

令和元年6月13日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12607

研究課題名(和文)酸化ラジカル反応により生成する酸化損傷塩基の生態系影響評価に関する研究

研究課題名(英文) Study of ecosystem assessment for oxidative damaged base by oxidative radical reaction

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞内酸化ラジカル反応により生成する酸化損傷塩基 8-hydroxy-deoxyguanosine(以下、8OHdG)に関し、どのような環境で、どれくらい生成し、自然突然変異率にどのように影響を及ぼすのか、さらに抑制機構はどのような仕組みなのか、を明らかにし、8OHdGの生物に与える影響について解析した。その結果、多くの細菌が至適培養温度より低い温度で培養すると、8OHdGが染色体DNA中に顕著に蓄積すること、特に絶対嫌気性菌においては酸素無添加培養時においても同様であったこと、好熱菌より常温菌、さらに低温細菌の方が8OHdGの蓄積量増大に対する抑制機構が優れていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、生物進化の原動力は、ウイルス、トランスポゾン、プラスミド等による遺伝子の水平伝播、すなわち外的要因を中心に研究されてきた。本研究は、細胞内酸化ラジカル反応により生成する酸化損傷塩基8OHdGを細胞内変異原、すなわち内的要因として位置付け、8-OHdGを生物進化の新たな指標として、そのポテンシャルを評価する点に意義がある。

研究成果の概要(英文)： One of the most lesions in DNA caused by reactive oxygen species (ROS) is the oxidized base 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG). The product of three of the *Escherichia coli* mut genes, mutM, mutY, and mutT, are devoted exclusively to preventing mutations due to 8-oxoG and are important components of the defense against this type of oxidative damage. However, other bacteria for DNA repair systems to prevent 8-oxoG such as MutT are unclear. Here, we used some strains, such as an *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus reuteri*, *Pseudoalteromonas* sp from deep sea, *Synechocystis* sp. PCC6803, and *E. coli* as a control. We measured the amount of 8-oxoG in chromosomal DNA. Also, cells highly accumulated 8-oxoG in DNA at low temperature than at appropriate temperature in all of bacteria. These results indicated that accumulation of 8-oxoG by ROS is highly active in exponential growth and at low temperature and prevention of DNA mutation by 8-oxoG are due to MutY and MutM rather than MutT.

研究分野：微生物学

キーワード：酸化損傷塩基 酸化ラジカル反応 自然突然変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内酸化ラジカル反応により生成する酸化損傷塩基 8-hydroxy-deoxyguanosine(以下、8OHdG)に関する研究は大腸菌を中心に実施され、DNA複製の基質として取り込まれ G/C から T/A への塩基置換、すなわち突然変異を引き起こすこと(J.Biol.Chem. 269:15318-24.1994)、8OHdGを対象とする分解・除去に関わる遺伝子として加水分解酵素 MutT(Nature. 355:273-5.1992)や除去酵素である MutMと MutY (Mutation Res. 336:257-67. 1995)が報告されている。一方、生物進化の原動力については、ウィルス、トランスポゾン、プラスミド等による遺伝子の水平伝搬、すなわち外的要因を中心に研究されてきた。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内酸化ラジカル反応により生成する酸化損傷塩基 8OHdGを細胞内変異原、すなわち生物進化の内的要因として位置付け、8OHdGを生物進化の新たな指標として、そのポテンシャルを評価することにある。

そこで、本研究は、化学的に安定である 8OHdGがどのような環境で、どれくらい生成し、自然突然変異率にどのように影響するのか、また細胞内ではどのように抑制されているのかを解析し、環境中における 8OHdGの生物に与える影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の使用菌株として、ゲノム解読が終了している次のモデル微生物を用いた。

通性嫌気性細菌	<i>Escherichia coli</i> K-12 (Science. 277:1453. 1996)
絶対好気性細菌	<i>Bacillus subtilis</i> 168 (Nature. 390:249-56. 1997)
酸素発生型光合成細菌	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 (DNA Res. 3:109-36. 1996)
絶対嫌気性細菌	<i>Lactobacillus reuteri</i> (ヒト由来: DNA Res. 15:151-61.2008)
絶対嫌気性細菌	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824(J.Bac. 183:4823. 2001)

また、本研究では、申請者らが分離した次の3株を用いた。

深海由来好冷性細菌	<i>Psychrobacter</i> sp.(Int J Syst Evol Microbiol.50:835-46.2000)
深海由来好冷性細菌	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PS1M3 (Marine Biotech. 3:96-9.2001)
深海由来好冷性細菌	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. APM04 (未発表)

