

## 論 文 要 旨

**Oxygen induces mutation in a strict anaerobe, *Prevotella melaninogenica***

〔 酸素による遺伝子変異の誘発 〕

内 匠 正 太

## 【序論および目的】

生物は様々な環境要因や化学物質に絶えず曝されており、紫外線、放射線、化学物質等によって生体内に活性酸素種が発生することが知られている。また、大気中に存在する酸素も細胞内代謝過程により活性酸素種に変換されることが報告されている。活性酸素種はその高い反応性から、DNA や RNA、タンパク質といった生体内分子と反応し、DNA 損傷、遺伝子変異、発がん、動脈硬化、老化等と深い関連を有する。しかし、酸素存在下で生息する好気性生物は、酸素・活性酸素種に対する様々な防御機構を備えているため、酸素・活性酸素種の影響を解析し難い。一方、ある種の嫌気性細菌は酸素に対して極めて高い感受性を示し、酸素による生体影響の解析に適した生物であることがこれまでの研究から示唆されている。そこで、本研究では酸素が偏性嫌気性細菌のゲノム DNA にどのような影響を与えるかを解析した。

## 【材料および方法】

偏性嫌気性細菌 *Prevotella melaninogenica* (GAI5490 株)は岐阜大学生命科学総合研究支援センター嫌気性菌研究分野の渡邊邦友教授から頂いた。*P. melaninogenica* の培養には嫌気培養器 (Forma Scientific anaerobic system model 1024) を用いた。*P. melaninogenica* を酸素ガスあるいは変異原物質である ethyl methanesulfonate (EMS) に曝露し、37°C でインキュベーション後、液体培地で 24 時間培養した。培養後に寒天培地および 10 µg/ml リファンピシン含有寒天培地に *P. melaninogenica* を塗布し、それぞれの培地に出現したコロニー数よりリファンピシン耐性菌の出現頻度を算出した。また、酸素および EMS 曝露後 *P. melaninogenica* から DNA を抽出し、代表的な酸化的 DNA 損傷である 8-oxo-deoxyguanosine (8-oxodG) を HPLC-ECD により測定した。次に、出現したリファンピシン耐性菌について解析を行った。これまで多くのリファンピシン耐性菌において標的タンパク質である RNA ポリメラーゼの β サブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子に変異が検出されていることから、*P. melaninogenica* の *rpoB* 遺伝子配列の解析を試みた。データベース上の *P. melaninogenica* (ATCC25845 株)の *rpoB* 遺伝子配列を基にプライマーを作成し、リファンピシン耐性菌から抽出した DNA を用い、*rpoB* 遺伝子の増幅を行った。増幅した PCR 産物の塩基配列は Big Dye Terminator ver.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い解析した。変異の検出はリファンピシン耐性菌と感受性菌との *rpoB* 遺伝子配列の比較により行った。最後に、酸素あるいは EMS 曝露によりどのような塩基配列に変異が誘発されたかを検討した。

## 【結果】

*P. melaninogenica* の生菌数は、酸素ガス曝露後の 37°Cでのインキュベーション時間に依存して減少した。一方、8-oxodG はインキュベーション時間に依存して増加した。出現したリファンピシン耐性菌のコロニー数よりリファンピシン耐性菌の出現頻度を算出すると、EMS では control に比べ 149.4 倍増加した。酸素ガス曝露を行ったサンプルにおいてもインキュベーション時間に依存して耐性菌の出現頻度が増加し、control に比べ 1.6 倍 (インキュベーション時間 0 分)、12.3 倍 (同 30 分)、34.7 倍 (同 60 分) となった。作成したプライマーを用い PCR を行ったところ、254bp の *rpoB* 遺伝子の PCR 産物を得た。得られた PCR 産物の塩基配列はデータベース上の *P. melaninogenica* ATCC25845 の *rpoB* 遺伝子の塩基配列と 85 %の相同性を示し、アミノ酸配列においては 100 %の相同性を示した。酸素あるいは EMS 曝露により得られたリファンピシン耐性菌の *rpoB* 遺伝子の塩基配列を解析した結果、酸素曝露により誘発された変異の 68.8 % が G:C → T:A 変異であった。一方、EMS により誘発された変異の 85.7 %が G:C→A:T、A:T→G:C 変異であった。

