

氏 名(本籍) あい 相 かわ 川 かつ 勝 ひろ 弘

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 480 号

学位授与年月日 平 成 5 年 6 月 17 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 脂肪酸過酸化物及びその分解産物の抗変
異原性に関する研究

論文審査委員(主 査) 教 授 一 島 英 治
教 授 伊 崎 和 夫
教 授 折 谷 隆 之

論文内容要旨

序論

変異原の活性を抑制する物質、いわゆる抗変異原物質に関する研究は、故賀田恒夫博士らによって始められ、食品中や天然物中から種々の抗変異原物質が単離され、その作用様式の違いから、変異原不活性化物質である desmutagen と細胞内の突然変異のプロセスそのものを抑制する bio-antimutagen の 2 つのタイプに分けられることが示されている^{a)}。このうち desmutagen の変異原不活性化の機構については、化学的修飾、酵素的修飾、高分子化合物による吸着および代謝活性化の阻害等が知られているが、bio-antimutagen の作用機構に関しては DNA 修復、DNA 複製等の面から種々のアプローチがなされているものの、突然変異の生成過程そのものが完全に解明されていないため、不明な点が数多く残されている。

一方、過酸化脂質の変異原性に関しては、ヒドロペルオキシド及びその二次分解産物であるマロンジアルデヒド等に弱い変異原性が在ることが報告されているが、抗変異原性に関する研究はほとんど行われていない。しかしながら、過酸化脂質は多数の物質の混合物であることから、抗変異原物質が存在し、本来の変異原性を修飾している可能性も十分に考えられる。

本研究では、大腸菌の紫外線誘発突然変異に対する脂肪酸過酸化物の作用について検討を行い、脂肪酸過酸化物が抗変異原性 (bio-antimutagen 活性) を示すことを初めて明らかにした。また、抗変異原物質の同定も行い、脂肪酸過酸化物中の α , β -不飽和アルデヒド類が抗変異原性を示すこと、及びこれらのアルデヒドの中でアクロレインが、最も強い抗変異原性を示すことをみいだした。さらに、アクロレインの関連化合物について抗変異原活性を調べ、抗変異原性に必要な化学構造を明らかにした。また、アクロレインの抗変異原性発現のメカニズムを明らかにするために、SOS 応答と DNA 修復の両面から検討を加えた。

第一章 脂肪酸過酸化物の抗変異原性

本論文を通じて使用した大腸菌及びサルモネラ菌の菌株と、その遺伝的特性を

^{a)} T. Kada, Toxicology Forum, 6, 580-589 (1983).

Table 1に示した。大腸菌（WP2）は、37℃で一晩培養したものをを用い、1/15Mリン酸緩衝液で洗浄後、desmutagen等による分解を考慮する必要のない変異原である紫外線を用いて、変異原処理（殺菌灯を用い2.9J/m²/sの条件で照射）を行った。処理後、菌を検体であるリノール酸自動酸化物と混合し、突然変異検出用プレート上に広げ培養を行い、変異体数と生菌数より抗変異原性の有無を検討した¹⁾。その結果、リノール酸自動酸化物の添加に伴い、生菌数の大きな減少なしに変異体の数に顕著な減少が見られ、リノール酸自動酸化物が抗変異原性を持つことが示された（Table 2）。同様の結果は、オレイン酸自動酸化物を用いた系でも得られた（Table 3）。この結果は、抗変異原性がリノール酸過酸化物に特異的な性質でないことを示している。また、リノール酸の過酸化物価と抗変異原性との関連を検討した結果、リノール酸そのものは抗変異原性を示さず、過酸化物価の上昇の後、抗変異原性が現れてくることを明らかにした（Fig. 1）¹⁾。

