

低 pH 環境下における大腸菌細胞内で  
誘発される遺伝的不安定性

宮原亮太

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)

2018 年 1 月 22 日提出

# 目次

## 第1章 序論 4 - 16

1. 自然突然変異
2. 自然突然変異を誘発する酸化 DNA 損傷
3. 酸化 DNA 損傷を引き起こすヒドロキシラジカル
4. 本研究の目的

## 第2章 材料と方法 17 - 31

### 1. 材料

試薬・培地・抗生物質

大腸菌株

プラスミド

プライマー

### 2. 実験操作

DNA 操作

タンパク質操作

大腸菌遺伝子欠損株の作製

プラスミド DNA の構築

突然変異頻度測定

過酸化水素感受性試験

フローサイトメーターを用いたプロモーターアッセイ

統計解析

### 第3章 結果

32 - 51

1. アスコルビン酸添加によって酸化 DNA 損傷レベルが上昇する原因の解明
2. 増殖環境 pH が酸化 DNA 損傷レベルに与える影響の解析
3. 低 pH 環境と細胞内過酸化水素レベルと酸化 DNA 損傷レベルの関係
4. 低 pH 環境が細胞内遊離鉄イオン濃度及び酸化 DNA 損傷レベルに与える影響

### 第4章 考察

52 - 67

1. 大腸菌細胞内におけるアスコルビン酸の作用
2. 細胞外低 pH と遺伝的不安定性
3. 細胞内活性酸素種レベルと酸化 DNA 損傷
4. 低 pH 環境における細胞内鉄イオン濃度に与える影響
5. 今後の展望

### 付録

68

### 謝辞

69

### 参考文献

70 - 81

## 第 1 章 序論

## 1. 自然突然変異

### はじめに

地球上に生命が誕生し現在に至るまで、生物は多岐にわたる進化を遂げてきた。生物進化の原動力と考えられている現象の一つが自然突然変異である。自然突然変異とは生物が自然界で生息する過程で生じる突然変異のことであり、放射線処理や変異剤処理など人工的に引き起こされる突然変異は含まれない。自然突然変異が生み出す遺伝的多様性は環境適応という側面から考えると生存戦略にプラスに作用する場合がある。しかし、ヒトにおいては突然変異の蓄積が老化や発癌の原因であることが示唆されており、年齢ごとの発癌率は年齢の5～6乗に比例することが報告されている[1]。生じる突然変異には様々な種類が存在する。染色体DNA中の塩基の置き換え（塩基置換）や、塩基の挿入または欠失、転移による大規模な染色体再編、特定の配列の数的変化など、様々なタイプの変異がある。

### 自然突然変異研究の経緯

自然突然変異は稀に発生する現象であるため、近年まで自然突然変異研究におけるモデル生物の1種として使用されている大腸菌においても、論文によっては変異率が10倍異なる場合もあり近年まで突然変異の発生率を正確に推定することが困難であった[2,3]。しかし、次世代シーケンスをはじめとする技術の発展に伴い、より正確な自然突然変異率を推定することが可能となった。変異蓄積実験系を用いた研究では大腸菌をはじめ、出芽酵母、ショウジョウバエにおける突然変異率が算出されただけでなく[4,5,6]、ヒトやマウスの親子孫間での突然変異率なども算出されてきた[7,8]。これらの研究から自然突然変異が発生する頻度は生物種によって大きく異なることが明らかにされた。

## 2. 自然突然変異を誘発する酸化 DNA 損傷

### DNA 修復経路

突然変異が生じる経路は大きく分けて2通りある。1つはDNA複製の中心的役割を担うDNAポリメラーゼが新生鎖に誤った塩基対を取り込み、次の複製までに誤対合した塩基対が修復されずに変異として固定した場合である。通常生物はDNAポリメラーゼの校正機能やミスマッチ修復機構により誤対合した塩基対は99.9%以上修復される。2点目は、DNAに生じた様々な傷を修復する過程で変異が生じる場合である、DNAは細胞の中では加水分解、メチル基付加、アルキル化、酸化などの損傷に常に曝されており、ヒト細胞の染色体DNAにおいては1日あたり1万以上もの数のDNA損傷が自然発生している[9]。生物は様々な種類のDNA損傷が発生した時に対応して様々なDNA修復経路を保持している(表1)。その精密な遺伝情報伝達に大きく寄与しているものがDNA修復機構である。生物は損傷DNAの遺伝情報をほぼ正確に伝達している。表1に示すように、生物は様々なDNA修復系を保持していることで自然突然変異の発生率を低く抑えることに成功している。しかしながら、様々なDNA修復機構を保有している状態においても、突然変異は極めて低い頻度ながらもその発生頻度を0にすることはできない。

表1. 生物における主なDNA修復機構

DNA修復経路	主な機能	損傷の大きさ
相同組み換え	DNA二重鎖切断 (DSB) の修復、複製ブロックの解除	<div style="text-align: center;"> <p>損傷大</p>  <p>損傷小</p> </div>
非相同末端結合	DSBの修復 (G1や静止期に作用)	
ヌクレオチド除去修復	DNA鎖の構造を変化させる損傷タイプの除去	
損傷乗り越え	複製ブロックの解除	
塩基除去修復	塩基損傷の除去	
ミスマッチ修復	複製エラーの修復	

## 自然突然変異を誘発させる酸化 DNA 損傷

自然突然変異が生じる詳細なメカニズムを明らかにする上で、通性嫌気性である大腸菌はゲノムレベルでの研究に理想的なモデル生物として利用されてきた。自然突然変異研究は多くの生物では塩基置換変異の発生率のみを算出している場合が多数だが、大腸菌においては塩基置換変異以外に塩基の挿入/欠失、相同組換えが生じる頻度においても算出されており、通性嫌気性である特徴を生かして好気環境と嫌気環境で増殖した際に生じる変異スペクトルの違いまで明らかにされてきた[10, 11]。

酸化 DNA 損傷についてはこれまでに 50 種類以上の損傷タイプが報告されており（図 1）、酸化 DNA 損傷がゲノムの不安定性やそれに伴う疾患に強く関与していることについても数多くの研究結果が報告されている[12]。

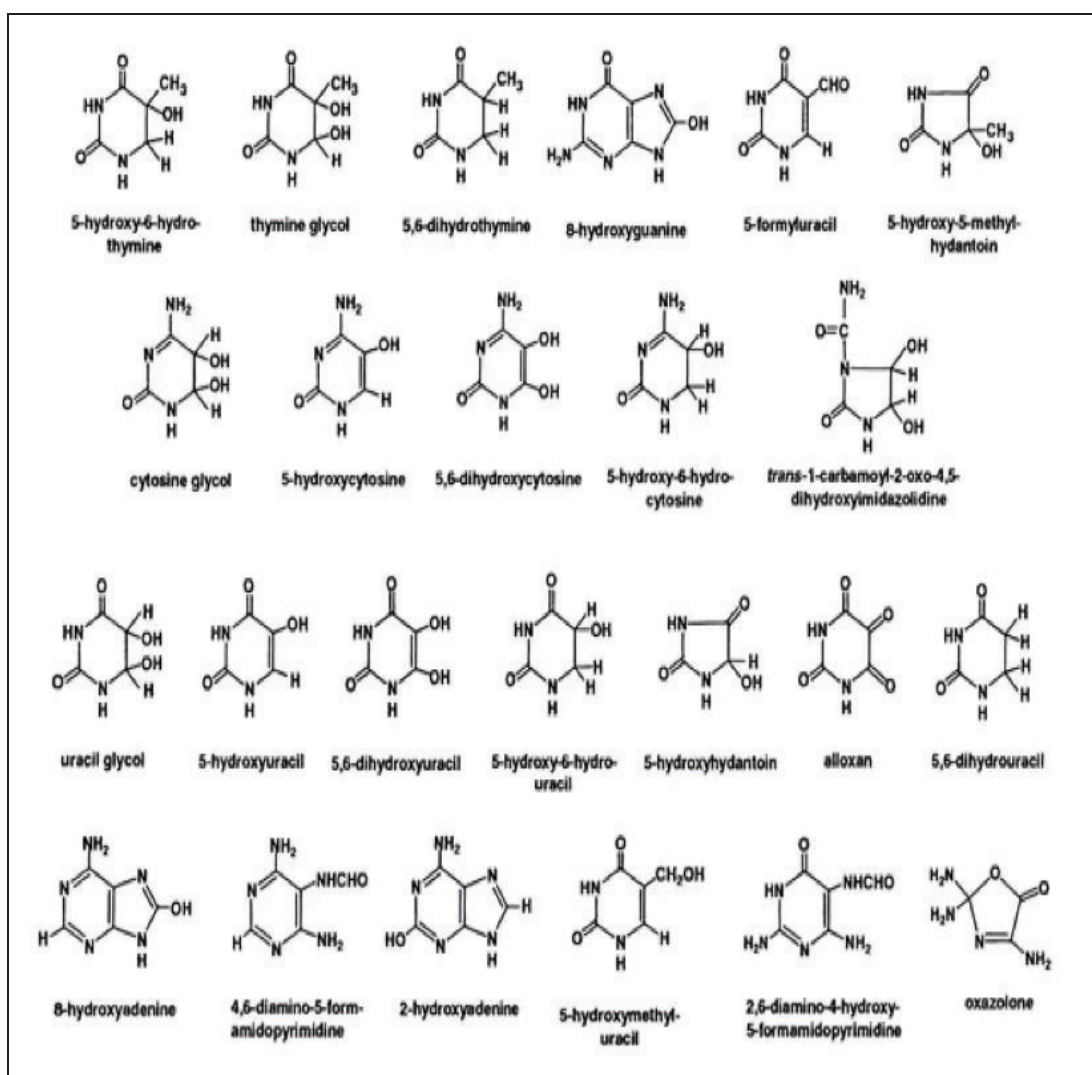


図 1. 酸素ラジカルと相互作用して生じる酸化塩基損傷の一部

## 塩基置換変異を誘発する酸化 DNA 損傷 8-oxodG

様々な酸化 DNA 損傷の中でも、DNA 複製の進行を阻害しない 8-oxoG や DNA 複製の進行を阻害するチミングリコールは代表的な酸化 DNA 損傷として多くの研究がなされている。8-oxoG については 1984 年に発見されて以降 [13]、自然突然変異を誘発する酸化 DNA 損傷として盛んに研究されてきた。

8-oxoG は DNA 中のグアニンが活性酸素種の 1 つであるヒドロキシラジカルによって直接酸化されることで生じる。生じた 8-oxoG はシトシンのみならずアデニンとも安定的な塩基対形成が可能となるため、8-oxoG とアデニンの塩基対が形成された場合、次の DNA 複製までに 8-oxoG が除去されなければ GC→TA 転移変異が誘発される。このことは大腸菌の変異株を用いた研究や、*in vitro* による複製実験等から実験的に明らかにされた [14]。DNA 中に存在する 8-oxoG の除去機構においても大腸菌で初めて実証され、次第に酵母やヒトにおいても同様に明らかにされた。生物種間問わずに 8-oxoG 除去機構が存在することからも、8-oxoG が生物にとって重要な酸化損傷であること、また修復酵素が生物の生存に極めて重要であることが推察できる。

大腸菌において、DNA 中に存在する 8-oxoG は DNA グリコシラーゼの MutM 及びアデニングリコシラーゼである MutY によって除去される。DNA 中に存在する G-C 塩基対のグアニンが酸化され 8-oxoG-C の塩基対となった場合、MutM が 8-oxoG とシトシンの塩基対を認識し 8-oxoG を除去する [15]。万が一 8-oxoG が除去されずに複製が生じ、8-oxoG とアデニンの塩基対が形成された場合は MutY が 8-oxoG とアデニンの塩基対を認識し、アデニンを除去する [15]。除去されたアデニンの部分に dCTP が DNA 中に取り込まれると MutM によって 8-oxoG が DNA 中から除去される (図 2)。DNA 中の 8-oxoG による変異誘発を完全に抑制できない *mutM*・*mutY* 二重欠損株 (以下  $\Delta$  *mutMY* 株) では GC→TA 転移変異が野生株と比較すると 100 倍以上発生することが知られている。

マウスにおいては大腸菌 MutM ホモログである OGG1 が欠損した場合、肝細胞の染色体 DNA 中に 8-oxoG が蓄積して G → T 変異の頻度が約 2 倍に上昇するだけでなく、野生型マウスの数倍の頻度で肺腫瘍が自然発生することが観察されている [16]。細胞中の 8-oxoG の蓄積及び変異誘発は疾患に大きく関与していることが強く示唆されている。



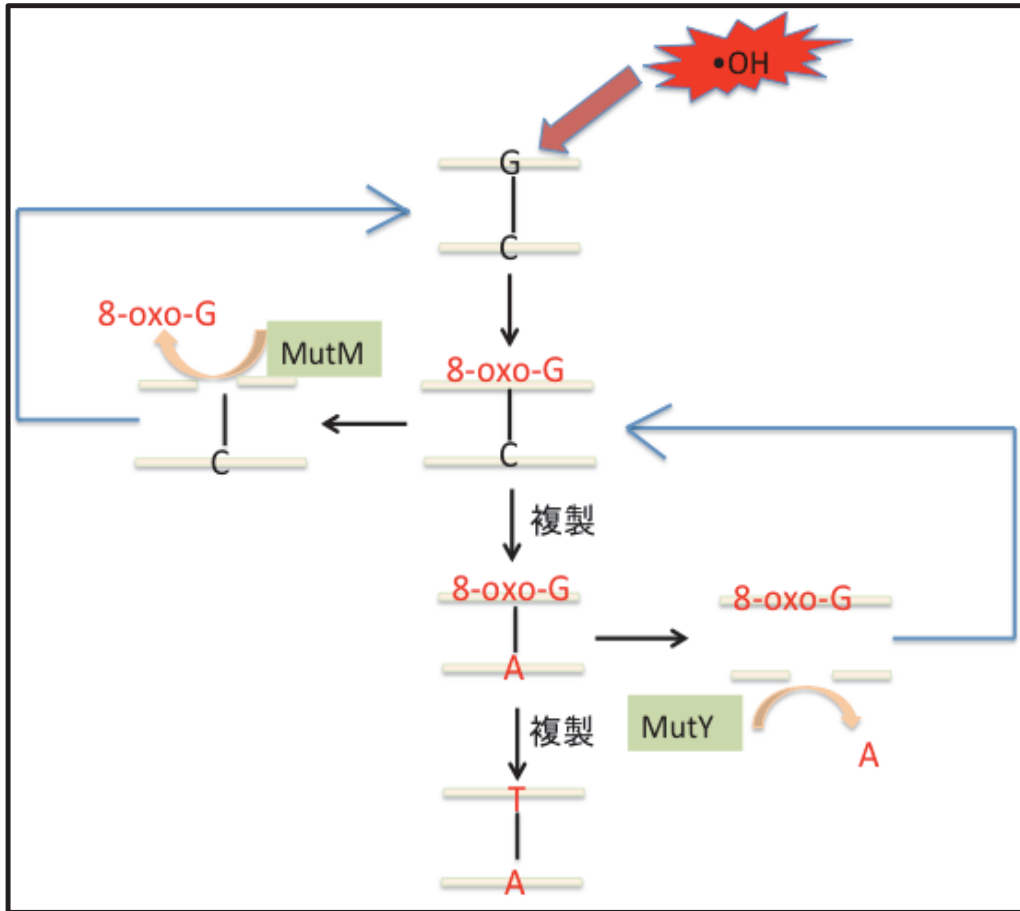


図. 2. 大腸菌 MutM・MutY による DNA 中の 8-oxoG 由来の変異誘発抑制機構

## 相同組換え修復により誘発される染色体再編

チミングリコールをはじめとする DNA 複製進行を停滞、阻害させる DNA 損傷は、適切に修復されなければ突然変異のみならず DNA 二本鎖切断、細胞死が誘導される。DNA 組換え修復経路は停滞または阻害された DNA 複製フォーク [17] から細胞を保護するために最も重要な DNA 修復経路である。大腸菌において、DNA 組換え修復の大部分は RecBCD および RecFOR 経路で修復されることが実証されている [18]。RecBCD は二本鎖切断 DNA の修復を担い、RecFOR 経路は一本鎖切断 DNA の修復を担う。双方の経路共に相同組換えのために RecA を必要とし、RecA が一本鎖 DNA の 5' から 3' 方向に結合しフィラメントを形成することで開始され、完全な DNA の相同配列の検索を開始し、交換鎖を開始し、最終的に組換え事象を誘導する (図 3)。

DNA 二本鎖切断等により組換え修復が必要となる頻度について、細菌においては通常の生育条件下に 1 世代あたり 1 箇所 [19]、哺乳類細胞においては有糸分裂の各部分で 10 箇所の複製フォークが組換え修復を受けると推定されている [20]。

先行研究において、RecA タンパク質などの相同組換え修復に関与する主要タンパク質が欠損した細胞では大腸菌細胞は紫外線感受性となり、野生型細胞よりも 10 倍高い大きな欠失が誘導されることが報告されている [21]。ヒトにおいては近年、相同組換えの増加が腫瘍感受性に関連していることが報告されている [22]。これらのことから、相同組換え修復はゲノムの完全性を維持することによって細胞の生存を助けることは明らかである。さらに、当研究室の Lan Anh が大腸菌細胞内の 8-oxoG 量と相同組換え発生頻度に相関性があることを近年明らかにした [23]。ヒト染色体ゲノムにおいても、8-oxoG が蓄積しやすい領域では染色体組換え頻度が有意に高くなる事が報告されている [24]。このことは、DNA 中に 8-oxoG をはじめとする酸化 DNA 損傷が多発するほど、塩基置換変異のみならず相同組換え修復を介した大規模な染色体再編が起こる確率が上昇することを示唆している。

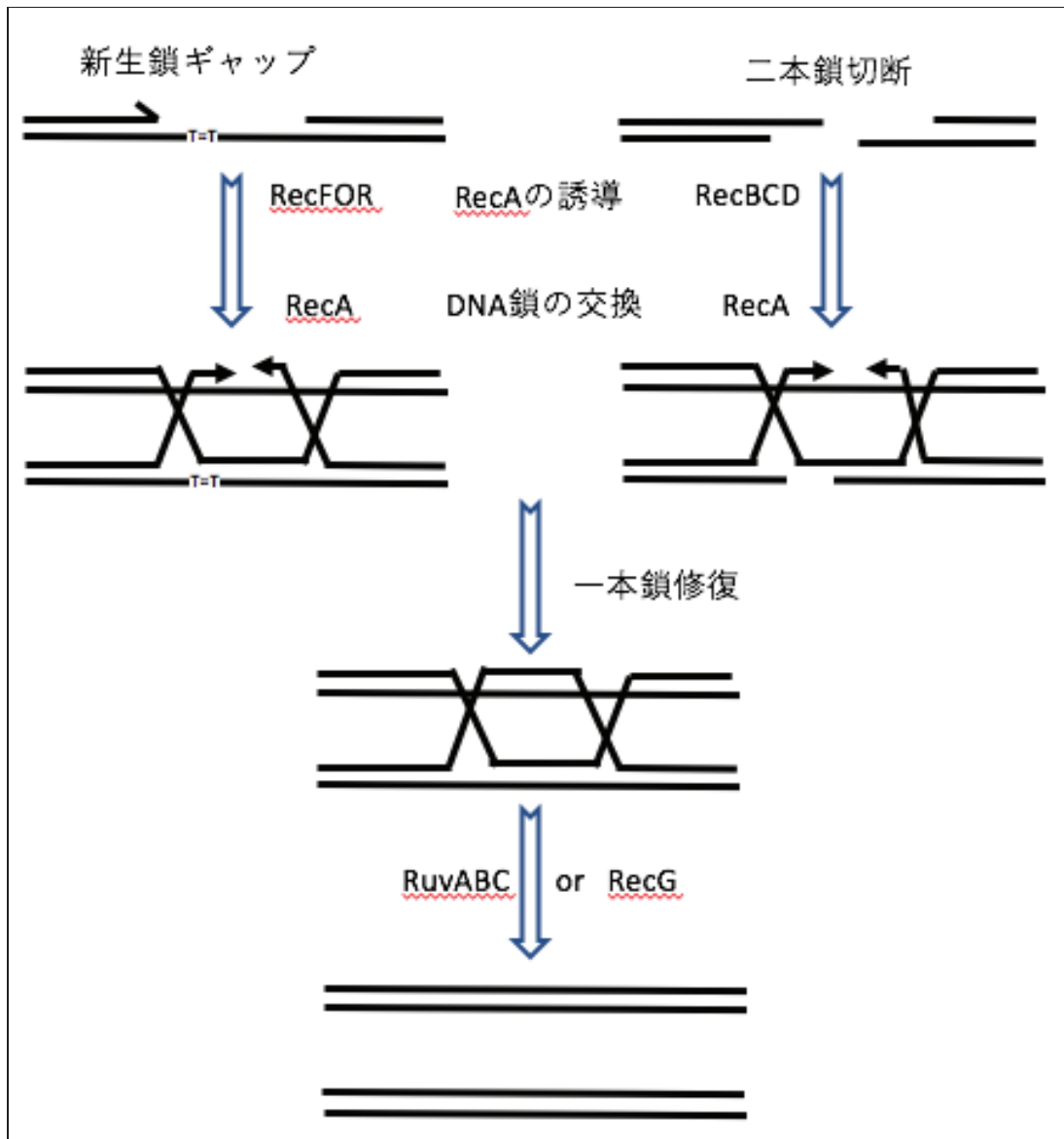


図. 3. 大腸菌における相同組換え修復機構

DNA 末端処理が行われて形成された一本鎖 DNA に RecA が結合して相同な配列を検索する。RecA 触媒による相同鎖交換により、一本鎖修復が個々の DNA 鎖の不規則性を固定化できるようになった後、RuvABC または RecG により、修復中間体からの RecA フィラメントおよび Holliday junction が除去され、元の染色体 DNA の状態に戻った。

### 3. 酸化 DNA 損傷を引き起こすヒドロキシラジカル発生経路

#### 活性酸素種発生経路及び除去機構

好気呼吸を行う生物にとって、活性酸素種は細胞内でのエネルギー合成過程で恒常的に生じており、細胞内での活性酸素種産生は避けることができない現象である。活性酸素種は細胞内でタンパク質、核酸、脂質などの生体物質を酸化し、損傷を与えることで機能不全を起こし、結果として細胞毒性を示す原因となりうる。そのため、生物はこれら活性酸素種を迅速に消去する機構を獲得している。特に、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) とカタラーゼは生物に共通して保有している消去酵素である。酸素分子が電子を受け取ることでスーパーオキシドを SOD が過酸化水素に変換し、変換された過酸化水素はカタラーゼによって水に分解され無毒化される。

大腸菌は細胞のスーパーオキシド消去のために 3 種のスーパーオキシドジスムターゼ MnSOD、FeSOD、Cu/ZnSOD (それぞれ *sodA*、*sodB*、*sodC* がコード) [25, 26] を保有している。細胞内のスーパーオキシド応答機構には SoxRS レギュロンが関与する。センサータンパク質である SoxR がスーパーオキシドの酸化を受けることで活性型となり *soxS* の転写を促進する。続いて SoxS が *sodA* を始めとする標的遺伝子のプロモーター領域に結合し転写が促進されることで細胞内スーパーオキシドの毒性から細胞を保護している [26, 27]。

細胞内に存在する過酸化水素の無毒化は、過酸化水素センサータンパク質である OxyR に存在する 2 つの SH 基が酸化されることで始まる。OxyR の SH 基が酸化されジスルフィド結合を形成することで OxyR が活性型となる [28]。活性型となった OxyR は、30 以上存在する OxyR レギュロン遺伝子のプロモーター上流に結合し転写を促進する [29]。OxyR レギュロン遺伝子群の中でも代表的な遺伝子は、高濃度の過酸化水素に曝された時に過酸化水素消去に作用するカタラーゼ HP I、HP II をコードしている *katG*、*katE* [30, 31]、生理的濃度の活性酸素消去に作用するアルキルヒドロキシペルオキシダーゼをコードする *ahpC*、*ahpF* [32] である。上記の過酸化水素分解酵素が働くことで、大腸菌細胞内の過酸化水素濃度は通常 50 nM 程度という極めて低い濃度であることが推定されている [33]。

