

論文内容の要旨

申請者氏名 Yeo Adeline Syin Lian

好気呼吸をしながら増殖している細胞の中で生じる自然突然変異の主要な原因として、活性酸素種 (ROS) による酸化 DNA 損傷が同定されており、その発生レベルは自然突然変異の発生頻度の 1,000 倍以上高いことも知られている。酸化 DNA 損傷は細胞の中で DNA 修復により高い効率で取り除かれ、そのほとんどは突然変異の発生に至らない。これまで、酸化 DNA 損傷に対する DNA 修復の役割や機能については詳細な研究がなされているが、細胞内で酸化 DNA 損傷が発生するプロセスや、通常の細胞内で発生する ROS を分解・排除する仕組みの役割については不明な点が多い。一方、細胞外から高濃度の H_2O_2 が侵入する場合に、大腸菌においては OxyR タンパク質が H_2O_2 の濃度上昇を検知し、40 種程度の OxyR レギュロン遺伝子の発現を誘導あるいは抑制して、 H_2O_2 の殺菌効果に対する抵抗性を与えていることが知られている。申請者は、OxyR および OxyR レギュロン遺伝子の産物が通常の細胞で生じる酸化 DNA 損傷の発生にも抑制的に働いているのかどうかを明らかにするために研究を開始した。

まず、細胞内の酸化 DNA 損傷の発生レベルを容易にかつ正確に推定できる大腸菌 *mutM mutY* 欠損株の変異頻度測定の手法を用いて、 $\Delta oxyR$ 株では酸化 DNA 損傷の発生が顕著に上昇していることを見だし、OxyR が通常の細胞においても ROS による酸化 DNA 損傷の発生を抑制していることを明らかにした。次に、OxyR レギュロン遺伝子群の主要な機能既知遺伝子および機能未知遺伝子の欠損株を用いて、レギュロン内の遺伝子の酸化 DNA 損傷抑制に対する関与を解析した。その結果、細胞内遊離鉄イオンの制御に関わることが報告されていた *fur*、*dps*、*yaaA* 遺伝子が単独の欠損では酸化 DNA 損傷の発生の上昇は小さいが、*fur* と *dps* あるいは *dps* と *yaaA* の両方が欠損した場合には $\Delta oxyR$ 株が示す酸化 DNA 損傷の発生レベルまで大きく上昇することが分かった。これに対して、*fur* と *yaaA* の二重欠損株では、酸化 DNA 損傷の発生の上昇は小さいままであった。一方、 H_2O_2 の分解に働く *katG* の欠損株では、酸化 DNA 損傷の発生の上昇は顕著ではなかった。これらのことから、OxyR は遊離鉄イオン制御に関わる *fur*、*dps*、*yaaA* 遺伝子の発現を制御することにより、酸化 DNA 損傷の発生を強く抑制していることが示唆された。*fur* は鉄イオンの細胞への取り込みに関与する *tonB* の発現を抑制すること、また、*dps* は細胞内遊離鉄イオンを自身に取り込む鉄貯蔵タンパク質であることが知られている。一方、*yaaA* 遺伝子は遊離鉄イオン制御にどのように関与するのかは不明であったが、今回の結果より、*fur* と同じ経路で働くことが示唆された。*yaaA* 遺伝子は *tonB* 遺伝子の転写抑制には関与しないことが示されたことから、*yaaA* 遺伝子産物が直接 TonB タンパク質の活性制御に関与する可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Yeo Adeline Syin Lian

申請者が所属する研究室では、自然突然変異の原因として酸化 DNA 損傷の重要性を明らかにし、酸化 DNA 損傷に特異的な DNA 修復機構の遺伝学および生化学的解析を進めてきた。その過程で、酸化 DNA 損傷が発生する分子機構に関する知識が不足していること、特に細胞内での H_2O_2 の発生と消去の機構が重要な意味を持つと考えられているにもかかわらず、これに関して明快な研究成果は少ないことに気づいた。申請者は OxyR と OxyR レギュロン遺伝子群が酸化 DNA 損傷の発生や抑制にどのように関与しているのかに疑問を持ち、研究を開始している。OxyR および OxyR レギュロン遺伝子群については多くの研究がなされているが、その大部分は細胞が致死に至るレベルの高濃度 H_2O_2 がどのようにして OxyR レギュロン遺伝子群の発現制御を行うのかを研究したものであり、外部から H_2O_2 を与える場合の研究が大部分である。通常の細胞における OxyR レギュロン遺伝子群の役割についてはほとんど報告がない。申請者は、細胞内での酸化 DNA 損傷の発生頻度を簡便にかつ正確に定量できる実験法を用いて、 $\Delta oxyR$ 株では酸化 DNA 損傷の発生頻度が 10 倍以上に上昇していることを発見している。これは、 H_2O_2 に対する防御機構と考えられてきた OxyR レギュロンが通常の細胞において酸化 DNA 損傷の発生の抑制に働いていることを初めて示したものである。さらに、OxyR レギュロン遺伝子群の中でも遊離鉄イオンの制御に関与する *fur*、*dps*、*yaaA* の 3 つの遺伝子が酸化 DNA 損傷の抑制に中心的に働き、*fur* と *yaaA* は鉄イオンの取り込みの制御の経路を、*dps* は細胞内遊離鉄イオンを除去する経路をそれぞれ担っており、両方の経路が働くことによって遊離鉄イオンの細胞内濃度を極めて低いレベルに保っていることを示唆する結果を得ている。また、研究がほとんど進んでいない *yaaA* 遺伝子産物の機能の解明につながる知見も得ている。

以上のように、本論文は、細菌の H_2O_2 抵抗性の中心的役割を果たすと考えられてきた OxyR レギュロン遺伝子群が、細胞内 H_2O_2 濃度が極めて低い濃度 (20 nM 程度) に保たれている通常の環境で増殖している細胞においても酸化 DNA 損傷の発生を強く抑制する働きを持っていることを明らかにした。また、OxyR レギュロン遺伝子群の中の遊離鉄イオンの制御に関与する 3 つの遺伝子が酸化 DNA 損傷の抑制に関与していることを示した。*yaaA* 遺伝子が転写制御とは異なる仕組みで取り込み機構の活性制御を行っていることを示唆するデータは、Fur 経路による細胞内への鉄イオン取り込み制御に関する研究の大きな転換点となると思われる。本研究の成果は、酸化 DNA 損傷の発生機構の理解、酸化 DNA 損傷の抑制における鉄イオン制御の重要性の発見などの学術上、さらには鉄イオンの遺伝毒性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。