

(別紙1)

## 論文内容の要旨

申請者氏名 上船 晴香

DNAの酸化損傷の1つである7, 8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG)は、DNA鎖上のグアニンがヒドロキシラジカルによって酸化されることで生じ、G:C→T:A変異を特異的に誘発する。しかし、大腸菌は8-oxoGによる突然変異を抑制する8-オキシグアニンDNAグリコシラーゼ (MutM) とアデニンDNAグリコシラーゼ (MutY) の働きによりG:C→T:A変異の発生を低い頻度に抑えている。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 *mutM mutY* 欠損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による突然変異の発生に大きな影響を与えることを見出している。*mutM mutY* 欠損株を酸素濃度0.1% (低酸素環境) から大気中の酸素濃度21% (有酸素環境) へシフトした場合(酸素シフト処理)、G:C→T:A変異頻度が酸素濃度0% (完全嫌気環境) で培養した場合と比較して約2万倍にも上昇することが報告されており、酸素シフト処理によりDNA中に8-oxoGが大量に産生されると考えられた。環境中の酸素濃度の違いが遺伝的不安定性の程度に影響を与えることは生物学的に重要であると考え、「酸素シフト処理における8-oxoG誘発の分子機構の解明」を当初の研究目的とした。

まず、酸素シフト処理におけるヒドロキシラジカルレベルの上昇を確認するために、前駆体である過酸化水素の濃度に応じて発現する *ahpC-gfp* 融合遺伝子を挿入したプラスミドを *mutM mutY* 欠損株に導入し、GFP蛍光レベルを測定することで細胞内の過酸化水素レベルを調べた。酸素シフト処理後の細胞での *ahpC-GFP* 蛍光レベルは、有酸素環境で培養した細胞と比較して約11倍上昇したが、低酸素環境でのみ培養した細胞での *ahpC-GFP* 蛍光レベルも約9倍上昇していた。従って、酸素シフト処理で増加したと考えていた8-oxoGは、低酸素環境下の培養中に生じた可能性が高いと推測した。そこで、「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進め、以下の結果を得た。

大腸菌のシトクロム末端酸化酵素は3種類存在し、これらの酵素の発現量は酸素濃度の影響を受けることが報告されている。それぞれのシトクロム末端酸化酵素の単一欠損株および多重欠損株の解析から、シトクロム末端酸化酵素は、低酸素環境下での過酸化水素産生を抑制することが示唆された。また、自動酸化に関わるフラボタンパク質の内、フマル酸レダクターゼが低酸素環境での過酸化水素産生に大きく関わっていることを明らかにした。さらに、パラコートを用いた解析により、低酸素環境下で産生した過酸化水素の大部分はスーパーオキシドを介さず、酸素から自動酸化により直接生じることも明らかになった。この発見は、高等生物(動物や植物)の細胞における低酸素環境下での酸素ストレス誘発機構の解明にも繋がると考えられる。

(別紙2)

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 上船 晴香

突然変異は放射線や化学変異原によって誘発することが可能であるが、自然界ではそのような変異原は環境中にはほとんど存在せず、通常の生育環境で生じる自然突然変異は細胞内で生じる自然 DNA 損傷や複製エラーなどが原因となっている。また、細胞が有する DNA 修復や変異抑制機能により、ほとんどの自然 DNA 損傷や複製エラーはほぼ完全に除去・修正され、自然突然変異は極めて低いレベルに維持されている。遺伝学や進化学の基本的概念として、自然突然変異の発生率、すなわち変異率は細胞分裂あたりでは一定であると考えられてきた。しかしながら、自然突然変異の変異率の低さが原因して、実証的な研究は少なく、この考えの妥当性については古くから生物学の大きな論点となっている。本研究は、大腸菌を用いた分子遺伝学的手法により、自然突然変異の発生頻度と環境中の酸素濃度との関係を解析したものである。

研究の契機は、嫌気環境で培養した大腸菌を大気中に取り出した際に、DNA 中の 8-oxoG による変異誘発を全く抑制できない *mutM mutY* 変異株で極めて高頻度の自然突然変異の発生が観察されたことである。酸素濃度計による測定から、実験に用いた嫌気環境は酸素濃度が 0.1% (低酸素環境) であったことが判明し、低酸素環境での培養中に大量の 8-oxoG が DNA 中に誘発されていることを示唆する実験結果を得た。大腸菌内では、酸素ラジカル消去系の強い働きにより、酸素ラジカルの濃度は通常の設定法では検出不可能なレベルに低く維持されている。そこで、過酸化水素に応答する遺伝子発現系を利用した *ahpC-GFP* レポーターアッセイを用いて、低酸素環境下で増殖している細胞内での過酸化水素濃度の測定を行った。その結果、低酸素環境では通常の好機環境の場合と比較して、過酸化水素濃度が約 10 倍に上昇していることを見いだした。さらに、各種の変異株を用いた解析により、上昇した濃度の過酸化水素はスーパーオキシドの産生を経由するものでなく、主としてフラボタンパク質による自動酸化で生じることも明らかにした。好気環境では、電子伝達系の末端酸化酵素により電子の受容体としての酸素が水分子に効率よく変換されるが、低酸素環境ではその効率が低下し、電子伝達系の途中でフラボタンパク質に電子が渡されて自動酸化がより生じやすくなるものと考察している。これらの結果から、微好気環境 (極端に低い酸素濃度環境) では自動酸化による過酸化水素の発生に起因した酸化 DNA 損傷の誘発が昂進し、好気環境と比較して遺伝的不安定性のリスクが高まることが明らかとなり、変化する環境に応じて突然変異率が変動する可能性が示された。

以上のように、本論文は低酸素環境での酸化 DNA 損傷誘発の昂進を解明した上で、新たな研究領域を開拓したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。