

大腸菌における抗突然変異因子の
作用機構に関する研究

名古屋大学図書	
和	978897

太田 敏博

報告番号	2 第 3090 号
------	------------

目 次

序	-----	1
第1章 変異原物質及び紫外線による誘発突然変異に対する抗突然変異因子		
の検索	-----	1 2
第1節 緒言	-----	1 2
第2節 材料と方法	-----	1 4
第3節 結果	-----	2 2
第4節 考察	-----	3 7
第5節 要約	-----	4 4
第6節 参考文献	-----	4 6
第2章 DNAのSOS修復系の誘発過程を阻害して抗突然変異活性を示す		
因子の検索	-----	4 7
第1節 緒言	-----	4 7
第2節 材料と方法	-----	5 2
第3節 結果	-----	6 4
第4節 考察	-----	7 7
第5節 要約	-----	8 0
第6節 参考文献	-----	8 3
第3章 抗突然変異因子, 桂皮アルデヒドの作用機構の遺伝学的解析	-----	8 6
第1節 緒言	-----	8 6
第2節 材料と方法	-----	8 8
第3節 結果	-----	1 0 0
第4節 考察	-----	1 1 9

第5節 要約	-----	128
第6節 参考文献	-----	132
第4章 RecA蛋白質の <u>in vitro</u> 酵素反応に対する桂皮アルデヒドの作用	--	135
第1節 緒言	-----	135
第2節 材料と方法	-----	137
第3節 結果	-----	157
第4節 考察	-----	172
第5節 要約	-----	176
第6節 参考文献	-----	179
第5章 総合考察	-----	181
謝辞	-----	189

序

今日、医薬、農薬、食品添加物、化学工業製品をはじめとする実に莫大の種類の化学物質が毎年生産され、われわれの身のまわりに存在している。化学物質の有する突然変異誘発作用（変異原性、Mutagenicity）の重要性が発ガン性との関連から注目されるようになって10年以上が経つ。この間にファージ、細菌、酵母、哺乳動物培養細胞、そして昆虫から哺乳動物個体に至るまで様々な生物系での変異原性検出試験法が開発されてきた（Hollstein et al., 1979）。なかでも大腸菌やサルモネラ菌を用いた微生物変異原性試験法は、その簡便性、迅速性、および経済性ゆえに目ざましい改良が加えられ、現在最も感受性の高い試験法として確立されている。この変異原性試験法の著しい発展の結果、環境中から突然変異誘発作用をもつ物質（変異原物質、Mutagen）を極めて鋭敏に検出することが可能となっ

た。当初は多環芳香族炭化水素類、アルキル化剤、ニトロソアミン類、制癌剤などの合成化学物質の変異原性が注目されていたが、近年、天然物や食品中にも多くの変異原物質が存在することが明らかになってきた。なかでも、食品の加熱調理によって生じるヘテロサイクリックアミン類の中には合成化学物質よりもはるかに強い変異原物質が存在すること、また、大気汚染物質の浮遊じん中にもニトロ化多環芳香族炭化水素類の強力な変異原物質が含まれていることがわかってきた。このように、われわれは日常生活において変異原性を有する様々な物質と接触し、また食物を通して摂取している訳である。

変異原物質によるDNA傷害は生物に対して種々の悪影響をもたらす。体細胞における遺伝子突然変異は多くのがんの発生の引きがねになっていると考えられている。事実、約80%の発がん物質に変異原性があることが知られている (Ames et al., 1975 ; Sugimura et al.,

1976)。さらには体細胞突然変異の蓄積と老化の関連も古くより論じられている。一方、生殖細胞に遺伝性突然変異が生じればその子孫に先天性遺伝病などの遺伝的欠損を招くことになる。したがって、突然変異は発がんという単一個体レベルの問題にとどまらず、子孫に対する遺伝毒性の観点からも重大な問題である。そこで、このような変異原物質の作用を抑制あるいは軽減させることはヒトの健康のために極めて大切なことであると考えられる。このような観点からここ数年来、突然変異誘発作用を抑制する因子の検索が試みられ、いくつかの有効因子が報告されてきている。これらの因子は抗突然変異因子 (Anti-mutagen) と呼ばれているが、その作用面から次の2つに大別されるものである (図0-1. 参照)。

第1は、変異原物質を直接的ないしは間接的に不活性化する型の因子で Desmutagen と呼ばれているものである。近年報告されてきて

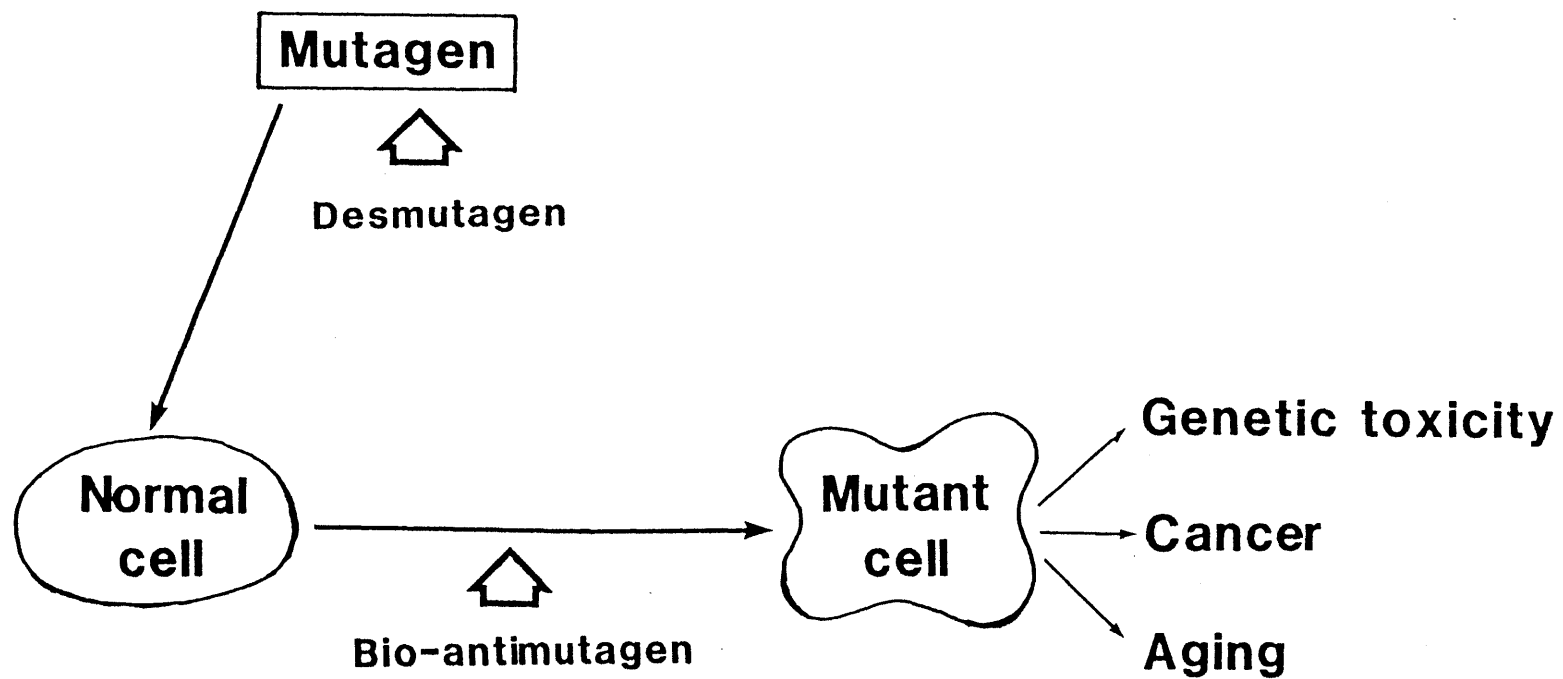


Fig. 0-1. Schematic actions of 'Desmutagen' and 'Bio-antimutagen' (Kada, 1984)

いる抗突然変異因子の大部分はこの型に属すると考えられる。この種の因子には、

(1) 変異原物質と直接化学反応を起こし不活性する因子。例えば、システイン、ビタミンCなどの還元剤による変異原物質キャプタンの失活反応 (Moriya et. al., 1978)。

(2) 変異原物質に直接作用し不活性化する酵素。例えば、パーオキシダーゼによる変異原物質 Trp-P-1 の失活反応 (Inoue et al., 1981)。

(3) 変異原物質の代謝活性化反応の阻害因子。例えば、オレイン酸、リノール酸など不飽和脂肪酸による変異原物質ジメチルニトロソアミンの代謝活性化反応の阻害 (Hayatsu et. al., 1981)。

(4) 変異原物質の吸着因子。例えば、ヘミンによる変異原物質 Trp-P-1 の吸着 (Arimoto et al., 1980)。

などが含まれるが、いずれも変異原物質が細胞の DNA に作用する以前の段階で作用する因子である。

第2の因子は変異原物質により、DNA損傷が生じた細胞における突然変異生成過程で抑制効果を示し、結果的に突然変異誘発頻度の低下をもたらす因子で、このようなタイプの因子は Bio-antimutagen として区別されるものである。この種の因子としては、古くは1960年代頃から微生物遺伝学の分野でいくつかの因子が報告されている (Clarke & Shankel, 1975)。しかし、それらはいずれも自然突然変異 (Spontaneous mutation) に対する抑制作用の研究であり、放射線や化学物質による誘発突然変異 (Induced mutation) に対する研究としては、紫外線誘発突然変異に対するアンチパインの抑制作用 (Meyn et al., 1977)、N - メチル - N' - ニトロ - N - ニトロソグアニジン (MNNG) 誘発突然変異に対する塩化コバルトの抑制作用 (Kada & Kanematsu, 1978)、および、4 - ニトロキノリン 1 - オキシド (4-NQO) 誘発突然変異に対するカフェインの突然変異抑制作用 (Ichikawa-Ryo & Kondo, 1980) などの報告が

あるのみである。しかも、その突然変異抑制作用の機構の詳細にいたってほとんど解明されてはいない。

本研究は後者の型に属する抗突然変異因子である Bio-antimutagen に着眼し、新たに抗突然変異因子の検索とその作用機構の解明を目的とした。本論文の第1章では大腸菌において変異原物質および紫外線によって誘発された突然変異に対する抗突然変異因子の検索を行い、その結果、桂皮アルデヒド、クマリン、ウンベリフェロン、アニスアルデヒド、エチルバニリン、および、バニリンの6種の化合物にその活性があることを見出した。

第2章においては上記の抗突然変異因子の作用機構を知る目的で、大腸菌における突然変異生成経路の1つである SOS 修復の誘発を抑制する作用について検討したが、SOS 修復誘発に対する阻害作用は認められなかった。一方で、SOS 修復の誘発を阻害することにより抗突然変異活性を示す因子の検索も行った。

その結果、5 - フルオロウラシルと5 - フルオロデオキシウリジンが紫外線誘発突然変異に対し、SOS修復の誘発を抑制することにより強い抗突然変異活性を示すことを明らかにした。

第3章においては、第1章で検出した抗突然変異因子の1つから桂皮アルデヒドを例にとり、その抗突然変異作用の機構の解析を行った。種々のDNA修復変異株を用いた遺伝学的解析の結果、桂皮アルデヒドは突然変異生成の原因とほる誤りを生じ易いSOS修復を阻害するのではなく、正確なDNA修復系である組換修復機能を促進することにより突然変異誘発頻度を下げることが強く示唆される結果を得た。

第4章では大腸菌より精製されたRecA蛋白質とfdファージのDNAとを用いて、RecA蛋白質の司る酵素反応の1つからATPase活性およびヘテロ二重鎖形成反応を in vitro で種々の条件下で測定し、桂皮アルデヒドの効果を検討

した。

以上の総合成績に基づいて、大腸菌における誘発突然変異に対する抗突然変異因子の作用形式について論述した。

参考文献

- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Res.*, 31, 347-364.
- Arimoto, S., Y. Ohara, T. Namba, T. Negishi and H. Hayatsu (1980) Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 662-668.
- Clarke, C. H. and D. M. Shankel (1975) Antimutagenesis in microbial system, *Bacteriol. Rev.*, 39, 33-53.
- Hayatsu, H., S. Arimoto, K. Togawa, and M. Makita (1981) Inhibitory effect of the ether extract of human feces on activities of mutagens: inhibition by oleic and linoleic acids, *Mutation Res.*, 81, 287-293.
- Hollstein, M., J. McCann, F. A. Angelosanto and W. W. Nichols (1979) Short-term tests for carcinogens and mutagens, *Mutation Res.*, 65, 133-226.
- Ichikawa-Ryo, H. and S. Kondo (1980) Differential antimutagenic effects of caffeine and the protease inhibitor antipain on mutagenesis by various mutagens in Escherichia coli, *Mutation Res.*, 72, 311-322.
- Inoue, T., K. Morita and T. Kada (1981) Purification and properties of a plant desmutagenic factor for the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 345-353.

- Kada, T. and N. Kanamatsu (1978) Reduction of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mutations by cobalt chloride in Escherichia coli, Proc. Japan Acad., 54(B), 234-237.
- Kada, T. (1984) Desmutagens and bio-antimutagens: Their action mechanisms and possible roles in the modulation of dose-mutation relationships, in: Tajima, Y., S. Kondo and Y. Kuroda (Eds.), Problems of Threshold in Chemical Mutagenesis, The Environmental Mutagen Society of Japan, pp.73-82.
- Meyn, M. S., T. Rossman and W. Troll (1977) A protease inhibitor blocks SOS functions in Escherichia coli: Antipain prevents λ repressor inactivation, ultraviolet mutagenesis, and filamentous growth, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 74, 1152-1156.
- Moriya, M., K. Kato and Y. Shirasu (1978) Effects of cysteine and a liver metabolic activation system on the activities of mutagenic pesticides, Mutation Res., 57, 259-263.
- Sugimura, T., S. Sato, M. Nagao, T. Yahagi, T. Matsushima, Y. Seino, M. Takeuchi and T. Kawachi (1976) Overlapping of carcinogens and mutagens, in: Magee, P. N., S. Takayama, T. Sugimura and T. Matsushima (Eds.), Fundamentals in Cancer Prevention, University of Tokyo Press, pp.191-215.

第 1 章 変異原物質及び紫外線による誘発突然変異に対する抗突然変異因子の検索

第 1 節 緒言

本章では種々の化学物質のうちから香料成分として利用されている化合物およびその誘導体 43 種を試料として、紫外線 (UV) および代表的な変異原物質である 4-ニトロキノリン 1-オキシド (4-NQO) と N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG) による誘発突然変異に対する抗突然変異活性の検索を行った結果について、及びそこで活性の認められた突然変異抑制因子が Desmutagen としてではなく、Bio-antimutagen として作用することについての研究を論述する。

香料は食品添加物や化粧品などに広く利用され、われわれの生活に深く関連のある化合物であることから、香料成分が抗突然変異活性をもつことは、例えば食品中に含まれる種々の変異原物質の安全性評価に際しても重要

なことであると考えられる。

第2節 材料と方法

1. 香料成分

抗突然変異活性の検索を行った43種の香料成分の物質名、構造式、および入手先を表1-1. に示した。

2. 変異原物質

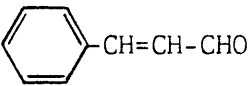
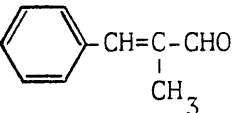
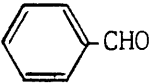
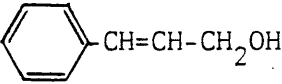
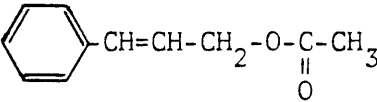
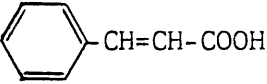
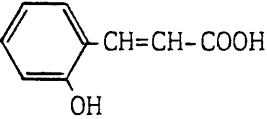
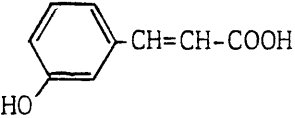
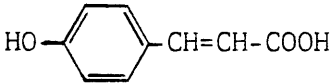
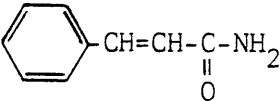
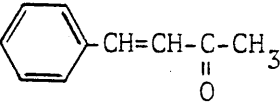
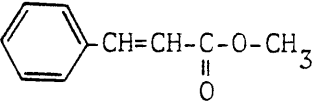
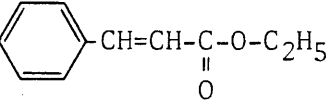
4 - ニトロキノリン 1 - オキシド (4-NQO)、4 - ヒドロキシアミノキノリン 1 - オキシド (4-HAQO) は東京化成工業より、また、N - メチル - N' - ニトロ - N - ニトロソグアニジン (MNNG) は和光純薬工業より入手した。いずれもジメチルスルホキシド (和光純薬工業) に溶かして使用した。

3. 菌株

E. coli WP2s : uvrA、trpE、malB、lon、sulA

大腸菌 B 株由来の本菌株は変異原物質の検出目的で汎用されており、国立遺伝学研究所の賀田恒夫教授より分与されたものである。

Table 1-1 List of tested compounds.