## 細胞内鉄イオン濃度調節機構と酸化ストレス

前述したように、生物は多数の活性酸素種除去機構を保持しているが、細胞内の活性酸素種を完全に除去することはできない。除去されない活性酸素種は細胞内の様々な分子を損傷させるが、特にヒドロキシラジカルは活性酸素種の中においても酸化力が高く、細胞内のタンパク質や脂質、核酸(DNA、RNA)も同様に酸化される[34]。ヒドロキシラジカルは過酸化水素が二価鉄イオン( $\text{Fe}^{2+}$ )や一価銅イオン( $\text{Cu}^+$ )の遷移金属と反応することで生じる。ヒドロキシラジカルによる酸化損傷を最小限に抑制することは細胞の生存に重要であるため、大腸菌において細胞内の活性酸素種濃度のみならず、細胞内に遊離に存在する金属イオン、特に細胞内の含有量が高い鉄イオン濃度の厳密な制御が重要である。

鉄イオンは酸素存在下では三価鉄( $\text{Fe}^{3+}$ )の状態であり、その溶解度は $10^{-17}$ (pH7.0)と極度に低いため大腸菌は $\text{Fe}^{3+}$ を直接細胞内へ輸送することができない。細胞にとって必須金属である鉄を効率よく取り込むために、大腸菌細胞はシデロフォア(鉄担体)と呼ばれる高親和性細胞外鉄キレート剤を細胞外に分泌し[37]、細胞増殖に十分量の $\text{Fe}^{3+}$ を可溶化することで増殖に必要な鉄を細胞内へ輸送している。鉄-シデロフォア複合体の輸送は、細胞質膜の膜電位によるエネルギー変換 TonB-ExbB-ExbD 複合体に依存する外膜受容体と、ペリプラズム結合タンパク質 ABC 内膜輸送体によって行われる[37]。また、細胞内への鉄輸送能は TonB タンパク質に大きく依存していることが報告されており、*tonB* を欠損した大腸菌は、細胞内への鉄輸送能が著しく低下することが報告されている[38]。

大腸菌を含む多くのグラム陰性菌では、鉄取り込み転写制御因子 Fur (Ferric Uptake Regulator) が 100 以上の遺伝子発現を調節することで細胞内鉄イオンレベルを厳密に制御している[35]。Fur は細胞内遊離鉄イオンと結合することで転写制御因子として機能し、鉄取り込みに関与する遺伝子の転写を負に、鉄貯蔵に関与する遺伝子の転写を促進させる[35]。そのため、Fur が欠損した大腸菌細胞では鉄取り込みに関与する遺伝子群の発現量が野生型細胞と比較し増加することが知られている。結果として細胞内鉄イオン濃度が過剰になり、細胞内のヒドロキシラジカルレベルと酸化 DNA 損傷レベルが増加することが報告されている[36]。

また、Fur のみならず細胞内遊離鉄イオン濃度の制御には鉄貯蔵タンパク質が大きく寄与している。大腸菌が保有している鉄貯蔵タンパク質として、フェリチンの FtnA[39]、バクテリオフェリチンの Bfr[40]、DNA 結合タンパク質 Dps が存在する[41]。フェリチンをコードする *ftnA* の転写は Fur によって制御されて

いるが[35]、*bfr*は直接的なFur制御下にはない。Dpsにおいては非特異的なDNA結合のみならず、鉄貯蔵の機能を有していることから、DNA近傍でフェントン反応が生じることを未然に防いでいる[42]。また、*dps*は定常期にストレス応答転写制御因子である*rpoS*によって発言が上昇するが[43]、細胞内の酸化レベルが高いと*OxyR*によって転写が促進される[29]。このことから、Dpsが細胞を酸化ストレスから保護していることが考えられている。

さらに近年、細胞内の硫化水素 ( $H_2S$ ) が細胞内に遊離に存在する  $Fe^{2+}$  と反応し不溶化する事で細胞内におけるヒドロキシラジカル発生の抑制に寄与していることが示唆される研究結果が報告された[61]。

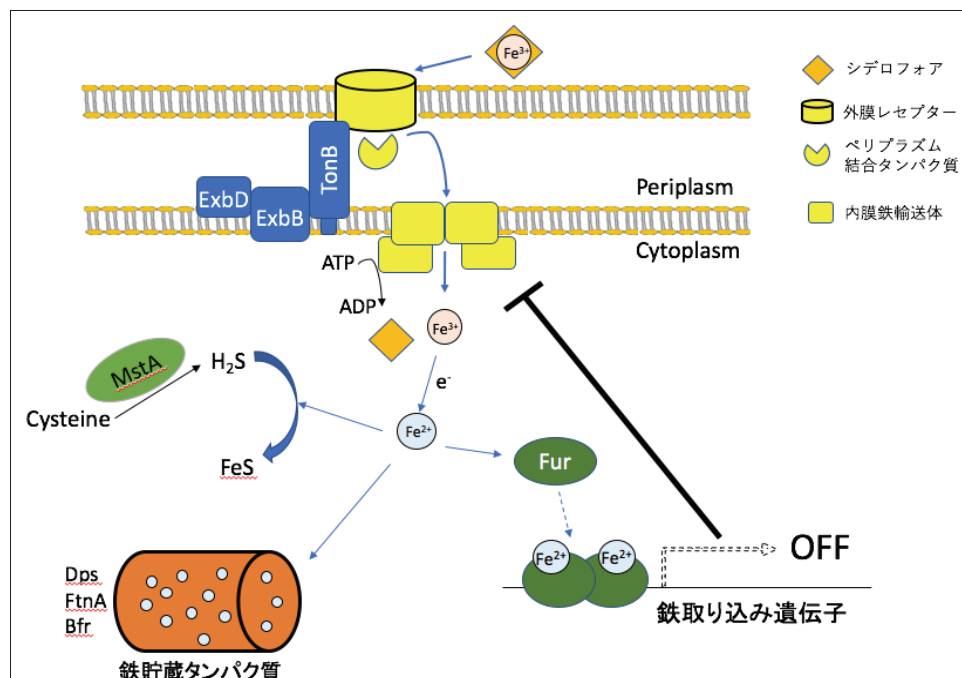


図. 4. 大腸菌における細胞内鉄イオン濃度制御機構

細胞外の鉄イオンは大腸菌が分泌するシデロフォアと複合体を形成した状態で輸送される。TonB-ExbB-ExbD 複合体を介して輸送に必要なエネルギーが供給され、細胞質内に輸送される。細胞内の遊離鉄イオンは、1：転写制御因子Furと結合して細胞内鉄濃度に関与する遺伝子の転写を調節する、2：鉄貯蔵タンパク質に取り込まれる、3：細胞内  $H_2S$  と結合し不溶化される。

## 4. 本研究の目的

### 細胞外増殖環境が酸化 DNA 損傷レベルに与える影響

これまで酸化 DNA 損傷由来の変異誘発について数多くの研究がなされており、酸化 DNA 損傷の発生から突然変異として固定されるまでの過程や、損傷 DNA 修復機構が明らかにされてきた。しかし、自然突然変異という事象の全貌を解明する上で、細胞の増殖環境が酸化 DNA 損傷由来の変異誘発にどのような影響を与えるかについては明らかにされていなかった。先行研究での自然突然変異研究は主に、富栄養培地・好気条件での対数増殖で生じる遺伝的变化（突然変異や組換え・染色体再編）について解析がなされてきた。しかし、自然界に生息する生物は様々な環境下に生息しており、ヒトにおいても細胞外環境は全ての臓器、細胞外の環境状況は同一ではなく、癌細胞周辺領域は低酸素環境の傾向が高いことなどが知られている。

当研究室ではこれまでに、細胞の増殖環境（栄養、酸素濃度、温度）が自然突然変異誘発、特に細胞中の 8-oxoG レベルに影響を与えているのか明らかにしてきた[44, 45, 46]。その中で当研究室の坂井が、酸素濃度 0.1%（低酸素環境）で増殖中の  $\Delta mutMY$  株を大気中の酸素濃度 21%（有酸素環境）へシフトした場合、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 万倍上昇することを見出した[47]。この結果は、酸素ラジカルを発生させる薬剤等を細胞に処理することなく、細胞内の酸素ラジカルレベルを著しく上昇させる実験系が構築されたことを意味する。

### 抗酸化剤であるアスコルビン酸が酸化 DNA 損傷を促進させた

坂井が見出した実験系を利用して、当研究室の岸が抗酸化剤の抗酸化能を簡便かつ鋭敏に評価する実験系の構築に試みた。その研究過程で、抗酸化剤として知られているアスコルビン酸が大腸菌細胞内において染色体 DNA の酸化損傷を促進させる結果が得られた[48]。抗酸化物質として広く知られているアスコルビン酸が大腸菌細胞内では酸化剤として作用している矛盾の原因を解明することは、in vivo における酸化剤・抗酸化剤の適切な評価を行う上で重要な問題であると考えた。

本研究は「大腸菌細胞に対してアスコルビン酸が酸化 DNA 損傷レベルに与える影響及び分子機構の解明」として研究を開始した。研究過程で新たに低 pH 環境が酸化 DNA 損傷を誘発していたことを見出し、「低 pH 増殖環境における 8-oxoG 誘発の分子機構の解明」を目的にさらなる研究を行った。本研究結果から、低 pH 環境での酸化 DNA 損傷レベルの増加には細胞内の過酸化水素やスーパーオキシド濃度変化は影響していないこと、細胞内鉄イオン濃度が上昇している結果が遺伝的解析から示唆された。



## 第2章 材料・方法

## 1. 材料

### 試薬

本研究で使用した試薬は特に記載がない限り、和光純薬工業社から購入したものを使用した。また、特に記載のない限り、試薬作製の調整には MilliQ 水を使用し、培地作製には脱イオン水を使用した。

### 培地・抗生物質

特に記載のない限り、大腸菌の培養には LB 培地 [1 % (w/v) Bacto trypton (Difco 社)、0.5 % Bacto yeast extract (Difco 社)、1 % NaCl] を使用した。固体培地を使用する際には Bacto agar (Difco 社) を 1.5 % (w/v) となるよう加えた。

P1 フェージを用いた形質導入の際には R 培地 [ 1 % Bacto Tryptone, 0.1 % (w/v) Bacto yeast extract, 0.8 % (w/v) NaCl, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 % グルコース 1.2 % (w/v) Bacto agar ] と R-top agar [0.8 % Bacto agar の R 固体培地 ] を使用した。はじめに下線部を除く組成でオートクレーブ滅菌し、培地温度を 55 °C まで冷却した後にオートクレーブ滅菌した 1 M CaCl<sub>2</sub> 溶液と、フィルター滅菌した 20 % グルコース溶液をそれぞれ最終濃度 2.0 mM、0.1 % になるよう添加した。

エレクトロポレーション法で DNA を大腸菌細胞に導入した後の回復培養には、SOC 培地 [ 2 % Bacto trypton, 0.5 % Bacto yeast extract, 0.05 % NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM グルコース, ] を使用した。はじめに下線部を除く組成でオートクレーブ滅菌し、培地温度を 55 °C まで冷却した後に、オートクレーブ滅菌した 1 M KCl 溶液、1 M MgCl<sub>2</sub> 溶液、1 M MgSO<sub>4</sub> 溶液とフィルター滅菌した 1 M グルコース溶液をそれぞれ最終濃度 2.5 mM、10 mM、10 mM、20 mM になるよう添加し使用した。

抗生物質は培養する大腸菌株に合わせて適宜培地中に添加した。抗生物質を培地に添加する際には、オートクレーブ滅菌済みの培地を 55 °C まで冷却した後に添加した。カナマイシン (Km) とストレプトマイシン (Sm) はそれぞれ 50 mg/ml、100 mg/ml になるよう MilliQ 水で溶解し、培地中の濃度はそれぞれ 25-100 μg/ml、100 μg/ml で使用した。クロラムフェニコール (Cm) とリファンピシン (Rif、東京化成社) は、50 mg/ml、10 mg/ml になるようそれぞれ 100 % エタノール、メタノールで溶解し、培地中の濃度はそれぞれ 25 μg/ml と 100 μg/ml で使用した。

培地 pH 調整には 6 M HCl または 10 N NaOH を用いた。オートクレーブ滅菌済みの LB 培地に添加して適宜調整した。

## 大腸菌株

本研究室で使用した大腸菌株は全て K-12 株由来である。使用した菌株の遺伝子型と由来については表 2 に示した。

表 2. 本研究で使用した大腸菌株

菌株	遺伝子型	由来
MG1655	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , <i>rph-1</i>	当研究室ストック
MK7180	MG1655 Δ <i>mutM</i> , Δ <i>mutY</i>	当研究室ストック
MK9313	MK7180 Δ <i>cydAB</i>	当研究室ストック
MK9404	MK7180 Δ <i>dps</i>	当研究室ストック
MK9406	MK7180 Δ <i>dps</i> , Δ <i>fur</i>	当研究室ストック
MK9473	MK7180 Δ <i>fur</i>	当研究室ストック
MK9547	MG1655 ( <i>rpsL128</i> (Sm <sup>r</sup> ), <i>ygdH</i> の下流に <i>rpsL+</i> )	当研究室ストック [23]
MK10002	MK7180 <i>cpxA</i> :: <i>kan</i>	本研究にて作製
MK10005	MK7180 <i>tonB</i> :: <i>kan</i>	本研究にて作製
MK10007	MK7180 Δ <i>cpxA</i>	本研究にて作製
MK10009	MK7180 Δ <i>tonB</i>	本研究にて作製
MK10017	MK7180 <i>mntH</i> :: <i>kan</i>	本研究にて作製
MK10018	MK7180 Δ <i>mntH</i>	本研究にて作製
MK10021	MK7180 <i>feoABC</i> :: <i>kan</i>	本研究にて作製
MK10025	MK7180 Δ <i>feoABC</i>	本研究にて作製
MK10048	MG1655 Δ <i>mstA</i>	本研究にて作製
MK10047	MK7180 Δ <i>mstA</i>	本研究にて作製
MK10049	MG1655 <i>fur</i> :: <i>kan</i>	本研究にて作製
MK10052	MG1655 Δ <i>fur</i>	本研究にて作製
MK10051	MG1655 Δ <i>fur</i> , Δ <i>mstA</i>	本研究にて作製
BW25113	F <sup>-</sup> , Δ( <i>araD-araB</i> ) 567, <i>lacZ4787</i> (del):: <i>rrnB-3</i> , LAM <sup>-</sup> , <i>rph-1</i> , Δ( <i>rhaD-rhaB</i> ) 568, <i>hsdR514</i>	本学システム微生物学研究室 森研究室から分与
JW0669	BW25113 <i>fur</i> :: <i>kan</i>	本学システム微生物学研究室 森研究室から分与
JW2388	BW25113 <i>mntH</i> :: <i>kan</i>	本学システム微生物学研究室 森研究室から分与
JW2505	BW25113 <i>mstA</i> :: <i>kan</i>	本学システム微生物学研究室 森研究室から分与
JW3882	BW25113 <i>cpxA</i> :: <i>kan</i>	本学システム微生物学研究室 森研究室から分与
JW5195	BW25113 <i>tonB</i> :: <i>kan</i>	本学システム微生物学研究室 森研究室から分与
MK10020	BW25113 <i>feoABC</i> :: <i>kan</i>	本研究にて作製
LC106 (Hpx <sup>-</sup> )	MG1655 Δ( <i>katG17</i> ::Tn10)   ( <i>ahpC-ahpF'</i> ) Δ <i>kan</i> :: <i>ahpF</i> Δ( <i>katE12</i> ::Tn10)	[49]

## プラスミド

本研究で使用したプラスミドの遺伝子型及び由来は表 3 に示した。

表 3. 本研究にて使用したプラスミド

プラスミド名	遺伝子型	由来
pCP20	FLP, Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	[50]
pKD13	Km <sup>r</sup> (FRT)	[50]
pKD46	$\lambda$ <i>red</i> recombinase under <i>araBAD</i> promoter, Amp <sup>r</sup>	[50]
pASKIBA3plus	Expression vector, Amp <sup>r</sup>	IBA社から購入
pASK/ <i>katG</i>	pASK-IBA3plus, <i>katG</i> ,	本研究にて作製
pTN247	<i>soxS-gfp</i> , PSTV29, Cm <sup>r</sup>	[51]
pTN249	<i>ahpC-gfp</i> , PSTV29, Cm <sup>r</sup>	[51]
pCA24N	Cm <sup>r</sup> , <i>lacI<sup>q</sup></i>	[52]
pCA24N- <i>dps</i>	Cm <sup>r</sup> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , pCA24N P <sub>T5-lac</sub> :: <i>dps</i> <sup>+</sup>	[52]
pCA24N- <i>ftnA</i>	Cm <sup>r</sup> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , pCA24N P <sub>T5-lac</sub> :: <i>ftnA</i> <sup>+</sup>	[52]
pCA24N- <i>bfr</i>	Cm <sup>r</sup> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , pCA24N P <sub>T5-lac</sub> :: <i>bfr</i> <sup>+</sup>	[52]

## プライマー

本研究で使用したプライマーの配列と使用目的を表4に示した。Oligo DNAはIntegrated DNA Technologies社に委託した。MilliQに溶解し、-30℃で保存した。使用時は溶解した後に適当な濃度に希釈して用いた。

表4. 本研究で使用したプライマー

プライマー名	配列 (5' → 3')	使用目的
cpxRA-F	CTGGAGTTGGTTTCCCGTGT	遺伝子欠損確認
cpxRA-R	GGATGCCAGTTATCGCCTGA	
tonB-F	ATAGACTCCTGCCGCTACG	
tonB-R	TGGCGCTGTATCTCCTCTG	
fur 1F	TCTCAATGCCTGCTGTGATG	
fur 1R	ACGCGTACTGGATTATCAGC	
dsseA-F	TTGGCGCGTTATCGTTGTTG	
dsseA-R	ATTACCGAACACGGCGGAAA	
dfeoABC-F	CCAGTCCGGGTAATTCCT	
dfeoABC-R	GGTGAACTCTGCTTTTTGC	
dmntH-F	GCTCCAAATATGAGGCAGGT	
dmntH-R	AAAGCGTATGAGCGTGGCTA	
dfeoABC-P1-F	CTTTGTTGGCAAATCATCTGGTCTCATGTCGCTGTCAAACG CCCCATGAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	One step gene disruption
dfeoABC-P4-R	AAAGCCGCACGCAAAAAAGCCCGGATGCAGACGCATACCGG GCTTTCCAAATTCGGGGATCCGTCGACC	
pASKIBA3plus Inverse-F	TTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAA	クローニング
pASKIBA3plus Inverse-R	CATTTGTATATCTCCTTCTTAAAG	
pASK-katG-F	TTTAAGAAGGAGATATACAAATGAGCACGTCAGACGATATC CATA	
pASK-katG-R	TTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAATTACAGCAGGTCGAAACG GTC	
F-pASK	GAGTATTTTACCACTCCCT	シーケンス
R-pASK	CGCAGTAGCGGTAAACG	
katG-1F	CTGGTCTGGAAGTAGTCTG	
katG-1R	GTTGAGGAAACGACGAGAG	
ygdh-72F2	TCTGCACCGGCTGTGGTCCGGGAGCGATGG	Allele-specific PCR
ygdh-72R2	AGCCAGTTCAGCCCGGAAGGTGCCTGACCG	
PT-F (128)	TGTATATACTACCACTCCTAC	
SdaC-R	CGGTTTATGAAAATAGGAAACG	

## 2. 実験操作

### 大腸菌の培養

大腸菌の培養方法は、特に記載のない限り $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ に保存された大腸菌ストックから LB 固体培地（適宜抗生物質は添加する）に画線培養し（ $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、24 時間）、得られたシングルコロニーを爪楊枝でとり、5 ml の LB 培地（適宜抗生物質は添加する）に植菌し、一晚回転培養した。得られた培養液を一晚培養液として使用した。

### プラスミド DNA 抽出

プラスミド DNA 抽出は FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス) を使用した。プラスミド抽出の詳細なプロトコルは、抽出するプラスミドのコピー数に合わせて適宜 Kit に記載されているプロトコルを参照した。

### プラスミド導入による形質転換法

#### ① 塩化カルシウム法

プラスミド DNA を導入する菌株の一晚培養液を作製し、一晚培養液 0.25 ml を LB 液体培地 25 ml 中に添加し、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、250 rpm で  $\text{OD}_{600}$  が 0.3~0.4 に達するまで震とう培養した (BECKMAN 社製 DU640 spectrophotometer)。 $\text{OD}_{600}$  が 0.3~0.4 に達した後、培養液を冷却した滅菌遠心管 (50 ml) に移し、氷上で 10 分間静置した。冷却された培養液を  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、6000 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  $\text{MgCl}_2\text{-CaCl}_2$  溶液 (80 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM  $\text{CaCl}_2$ ) を 7.5 ml 添加し、緩やかに懸濁した。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、6000 rpm で 10 分間遠心し、上清を完全に除去した。再び同量の  $\text{MgCl}_2\text{-CaCl}_2$  溶液を加え、懸濁後、同様の条件で遠心し、上清を除去した。冷却した 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  500  $\mu\text{l}$  を添加し、再懸濁した。懸濁液を滅菌した 1.5 ml のマイクロチューブに 200  $\mu\text{l}$  ずつ分注した。

懸濁液にプラスミド DNA (3-10 ng/ $\mu\text{l}$ ) を 1  $\mu\text{l}$  加え、緩やかに混和したのちに氷上で 30 分-1 時間静置した。ネガティブコントロールのサンプルには  $1\times\text{TE}$  1  $\mu\text{l}$  を懸濁液に添加した。 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 90 秒間ヒートショックし、氷上で 2 分間静置した。800  $\mu\text{l}$  の液体 LB 培地を添加済みの大試験管にサンプルを添加し、適当な温度で 90 分間震とう培養した。培養後、適当な抗生物質含有の LB 固体培地に適量塗布し、適当な温度で静置培養した。得られたコロニーを選択し、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 液体培地にて一晚培養した。得られたコロニーの細胞に目的のプ

プラスミドが保持されているかどうか、プラスミド抽出を行った後に得られたプラスミドを任意の制限酵素と反応させ、目的サイズのプラスミドが得られたか確認した。

## ②エレクトロポレーション法

### ②-1 コンピテンセルの作製

DNAを導入する菌株の一晩培養液を作製し、LB培地のNaCl濃度を0.5%に低下させた液体培地100 mlに一晩培養液0.5 ml添加した。適当な温度で250 rpm、 $OD_{600}$ が0.3~0.4に達するまで震とう培養した。pKD46が保持されているBW25113株を培養する際には10 mM L-アラビノース含有培地で培養した。培養後、培養液を2本の50 ml遠心管に移し、2℃、5200 rpmの条件で15分間遠心した。上清を除去し、冷却した10%(w/v)グリセロール50 mlを加え、穏やかに懸濁した。2℃、5200 rpmの条件で20分間遠心し、上清を除去した。再度10%グリセロールを同量加え、懸濁後、同条件で遠心した。上清を除去し、10%グリセロールを8 ml加え、懸濁後、同条件で遠心した。上清を除去し、冷却したGYT培地を各々の遠心管に100  $\mu$ l加え、懸濁後、1.5 ml エッペンドルフチューブに40  $\mu$ lずつ分注した。分注したコンピテントセルは液体窒素を用いて凍結し、-80℃に冷凍保存した。