次に、脂肪酸過酸化物の抗変異原性に対するS-9 Mix（代謝活性化酵素+補酵素類）の作用について検討した²⁾。その結果、紫外線照射した大腸菌（WP2）を用いた系（Table 4）、及び2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide（AF2）処理をしたサルモネラ菌（TA98）を用いた系（Table 5）のいずれの場合も、リノール酸過酸化物中の抗変異原性がS-9 Mixの添加によって減少することが明らかとなった。脂肪酸過酸化物の変異原性の検出には、S-9 Mixの添加が必要なことが報告されているが、この結果により、S-9 Mixの使用について変異原の代謝活性化という作用に加え、共存する抗変異原性の減少による変異原性の顕在化という作用も考慮する必要があることを示した。

本研究は、脂肪酸過酸化物に抗変異原性があることを初めて明らかにしたものである。また、S-9 Mixの作用について、変異原の代謝活性化に加え抗変異原性の減少も考慮すべきであることを新たに示した。

第二章 アクロレイン関連化合物の抗変異原性

脂肪酸過酸化物中の抗変異原性を短期間で得るため、空気を送りながらリノール酸を加熱し強制的に過酸化物を作成し、得られた揮発性の分解産物について、抗変異原性を測定した³⁾。その結果、脂肪酸過酸化物の揮発性分解産物中に抗変

異原物質が存在することを明かにした (Table 6)。さらに、揮発性成分をガスクロマトグラフィーで分析し、主要成分を同定した。Fig. 2 にその結果を示す。これらの主要成分のうちアクロレイン、2-ヘキセナール、2-ヘプテナール、2-ノネナール、及び2,4-デカジエナールが抗変異原性を示した (Table 7)。これらの化合物はすべて α , β -不飽和アルデヒド類であり、化学構造の最も簡単なアクロレインが最も強い抗変異原性を示した³⁾。

次に、アクロレインの関連化合物10種類について化学構造と抗変異原性の関係を検討した (Table 8)⁴⁾。その結果、不飽和アルデヒドであるアクロレインと不飽和ケトンであるメチルビニルケトンに強い抗変異原性が観察された。アクロレインの3-アルキル置換体であるクロトンアルデヒド、2-ヘキセナール、及び共役二重結合を持つ2,4-デカジエナールでは抗変異原性が弱まった。3-フェニル置換体であるシンナムアルデヒドでは抗変異原性がさらに弱まった。また、不飽和酸、不飽和アルコール、不飽和エステル及び飽和アルデヒドについては、ほとんど抗変異原性が観察されなかった。以上の結果より、 α , β -不飽和カルボニル基が抗変異原性に深く関連していることを明かにした⁴⁾。

第三章 アクロレインの抗変異原性の微生物遺伝学的解析

紫外線誘発突然変異の生成メカニズムは、完全に明かにされてはいないが、recA-lexA遺伝子の制御下にあるSOS応答の発現と深い関連のあることが知られている。そこで、SOS応答よりumuDC遺伝子^{b)}の発現と λ プロファージの誘発を選び、アクロレインの抗変異原性との関連を検討した⁵⁾。umuDC遺伝子は突然変異の生成に直接関与することが知られており、その3'側を β -ガラクトシダーゼの構造遺伝子と連結したプラスミドpSK1002を用いて、遺伝子の発現量を容易に測定することが可能である。そこで、このプラスミドを大腸菌WP2株に組込み、WP2/pSK1002を作成し、umuDC遺伝子の発現に対するアクロレインの作用を検討し

^{b)} umu UV-non-mutableの略号、この遺伝子に変異が起こると突然変異が起こらなくなることから名付けられた。umuDC遺伝子の産物はrecA遺伝子の産物と共にDNAポリメラーゼに働き、DNA複製の精度を下げるということが知られている。

た。その結果、Fig. 3 に見られるようにアクロレインはumuDC遺伝子の発現を抑制した。また、もう一つのSOS応答であるλプロファージの紫外線誘発による溶菌現象(OD₆₀₀の減少)もアクロレインは抑制した(Fig. 4)。さらに、これらSOS応答の抑制と変異の生成過程との関連を調べるため、変異頻度の増加に対するアクロレインの作用について検討した⁶⁾。その結果、アクロレインは変異体の総数を減少させること、及び変異頻度の増加は、アクロレインの有無にかかわらず、約2時間で終了することが示された(Fig. 5)。アクロレインによるSOS応答の抑制は2時間以内でもはっきり見られることから(Fig. 3, Fig. 4)、アクロレインの存在下では、変異頻度の増加する期間を通じてSOS応答の抑制が起こっていることを明かにした。この事実は、アクロレインによるSOS応答の抑制が、抗変異原性の発現に関与していることを示すものである。