No.	Compound	Structure	Source ^{a)}
1	<i>trans</i> -Cinnamaldehyde		TK
2	α -Methyl cinnamaldehyde		TK
3	Benzaldehyde		NC
4	Cinnamyl alcohol		TK
5	Cinnamyl acetate		TK
6	<i>trans</i> -Cinnamic acid		TK
7	<i>trans</i> - <i>o</i> -Hydroxycinnamic acid		TK
8	<i>trans</i> - <i>m</i> -Hydroxycinnamic acid		TK
9	<i>p</i> -Hydroxycinnamic acid		TK
10	Cinnamamide		TK
11	Cinnamyl methyl ketone (Benzalacetone)		TK
12	Methyl cinnamate		TK
13	Ethyl cinnamate		TK

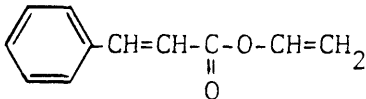
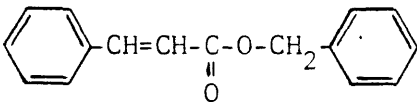
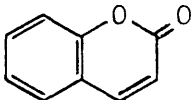
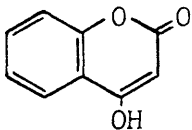
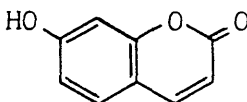
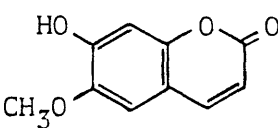
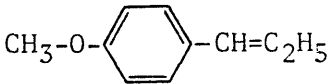
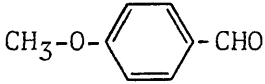
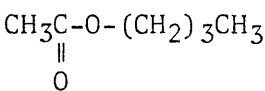
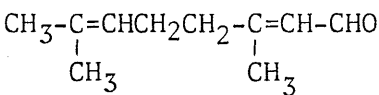
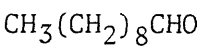
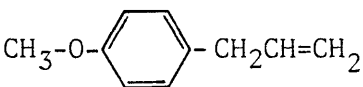
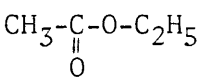
14	Vinyl cinnamate		TK
15	Benzyl cinnamate		TK
16	Coumarin		TK
17	4-Hydroxycoumarin		TK
18	7-Hydroxycoumarin (Umbelliferone)		TK
19	7-Hydroxy-6-methoxy- coumarin (Scopoletin)		SC
20	Anethole		TK
21	<i>p</i> -Anisaldehyde		TK
22	<i>n</i> -Butyl acetate		TK
23	Citral		TK
24	<i>n</i> -Decylaldehyde		TK
25	Estragole		TK
26	Ethyl acetate		TK

Table 1-1 (continued)

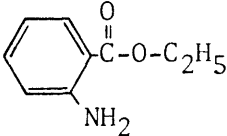
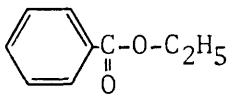
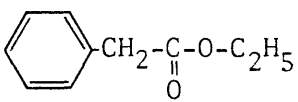
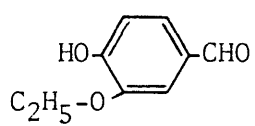
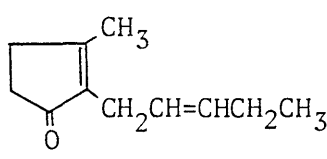
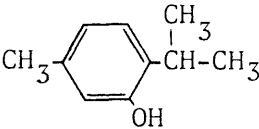
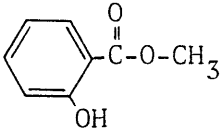
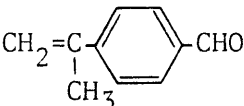
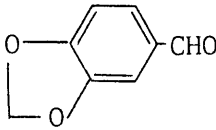
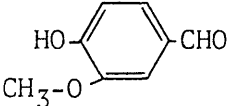
27	Ethyl acetoacetate	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5$	TK
28	Ethyl anthranilate		TK
29	Ethyl benzoate		TK
30	Ethyl caprylate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5$	TK
31	Ethyl isovalerate	$\text{CH}_3-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5$	TK
32	Ethyl phenylacetate		TK
33	Ethyl vanillin		TK
34	Geraniol	$\text{CH}_3-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH}$	TK
35	Isoamyl butyrate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_3$	TK
36	Isoamyl formate	$\text{HC}-\underset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_3$	TK
37	Jasmone		TK
38	Linalool	$\text{CH}_3-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{OH}}{\text{C}}}-\text{CH}=\text{CH}_2$	TK

Table 1-1 (continued)

39	<i>dl</i> -Menthol		TK
40	Methyl salicylate		TK
41	<i>dl</i> -Perillaldehyde		TK
42	Piperonal		TK
43	Vanillin		TK

a) TK, Tokyo Kasei Kogyo; NC, Nakarai Chemicals; SC, Sigma Chemical

4. 培地

(1) Nutrient 培地 (1ℓ 中の組成)

BBL Nutrient broth	8 g
NaCl	5 g

(2) Vogel-Bonner E 最少寒天培地 (1ℓ 中の組成)

クエン酸・1水塩	2 g
K_2HPO_4	10 g
$Na(NH_4)HPO_4 \cdot 4H_2O$	3.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
グルコース	4 g
Difco 寒天	15 g

(3) SEM (semi-enriched minimal) 寒天培地

Vogel-Bonner E 最少寒天培地に Nutrient 培地を 5% (v/v) 加えた。

この培地はトリプトファン要求性から非要求性への突然変異を測定するのに適しており、培地中の少量の Nutrient broth に含まれているトリプトファンは突然変異の固定のための数

回の分裂に必要な量であり、また、生存菌数測定の際には計数可能な大きさのコロニーを形成するのに充分な量である (Witkin, 1975)。香料成分は少量のジメチルスルホキシドに溶かし、あらかじめオートクレーブ滅菌した SEM 寒天培地に加えて均一に混ぜ、約 20 ml のフシャーレに分注した。SEM 寒天培地中のジメチルスルホキシドの最終濃度は 0.1 % 以下にした。調製したプレートは 37 ~ 40 °C で一晩乾燥させた後、2 日以内に実験に使用した。

5. 抗突然変異活性の測定

Nutrient 培地で培養した WP2s 株の対数増殖期の菌液 (約 $1 \sim 2 \times 10^9 / \text{ml}$) を $1/15 \text{ M}$ リン酸緩衝液で 2 度洗った後、変異原物質溶液を加え 37 °C で 15 ~ 60 分間処理した。処理した菌液は 2 回の遠心・洗浄操作により変異原物質を除いた後、リン酸緩衝液に懸濁させた。一方、紫外線照射はシャーレに薄く広げた菌懸濁液

に 15W の殺菌ランプを用いて照射した。紫外線の線量は UV ラジオメーター (Topcon 社) で測定した。光回復効果を防ぐため操作は黄色安全光の下で行った。

トリプトファン非要求性の Trp^+ 復帰突然変異体数を測定するため菌懸濁液 0.1ml を各々の香料成分を種々の濃度で添加した SEM 寒天プレート上にまいた。また、生菌数を測定するために菌懸濁液を適当に希釈した後、同種の SEM 寒天プレートにまいた。37°C で 3 日間培養した後、 Trp^+ 復帰変異体および生存菌のコロニー数を計数して対照値と比較した。

第3節 結果

1. 抗突然変異因子の検索

表 1-1. に示した 43 種類の物質について、4-NQO 誘発突然変異に対する抗突然変異作用の有無を検索した。各々の香料成分は菌株に対する抗菌作用が認められたい限り 200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度まで調べた。その結果、4-NQO 誘発突然変異に対しては、桂皮アルデヒド (No. 1)、クマリン (No. 16)、ウンベリフェロン (No. 17)、アニスアルデヒド (No. 21)、エチルバニリン (No. 33)、および、バニリン (No. 43) の 6 種の化合物が著明な突然変異抑制作用を示した (図 1-1, 1-2)。抗菌作用を示さない濃度範囲において、これらの抗突然変異因子の存在により Trp^+ 復帰変異体数は対照値の 30% 以下に減少した。この突然変異抑制作用はいずれの 4-NQO 処理濃度でも認められたが、自然突然変異に対しては抑制効果は認められなかった (表 1-2.)。また、メチル桂皮アルデヒド (No. 2)、桂皮アルコール (No. 4)、桂皮酸 (No. 6)、o-

ヒドロキシ桂皮酸 (No.7)、桂皮アルデヒド (No.10)、シンナミルメチルケトン (No.11)、4-ヒドロキシクマリン (No.17)、スコポレチン (No.19)、シトラール (No.23)、アントラニル酸エチル (No.28)、および、ジャスモン (No.37) の11種の化合物を添加したSEM寒天プレート上では4-NQO誘発復帰変異体数に20~30%のわずかな減少が認められた。桂皮アルコール、桂皮酸の作用を図1-3. に示した。

一方、4-NQO誘発突然変異に対して著明な抗突然変異作用を示した桂皮アルデヒド、クマリン、ウンベリフェロン、アニスアルデヒド、エチルバニリン、バニリンの6化合物についてさらにMNNG誘発突然変異および、UV誘発突然変異に対する効果も調べた。その結果、いずれの物質もMNNG誘発突然変異に対しては全く効果は認められなかったが、UV誘発突然変異に対しては4-NQOの場合と同様に強い突然変異抑制作用を示した。桂皮アルデヒドでの結果を図1-4. に示した。

ところで、桂皮アルデヒドやバニリンを含む SEM 寒天プレート上では Trp^+ 復帰変異体数の減少にもかかわらず、4-NQO 処理した菌の生存菌数には増加傾向が認められた (表 1-2, 図 1-2.)。このことはこれらの物質の抗菌作用により菌が死滅するためプレート上での突然変異体数が減少するのではないことを示している。この現象については第 3 章でさらに詳しく論述する。

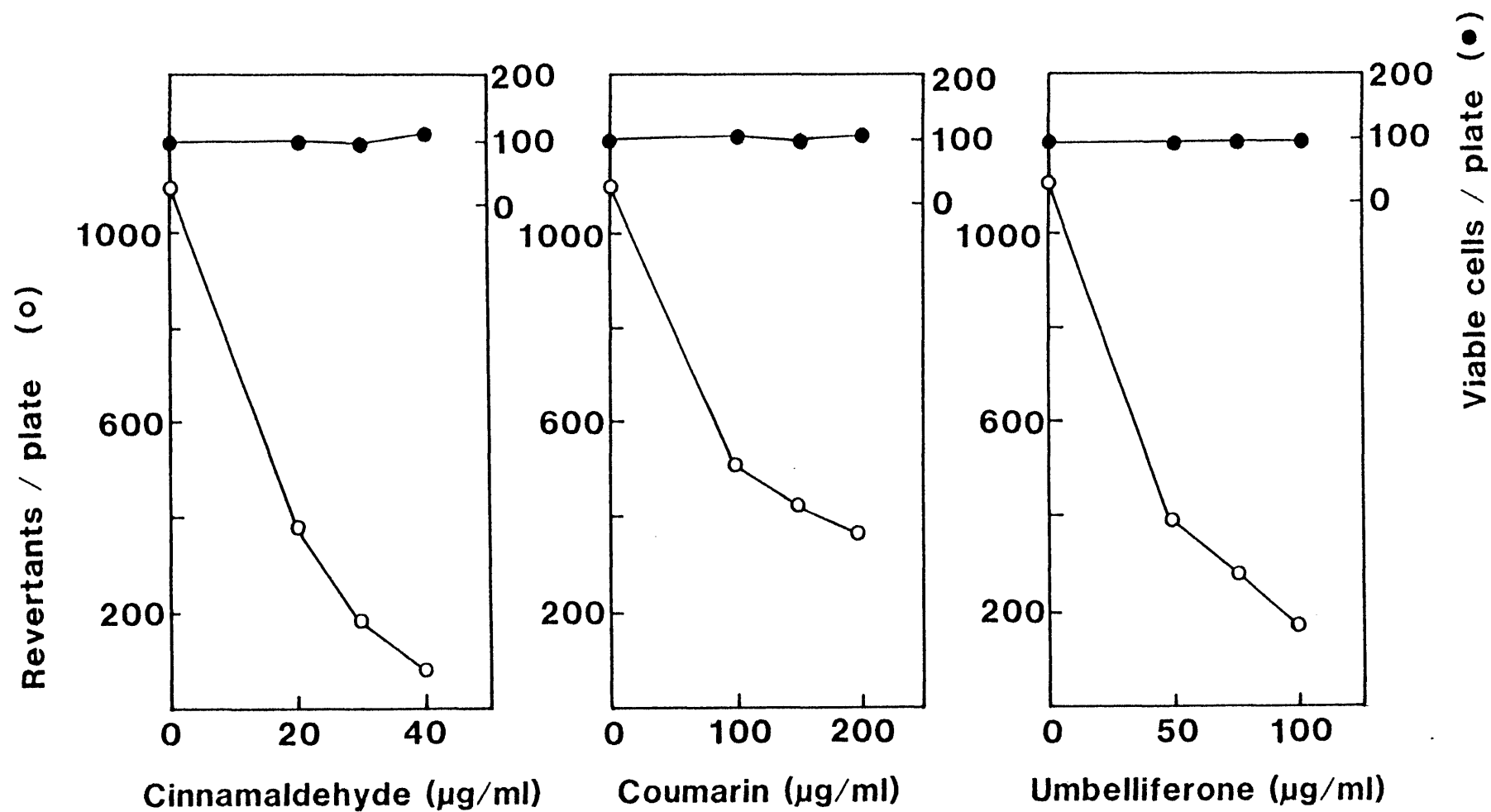


Fig. 1-1 Antimutagenic effects of cinnamaldehyde, coumarin and umbelliferone on 4-NQO-induced mutagenesis in *E. coli* WP2s. Cells were treated with 4-NQO at 2 $\mu\text{g/ml}$ for 15 min.

