

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510025

研究課題名(和文) 低温環境における微生物由来変異原の海洋生態系に及ぼす影響評価手法の開発

研究課題名(英文) Development of the method to evaluate the marine ecosystem of mutagen derived from a microbe in the low temperature environment

研究代表者

久留主 泰朗 (KURUSU, YASUROU)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：60272118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞内変異原として酸化損傷塩基が低温環境でどれくらい生成・蓄積しているのかを解析した。房総沖(約6,000m)および南部マリアナ海域(約2,900m)から深海細菌をそれぞれ分離し、酸化損傷塩基の分解遺伝子MutTを大腸菌由来同遺伝子と比較したところ、MutTの比活性は大腸菌より約2倍の高い値を示し、酸化損傷塩基に対する基質特異性が大腸菌より著しく高かった。次に、8-OH-G生成量を調べるために、MR09-04航海(JAMSTEC)にて採水した深海海水中の微生物ゲノムDNA中の8-OH-G量を測定した結果、深海微生物の方が表層微生物よりも約10倍多く蓄積していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the synthesis and accumulation of oxidative damage base in the cell in low temperature environment. After isolating deep sea bacteria each from the Boso (6,000m) and south Mariana area (2,900m), and comparing resolution gene MutT of the oxidative damage base with the Escherichia coli origin gene, the specific activity of MutT showed a high value of approximately 2 times than Escherichia coli and the substrate specificity for the oxidation damage base was more remarkable than Escherichia coli and was high. Then, as a result of 8-OH-G quantity in microbe genomic DNA in the deep sea which collected sea water in MR09-04 (JAMSTEC) to check 8-OH-G production, there were more deep sea microbes approximately 10 times than a microbe from surface sea water.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価

キーワード：環境変異源 微生物 低温環境

1. 研究開始当初の背景

細胞内自然突然変異の生成プロセスは、1)塩基の脱アミノ化、2)塩基の脱プリン化、3)塩基の酸化損傷、4)DNA Polymeraseの異常ヌクレオチドの取り込みによる複製エラーからなる。特に **deoxyguanosine** (dG) は他の塩基に比べ、細胞内で発生した **hydroxyl radical** により、8-OH-dGへ酸化されやすい。さらにヌクレオチドとなった8-OH-dGTPは、基質としてDNA複製中に取り込まれるとG/C⇒T/AやA/T⇒C/Gのトランスポゾン型の塩基置換を引き起こす。

一方、細胞は酸化損傷塩基の分解や除去に関わる遺伝子を保持し、特に8-OH-dGTPを加水分解し8-OH-dGMPに分解する遺伝子としてMutT、二本鎖DNA中から8-OH-dGの除去に関わる遺伝子としてMutMとMutYが知られており、大腸菌を中心として古くから研究されてきた。大腸菌染色体上のMutT遺伝子を破壊した株は、野生株に比し自然突然変異率が1,000~10,000倍に増大する。このように、MutT遺伝子は細胞内で生成した酸化損傷ヌクレオチド8-OH-dGTPを加水分解し、DNA複製の基質として使われないよう、細胞内のヌクレオチドプールの浄化に主要な役割を果たしていると推察される。以上の研究は、いずれも大腸菌を主とする腸内細菌群を対象とし、またDNA突然変異修復機構の解明に焦点を当てた報告が多い。

海洋は、表層から深層にかけ、常温から低温(あるいは高温)、常圧から高压等、様々な環境から構成され、それらの環境で生育する多様な生物を生み出している。このような環境における生物進化(適応)の原動力には、外的要因(ウイルス、プラスミドやトランスポゾン等による遺伝子の水平伝播)の他に、先に述べた内的要因(細胞内自然突然変異による垂直遺伝)もまた大きな影響を与えると考えられる。一方、遺伝子資源の利用価値が高まるにつれ海洋生態系の多様化が重要視されている。地球の表面積の約7割、そして地球上の水97%を占めている海洋には膨大な数の微生物が存在していると予想される。海洋は多様性に富んだ手つかずの生物資源の宝庫であり、近年培養や解析技術が進んだことから海洋微生物資源に対する研究が大きく注目されている。

本研究は、細胞内で酸化ラジカル反応により生成する酸化損傷ヌクレオチドを細胞内変異原として捉え、生物の環境適応機構、すなわち生物ゲノムの進化の原動力(自然突然変異)と位置付け、その“場”として海洋環境をターゲットとして行うものである。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内変異原となる主要酸化損傷塩基(8-OH-dG)を対象に、1)低温微生物は8-OH-dGをどれくらい生成・蓄積しているのか、2)低温微生物は8-OH-dGの生成・蓄積をどのように抑制しているのか、3)