### ②-2 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。-80℃に凍結保存したコンピテントセルを氷上で溶解し、100 ng~200 ng程度のプラスミドDNAまたはDNA断片を加えて混和した。冷却しておいた0.2 cm間隔のジーンパルサーキューベット (Bio-Rad社)にサンプルを移し、氷上で1分間静置した。その後、キューベットをジーンパルサーにセットし、2.5 kVで通電した。通電後即座にSOC培地1 mlをキューベット内に加え数回ピペッティングによる攪拌を行った後に大試験管にサンプルを移し、適当な温度で1.5時間回転培養した。培養後、適当な抗生物質が含まれているLB固体培地に塗布し、適当な温度で培養後、形質転換体を得た。得られた形質転換体を純化するために、抗生物質含有固体培地で2度画線培養した。形質転換帯に目的のプラスミドDNAが保持されているかどうか、一晩培養液を作製し、プラスミド抽出を行った後に任意の制限酵素と反応させた。DNA断片を導入した場合は、目的の染色体位置にDNA断片が導入されたかどうかコロニーPCRにて確認した。

## PCR

本研究の PCR で使用した dNTP mix は 東洋紡績社、10×standard buffer、rTaq polymerase は Bio Academia 社、10×Ex taq buffer、5 Units/ $\mu$ l Ex Taq polymerase は TaKaRa 社からそれぞれ購入した。PCR 反応組成については特に記載のない限り [ 1×standard buffer, 0.2 mM dNTP mix, 各 0.2  $\mu$ M プライマー, 0.5 Units/ $\mu$ l r-taq polymerase, 10 %(v/v) 鋳型 DNA 溶液] とした。PCR 反応には Gene Amp PCR System 9600 (PERKIN ELIMER 社製) を用いて、反応サイクルについては特に記載のない限り、95 °C で 1 分間反応させたのち、95 °C 15 秒、55 °C 15 秒、72 °C 1 kb/min を 30 サイクル繰り返し、最後に 72 °C 5 分間反応させた。

## アガロースゲル電気泳動

基本的な操作は *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) を使用した。電気泳動に使用するゲル作成には 1×TAE 緩衝液 [40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA (pH 8.0) ] を用いて、ゲル濃度は全て 1.2 % に調整した。電気泳動は ミューピッド泳動槽 (アドバンス社) を使用し、電圧 100 V で 30~40 分間通電した。電気泳動後、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~1 時間浸し、振とうした。ゲルを染色後、UV トランスイルミネーター (アーツ社製) を用いてゲルに紫外線を照射し、DNA の観察及び CCD カメラによる撮影を行った。



## SDS-PAGE

基本的な操作は *Molecular Cloning* (Sambrook *et al.*, 1989)に従った。Stacking gel は 5 %、separating gel は 12.5 %の濃度に調整した。分子量マーカーは SDS-PAGE Standard(Low) (Bio-Rad 社) を用いた。

タンパク質試料の作製について、はじめに一晩培養液をコロニーが 100 程度増殖するように希釈し、LB 固体培地上に塗布した（必要に応じて 0.1 mM IPTG 含有 LB 固体培地で培養した）。コロニーの大きさが 1.5 ml になるまで培養し、冷却した 5 ml 液体培地とコンラージ棒を用いて菌体を回収した。回収した菌体の OD<sub>600</sub> が 0.5 になるよう 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、4 °C、12000 rpm で 1 分間遠心した。上清を除去し、100 μl の 1×SDS-PAGE sample buffer に懸濁し、100 °C で 5 分間熱処理した。熱処理後、4 °C、12000 rpm で 5 分間遠心し、上清をサンプルとして使用した。サンプル 10 μl をゲルにアプライし、1×SDS-PAGE running buffer に満たして、10 mA の定電流で 2~3 時間泳動を行った。

泳動後、タンパク質固定液（10 % 酢酸、10 % メタノール）に浸して 10 分間緩やかに震とうした。その後、固定液を捨て、CBB 染色液を加えて 1 時間緩やかに震とうした。その後、CBB 染色液を捨て、脱色液（10 % 酢酸、15 % メタノール）に浸し、一晩緩やかに震とうした。ゲル全体が脱色されていることを確認し、ゲルをろ紙上に乗せ、モデル 583 ゲルドライヤー（Bio Rad 社）を用いてゲルを乾燥させた。

## 大腸菌遺伝子欠損株の構築

本研究にて MG1655 株由来の遺伝子欠損株構築には、P1 ファージを用いた形質導入を行った (Miller, 1992)。使用したプラスミドとプライマーは表 3、表 4 に示した。使用した P1 ファージは当研究室ストックの P1 ビルレントファージを必要に応じて希釈し使用した。供与菌として、標的遺伝子がカナマイシン耐性遺伝子に置き換わっている KEIO COLLECTION を使用した。MK10025 株の構築には One-step gene disruption 法により MK10020 株を構築後、P1 ファージを用いた形質導入を行った。Km 耐性遺伝子の除去には FLP を発現する pCP20 を形質転換することで染色体 DNA 上から除去した。

### P1 ファージを用いた形質導入

#### ① P1 溶菌液の調製

薬剤耐性マーカーを保持した供与菌のグリセロールストックから画線培養し、得られたシングルコロニーから一晚培養液を作製した。5 mM CaCl<sub>2</sub> 含有の LB 液体培地 5 ml に一晚培養液 50  $\mu$ l 添加し、37°C、160 rpm/min で OD<sub>600</sub> が 0.4~0.5 になるまで震とう培養した。培養液 1 ml を小試験管に分注し、 $1.0 \times 10^7$  pfu/ml 程度の P1 lysate 100  $\mu$ l を加え、37°C で 20 分間静置し感染させた。この感染液に 55 °C の R-top agar 3 ml を緩やかに加え、R 個体培地上全体に均等になるよう流し込んだ。R-top agar が凝固したことを確認した後に 37°C で一晚培養した。一晚培養後、個体培地上層の R-top agar を 5 mM CaCl<sub>2</sub> 含有 LB 液体培地 2 ml とコンラージ棒を用いて回収した。回収液に 100  $\mu$ l のクロロホルムを添加し 30 秒ボルテックスにて激しく攪拌した。攪拌後、4 °C、9000 rpm にて 20 分間遠心し、上清を別のチューブに移した。得られた P1 溶菌液にクロロホルム 40  $\mu$ l を添加し、緩やかに混合後、4°C で保存した。

#### ② P1 溶菌液による形質導入

受容菌のグリセロールストックから画線培養し、得られたシングルコロニーから一晚培養液を作製した。一晚培養液 1 ml を 1.5 ml の滅菌済み  $\mu$  チューブに移し、室温、3000 rpm にて 5 分間遠心した。上清を取り除き MC buffer [100 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>] を 1 ml 加え、ボルテックスにより再懸濁した。懸濁液 100  $\mu$ l ( $1.0 \times 10^9$  cells/ml 程度) を小試験管に移し、 $1.0 \times 10^8$  pfu/ml 程度の P1 溶菌液 100  $\mu$ l を加え 37 °C で 20 分間静置し、受容菌株に P1 溶菌液を感染させた。1 M クエン酸ナトリウム溶液 (pH 5.5) を 200  $\mu$ l 加え感染を停止させ、37 °C で 2 時間静置した。カナマイシン含有 LB 固体培地に 100  $\mu$ l 塗布

し、37 °Cで一晩培養した。得られた薬剤耐性のコロニーを純化するために、カナマイシン含有 LB 固体培地で画線培養を 2 回行った後に、目的の遺伝子がカナマイシン耐性遺伝子に置き換わっているかどうかコロニーPCRにて確認した。

### One-step gene disruption 法による遺伝子欠損株の作製

MK10025 株の構築に際して、基本的な手法は Datsenko らの手法を参照した (Datsenko, . 2000) 。プラスミド DNA pKD13 の Km 耐性遺伝子及び FRT 配列を挟んで外側に位置している Priming site1(20 bp)と、Priming site4(20 bp)を 3' 側にして、欠損する遺伝子の近辺領域に対して相同な 50 bp を 5' 側に配置した 70 bp のプライマーを設計した。FRT-kan の DNA 断片を、pKD13 を鋳型としてプライマー dfeoABC-P1-F と dfeoABC-P4-R を用いた PCR 反応により増幅した。反応組成は [ 1×Ex taq buffer(Takara)、0.2 mM dNTPs(ToYoBo)、0.4 μM dfeoABC-P1-F、0.4 μM dfeoABC-P4-R、0.5 units/μl Ex taq(Takara)、0.15 ng/μl pKD13 ] とした。反応条件は 95 °C、1 分、【変形反応：95 °C、30 秒、アニーリング反応：55 °C、30 秒、伸長反応：72 °C、1.5 分】を 30 サイクル行い、最後に 72 °C で 5 分反応させた。目的の DNA 産物増幅は電気泳動により確認した。

PCR 反応液の余分な DNA 断片を除去するために、反応液 50 μl に対して DpnI(20 U/μl、TOYOBO)を 1 μl 加え、37°C、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による精製を行った。最終的に得られた DNA 断片を、滅菌した MilliQ 水 5 μl に溶解した。溶解した DNA 断片の濃度は、濃度既知の DNA マーカーと共に電気泳動することで濃度を推定した。得られた DNA 断片の濃度を適当な濃度に希釈し、エレクトロポレーション法を用いた、BW25113/pKD46 株への導入に使用した。

### Km 耐性遺伝子の除去

FRT-kan が染色体 DNA 上に含まれている大腸菌細胞に、塩化カルシウム法により pCP20 を形質転換した。形質転換体はクロラムフェニコール含有 LB 固体培地、30 °C で培養して選択した。得られた形質転換体から pCP20 を脱落させるために、LB 固体培地、42 °C で画線培養した。画線培養後の細胞が Cm、Km 感受性になったことを確認後、コロニーPCRにより Km 耐性遺伝子が除去されていることを確認した。

## プラスミド DNA の構築

### Gibson Assembly による遺伝子クローニング

本研究にて作製した pASK/katG プラスミドは Gibson Assembly システムにより構築した[53]。インサートである katG 遺伝子の増幅は[1×Primestar Max(TaKaRa) , 2  $\mu$ M pASK-katG-F 0.75  $\mu$ l, 2  $\mu$ M pASK-katG-R 0.75  $\mu$ l , 50 ng/ $\mu$ l Bacterial genome DNA 0.5  $\mu$ l, milliQ 0.5  $\mu$ l]とした。PCR による Vector の増幅には[1×primestar Max、2  $\mu$ M primer 0.75  $\mu$ l, 0.2 ng/ $\mu$ l plasmid DNA 0.5  $\mu$ l, milliQ 0.5  $\mu$ l]とした。PCR 反応サイクルは 95  $^{\circ}$ C、1 分間反応したのち、サイクル反応として 98  $^{\circ}$ C を 10 秒間、55  $^{\circ}$ C を 10 秒間、72  $^{\circ}$ C を 30 秒間反応させた。PCR 産物 0.5  $\mu$ l を電気泳動により目的の DNA 産物を確認後、Gibson Assembly 反応として、インサート (7.25 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l、ベクター(10 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l、2×Gibson Assembly Premix 2  $\mu$ l の計 4  $\mu$ l を 50  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、反応液 0.5  $\mu$ l をエレクトロポレーション法による形質転換を行った。得られた形質転換体を純化後、一晚培養液からプラスミドを抽出し、任意の制限酵素と反応させ、プラスミド DNA サイズが目的のサイズになっていることを確認した。

### DNA 塩基配列決定

クローニングした遺伝子配列を確認するために、3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems 社)を用いた。サイクルシーケンス反応の反応液は 1 サンプルあたり 10  $\mu$ l [MilliQ 水 5.0  $\mu$ l、5×Big Dye buffer 2.0  $\mu$ l、2  $\mu$ M primer 1.0  $\mu$ l、Big Dye V3.1 1.0  $\mu$ l、鋳型 DNA 1.0  $\mu$ l]で作製し、サイクルシーケンス反応は 96  $^{\circ}$ C、1 分間反応させたのち、25 サイクル反応として 96  $^{\circ}$ C を 10 秒間、50  $^{\circ}$ C を 5 秒間、60  $^{\circ}$ C を 4 分間反応させた。反応終了後、4  $^{\circ}$ C で Hold した。未反応 dye terminator 除去のためにエタール/EDTA 沈殿によるサンプルの精製を行った。PCR 反応液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、125 mM EDTA 2.5  $\mu$ l と 100 %エタノール 30  $\mu$ l を加えた。遮光して 15 分間静置したのちに RT、10000 rpm の条件で 20 分間遠心した。上清を除去し、30  $\mu$ l の 70 %エタノールを加えた。RT、10000 rpm の条件で 20 分間遠心した。上清を除去し、遮光状態で 5-10 分間乾燥させた。20  $\mu$ l の Hi-di Formamide を加え、20 回ピペッティングによる懸濁を行った。95  $^{\circ}$ C、2 分間熱処理を行った。熱処理後、96 well plate にサンプルを移し、遮光状態、氷上で急冷した。作製したサンプルの DNA 塩基配列決定には 3100 Genetic Analyzer を使用した。使用方法については 3100 Sequencing 簡易操作ガイドに従った。

## 突然変異頻度測定

### ① *rpoB* 突然変異頻度測定

RNA ポリメラーゼの  $\beta$  サブユニットをコードする *rpoB* 上に塩基置換が生じることで大腸菌は抗生物質であるリファンピシンに対して耐性となる。そのため *rpoB* を標的とした塩基置換検出系は広く用いられている [15]。

一晚培養液を適当に希釈し、60-150 cell 程の細胞数を固体培地上に塗布し、37 °C で培養した。LB 固体培地に塗布する場合は LB 液体培地を希釈液として使用した。培養したコロニーのサイズが 1.5 mm になるまで培養し、1.5 mm になった後、4 °C の LB 液体培地 5 ml で菌体を溶かし、菌液を回収した。回収した菌液を適当な希釈率で希釈し、LB 固体培地、Rif 含有 LB 固体培地にそれぞれ塗布した。37 °C で培養を行い、LB 固体培地はコロニーサイズが 1.5 mm になった後に回収し、24 時間後に抗生物質含有 LB 固体培地を回収した。それぞれの培地で増殖したコロニー数をカウントした。カウントしたコロニー数、希釈率を元に、回収した菌液 1 ml あたりに含まれる抗生物質抵抗性生菌数と全生菌数を算出し、その数字から突然変異頻度を算出した。突然変異頻度は 1 ml あたりの抗生物質抵抗性菌数/1 ml あたりの全生菌数である。

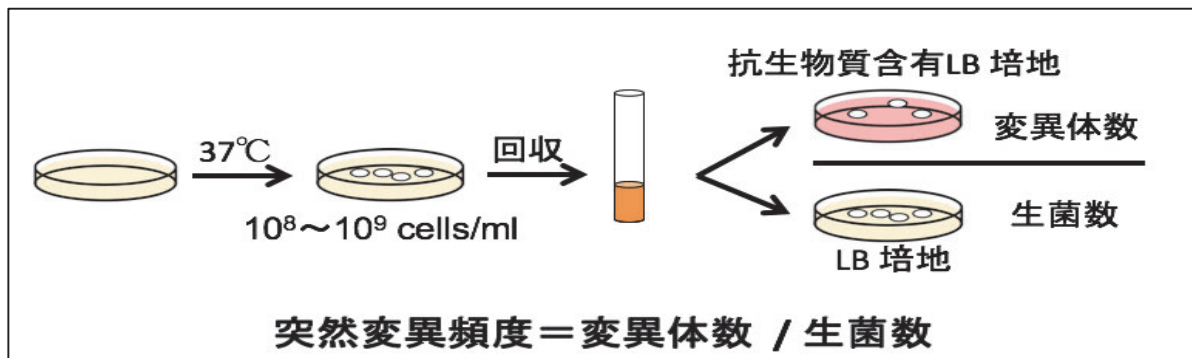


図. 5. 突然変異頻度測定方法

### ② *rpsL* 突然変異頻度測定

*rpsL* 遺伝子に変異が生じると抗生物質であるストレプトマイシン耐性になることが知られており、*rpoB* 検出系と同様に 1 塩基置換変異検出法として広く使用されている [40, 41]。突然変異頻度の測定方法は *rpoB* 突然変異頻度測定と同様の方法で測定した。

### ③ *rpsL* 部分二倍体株を用いた相同組換え頻度測定

当研究室の Lan Anh が構築した MK9547 株を使用した[23]。MK9547 株は、MG1655 株の *rpsL* 遺伝子の 128 番目の塩基が A から C に置換することでストレプトマイシン耐性を示すだけでなく、*ygdh* 遺伝子領域の下流にゲノムの複製方向に対して順向きに野生型の *rpsL* 遺伝子が挿入されている。*rpsL* 遺伝子はドミナントネガティブであるため MK9547 株はストレプトマイシン感受性を示すが、挿入された *rpsL* 遺伝子上に変異が生じて不活性化されるか、A128C の *rpsL* 遺伝子と相同組換え反応が生じることでストレプトマイシン耐性を示す。

相同組換え頻度測定のために、はじめに *rpsL* 突然変異頻度を測定した。次に、ストレプトマイシンに耐性を示した任意のコロニー20個を、コロニーPCRにより相同組換えの有無を判別した。判別方法は図6に示すように、Transgenic の *rpsL* 遺伝子と A128C の *rpsL* 遺伝子間で相同組換えが生じると Transgenic の *rpsL* 遺伝子の 128 番目の A が C に置換される。この特徴を利用して、当研究室の株本が図6のPCR反応による相同組換え体の判別する実験系を確立した。

PCR 反応組成は[ 1×standard buffer, 0.25 mM dNTPs, 500 nM PT-F(128), 500 nM SdaC-R, 20 nM *ygdh*-72F2, 20 nM *ygdh*-72R2, 0.03 U/μl rTaq polymerase] に調整した。PCR 反応サイクルは図6に示した。相同組換え頻度は、*rpsL* 突然変異頻度×組換え体数/20 で示した。

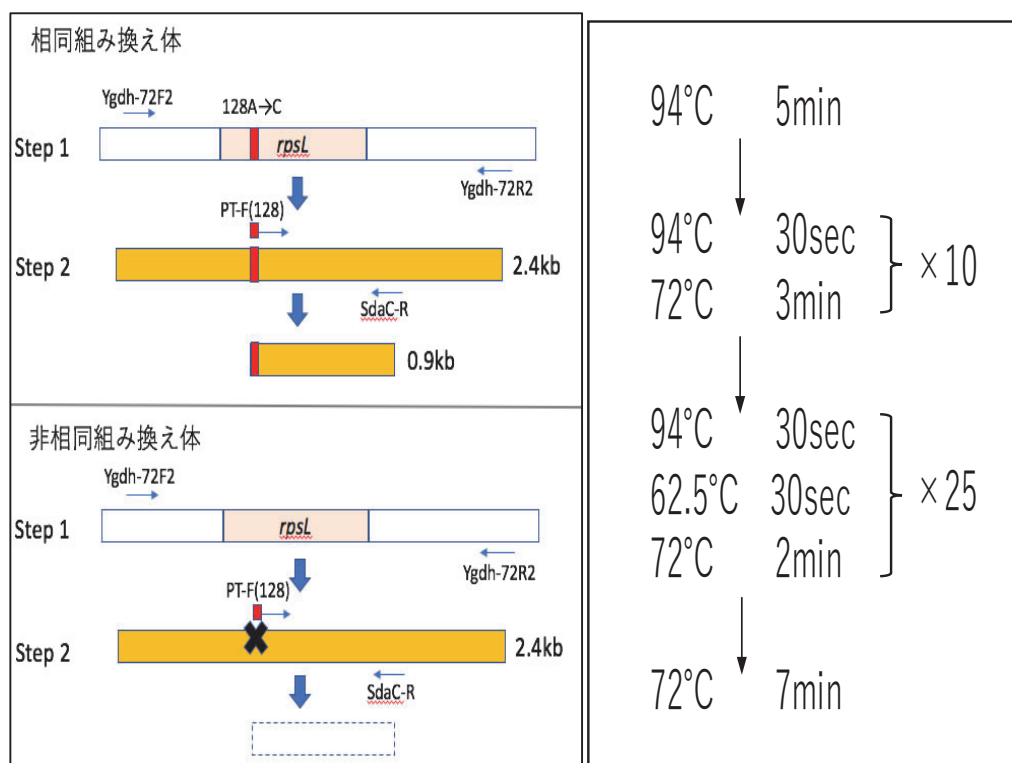


図.6. Allele specific PCR による組換え体の判別

## 過酸化水素感受性試験

過酸化水素は 30 %過酸化水素溶液を 1 M に調整して使用した。一晚培養液 50  $\mu$ l を 5 ml LB 液体培地に継代し、37 °C、160 rpm、OD<sub>600</sub>=0.2 になるまで震とう培養した。培養後、培養液中の過酸化水素濃度が 2 mM になるよう 1 M 過酸化水素を加え、再度 37 °C、160 rpm の条件で震とうした。過酸化水素添加から 0 分、10 分、20 分、30 後の培養液をその都度分取し、希釈したのちに 2 枚の LB 固体培地にそれぞれ 100  $\mu$ l 塗布した。0 分は過酸化水素を培養液に添加する直前の培養液を分取した。固体培地に増殖したコロニー数から 1 ml 当たりの生菌数を算出し、0 分の生菌数を 1 として各過酸化水素曝露時間の生菌数比率を算出した。

## フローサイトメーターを使用した大腸菌 1 細胞あたりに含まれる GFP 蛍光強度の測定

-80 °C に保存されている大腸菌ストックから LB 固体培地に画線培養した (30 °C、24 時間)。プラスミドが導入されている菌株においては得られたシングルコロニーを爪楊枝でとり Cm 含有 LB 個体培地に再度画線培養した (30 °C、24 時間)。得られたシングルコロニーから一晚培養液を作製した (プラスミドが導入されている菌株は Cm 含有 LB 培地で 14 時間回転培養)。一晚培養液をコロニーが 100 cell 程度になるよう希釈し各条件のプレートに塗布して 37 °C で培養した。プラスミドが導入された菌株のコロニーサイズが 1.5 mm になった後、0.2 %アジ化ナトリウム含有 1×M9salt 溶液 4 ml でプレートの菌体を回収した。回収した菌体液を PBS (pH7.2) で 10<sup>-3</sup> 希釈・洗浄した後、細胞当たりの GFP 蛍光強度を測定した。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。フィラメント状ではない単一細胞の GFP 蛍光強度を測定するために、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 [51, 57]。また、プラスミドを持たない菌株の GFP 蛍光強度をバックグラウンドとして差し引いた。バックグラウンドの値を差し引いた GFP 傾向強度の平均値を算出した。

## 統計解析

突然変異頻度の有意差検定には *Nonparametric Statistics for The Behavioral Science* (Siegel, 1956) に記載されている Mann-Whitney の U-検定を採用した。有意水準 1 % 以下のときに有意差があると判断した。

## 第 3 章 結果



## 1. アスコルビン酸添加によって酸化 DNA 損傷レベルが上昇する原因の解明

先行研究において当研究室の岸は、LB 培地中のアスコルビン酸濃度が 10 mM の時に突然変異頻度が有意に増加することを見出した。10 mM 以外の濃度についての突然変異頻度は調べられていなかったため、はじめにアスコルビン酸濃度と突然変異頻度の関係を調べた。

大腸菌野生株と  $\Delta mutMY$  株をアスコルビン酸 0~20 mM 含有 LB 培地で培養し *rpoB* 突然変異頻度を測定した。その結果、 $\Delta mutMY$  株においてアスコルビン酸濃度依存的に突然変異頻度が上昇し、最大 28 倍突然変異頻度が上昇した。(図 7 A)。野生株においてはアスコルビン酸含有濃度増加による突然変異頻度の上昇は示されなかった(図 7 A)。この結果から、培地中に含まれるアスコルビン酸が大腸菌細胞内において酸化 DNA 損傷を促進させることが示唆された。また、大腸菌野生株においては培地中アスコルビン酸濃度変化による突然変異頻度の上昇が見られなかったことから、細胞内の 8-oxoG レベルが 28 倍上昇した際においても細胞は 8-oxoG 由来の変異誘発を完全に抑制することが示唆された。