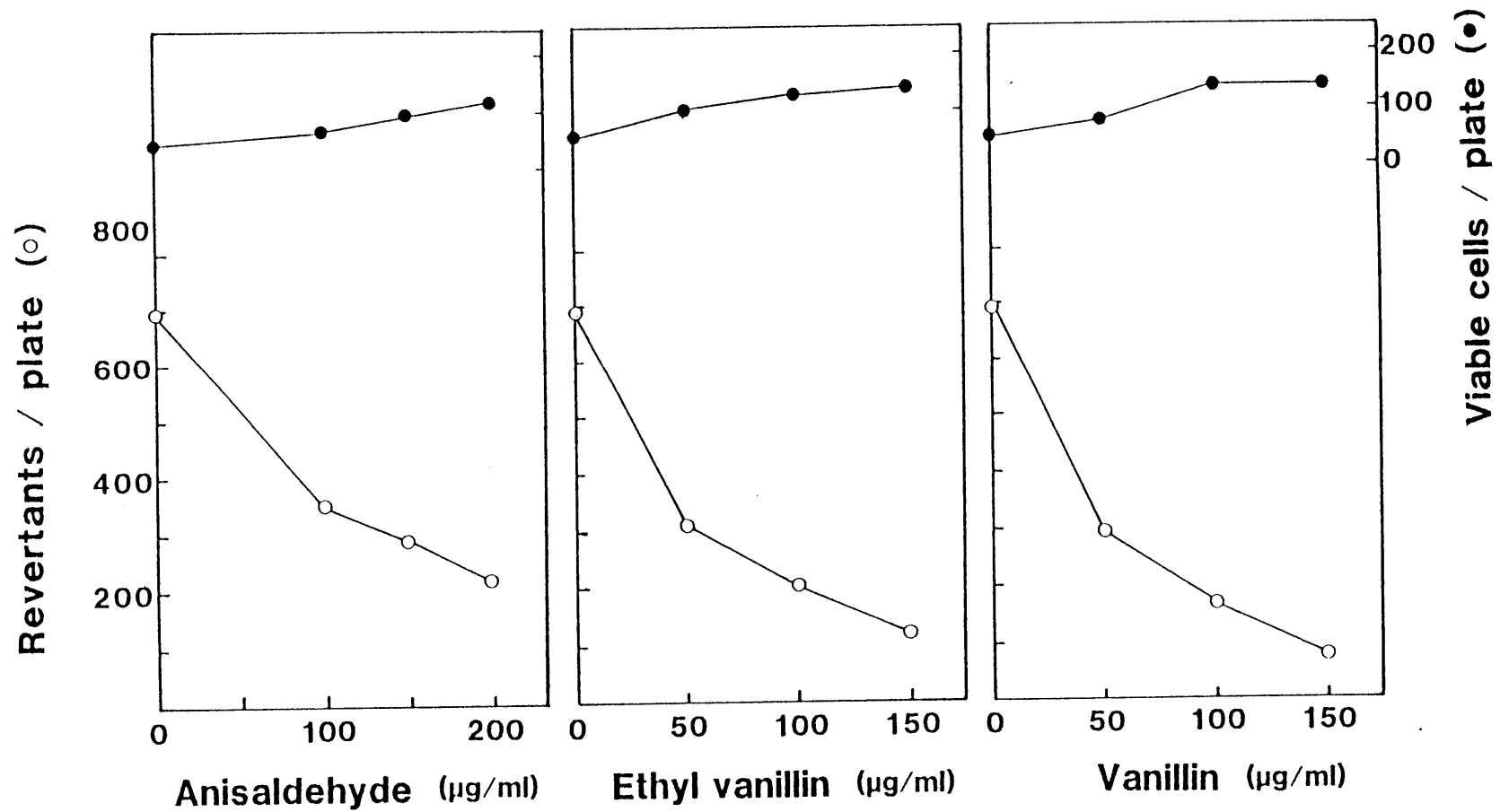


Fig. 1-2 Antimutagenic effects of anisaldehyde, ethyl vanillin and vanillin on 4-NQO-induced mutagenesis in *E. coli* WP2s. Cells were treated with 4-NQO at 2 $\mu\text{g/ml}$ for 15 min.

Table 1-2. Antimutagenic effect of cinnamaldehyde on 4-NQO-induced mutagenesis in E. coli WP2s.

4-NQO treatment ($\mu\text{g/ml}$)	Cinnamaldehyde in SEM agar medium ($\mu\text{g/ml}$)	Viable cells per plate	Revertants per plate
0	0	184	10
	40	183	8
1	0	190	87
	40	194	27
2	0	109	685
	40	130	137
3	0	37	1060
	40	66	292

Cells were treated with 4-NQO for 60 min at 37°C

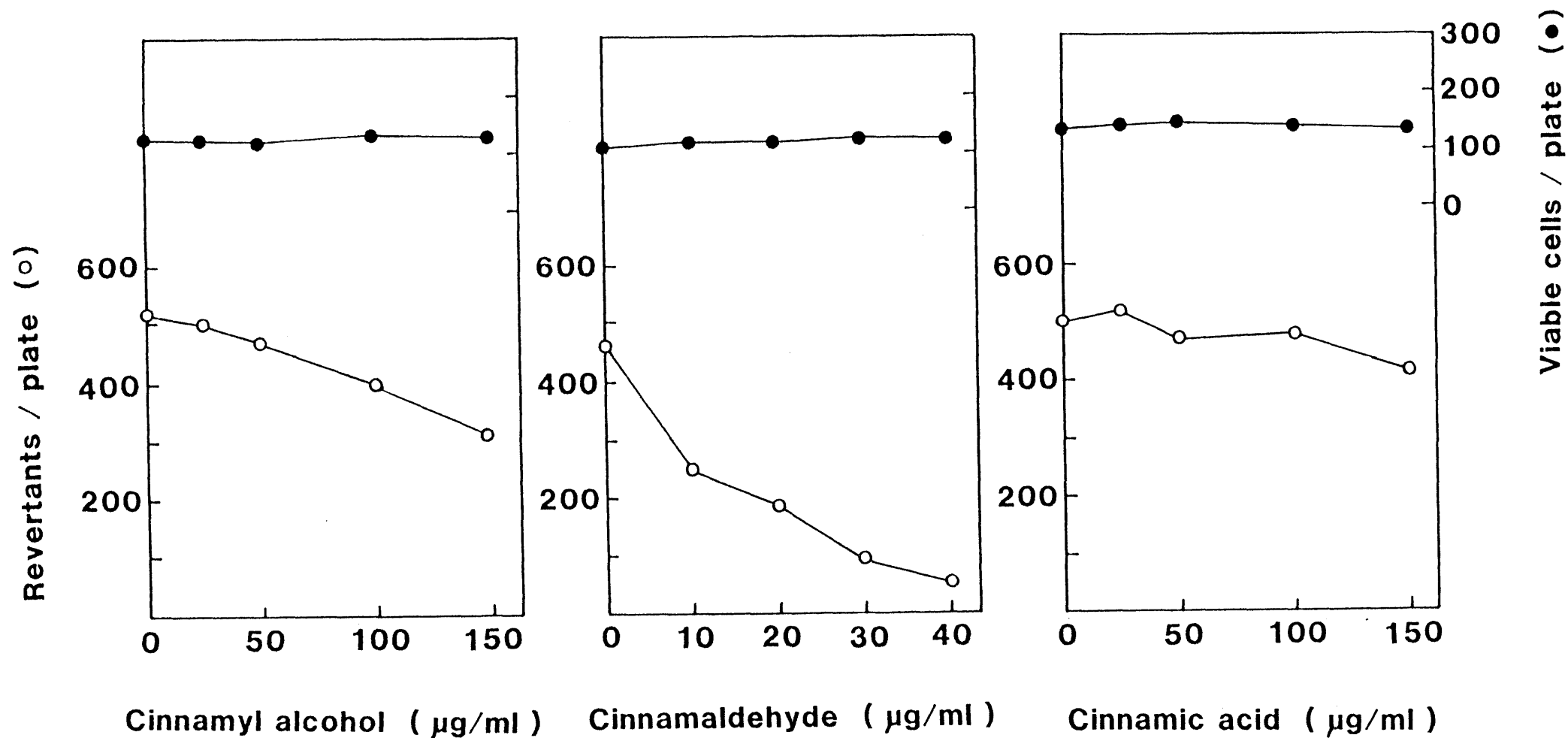


Fig. 1-3 Comparison of antimutagenic effects of cinnamaldehyde and its derivatives on 4-NQO mutagenesis. Cells were treated with 4-NQO (2 $\mu\text{g/ml}$) for 60 min.

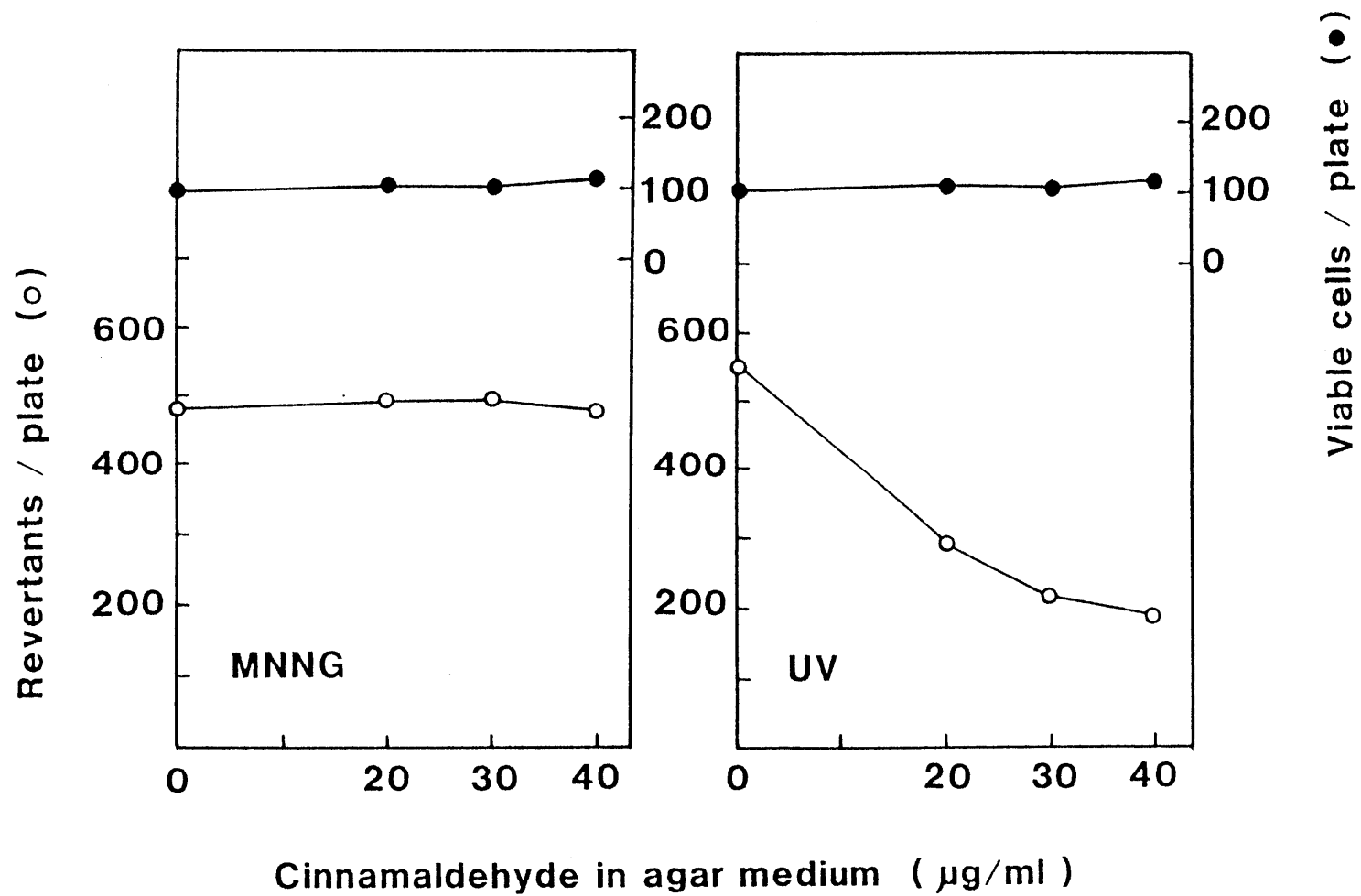


Fig. 1-4 Effects of cinnamaldehyde on mutagenesis induced by MNNG (2 µg/ml, 60 min) or UV (1 J/m²) in *E. coli* WP2s.

2. 生育阻害作用の検討

桂皮アルデヒドなどの抗突然変異因子は、 Trp^+ 復帰変異体のコロニー形成期間中寒天培地中に存在しているため、突然変異体の生育速度が遅くなり、その結果、見かけ上の可視コロニー数が減少する可能性も考えられた。そこで、 Trp^+ 復帰変異体のクローンを分離して抗突然変異因子に対する生育感受性を調べる再構成実験を行った。4-NQOにより誘発された Trp^+ コロニーを任意に50個選別し、トリプトファンを含まない最少寒天プレート上で純化した。各々のクローンを最少液体培地で培養した後、等量ずつを混合した。 Trp^+ の菌の混合液を適当に希釈し（約 $3 \times 10^3/\text{ml}$ ）、その0.1 mlを Trp^- のWP2s菌液（約 $10^9/\text{ml}$ ）0.1 mlと共に抗突然変異因子を含むSEM寒天プレート上に広げた。この方法により、抗突然変異活性を測定する時とほぼ同様の細胞数の条件下で Trp^+ 菌のコロニー形成能を調べることができる。その結果、 Trp^+ 変異体はいず

れの抗突然変異因子を含む SEM 寒天プレート上でも十分に生育し、対照のプレートに比べコロニー数の有意な減少は認められなかった。表1-3. に桂皮アルデヒド、クマリン、ウンベリフェロンでの結果を示した。

Table 1-3
Reconstruction experiment

Antimutagen in SEM agar medium ($\mu\text{g/ml}$)	Number of Trp ⁺ colonies per plate		
	WP2s *	Revertant clones	Revertant clones and WP2s
None	6	310	325
Cinnamaldehyde (20)	3	326	320
Cinnamaldehyde (40)	4	300	323
Coumarin (100)	5	310	309
Coumarin (200)	5	320	322
Umbelliferone (50)	4	319	321
Umbelliferone (100)	6	318	317

* Approx. 10^8 cells of WP2s were spread.

3. 4-NQO 代謝活性化反応の阻害作用の検討

4-NQO は細菌のニトロ還元酵素により 4-ヒドロキシアミノキノリン 1-オキシド (4-HAQO) に代謝活性化された後に DNA のアリン塩基と反応することが知られている (Tada & Tada, 1976)。桂皮アルデヒドやバニリンなどの抗突然変異因子がこの代謝活性化反応を阻害している可能性を調べるため、代謝活性化体である 4-HAQO による誘発突然変異に対する効果の有無を調べた。その結果、これらの抗突然変異因子は 4-HAQO 誘発突然変異に対しても著明な抗突然変異作用を示すことが判明した (表 1-4)。すなわち、4-NQO の代謝活性化反応の阻害では突然変異体数の減少を説明することはできなかった。

Table 1-4

Antimutagenic effects of cinnamaldehyde, coumarin and umbelliferone on the 4-HAQO-induced mutagenesis

Antimutagen in SEM agar medium ($\mu\text{g/ml}$)	Viable cells per plate	Induced Revertants per plate
None	124	511
Cinnamaldehyde (20)	120	157 (69) ^{a)}
Cinnamaldehyde (30)	130	81 (84)
Cinnamaldehyde (40)	131	37 (93)
Coumarin (100)	137	198 (61)
Coumarin (150)	116	130 (75)
Coumarin (200)	127	78 (85)
Umbelliferone (50)	132	155 (70)
Umbelliferone (75)	136	103 (80)
Umbelliferone (100)	137	62 (88)

Cells were treated with 4-HAQO (4 $\mu\text{g/ml}$) for 15 min at 37°C.

a) % decrease in the number of induced revertants per plate.