次に、DNA修復に関して野生株であるWP2と、DNAの除去修復欠損株であるWP2s及びZA159の3株を用いて、DNA修復とアクロレインの抗変異原性との関連について検討をおこなった⁶⁾。その結果、紫外線照射後の大腸菌を30℃で培養した場合、野生株に対してアクロレインは抗変異原性を示したが、除去修復欠損株には抗変異原性を示さなかった(Table 9)。一方、40℃で培養した場合は、野生株において抗変異原性が増加するとともに、除去修復欠損株においても抗変異原性が観察されるようになった(Table 10)。この温度依存性の現象をさらに解析するため、ヒートショック応答を制御しているrpoH遺伝子に変異を持つrpoH15遺伝子を、WP2及びZA159に導入したAI10及びAI11株を作成し、アクロレインの抗変異原性について検討を行った⁶⁾。その結果、ヒートショック応答が抑制されている場合、紫外線照射後30℃で培養した除去修復欠損株(AI11)においても、抗変異原性は観察された(Table 11)。以上の結果から、アクロレインの抗変異原性には、少なくとも除去修復依存性と非依存性の二つの機構が関与すること、及び除去修復非依存性の機構は、培養温度やヒートショック応答と関連していることを明らかにした。

本研究は、SOS応答の抑制が抗変異原性の発現に関与していることを示すとともに、抗変異原性と培養温度及びヒートショック応答との関係を初めて明らかにしたものである。

結 論

本研究は、紫外線誘発突然変異に対する脂肪酸過酸化物の作用について検討を行い、脂肪酸過酸化物が抗変異原性を持つことを初めて明らかにしたものである。

また、S-9 Mixが脂肪酸過酸化物中の抗変異原性を減少させることを示し、S-9 Mixの作用として抗変異原性の減少も考慮する必要があることを指摘した。

次に、脂肪酸過酸化物の抗変異原物質について同定を行い、揮発性成分中の α 、 β -不飽和アルデヒド類が抗変異原性を示すこと、及びこれらの不飽和アルデヒドの中でアクロレインが最も強い抗変異原性を持つこと等を見いだした。さらに、アクロレインの関連化合物についてその抗変異原性を検討し、 α 、 β -不飽和カルボニル化合物が強い抗変異原性を持つこと、及びアクロレインの3-アルキル置換は抗変異原性を減少させること等を明らかにした。

一方、アクロレインの抗変異原性の発現機構について微生物遺伝学的解析を行い、突然変異の生成に直接関与するumuDC遺伝子の発現や λ プロファージの誘発等のSOS応答をアクロレインが抑制することを示した。また、DNAの除去修復欠損株を用いて、抗変異原性が培養温度に依存していることを見だし、ヒートショック応答が抗変異原性に関与していることを初めて明らかにした。

原著論文

- 1) K. Aikawa and Y. Komatu, Agric. Biol. Chem., 51, 2717-2720 (1987).
- 2) K. Aikawa, Agric. Biol. Chem., 52, 2115-2116 (1988).
- 3) K. Aikawa and K. Chikuni, Mutation Res., 208, 163-166 (1988).
- 4) K. Aikawa and K. Chikuni, Agric. Biol. Chem., 53, 253-254 (1989).
- 5) K. Aikawa, K. Chikuni and M. Miwa, Agric. Biol. Chem., 55, 2425-2426 (1991).
- 6) K. Aikawa and M. Miwa, Mutation Res., 301, 93-97 (1993).