上記菌株を用いて、以下の2つの大項目について研究を実施した。なお、以下、菌株は番号から 示す。

(1) さまざまな培養温度における 8OHdGの蓄積量と自然突然変異率の解析

8OHdGの測定は、8OHdGに特異的なモノクローナル抗体を使用するELISAキットで実施した。自然突然変異率の測定は、抗生物質である Rifampicin に対する耐性株の出現頻度で算出した。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 polymerase と等モル比で結合し、RNA の合成開始を阻害する。RNA polymerase 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、自然突然変異率の測定に広く用いられている。

(2) 8OHdGの分解に関わる *mutT* および除去に関わる *mutY* と *mutM* の遺伝学的解析

各生物のゲノム情報より、細胞内で生成される 8-OH-dGTP を分解する酵素をコードする *mutT* 遺伝子をクローニングして、同酵素を大量発現・精製し、試験管内にて酵素の諸特性、特に 8-OH-dGTP と他 dNTP の基質特異性を中心に解析した。

4. 研究成果

(1) 8OHdGの蓄積量と自然突然変異率の解析

菌株 1 については至適増殖温度より低温で培養すると 8OHdG の蓄積量が増大したが、自然突然変異率には大きな差異はなかった。菌株 2 については培養温度の違いによる 8OHdG の蓄積量に差は見られなかった。さらに増殖時期と蓄積時期について調べたところ、いずれの菌株も定常期より対数増殖期の細胞で顕著な 8OHdG の蓄積が見られ、細胞分裂時における DNA 複製への影響が示唆された。同様に自然突然変異率を測定したところ、いずれも対数増殖期の細胞の方が若干高い傾向を示した。なお、酸素発生型光合成細菌である菌株 3 については元来 Rifampicin に対する耐性を示すため、自然突然変異率は測定していないが、1 µgDNA 当たりの 8OHdG 量は大腸菌に比べ約 10 倍高い値を示し、細胞内における酸化ラジカル反応がかなり頻繁に起きているのではないかと示唆された。また、同菌株については増殖時期に関係なくほぼ一定の 8OHdG 量を示したことから、何らかの抑制機構があるのではないかと推察された。さらに絶対嫌気性菌である菌株 4 については、嫌気条件下での培養であるにもかかわらず 8OHdG 量の蓄積が認められ、また対数増殖期の方が多く蓄積し、自然突然変異率も高かった。このことは、絶対嫌気性菌においては、環境中の酸素の有無にかかわらず自然突然変異が起こりうることを示唆している。

(2) *mutT* および *mutY* と *mutM* の遺伝学的解析

絶対嫌気性菌株である 1 について *mutT* 遺伝子のクローニングを試みたが同定できなかった。 2 については3つの候補遺伝子 (LAR0754、LAR1530、LAR0580) のいずれも大腸菌 *mutT* 変異株を相補しなかった。 3 についても8つの候補遺伝子 (CA_C0145、CA_C2828、CA_C0446、CA_C3601、CA_C0084、CA_C1006、CA_C1854、CA_C1777) について同様に試みたが同定出来な

った。また、初期データではあるが *mutM* と *mutY* について大腸菌同遺伝子との相同性検索を行ったが、いずれの菌株からも見いだせなかった。前述(1)において8OHdGの蓄積が認められたことから、絶対嫌気性細菌においては *mutT*、*mutM*、*mutY* に変わる全く別の機能の存在が示唆され、大変興味深い結果となった。今後の最重要課題と位置付ける。

一方、酸素発生型光合成細菌、深海由来低温細菌及び大腸菌のMutT精製酵素を用いて酵素活性を調べたところ、の方がより約2倍高い活性を示すこと、大腸菌117番目のプリンをと同じアラニンに置換すると約2倍高い活性を示すがdGTPに対しても同様の活性を示すことが明らかになった。さらには大腸菌より8-oxo-dGTPに対する基質特異性が高かった。また、からも*mutT*遺伝子を単離し解析したところ、とわずか1アミノ酸が違っただけでほぼ99%の相同性を示した。このことは、元来同属同種間においてもMutTのアミノ酸相同性は極めて低く、との採取場所は数千Km離れた深海底であり、同属とはいえ高い相同性をMutTで示したことは大変興味深い結果である。さらに申請者らは好熱性古細菌*Sulfolobus tokodaii* strain7からMutTホモログの酵素活性を調べた結果、8-oxo-dGTP以外のdNTPにも反応し、極めて基質特異性が低いことを明らかにしている(未発表)。

