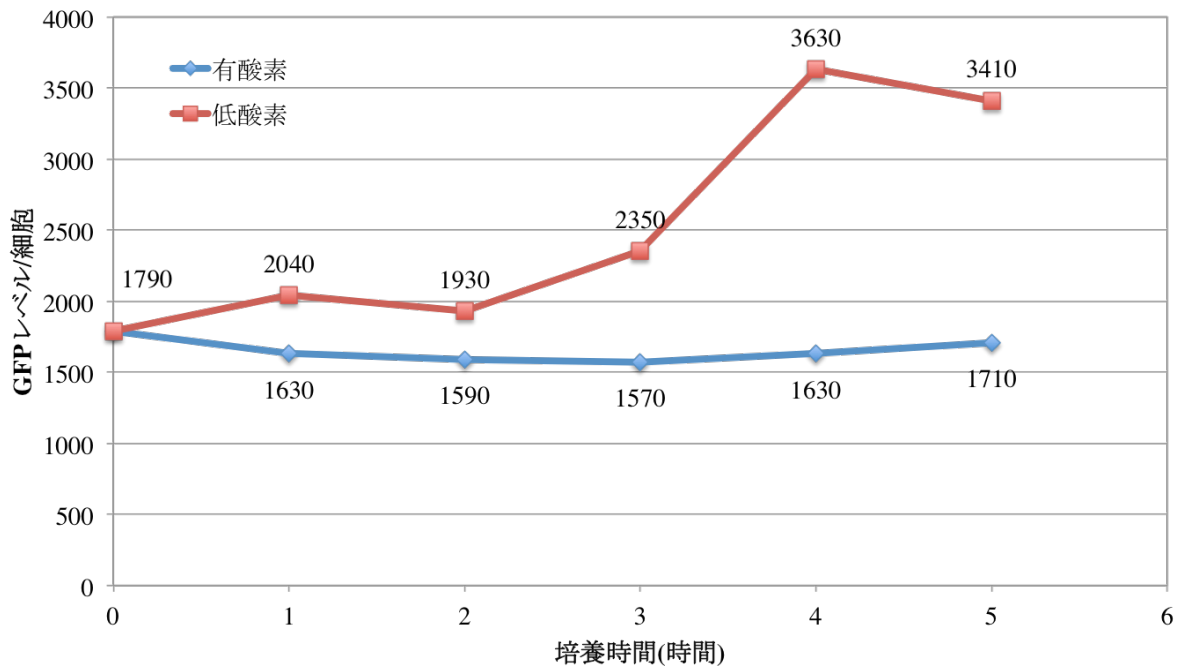


図 33 培養時間と *ahpC*-GFP レベルの関係

有酸素培養で直径 0.5 mm にまで培養後、低酸素環境で培養し、*ahpC*-GFP レベルの変化を 1 時間毎に 5 時間後まで観察した結果である(赤線)。コントロールとして、有酸素培養でコロニーの直径が 0.5 mm になるまで培養後、有酸素条件のまま 1 時間毎に *ahpC*-GFP レベルを測定した(青線)。低酸素環境と有酸素環境の *ahpC*-GFP レベルの測定には、野生型大腸菌株 (MG1655) を利用し、各々 3 実験区分の平均を示した。低酸素環境下における *ahpC*-GFP レベルは、0 時間(有酸素環境コロニー直径 0.5 mm)と比較して上昇を示したが、有酸素環境の *ahpC*-GFP レベルは変化が見られなかった。よって、低酸素環境は細胞内過酸化水素レベルの上昇によって *ahpC*-GFP レベルの上昇を示し、有酸素環境はコロニーの直径 0.5 mm の段階において定常状態であると示唆された。