参考論文

- 1) K. Aikawa and G. Chikuma, Agric. Biol. Chem., 48, 1621-1623 (1984).
- 2) K. Aikawa and G. Chikuma, Agric. Biol. Chem., 49, 1863-1864 (1985).
- 3) T. Kada, M. Kato, K. Aikawa and S. Kiriya, Mutation Res., 141, 149-152 (1984).
- 4) T. Inoue, K. Aikawa, H. Tezuka, T. Kada and D. Shultz, Cancer Res., 46, 3979-3982 (1986).

Table 1. Bacterial strains

| Strain | Marker | (Phage) | /Plasmid |
|-----------------------|-------------------------|---|------------------------------|
| <u>E. coli B/r</u> | | | |
| WP2 | <u>trpE56</u> | <u>malB-15</u> | <u>lon-11</u> <u>sulA1</u> |
| WP2s | as WP2, | but <u>uvrA155</u> | |
| ZA159 | as WP2, | but Δ (<u>uvrB</u> <u>chl</u>) | |
| CM571 | as WP2, | but <u>recA56</u> | |
| AI10 | as WP2, | but <u>rpoH15</u> | |
| AI11 | as ZA159, | but <u>rpoH15</u> | |
| WP2/pSK1002 | as WP2, | but /pSK1002 | <u>umuDC'</u> - <u>lacZ'</u> |
| <u>E. coli K-12</u> | | | |
| W4110 | <u>proA</u> or <u>B</u> | <u>str</u> | (λ) |
| <u>S. typhimurium</u> | | | |
| TA98 | <u>rfa</u> | Δ (<u>gal</u> <u>chl</u> <u>bio</u> <u>uvrB</u>) | /pKM101 |

Table 2. EFFECTS OF AUTOXIDIZED LINOLEIC ACID (P.O.V. = 1,482 meq/kg) ON CELL VIABILITY AND UV MUTAGENESIS IN *E. coli* WP2

| Amount of autoxidized linoleic acid (mg/plate) | Viable cells per plate ($\times 10^6$) | Number of Trp ⁺ colonies per plate | Mutation frequency ($\times 10^{-8}$) |
|--|--|---|---|
| 0 | 109 | 771 | 707 |
| 2 | 88 | 439 | 499 |
| 4 | 78 | 152 | 195 |
| 6 | 78 | 80 | 103 |
| 8 | 84 | 33 | 39 |

Table 3. EFFECTS OF AUTOXIDIZED OLEIC ACID (P.O.V. = 690 meq/kg) ON CELL VIABILITY AND UV MUTAGENESIS IN *E. coli* WP2

| Amount of autoxidized oleic acid (mg/plate) | Viable cells per plate ($\times 10^6$) | Number of Trp ⁺ colonies per plate | Mutation frequency ($\times 10^{-8}$) |
|---|--|---|---|
| 0 | 122 | 542 | 444 |
| 1.25 | 111 | 403 | 363 |
| 2.50 | 100 | 284 | 284 |
| 3.75 | 118 | 90 | 76 |
| 5.00 | 106 | 61 | 58 |

* peroxide value

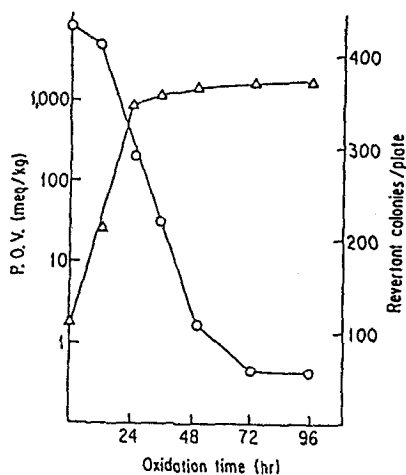


Fig. 1. Correlation between Changes in the P.O.V. of Autoxidized Linoleic Acid and Antimutagenic Activity in WP2.

The cells were UV irradiated at 66 J/m^2 and spread on SEM plates with various kinds of autoxidized linoleic acid (5 mg/plate). (Δ), P.O.V.; (○), revertant colonies.

