

論文内容の要旨

申請者氏名 Chang Phooi Yee

DNA 損傷などの DNA 複製を阻害する要因は DNA 複製ストレスと呼ばれて、染色体再編などの遺伝的変化を誘発したり、複製阻害が解消されない場合は細胞死を誘発すると考えられている。ヒドロキシウレア (HU) も dNTP の生合成を阻害して細胞内の dNTP プールを枯渇させるため、強い DNA 複製ストレスを引き起こすことが知られている。最近になり、HU が誘発する大腸菌の細胞死について、これまで考えられてきた HU の作用機序とは全く異なる分子機構が提唱された。HU による複製阻害が MazF トキシンを活性化し、その結果生じる異常タンパク質が膜ストレスセンサーである CpxA の活性化を促し、それが呼吸鎖の末端で働く膜タンパク質である CydAB の働きに影響を及ぼして、スーパーオキシドの過剰生産により生じる活性酸素種 (ROS) が細胞死を誘発するという仮説である。しかしながら、この仮説の主要な根拠である蛍光プローブを用いた ROS の測定結果についての疑義などから、仮説の妥当性は不明である。本研究では、増殖中の大腸菌を HU で処理した際に酸化 DNA 損傷の発生が誘導されるのかどうかを分子遺伝学的方法で検証し、もしそれが確認されれば、その分子機構を解明することを目的とした。

まず、大腸菌培養液に HU を添加した後、細胞死が誘発される 2 時間後のサンプルでの酸化 DNA 損傷および細胞内スーパーオキシドと H_2O_2 濃度を測定した。その結果、HU は酸化 DNA 損傷レベルを 4 倍程度、細胞内スーパーオキシドと H_2O_2 濃度を 2~3 倍程度に上昇させることが見いだされた。また、チオウレアを用いた解析から、HU 依存性の酸化 DNA 損傷と細胞死の誘発はヒドロキシラジカルによることが示された。しかし、過去の報告とは異なり、この HU 依存性の酸化 DNA 損傷の誘発は *mazF* 欠損株、*cpxA* 欠損株でも野生株と同様に生じ、HU による細胞死の誘発も全く影響を受けないことが分かった。一方、*cydAB* 欠損株では、HU 依存性の酸化 DNA 損傷および細胞死の誘発が完全に抑制されるが、HU 処理による細胞内スーパーオキシドと H_2O_2 濃度の上昇は全く抑制を受けないことが明らかになった。ビピリジンや細胞内遊離鉄イオン制御に関わる遺伝子の変異株を用いた解析結果もあわせて、HU は CydAB を介して細胞内遊離鉄イオンの濃度を上昇させてヒドロキシラジカルを発生させている可能性が考えられるが、細胞内鉄イオン濃度を測定するなどの直接の証拠が必要である。また、HU により誘発される酸化 DNA 損傷のレベルは細胞死を誘発するレベルの 1/1000 以下であることから、HU による細胞死の誘発は酸化 DNA 損傷に起因するものではないことも示唆された。DNA 複製装置の温度感受性変異株での解析から、複製装置の欠損による複製ストレスも酸化 DNA 損傷を誘発するが、CydAB には依存しないことが分かった。このことから、CydAB 依存性の酸化 DNA 損傷の誘発は HU に特異的であると結論された。HU 処理により、CydAB がどのようにして酸化 DNA 損傷を誘発させるかについては、今後の重要な研究課題と考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Chang Phooi Yee

本論文は、ヒドロキシウレア (HU) による細胞死の誘発機構に活性酸素種 (ROS) の過剰誘発が関与するという Collins らの仮説の検証を出発点として、HU が大腸菌細胞内で酸化 DNA 損傷を誘発することを明確に示し、その分子機構を解析したものである。Collins らの HU 細胞死の仮説は、殺菌性抗生物質の殺菌作用は細菌細胞内で活性酸素種 (ROS) が過剰発生することによるという Collins らの仮説を HU に拡張したものであるが、本研究の結論は、殺菌性抗生物質の殺菌機構の論争にも大きな影響を与えるものである。

申請者の研究結果は以下のように要約される。(1) HU 処理後の大腸菌細胞ではヒドロキシラジカルが誘発されて酸化 DNA 損傷が処理前の 4 倍程度に上昇する。(2) HU による細胞死もヒドロキシラジカルの誘発に依存する。(3) HU による酸化 DNA 損傷および細胞死の誘発には MazF および CpxA は関与しないが、CydAB に完全に依存する。(4) HU はスーパーオキシドと H_2O_2 の細胞内濃度をわずかに上昇させるが、これには CydAB は全く関与せず、スーパーオキシドと H_2O_2 の細胞内濃度の上昇は酸化 DNA 損傷と細胞死の誘発には関係しない。(5) HU 依存性の酸化 DNA 損傷と細胞死の誘発には CydAB とともに遊離鉄イオンが重要な役割を果たす。(6) DNA 複製装置の機能喪失も細胞内遊離鉄イオンが関与するヒドロキシラジカルの誘発を引き起こすが、それは酸化 DNA 損傷を誘発するが細胞死には関与しない。(7) DNA 複製装置の機能喪失によるヒドロキシラジカルの誘発には CydAB は全く関与しない。これらの研究結果は、Collins らの報告とかなりの部分で異なるが、HU が CydAB に依存してヒドロキシラジカルを誘発し、酸化 DNA 損傷を引き起こすことを明確に示す一方、酸化 DNA 損傷の誘発の程度は小さなものであり、細胞死を引き起こす程度をはるかに下回っていることから、ヒドロキシラジカルに依存し、酸化 DNA 損傷には依存しない細胞死の誘発機構の存在を示唆する。また、HU による CydAB 依存性のヒドロキシラジカルの誘発については、必ずしも複製ストレスが関与するかどうかは不明であることも今回の研究から浮かび上がってきた重要なポイントである。CydAB に HU が直接作用する可能性や、CydAB に含まれるヘムが酸化 DNA 損傷の誘発にどのような意味を持つのかについても今後の研究の重要な視点と認められる。

以上のように、本論文は HU および複製装置の機能欠損が細胞内遊離鉄イオンが関与する形でヒドロキシラジカルを誘発することに加えて、この過程に CydAB が HU 処理に特異的に関与することを発見したものである。本研究の成果は、酸化 DNA 損傷の発生機構についての理解の深化などの学術上、さらには抗がん剤としての HU の作用機序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。