## 【結論及び考察】

*P. melaninogenica* を酸素曝露することにより、生菌数の減少と 8-oxodG の増加が見られ、*P. melaninogenica* が酸素に対して高感受性を示すことが確認された。一方、嫌気培養器内で EMS 処理を行ったサンプルでは 8-oxodG の増加は見られなかった。*P. melaninogenica* は抗酸化酵素として重要なカタラーゼや SOD 活性を持たないことが酸素高感受性の要因の一つと考えられる。また、酸素曝露による活性酸素種の生成が *P. melaninogenica* において確認されている。酸素曝露を行ったサンプルでは 8-oxodG の増加に伴いリファンピシン耐性菌の出現頻度が増加することが確認された。さらに、酸素曝露により出現したリファンピシン耐性菌の *rpoB* 遺伝子を解析した結果、G:C→T:A のトランスポージョン変異が主に検出された。この塩基置換変異は、8-oxodG によって誘発される典型的な塩基置換変異であり、酸素曝露後のサンプルにおける 8-oxodG の増加を反映するものと考えられた。また、EMS 曝露では G:C→A:T、A:T→G:C のトランジション変異が検出され、文献で報告されている EMS による変異と合致した。このことから、今回確立した偏性嫌気性細菌を用いた変異検出法は、変異を正確に検出できると考えられた。これらの結果から、酸素曝露によって生じた酸化的 DNA 損傷が嫌気性細菌 *P. melaninogenica* の遺伝子変異を誘発することが強く示唆され、酸素高感受性の嫌気性細菌が酸素による生体影響解析に有用であることが示された。また、本研究の結果は近年社会的に問題となっている薬剤耐性菌の出現に、環境中の変異原物質が寄与している可能性を示唆するものとなった。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 50 号		学位申請者	内匠 正太
審査委員	主査	小澤 政之	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	秋葉 澄伯	副査	小田 紘
	副査	嶽崎 俊郎	副査	丸山 征郎

**Oxygen induces mutation in a strict anaerobe, *Prevotella melaninogenica***

(酸素による遺伝子変異の誘発)

これまでに多くの研究から、活性酸素種は DNA 損傷、遺伝子変異、がん、老化などと強く関連することが明らかとなっている。しかし、酸素存在下で生息する生物は、酸素・活性酸素種に対する様々な防御機構を細胞内に備えているため、酸素・活性酸素種の影響を観察し難い。一方、偏性嫌気性細菌は酸素に対し感受性が高く、酸素による生体影響の観察に適した生物である。そこで、申請者らは偏性嫌気性細菌の *Prevotella melaninogenica* を用い、酸素がゲノム DNA にどのような影響を及ぼすかを検討した。

*P. melaninogenica* を酸素ガスおよび変異原物質である ethyl methanesulfonate (EMS) に曝露し、37°C でインキュベーション後、液体培地で 24 時間培養した。培養後にリファンピシン含有寒天培地および寒天培地に塗布し、それぞれの培地に生成したコロニー数よりリファンピシン耐性菌の出現頻度を算出した。さらにリファンピシン耐性株から DNA を抽出し、リファンピシンの標的タンパク質である RNA ポリメラーゼ  $\beta$  サブユニットの遺伝子(*rpoB*)の変異を、塩基配列解析によって評価した。また、酸素曝露後の *P. melaninogenica* から DNA を抽出し、酸化的 DNA 損傷の一種である 8-oxo-deoxyguanosine (8-oxodG) を HPLC-ECD により測定した。

その結果、以下のことが明らかになった。

- 1) *P. melaninogenica* に酸素曝露することによりコントロールに比べ有意な生菌数の減少と 8-oxodG の増加が見られ、*P. melaninogenica* が酸素に対して高感受性を示すことが明らかとなった。
- 2) 8-oxodG の増加に伴いリファンピシン耐性菌の出現頻度が上昇することが明らかとなった。
- 3) 酸素曝露により発生したリファンピシン耐性株の *rpoB* 遺伝子を解析した結果、主に G:C→T:A のトランスポージョン変異が検出されることが明らかとなった。
- 4) EMS 曝露により既報の G:C→A:T、A:T→G:C のトランジション変異が検出されたことから、今回確立した変異検出法が正確に変異を検出できることが明らかとなった。

これらの結果から、酸素曝露によって生じた酸化的 DNA 損傷が偏性嫌気性細菌 *P. melaninogenica* の遺伝子変異を誘発することが強く示唆され、酸素高感受性の偏性嫌気性細菌が酸素による生体影響解析に有用であることを申請者らは示した。また、環境中に存在する変異原物質が薬剤耐性菌の出現に関与している可能性を示し、研究の更なる発展性が期待された。これらのことから本研究は、偏性嫌気性細菌という特殊な材料を用いた研究ではあるが、酸化ストレスや環境要因がヒトの健康に及ぼす影響の解析並びにヒトの疾病予防に大いに貢献すると考えられた。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 50 号		学位申請者	内匠 正太
審査委員	主査	小澤 政之	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	秋葉 澄伯	副査	小田 紘
	副査	嶽崎 俊郎	副査	丸山 征郎

主査および副査の5名は、平成20年12月2日、学位申請者 内匠 正太 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) *Prevotella melaninogenica* を用いた理由は？

(回答) *P. melaninogenica* は酸素に極めて高い感受性を示し、酸素曝露により酸化的 DNA 損傷である 8-oxo-deoxyguanosine (8-oxodG) が顕著に増加する細菌である。このことから酸素による生体影響をより明確に解析できると考え本研究に用いた。