Table 4. EFFECTS OF S-9 MIX ON ANTIMUTAGENIC ACTIVITY OF AUTOXIDIZED LINOLEIC ACID (AOLA) IN UV INDUCED MUTAGENESIS OF *E. coli* B/r WP2

| Treatment | Trp ⁺ revertants/plate | |
|------------------------------|-----------------------------------|-----|
| | +UV | -UV |
| AOLA 0mg | 1,153 | 3 |
| AOLA 5mg | 105 | 7 |
| AOLA 5mg+S-9 Mix 200 μ l | 121 | 2 |
| AOLA 5mg+S-9 Mix 400 μ l | 195 | 6 |
| AOLA 5mg+S-9 Mix 600 μ l | 263 | 6 |
| AOLA 5mg+S-9 Mix 800 μ l | 355 | 7 |

Peroxide value of AOLA was 1110 meq/kg.

Table 5. EFFECTS OF S-9 MIX ON ANTIMUTAGENIC ACTIVITY OF AUTOXIDIZED LINOLEIC ACID (AOLA) IN AF2 INDUCED MUTAGENESIS OF *S. typhimurium* TA98

| Treatment | His ⁺ revertants/plate | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------|
| | +AF2 | -AF2 |
| AOLA 0 μ g | 312 | 17 |
| AOLA 40 μ g | 28 | 14 |
| AOLA 40 μ g+S-9 Mix 50 μ l | 28 | 9 |
| AOLA 40 μ g+S-9 Mix 100 μ l | 75 | 7 |
| AOLA 40 μ g+S-9 Mix 150 μ l | 127 | 14 |
| AOLA 40 μ g+S-9 Mix 200 μ l | 172 | 19 |

Peroxide value of AOLA was 1110 meq/kg.

Table 6

EFFECTS OF THE WATER-SOLUBLE FRACTION FROM VOLATILE PRODUCTS ON CELL VIABILITY AND UV MUTAGENESIS IN *E. coli* B/r WP2

| Amount of water-soluble fraction (μ l/plate) | Viable cells/plate ($\times 10^6$) | Trp ⁺ colonies/plate |
|---|--------------------------------------|---------------------------------|
| 0 | 105 | 718 |
| 10 | 84 | 296 |
| 20 | 95 | 103 |
| 30 | 109 | 34 |
| 40 | 116 | 18 |

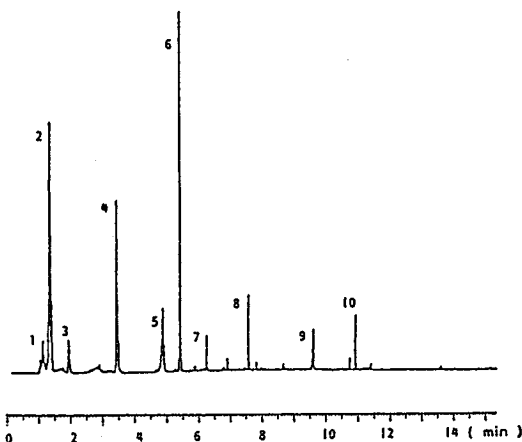


Fig. 2. Gas chromatogram of the water-soluble fraction from volatile products. 1, acetaldehyde; 2, acrolein; 3, butylaldehyde; 4, pentanal; 5, amyl alcohol; 6, hexanal; 7, 2-hexenal; 8, 2-heptenal; 9, 2-nonenal; 10, 2,4-decadienal.