4. Desmutagen としての作用の検討

桂皮アルデヒド、フマリン、バニリンなどの因子が変異原物質である 4-NQO あるいは 4-HAQO と直接化学反応を起こしてその変異原活性を不活化する可能性 (Desmutagenic 効果) についても調べた。4-NQO または 4-HAQO を抗突然変異因子と共にリン酸緩衝液中で 15 分間 37°C でインキュベートし、その後、WP2s 株の菌懸濁液を加え 15 分間処理した。遠心・洗浄操作をくり返して変異原物質および抗突然変異因子を除き、SEM 寒天プレートにまいて突然変異誘発頻度を調べた。表 1-5. には桂皮アルデヒドでの結果を示したが、いずれの抗突然変異因子との共存によっても、4-NQO および 4-HAQO の変異原活性の著しい低下は認められなかった。

Table 1-5

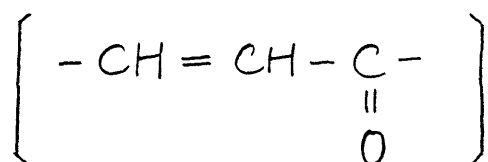
Stability of mutagenic activity of 4-NQO and 4-HAQO after pre-incubation with cinnamaldehyde.

Mutagen ($\mu\text{g/ml}$)		Cinnamaldehyde	Viable cells	Revertants	M. F.
4-NQO	4-HAQO	($\mu\text{g/ml}$)	per ml	per plate	(Trp ⁺ /10 ⁷)
0	0	0	3.5×10^8	7	2
0	0	40	3.5×10^8	8	2
2		0	2.5×10^8	1305	522
2		20	2.4×10^8	1328	553
2		40	2.6×10^8	1291	496
	4	0	3.2×10^8	375	117
	4	20	3.2×10^8	406	127
	4	40	3.3×10^8	420	127

4-NQO or 4-HAQO was pre-incubated with and without cinnamaldehyde in phosphate buffer for 15 min at 37°C prior to exposure to bacterial cells.

第4節 考察

本章においては香料成分として用いられている化合物およびその誘導体 43 種に関してその抗突然変異作用の検索を行い、その結果、桂皮アルデヒド、クマリン、ウンベリフェロン、アニスアルデヒド、エチルバニリン、および、バニリンの 6 種の化合物に 4NQO および UV 誘発突然変異に対する著明な突然変異抑制作用が認められることが判明した。これら 6 種の化合物は比較的構造が類似しており、いずれも α, β -不飽和カルボニル構造



をもつ化合物であり、また、クマリン以外は遊離のアルデヒド基が存在する。しかし、この構造をもつ化合物全てに抗突然変異活性がある訳ではなく、置換基の種類や位置により活性が異なる。桂皮アルデヒドは種々のニッケイ、特にセイロンニッケイやシナニッケイの樹皮を蒸留して得られる黄色の香油の主成分

で、食品添加物として嗜好品に広く用いられている。また、クマリンは α -ヒドロキシ桂皮酸のラクトン体であり、フルヌバ草の芳香成分で香料として利用される。ウンベリフェロンはセリ科の植物などに広く存在する成分で、蛍光染色として化粧品などに用いられている。一方、ウイキョウの実を蒸留して得られるアニス油の主成分であるアネトールを酸化したものがアニスアルデヒドであり、クマリン様の香をもち香料および調香料として用いられる。また、バニラ豆中に存在するバニリン、およびその誘導体であるエチルバニリンは共に多くの食品の着香料として広く使用されている。

ところで、桂皮アルデヒドやバニリンなどの化合物を突然変異検出用の SEM 寒天培地中に加えた時、4-NQO および UV 誘発突然変異は著しく抑制されたが、MNNG 誘発突然変異に対しては全く効果が認められなかった。寒天プレート上において、4-NQO によって誘発

された Trp⁺ 復帰変異体が減少する原因としては次のような場合が考えられる。図 1-5. に示したように、1 番目には 4-NQO あるいはその代謝活性化体が桂皮アルデヒドやバニリンなどの因子と直接反応を起こして不活性化される場合である。今回の実験条件下では 4-NQO で菌を処理した後、2 回の洗浄によって 4-NQO を除いてから抗突然変異因子に作用させているため上記の可能性は低いものと考えられた。しかも、4-NQO または 4-HAQO と桂皮アルデヒドやバニリンなどの抗突然変異因子とをリン酸緩衝液中であらかじめ 15 分間接触させても 4-NQO や 4-HAQO の突然変異誘発活性の低下が認められなかったことから、突然変異抑制作用は変異原物質の不活性化では説明されなかった。

2 番目には 4-NQO から 4-HAQO への細菌細胞内での代謝活性化反応の阻害が起きた場合である。この可能性も桂皮アルデヒドやバニリンなどの因子が 4-HAQO 誘発突然変異に対

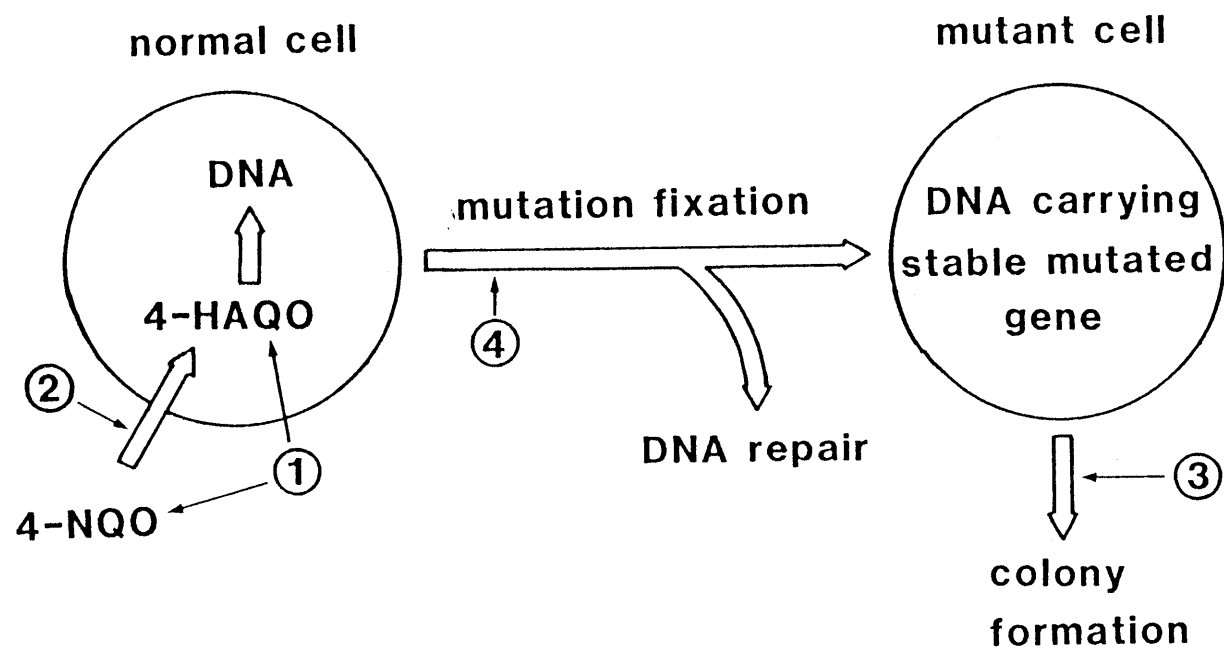


Fig. 1-5. Hypothetic actions of cinnamaldehyde to explain its antimutagenic activity. (1) Inactivation of 4-NQO or 4-HAQO by chemical interaction, (2) Inhibition of metabolic activation of 4-NQO in bacterial cells, (3) Growth inhibition specific to Trp^+ revertant cells, (4) Effect on mutation fixation process including DNA repair.

しても 4-NQO 誘発突然変異の場合と同程度に抑制作用を示すことから除外された。さらに桂皮アルデヒドなどが紫外線誘発突然変異に対しても抗突然変異作用を示す事實は、抗突然変異因子の作用が単なる Desmutagenic 効果では説明され得ないことを示している。

第3番目の可能性としては Trp⁺ 復帰変異体に対する生育阻害作用がある。この点についても、再構成実験において香料成分を含む寒天プレート上での Trp⁺ 復帰変異体のコロニー形成能に差が認められなかったこと、さらには、MNNG 誘発突然変異に対しても突然変異抑制作用が認められず、いずれのプレート上でも対照のプレート上とほぼ同数の復帰変異体が認められたことから単なる菌の生育阻害で説明されるものではなかった。

4番目の説明としては、桂皮アルデヒドやバニリンなどの化合物が 4-NQO 処理によって生じた DNA 損傷を修復する過程で作用して突然変異生成を抑制する場合である。ただし、

この場合には MNNG 処理によって生じた DNA 損傷に起因する突然変異生成経路には作用しないことを説明し得るものでなければならぬ。現在、突然変異の生成機構に関しては、recA、lexA 遺伝子機能を必要とする DNA 修復の際の修復ミスによって生じる型と、recA、lexA 遺伝子機能を必要とせず、DNA 複製の際の対合ミスによって生じるものの少なくとも2種の型が大腸菌において知られている (Witkin, 1969; Kondo et al., 1970)。このことについては第3章でさらに詳しく論述するが、4-NQO や UV は前者の型の変異原であり、したがって、recA⁻変異株や lexA⁻ 変異株ではこれらの変異原を作用させても突然変異はほとんど生じない。一方、MNNG などアルキル化剤の多くは後者の型に属し、突然変異は recA⁻ 変異株や lexA⁻ 変異株でも野生株と同程度に誘発される。これらのことは桂皮アルデヒドやバニリンなどが 4-NQO および UV 誘発突然変異に対して有効であり、MNNG 誘発突然変

異に対しては効果がなかったことを説明し得る可能性があることを示している。さらに、抗突然変異因子を含むプレート上では 4-NQO 処理した菌の生存率に明らかな上昇傾向が認められることも、これらの抗突然変異因子が DNA 修復過程で何らかの作用を及ぼしていることを示唆している。

本章における研究の結果、桂皮アルデヒド、クマリン、ウンベリフェロン、アニスアルデヒド、エチルバニリン、およびバニリンの 6 種の化合物は Desmutagen としてではなく Bio-antimutagen として突然変異抑制作用を示し、その機構は 4-NQO あるいは UV によって誘発される突然変異生成の共通の過程、例えば、DNA 修復過程に作用して抗突然変異活性を示すものと推定された。

第5節 要約

はじめに大腸菌 WP2s (trpE, uvrA) 株を用いて 4-NQO 誘発突然変異に対する抗突然変異因子の検索を行った。菌を 4-NQO で処理した後、遠心、洗浄操作により 4-NQO を除き、種々の濃度の被験物質を添加した突然変異検出用寒天プレートにまいた。香料成分およびその誘導体 43 種の化合物について調べた結果、桂皮アルデヒド、クマリン、ウンベリフェロン、アニスアルデヒド、エチルバニリン、および、バニリンの 6 種類の化合物が 4-NQO 誘発突然変異に対して著しい抗突然変異作用を示した。これらの化合物はいずれも α, β -不飽和カルボニル構造をもつ物質であった。

4-NQO 誘発突然変異に対する抑制効果をさらに詳しく調べた結果、桂皮アルデヒドやバニリンなどの抗突然変異因子を含む寒天プレート上での Trp^+ 復帰突然変異体数の減少は、菌に対する生育阻害作用、4-NQO から 4-HAQO への菌体内での代謝活性化反応の阻害作用、

あるいは抗突然変異因子が直接 4-NQO か 4-HAQO を不活性化する作用かどうかは説明され得ない現象であった。

一方、桂皮アルデヒドをはじめとする 6 種の化合物は紫外線誘発突然変異に対しても顕著な抗突然変異作用を示したが、MNNG 誘発突然変異に対する抑制作用は全く認められなかった。MNNG などのアルキル化剤によって生じる DNA 損傷に起因する突然変異生成の経路は、4-NQO や紫外線によって生じる DNA 損傷に起因する突然変異生成経路とは異なっていることが知られているので、これらの抗突然変異因子はある種の DNA 損傷に対する修復過程で何らかの作用を及ぼして突然変異抑制作用を示すものと考えられた。

4-NQO : 4-nitroquinoline 1-oxide

4-HAQO : 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide

MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

第 6 節 参考文献

- Kondo, S., H. Ichikawa, K. Iwo and T. Kato (1970) Base-change mutagenesis and prophage induction in strains of Escherichia coli with different DNA repair capacities, *Genetics*, 66, 187-217.
- Tada, M., and M. Tada (1976) Metabolic activation of 4-nitro-quinoline 1-oxide and its binding to nucleic acid, in: P. N. Magee, S. Takayama, T. Sugimura and T. Matsushima (Eds.), *Fundamentals in Cancer Prevention*, University of Tokyo Press, pp.217-228.
- Witkin, E. M. (1969) Ultraviolet-induced mutation and DNA repair, *Annu. Rev. Microbiol.*, 23, 478-514.
- Witkin, E. M. (1975) Persistence and decay of thermoinducible error-prone repair activity in nonfilamentous derivatives of tif-1 Escherichia coli B/r: The timing of some critical events in ultraviolet mutagenesis, *Mol. Gen. Genet.*, 142, 87-103.

第2章 DNAのSOS修復系の誘発過程を阻害 して抗突然変異活性を示す因子の模索

第1節 緒言

大腸菌を紫外線あるいは変異原物質で処理してDNAに損傷を与えると種々のDNA修復機能の活性化、プロファージの誘発、細胞分裂の阻害による細胞のフィラメント化、呼吸停止、そして突然変異生成の促進など多様な表現型があらわれる。この一連の反応はSOS反応と呼ばれ (Radman, 1975; Witkin, 1976)、SOS反応によって発現が誘導される遺伝子をSOS遺伝子と言う。これらの諸反応は細胞がDNA損傷を受けた時、細胞分裂を一時的に停止し、その間に効率よくDNAを修復し被害を最少限にするための適応的応答と考えられる。また、プロファージの場合は損傷を受けた宿主からいち早く逃げ出すための仕組みと解釈される。現在までに大腸菌の主染色体上の recA、lexA、uvrA、uvrB、uvrC、uvrD、sulA、himA、dinA、dinB、dinD、

dinF、umuC、umuD、ruv、ssb、recN などの遺伝子が、また、プラスミド pKM101 上の mucA、mucB 遺伝子が SOS 遺伝子として知られている (Gottesman, 1981; Little & Mount, 1982; Walker, 1984)。これらの SOS 遺伝子群は lexA 遺伝子産物である LexA リゾレクサーと、recA 遺伝子産物のプロテアーゼ活性をもつ RecA 蛋白とによってその発現の調節を受けている (図 2-1.)。DNA に損傷が生じると RecA 蛋白が活性化されてプロテアーゼ活性を示すようになり、LexA リゾレクサー蛋白を切断する (Little et al., 1981)。その結果 SOS 遺伝子群の発現が起こる訳である。一方、ラムダファージの溶原菌ではファージの cI リゾレクサー蛋白が同様に RecA プロテアーゼで切断されるためにプロファージの誘発が起こる (Roberts et al., 1978)。

ところで、SOS 遺伝子群のなかで umuC と umuD の両遺伝子は大腸菌の SOS 修復に関与する遺伝子である (Kato & Shinoura, 1977 ;

