

論文内容の要旨

申請者氏名 Suzianti Binti Iskandar Vijaya

申請者が所属する研究室では、培地中の栄養や pH、酸素濃度などの通常の生育環境でも変化する生育因子が酸化 DNA 損傷の発生に大きな影響を与えることが発見され、その分子機構についての解析が行われてきた。一方、殺菌性の抗生物質が細菌の細胞内で活性酸素種 (ROS) の発生を誘導し、それが抗生物質の殺菌効果に関連しているとの報告があり、近致死濃度の殺菌性抗生物質存在下での培養では野生型大腸菌の自然突然変異頻度が上昇することが報告されている。しかしながら、これらの報告では蛍光プローブを用いた ROS の測定結果が主要な根拠となっており、この測定法の信憑性についての疑義が報告されていることなどから、殺菌性抗生物質の ROS 誘導およびその殺菌効果については現在も論争中である。本研究では、近致死濃度の殺菌性抗生物質が酸化 DNA 損傷の発生を誘導するの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。

上記の報告で用いられている 3 種の殺菌性抗生物質 ampicillin (AP, β -lactam)、norfloxacin (NF, fluoroquinolone)、gentamicin (GT, aminoglycoside) および静菌性抗生物質の最小阻害濃度 (MIC) を測定し、その半分の濃度 (1/2MIC) の抗生物質を添加した培地での培養における酸化 DNA 損傷および細胞内 H_2O_2 濃度を測定した。その結果、AP と NF は酸化 DNA 損傷レベルと細胞内 H_2O_2 濃度を顕著に上昇させるが、GT および静菌性抗生物質は未処理の場合と比べて変化は見られなかった。このことから、殺菌性抗生物質の全てではないが、その一部は近致死濃度で ROS の発生と酸化 DNA 損傷を誘導することが明らかになった。また、細胞内 H_2O_2 濃度と酸化 DNA 損傷レベルの関係を調べたところ、 H_2O_2 濃度が通常よりも 10 倍程度上昇する培養条件では AP および NF による酸化 DNA 損傷レベルが全く上昇しなかった。これに加えて、 H_2O_2 濃度と酸化 DNA 損傷の誘導における抗生物質の濃度依存性の違いから、 H_2O_2 濃度の上昇は AP と NF が酸化 DNA 損傷を誘導する原因ではないことが示唆された。さらに、チオウレアとビピリジンは AP および NF による酸化 DNA 損傷の誘発をほぼ完全に抑制したことから、これらの殺菌性抗生物質による酸化 DNA 損傷の誘発は細胞内遊離鉄イオンの上昇によるヒドロキシラジカルの発生が関与することが示唆された。鉄イオンの取り込み制御に関与する *yaaA* 遺伝子と遊離鉄イオンの除去と貯蔵に関与する *dps* 遺伝子の二重欠損株では AP および NF による酸化 DNA 損傷の誘発が相乗的に顕著に上昇すること、鉄の取り込みに中心的な役割を持つ *tonB* 遺伝子欠損株では AP および NF の酸化 DNA 損傷誘発が完全に抑制されることから、AP および NF が TonB タンパク質を含む鉄取り込み装置に何らかの影響を及ぼして細胞内遊離鉄イオンの濃度上昇を引き起こした可能性が考えられる。これについては、細胞内遊離鉄イオンの直接的な測定など、今後の研究による検証が必要である。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Suzianti Binti Iskandar Vijaya

本論文は、現在盛んに論争が行われている「殺菌性抗生物質の殺菌作用は細菌細胞内で ROS の発生を誘導することによる」という Collins らによるセンセーショナルな仮説を出発点にして、大腸菌の増殖には影響を及ぼさない近致死濃度での殺菌性抗生物質が大腸菌細胞内で酸化 DNA 損傷を引き起こすのかどうかを検証することを目的に研究を開始している。殺菌性抗菌物質が種類を問わず ROS を誘導するという過去の報告とは異なり、実験に用いた 3 種類の殺菌性抗菌物質のうち、ampicillin (AP) と norfloxacin (NF) は近致死濃度でも細胞内 H_2O_2 と酸化 DNA 損傷を誘導するが、gentamicin はそのような効果を示さないことを明らかにしている。細胞内 H_2O_2 の発生誘導に関しては、高濃度の抗生物質を用いた場合も同様であった。さらに、酸化 DNA 損傷の誘発に関しては、抗生物質の濃度に比例して生じてはおらず、近致死濃度での誘発効果が最も高く、それ以上の濃度では更なる上昇が見られることはなかった。また、AP と NF による酸化 DNA 損傷の発生レベルは細胞増殖に全く影響を及ぼさない範囲であることから、これら二つの殺菌性抗生物質の殺菌効果には酸化 DNA 損傷は全く関与していないことが強く示唆されている。以上のことから、Collins らの仮説の根拠となっている実験結果の少なくとも一部は再現できないことに加え、ROS と殺菌効果の関係を解明するには更なる検証を注意深く行うことが必要であると考えられる。

さらに、この近致死濃度の AP および NF による酸化 DNA 損傷誘発の分子機構の解明を進め、まず細胞内 H_2O_2 濃度のわずかな上昇は酸化 DNA 損傷の誘発とは関係がないことを示している。また、鉄キレート剤を用いた解析および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実験から、AP および NF による酸化 DNA 損傷誘発には細胞内遊離鉄イオン濃度の上昇が関与することを示唆する結果を得ている。さらに、AP および NF の効果が TonB タンパク質が関与する鉄イオン取り込み装置に依存することを示し、AP および NF が鉄イオン取り込み装置の働きを活性化して細胞内遊離鉄イオンの濃度を上昇させる可能性については、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、本論文は殺菌性抗生物質が低濃度で細菌細胞内の酸化 DNA 損傷を誘発することを発見したものであり、その誘発の程度は野生型大腸菌においては塩基置換変異の頻度を上昇させるものではないが、自発的相同組換え頻度を上昇させるには十分であり、染色体再編などによる細菌の遺伝的変化が生じうることを初めて明らかにしている。本研究の成果は殺菌性抗生物質の作用機序の新しい観点を提示するなどの学術上、さらには殺菌性抗菌物質の低濃度での変異誘発能の問題点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。