しかし、上記実験過程でアスコルビン酸を添加した際の培地 pH 低下を測定した結果、アスコルビン酸添加により培地 pH が酸性に傾き、20 mM では pH4.5 を示した。先行研究において、低 pH 環境が酸化 DNA 損傷の発生を促進させることは報告されていなかったことから、低 pH 環境が酸化 DNA 損傷発生促進に関与しているかどうか調べた。

20 mM アスコルビン酸含有 LB 培地に 10 N NaOH を添加し pH を 7.1 に調整した培地を作製した。その培地で  $\Delta mutMY$  株を培養し、*rpoB* 突然変異頻度を測定した。その結果、突然変異頻度は通常の LB 培地で培養した際の突然変異頻度と有意な差はあったものの、20 mM アスコルビン酸含有 LB 培地で培養した際の突然変異頻度と比較すると顕著に抑制された(図 7 B)。この結果から、図 7 で示された、 $\Delta mutMY$  株におけるアスコルビン酸濃度依存的な突然変異頻度の上昇は、細胞外の pH 環境が中性から酸性に変化したことが原因である可能性が示唆された。当研究室の岸が示した結果を含め、アスコルビン酸が大腸菌細胞内で酸化 DNA 損傷発生を促進させている可能性は低いことが示唆された。

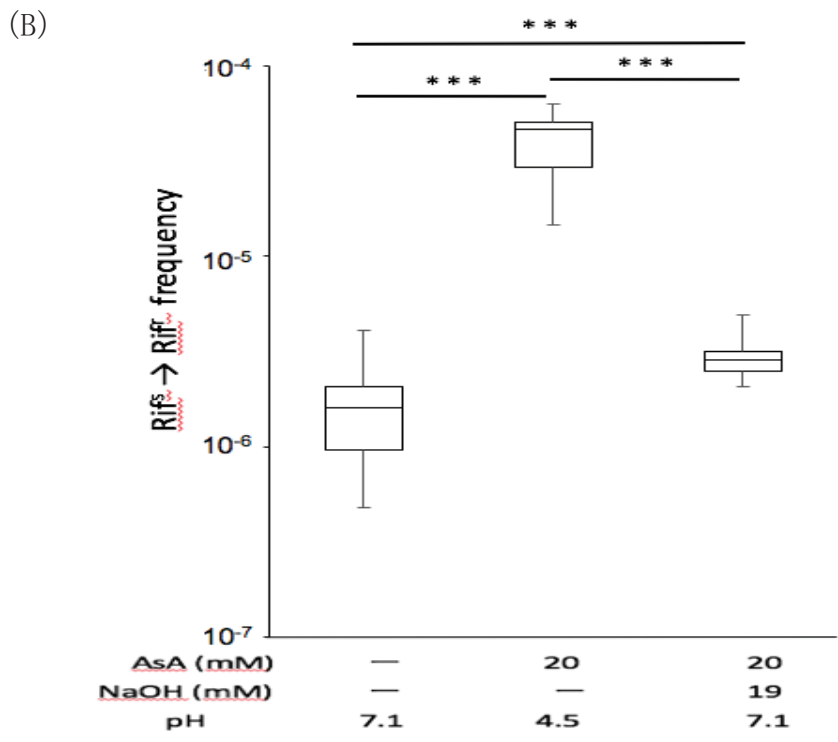
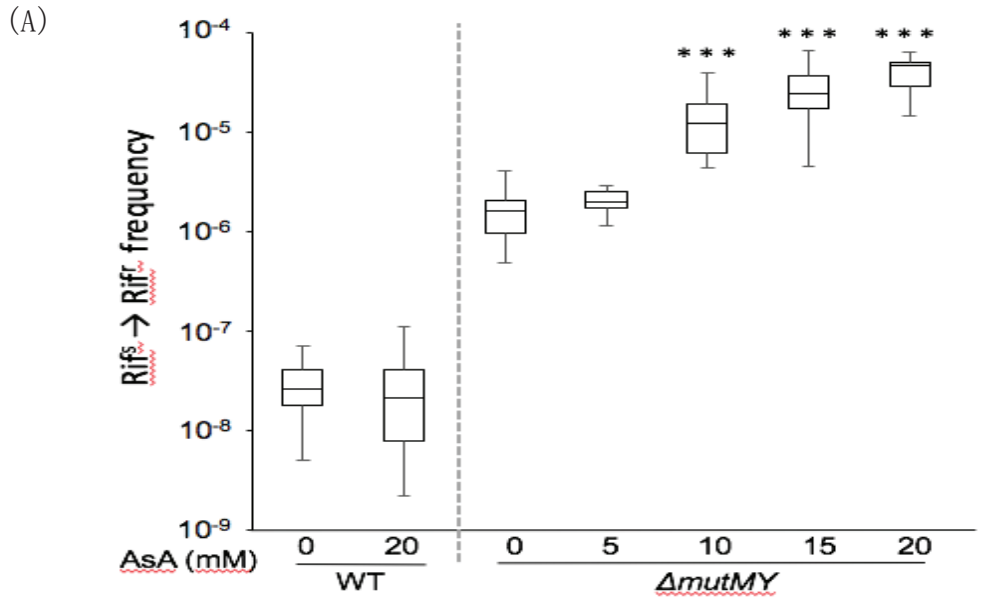


図. 7. 培地中アスコルビン酸濃度が突然変異頻度に与える影響

(A) 0-20 mM アスコルビン酸含有 LB 培地で培養した際の野生株 MG1655 と  $\Delta mutMY$  株の *rpoB* 突然変異頻度を測定した。独立した 20 回の実験結果より中央値及びデータの 50% を占める分布を示した。\*\*\* $p < 0.001$

(B)  $\Delta mutMY$  株を 20 mM AsA+ 19 mM NaOH 含有培地で培養した際の *rpoB* 突然変異頻度。独立した 20 回の実験結果より中央値及びデータの 50% を占める分布を示した。\*\*\* $p < 0.001$

## 2. 増殖環境 pH が酸化 DNA 損傷レベルに与える影響の解析

### HCl 添加による培地 pH 変化が酸化 DNA 損傷レベルに与える影響

次に、低 pH 環境が酸化 DNA 損傷発生を促進させた原因であるかどうか調べた。大腸菌の低 pH ストレス研究で多く用いられている HCl を用いて培地 pH を調整した。大腸菌野生株と  $\Delta mutMY$  株をそれぞれ培地 pH 4.5~7.1 の LB 培地で培養し、*rpoB* 突然変異頻度を測定した。その結果、 $\Delta mutMY$  株において培地 pH が 5.2 以下では突然変異頻度の有意な上昇が示された (図 8)。さらに培地中の Cl<sup>-</sup> 濃度が酸化 DNA 損傷発生促進に影響を与えたかどうか調べた。HCl と NaOH を添加し pH を 7.1 に調整した LB 培地 (14.4 mM HCl, 13 mM NaOH) で  $\Delta mutMY$  株を培養し、*rpoB* 突然変異頻度を測定した。その結果、通常の LB 培地で増殖した際に測定した突然変異頻度と有意な差は示されなかった。図 8 の結果から、低 pH 増殖環境が酸化 DNA 損傷発生促進に関与していることが示唆された。

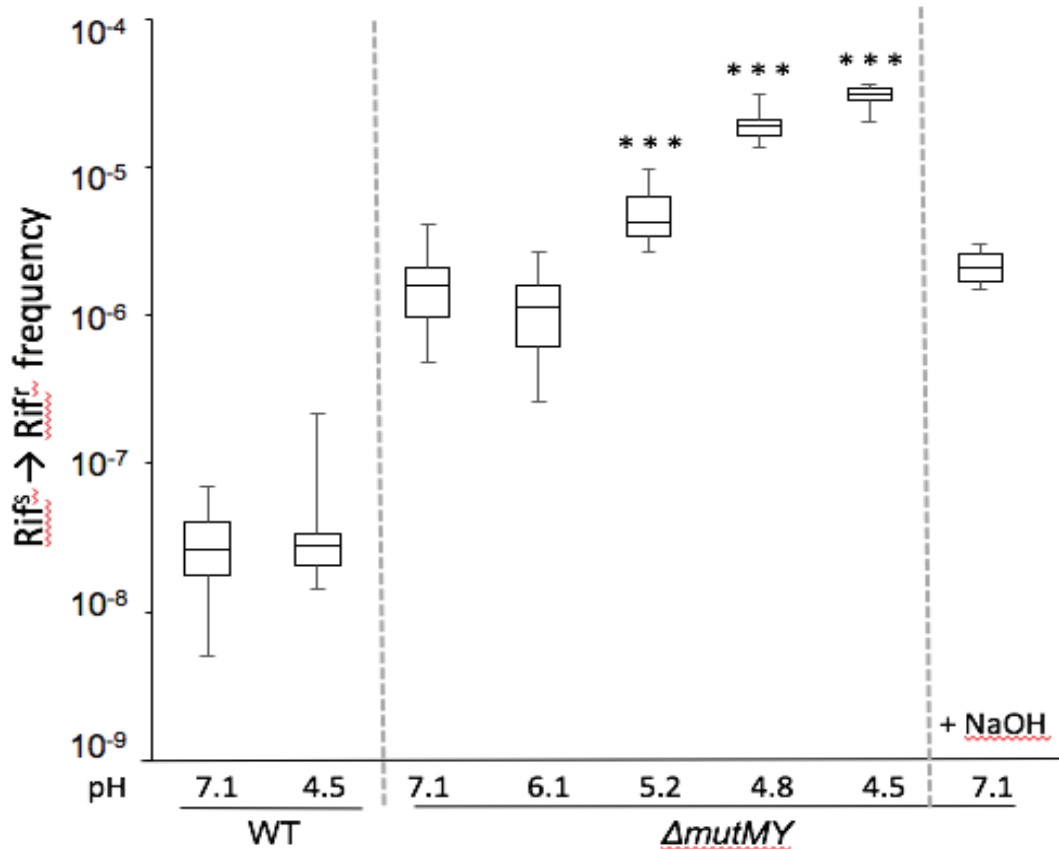


図 8. 培地 pH 低下の突然変異への影響

6 M HCl を添加して pH を調整した培地で野生株 MG1655 と  $\Delta mutMY$  株を培養した際の *rpoB* 突然変異頻度。

独立した 20 回の実験結果より中央値及びデータの 50% を占める分布を示した。\*\*\*p<0.001

## 高 pH 環境が酸化 DNA 損傷レベルに与える影響

次に、前述した突然変異頻度の上昇が低 pH 環境特異的な現象であるかどうか、高 pH 環境で培養した際の突然変異頻度を調べた。培地 pH の調整は NaOH を用いた。大腸菌野生株と  $\Delta mutMY$  株をそれぞれ pH8.0、9.0 の LB 培地で培養し、*rpoB* 突然変異頻度測定を行った。その結果、高 pH 環境で培養した場合、野生株のみならず  $\Delta mutMY$  株においても突然変異頻度の有意な上昇は示されなかった

(図 9)。この結果から、様々な pH 環境の中でも低 pH 環境特異的に大腸菌細胞内の酸化 DNA 損傷レベルが促進されることが強く示された。また、当研究室の先行研究において増殖環境の違いにより生じる増殖速度と突然変異頻度に相関性がないことが示されている (表 S1)。

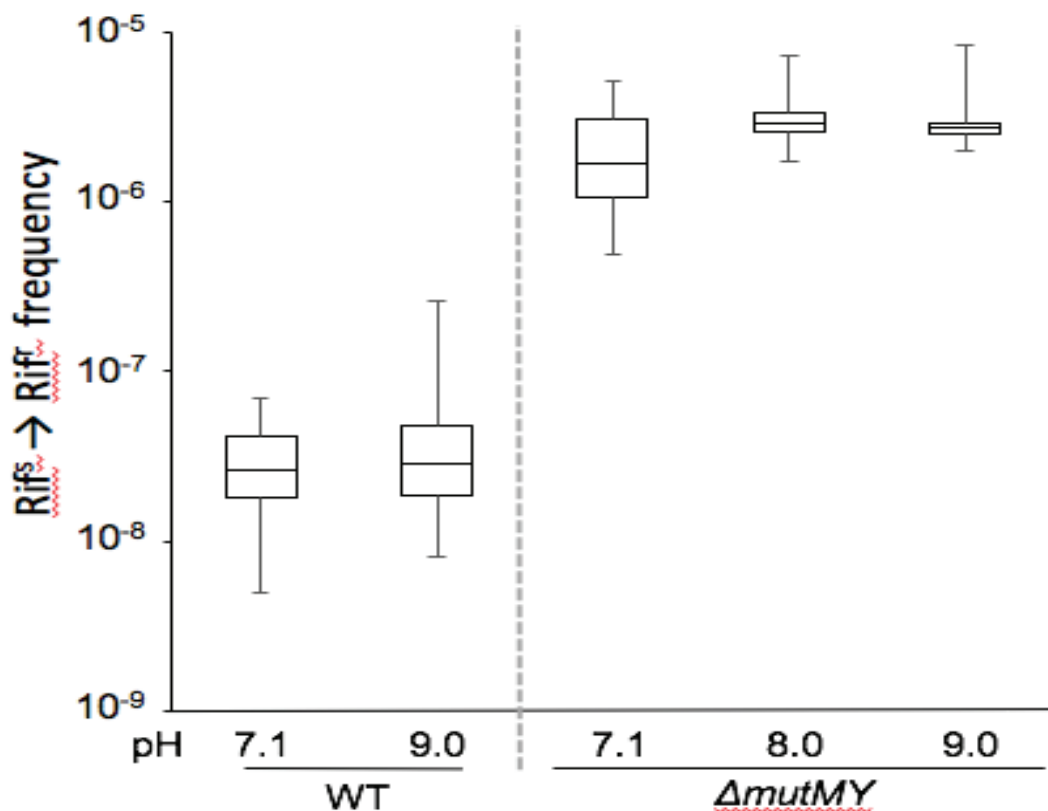


図. 9. 高 pH 環境が突然変異頻度に与える影響

10 N NaOH で pH を調整した培地で野生株 MG1655 と  $\Delta mutMY$  株を培養した際の *rpoB* 突然変異頻度。独立した 20 回の実験結果より中央値及びデータの 50 % を占める分布を示した。

## 標的遺伝子が酸化 DNA 損傷レベルに与える影響

低 pH 環境での突然変異頻度の上昇が、標的遺伝子である *rpoB* の配列及び染色体位置以外の条件においても生じるかどうか、リボソームタンパク質の S12 をコードする *rpsL* 遺伝子を標的とした *rpsL* 突然変異頻度測定を行った。大腸菌野生株と  $\Delta mutMY$  欠損株をそれぞれ培地 pH4.5、7.1 の LB 培地で培養し、*rpsL* 突然変異頻度を測定した。その結果、*rpoB* 突然変異頻度測定の結果同様、 $\Delta mutMY$  欠損株においてのみ pH4.5 の環境で増殖させた場合、pH7.1 で増殖させた場合に比べ突然変異頻度が著しく上昇した (図 10)。この結果から、低 pH 環境で増殖した際に生じる酸化 DNA 損傷レベルの増加は染色体 DNA 全体で生じている可能性が示唆された。

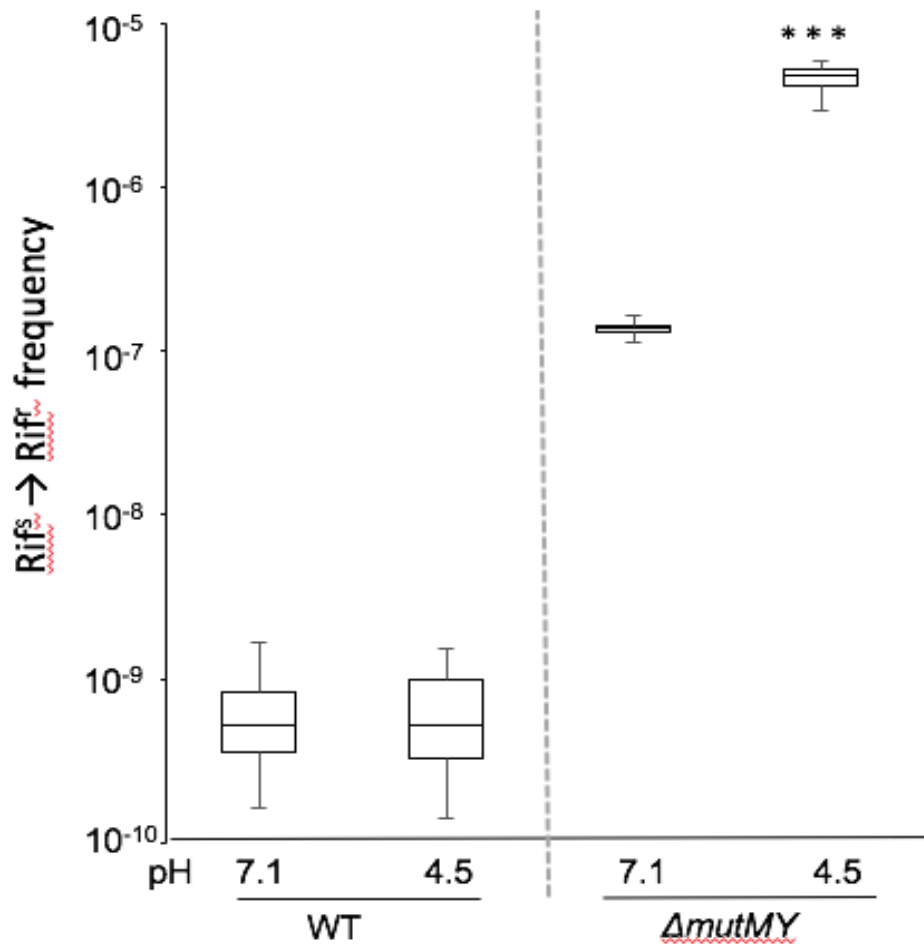


図. 10. 培地 pH 低下の突然変異への影響

6 M HCl を添加して pH を調整した培地で野生株 MG1655 と  $\Delta mutMY$  株を培養し、*rpsL* 突然変異頻度を測定した。独立した 20 回の実験結果より中央値及びデータの 50 % を占める分布を示した。\*\*\* $p < 0.001$

## 低 pH 環境によって誘発される染色体再編

次に、低 pH 環境において増大した酸化 DNA 損傷が塩基置換変異以外の遺伝的变化を誘発しているかどうか検証した。これまでの実験では、8-oxoG 由来の塩基置換変異を修復できない  $\Delta mutMY$  株を使用して、突然変異頻度から酸化 DNA 損傷発生促進の有無を評価した。その中で、大腸菌野生株においては *rpoB* 及び *rpsL* 突然変異頻度は細胞外 pH 変化の影響を受けないことが示された

(図. 11)。この結果は、野生型大腸菌は低 pH 環境によって酸化 DNA 損傷レベルが増大した場合においても、塩基置換変異の誘発を抑制できることを示唆しており、遺伝的变化が生じる頻度に影響を与えていない可能性が考えられる。

しかし、図. 1 に示してあるように、酸化 DNA 損傷は 8-oxoG 以外にも様々な種類の損傷が生じる。低 pH 環境では遺伝的不安定性に影響を与えないのか、8-oxoG 以外の酸化 DNA 損傷発生が促進されているかどうかを明らかにする必要がある。8-oxoG 以外の多くの酸化 DNA 損傷は、次の複製フォークが損傷 DNA 上に来るまでに修復されなければ DNA 二本鎖切断が生じ、その修復機構として相同組換えが最も優先的に働くことが知られている。

本研究室の Lan Anh が構築した、MG1655 由来株でありストレプトマイシン抵抗性を示す *rpsL128A*→C 変異を持ち、なおかつ染色体 DNA 中に野生型 *rpsL* 遺伝子を異所的に挿入した *rpsL* 部分二倍体を用いて、低 pH 環境が自発的相同組換えの発生頻度に影響を与えるかどうか調べた。

その結果、塩基置換変異など、その他の変異の発生頻度は培地 pH の影響を受けないが、相同組換え頻度は低 pH 環境では 3.2 倍有意に上昇しました。

この結果から、低 pH 環境では組換え修復による染色体再編が誘発されやすい状態であることが示唆されました。

図 8、図 11 の結果から、低 pH 環境は酸化 DNA 損傷レベルを増加させ、塩基置換変異の発生は抑制されるが、相同組換えによる染色体再編が誘発される頻度が有意に上昇することが示された。

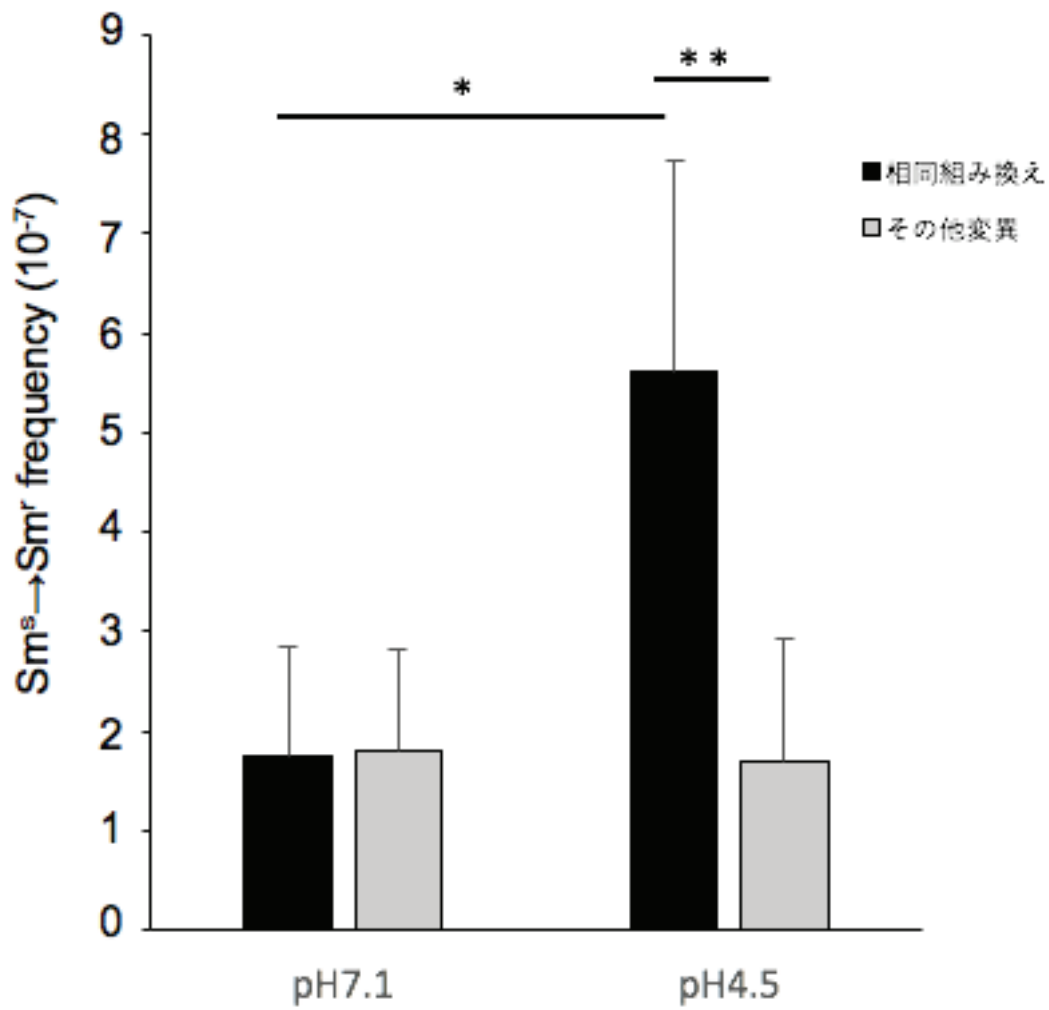


図. 11. 培地 pH の違いが相同組換え頻度に与える影響

6 M HCl を添加して pH を調整した培地で MK9547 株を培養し *rpsL* 突然変異頻度を測定した。その後 Sm 耐性となったコロニーを allele specific PCR により解析し、相同組換え頻度を算出した。独立した 6 回の実験結果の平均値と標準偏差を示した。\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.005$