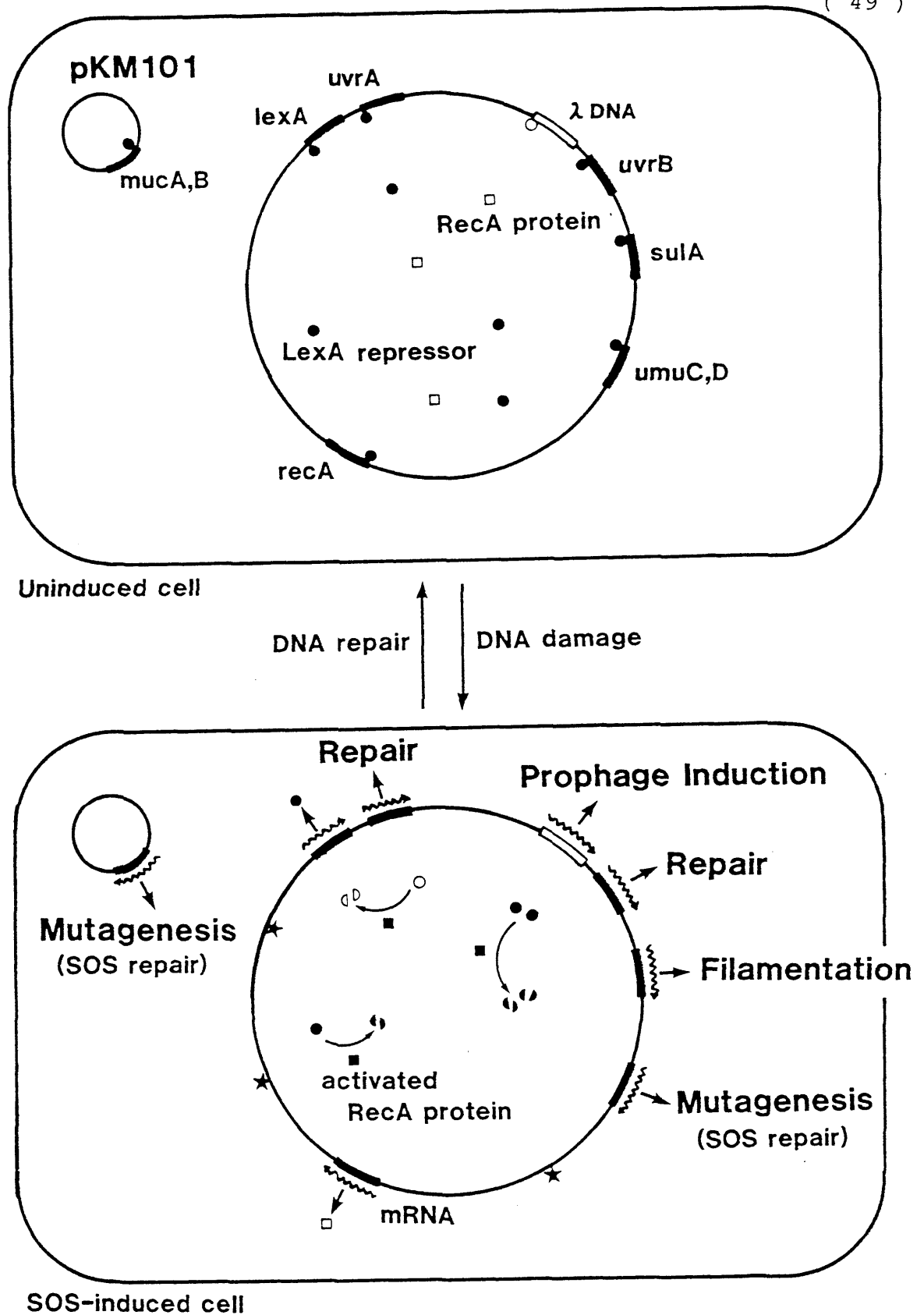


Fig. 2-1. Model for the SOS regulatory system. The RecA protein is synthesized at low levels in uninduced cells, but does not display significant protease activity. After SOS-inducing treatments the RecA protein acquires a specific protease activity.

Kato & Nakano, 1981)。この SOS 修復は、その DNA 修復過程で誤りを生じ易く、そのために error-prone repair とも呼ばれるが突然変異生成に重要な役割を果たしている。多種多様な変異原物質で誘発される突然変異も、その多くが SOS 修復の際の修復ミスによって生じると考えられている。事実、ほとんどの変異原物質には SOS 反応の誘発活性が認められている (Ohta et al., 1984 ; Quillardet et al., 1985)。したがって、この SOS 反応の誘発を抑制すれば、その結果として突然変異誘発頻度を下げることが予測される。

本章では、第 1 章で検索を行った化合物も含め、食品添加物、天然物、抗生物質、無機塩類、農薬など様々な化合物 233 種について、紫外線による SOS 反応の誘発に対する阻害作用を検索した結果について論述する。さらに、SOS 反応誘発の阻害作用を示した化合物が、実際に紫外線誘発突然変異に対して抗突然変異作用を有することを示し、その作用機構は

第 1 章で述べた桂皮アルデヒドやバニリンなどとは異なることについて考察を加えた。

第 2 節 材料と方法

1. 被験物質および試薬

検索を行った 233 種の物質の化合物名を表 2-1. に示した。農薬と飼料添加物は農林水産省より標準品として入手した。その他の化合物は関東化学、宮崎化学薬品、半井化学薬品、東京化成工業、和光純薬工業、アルドリッチ・ケミカル、エー・メルフ・ジャパン、および、シグマ・ケミカルより購入した。これらの化合物は蒸留水またはジメチルスルホキシドに溶かして用いた。なお、5-フルオロウラシル (5-FU)、5-フルオロデオキシウリジン (FUDR) と、酵素基質の *o*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (ONPG)、*p*-ニトロフェニルホスフェート (PNPP) はシグマ・ケミカルから購入した。

2. 培地および緩衝液

(1) LB 培地 (1ℓ 中の組成)

トリプトン

10 g

酵母エキス 5 g

NaCl 10 g

(pH 7.2)

PQ37 株および PQ3703 株の培養時にはアンピシリンを $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 加えた。

(2) SEM 寒天培地 (1 l 中の組成)

フリン酸・1水塩 2 g

K_2HPO_4 10 g

$\text{Na}(\text{NH}_4)\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3.5 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g

グルコース 4 g

Nutrient 培地 50 ml

寒天 15 g

(3) Z - 緩衝液 (pH 7.0)

Na_2HPO_4 60 mM

NaH_2PO_4 40 mM

KCl 10 mM

MgSO_4 1 mM

Table 2-1 List of chemicals tested

Food and feed additives (44)

Amprolium	<i>n</i> -Decylaldehyde	Ethyl vanillin	Pyrimethamine
<i>p</i> -Anisaldehyde	Ethopabate	Eugenol	Retinol
Ascorbic acid	Ethoxyquin	Geraniol	Robenidine
<i>n</i> -Butyl acetate	Ethyl acetate	Isoamyl <i>n</i> -butyrate	Sodium dehydroacetate
Butylhydroxytoluene	Ethyl acetoacetate	Isoamyl formate	Sorbic acid
Calcium propionate	Ethyl anthranilate	Linalool	Sulfamonomethoxine
Caprylohydroxamate	Ethyl benzoate	<i>dl</i> -Menthol	Sulfaquinoxaline
Cinnamaldehyde	Ethyl <i>n</i> -caprylate	Methyl salicylate	Thiabendazole
Citral	Ethyl cinnamate	<i>dl</i> -Perillaldehyde	α -Tocopherol
Clopidol	Ethyl isovalerate	Piperonyl butoxide	γ -Undecalactone
Decoquinate	Ethyl phenylacetate	<i>o</i> -Phenylphenol	Vanillin

Naturally occurring compounds and derivatives (23)

Anethole	Cinnamic acid	Coumarin	Piperinal
Benzalacetone	Cinnamyl acetate	Estragole	Safrole
Benzaldehyde	Cinnamyl alcohol	4-Hydroxycoumarin	Scopoletin
Benzyl cinnamate	<i>o</i> -Coumaric acid	Jasmone	Umbelliferone
Caffeine	<i>m</i> -Coumaric acid	Methylcinnamaldehyde	Vinyl cinnamate
Cinnamamide	<i>p</i> -Coumaric acid	Methyl cinnamate	

Table 2-1 (Continued)

Antibiotics (21)

Actinomycin D	Cycloheximide	Kasugamycin	Streptomycin
Aminopterin	Cytosine arabinoside	6-Mercaptopurine	Tetracycline
Ampicillin	Erythromycin	Methotrexate	Validamycin A
Blasticidin S	5-Fluorouracil	Novobiocin	
Chloramphenicol	Griseofulvin	Polyoxin B	
Chromomycin A ₃	Kanamycin	Rifampicin	

Pesticides (61)

Aldrin	2,4-D	Iron methanearsonate	Probenazole
Allethrin	DDE	Isoprothiolane	Propaphos
Ametryne	DDT	Lenacil	Pyrethrins
Amitraz	Dibrom	Linuron	Pyridaphenthion
Asulam	Dimethirimol	Macbal	Simazine
Atrazine	Diphenamide	Malathion	Simetryne
Bassa	Diquat dibromide	Maneb	Swep
Benomyl	Echlomezol	Meobal	Terbacil
α-BHC	Endrin	Methomyl	Tetradifon
Bromacil	Ethion	Naphthalene acetate	Trifluralin
Carbaryl	Fthalide	Oxycarboxin	Triforine
Chlorobenzilate	Gryphosate	Paraquat dichloride	Tsumacide
Chlorothalonil	Heptachlor	Pentachlorophenol	Zineb
Chlorpyrifos	Hymexazol	Phenisobromolate	
Cyanazine	Indolebutyric acid	Phenothiol	
Cyanofenphos	Ioxynil octanoate	Pirimicarb	

Table 2-1 (Continued)

Inorganics (33)

AgNO ₃	FeSO ₄	MnCl ₂	SbCl ₃
AlCl ₃	GeCl ₄	NaAsO ₂	SnCl ₂
BaCl ₂	H ₃ BO ₃	Na ₂ HAsO ₄	SrCl ₂
CaCl ₂	HgCl ₂	NaF	Y(NO ₃) ₃
CdCl ₂	KBr	Na ₂ SeO ₃	ZnSO ₄
CoCl ₂	K ₂ Cr ₂ O ₇	Na ₂ WO ₄	ZrCl ₄
CsCl	KI	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	
CuCl ₂	LiCl	NiCl ₂	
FeCl ₃	MgCl ₂	RbCl	

Other chemicals (51)

Acetonitrile	Cortisone	5-Fluorodeoxyuridine	Pyrazol
Adenine	Cyclic AMP	Formamide	Sodium Azide
Adenosine	Cysteamine	Glutathione	Thioacetamide
9-Aminoacridine	Cytidine	Guanine	6-Thioguanine
6-Aminonicotinamide	Cytosine	Guanosine	Thiourea
Amitrol	Dexamethasone	Hydroxylamine	Thymidine
Anilline	Diethanolamine	Hydroxyurea	Thymine
Aspirin	Disulfiram	Iodoacetic acid	o-Toluidine
8-Azaguanine	Dithiothreitol	2-Mercaptoethanol	Uracil
5-Bromocytosine	Ethidium bromide	β-Naphthoflavone	Urea
5-Bromodeoxyuridine	Ethionine	Norharman	Uric acid
5-Bromouracil	Fluoroacetic acid	Ouabain	Vitamin B ₁₂
Butylhydroxyanisole	5-Fluorocytosine	Phenobarbital	

3. 菌株

(1) E. coli PQ37

thr, leu, his-4, pyrD, thi, galE, galK (or galT),
lac Δ U169, rpoB (Rf^r), rpsL (Sm^r), rfa, uvrA,
srl-300 :: Tn10 (Tc^r), sulA :: Mud (Ap, lac) cts,
trp :: Muc⁺, Pho^c

本菌株はフランスのパスツール研究所の Maurice Hofnung 博士より分与されたものである。PQ37 株 (Quillardet et al., 1982) はその主染色体上の sulA (以前は sfiA と呼ばれていた) 遺伝子内に Mud (Ap, lac) ファージが挿入された株である (図 2-2.)。このファージは DNA 中にラクトース・オペロンの一部 (構造遺伝子の lacZ, lacY, lacA) とトランスポゾン Tn3 由来のアンピシリン耐性遺伝子をもつ特殊な Mu ファージである。宿主の大腸菌にはラクトース・オペロンの欠失株 (lac Δ U169) を用いてあるため、lacZ 遺伝子の発現は SOS 遺伝子である sulA 遺伝子の発現に依存している。したがって、変異原物質による DNA 損傷によつて

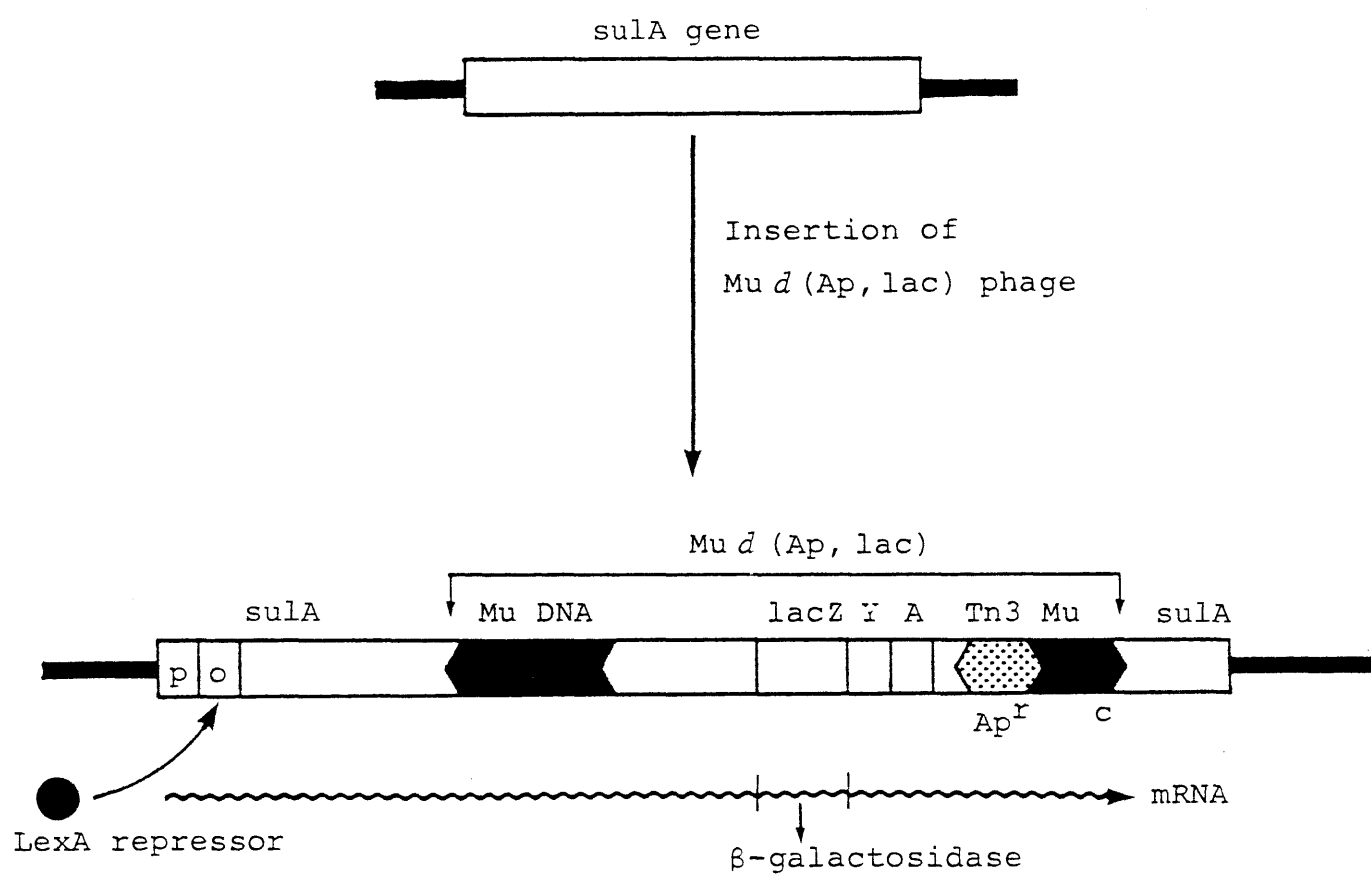


Fig. 2-2 Construction of *E. coli* strain PQ37.