Table 7

EFFECTS OF ACROLEIN, 2-HEXENAL, 2-HEPTENAL, 2-NONENAL AND 2,4-DECADIENAL ON CELL VIABILITY AND UV MUTAGENESIS IN *E. coli* B/r WP2

| | Viable cells/plate ($\times 10^6$) | Trp ⁺ colonies/plate |
|------------------------------|---|---------------------------------|
| acrolein | | |
| 0 $\mu\text{g}/\text{plate}$ | 141 | 633 |
| 5 | 116 | 177 |
| 10 | 127 | 49 |
| 15 | 117 | 33 |
| 20 | 115 | 20 |
| 2-hexenal | | |
| 0 | 204 | 730 |
| 50 | 198 | 550 |
| 100 | 158 | 454 |
| 150 | 163 | 302 |
| 200 | 161 | 256 |
| 2-heptenal | | |
| 0 | 204 | 730 |
| 50 | 185 | 516 |
| 100 | 158 | 304 |
| 150 | 168 | 194 |
| 200 | 144 | 144 |
| 2-nonenal | | |
| 0 | 147 | 868 |
| 50 | 136 | 531 |
| 100 | 120 | 342 |
| 150 | 120 | 198 |
| 200 | 123 | 105 |
| 2,4-decadienal | | |
| 0 | 141 | 633 |
| 50 | 121 | 466 |
| 100 | 110 | 335 |
| 150 | 101 | 193 |
| 200 | 81 | 82 |

Table 8. EFFECTS OF ACROLEIN-RELATED COMPOUNDS ON CELL VIABILITY AND UV MUTAGENESIS IN *E. coli* B/r WP2

| No. | Name | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Trp ⁺ colonies/ plate | Viable cells/ plate |
|-----|---------------------|--|--|---------------------------|
| | None | | 733 | 131 |
| 1 | Acrolein | 5 | 252 | 133 |
| | | 10 | 87 | 124 |
| | | 15 | 54 | 120 |
| 2 | Methyl vinyl ketone | 15 | 234 | 121 |
| | | 30 | 105 | 123 |
| 3 | Crotonaldehyde | 45 | 46 | 114 |
| | | 50 | 442 | 125 |
| | | 100 | 331 | 114 |
| 4 | 2-Hexenal | 150 | 215 | 121 |
| | | 50 | 626 | 138 |
| | | 100 | 441 | 120 |
| 5 | 2,4-Decadienal | 150 | 377 | 130 |
| | | 50 | 571 | 132 |
| | | 100 | 510 | 135 |
| 6 | Cinnamaldehyde | 150 | 344 | 103 |
| | | 300 | 577 | 119 |
| | | 450 | 483 | 116 |
| 7 | Propionaldehyde | 450 | 234 | 114 |
| | | 150 | 499 | 123 |
| | | 300 | 454 | 127 |
| 8 | Acrylic acid | 450 | 402 | 135 |
| | | 150 | 709 | 134 |
| | | 300 | 691 | 134 |
| 9 | Allyl alcohol | 450 | 643 | 135 |
| | | 150 | 668 | 144 |
| | | 300 | 536 | 136 |
| 10 | Methyl acrylate | 450 | 531 | 145 |
| | | 150 | 758 | 130 |
| | | 300 | 642 | 142 |
| | | 450 | 582 | 123 |

Individual points are the means of 2 experiments.

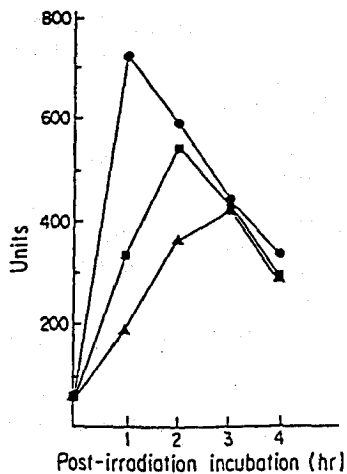


Fig. 3. Effects of Acrolein on the Induction of *umuDC* Gene.

UV-irradiated (66 J/m^2) *E. coli* WP2/pSK1002 cells were cultured with acrolein (0–4.6 $\mu\text{g/ml}$) and the induction of *umuDC* gene was investigated by the β -galactosidase activity. (●), 0 $\mu\text{g/ml}$; (■), 2.3 $\mu\text{g/ml}$; (▲), 4.6 $\mu\text{g/ml}$ acrolein.