## 低 pH 環境と遺伝的不安定性

生物は細胞外 pH が低下すると、細胞内 pH の低下を防ぎ、その恒常性を維持するために代謝を変化させる。細胞内 pH の恒常性は、細胞内代謝反応の安定化のみならず、細胞膜やオルガネラ膜を介した pH 勾配や膜電位の確立に重要な要素である。それらを駆動力とした膜輸送系の活性は細胞の生存にとって必須である。

本研究では細胞外低 pH 環境が細胞内の酸化 DNA 損傷レベルを促進させることを新たに見出し、大腸菌ゲノムの不安定性が増大している可能性が示唆された。それでは大腸菌以外の生物において、低 pH 環境がゲノムの不安定性に影響を与えている可能性はあるのだろうか？

低 pH 環境と疾患の関連性の先行研究について、固形腫瘍で生じる過剰量の嫌気性グルコース代謝産物が細胞外 pH (pH) の低下を引き起こすことが観察されている。また、癌細胞周辺領域の酸性微小環境が、低酸素症とは異なるシグナル経路を用いて腫瘍の血管新生を調節し得ることが報告されている [58, 59]。

これらの研究からも、細胞外低 pH 環境が遺伝的不安定性に影響を与えるメカニズムを明らかにすることは生物学的に重要であると考えられる。そのため、「低 pH 増殖環境における 8-oxoG 誘発の分子機構及び遺伝的不安定性への影響の解明」を次の目的として研究を行うこととした。



### 3. 低 pH 環境と細胞内過酸化水素レベル及び酸化 DNA 損傷レベルの関係

#### GFP レポーターアッセイによる細胞内過酸化水素レベルの相対的評価

先行研究において、低 pH 環境では呼吸鎖の電子伝達系に関与する遺伝子群及び酸化ストレス応答に関与する遺伝子群の発現量が上昇することが報告されている。そのため、低 pH 環境で増加する細胞内の過酸化水素レベルに比例して、細胞内ヒドロキシラジカルレベルも同様に増加していることが考えられる。細胞内ヒドロキシラジカルの直接的な定量を試みたいが、ヒドロキシラジカルの存在寿命は 1/100 万秒と極端に短いため、*in vivo* で定量することが困難である。そのため、ヒドロキシラジカルの前駆物質である細胞内過酸化水素レベルを調べることで、間接的に細胞内ヒドロキシラジカルレベルを検討した。Venus GFP 領域の上流に *ahpC* 遺伝子のプロモーター領域と N 末端側の領域 (30~60 塩基) を融合したプラスミド pTN249 を用いたプロモーターアッセイにより細胞内過酸化水素レベルを間接的に評価した。

はじめに、GFP 蛍光強度が細胞内過酸化水素レベルに反映されているかどうか、野生型大腸菌株及び 4 つの過酸化水素消去遺伝子を欠損させた Hpx 株と Hpx-株に *katG* 遺伝子配列を含むプラスミドを保有する株を用いた。各々の大腸菌株に pTN249 を形質転換し、LB 培地で増殖した後に細胞内 GFP 蛍光強度を測定した。その結果、Hpx-株の GFP 蛍光強度は野生型大腸菌に比べ 7 倍有意に増加した (図 12-A)。Hpx-株に *katG* 遺伝子を発現させた場合の GFP 蛍光強度は野生型大腸菌株比較し有意な差は示されなかった。この結果から、本実験の実験系は細胞内過酸化水素レベルを測定する指標として有効であると判断した。

次に、低 pH 環境では細胞内過酸化水素レベルが上昇しているかどうか調べた。pTN249 が形質転換された野生型大腸菌株を pH7.1、4.5 の LB 培地で増殖した後に細胞内 GFP 蛍光強度を測定した。その結果、pH4.5 の培地で増殖した細胞は pH7.1 の環境で増殖した細胞に比べ GFP 蛍光強度が 1.7 倍有意に上昇した (図 12-B)。この結果から、低 pH 増殖環境は細胞内過酸化水素レベルを増加させ、酸化 DNA 損傷を誘発している可能性が示唆された。また、Maurer らの先行研究において、低 pH 増殖環境では *ahpC* の発現量が約 1.8 倍上昇することが、トランスクリプトームを用いて明らかにされている [60]。

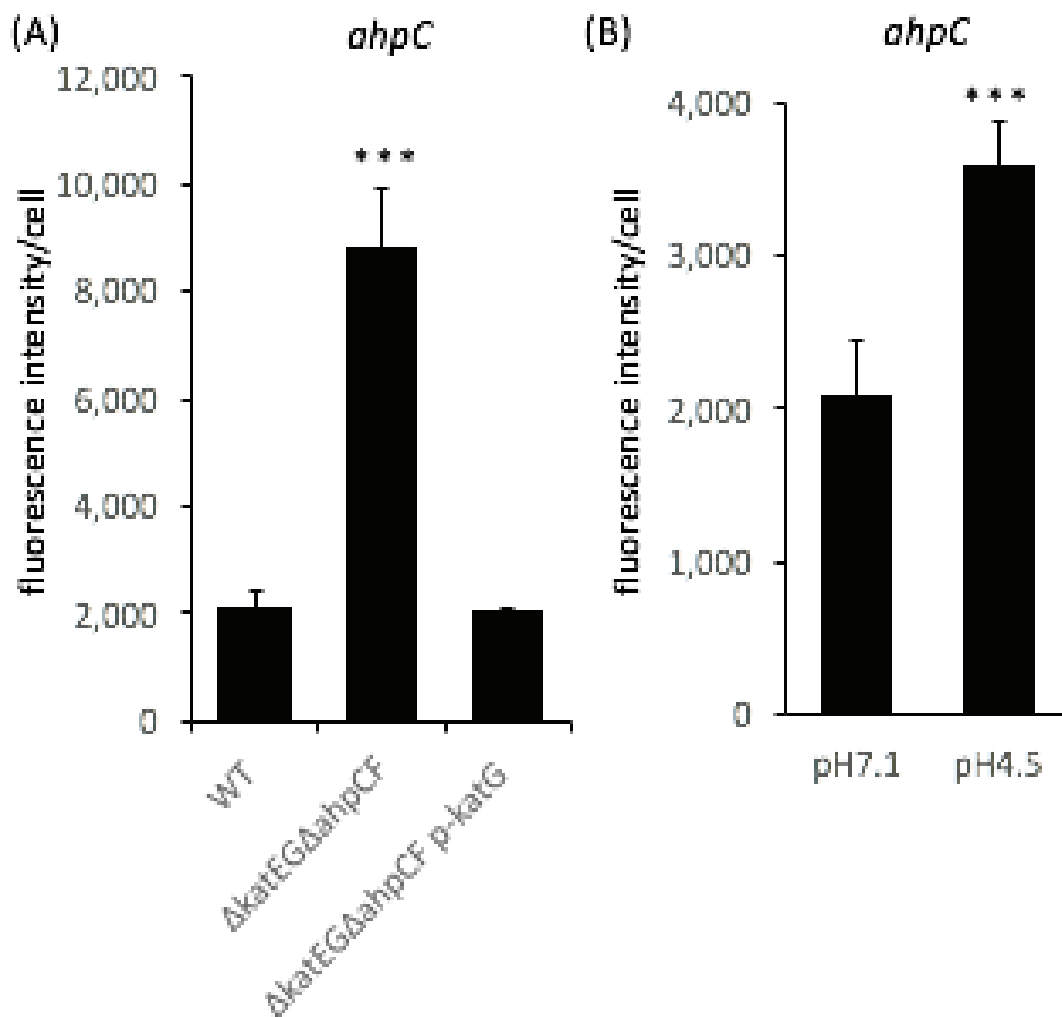


図. 12. フローサイトメーターを用いた pAhpC-GFP 蛍光強度測定

(A) pTN249 を保有する野生株 MG1655 及び 4 つの過酸化水素消去遺伝子を欠損させた  $Hpx^-$  株、 $Hpx^-$  株に *katG* 遺伝子配列を含むプラスミドを保有する株を LB 固体培地で培養したのち GFP 蛍光強度を測定した。独立した 9 回の実験結果の平均値と標準偏差を示した。\*\*\* $p < 0.001$

(B) pTN249 を保有する野生株 MG1655 を pH7.1 と pH4.5 の LB 固体培地で培養したのち GFP 蛍光強度を測定した。pH 調整には 6 M HCl を使用した。独立した 9 回の実験結果の平均値と標準偏差を示した。

\*\*\* $p < 0.001$

### 細胞内過酸化水素レベルの上昇が酸化 DNA 損傷レベルに与える影響

低 pH 環境において、細胞内過酸化水素レベルが上昇したことにより酸化 DNA 損傷が誘発されたことも考えられるが、*ahpC*-GFP 蛍光強度の増加はわずか 1.7 倍である。一方、 $\Delta mutMY$  欠損株を用いた突然変異頻度測定の結果から、低 pH 環境では細胞内の 8-oxoG レベルは少なくとも 19 倍上昇していると考えられる。果たして細胞内過酸化水素レベルは酸化 DNA 損傷レベルに反映しているのだろうか？先行研究において、当研究室の布瀬が 0.2 % グルコース含有 LB 培地を用いた研究において細胞内過酸化水素レベルが突然変異頻度に反映されないことを示した (図 13、図 14)。そこで次に、グルコース含有 (最終濃度 0.2 %) pH4.5 の LB 培地で増殖した細胞の過酸化水素レベル及び突然変異頻度を調べた。

pTN249 が形質転換された野生型大腸菌株を 0.2 %グルコース含有 LB 培地 (pH、4.5) で増殖した後に細胞内 GFP 蛍光強度を測定した。その結果、pH4.5 の培地で増殖した細胞に比べ GFP 蛍光強度が 18 倍有意に上昇した (図 13)。一方、突然変異頻度においては  $\Delta mutMY$  欠損株を 0.2 %グルコース含有 LB 培地 (pH、4.5) で培養し、*rpoB* 突然変異頻度を測定した。その結果、グルコース添加の有無は突然変異頻度に影響を与えなかった (図 14)。これらの結果から、低 pH 環境で上昇した酸化 DNA 損傷レベルは細胞内の過酸化水素レベルに影響されないことが示唆された。

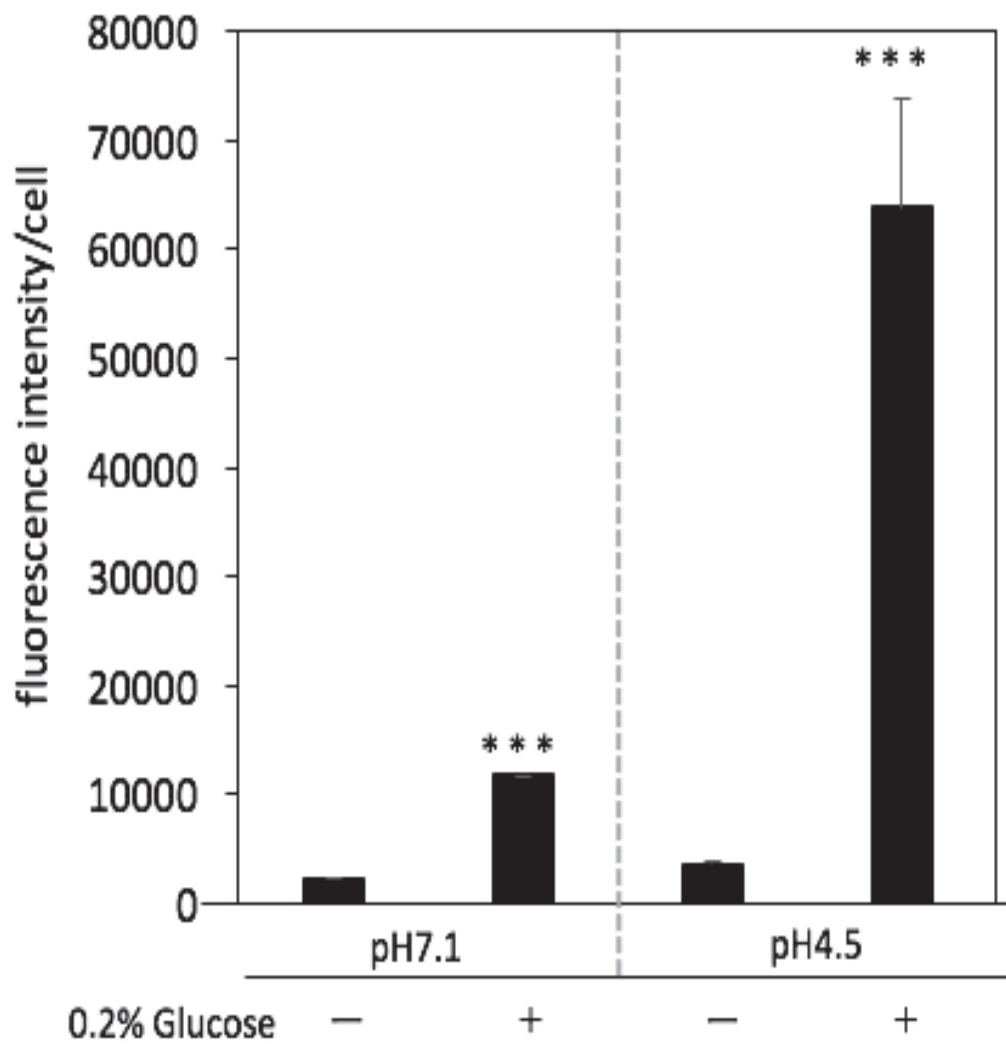


図. 13. フローサイトメーターを用いた *ahpC*-GFP 蛍光強度測定

pTN249 を保有する野生株 MG1655 を pH7.1 と pH4.5 の LB 固体培地及び各 pH の 0.2 % グルコース含有培地で培養したのち GFP 蛍光強度を測定した。pH7.1 のデータは当研究室の布瀬によって得られた。独立した 9 回の実験結果の平均値と標準偏差を示した。\*\*\* $p < 0.001$

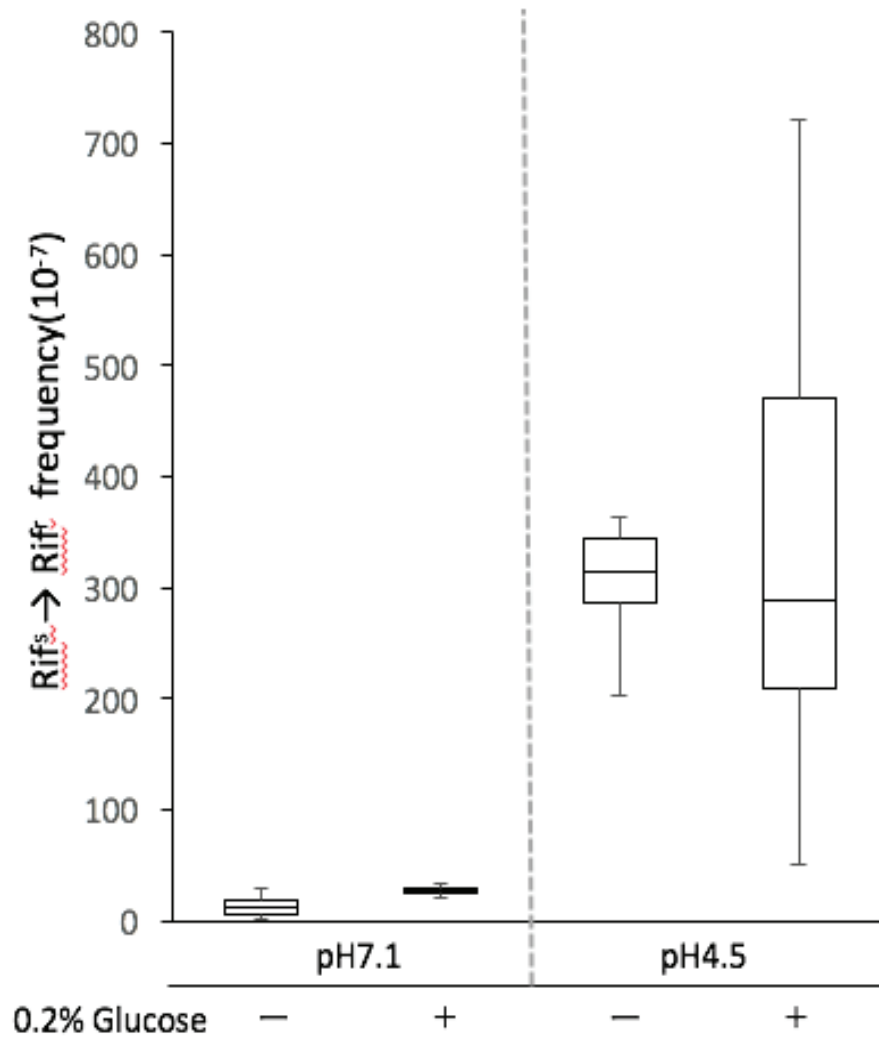


図. 14. グルコース添加による突然変異頻度への影響

$\Delta mutMY$ 株を pH7.1 と pH4.5 の LB 固体培地及び各 pH の 0.2 % グルコース含有培地で培養し、*rpoB* 突然変異頻度を測定した。pH7.1 のデータは当研究室の布瀬によって得られた。独立した 20 回の実験結果より中央値及びデータの 50 % を占める分布を示した。

#### 4. 低 pH 環境が細胞内遊離鉄イオン濃度及び酸化 DNA 損傷レベルに与える影響

##### はじめに

低 pH で増加した酸化 DNA 損傷レベルに細胞内過酸化水素レベルが影響しないことが示唆されたため、細胞内遊離  $\text{Fe}^{2+}$  濃度が低 pH 環境では増加していることが推察される。前述したように、生物にとって鉄は金属イオンの中でも含有量が多い一方で、遊離の  $\text{Fe}^{2+}$  濃度はヒドロキシラジカル発生原因物質でもあるため細胞内の遊離  $\text{Fe}^{2+}$  濃度は厳密に制御されている。故に細胞内遊離  $\text{Fe}^{2+}$  濃度の直接的定量が困難であり、先行研究で報告されている細胞内遊離  $\text{Fe}^{2+}$  の定量に用いている菌株においても、細胞内の鉄イオンが過剰になる変異体を使用している。そこで本研究では遺伝学手法により低 pH 環境での酸化 DNA 損傷レベルの増加と細胞内鉄イオン制御機構の関連性を調べた。

##### 低 pH 環境における細胞内鉄取り込み機構と酸化 DNA 損傷レベルの関係

様々な細胞内鉄イオン代謝系の中で、はじめに細胞内への鉄輸送に着目した。はじめに鉄キレート剤である 2,2'-Bipyridyl (Sigma 社) を培地中に含有させた培地で細胞を増殖した際に突然変異頻度が低下するかどうか調べた。先行研究において、当研究室の布瀬が、 $\Delta mutMY$  株を LB 培地で増殖させた時には 2,2'-Bipyridyl 添加による突然変異頻度の低下は示されなかった (図 15)。 $\Delta mutMY$  株を 150  $\mu\text{M}$  2,2'-Bipyridyl 含有 pH、4.5 の LB 培地で培養し、*rpoB* 突然変異頻度を測定した。その結果、突然変異頻度は有意に低下した (図 15)。

さらに、細胞に鉄イオンを取り込む輸送能が著しく損なわれた  $\Delta mutMY \Delta tonB$  株を中性 pH 及び低 pH 環境で培養し *rpoB* 突然変異頻度を測定した。その結果、中性 pH 環境、低 pH 環境ともに *tonB* 欠損により突然変異頻度の有意な低下が示された。特に、低 pH では  $\Delta mutMY$  欠損株に比較して突然変異頻度がより顕著に低下した (図. 15)。これらの結果から、低 pH 環境での酸化 DNA 損傷誘発には細胞内鉄イオンの上昇が関与していることが示唆された。

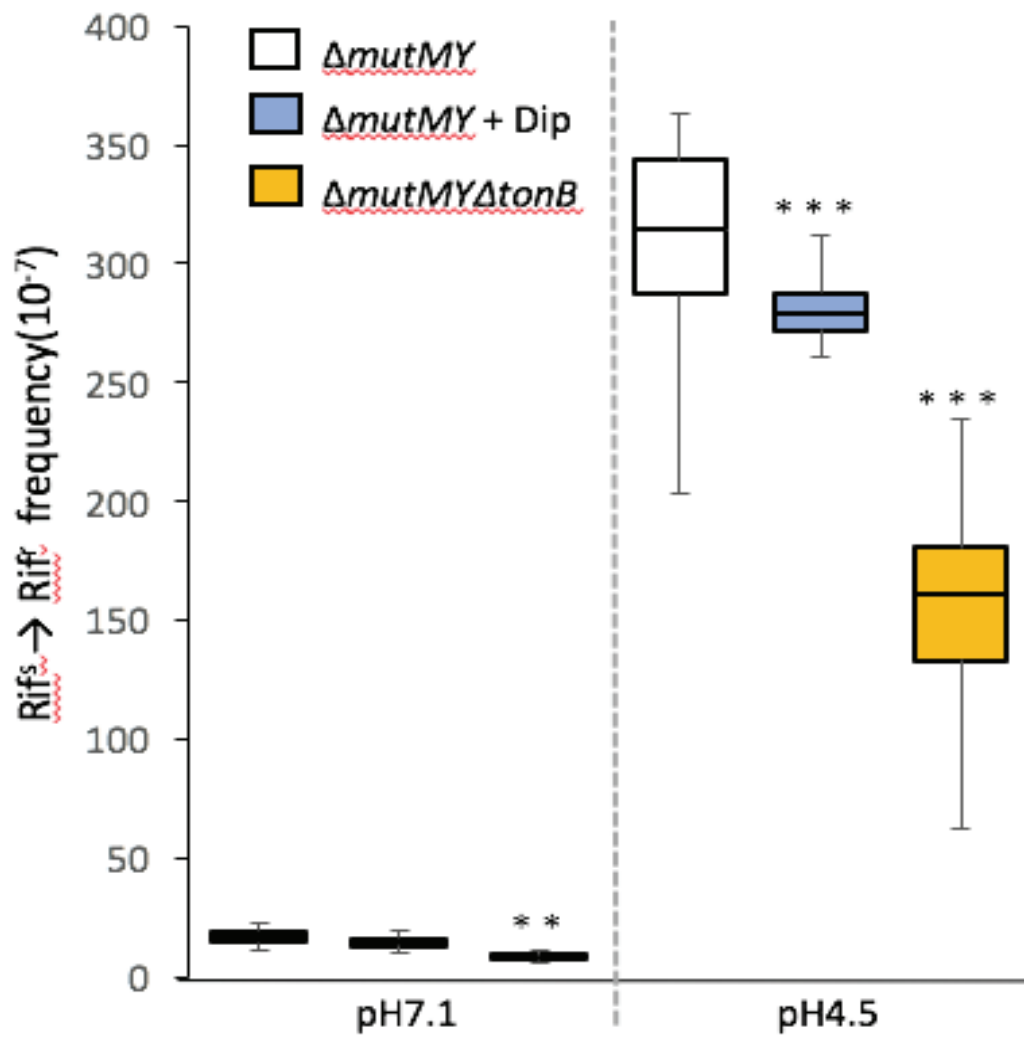


図 15. 鉄イオン取り込み能が突然変異頻度に与える影響

$\Delta mutMY$  株、 $\Delta tonB \Delta mutMY$  株を LB pH7.1、LB pH4.5 の環境下で培養し、*rpoB* 突然変異頻度を測定した。pH7.1 において 200  $\mu M$  2,2'-Bipyridyl 含有 LB 培地で培養した際の *rpoB* 突然変異頻度の結果は当研究室の布瀬によって得られた。pH4.5 においては 2,2'-Bipyridyl 濃度は 150  $\mu M$  で突然変異頻度を測定した。独立した 20 回の実験結果より中央値及びデータの 50 % を占める分布を示した。\*\*\* $p < 0.001$

