

深海環境における細胞内変異原の生成と自然突然変異

○林 宏恵・久留主泰朗（茨城大学），砂村倫成（東京大学），丸山明彦（産業技術総合研究所）

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、様々な物理的要因から構成され、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（遺伝子の水平伝播等）の他に、細胞の内的要因（細胞内自然突然変異）も大きく関与している。細胞内自然突然変異の生成プロセスは、1)塩基の脱アミノ化や脱プリン化、2)塩基の酸化損傷、3)DNA Polymerase の酸化損傷塩基取込みによる複製エラーからなる。特に、2)は細胞内での酸化ラジカル反応により行われ、dGTP (deoxyguanosine-5' -triphosphate) が 8-OH-dGTP (8-hydroxy-deoxyguanosine-5' -triphosphate) に酸化され、複製 DNA 中に基質として取り込まれると G:C⇒T:A あるいは A:T⇒C:G の塩基置換を引き起こす。

本研究は、酸化損傷ヌクレオチドである 8-OH-dGTP を主要な細胞内変異原として捉え、海洋環境中の微生物細胞内にどれくらい生成し、またどれくらい自然突然変異率に影響しているのかを解析し、深海環境における生物進化のポテンシャルを評価することを目的とする。

（独）海洋研究開発機構の研究調査船「みらい」を用いた MR09-04 西部熱帯太平洋航海（柏野祐二首席）で採水した海水試料（深海 2,000m～4,000m：水温 2～4℃）、および同機構の研究調査船「淡青丸」による KT10-24 南西諸島伊是名航海（山本啓之首席）で採水した海水試料（1,000m～1,500m：水温 3～4℃）を濾過（孔径 0.22 μm）し、得られた微生物菌体からゲノム DNA 中の 8-OH-G の定量を行った結果、深海試料の方が表層海水（水温：28℃）の微生物よりも最大で約 10 倍多く蓄積していることが判明した。このことは、深海環境では、細胞内変異原 8-OH-G が蓄積しやすいこと、すなわちゲノム DNA に自然突然変異が起きやすいことを示唆している。

次に、詳細に解析するために、深海微生物を用いた培養実験を行った。千葉県房総沖日本海溝（約 5,000m～6,000m の堆積物）から分離した低温細菌 *Pseudoalteromonas* sp. PS1M3 および *Psychrobacter pacificensis* NIBHP2J2 (A. Maruyama et al. Marine Biology 128:705 -711. 1997) を用い、4℃と 30℃で培養して得られた菌体中のゲノム DNA 中の 8-OH-G の定量を行った結果、4℃培養で得られた菌体の方が多く生成していることが明らかになり、低温環境で細胞内変異原 8-OH-G が蓄積しやすいことが判明した。そこで、その原因を解明するために、8-OH-dGTP の分解酵素遺伝子 MutT を低温細菌 *Pseudoalteromonas* sp. PS1M3 からクローニングし高発現させ酵素を精製し、これを大腸菌由来の同酵素と比較したところ、低温細菌由来 MutT の比活性は大腸菌より約 2 倍の高い値を示し、さらに 8-OH-G に対する基質特異性が大腸菌より高かった。さらに、反応温度を調べた結果、10℃以下では酵素活性が著しく低下することが判明した。このことから、深海、すなわち低温環境では、酸化損傷ヌクレオチド分解酵素が働かないため細胞内変異原 8-OH-G が蓄積しやすいことが推察された。現在、8-OH-G の蓄積とそれが自然突然変異率に及ぼす影響について解析中である。