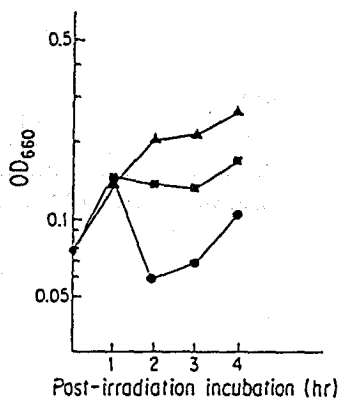


Fig. 4. Effects of Acrolein on the Induction of λ Phage.

UV-irradiated (27 J/m^2) *E. coli* W4110 (λ) cells were cultured with acrolein (0–4.6 $\mu\text{g/ml}$) and the induction of λ phage was detected by the reduction of OD_{660} . (●), 0 $\mu\text{g/ml}$; (■), 2.3 $\mu\text{g/ml}$; (▲), 4.6 $\mu\text{g/ml}$ acrolein.

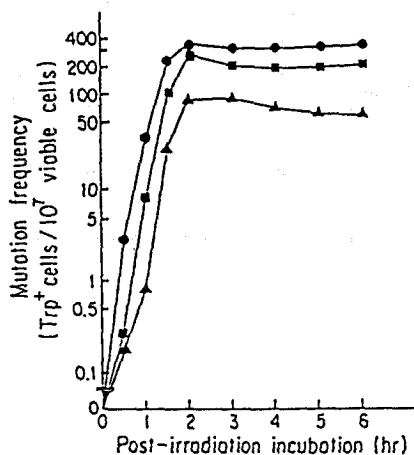


Fig. 5. Effects of Acrolein on Mutagenesis.

UV-irradiated (66 J/m^2) *E. coli* B/r WP2 cells were cultured with acrolein (0–4.6 $\mu\text{g/ml}$) and fixed Trp^+ mutants were detected on the minimum agar plates. (●), 0 $\mu\text{g/ml}$; (■), 2.3 $\mu\text{g/ml}$; (▲), 4.6 $\mu\text{g/ml}$ acrolein.

Table 9

EFFECTS OF ACROLEIN ON VIABLE CELLS AND Trp⁺ MUTANT CELLS
WHEN UV-IRRADIATED CELLS WERE INCUBATED AT 30°C

| Acrolein μg/plate | WP2 | | | WP2s(<u>uvrA155</u>) | | | ZA159(<u>ΔuvrB</u>) | | |
|----------------------|----------------|----------------|-----------------|------------------------|-----|-----|-----------------------|-----|-----|
| | C ^a | M ^b | MF ^c | C | M | MF | C | M | MF |
| 0 | 124 | 767 | 619 | 154 | 784 | 509 | 162 | 863 | 533 |
| 4.5 | 123 | 174 | 141 | 150 | 630 | 420 | 169 | 752 | 445 |
| 9 | 121 | 72 | 60 | 139 | 655 | 471 | 161 | 732 | 455 |
| 18 | 111 | 44 | 40 | 138 | 660 | 478 | 142 | 721 | 508 |

The number of spontaneous mutants per plate was 4 for WP2,
2 for WP2s and 4 for ZA159.

^aNumber of colonies/plate.

^bNumber of mutant colonies/plate.

^cMutation frequency (number of mutant cells/10⁸ viable cells).

Table 10

EFFECTS OF ACROLEIN ON VIABLE CELLS AND Trp⁺ MUTANT CELLS
WHEN UV-IRRADIATED CELLS WERE INCUBATED AT 40°C

| | WP2 | | | WP2s(<u>uvrA155</u>) | | | ZA159(Δ <u>uvrB</u>) | | |
|---------------|----------------|----------------|-----------------|------------------------|-----|-----|-------------------------------|-----|-----|
| Acrolein | | | | | | | | | |
| μ g/plate | C ^a | M ^b | MF ^c | C | M | MF | C | M | MF |
| 0 | 127 | 533 | 420 | 145 | 206 | 142 | 157 | 353 | 225 |
| 4.5 | 123 | 95 | 77 | 109 | 104 | 95 | 152 | 165 | 109 |
| 9 | 105 | 36 | 34 | 93 | 46 | 49 | 132 | 110 | 83 |
| 18 | 93 | 13 | 14 | 88 | 30 | 34 | 112 | 44 | 39 |

The number of spontaneous mutants per plate was 3 for WP2,
1 for WP2s and 3 for ZA159.