## 低 pH 環境下における鉄貯蔵タンパク質の過剰発現が酸化 DNA 損傷レベルに与える影響

さらに、鉄貯蔵タンパク質をコードする遺伝子を過剰発現させた際に突然変異頻度が低下するかどうか調べた。鉄貯蔵タンパク質をコードする *dps*、*ftnA*、*bfr* いずれの遺伝子を過剰発現させた場合においても突然変異の有意な低下は示されなかった (図 16)。その原因として、先行研究により低 pH 環境では *dps* 遺伝子の発現量が増加することが報告されており、低 pH 環境では既に鉄貯蔵タンパク質が過剰に存在しているにも関わらず酸化 DNA 損傷が促進されていることが考えられる。

以上の結果から、低 pH 環境での酸化 DNA 損傷の誘発には細胞内鉄イオンの上昇が関与することが示唆された。さらに、細胞内の鉄イオン濃度を減少させる手法としては *tonB* 欠損 > 培地中に 2, 2'-Bipyridyl 添加 > 鉄貯蔵タンパク質の過剰発現が効果的であることが明らかになった。

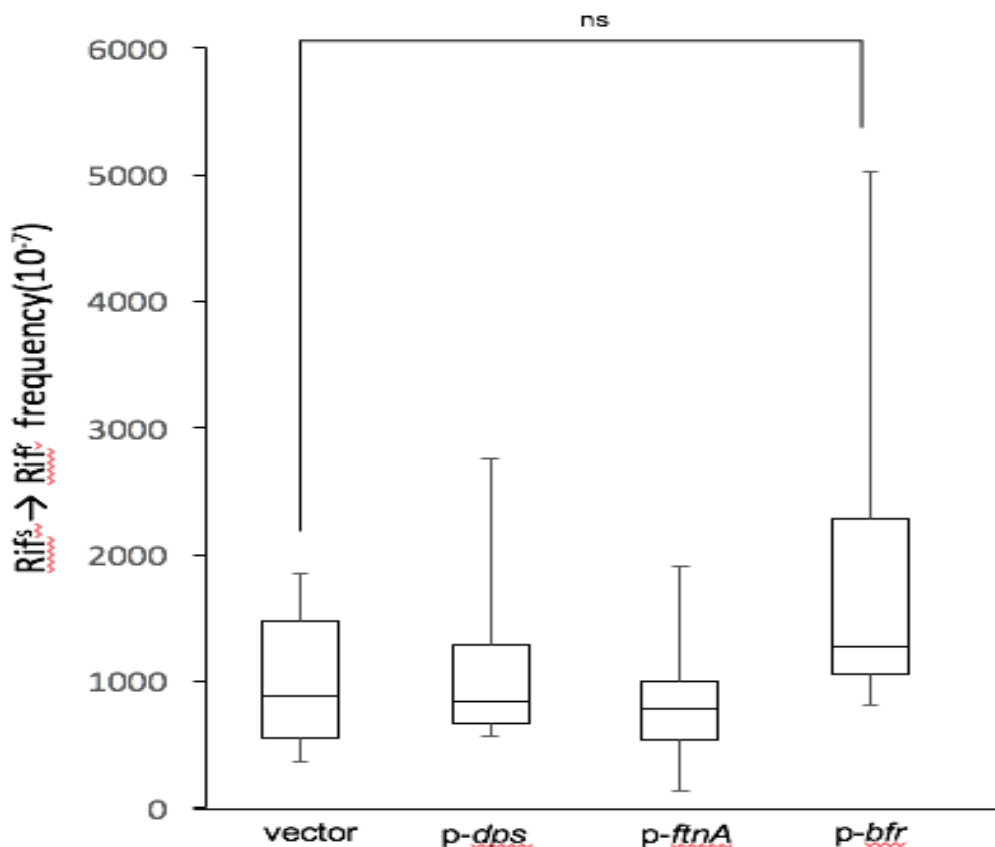


図. 16. 鉄貯蔵タンパク質の過剰発現時の突然変異への影響

$\Delta mutMY$  株に pCA24N、pCA24N-dps、pCA24N-ftnA、pCA24N-bfr プラスミドを形質転換した菌株を 0.1 mM IPTG 含有 LB pH4.5 の培地で培養し *rpoB* 突然変異頻度を測定した。独立した 20 回の実験結果より中央値及びデータの 50% を占める分布を示した。



## 低 pH 環境において細胞内鉄取り込み制御機構が酸化 DNA 損傷誘発に与えている影響

図 15 の結果より、低 pH 環境では細胞内遊離鉄イオン濃度が上昇している可能性が考えられる。そこで次に、細胞内遊離鉄イオン濃度を制御している因子を欠損した変異体を用いた際に、低 pH 環境では酸化 DNA 損傷レベルが相乗的に上昇するかどうか検証した。当研究室の布瀬の先行研究により、 $\Delta mutMY$  株に鉄貯蔵タンパク質をコードする *dps*、鉄取り込み遺伝子の転写制御因子である *fur* を欠損させた細胞では突然変異頻度が有意に上昇することが示された (図 17)。これらの変異体を用いて、低 pH 環境で培養した際に突然変異頻度の顕著な上昇が観察されるか検証した。その結果、*mutMY* 欠損株での突然変異頻度と比較して、*dps* 欠損、*fur* 欠損ともに突然変異頻度が著しく増加した (図 17)。以上の結果から、*fur-tonB* 依存の鉄イオンの取り込み能が増強され、細胞内の遊離鉄イオン濃度が増加していることが示唆された。

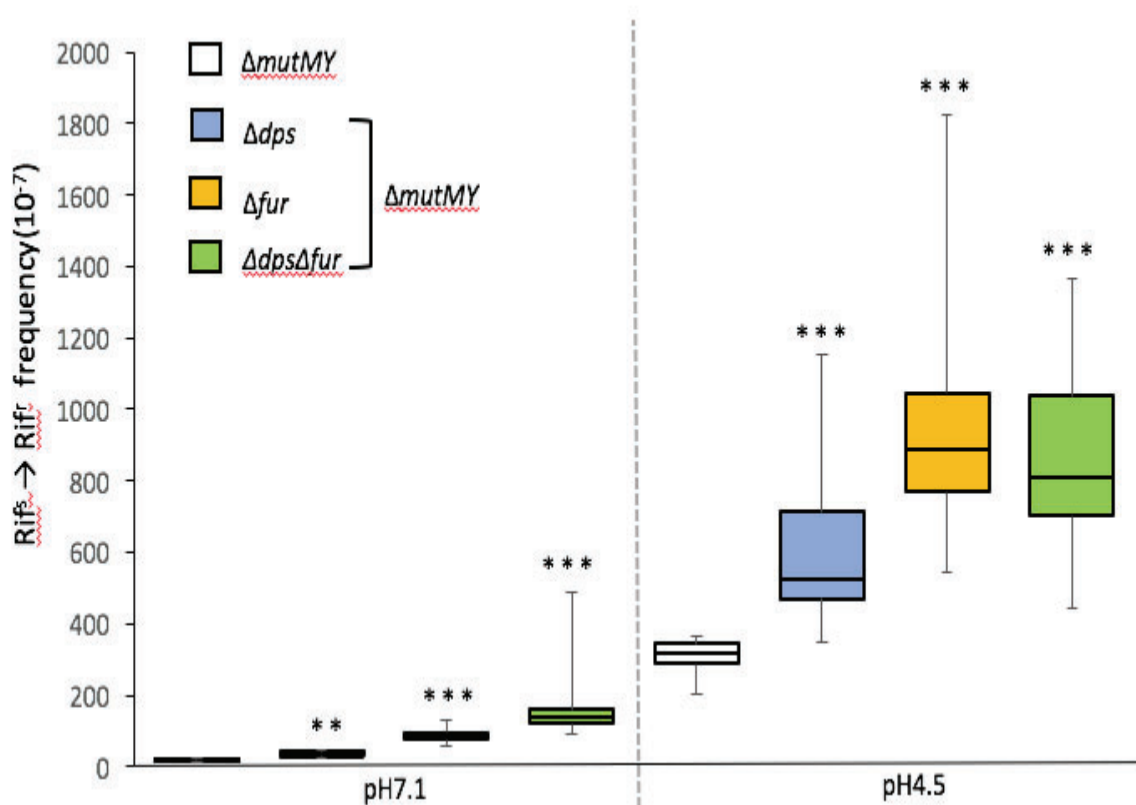


図. 17. 細胞内鉄イオン制御因子欠損が突然変異頻度を与える影響

$\Delta mutMY$  株、 $\Delta mutMY \Delta dps$ 、 $\Delta mutMY \Delta fur$ 、 $\Delta mutMY \Delta dps \Delta fur$  株を pH7.1 及び pH4.5 の LB 培地で培養し *rpoB* 突然変異頻度を測定した。pH7.1 のデータは当研究室の布瀬によって得られた。独立した 20 回の実験結果より中央値及びデータの 50% を占める分布を示した。\*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$

## 低 pH 環境における細胞内 H<sub>2</sub>S 濃度と酸化 DNA 損傷レベルの関係

さらに、低 pH 環境において細胞内遊離鉄イオン濃度が上昇しているかどうか調べるため、細胞内 H<sub>2</sub>S の酸化ストレス保護機構に着目した。先行研究により、大腸菌細胞内の H<sub>2</sub>S が細胞内遊離 Fe<sup>2+</sup> と反応することで Fe<sup>2+</sup> を不溶化し、フェントン反応によるヒドロキシラジカル発生及び酸化ストレスから細胞を保護していることが報告されている [61]。大腸菌細胞内の H<sub>2</sub>S の大部分は 3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素をコードする *mstA* によって合成されることが報告されている。

細胞内 H<sub>2</sub>S が酸化ストレスから細胞を保護しているかどうか、大腸菌野生株、 $\Delta mstA$  株、 $\Delta fur$  株、 $\Delta fur \Delta mstA$  株を用いて各々の過酸化水素感受性を測定した。その結果、 $\Delta mstA$  株では過酸化水素感受性を示されなかったが、細胞内鉄イオン濃度が高い  $\Delta fur$  株は過酸化水素感受性を示した (図. 18)。また、 $\Delta fur \Delta mstA$  欠損株では過酸化水素に対して著しく感受性を示した (図. 18)。この結果から、細胞内遊離鉄イオンが生理的濃度より高い場合、MstA によって合成された H<sub>2</sub>S が細胞内の遊離鉄イオンを不溶化し、結果として先行研究で示唆されていた通り細胞を酸化ストレスから保護していることが示唆された。

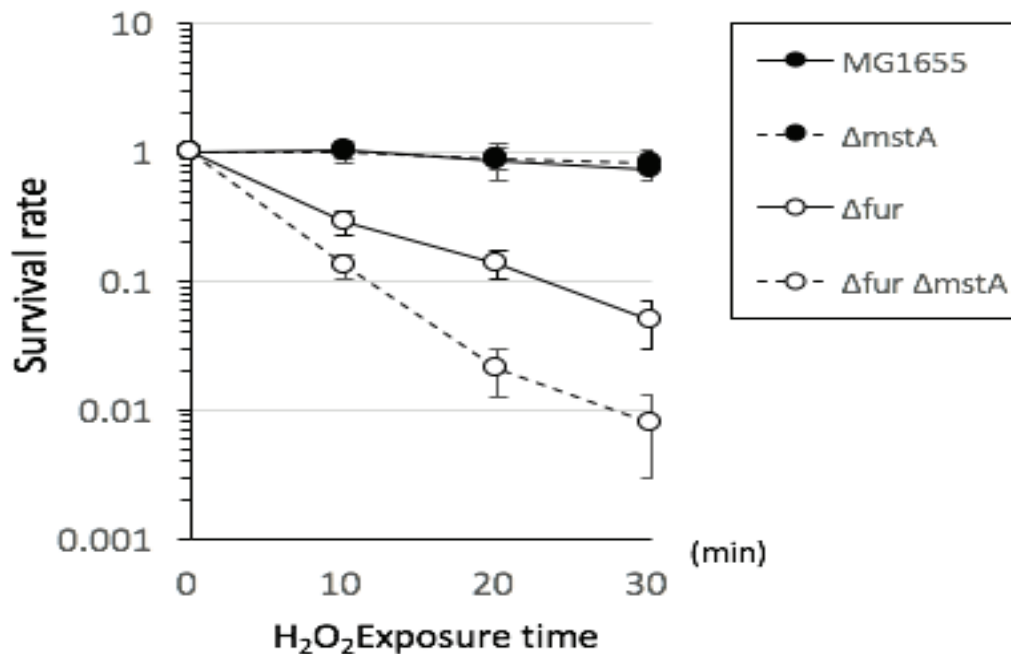


図. 18. *mstA* 欠損が過酸化水素感受性に与える影響

対数増殖期である OD<sub>600</sub>=0.2 の MG1655、 $\Delta mstA$ 、 $\Delta fur$ 、 $\Delta fur \Delta mstA$  細胞を 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に 0, 10 min, 20 min, 30 min 処理し、生存率を測定した。実験は独立して 3 回行い、生存率は平均値で示し、エラーバーは標準偏差で示した。

図 18 の結果から、低 pH 環境において大腸菌細胞内の遊離鉄イオン濃度が上昇している場合、低 pH 環境で増殖した  $\Delta mutMY \Delta mstA$  株の *rpoB* 突然変異頻度は  $\Delta mutMY$  株に比較して増加することが予測された。 $\Delta mutMY \Delta mstA$  株を pH7.1 と pH4.5 の LB 培地で培養し *rpoB* 突然変異頻度を測定した。その結果、pH4.5 においてのみ、 $\Delta mutMY$  欠損株での突然変異頻度と比較し 1.7 倍有意に上昇した (図. 19 )。以上の結果から、低 pH 環境では細胞内遊離鉄イオン濃度、特に  $Fe^{2+}$  濃度が上昇しており、細胞内  $H_2S$  が酸化 DNA 損傷誘発の抑制に寄与していることが強く示唆された。

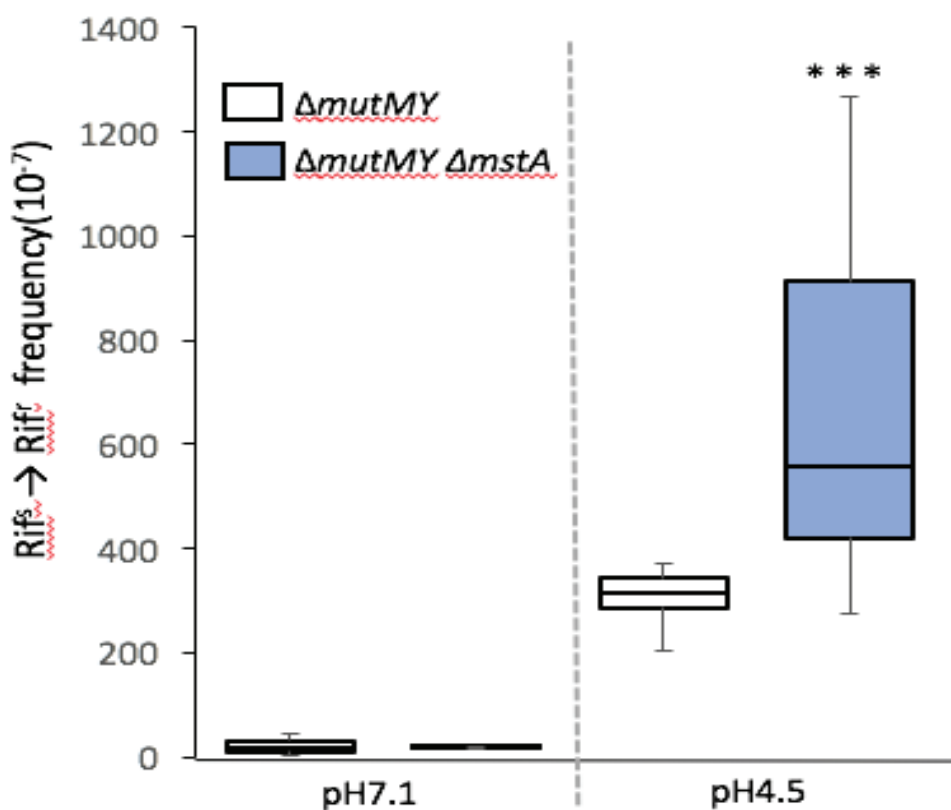


図. 19. *mstA* 欠損が突然変異に与える影響

$\Delta mutMY$  株、 $\Delta mutMY \Delta mstA$  株を LB pH7.1、LB pH4.5 の環境下で増殖させ *rpoB* 突然変異頻度を測定した。

独立した 20 回の実験結果より中央値及びデータの 50 % を占める分布を示した。\*\*\* $p < 0.001$

## 第4章 考察

## 1. 大腸菌細胞内におけるアスコルビン酸の作用

### アスコルビン酸は細胞内で酸化ストレスを誘発しないのか？

本研究の当初の目的は、抗酸化剤であるアスコルビン酸がどのような分子機構で大腸菌細胞内の酸化 DNA 損傷発生を促進させているのか解明することであった。先行研究において、結核菌ではアスコルビン酸処理が細胞内のフェントン反応を促進させることが報告されるなど [62]、アスコルビン酸が細胞内で酸化ストレスを誘発する可能性については本研究以前から議論がなされていた。このことから、当初の目的で研究を始めたことは極めて妥当であったと考える。

しかし、本研究結果から、アスコルビン酸含有培地で培養した際に酸化 DNA 損傷発生が促進された原因は、増殖環境の pH が中性から酸性に変化していたからであった。アスコルビン酸が大腸菌細胞に与えた影響については図 7 に示す結果から 2 点の事が示唆された。1 点目は、大腸菌細胞におけるアスコルビン酸の酸化 DNA 損傷発生促進作用は小さいこと。2 点目は、本研究の実験系ではアスコルビン酸の抗酸化能評価は困難であること。前者については図 7B の培地 pH を中和した際の結果から、有意な差が生じたものの低 pH 環境が促進させた酸化 DNA 損傷レベルと比較するとその影響は小さいことが明らかになった。後者については、当研究室の坂井が構築した酸素シフトの実験系を用いて、アスコルビン酸濃度と培地 pH を適切に調整することで、*in vivo* でのアスコルビン酸の抗酸化能を評価できる可能性も考えられる。

## 2. 細胞外低 pH と遺伝的不安定性

### 低 pH ストレス応答機構と酸化ストレス応答機構の関連性

先行研究の報告により、低 pH ストレス応答で発現誘導される遺伝子群と、酸化ストレス応答により発現誘導される遺伝子群には、*ahpC* や *dps* など数多くの遺伝子が重複していることが示されている [29, 60, 63, ]。このことから、低 pH ストレスが副次的に酸化ストレスを誘発していることが考えられていた。しかし、実際に低 pH 環境が細胞内の酸化 DNA 損傷を促進させることを見出したのは本研究が初めてのことである。

大腸菌における低 pH ストレスと DNA 損傷の関係性について、細胞が増殖できない極度な低 pH 環境下 (pH~3.0) では Dps や RecA が染色体 DNA を損傷から保護・修復し、一時的な細胞生存に寄与していることが報告されている [64]。極度の低 pH 環境では細胞膜の恒常性を維持出来ず、細胞内 pH が低下するとともに細胞死に至る。細胞内の低 pH ストレスは DNA に損傷を与え、細胞内 pH の低下に伴い脱プリン化および脱ピリミジン化を引き起こすことも知られている [65]。Dps や RecA は DNA 結合能を有していることから、細胞内低 pH に伴う DNA 損傷誘発を防ぐために、物理的に染色体 DNA を損傷から保護していると考えられている。

一方、本研究で低 pH を示す pH4.5 の増殖環境では、大腸菌細胞は細胞死や増殖に伴う生菌数の低下は引き起こされない。また、HCl を用いて培地 pH を低下させた場合において、細胞質内の pH は中性に維持されていることが先行研究から示されている [66, 67]。故に、本研究での発見は、極度の低 pH 環境下により誘発された DNA 損傷機構とは大きく異なる分子機構で発生した事象であることが推察される。実際に、 $\Delta mutMY$  株を用いて低 pH 環境下で培養すると 8-oxoG 由来の突然変異頻度が著しく上昇した結果からも、その推察は強く支持される。

## 低 pH 環境で増加した自発的相同組換え頻度

本研究でははじめに 8-oxoG 由来の塩基置換変異の発生頻度を指標に酸化 DNA 損傷レベルの増減を評価した。その中で、野生型大腸菌株においては、低 pH 環境においても突然変異頻度に有意な変化は示されなかった。このことから 2 つの可能性が考えられる。1 つは野生型大腸菌株においても酸化 DNA 損傷発生は促進されたが、修復酵素によって変異誘発が完全に抑制されたこと。もう一方は、野生型大腸菌株においては酸化 DNA 損傷発生が促進されていない可能性がある。序論の図. 1 に示したように、細胞内では様々な種類の酸化 DNA 損傷が生じていることから、低 pH 環境において 8-oxoG 以外の酸化 DNA 損傷レベルは増加していると推察した。

当研究室の Lan Anh は先行研究にて、DNA 修復酵素が欠損していない M9547 株を用いて、酸化 DNA 損傷レベルと相同組換え頻度に相関性があることを、塩基除去修復機構とヌクレオチド除去機構が欠損した細胞を用いて明らかにした。当研究室の Lan Anh が見出した結果から、本研究においても低 pH 環境が相同組換え頻度を上昇させている可能性を考え、実際に相同組換え頻度検出系を用いた実験により、低 pH 環境において相同組換え頻度が上昇したことを確認した (図. 11)。

このことは、低 pH 環境での増殖により細胞内の 8-oxoG レベルが上昇しただけでなく、その他の酸化 DNA 損傷発生も促進されたことを示唆している。またその結果として、塩基除去修復とヌクレオチド除去修復による DNA 修復が間に合わない損傷部位の発生頻度が増加し、相同組換えによる修復頻度が増加したことが示唆される。

### 3. 細胞内活性酸素種レベルと酸化 DNA 損傷

#### 細胞内過酸化水素レベルの適切な測定方法とは？

本研究では細胞内過酸化水素レベルを測定するために、*ahpC*のプロモーターアッセイを行った。しかし、細胞内過酸化水素レベルを測定する一般的な手法としては、細胞内で過酸化水素と直接反応する蛍光試薬を用いられることが多い。蛍光試薬を用いる研究では基本的に細胞を mM レベルの過酸化水素濃度で細胞を処理した後に細胞内過酸化水素レベルが測定されることが多い。

本研究においては増殖環境 pH 変化が細胞内過酸化水素レベルに与える影響を調べることが目的であるため、細胞に過酸化水素処理を施す必要はない。また、通常生物は細胞内の活性酸素種レベルを極限に抑えており、大腸菌においては細胞内の過酸化水素レベルがおよそ 50 nM と非常に低い濃度であることが先行研究から推察されている。故に、本研究では蛍光試薬を用いた細胞内過酸化水素レベルの測定は適していないと判断した。細胞内過酸化水素レベルの指標とした AhpC は、大腸菌細胞内に存在するタンパク質の中でも、1 細胞当たり存在する分子数が豊富であるタンパク質に分類されていることから [68]、生理的条件の細胞内過酸化水素の無毒化に大きく寄与していることは明らかである。このことから、本研究では細胞内過酸化水素レベル測定として *ahpC* 遺伝子の転写レベルの比較を行うことが適当な手段であると考えた。