質問2) 変異を検出するのにリファンピシンを用いた理由は？

(回答) リファンピシンに対する耐性機序は多くの細菌で研究されており、主に *rpoB* 遺伝子の変異が原因でリファンピシン耐性になることが報告されている。このことから、本研究では変異を検出するためにリファンピシンを用い、*rpoB* 遺伝子の解析を行った。

質問3) 他の抗菌剤に対しても酸素が耐性を賦与したか？

(回答) 他の抗菌剤は未だ試していない。

質問4) 生体内で *P. melaninogenica* が酸素曝露、酸素の攻撃を受ける可能性はあるか？

(回答) 血液や体液中の酸素や、短時間とは思われるが侵入時や呼吸器の酸素との接触や、生体内のマクロファージ等が産生する活性酸素種に常に曝されていると考えられる。

質問5) 酸素による変異が進化に繋がるか？

(回答) 更なる系統発生的な解析が必要になると思われるが、酸素による遺伝子変異が進化の一つの要因になると推測される。

質問6) 8-oxodG の修復酵素(OGG1)は *P. melaninogenica* ではどのようになっているか？

(回答) 同じ *Prevotella* 属である *Prevotella intermedia* の遺伝情報を参考にすると、細菌の 8-oxodG の修復酵素である MutM の存在は確認されていない。また、*P. melaninogenica* では酸素曝露により誘発された 8-oxodG が減少しないことから、*P. melaninogenica* は十分な 8-oxodG の修復機構を備えていないと考えられる。

質問7) MutY 等について、*P. melaninogenica* で遺伝子多型が判っているか？

(回答) 現時点では、*P. melaninogenica* の遺伝情報は明らかにされていないため、遺伝子多型についても不明である。

質問 8) *P. melaninogenica* の内因性の酸化ストレス防御機構はどうか? ビタミン E 等について判っているか?

(回答) Superoxide reductase が多くの偏性嫌気性細菌の酸素代謝に関与すると報告されている。抗酸化ビタミンについては報告されていない。

質問 9) この研究の目的は、特に環境医学でこの研究を遂行する目的は何か?

(回答) 酸素 (活性酸素種) による遺伝子への影響は、多くの疾患に関与すると考えられる。本システムでは酸素・活性酸素種の影響が鋭敏に出現するので、新しい DNA 損傷の同定、DNA 損傷と遺伝子変異の関連解析、遺伝子変異が引き起こす生体変容の解析、さらには損傷や変容を制御する要因の発見や開発に貢献できると期待できる。

質問 10) 指標として 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG)、8-oxodG、8-oxo-Guanine (8-oxoG) が測定されているが、どれが指標として良いのか。

(回答) 以前は 8-OHdG が広く用いられたが、最近は 8-oxodG と表記されるようになり、両者は同じものである。8-oxoG は DNA 並びに RNA に由来するため、遺伝情報への影響評価という観点からは 8-oxodG を測定する方が良いと考える。

質問 11) 酸素曝露レベルによって細菌の応答が異なるか? Double strand break (Dsb) の生成量等に曝露レベルが影響を与えないか? Dsb は発生しているか?

(回答) 今回の研究においては同一条件の酸素曝露しか行っていないため、酸素曝露レベルにより細菌の応答が異なるかは不明である。しかし、酸素曝露後のインキュベーション時間を長くすることで、細菌から回収した DNA では索状物を形成しにくいいため、Dsb が発生していると思われる。

質問 12) Antioxidants で酸素曝露の影響を抑制できるか。

(回答) カタラーゼ、SOD、ビタミン C でこれまで実験が行われているが、カタラーゼにおいて酸素曝露の影響の抑制が見られている。

質問 13) どんな ROS が損傷を誘発しているか? Long lasting な free radical が発生しているか?

(回答) 酸素曝露により発生したスーパーオキシドラジカルが過酸化水素に変換され、その過酸化水素が DNA 近傍で遷移金属によりヒドロキシラジカル様のラジカルを発生し、損傷を誘発していると思われる。

質問 14) 偏性嫌気性細菌では酸素の影響を観察できるが、抗酸化能や修復能を有する生物に今回の結果が外挿できるか?

(回答) 偏性嫌気性細菌で得られた結果を、抗酸化能や修復能を有する生物に直接外挿することはできないが、酸素が生物の DNA に酸化的 DNA 損傷を誘発し、変異を誘発することが証明できた。酸化ストレスに対する防御・修復は完全ではないため、偏性嫌気性菌以外でもレベルは低いですが、同様の変化が発生している可能性がある。

質問 15) 酸素曝露後 60 分のインキュベーションで多くの細菌が死滅するが、なぜ死滅するか?

(回答) 酸素により代謝に重要な酵素が失活するだけでなく、その過程で発生した活性酸素種により修復不可能な DNA の損傷や、細菌の構成成分の損傷が誘発されたため死滅すると考えられる。

質問 16) 生き残った細菌と死滅した細菌を分別採取し、各々のダメージレベルを計測できるか?

(回答) 現時点では、分別採取する技術は確立されていない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。