

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 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 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 のトランスバ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。