#### 低 pH が細胞内過酸化水素レベルを上昇させる要因

図. 12-B から低 pH 環境では *ahpC*-GFP 蛍光強度が増加したことから、低 pH 環境では細胞内過酸化水素レベルが増加していることが示唆された。先行研究におけるトランスクリプトーム解析により、低 pH 環境で好気培養された細胞は、酸素呼吸の末端酸化酵素であるシトクロム *bo* 末端酸化酵素、NADH 脱水素酵素 II、コハク酸脱水素酵素、および NADH 脱水素酵素 I の発現が増加することが報告されている (60, 69)。通常の細胞増殖環境ではこれらの遺伝子は、ATPase による ATP 産生に必要なプロトン勾配を生成するための重要な因子である。NADH の NAD への酸化をはじめとする、酸化還元反応と共役して最終的に細胞質外へとプロトンを排出することでプロトン勾配を生成している。つまり、低 pH 環境で上記の遺伝子発現レベルが増加することで、中性 pH での増殖条件下よりも高いプロトン排出率となり、細胞質内の pH 降下を積極的に打ち消すことを可能にしている。その代償として、細胞質内へとリークする電子量が増加し、細胞内の過酸化水素レベルのみならずスーパーオキシドレベルも同様に上昇したと推察される。



## 細胞内活性酸素種レベルが酸化 DNA 損傷レベルに与える影響

細胞内過酸化水素レベルと突然変異頻度の関係性について、当研究室の布瀬の結果（図 13 及び図 14）から、細胞内過酸化水素レベルは酸化 DNA 損傷レベルに影響しないことが示唆された。グルコース含有培地で増殖した細胞の *ahpC*-GFP 蛍光度が顕著に上昇した要因としては、グルコース添加によりエネルギー生産を行う代謝経路が TCA 回路を中心とした代謝系に変化したことが考えられる。また、低 pH 環境においてはグルコース代謝が行われることで細胞外のみならず細胞内の pH が低下し、より多くのプロトンを排出する必要となりシトクロム *bo* を始めとする電子伝達系を利用した細胞外へのプロトン排出が一層活発化され、結果として細胞内にリークする電子の増加が考えられる。

さらに、低 pH 環境では細胞内スーパーオキシドレベルも同様に上昇しているかどうか調べた結果、pH4.5 の培地で増殖した細胞は pH7.1 の環境で増殖した細胞に比べ *soxS*-GFP 蛍光強度が 1.4 倍有意に上昇した（図 20）。

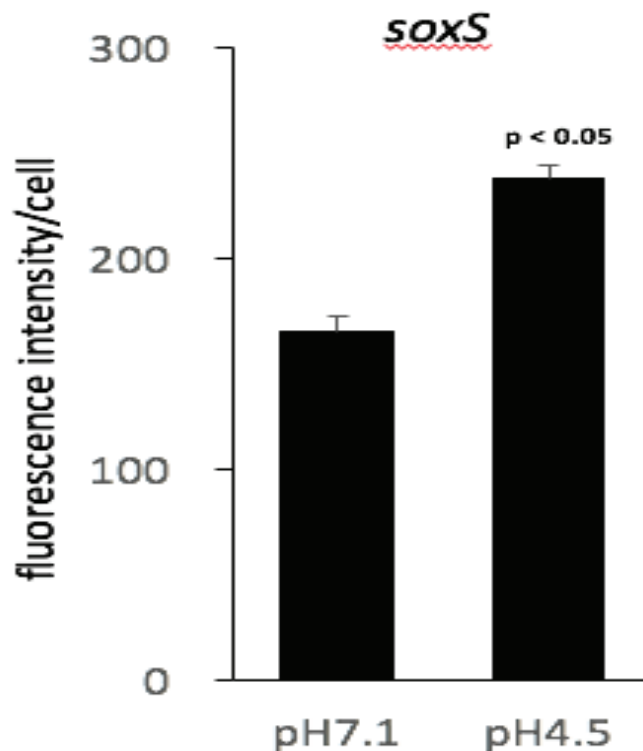


図. 20. フローサイトメーターを用いた pSoxS-GFP 蛍光強度測定

(B) pTN247 を保有する野生株 MG1655 を pH7.1 と pH4.5 の LB 固体培地で培養したのち GFP 蛍光強度を測定した。pH 調整には 6 M HCl を使用した。独立した 3 回の実験結果の平均値と標準偏差を示した。

低 pH 環境では細胞内過酸化水素レベルのみならず、スーパーオキシドレベルも同様に上昇したが、果たしてその上昇は酸化 DNA 損傷発生促進に関与していないのだろうか？ スーパーオキシドは DNA への直接的な酸化能を有していないが、タンパク質をはじめとする生体分子を酸化損傷させる。その中でも、Fe-S クラスターを含むタンパク質の Fe-S 部位が酸化損傷を受けると Fe-S クラスターから鉄イオンが細胞内に遊離することが知られている。大腸菌における代表的な例として、表面に露出した Fe-S クラスターを含む脱水酵素が存在する [70]。また先行研究において、大腸菌の細胞質 SOD 欠損株では好気環境下で最小培地の増殖が不可能なこと、8-oxoG 由来の変異誘発が増加することが報告されている [71, 72]。このことから、酸化 DNA 損傷レベルを著しく上昇させることが示唆されていた。

しかし近年、当研究室の上船が、スーパーオキシド発生剤であるパラコート を LB 培地中に含有させた培地で細胞を増殖させ、*soxS*-GFP 蛍光強度と *rpoB* 突然変異頻度を測定した。その結果、パラコート添加により *soxS*-GFP 蛍光強度が 7.1 倍上昇するも、 $\Delta mutMY$  株の *rpoB* 突然変異頻度の上昇は 1.8 倍にとどまった [44]。このことから、細胞中のスーパーオキシドレベルが増加した場合においても、SOD 存在下では酸化 DNA 損傷発生促進に影響しないことが示唆された。

#### 4. 低 pH 環境における細胞内鉄イオン濃度に与える影響

##### 細胞内遊離 Fe<sup>2+</sup>は直接的な定量が可能なのか？

本研究では遺伝学的手法を主として、低 pH 環境で促進された酸化 DNA 損傷に細胞内遊離鉄イオン濃度が関与しているかどうか検証した。遺伝学的手法を用いた理由としては、細胞内遊離鉄イオン濃度、特に Fe<sup>2+</sup>の直接的定量が現時点では適当に評価できないと考えたからである。前述したように好気環境では鉄は毒性を示すことから細胞内の鉄イオン濃度は厳密に制御されている。大腸菌において細胞内の遊離鉄イオンを検出する方法として、主に核磁気共鳴を用いた検出がなされている [73]。しかし、核磁気共鳴によって細胞内遊離鉄イオンを検出するためには、細胞内に鉄イオンが過剰に存在する変異体を使用する必要がある。また、先行研究における核磁気共鳴による細胞内遊離鉄イオン濃度の検出においても、細胞透過性のキレート剤を用いて細胞内の Fe<sup>3+</sup>を検出している。そのため大腸菌において、細胞内の遊離鉄イオン濃度の定量方法については十分に議論できるほど確立されているとは言い難い。さらに、核磁気共鳴による細胞内遊離鉄イオン濃度を検出するには 2~3 L の培養液を作製する必要がある。本研究では動物の腸などの自然環境で大腸菌が遭遇するストレス環境を模倣するために、コロニーを形成する寒天培地上で細胞を増殖させた際の細胞について解析を行ってきた。今後は液体培地で培養した際にも低 pH 環境では遺伝的不安定性が増大するかどうか検証する必要がある。

また、他の細胞内遊離鉄イオンの検出方法として、近年 Hirayama らが動物生細胞内 Fe<sup>2+</sup>を特異的に検出可能なゴルジ局在性の生細胞イメージング用蛍光プローブ RhoNox-1 を開発した [74]。そこで当研究室においても、RhoNox-1 を用いた大腸菌細胞内 Fe<sup>2+</sup>の検出が可能なのかどうか検証した。その結果、大腸菌細胞においては RhoNox-1 を用いた細胞内 Fe<sup>2+</sup>の検出を評価することができなかった。(date not shown)

## 低 pH 環境で細胞内遊離鉄イオン濃度が上昇している可能性について

細胞が低 pH 環境に曝された際、細胞内の遊離鉄イオン濃度及び鉄代謝に関与する遺伝子発現が有意に変化することはこれまでに報告されていない。本研究では遺伝学的解析により、低 pH 環境で増殖した際の細胞内遊離鉄イオン濃度の増加を支持する結果を得た。

図 15 の結果より、*tonB* 遺伝子が欠損した細胞では、低 pH 環境で増加した酸化 DNA 損傷レベルが 1/2 に低下することが示された。この結果は、低 pH 環境における酸化 DNA 損傷レベルの増大には TonB を介した細胞内鉄輸送が大きく関与していることを意味している。さらに、鉄キレート剤である 2,2'-Bipyridyl を培地中に添加し、細胞内への鉄取り込みを制限した際の突然変異頻度を測定した結果、中性 pH 環境下においては突然変異頻度に有意な差は見られなかったが、低 pH 環境においては 2,2'-Bipyridyl 添加による突然変異頻度の有意な低下が示された。これらの結果から、低 pH 環境における酸化 DNA 損傷レベルの上昇には細胞内遊離鉄イオン濃度が大きく関与していることが示唆された。

低 pH 環境において細胞内遊離鉄イオン濃度が上昇していると仮定すると、細胞内鉄イオン濃度が過剰になる変異体を使用して突然変異頻度を測定すると突然変異頻度が相乗的に増加することが推察された。実際に、図 17 の  $\Delta dps$  や  $\Delta fur$  株を用いた実験により、低 pH 環境で培養し *rpoB* 突然変異頻度を測定すると通常の LB 培地で増殖した際に見られる突然変異頻度の上昇に比べ、著しい突然変異頻度の上昇が示された。これらの結果から、低 pH 環境では細胞内の遊離鉄イオン濃度が上昇していることが示唆された。

さらに、細胞内における酸化ストレス保護物質として近年報告された  $H_2S$  が機能していることが報告された。大腸菌細胞内にて合成される  $H_2S$  の大半は MstA によって生合成されている。図 18 の結果から、細胞内の鉄イオン濃度が高い状態の時、細胞内  $H_2S$  は酸化ストレス保護に寄与していることが示された。この結果から、低 pH 環境において細胞内遊離鉄イオン濃度が増加している場合 *mstA* が欠損することで酸化 DNA 損傷レベルが増大すると予測した。結果として、LB 培地で培養し突然変異頻度を測定した際には  $\Delta mutMY$  株での突然変異頻度と有意な差は示されなかったが、低 pH 環境で増殖させた際には  $\Delta mutMY\Delta mstA$  株での突然変異頻度は  $\Delta mutMY$  株での変異頻度に比べ有意に上昇した。この結果から、低 pH 環境では細胞内遊離鉄イオン濃度が上昇している可能性が強く示唆された。この主張を補強するために補強するために、今後は MstA 以外の、 $H_2S$  供給源をさらに欠損させた際の突然変異頻度を測定する必要がある。また、その際

の細胞内  $H_2S$  レベルの低下を確認する必要がある。その他の供給源としては *tnaA*、*cysK*、*malY* を始めとする 7 種類のタンパク質が知られている [75、76]。さらに、MstA を介した  $H_2S$  生成には、CysB によって制御されている L-シスチン /L-システイントランスポーター TcyP が重要な役割を果たしていることが報告されている。低 pH 環境において L-システインの利用および  $H_2S$  媒介による遊離鉄の隔離が酸化ストレス保護に関与していることが示唆される。

### 低 pH 環境における酸化 DNA 損傷発生促進のモデル図

本研究における遺伝的解析及び鉄キレート剤である 2,2'-Bipyridyl を用いた実験から、低 pH 環境で増殖すると細胞内の遊離鉄イオン濃度が上昇し、酸化 DNA 損傷発生が促進されたことが示唆された。それでは低 pH 環境ではどのような機構で細胞内鉄イオン濃度が上昇しているのだろうか？

前述したように、低 pH 環境では細胞質内にリークするプロトンを排出ために、呼吸鎖の電子伝達系に関与する遺伝子群転写が促進されていることが知られている。シトクロム bo 末端酸化酵素をはじめとする呼吸鎖のタンパク質は電子伝達の役割を担うため Fe-S タンパク質となっている。故に、低 pH では細胞内で必要な Fe-S タンパク質の分子数が増加した可能性が考えられる。また、細胞内膜近傍では酸素呼吸の過程で稀に生じる活性酸素が産生されて呼吸鎖タンパク質の損傷に関与している可能性がある。また、低 pH 環境では TCA 回路に関与する遺伝子群の転写も促進されていることから、細胞内の NADH 濃度が増加している可能性がある。先行研究において NADH は細胞内にて  $Fe^{3+}$  を  $Fe^{2+}$  に還元する役割を担っている可能性があることが報告されており、低 pH 環境において、 $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$  の反応速度が増加した結果、フェントン反応が生じる頻度も増加した可能性が考えられる (図 21)。

さらに、ヒドロキシラジカルのその反応性の高さから、DNA が酸化損傷を受けるにはヒドロキシラジカルが DNA 近傍で生成される必要があると考えられている。先行研究において  $Fe^{2+}$  が DNA 鎖と直接結合すること、特に RGGG 配列 (R は任意の塩基) のグアニンに隣接するグアニンの N の位置に結合しやすいという報告がなされている [83]。このことから、低 pH 環境において細胞内の遊離  $Fe^{2+}$  濃度が増加し DNA 近傍でヒドロキシラジカルが発生しやすい状況になったことが推察される。。

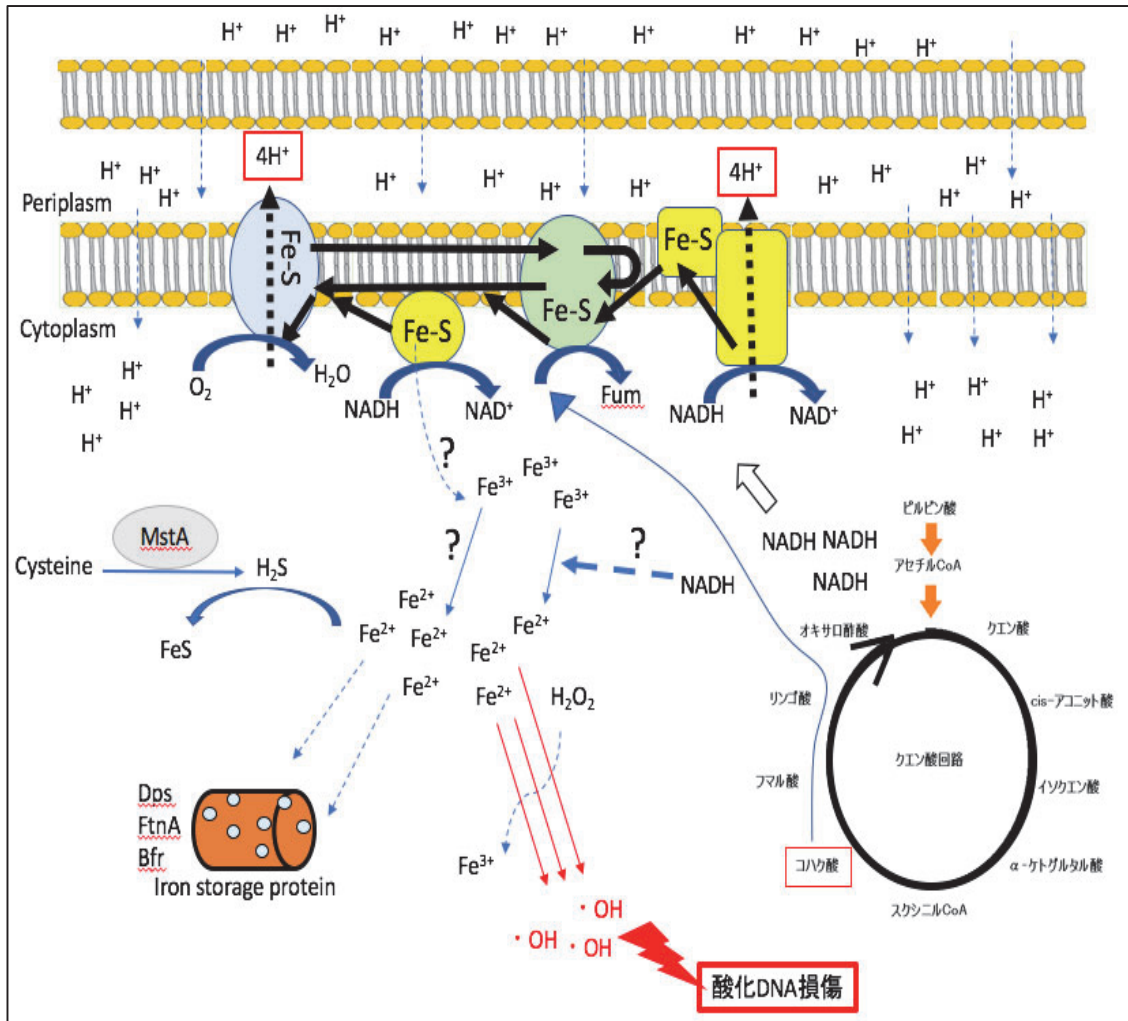


図. 21 低 pH 環境下における酸化 DNA 損傷誘発仮説モデル

細胞内遊離  $\text{Fe}^{2+}$ が増加している場合、その原因については2点考えられる。1点目は低 pH 環境において細胞内で必要とする鉄の量が増加している可能性。低 pH 環境では細胞内へのプロトンリークに常にさらされており、先行研究から呼吸鎖に関与する遺伝子群の発現が上昇していることから細胞外へのプロトン排出に大きく寄与していると推察されている。これら呼吸鎖のタンパク質は鉄硫黄タンパク質であることから、結果として細胞自体が必要とする鉄イオン濃度が上昇している可能性が考えられる、または低 pH 環境であるペリプラズム領域によって内膜に局在する鉄硫黄タンパク質が損傷を受けやすい状態になっており、その結果細胞内にリークする鉄イオン濃度が上昇したことによる遊離鉄イオン濃度の上昇が考えられる。2点目は  $\text{Fe}^{3+}$ から  $\text{Fe}^{2+}$ への還元反応が促進されている可能性。先行研究により低 pH 環境では TCA サイクルに関与する遺伝子群の発現が上昇していることが報告されていることから細胞内の NADH レベルが上昇し、NADH が  $\text{Fe}^{3+}$ から  $\text{Fe}^{2+}$ への還元反応を促進している可能性が考えられる。その結果、細胞内遊離  $\text{Fe}^{2+}$ 濃度が増加し細胞内で発生するヒドロキシラジカル及び酸化 DNA 損傷レベルが増加した可能性が考えられる

## Fe<sup>2+</sup>輸送が酸化 DNA 損傷レベルに与える影響

通常鉄イオンは酸素存在下では瞬時に酸化され Fe<sup>3+</sup>の状態が存在し、不溶化されている。そのため、鉄イオン単体を直接取り込むことができず TonB を介した鉄輸送が行われる。大腸菌には tonB を介した鉄輸送以外に、Fe<sup>2+</sup>を特異的に細胞内に取り込む輸送体を保持している。主な Fe<sup>2+</sup>の輸送体としては、FeoAB 複合体[77]と MntH[78]が報告されている。前者は嫌気環境下において Fe<sup>2+</sup>を細胞内に取り込みむ。後者は 2 価の金属の輸送体として知られている *Nramp* ファミリーに属しており Mn<sup>2+</sup>との親和性が高い。Fe<sup>2+</sup>との親和性は Mn<sup>2+</sup>との親和性と比較すると低いが、OxyR によって発現誘導されることが知られており、酸化ストレス応答との関連性も報告されている。また、ペリプラズム領域に存在する鉄イオン濃度については明らかではなく、低 pH 環境下においては Fe<sup>3+</sup>が還元物質により Fe<sup>2+</sup>に還元され、Fe<sup>2+</sup>輸送体により取り込まれている可能性も考えられる。そこで、*feoABC* 欠損、*mntH* 欠損株の *rpoB* 突然変異頻度を各々測定した。その結果、突然変異頻度が抑制されることはなく、有意に増加した (図 22)。この結果から、FeoABC を介して細胞内へ輸送された Fe<sup>2+</sup>はヒドロキシラジカルの発生源になる可能性が低いことが示唆された。また、細胞内において Mn が酸化 DNA 損傷の発生抑制に寄与していることが示唆された。

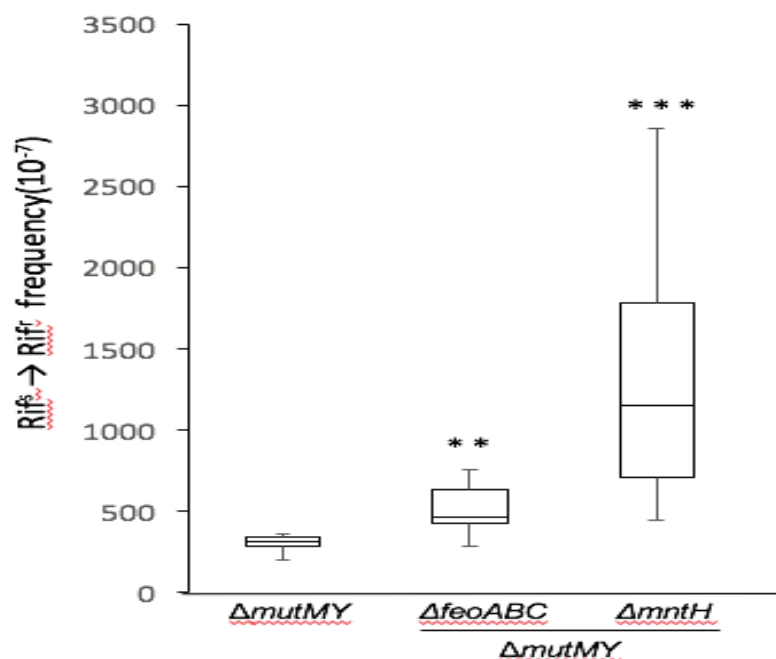


図. 22. Fe<sup>2+</sup>輸送体欠損が突然変異頻度に与える影響

*ΔmutMY* 株、*ΔmutMY ΔfeoABC* 株、*ΔmutMY ΔmntH* を LB pH4.5 の環境下で増殖させ *rpoB* 突然変異頻度を測定した。*ΔmutMY* 株においては独立した 20 回の、その他の菌株は独立した 10 回の実験結果より中央値及びデータの 50% を占める分布を示した。\*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001

## 膜ストレスと酸素ラジカル発生の関係について

前述したように、pH4.5では大腸菌は増殖可能であり細胞質内のpHも中性に維持されていると考えられる。一方、ペリプラズム領域においては細胞外環境のpHに大きく依存することが報告されている。そのため、ペリプラズム領域は酸性となり、ペリプラズムに局在するタンパク質や膜タンパク質が変性される可能性が高くなることが推察される。

近年、細菌にヒドロキシウレアや抗生物質を処理した際に引き起こされる細胞死の原因は、呼吸鎖の電子伝達系を含む膜ストレスにより細胞内酸素ラジカルレベルの増加であることが複数の研究グループから提唱されている。それらの研究の中で、膜タンパクの恒常性を保つための成分制御系のセンサーであるCpxAや、シトクロムbd末端酸化酵素の1サブユニットをコードするCydBが細胞死を誘発させる酸素ラジカル発生に関与していると考えられている。実際に*cpxA*変異株や、*cydB*変異株ではHUや抗生物質処理に耐性を示し、細胞内酸素ラジカルレベルも低下することが報告されている[79, 80, ]。