LexA リゾレクターが不活性化され sulA 遺伝子の発現が起きると、その量を lacZ 遺伝子産物の β -ガラクトシダーゼの酵素量を測定することにより容易に定量することができる。その際、遺伝子の発現過程での mRNA 合成や蛋白質合成が阻害を受けにくいようにする目的で RNA ポリメラーゼの β サブユニット (rpoB) および、リボゾーム蛋白 (rpsL) に変異を入れ、各々、リファンピリン耐性、ストレプトマイシン耐性となっている。さらに、変異原物質に対する感度を高めるために除去修復変異 (uvrA) と、高分子物質の膜透過性を高める変異 (rfa) が導入されている。また、trp 遺伝子内にも野生型の Mu ファージが挿入されているが、これは Mud (Ap. lac) ファージのリゾレクターが温度感受性 (ts) であるため、野生型ファージのリゾレクターをトランスに作用させることにより、高温でのプロファージ誘発を防ぐ意味で挿入されている。その他、PQ37 株ではアルカリホスファターゼの合成が

誘導型から構成型に変異している (Pho^c)。

(2) E. coli PQ3703

PQ37 株の PyrD^+ 自然復帰変異株で、ポリミン系の化合物を調べる際に用いた。

(3) E. coli WP2

trpE, malB, lon, sulA

国立遺伝学研究所の賀田恒夫教授より入手した菌株で、抗突然変異作用の測定に用いた。

4. SOS 遺伝子 (sulA) 発現量の測定

LB 培地で培養した対数増殖期にある PQ37 株または PQ3703 株の菌液 ($\text{OD}_{600} = 0.3 \sim 0.4$) に紫外線 (UV) を $1 \sim 1.5 \text{ J/m}^2$ 照射した。UV 照射した菌液 0.2 ml ずつを直ちに各々の被験物質を種々の濃度で含む LB 培地 1.8 ml に接種し、 37°C で 2 時間培養した後に菌濃度 (OD_{600}) の測定と β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼの酵素活性の測定を行った。

(1) β -ガラクトシダーゼ活性

菌液 0.1 ml を 0.9 ml の Σ -緩衝液に加え、0.1% SDS 50 μ l と 70 μ l ホルム 50 μ l を添加して直ちに強く攪拌して菌体膜の透過障壁を破壊した。28°C に 10 分間放置した後、4 mg/ml の ONPG 溶液 0.2 ml を加えて反応を開始させた。28°C で 5 ~ 60 分間反応させた後に 1 M の Na_2CO_3 を 1 ml 加えて反応を止めた。黄色に呈色した反応液の OD₄₂₀ および OD₅₅₀ での吸光度を測定した。OD₅₅₀ は菌体の濁りによる OD₄₂₀ の値への影響を補正するためのものである。

(2) アルカリホスファターゼ活性

Σ -緩衝液の代わりにトリス緩衝液 (1 M Tris-Cl, pH 8.8) を用い、4 mg/ml の PNPP を基質として β -ガラクトシダーゼの場合と同様の操作を行った。反応は 2 M HCl を 0.5 ml 加えて止めた。酸性側では黄色の呈色が消えるため 5 分後に再度 2 M Tris を 0.5 ml 添加した。

(3) 酵素量

酵素量は Miller の計算式 (Miller, 1972) により算出した。

$$\text{酵素量 (unit)} = 1000 \times \frac{\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}}{t \times v \times \text{OD}_{600}}$$

t は反応時間 (min)、 v は反応に用いた菌液の量 (ml) である。

5. 抗突然変異活性の測定

5-FU および FUDR は強い抗菌作用を示すため、抗突然変異活性の測定には軟寒天重層法 (Kada & Mochizuki, 1981) を用いた。対数増殖期の WP2 株の菌液をリン酸緩衝液で 2 度洗った後、 3 J/m^2 の UV を照射した。融解して 42°C に保温した 2.5 ml の軟寒天液 (0.5% NaCl, 0.6% 寒天) に UV 照射菌液 0.1 ml と 5-FU または FUDR 溶液 0.1 ml を加え、SEM 寒天プレート上に広げた。生菌数測定のため UV 照射した菌懸濁液を適当に希釈し、同様の方法で

5-FU または FUDR 存在下で生存菌数を調べた。37°C で 3 日間培養した後 Trp⁺ 復帰変異体と生存菌のコロニーを計数した。

第3節 結果

1. SOS 反応誘発に対する阻害作用

表 2-1. に示した 44 種の食品・飼料添加物、23 種の天然物およびその誘導体、21 種の抗生物質、61 種の農薬、33 種の無機化合物、および、51 種のその他の一般試薬類の総計 233 の化合物について、SOS 反応誘発に対する特異的阻害効果の有無について調べた。これらの化合物は菌に対して抗菌作用を示さない限り 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度まで試験した。SOS 遺伝子の発現量は *sulA::lacZ* 融合遺伝子をもつ菌株の β -ガラクトシダーゼ量を測定することによって定量した。一方、SOS 遺伝子の誘導自体が阻害を受けなくても、その後の蛋白質合成が阻害されれば見かけ上の β -ガラクトシダーゼの量は減少する。この蛋白質合成阻害作用による β -ガラクトシダーゼ量の減少とを区別するため、構成型のアルカリホスファターゼ量を同時に測定した。すなわち、アルカリホスファターゼ量の減少が認められ

高い濃度範囲で β -ガラクトシダーゼ量を減少させる阻害因子の検索を行った。

検索の結果、5-フルオロウラシル(5-FU)と5-フルオロデオキシウリジン(FUDR)の2種の化合物にSOS反応誘発に対する阻害作用が認められた。表2-2. に示したように、5-FU では1~6 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、FUDR では2~12 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で β -ガラクトシダーゼ量の減少が認められた。一方、菌濃度は5-FU およびFUDR 存在下ではわずかに薄く、弱い生育阻害が認められたもののアルカリホスファターゼ量には変化は全く認められなかった。この5-FU とFUDR の作用はUV 照射量を0.5~4 J/m^2 に変化させた場合にも、また、1.5 J/m^2 のUV 照射後150分までのいずれの培養時間においても認められた(図2-3. 図2-4.)。しかし、この5-FU の阻害作用は可逆的であり、UV 照射した菌を5-FU に30分間だけ作用させた後に菌体を新しい培地に移すと β -ガラクトシダーゼの誘導が再び観

察された (図 2-5.)。

ところで、5-FU および FUDR が β -ガラクトシダーゼの誘導を阻害するのではなく、 β -ガラクトシダーゼによる基質 ONPG の分解反応を阻害している可能性も考えられた。そこで、 1.5 J/m^2 の UV 照射によりあらかじめ β -ガラクトシダーゼを誘導した菌体を用い、5-FU はいしは FUDR 存在下で ONPG の分解反応の測定を行った。表 2-3. に結果を示したように、5-FU および FUDR には酵素反応阻害作用は認められなかった。

5-FU の類似化合物である 5-フルオロシトシン、5-ブロモウラシル、5-ブロモデオキシウリジン、および、5-ブロモシトシンには SOS 反応の誘発に対する抑制作用はなかった。また、第 1 章で述べた抗突然変異因子の桂皮アルデヒド、クマリン、ウンベリフェロン、アニスアルデヒド、エチルバニリン、および、バニリンのいずれにも阻害作用は認められなかった。桂皮アルデヒドでの結果を

図 2-6. に示した。一方、賀田らによって抗突然変異作用の報告されている塩化コバルト (Kada & Kanematsu, 1978) の場合は、 β -ガラクトシダーゼとアルカリホスファターゼの両酵素量に同程度の減少が認められた。つまり、塩化コバルトの場合は蛋白質合成阻害作用はあるが、5-FU のような特異的な SOS 反応誘発に対する阻害効果ではなかった (図 2-6.)。

Table 2-2

Inhibitory effects of 5-FU and FUDR on the UV-induction of the SOS gene in *E. coli* PQ3703

UV dose (J/m ²)	Compound added	Conc. (ug/ml)	Cell growth OD ₆₀₀	<u>β-Galactosidase</u>		<u>Alkaline phosphatase</u>	
				OD ₄₂₀	Unit	OD ₄₂₀	Unit
0	None		0.502	0.167	82 (-)	0.480	289
1.5			0.474	0.882	588 (506)	0.470	305
1.5	5-FU	1	0.468	0.613	407 (325)	0.453	296
		2	0.458	0.485	326 (244)	0.472	319
		3	0.445	0.395	270 (188)	0.439	305
		4	0.442	0.327	220 (138)	0.468	328
		5	0.438	0.300	203 (121)	0.463	327
		6	0.426	0.271	186 (104)	0.458	334
1.5	FUDR	2	0.455	0.578	394 (312)	0.420	285
		4	0.446	0.471	319 (237)	0.435	300
		6	0.429	0.401	279 (197)	0.416	300
		8	0.431	0.370	252 (170)	0.431	309
		10	0.438	0.323	214 (132)	0.459	324
		12	0.429	0.274	184 (102)	0.449	327

Numbers in parentheses indicate induced enzyme units.

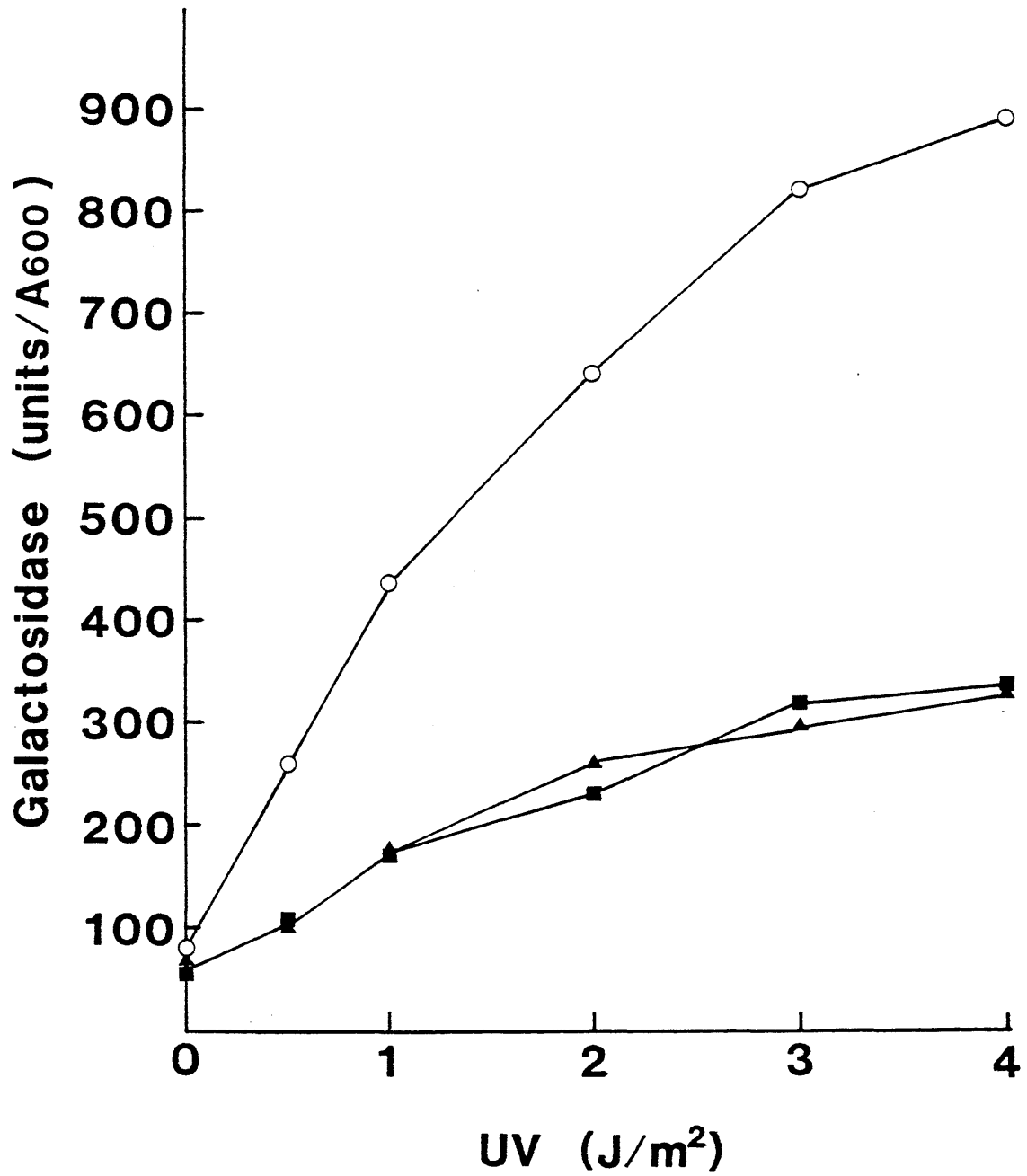


Fig. 2-3 Inhibition of SOS-induction by 5-FU and FUDR. Cells were irradiated with UV and then incubated in LB medium (o) and that containing 5-FU at 5 $\mu\text{g/ml}$ (■) or FUDR at 10 $\mu\text{g/ml}$ (▲) for 120 min at 37°C.

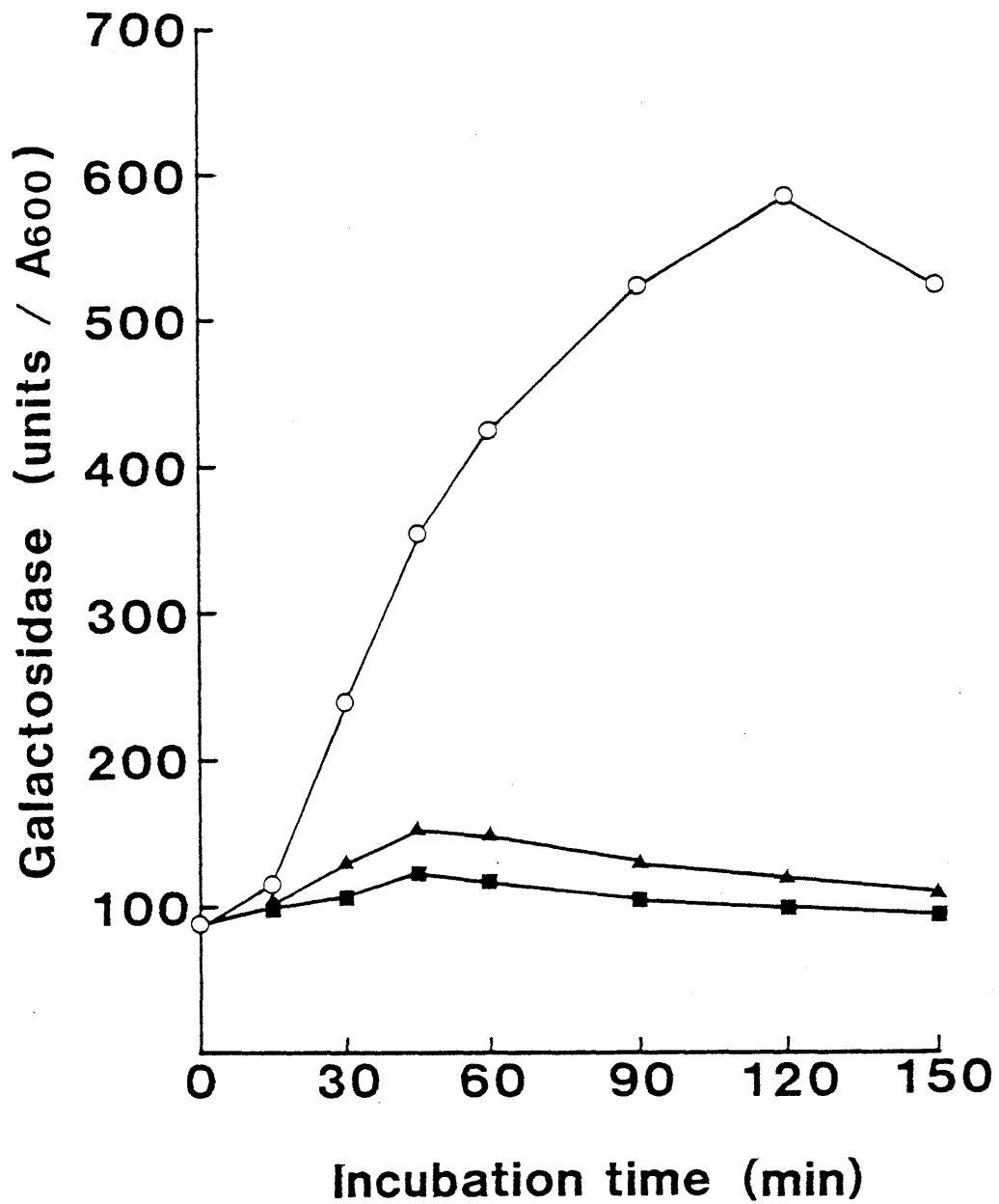


Fig. 2-4 Inhibition of SOS-induction by 5-FU and FUDR. Cells were irradiated with UV (1.5 J/m^2) and then incubated in LB medium (○) and that containing 5-FU at $5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ (▲) or FUDR at $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ (■).