8-OH-dGの生成・蓄積はどのような環境で起きやすいのかを調査し、海洋環境における8-OH-dGの微生物に与える影響評価を行うことを目的とする。本研究により、細胞内自然突然変異の原動力となる8-OH-dGを、さまざまな海洋環境における微生物群集から定量することにより、海洋環境における生物進化のポテンシャルを評価することが可能となる。

3. 研究の方法

(1) 使用した菌株および試料

本研究では、海洋における低温環境の“場”として、深海(2,000m以下)と表層(水温15以下)について設定した。2009年11月3日~2009年12月12日に(独)海洋研究開発機構の研究調査船「みらい」で実施されたMR09-04航海で採水した海水試料、および2010年10月23日~25日に同機構の研究調査船「淡青丸」で実施されたKT10-24航海から分与された海水試料を用いて、実際に海洋環境で海洋微生物の染色体ゲノムDNA中に8-OHdGがどれくらい蓄積しているのかを解析することにした。

また、低温細菌を用いた酸化損傷塩基の生成・蓄積・分解について生化学的・遺伝学的研究を実施するために、低温細菌として千葉県房総沖深海6,000mから分離した*Pseudoalteromonas* sp. (Maruyama A et al. *Marine Biol.*, 128:705-711,1997)、*Psychrobacter* sp. (Maruyama et al. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50:835-846,2000)を、対照として大腸菌(中温菌の代表)も併せて実施した。さらに、絶対好気性菌である枯草菌、絶対嫌気性菌である乳酸菌、および酸素発生型光合成細菌シアノバクテリアについても実施した。

(2) 8-OHdGの定量

8-OHdGの測定には8-OHdGに特異的なモノクローナル抗体を使用するELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)キット、高感度8-OHdG Check(日本老化制御研究所)を使用した。

(3) 自然突然変異率の測定

本研究での自然突然変異率の測定はRifampicinを用いて行った。Rifampicinは、アンサマイシン系抗生物質リファマイシンSVの誘導体で、RNAポリメラーゼと等モル比で結合し、RNAの合成開始を阻害する。RNAポリメラーゼのサブユニットに作用し、因子の解離、あるいはその両者を阻害すると考えられ、変異率の測定には広く用いられている。

4. 研究成果

(1) 細菌の酸化損傷塩基抑制機構の解析

千葉県房総沖深海6,000mから単離された低温細菌*Pseudoalteromonas* sp. PS1M3株からNudix boxをもつNudix遺伝子がクローニングし、遺伝的解析を行った。ヌクレオチド

プールに生じる酸化損傷ヌクレオチド 8-OHdGTP は DNA ポリメラーゼによってシトシンまたはアデニンと頻繁に対合する。それ故 GC TA,AT CG の塩基置換が起きやすい。MutT は複製に取り込まれる前の 8-OHdGTP を 8-OHdGMP に加水分解することで DNA ポリメラーゼに取り込まれることを防ぐ酵素である。mutT 遺伝子破壊株の相補性試験により、PS1M3 Ndx は大腸菌 mutT 遺伝子破壊株を完全に相補し、グアム沖深海 3,000m より単離された *Pseudoalteromonas sp.* APM04-2 と比較したところ同じ 132a. a. で 99.2% の相同性を有していた。さらに PS1M3 MutT を高発現した大腸菌酵素液を用いて *E. coli* の MutT の酵素活性と比較検討したところ、PS1M3 MutT の比活性は大腸菌由来 MutT に比べ約 2 倍の高い値を示した。また同酵素の基質特異性を調べたところ、8-oxo-dGTP に対する基質特異性が大腸菌由来 MutT と同様に高かった。これまで報告されている MutT は基質特異性が広くヌクレオチドのサルベージに使われていると考えられてきたが、深海微生物由来 MutT の 8-OHdGTP に対する基質特異性の高さは大変興味深い。このことは、8-oxo-dGTP に起因する自然突然変異が深海環境下においても起きている可能性を示唆している。

一方、酸素発生型シアノバクテリアからも同様の遺伝子を同定し、上記低温細菌や大腸菌とほぼ同様の機構で抑制していることを明らかにした。しかしながら、絶対好気性である枯草菌から同遺伝子は同定されたが、全く遺伝学的に機能していないことが明らかになった。さらに、絶対嫌気性である乳酸菌からは同遺伝子は同定できなかったが、ゲノム DNA 中には嫌気条件下でも酸化損傷塩基が蓄積することが判明し、枯草菌と同様に酸化損傷塩基抑制機構として MutY と MutM が主要な役割を果たしていることが示唆された。