そこで、ペリプラズム領域が酸性に傾くことによって内膜に局在する膜タンパク質が変性・損傷を受ける頻度が高くなった結果、膜ストレスが増加し細胞内の酸素ラジカルレベルの増加を誘発させたのではないかと予測した。低pH環境下で $\Delta cpxA \Delta mutMY$ 株と $\Delta cydAB \Delta mutMY$ 株を各々増殖させ*rpoB*突然変異頻度を測定した。その結果、突然変異頻度が $\Delta mutMY$ 株より低下することはなかった(図. 22)。この結果から、低pH環境で誘発された酸素ラジカルレベルの増加は、抗生物質処理で増加する機構とは異なることが示された。CpxAやCydBは細胞死が誘発させる状態の時のみに酸素ラジカルによる細胞死を誘発させている可能性が考えられる。



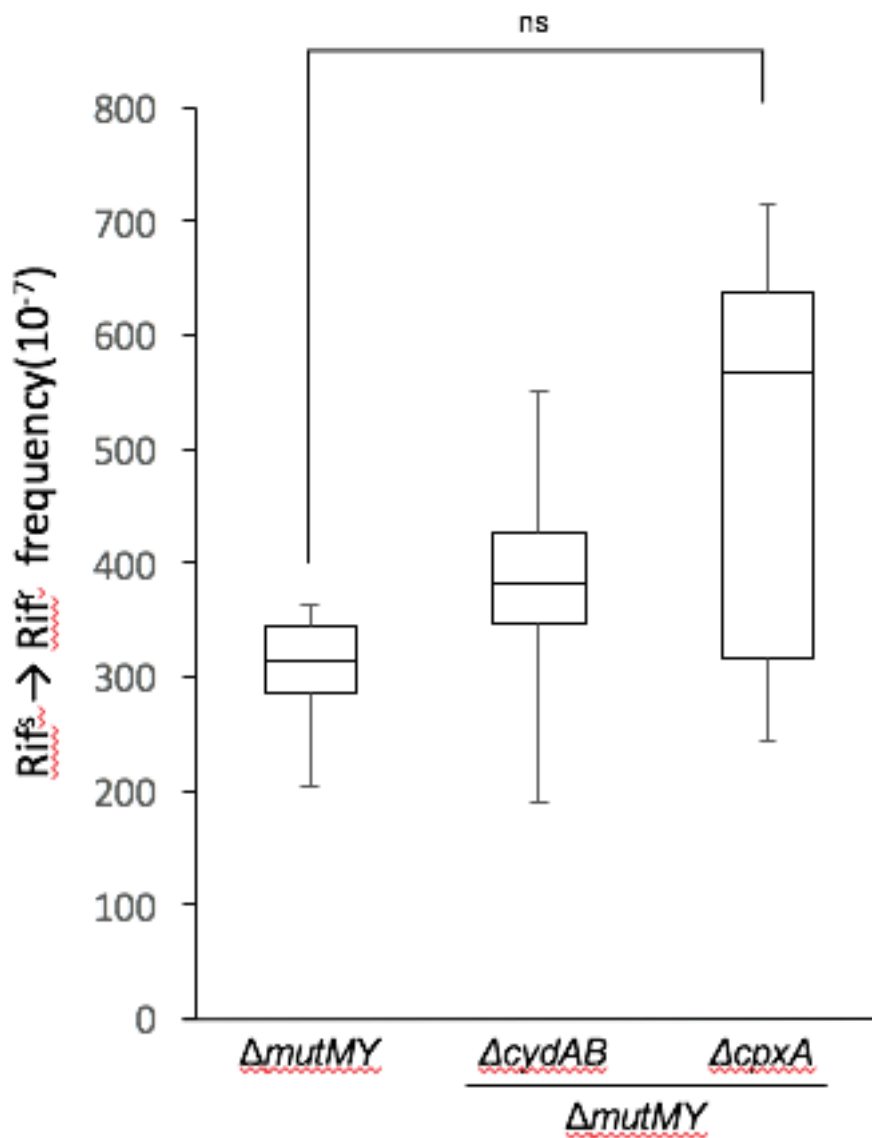


図. 23. 膜ストレス管理に関与する遺伝子欠損が突然変異頻度に与える影響

$\Delta mutMY$  株、 $\Delta mutMY \Delta cydAB$  株、 $\Delta mutMY \Delta cpxA$  株を LB pH4.5 の環境下で増殖させ *rpoB* 突然変異頻度を測定した。 $\Delta mutMY$  株においては独立した 20 回の、その他の菌株は独立した 10 回の実験結果より中央値及びデータの 50 % を占める分布を示した。

## 5. 今後の展望

### 1 細胞内遊離 $\text{Fe}^{2+}$ 濃度を上昇させるメカニズムについて検討

$\text{Fe}^{2+}$ と過酸化水素が反応することで生じるヒドロキシラジカルだが、細胞内において遊離の  $\text{Fe}^{2+}$ がどのような機構を介して生成されているのか、詳しく解明されていない。In vitro において、 $\text{Fe}^{3+}$ の還元剤としてスーパーオキシドが還元能を有していることが示されていた[27]。しかし、生理条件下の細胞内のスーパーオキシド濃度は極めて低い濃度に抑えられていることと、当研究室の上船の実験から SOD が欠損していない細胞ではスーパーオキシドがヒドロキシラジカル発生を促進させていることは考え難い。

細胞内に存在する濃度を考慮した場合、 $\text{Fe}^{3+}$ を還元させる候補物質としてはチオール、 $\alpha$ -ケト酸、NAD(P)H や FADH<sub>2</sub> が考えられている[81]。しかし、どの物質が優先的に  $\text{Fe}^{3+}$ の  $\text{Fe}^{2+}$ への還元作用しているのか未だに明らかにされていない。また、低 pH 環境での増殖によって上記物質の細胞内濃度変化が起きているかどうかにおいても不明である。そのため、今後の方針として、低 pH 環境下において  $\text{Fe}^{3+}$ を  $\text{Fe}^{2+}$ に還元する主要な物質をメタボローム解析による包括的解析手法により明らかにする必要がある。

### 2 プロトンと対向輸送する可能性がある新規鉄輸送体の探索

本研究の図. 15 の結果において、低 pH 環境で増殖した *tonB* 欠損株の突然変異頻度は、 $\Delta mutMY$  欠損株を LB 培地で増殖した際の突然変異頻度と比較すると依然として高い値を示している。このことから、低 pH 環境により誘発される酸化 DNA 損傷は *tonB* 依存的な鉄輸送が増強されたのみならず、*tonB* 非依存的な経路により細胞内鉄イオンが上昇したと考えられる。

*tonB* を介した鉄輸送にはプロトン駆動力を必要とする。そのため、鉄を細胞質内に取り込むにはプロトンも同時に取り込む必要がある。低 pH 環境応答が発達している大腸菌において、鉄輸送体としては鉄とプロトンが対向輸送される輸送体が理想ではあるが現在までにその候補となり得る輸送体について見出されていない。

### 3 低 pH 環境における染色体 DNA の空間配置について

近年大腸菌において、酸ストレスに応答する大腸菌の EnvZ / OmpR 二成分制御系の OmpR タンパク質が酸性環境下では内膜の近くに密接に局在することが観察された[82]。また、OmpR のみならず DNA と内膜との間にも空間的相関があることが観察された。この報告は、低 pH 環境によりゲノム DNA の空間的配置が変化したことを示唆している。

また、ラットの正常腎皮質組織におけるゲノム全体での 8-oxoG の分布を解析した先行研究によると、ゲノム DNA の核内空間的配置と 8-oxoG の存在頻度に相関性があることが示され、特に核周縁に配置されるゲノム DNA が酸化損傷を受けやすいことが報告された[32]。このことから、酸化ストレスから DNA を保護するには染色体 DNA の空間的位置も重要であることが見出された。

これらの先行研究結果から、大腸菌細胞が低 pH ストレスに応答するために染色体 DNA の細胞内空間配置を内膜側に変化させ、内膜に近接する染色体 DNA が酸化損傷を受けやすくなった可能性について今後議論する必要があると考える。そこで今後の展望として、異なる細胞外 pH 環境ではゲノム DNA 上に生じる酸化 DNA 損傷の分布に変化に違いがあるかどうか検証する。

## 付録

表. S1. 増殖環境の違いにより生じる増殖時間の差と突然変異頻度に与える影響

培地	LB aerobic	LB hypoxia	LB pH4.5	LB pH9.0	M9 Glc (最少培地)
増殖時間(h)	14	50	24	17	42
突然変異頻度 ( $10^{-6}$ ) ( $\Delta mutMY$ )	1.7	22	33	2.1	10
由来	本研究	上船(2016)	本研究	本研究	中村(2006)

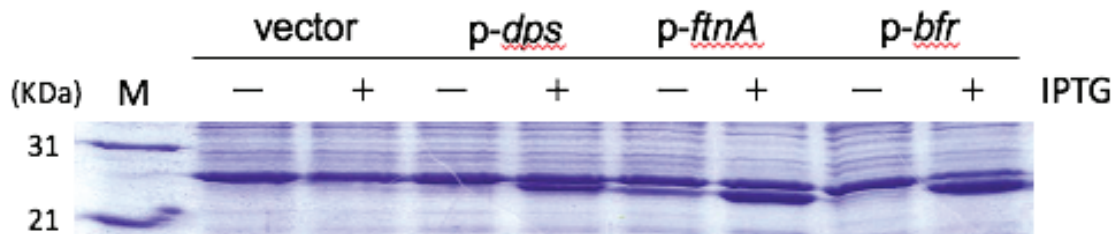


図. S1. SDS-PAGE によるタンパク質発現確認。

*dps*、*ftnA*、*bfr* 配列含有のプラスミド pCA24N は IPTG により発現誘導される。0.1 mM IPTG 含有固体培地で培養した細胞をサンプルとして使用した。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、丁寧なご指導ならび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致します。本研究を通して私自身が成長するための機会や助言いただいたことにも深く感謝致します。また、秋山昌広准教授、古郡麻子助教授には研究生活でのご指導や助言をして頂いただけでなく、研究環境の整備にも尽力して頂いたことに深く感謝致します。本論文を執筆するに至るまで、アドバイザーである高木博史教授、木俣行雄准教授には貴重な助言をして頂きましたことを感謝致します。研究室の皆様には本学での学生生活の中で公私共々に様々なご協力を頂き、特に当研究室卒業生である布瀬翔平氏には心より御礼申し上げます。最後に、本学での5年間の生活を経済的にも精神的にも支えてくださった両親や家族の皆様には感謝致します。

## 参考文献

[1] Bruce, A., Alexander, J., Julian, L., Martin, R., Keith, R., Peter, W. (2008). *Molecular biology of the Cell* 5th edition. (Garland Publishing Inc) pp.271-1029.

[2] Drake, J.W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 88 (16), 7160-7164.

[3] Wielgoss, S., Barrick, J.E., Tenaillon, O., Cruveiller, S., Chané-Woon-Ming, B., Médigue, C., Lenski, R.E., Schneider, D. (2011). Mutation rate inferred from synonymous substitutions in a long-term evolution experiment with *Escherichia coli*. *G3*, 1(3), 183-186.

[4] Zhu YO, Siegal ML, Hall DW, Petrov DA. (2014). Precise estimates of mutation rate and spectrum in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 111(22), 2310-2318.

[5] Lee H, Popodi E, Tang H, Foster PL. (2012). Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 109(41), 2774-2783.

[6] Keightley P.D., Ness, R.W., Halligan, D.L., Haddrill. P.R., (2014). Estimation of the spontaneous mutation rate per nucleotide site in a *Drosophila melanogaster* full-sib family. *Genetics* , 196(1), 313-320.

[7] Conrad, D.F., Keebler, JEM, DePristo MA, Lindsay SJ, Zhang Y, Cassals F., Idaghdour, Y., Hartl, C.L., Torroja, C., Garimella, K.V., et al. (2011). Variation in genome-wide mutation rates within and between human families. *Nature Genetics*, 43(7), 712-714.

- [8] Uchimura A, Higuchi M, Minakuchi Y, Ohno M, Toyoda A, Fujiyama A, Miura I, Wakana S, Nishino J, Yagi T. (2015). Germline mutation rates and the long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice. *Genome Research.*, 25(8), 1125-1134.
- [9] Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.
- [10] 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.
- [11] Shewaramani, S., Finn, T.J., Leahy, S.C., Kassen. R., Rainey., P.B, Moon, C.D. (2017). Anaerobically Grown *Escherichia coli* Has an Enhanced Mutation Rate and Distinct Mutational Spectra. *PLOS Genetics* 13(1), e1006570
- [12] Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu. M., Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB JOURNAL* , 17(10), 1195-1214
- [13] Kasai, H., Hayami, H., Yamaizumi, Z., Saito, H., & Nishimura, S. (1984). Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives. *Nucleic acids research*, 12(4), 2127-2136.
- [14] Maki H. (2002) Origins of spontaneous mutations : specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutageneses. *Annual Review Genetics.* 36, 279-303.
- [15] 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, 7022-7025



[16] 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, 4690-4694

[17] Cox, M.M., (2001). Recombinational DNA Repair of Damaged Replication Forks in *Escherichia coli*: Questions. *Annual review of genetics*, 35, 53-82.

[18] Amundsen, S.K. & Smith, G.R., 2003. Interchangeable parts of the *Escherichia coli* recombination machinery. *Cell*, 112(6), 741-744

[19] Cox, M.M., 2002. The nonmutagenic repair of broken replication forks via recombination. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 510(1-2), 107-120. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510702002567>.

[20] Lindsley, J.E. & Cox, M.M., 1990. Assembly and disassembly of recA protein filaments occur at opposite filament ends. Relationship to DNA strand exchange. *Journal of Biological Chemistry*, 265(16), 9043-9054.

[21] Kanie, S. et al., 2007. Roles of RecA protein in spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*. *Genes & genetic systems*, 82, pp.99-108.

[22] Modesti, M. & Kanaar, R., 2001. Homologous recombination: from model organisms to human disease. *Genome biology*, 2, p.REVIEWS1014.

[23] Le Thi Lan Anh (2017). Involvement of oxidative DNA damage and its repair mechanisms in spontaneous chromosomal rearrangements. 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

- [24] Ohno M, Miura T, Furuichi M, Tominaga Y, Tsuchimoto D, Sakumi K and Nakabeppu Y. (2006) A genome-wide distribution of 8-oxoguanine correlates with the preferred regions for recombination and single nucleotide polymorphism in the human genome. *Genome Res.* 16 , 567-575.
- [25] A, Carlioz and D, Touati. (1986) Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *The EMBO Journal* 5, 623-630.
- [26] AS Gort, DM Ferber, JA Imlay. (1999) The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 32, 171-191.
- [27] Amábile-Cuevas CF, Demple B. (1991). Molecular characterization of the soxRS genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Research.* 19, 4479- 84
- [28] M. Zheng, F. Åslund, G. Storz. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation *Science*, 279 , 1718-1721
- [29] Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A., Storz G. (2001). DNA Microarray-Mediated Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Response to Hydrogen Peroxide. *Journal of Bacteriology*, 183(15), 4562-4570
- [30] Imlay, J. A., Linn, S. (1987). Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, 169(7), 2967-2976.
- [31] Gonzalez-Flecha, B., Demple, B. (1997). Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179(2), 382-388.

- [32] 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.
- [33] The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. (2013). *Nature review microbiology* , 11(7), 443–454
- [34] James A. Imlay. (2003) . Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology*, 57, 395–418
- [35] McHugh, J.P., Rodríguez-Quinoñes, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D.A., Poole, R.K., Cooper, C.E., Andrews, S.C., (2003). Global Iron-dependent Gene Regulation in *Escherichia coli*. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 278(32), 29478–29486
- [36] Nunoshiba, T., Obata, F., Boss, A.C., Oikawa, S., Mori, T., Kawanishi, S., Yamamoto, K. (1999) . Role of Iron and Superoxide for Generation of Hydroxyl Radical, Oxidative DNA Lesions, and Mutagenesis in *Escherichia coli*. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 274, 34832–34837
- [37] Köster, W., (2001). ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Research in Microbiology*, 152(3–4) , 291–301.
- [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] Hudson, A.J., Andrews, S.C., Hawkins, C., Williams, J.M., Izuhara, M., Meldrum, F.C., Mann, S., Harrison, P.M., Guest, J.R., (1994). Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin. *European Journal of Biochemistry*, 218(3), 985–995

- [40] Andrews, S.C., Harrison, P.M., Guest, J.R., (1989). Cloning, sequencing, and mapping of the bacterioferritin gene (bfr) of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 171(7), 3940-3947
- [41] Almirón, M., Link, A.J., Furlong, D., Kolter, R., (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes & Development*, 12, 2646-2654
- [42] Zhao, G.H., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T.M., Chiancone, E. and Chasteen, N.D. (2002). Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells - A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 277, 27689-27696.
- [43] Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*:  $\sigma^S$ -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of Bacteriology*, 187(5), 1591-603
- [44] 上船晴香 (2016) 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 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
- [45] 中村葵 (2006) 自然突然変異の発生におよぼす生育環境要因の影響 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
- [46] 布瀬翔平(2014) 大腸菌の生育温度が与える突然変異への影響 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
- [47] 坂井 亜紀子(2002) 自然突然変異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修士論文
- [48] 岸 千瑛(2013) 活性酸素による突然変異誘発を抑制する化学物質を鋭敏に検出できる実験系の構築 , 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

- [49] Park, S., You, X., Imlay, J.A., (2005). Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx<sup>-</sup> mutants of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(26), 9317–9322
- [50] Kirill, A. Datsenko and Barry, L. Wanner. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640–6645.
- [51] Nakayashiki T., Mori H. (2013). Genome-wide screening with hydroxyurea reveals a link between nonessential ribosomal proteins and reactive oxygen species production. *Journal of Bacteriology*, 195(6), 1226–1235
- [52] Kitagawa M, Ara T, Arifuzzaman M, Ioka-Nakamichi T, Inamoto E, Toyonaga H, Mori H. (2005). Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Research*, 12(5), 291–299
- [53] Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., 3rd, Smith, H.O., (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345.
- [54] Garibyan L, Huang T, Kim M, Wolff E, Nguyen A, Nguyen T, Diep A, Hu K, Iverson A, Yang H and Miller JH. (2003) Use of the *rpoB* gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. *DNA Repair* 2, 593-608
- [55] A.R. Timms, H. Steingrimsdottir., A.R. Lehmann., B.A. Bridges(1992). Mutant sequences in the *rpsL* gene of *Escherichia coli* B/r: mechanistic implications for spontaneous and ultraviolet light mutagenesis. *Molecular & General Genetics*, 232(1), 89-96.

- [56] Janne M. Toivonen., Martin R. Boocock and Howard, T. Jacobs. (1999). Modelling in *Escherichia coli* of mutations in mitoribosomal protein S12: novel mutant phenotypes of rpsL. *Molecular Microbiology*, 31(6), 1735-1746.
- [57] 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.
- [58] Xu, L. and Fidler, I.J. (2000). Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Research*, 60, 4610-4616.
- [59] Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed, B. and Jain, R. K. (2001). Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Research*, 61, 6020-6024.
- [60] Wang, D., Calla, B., Vimolmangkang, S., Wu, X., Korban, S.S., Huber, S.C., Clough, S.J., Zhao, Y. (2005) . pH Regulates Genes for Flagellar Motility, Catabolism, and Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12 †. *Journal of Bacteriology*, 187(1), 304-319
- [61] Mironov, A., Seregina, T., Nagornykh, M., Luhachack, L.G., Korolkova, N., Lopes, L.E., Kotova, V., Zavilgelsky, G., Shakulov, R., Shatalin, K., Nudler, E. (2017). Mechanism of H<sub>2</sub>S-mediated protection against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(23), 6022-6027

- [62] Vilch eze, C., Hartman, T., Weinrick, B., Jacobs, W.R. Jr. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction. Nature Communications 4, 1881
- [63] Pomposiello, P., M. H. J. Bennik, and B. Dimple. 2001 . Genome-wide transcriptional profiling of *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. Journal of Bacteriology, 183(13), 3890-3920.
- [64] Jeong, K.C., Hung, K.F., Baumber, D.J., Byrd, J.J., Kaspar, C.W. (2008). Acid stress damage of DNA is prevented by Dps binding in *Escherichia coli* O157:H7. BMC Microbiology, doi: 10.1186/1471-2180-8-181
- [65] Lindahl T, Nyberg B: Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. Biochemistry. 1972, 11: 3610-3618. 10.1021/bi00769a018.
- [66] Slonczewski, J.L., Fujisawa, M., Dopson, M., Krulwich, T.A. (2009). Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. Advances in Microbial Physiology, 55:1-79
- [67] Wilks JC, Slonczewski JL. 2007. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *J. Bacteriol.* 189:5601-7
- [68] Ishihama Y, Schmidt T, Rappsilber J, Mann M, Hartl FU, Kerner MJ, Frishman D. (2008). Protein abundance profiling of the *Escherichia coli* cytosol. BMC Genomics, 9:102
- [69] Slonczewski JL, Fujisawa M, Dopson M, Krulwich TA. (2009). Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. Advances in Microbial Physiology, 55:1-79

[70] Gardner, P.R., Fridovich, I. (1991). Superoxide Sensitivity of the *Escherichia coli* 6-Phosphogluconate Dehydratase. The Journal of Biological Chemistry, 266(3):1478-83.

[71] A. Carlioz, D, Touati. (1986). Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? EMBO Journal, 5 , 623-630

[72] 藤本由布(2013) 活性酸素スーパーオキシドにより誘発される突然変異への短鎖アルデヒドの関与, 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

[73] Woodmansee AN, Imlay JA (2002). Quantitation of intracellular free iron by electron paramagnetic resonance spectroscopy. Methods in Enzymology, 349:3-9.

[74] Ito F, Nishiyama T, Shi L, Mori M, Hirayama T, Nagasawa H, Yasui H, Toyokuni S. (2016). Contrasting intra- and extracellular distribution of catalytic ferrous iron in ovalbumin-induced peritonitis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 476(4):600-606

[75] Shatalin, K., Shatalina, E., Mironov, A., Nudler, E. (2011) H<sub>2</sub>S: A universal defense against antibiotics in bacteria. Science 334:986-990

[76] Awano N., Wada M., Mori H., Nakamori S., Takagi H. (2005) Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulfhydrases. Appl. Environ. Microbiol., 71, 4149-4152.

[77] S Dukan and D Touati. (1996). Hypochlorous Acid Stress in *Escherichia coli*: Resistance, DNA Damage, and Comparison with Hydrogen Peroxide Stress. Journal of Bacteriology 178, 6145-6150



- [78] D Touati, M Jacques, B Tardat, L Bouchard, and S Despied. (1995) Lethal Oxidative Damage and Mutagenesis Are Generated by Iron in *fur* Mutants of *Escherichia coli*: Protective Role of Superoxide Dismutase. *Journal of Bacteriology*. 177, 2305-2314
- [79] Kammler, M., Schön, C., Hantke, K. (1991). Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 75(19):6212-9.
- [80] Makui, H., Roig, E., Cole, S.T., Helmann, J.D., Gros, P., Cellier, M.F. (2000). Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Molecular Microbiology*, 35(5):1065-1078.
- [81] Davies, B.W., Kohanski, M.A., Simmons, L.A., Winkler, J.A., Collins, J.J., Walker, G.C. (2009). Hydroxyurea Induces Hydroxyl Radical-Mediated Cell Death in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*, 36(5):845-860
- [82] Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Wierzbowski, J., Cottarel, G., Collins, J.J. (2008). Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*, 135(4):679-690
- [83] JAMES A. IMLAY AND STUART LINN. (1988) DNA Damage and Oxygen Radical Toxicity. *Science*, 240(4857):1302-1309.
- [84] Foo, Y.H., Spahn, C., Zhang, H., Heilemann, M., Kenney, L.J. (2015). Single cell super-resolution imaging of *E. coli* OmpR during environmental stress. *Integrative Biology*, 7(10):1297-1308
- [85] 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.