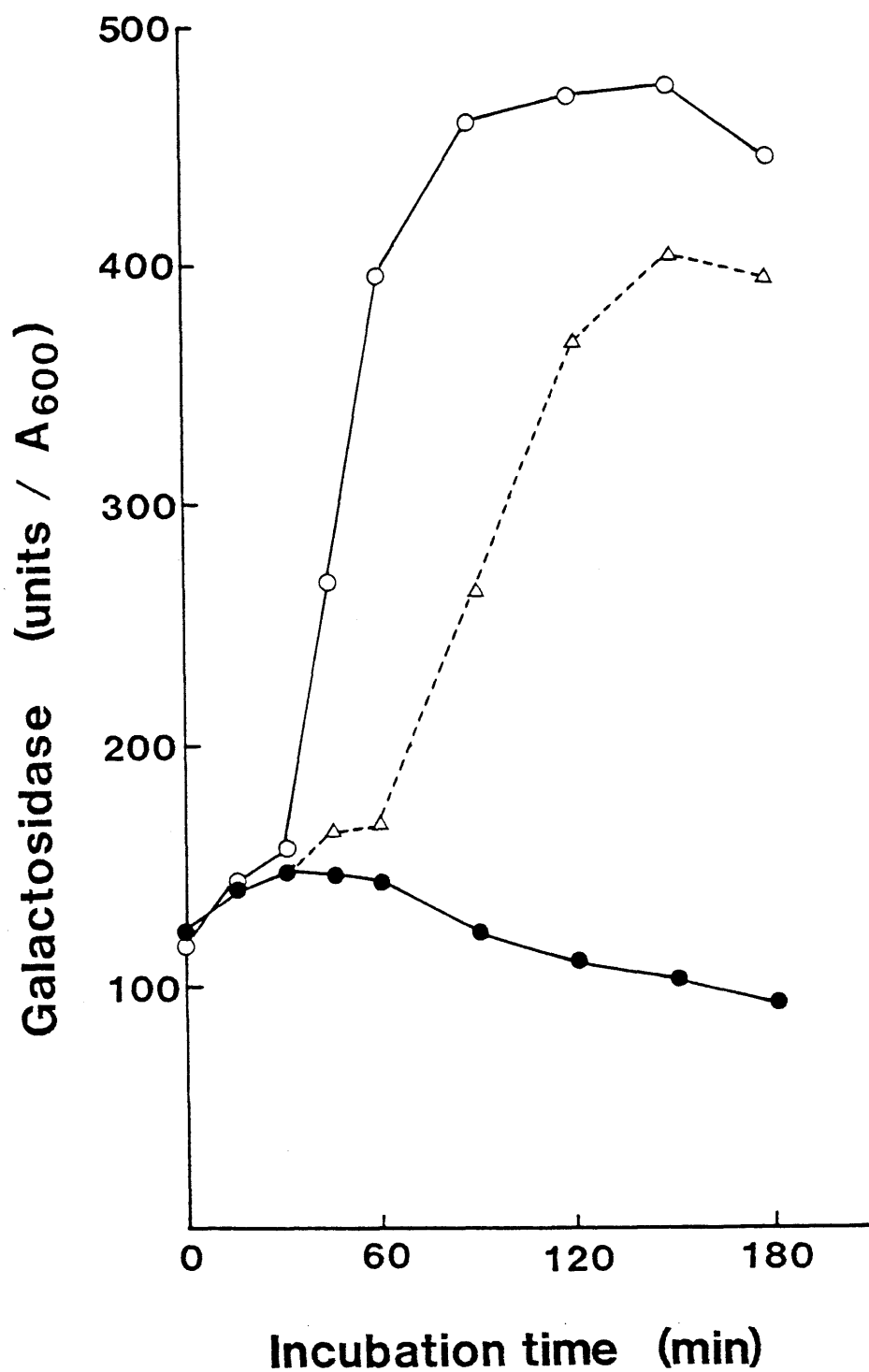


Fig. 2-5 Reversibility of inhibition of SOS-induction by 5-FU. Cells were irradiated with UV at 1.5 J/m^2 . ○, incubated without 5-FU; ●, incubated with 5-FU ($7 \text{ } \mu\text{g/ml}$); △, incubated with 5-FU ($7 \text{ } \mu\text{g/ml}$) for 30 min and then transferred to LB medium.

Table 2-3

Effect of 5-FU and FUDR on the enzyme activity of β -galactosidase

Compound	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	OD ₄₂₀	% inhibition
Control		0.873	-
5-FU	5	0.893	0
	10	0.899	0
FUDR	10	0.894	0
	20	0.885	0

β -Galactosidase was pre-induced by UV irradiation at 1.5 J/m^2 .

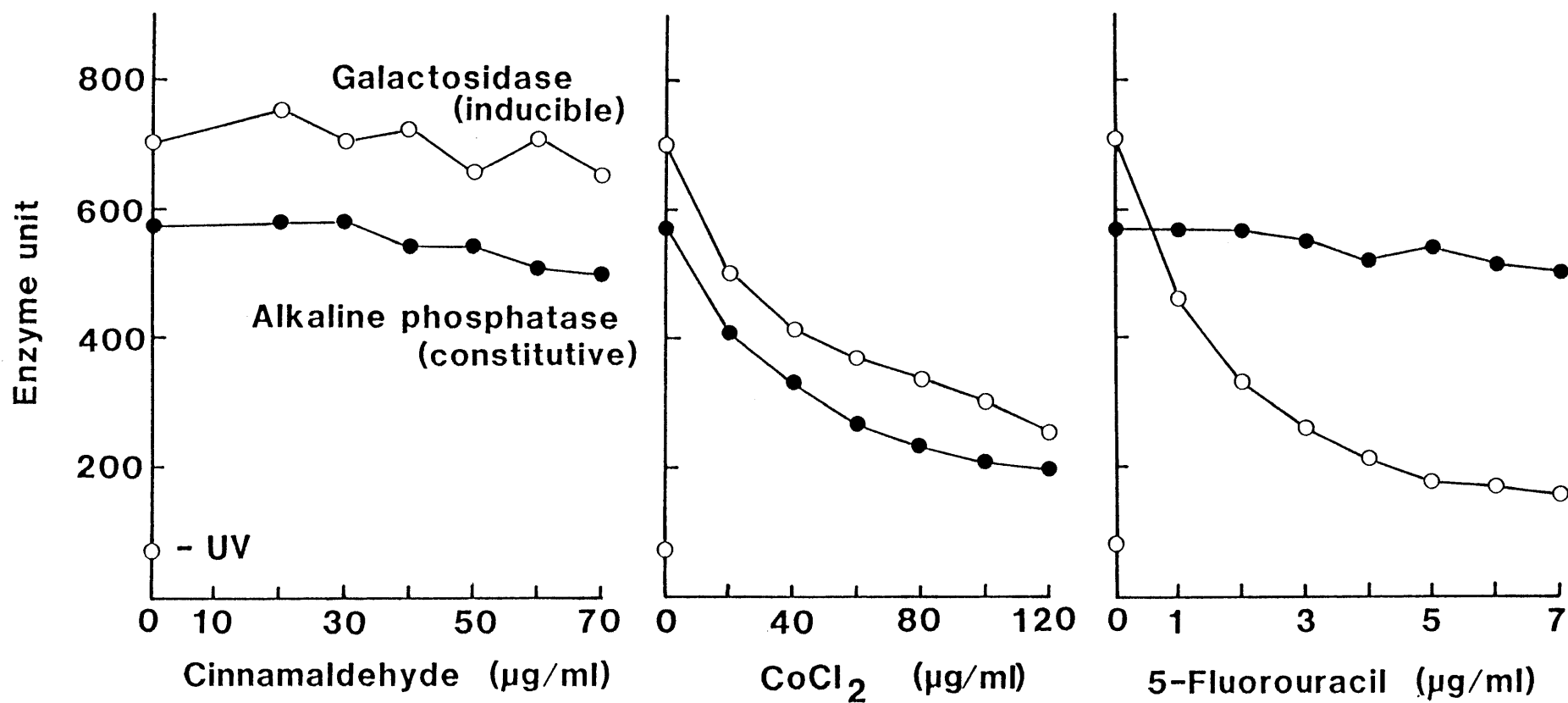


Fig. 2-6 Effects of cinnamaldehyde, cobaltous chloride and 5-fluorouracil on SOS-induction. Cells were irradiated with UV at 1 J/m^2 and then incubated for 120 min.

2. 抗突然変異作用

大腸菌における UV 誘発突然変異の生成には SOS 反応の誘導、すなわち SOS 修復が行われることが必要であることが知られている (Witkin, 1976)。5-FU や FUDR に SOS 反応誘発の抑制作用があれば、これらの物質は UV 誘発突然変異に対して抗突然変異作用を示すことが予測される。大腸菌 WP2 株を用いて調べた結果、5-FU と FUDR は菌の生存率に何ら影響を与えない濃度範囲において、 Trp^+ 復帰変異体数の著明な減少を誘起した。2 μg /70 レートの 5-FU、および、3 μg /70 レートの FUDR 存在下で UV 誘発突然変異体数は約 4 分の 1 に減少した (表 2-4)。また、この Trp^+ 変異体数の減少が単なる菌の生育阻害効果によるものではないことは、以下の再構成実験を行って確かめた。2.5 ml の軟寒天液に、リン酸緩衝液に懸濁した Trp^- の WP2 菌液 (約 $5 \times 10^8/\text{ml}$) を 0.1 ml と Trp^+ クローンの菌液 (約 $2 \times 10^3/\text{ml}$) を 0.1 ml、および、5-FU (または

FUDR) 溶液 0.1 ml を加えて SEM 寒天プレート上に広げた。37°C で3日間培養した後、Trp⁺コロニーを数えた。表2-4. に示したごとく、5-FU および FUDR 存在下でも94%以上の Trp⁺ 菌がコロニーを形成した。したがって、UV 誘発突然変異体の減少は Trp⁺ 菌に対する生育阻害のためではないと考えられた。

Table 2-4 Antimutagenic effects of 5-FU and FUDR on mutagenesis induced by UV in E. coli WP2

Compound	Conc. (µg/plate)	UV-induced mutagenesis [*]		Reconstruction condition	
		Viable cells / plate	Revertants / plate	Trp ⁺ colonies / plate	Recovery (%)
Control		132	2010	170	100
5-FU	0.5	138	1264		
	1	130	883	166	98
	1.5	136	705	163	96
	2	141	464	171	100
FUDR	1	146	1224		
	2	147	685	160	94
	3	134	504	159	94
	4	135	245	162	95

* Cells were irradiated with UV at a dose of 3 J/m².

第4節 考察

本章においては233種の多種多様な化学物質についてSOS修復誘発過程に対する阻害効果について検索を行い、その結果、5-FU およびFUDRにその活性があることを見出した。5-FU およびFUDRは各々、抗腫瘍剤、および抗ウィルス剤として用いられている物質である。これらの物質はいずれも生体内でフルオロデオキシウリジン酸に代謝され、この代謝物がチミジン酸合成酵素を阻害することによりDNA合成が阻害される (Balis, 1968)。また、5-FU はフルオロウリジン-3-リン酸にも代謝されるため、これがUTPの代りにRNA中に取り込まれる。このため、mRNAから蛋白質合成への翻訳段階で誤りが生じて、RNA生物ではトランジション型の突然変異が生じる (Balis, 1968)。このような生物活性作用に加えて、5-FU やFUDRに抗突然変異作用があることは極めて興味深い。

5-FU およびFUDRのUV誘発突然変異に

対する抗突然変異作用は、UVによるDNA損傷によって誘発されるSOS反応を阻害することにより、突然変異生成の原因であるSOS修復が働らかなくなるためと考えられる。同様な抗突然変異作用はプロテアーゼ阻害剤であるアンチパインについて報告がある (Meyn et al., 1977 ; Ichikawa-Ryo & Kondo, 1980)。アンチパインの場合はSOS反応の制御系において、RecAプロテアーゼによるLexAリゾレクターの分解反応を阻害することが原因と考えられている。SOS反応の誘発の初期段階であるRecA蛋白のプロテアーゼ活性の活性化反応はDNA損傷によって生じた何らかのシグナルによって起こる。このシグナルの正体は現在のところ不明であるが、おそらくはDNA修復過程で生じるDNA分解産物であると考えられている (Gottesman, 1981 ; Little & Mount, 1982 ; Walker, 1984)。5-FU および FUDR は共にペリミジン誘導体の化合物であり、また、その誘発抑制作用が可逆的であることから、これらの化

合物が RecA 蛋白の活性化反応過程を拮抗的に阻害しているものと推定された。

一方、第1章において論述した抗突然変異因子の桂皮アルデヒド、フマリシン、ウンベリフェロン、アニスアルデヒド、エチルバニリン、および、バニリンには SOS 反応の誘発に対する阻害作用は全く認められなかった。したがって、これらの因子の作用機構は 5-FU および FUDR とは異ったものであると結論された。桂皮アルデヒドなどの抗突然変異因子の作用機構については第3章以降で解析を行い論述する。

第5節 要約

大腸菌においては紫外線 (UV) や 4-NQO などの変異原物質による DNA 損傷が引きがねとなり、種々の SOS 反応が誘発される。この SOS 反応の誘発は、DNA の損傷により最初に RecA 蛋白質が活性化されてプロテアーゼ活性を示すようになる、次いで SOS 遺伝子群のリプレッサーである LexA 蛋白質が分解されることにより、種々の SOS 遺伝子が発現する。ところで突然変異生成に大きな役割を果たしていると考えられている SOS 修復機能も、この SOS 反応の 1 つであり、したがって誘導性の DNA 修復機構である。そこで第1章で見出した桂皮アルデヒドやバニリンなどの抗突然変異因子が SOS 反応の誘発を阻害する可能性について検討した。

Hofnung らにより分離された大腸菌 PQ37 株は SOS 遺伝子の 1 つである sulA 遺伝子と β -ガラクトシダーゼの構造遺伝子 lacZ との融合遺伝子 sulA::lacZ をもつ菌株である。この菌