(2) 海洋における酸化損傷塩基蓄積量

8-OHdG は酸化損傷塩基の中でも DNA 中に基質として取り込まれやすく変異原性が強いことで知られている。西部熱帯太平洋海域、南西諸島伊是海穴の海水試料より抽出された染色体ゲノム DNA から 8-OHdG を定量した結果、深層と表層で有意な差がみられ、深層で高いこと観察された。これらの結果は経度緯度に関係なく海洋環境微生物の細胞内で 8-OHdG が生じている証拠であり、特に深層で 8-OHdG の蓄積量が多いことはとても興味深い。深層海水中の海洋微生物にとって 8-OHdG は重要な変異原性物質であり、進化に深く関わっているのかもしれない。

(3) 海洋細菌における酸化損傷塩基蓄積量

PS1M3 の対数期と定常期で 8-OHdG 量を比較すると対数期で多いことが観察された。対数期は細胞分裂が活発な時期であり複製も盛んに行われている。8-OHG が生じる原因は 2 つあり、直接 DNA 中のグアニンが酸化される

か、前駆体である dGTP が酸化されて生成した 8-OHdGTP が複製時に取り込まれるかである。8-OHdG 量が対数期に多く、定常期に少ないことから、対数期で観察された値は 8-OHdGTP が原因である可能性が高い。また、このことは PS1M3 株の dGTP が酸化されやすく、細胞内で 8-OHdGTP が多く生成していることが考えられる。その他にも微生物によっては修復酵素の発現が増殖時期に関係していることから、対数期では 8-OHG や 8-OHdGTP の除去酵素が機能せず、定常期で機能することが 1 つの理由として考えられる。PS1M3 を 4 と 30 でそれぞれ対数期まで培養し 8-OHdG を定量したところ、4 培養で高い蓄積が観察された。PS1M3 の 8-OHdGTP 除去酵素 MutT 最大活性は 60 で高く、4 では活性がみられなかった。したがって 4 の低温培養では細胞内で MutT がほとんど機能せず、8-OHG の増大に繋がっていることが示唆される。またこの時の自然突然変異率は 8-OHdG 量と逆の傾向が観察された。この理由については 2 つのことが考えられる。1 つは DNA 中の 8-OHG 除去酵素群の低温高活性である。PS1M3 において大腸菌の 8-OHG 除去酵素 MutM、MutY に相当するタンパク質が低温環境で高い活性を持つため、変異が固定される前に 8-OHG を除去することが考えられる。もう一つは 8-OHG 以外の変異原性物質が 30 で生成しやすい場合である。PS1M3 の生育環境は 4 ~ 10 と低温で、30 の培養環境は細胞にとってストレスであり、8-OHG 以外の変異原性物質が生じやすい可能性が考えられる。

(4) 海洋におけるモデルの提唱

深層の微生物中には表層より多くの 8-OHdG の蓄積がみられた。本研究ではその解析のために低温細菌 *Pseudoalteromonas sp.* PS1M3 株と大腸菌 K-12 株の 8-OHdG 蓄積量や自然突然変異率の傾向を手がかりとした。

今回の研究によって DNA 中の 8-OHdG の蓄積は環境温度と関係していることが示唆された。低温環境で大腸菌の MutT は、活性が低く機能しなかった。PS1M3 株の MutT 活性は 4 ~ 10 では確認されておらず、8-OHdG 蓄積が高いことも、低温で MutT の活性が低いことが原因と推測される。

8-OHdG は変異原性物質であり突然変異を誘発させることが知られている。今回の研究では PS1M3 株の自然突然変異率が温度の影響を受けることを示唆した。PS1M3 株の自然突然変異率は低温では低く常温では高い。これは 8-OHdG 蓄積とは逆の傾向である。PS1M3 株の生育環境は 4 ~ 10 であり、30 では 8-OHG 以外の変異も生じやすく、それが突然変異率の上昇と関係していると考えられる。また、大腸菌 K-12 株の MutM、MutY 活性が低温で高まることが示唆され、PS1M3 株も低温で MutM、MutY と同じ機能を持つ酵素の活性が高くなり突然変異を抑制していると推測される。

8-OHdG の蓄積量と自然突然変異率は温度に関係していることから、MutT、MutM、MutY のような 8-OHG の抑制・除去に係る酵素の活性が温度に大きく影響されると考えられる。また、この研究から推測される表層・深層微生物の 8-OHG 抑制・除去システムのモデルを述べる。このモデルは細胞内の 8-OHdGTP と DNA 中のグアニンが直接酸化され生じる 8-OHG の生成量が表層と深層で一定であることを前提としている。表層微生物であり、MutT が機能しているため 8-OHG の蓄積が抑制されているが、MutM、MutY の活性が低いため自然突然変異率は高い。一方深層微生物で MutT が機能せず 8-OHG 蓄積が高いが、MutM、MutY の活性が高いため自然突然変異率が低いことを示している。今後さらに、他の低温細菌や PS1M3 株の *mutT*、*mutM*、*mutY* 破壊株で 8-OHdG 蓄積傾向や 8-OHG 除去酵素の機能を詳細に調べることで海洋微生物における 8-OHG 抑制・除去システムが明らかになるだろう。

