



Title	Mutational effects of ultraviolet light on the genomic DNA of <i>Escherichia coli</i>
Author(s)	Shibai, Atsushi
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69725
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (芝井 厚)	
論文題名	Mutational effects of ultraviolet light on the genomic DNA of <i>Escherichia coli</i> (紫外線が大腸菌ゲノムDNAに与える変異的影響に関する研究)
論文内容の要旨	

紫外線照射は、生物細胞中のDNAに変異をもたらす効果を持つ。紫外線は太陽光にも含まれる自然界に遍在する変異原の一つであり、地球史にわたって生物進化に影響を与えていたと考えられる。また実験室での有用微生物の進化的育種などにおいても、実験を加速させるための変異原として広く用いられている。変異原としての紫外線の性質を詳しく知ることは、生物進化の理解・予測の両方に寄与すると期待される。

変異原としての紫外線の性質についての研究は、大腸菌などを用いてこれまで多くなされてきた。しかしながらそのほとんどは、紫外線照射後の表現型変化とそれに対応するレポーター遺伝子のDNA配列の情報からゲノムDNAの変化を推測したものであり、ゲノムDNA上の局所的な特定部位の変異を間接的に調べるにすぎなかった。また、単発の照射による変異の発生を観察したものであり、細胞集団への変異の固定、紫外線耐性の獲得など適応的過程を考慮した視点では調べられていない。私は、近年普及が進んでいる次世代シーケンサ技術を適用することにより、ゲノム全体に生じるDNAの変化を直接観察することが可能だと考えた。そこで本研究では、モデル生物として大腸菌を用い、紫外線照射下で培養してそのゲノムを次世代シーケンサで解析することで、紫外線照射の変異誘導の性質を明らかにすることを試みた。

本学位論文は以下の第1章から第5章により構成される。

第1章では、研究の目的および背景について記述した。主に着目する変異誘導の性質として、世代あたりの塩基置換発生率と、塩基置換種のスペクトルの2つを挙げた。これらは進化の速度および方向性にそれぞれ影響する指標である。また変異誘発を扱う視点を、変異の「発生」とその「蓄積」との2つに分け、それぞれ第2章と第4章で扱うものとした。ここで、後者の変異の「蓄積」を観察するには比較的長期の培養実験を行う必要があった。それを実現するための培養装置の開発を第3章で行った。

第2章では前述のとおり変異の発生の過程に着目し、28日間の紫外線照射培養実験を行い、実験後の大腸菌ゲノムを次世代シーケンサにより解析した。結果、紫外線による塩基置換発生率は非照射条件下の100倍程度であることを明らかにした。また、紫外線が生じさせる塩基置換種のスペクトルは、G:C塩基対からA:T塩基対への置換がもっとも多く半数余りを占めるものの、全6種の塩基置換のうち4種類が一定の割合で生じることを示した。

第3章では、第4章で扱う変異の蓄積を観察するための長期の紫外線照射培養実験を可能とすることを目指した。第2章の実験では時間当たりの紫外線量を手作業で調節したが、その目測を見誤って大腸菌を絶滅させてしまうことがないよう毎日定時に数時間の実験操作を行った。より長期の実験を安定に行うには、細胞増殖とそれに応じた紫外線照射を自動的に行う培養システムが必要だと判断し、その開発を行った。これにより、過剰な紫外線照射による細胞集団の絶滅を防ぎつつ、最大量の紫外線を照射することが可能となった。

第4章では、前述のとおり変異の蓄積の過程に着目し、第3章で開発した装置を用いて700日間の紫外線照射培養実験を行った。そして、培養実験途中の数時点の大腸菌ゲノムを次世代シーケンサにより解析した。その結果、変異の蓄積に伴い大腸菌の紫外線耐性が向上する一方で、塩基置換発生率は非照射条件下の100倍程度で1年間推移することを明らかにした。また第4章においては、変異の蓄積がみられた遺伝子群の機能について解析した。その結果、先行研究において非必須と予測されている遺伝子に集中して機能不活性変異が蓄積することを示した。

第5章では、本研究で得られた知見をまとめ、展望について述べた。本研究では、紫外線照射を伴う大腸菌の培養実験を行うと、塩基置換発生率が100倍程度高まり、それが1年間にわたって持続することを示した。また、紫外線照射が発生させる塩基置換種のスペクトルを明らかにした。そして、機能不活性変異が非必須遺伝子群に集中することを示した。以上の結果は、多くの遺伝子に変異を必要とするような実験室内進化実験の計画に寄与すると期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (芝井 厚)		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 教授	松田 史生
	副 査 教授	前田 太郎
	副 査 教授	清水 浩
	副 査 教授	若宮 直紀
	副 査 教授	松田 秀雄

論文審査の結果の要旨

本論文は紫外線が大腸菌ゲノムDNAに与える変異的影響を研究したものである。紫外線を変異原として生命システムの改良に利用することを志向している。その実現に向け、変異の発生と蓄積の過程に着目し、紫外線長期間照射が世代あたりの塩基置換発生率と塩基置換種のスペクトルに与える影響の解明を目的としている。

第1章は序論である。本研究の背景と目的について述べている。

第2章では変異の発生の過程に着目し、28日間の紫外線照射培養実験を行い、実験後の大腸菌ゲノムを次世代シーケンサにより解析している。結果、紫外線による塩基置換発生率は非照射条件下的100倍程度であることを明らかにしている。また、紫外線が生じさせる塩基置換種のスペクトルは、G:C塩基対からA:T塩基対への置換がもっとも多く半数余りを占めるものの、全6種の塩基置換のうち4種類が一定の割合で生じることを示している。

第3章では、より長期の紫外線照射培養実験を可能とするための細胞増殖とそれに応じた紫外線照射を自動的に行う培養システムの開発を行っている。これにより、過剰な紫外線照射による細胞集団の絶滅を防ぎつつ、最大量の紫外線を照射することを可能としている。

第4章では変異の蓄積の過程に着目し、第3章で開発した装置を用いて700日間の紫外線照射培養実験を行い、培養実験途中の数時点の大腸菌ゲノムを次世代シーケンサにより解析している。その結果、変異の蓄積に伴い大腸菌の紫外線耐性が向上する一方で、塩基置換発生率は非照射条件下的100倍程度で1年間推移することを明らかにしている。また変異の蓄積がみられた遺伝子群の機能について解析し、先行研究において非必須と予測されている遺伝子に集中して機能不活性化性変異が蓄積することを示している。

第5章では、本研究で得られた知見をまとめ、展望について述べている。

このように、本論文では紫外線の長期間照射による変異の発生（第2章）と蓄積（第4章）という2つの観点から、紫外線の長期間照射による変異誘発の実態を解明している。また、長期間照射実験に必要な培養システムの構築を行っている（第3章）。本結果は紫外線長期間照射における世代あたりの塩基置換発生率と塩基置換種のスペクトルを明らかにしたという点で価値がある。したがって、本論文は博士（情報科学）の学位論文として価値のあるものと認める。