

## 論文内容の要旨

申請者氏名 宮原 亮太

申請者が所属する研究室では、自然突然変異を誘発する主要な酸化 DNA 損傷の 1 つであり、DNA 複製を阻害しない 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) 由来の塩基置換変異を全く抑制できない大腸菌 *mutM mutY* 欠損株を用いて、生育環境が酸化 DNA 損傷の発生に与える影響について解析が行われてきた。その中で、酸素濃度 0.1% から大気中の酸素濃度 21% (有酸素環境) へシフトした場合、*mutM mutY* 欠損株の 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 万倍上昇することが見出され、薬剤等を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ことが可能であることが示されていた。この実験系を利用し、アスコルビン酸の抗酸化能を評価することが試みられたが、アスコルビン酸は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という予想外の結果が得られていた。申請者は、この現象を詳細に解析した結果、酸化 DNA 損傷誘発の促進はアスコルビン酸そのものではなく、培地の低 pH 環境が原因であることを発見した。

*mutM mutY* 欠損株において培地 pH が低下するにつれて突然変異頻度が上昇し、pH4.5 で培養した細胞では、pH7.1 で培養した細胞に比べ突然変異頻度が 19 倍有意に上昇する。しかし、修復能が正常な野生型大腸菌では塩基置換変異の発生頻度は変化しない。そこで、塩基置換変異以外の遺伝的変化、特に相同組換えによる染色体再編を低 pH での酸化 DNA 損傷が誘発しているかどうかを *rpsL* 部分二倍体細胞を用いて検証した。その結果、低 pH 環境において、点突然変異頻度は変化しないが、相同組換え頻度は 3.2 倍に上昇することを見だし、低 pH 環境においては、相同組換えによる染色体再編などの大規模な遺伝的不安定性が誘発されることが示唆された。

酸化 DNA 損傷を誘発する活性酸素種はヒドロキシラジカルであることから、低 pH 環境では細胞内でヒドロキシラジカルの発生が昂進していると考えられる。ヒドロキシラジカルは過酸化水素と 2 価鉄イオンが反応することで生じる (Fenton 反応) ため、低 pH 環境での細胞内過酸化水素濃度を調べた結果、pH7.1 の培地で培養した細胞と比較して、ごくわずかな上昇しか見られなかった。また、培地に 0.2% グルコースを添加することにより細胞内過酸化水素濃度を約 20 倍上昇させても、低 pH での酸化 DNA 損傷レベルは変動しなかった。一方、細胞外からの鉄イオン輸送能が著しく損なわれる *tonB mutM mutY* 欠損株を低 pH 環境で培養した際の突然変異頻度は、*mutM mutY* 欠損株を低 pH 環境で培養した際の変異頻度の 1/2 に有意に低下することが分かった。培地に鉄キレート剤を添加した場合も同様であった。これらの結果から、低 pH 環境における酸化 DNA 損傷レベルの上昇は過酸化水素ではなく鉄イオンの関与が大きいことが明らかとなり、低 pH 環境では細胞内鉄イオン、特に遊離 2 価鉄イオンの濃度が上昇することが示唆された。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 宮原 亮太

本論文は、細胞外 pH が酸性になると細胞内の DNA に酸化 DNA 損傷が誘発されて遺伝的不安定性を引き起こすことを発見し、その分子機構について大腸菌を用いた分子遺伝学的解析を行ったものである。申請者が所属する研究室では、培地にアスコルビン酸を添加すると大腸菌細胞内で酸化 DNA 損傷が通常の好気培養で生じるレベルの 20 倍にも上昇することが見いだされていた。アスコルビン酸は抗酸化剤として知られていることから、申請者はアスコルビン酸が変異原性を有しているのかどうか、その分子機構はどのようなものかを明らかにすることに取り組んでいる。まず、申請者はアスコルビン酸の効果の濃度依存性から、アスコルビン酸添加による培地の pH 低下の可能性を考え、中和実験や塩酸と水酸化ナトリウムによる様々な pH での培養実験などを行い、アスコルビン酸自体に変異原性があるのではなく、培地の低 pH、特に pH5 以下の条件で酸化 DNA 損傷が高く誘発されることを発見した。また、大腸菌野生株では、低 pH 環境での増殖は点突然変異頻度には影響を与えないが、染色体異常を引き起こす自発的相同組換え頻度を約 3 倍に上昇させることを見いだしている。これは、特定の化学物質や電離放射線による遺伝的不安定性の誘発と異なり、通常生物が遭遇する機会が高い環境中の低 pH が遺伝的不安定性を引き起こすことを示したことから、生物進化や発がんプロセスを理解する上で重要な発見と考えられる。

さらに、この細胞外低 pH 環境がもたらす酸化 DNA 損傷の誘発について、ヒドロキシラジカルの発生の観点から研究を進めている。ヒドロキシラジカルは過酸化水素が遊離二価鉄イオンと反応して生じる。大腸菌細胞内での両者の濃度は極めて低いレベルに保たれているため、直接の濃度測定は困難である。申請者は、レポーターアッセイを用いる方法や鉄イオン制御に関わる変異株などを用いた研究により、細胞内過酸化水素濃度は低 pH 環境での酸化 DNA 損傷の誘導には関与しないが、細胞内遊離二価鉄イオンの濃度が上昇している可能性を示唆する結果を示し、低 pH 環境で増殖する大腸菌細胞内で遊離二価鉄イオンの濃度が上昇する機構についてのモデルを提唱している。特に、低 pH 環境においてプロトンのくみ出しが必要となり、そのために電子伝達系に関与する鉄含有タンパク質の発現が上昇することによる遊離二価鉄イオンの発生については今後の研究の作業仮説として重要な視点と認められる。

以上のように、本論文は遺伝的不安定性が細胞外の低 pH 環境により誘発することを発見したものであり、特に低 pH 環境では酸化 DNA 損傷が高頻度に発生し、自発的相同組換え頻度を上昇することを初めて明らかにした。また、生物が増殖する環境と遺伝的変化の相互作用について新たな知見をもたらしている。本研究の成果は遺伝学や進化学の基本的な概念の深化などの学術上、さらには発がん細胞微小環境の関係の解明などの応用上の点で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。