本研究において増殖時期の違いが 8-OHdG 蓄積量や自然突然変異率に影響していることが観察された。中立説に従えば増殖が盛んな時には変異があまり生じない。しかし、今回の研究では増殖が盛んな対数期に 8-OHdG が多く蓄積していることが観察された。最近、阪大の四方教授らの研究チームは大腸菌に高温環境ストレスを与え続けると遺伝子変異が環境適応と関係なく生じ、盛んに増殖するときも中立説が通用することを証明した。低温と常温の PS1M3 株や大腸菌が、対数期に 8-OHdG 蓄積の増大が観察されたことは、この説が低温でも成立する可能性を示唆している。また、深層海水の 8-OHdG 蓄積量が高かったことから、一般的に環境中に存在する微生物の多くは定常期とされているが、深層海水の 8-OHdG 蓄積量が高いことから対数期である可能性も考えられる。この仮定が事実であるとすれば、海洋微生物進化に 8-OHdG は大きな影響を与えている変異原の 1 つであり、進化ポテンシャルを評価する指標になるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 14 件)

白熊理沙、林宏恵、久留主泰朗「細菌由来ミスマッチ DNA 修復機構の温度依存性に関する遺伝学的解析」第 8 回日本ゲノム微生物学会(2014 年 3/7-9 日:東京農大)

成田佳織、久留主泰朗「*Synechocystis* sp. PCC6803 株の細胞内ヌクレオチドプールにおける 8-oxo-dGTP 除去機構」第 8 回日本ゲノム微生物学会(2014 年 3/7-9 日:東京農大)

白熊理沙、林宏恵、久留主泰朗「細菌由来ミスマッチ DNA 修復機構の温度依存性に関する遺伝学的解析」第 12 回微生物研究会(2013 年 10/5 日:東京電機大)

成田佳織、久留主泰朗「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 由来

8-oxo-dGTPase の酵素学的解析」第 12 回微生物研究会(2013 年 10/5 日:東京電機大)

Y. Kurusu, Y. Kojima, K. Narita, H. Hayashi 「Accumulation and prevention of oxidative damaged base, 7,8-dihydro-8-oxoguanine, in various bacteria」The EMBO Meeting 2013(2013 年 9/22~25: Amsterdam, Netherland)

Narita K & Kurusu Y 「Repression of Oxidative Base (8-oxo-deoxyguanine) in *Synechocystis* sp. PCC6803.」ASM General 113th Meeting(2013 年 5/18-21: Denver, Colorado, USA)

小島由夏、富山香里、久留主泰朗「嫌気性乳酸菌の酸化損傷塩基の生成と抑制に関する解析」第 7 回日本ゲノム微生物学会(2013 年 3/8-10 日:長浜バイオ大学)

成田佳織、久留主泰朗「光合成細菌における酸化損傷塩基分解酵素の解析」第 7 回日本ゲノム微生物学会(2013 年 3/8-10 日:長浜バイオ大学)

成田佳織、久留主泰朗「Analysis of an 8-oxo-dGTPase from *Synechocystis* sp. PCC6803」第 11 回微生物研究会(2012 年 9/22 日:東京大学)

成田佳織、久留主泰朗「Synthesis and repression of oxidative base (8-OH-deoxyguanine) in *Synechocystis* sp. PCC6803」第 28 回日本微生物生態学会年会(2012 年 9/19~22 日:豊橋技術科学大学)

Narita K & Kurusu Y 「Identification of *mutT* genes that hydrolyzes 8-oxo-dGTP in cyanobacteria」ASM General 112th Meeting (2012 年 6/16-19 日: SF, CA, USA)

成田佳織、久留主泰朗「シアノバクテリアにおける酸化損傷塩基除去機構の解析」第 6 回日本ゲノム微生物学会(2012 年 3 月 10~12 日:立教大学)

佐藤侑里、佐々木真弓、久留主泰朗「枯草菌における酸化損傷塩基の生成と抑制に関する解析」第 34 回日本分子生物学会(2011 年 12 月 13-16 日:パシフィコ横浜)

林宏恵、久留主泰朗「海洋性細菌由来 DNA ミスマッチ修復機構の温度依存性に関する解析」第 27 回日本微生物生態学会年会(2011 年 10 月 8-10 日:京都大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久留主 泰朗 (KURUSU YASUROH)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号: 60272118