## 2. 過酸化水素処理による突然変異頻度への影響

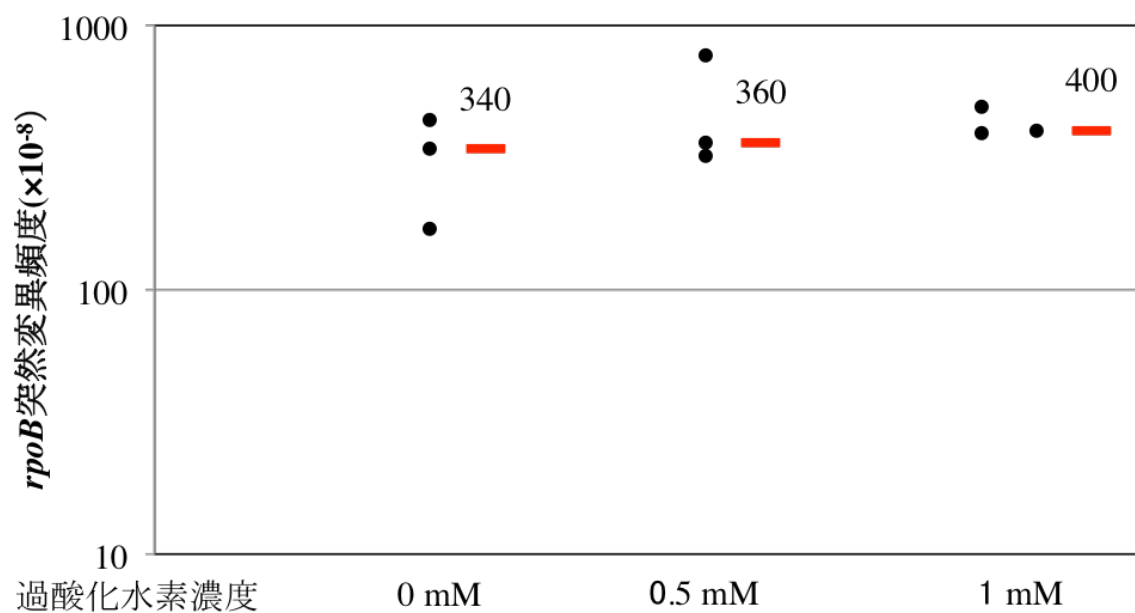


図 34 過酸化水素処理における突然変異頻度への影響

*mutMmutY* 欠損株を LB プレートで有酸素培養後、すべてのコロニーを LB 液体培地で回収し、回収した菌液に 0, 0.5, 1 mM の過酸化水素を処理した場合の突然変異頻度を示した。各々 3 実験区ずつ突然変異頻度を測定し、その中央値を示した。

## 第 6 章 参考文献

- [1] Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, 201(4359), 875-880.
- [2] Murphy, M. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J*, 417, 1-13.
- [3] Gabig, T. G. (1983). The NADPH-dependent O<sub>2</sub>-generating oxidase from human neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 258(10), 6352-6356.
- [4] Y. Kadota, J. Sklenar, P. Derbyshire, L. Stransfeld, S. Asai, V. Ntoukakis, J. DG Jones, K. Shirasu, F. Menke, A. Jones, C. Zipfel (2014) Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity, *Molecular Cell* 54, 43-55.
- [5] Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, 253(5015), 49-53.
- [6] Gabbita, S. P., Lovell, M. A., & Markesbery, W. R. (1998). Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 71(5), 2034-2040.
- [7] Alam, Z. I., Jenner, A., Daniel, S. E., Lees, A. J., Cairns, N., Marsden, C. D., ... & Halliwell, B. (1997). Oxidative DNA Damage in the Parkinsonian Brain: An Apparent Selective Increase in 8-Hydroxyguanine Levels in Substantia Nigra. *Journal of neurochemistry*, 69(3), 1196-1203.
- [8] Kasai, H., Hayami, H., Yamaizumi, Z., Saito, H., & Nishimura, S. (1984). Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanine derivatives. *Nucleic acids research*, 12(4), 2127-2136.
- [9] Kouchakdjian, M., Bodepudi, V., Shibutani, S., Eisenberg, M., Johnson, F., Grollman, A. P., & Patel, D. J. (1991). NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG (syn). cnddot. dA (anti) alignment at lesion site. *Biochemistry*, 30(5), 1403-1412.
- [10] Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S., & Loeb, L. A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *Journal of Biological Chemistry*, 267(1), 166-172.