以上のように、好熱菌より常温菌、常温菌より低温菌の方がMutTの絶対活性や8-oxo-dGTPに対する基質特異性が高い傾向にあることが判明した。約46億年前に地球が誕生して以来、高温で無酸素の環境が続いたが、約27億年前から大気中の酸素が増大し、酸素を使う生物が出現したと考えられている。最近の報告で、全生物最終共通祖先(LUCA)は、嫌氣的で高温を好むものであったことがわかっている(Nature Microbiology, 1:16230, 2016)。以上のことから、地球環境が高温から低温へ、無酸素から有酸素へと変化してきたことに連動し、生物も同様に適応して進化したこと、特に内的要因として本研究で明らかにしたMutTの基質特異性の変遷は大変興味深い。

(3) 深海由来低温細菌2株のゲノム解読

上記結果を踏まえ、深海由来低温細菌と の全ゲノム解読を実施した。は千葉県房総沖日本海溝海底下約6,000mの海底堆積物、は南部マリアナ海溝海底下約2,900mの同じく海底堆積物から分離した菌株である。各菌株のシーケンス結果の概要を以下に示す。

は、環状DNA分子として4つ存在し、染色体として3,607,123 bpsと711,752 bpsの2つ、さらに核外遺伝子としてのプラスミドとして27,013 bpsと3,133 bpsの2種を細胞内に保持していた。GC含量は、染色体1が39.9%、染色体2が39.8%、プラスミド1が38.8%、プラスミド2が37.1%と、いずれもあまり差異が無く、比較的低い結果となった。大腸菌(*mBio9:e02096-17*, 2018)および枯草菌(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:4678-83, 2003)で報告されている細胞増殖に必要な遺伝子について同様に遺伝子解析を行った結果、大腸菌と同様の必須遺伝子は染色体1に207個及び染色体2に3個存在し、枯草菌と同様の必須遺伝子は染色体1に159個と染色体2に1個存在した。このことから、染色体2には少なくとも細胞増殖に必要な遺伝子がコードされていることが判明し、菌株における存在意義が明らかになった。必須遺伝子としては、*ispG*(4-hydroxy-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase)、*hisS*(histidyl-tRNA synthetase)、*der*(GTPase)であった。

一方、について、環状DNA分子として2つ存在し、一つが3,457,294 bps、二つ目が683,804 bpsであった。とはいずれも細胞内に染色体を2つ保持していることは大変興味深い。最近、海洋の表層海水から分離された*Pseudoalteromonas*属細菌のゲノム解読が報告(Environmental Microbiology, 21:272-285, 2019)され、多くの細菌が染色体を2つ保持していることが明らかとなった。このことは、本研究で明らかにした深海由来の上記2株の結果と併せて、広く海洋において特に表層から深層において、同属細菌の染色体ゲノムの動態が普遍的であることを示唆している。

今後は、上記2株の*mutT*および*mutY*と*mutM*の温度依存性機能を含めて、環境中における8OHdGの生物に与える影響、特に低温環境における酸化損傷塩基の影響について全容を解明する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計6件)

- (1) Genomic analysis of psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. PS1M3. Y.Nikaidou, A.Maruyama & Y.Kurusu. 12th International Marine Biotechnology Conference. 2019/9/9-13. Shizuoka, Japan
- (2) Characterization and diversity of MutTs that degrade oxidative damaged nucleotide, 8-oxo-dGTP, in various bacteria. Y.Kurusu & H.Wada. Asm microbe 2019. 2019/6/21. San Francisco. USA.
- (3) 地球環境の変遷に伴う細胞内変異原の生物進化への影響
和田浩樹 久留主泰朗 ブルーアースサイエンステク 2019/2/21 横浜港大さん橋ホール
- (4) 細菌ゲノムDNA中における酸化損傷塩基8-oxo-dGの生成と抑制について
二階堂惟人 久留主泰朗 第16回微生物研究会 2017/11/18 東京工業大学

- (5) 細菌における酸化損傷塩基分解遺伝子 *mutT* の機能解析
和田浩樹 久留主泰朗 第 16 回微生物研究会 2017/11/18 東京工業大学
- (6) 大腸菌の低温培養時における酸化損傷塩基のゲノム内蓄積について
宮城隆太 久留主泰朗 第 15 回微生物研究会 2016/11/5 日本大学藤沢

6 . 研究組織

- (1) 研究分担者
- (2) 研究協力者