^aNumber of colonies/plate.

^bNumber of mutant colonies/plate.

^cMutation frequency (number of mutant cells/10⁸ viable cells).

Table 11

EFFECTS OF ACROLEIN ON VIABLE CELLS AND Trp⁺ MUTANT CELLS
WHEN UV-IRRADIATED rpoH15 STRAINS WERE INCUBATED AT 30°C

| Acrolein μg/plate | A110(<u>rpoH15</u>) | | | A111(Δ <u>uvrB</u> , <u>rpoH15</u>) | | |
|----------------------|-----------------------|----------------|-----------------|--------------------------------------|-----|-----|
| | C ^a | M ^b | MF ^c | C | M | MF |
| 0 | 115 | 241 | 419 | 108 | 228 | 422 |
| 4.5 | 111 | 30 | 54 | 96 | 83 | 173 |
| 9 | 120 | 13 | 22 | 85 | 70 | 165 |
| 18 | 87 | 6 | 14 | 72 | 50 | 139 |

The number of spontaneous mutants per plate was 5 for A110 and 6 for A111.

^aNumber of colonies/plate.

^bNumber of mutant colonies/plate.

^cMutation frequency (number of mutant cells/10⁸ viable cells).

論文審査の要旨

抗変異原物質は、変異原の活性を抑制する作用を持つ物質である。過酸化物質の変異原性に関してはヒドロペルオキシド及びその二次分解産物に弱い変異原性があることが知られているが、抗変異原性に関する研究はほとんど行われていない。

本研究は脂肪酸過酸化物が抗変異原性を示すことをはじめて明らかにし、抗変異原物質は α 、 β -不飽和アルデヒド類が抗変異原性を示すことをつきとめ、そのうちアクロレインが最も強い抗変異原性を示すことを見出した。さらに、アクロレインの抗変異原性発現のメカニズムについて、SOS 応答と DNA 修復の両面から詳細な検討を加えたものである。

本研究は大腸菌とサルモネラ菌を用いた。変異原には desmutagen 等による分解を考慮する必要のない変異原である紫外線を用いた。リノール酸の自動酸化物が抗変異原性を示すことを見出した。リノール酸のみならずオレイン酸などの脂肪酸の過酸化物中に抗変異原物質が現れることを明らかにした。さらに、代謝活性化酵素と補酵素類の混合物である S-9 Mix の使用により、変異原の代謝活性化に加え抗変異原性の減少も考慮すべきであることを示した。

脂肪酸過酸化物中の抗変異原性物質の構造活性相関を検討した結果、 α 、 β -不飽和カルボニル基をもつものが抗変異原性を示すことを明らかにした。さらに、抗変異原性は最も構造の簡単なアクロレインが最強であることを明らかにした。

アクロレインの抗変異性のメカニズムを探るために微生物遺伝学的解析を加えた。紫外線誘発突然変の生成メカニズムに関与する recA-lexA 遺伝子の制御下にある SOS 応答の発現とのかかわりを umuDC 遺伝子の発現と λ プロフェージの誘発の点から検討を加えた。アクロレインによる SOS 応答の抑制が抗変異性に関与していることを示した。さらに、DNA の除去修復欠損株を用いて検討を行ったところ、除去修復欠損株は抗変異原性を示さないことを示した。ところが、40℃で培養した場合に、除去修復欠損株においても抗変異性を示すことを見出した。この温度依存性を解析した結果、アクロレインの抗変異原性には、すくなくとも除去修復依存性と非依存性の二つの機構が関与すること、そして除去修復非依存性の機構は温度やヒートショック応答と関連していることを初めて明らかにしたものである。

以上の結果、審査員一同本研究者に博士（農学）の学位を授与するに価するものと認定した。