- [11] Tchou, J., Kasai, H., Shibutani, S., Chung, M. H., Laval, J., Grollman, A. P., & Nishimura, S. (1991). 8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(11), 4690-4694.
- [12] Michaels, M. L., Cruz, C., Grollman, A. P., & Miller, J. H. (1992). Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(15), 7022-7025.
- [13] Tajiri, T., Maki, H., & Sekiguchi, M. (1995). Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutation Research/DNA Repair*, 336(3), 257-267.
- [14] H. Maki & M. Sekiguchi (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis, *Nature* 355, 273-275.
- [15] Sakai, A., Nakanishi, M., Yoshiyama, K., & Maki, H. (2006). Impact of reactive oxygen species on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*. *Genes to Cells*, 11(7), 767-778.
- [16] 坂井亜紀子 (平成 18 年) 自然突然変異の発生における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博士論文
- [17] G. Uden and J. Bongaerts (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors, *Biochimica et Biophysica Acta* 1320, 217-234
- [18] Matsushita, K., Ohnishi, T., & Kaback, H. R. (1987). NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *Biochemistry*, 26(24), 7732-7737.
- [19] Ingledew, W. J., & Poole, R. K. (1984). The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiological reviews*, 48(3), 222.
- [20] Cotter, P. A., Chepuri, V., Gennis, R. B., & Gunsalus, R. P. (1990). Cytochrome o (cyoABCDE) and d (cydAB) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the fnr gene product. *Journal of bacteriology*, 172(11), 6333-6338.
- [21] S. Korshunov and J. A. Imlay (2010) Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology* 75, 1389-1401

- [22] Seaver, L. C., & Imlay, J. A. (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 183(24), 7173-7181.
- [23] Kevin R. Messener and James A. Imlay. (2002) Mechanism of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation by Fumarate Reductase, Succinate Dehydrogenase, and Aspartate Oxidase. *J. Biol. chem* 277, 42563-42571.
- [24] Schellhorn, H. E., & Hassan, H. M. (1988). Transcriptional regulation of katE in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 170(9), 4286-4292
- [25] Imlay, J. A., & Fridovich, I. (1991). Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(11), 6957-6965.
- [26] Imlay, J. A., Chin, S. M., & Linn, S. (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, 240(4852), 640-642.
- [27] Henle, E. S., & Linn, S. (1997). Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 272(31), 19095-19098.
- [28] Vasilij A. Portnoy, Markus J, Herrgard, # and Bernhard Ø Palsson. (2008) Aerobic Fermentation of D-Glucose by an Evolved Cytochrome Oxidase-Deficient *Escherichia coli* Strain, *Appl. Environ. Microbiol* 74(24), 7561-7569
- [29] Kirill A. Datsenko and Barry L. Wanner (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *PNAS* 97(12), 6640-6645
- [30] Bauer, C. E., Elsen, S., & Bird, T. H. (1999). Mechanisms for redox control of gene expression. *Annual Reviews in Microbiology*, 53(1), 495-523.
- [31] Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual review of biochemistry*, 77, 755.
- [32] Toru Nakayashiki, Hirotada Mori (2013) Genome-Wide Screening with Hydroxyurea Reveals a Link between Nonessential Ribosomal Proteins and Reactive Oxygen Species Production, *Journal of bacteriology* 195, 1226-1235

- [33] Nakayashiki, T., Saito, N., Takeuchi, R., Kadokura, H., Nakahigashi, K., Wanner, B. L., & Mori, H. (2013). The tRNA thiolation pathway modulates the intracellular redox state in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 195(9), 2039-2049.
- [34] Noumi, T., Maeda, M., & Futai, M. (1987). Mode of inhibition of sodium azide on H<sup>+</sup>-ATPase of *Escherichia coli*. *FEBS letters*, 213(2), 381-384.
- [35] Inokuchi, H., Ito, R., Sekiguchi, T., & Sekiguchi, M. (2013). Search for Proteins Required for Accurate Gene Expression under Oxidative Stress ROLES OF GUANYLATE KINASE AND RNA POLYMERASE. *Journal of Biological Chemistry*, 288(46), 32952-32962.
- [36] Hassan, H. M., & Fridovich, I. (1979). Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. *Journal of Biological Chemistry*, 254(21), 10846-10852.
- [37] Chan, E., & Weiss, B. (1987). Endonuclease IV of *Escherichia coli* is induced by paraquat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(10), 3189-3193.
- [38] Hantke, K. (1981). Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Molecular and General Genetics MGG*, 182(2), 288-292.
- [39] Becker, S., Holighaus, G., Gabrielczyk, T., & Unden, G. (1996). O<sub>2</sub> as the regulatory signal for FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 178(15), 4515-4521.
- [40] Stolper, D. A., Revsbech, N. P., & Canfield, D. E. (2010). Aerobic growth at nanomolar oxygen concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), 18755-18760.
- [41] Partridge, J. D., Sanguinetti, G., Dibden, D. P., Roberts, R. E., Poole, R. K., & Green, J. (2007). Transition of *Escherichia coli* from aerobic to micro-aerobic conditions involves fast and slow reacting regulatory components. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11230-11237.
- [42] Seaver, L. C., & Imlay, J. A. (2004). Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide?. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 48742-48750.

- [43] Trotter, E. W., Rolfe, M. D., Hounslow, A. M., Craven, C. J., Williamson, M. P., Sanguinetti, G., ... & Green, J. (2011). Reprogramming of *Escherichia coli* K-12 metabolism during the initial phase of transition from an anaerobic to a micro-aerobic environment. *PLoS One*, 6(9), e25501-e25501.
- [44] 上船晴香（平成 25 年）大腸菌の生育環境の急激な変化が引き起こす突然変異への影響 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
- [45] Echave, P., Tamarit, J., Cabisco, E., & Ros, J. (2003). Novel antioxidant role of alcohol dehydrogenase E from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 30193-30198.
- [46] Rai, P., Cole, T. D., Wemmer, D. E., & Linn, S. (2001). Localization of Fe<sup>2+</sup> at an RTGR sequence within a DNA duplex explains preferential cleavage by Fe<sup>2+</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of molecular biology*, 312(5), 1089-1101.
- [47] Jang, S., & Imlay, J. A. (2007). Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 929-937.
- [48] Gu, M., & Imlay, J. A. (2013). Superoxide poisons mononuclear iron enzymes by causing mismetallation. *Molecular microbiology*, 89(1), 1g3-134.
- [49] Ezraty, B., Chabalier, M., Ducret, A., Maisonneuve, E., & Dukan, S. (2011). CO<sub>2</sub> exacerbates oxygen toxicity. *EMBO reports*, 12(4), 321-326.
- [50] Clanton, T. L. (2007). Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 102(6), 2379-2388.
- [51] Koppenol, W. H. (1976). Reactions involving singlet oxygen and the superoxide anion. *Nature* **262**, 420 – 421.
- [52] 市岡拓馬（平成 27 年）大腸菌  $\Delta$ mutMY 株に対する培地中の過酸化水素が及ぼす細胞内酸素ラジカル濃度と突然変異頻度への影響 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
- [53] Ohtsu, I., Wiriyathanawudhiwong, N., Morigasaki, S., Nakatani, T., Kadokura, H., & Takagi, H. (2010). The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17479-17487.

[54] Sawa, T., Zaki, M. H., Okamoto, T., Akuta, T., Tokutomi, Y., Kim-Mitsuyama, S., ... & Arimoto, H. (2007). Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3' , 5' -cyclic monophosphate. *Nature Chemical Biology*, 3(11), 727-735.



## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導・ご助言、さらに研究材料の惜しみない援助をして頂きました真木寿治教授に深く感謝いたします。秋山昌広准教授、真木智子助教授、古郡麻子助教授、アドバイザーの高木博史教授、木俣行雄准教授には本研究へのご助言を頂き、深く感謝いたします。また、活性酸素の解析について貴重な助言をくださった大津巖生先生と、本研究で利用したレポーター遺伝子アッセイについてご指導とプラスミドをくださいました仲屋敷徹先生に心より御礼申し上げます。さらに本研究を行う上での環境整備をして頂いた府川奈美秘書に深く感謝します。研究室の皆様には公私共々に様々なご協力を頂き、誠に有難うございました。最後に長い学生生活を経済面だけでなく、精神面でも支えてくれた両親や家族に深く感謝いたします。