を UV で照射した後、各々の抗突然変異因子を含む培地に移して 2 時間培養し、sulA 遺伝子の発現量を β -ガラクトシダーゼ量を測定することによって調べた。遺伝子発現段階での阻害作用による β -ガラクトシダーゼ量の減少と、遺伝子発現後の蛋白質合成段階での阻害作用による β -ガラクトシダーゼ量の減少とを区別するため、対照として構成型のアルカリホスファターゼ量を測定し、 β -ガラクトシダーゼ量にのみ特異的な減少が認められるか否かを調べた。その結果、桂皮アルデヒド、クマリン、ウンベリフェロン、アニスアルデヒド、エチルバニリン、および、バニリンは SOS 反応誘発に対して全く阻害作用を示さなかったことがわかった。

さらに、この試験系を利用して SOS 反応の誘発に対する阻害因子の検索を行った。食品および飼料添加物、天然物、抗生物質、農薬、無機塩類など多様な化合物 233 種について調べた結果、5-フルオロウラシル (5-FU) と

5 - フルオロデオキシウリジン (FUDR) に SOS 反応誘発に対する抑制作用が認められた。また、この抑制作用は可逆的であった。5-FU や FUDR は SOS 反応誘発の初期段階において RecA 蛋白質がプロテアーゼとしての活性化を受ける反応過程に作用してこれを阻害するものと推定された。

SOS 反応誘発の結果誘導される SOS 修復機能は UV 誘発突然変異の生成に必須のものであることが知られている。そこで大腸菌 WP2 株 (trpE) を用いて UV 誘発突然変異に対する抗突然変異作用を調べたところ、5-FU および FUDR は抗菌性を示さばい濃度範囲において Trp⁺ 復帰変異体数の顕著な減少を引き起こした。したがって、5-FU や FUDR は SOS 修復の誘導を抑制することによって抗突然変異作用を示すことが判明した。

4-NQO : 4-nitroquinoline 1-oxide

第 6 節 参考文献

- Balis, M. E. (1968) Antagonists and Nucleic Acids, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Gottesman, S. (1981) Genetic control of the SOS system in E. coli, Cell, 23, 1-2.
- Ichikawa-Ryo, H., and S. Kondo (1980) Differential antimutagenic effects of caffeine and the protease inhibitor antipain on mutagenesis by various mutagens in Escherichia coli, Mutation Res., 72, 311-322.
- Kada, T., and N. Kanematsu (1978) Reduction of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mutations by cobalt chloride in Escherichia coli, Proc. Japan Acad., 54(B), 234-237.
- Kada, T., and H. Mochizuki (1981) Antimutagenic activities of human placental extract on ultraviolet light- and gamma-ray-induced mutations in Escherichia coli WP2 B/r trp, J. Radiat. Res., 22, 297-302.
- Kato, T., and Y. Shinoura (1977) Isolation and characterization of mutants of Escherichia coli deficient in induction of mutations by ultraviolet light, Mol. Gen. Genet., 156, 121-131.
- Kato, T., and E. Nakano (1981) Effects of the umuC36 mutation on ultraviolet-radiation-induced base-change and frameshift mutations in Escherichia coli, Mutation Res., 83, 307-319.
- Little, J. W., D. W. Mount and C. R. Yanisch-Perron (1981) Purified lexA protein is a repressor of the recA and lexA genes, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 78, 4199-4203.

- Little, J. W., and D. W. Mount (1982) The SOS regulatory system of Escherichia coli, *Cell*, 29, 11-22.
- Meyn, M. S., T. Rossman and W. Troll (1977) A protease inhibitor blocks SOS functions in Escherichia coli: Antipain prevents λ repressor inactivation, ultraviolet mutagenesis, and filamentous growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 74, 1152-1156.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Ohta, T., N. Nakamura, M. Moriya, Y. Shirasu and T. Kada (1984) The SOS-function-inducing activity of chemical mutagens in Escherichia coli, *Mutation Res.*, 131, 101-109.
- Quillardet, P., O. Huisman, R. D'Ari and M. Hofnung (1982) SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 79, 5971-5975.
- Quillardet, P., C. de Bellecombe and M. Hofnung (1985) The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds, *Mutation Res.*, 147, 79-95.
- Radman, M. (1975) SOS repair hypothesis: Phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis, In: Hanawalt, P. C., and R. B. Stelow (Eds.) *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*, Plenum Press, New York, pp.355-367.
- Roberts, J. W., C. W. Roberts and N. L. Craig (1978) Escherichia coli recA gene product inactivates phage λ repressor, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 75, 4714-4718.

- Walker, G. C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in Escherichia coli, Microbiol. Rev., 48, 60-93.
- Witkin, E. M. (1967) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in Escherichia coli, Bacteriol. Rev., 40, 869-907.

第3章 抗突然変異因子、桂皮アルデヒドの 作用機構の遺伝学的解析

第1節 緒言

本章では第1章で見い出された抗突然変異因子について、その作用機構の遺伝学的な解析から得られた結果について論述する。桂皮アルデヒド、クマリン、ウンベリフェロン、アニスアルデヒド、エチルバニリン、およびバニリンは、いずれも α, β -不飽和カルボニル構造をもつ構造類似体であり、同様の機構で作用しているものと推定されたため、ここでは桂皮アルデヒドについて研究を行った。種々の変異原物質で誘発される突然変異に対して桂皮アルデヒドの効果の強さを調べた。さらに、これらの変異原物質による突然変異生成におけるSOS修復の関与の程度についても調べ、抗突然変異作用との関連性について検討した。一方、桂皮アルデヒドが、DNA損傷を受けた菌の生存率を高める作用について

多数の DNA 修復変異株を用いて解析した。これらの結果をもとに、桂皮アルデヒドの抗突然変異作用の機構について考察を行った。

第2節 材料と方法

1. 変異原物質

フリルフラマイド (AF-2)、キャプタン、および MNNG は和光純薬工業より、ジエチルスルフェート (DES)、 β -プロセオラクトン (β -PL)、および 4-NQO は東京化成工業より、N-メチル-N-ニトロソウレア (MNU) と N-エチル-N-ニトロソウレア (ENU) は半井化学工業より購入した。また、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (ENNG) は岩井化学薬品から、エチルメタンスルホネート (EMS) はイーストマン・コダック社より購入した。

2. 培地

(1) トリプトン培地 (1ℓ 中の組成)

Difco	トリプトン	10 g
	NaCl	5 g

4アミン要求性株の培養時には4アミンを $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 加えた。また、寒天培地として使用

ある場合には Difco 寒天末を 1.5% 加えた。

(2) Vogel-Bonner E 最少培地 (1ℓ 中の組成)

フエン酸・1水塩 2 g

K_2HPO_4 10 g

$Na(NH_4)HPO_4 \cdot 4H_2O$ 3.5 g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g

必要に応じて糖類は 0.2~0.4%、アミノ酸類は 100~200 $\mu g/ml$ 、ビタミン類は 1 $\mu g/ml$ 添加した。

(3) SEM 寒天培地

Vogel-Bonner E 最少培地に Nutrient 培地を 5% (v/v)、寒天末を 1.5% 加えた。大腸菌 B 株系統の菌株の Trp^+ 復帰突然変異体の検出に用いた。

(4) HCA 寒天培地 (1ℓ 中の組成; Mount, 1977)

Tris 12.1 g

NH_4Cl 1 g

KH_2PO_4	22 mg
KCl	1.49 g
NaCl	4.68 g
Na_2SO_4	220 mg
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.03 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147 mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	8.1 mg
チアミン	200 μg
グルコース	2 g
アルギニン	200 mg
プロリン	200 mg
スレオニン	100 mg
ロイシン	100 mg
バリン	100 mg
イソロイシン	100 mg
カガミノ酸	40 mg
寒天	15 g
	(pH 7.2)

大腸菌 K-12 株系統の菌株の His^+ 復帰突然変異体の検出に用いた。

(5) TY 培地 (1ℓ 中の組成)

ポリペプトン	10 g
酵母エキス	1 g
グルコース	1 g
NaCl	8 g
CaCl ₂	2 mM

寒天はプレートの場合は 1.2%、上層軟寒天の場合は 0.5% 加えた。P1 ファージの実験に用いた。

(6) ペプトン培地 (1ℓ 中の組成)

ポリペプトン	10 g
NaCl	5 g
寒天	10 g

T4 ファージの実験に用いた。

3. 菌株およびファージ

表 3-1. に使用した菌株名、遺伝子型、および入手源を示した。なお、遺伝マーカーの導入にあたり、以下の手法を用いた。

Table 3-1 Bacterial strains

Strain	Genotype ^{a)}	Source	Reference/comments
<i>E. coli</i> B/r derivatives			
WP2	<i>trpE65(Oc), malB15, lon-11, sulA1</i>	Kada	Witkin & George, 1973
WP2s	as WP2, but <i>uvrA155</i>	Kada	Hill, 1965
CM561	as WP2, but <i>lexA102, malB⁺</i>	Kada	Bridges et al., 1972
CM571	as WP2, but <i>recA56</i>	Kada	Bridges et al., 1972
WP67	as WP2, but <i>uvrA155, polA1</i>	Kada	Witkin & George, 1973
CM611	as WP2, but <i>uvrA155, lexA102, malB⁺</i>	Kada	Bridges et al., 1972
ZA159	as WP2, but $\Delta(uvrB, chl)$		Spontaneous Chl^r mutant
ZA516	as WP2, but $\Delta(uvrB, chl), ssb-113$		P1(PAM2611) x ZA159
ZA545	as WP2, but <i>ssb-113</i>		P1(PAM2611) x WP2
<i>E. coli</i> K-12 derivatives			
AB1157	<i>thr-1, leu-6, proA2, his-4(Oc), argE3, thi-1, galK2, lacY1, ara-14, xyl-5, mtl-1, tsx-33, rpsL31, supE44</i>	Kato	Bachmann, 1972
TK603	as AB1157, but <i>uvrA6, ilv-325, argE⁺</i>	Kato	Kato & Nakano, 1981
TK610	as AB1157, but <i>uvrA6, umuC36, ilv-325, argE⁺</i>	Kato	Kato & Nakano, 1981
AB2463	as AB1157, but <i>recA13</i>	Kato	Bachmann, 1972
AB2480	as AB1157, but <i>uvrA6, recA13, thr⁺, leu⁺, his⁺, argE⁺</i>	Kato	Howard-Flanders et al., 1969
MO1594	as AB1157, but <i>uvrA6, recB21</i>	Oishi	Irbe et al., 1981
JC3914	as AB1157, but <i>uvrA6, recB21, recC22, argE⁺</i>	Kato	Kato et al., 1977
JC3913	as AB1157, but <i>uvrA6, recF143, argE⁺</i>	Kato	Kato et al., 1977
JC3881	as AB1157, but <i>recB21, recC22, recF143</i>	Kato	Kato et al., 1977

Table 3-1 (continued)

JM12123	as AB1157, but <i>tif-1</i> , <i>recA123</i>	Inoue	Castellazzi et al., 1972
GC714	as AB1157, but <i>uvrA</i> , <i>tif-1</i> , <i>sulA11</i> , <i>ilv</i> , <i>thr</i> ⁺ , <i>leu</i> ⁺ , <i>argE</i> ⁺ , <i>lacY</i> ⁺	Inoue	Villani et al., 1978
PAM2611	Hfr, <i>hisA323</i> , <i>ssb-113</i>	Bachmann	Johnson, 1977
H3000	Hfr, <i>met</i>	Yamagata	Bachmann, 1972
<i>Bacteriophage</i>			
P1		Yamagata	
T4		Kada	
T4	<i>ochre19</i>	Kada	

a) The nomenclature is that followed by Bachmann (1983). To avoid confusing nomenclature change, *tif-1* (now called *recA441*, Witkin et al., 1982) is retained. *tif* is one of the *recA* mutations that express SOS functions at 40°C without DNA damages.

(1) WP2 株より uvrB 変異株の分離

uvrB 遺伝子は図 3-1. に示したように chlA 遺伝子のごく近傍にあるので、塩素酸カリウム耐性変異株のほかからこの付近の遺伝子群に欠失の生じた $\Delta(uvrB, chl)$ 変異株として分離した。WP2 (trpE, malB) 株の培養液を 0.3 % $KClO_3$ 含有のトリプトン寒天培地上にまき Gas Pak 容器 (BBL 社製) 中で嫌氣的に培養した。37°C で一晚培養し、自然突然変異により生じた塩素酸カリウム耐性 (Chl^r) コロニーを分離した。得られた Chl^r 株の中から 15 J/m² の紫外線に感受性を示すものを選んだ。欠失の大きさを知るためにビオチン要求性、ガラクトース発酵性についても調べた。分離した変異株 (UV^s , Trp^- , Met^+ , Mal^-) の UV 感受性の原因が uvrB 遺伝子の欠失によるものであることは、Hfr 菌である H3000 株 (UV^r , Trp^+ , Met^- , Mal^+) との 35 分間の接合により UV^r , Trp^+ , Met^+ , Mal^- の組換体が高頻度で得られることで確認した。

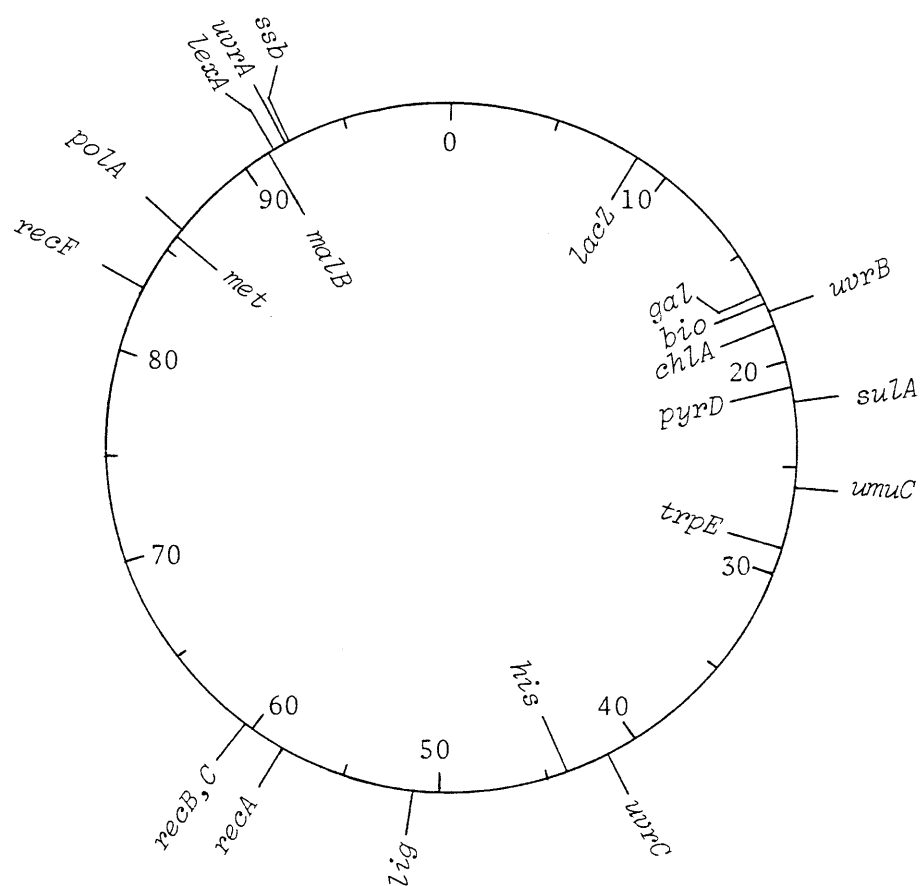


Fig. 3-1 Linkage map of Escherichia coli (Bachmann, 1983)

(2) P1 ファージによる形質導入

PAM2611 株 (ssb-113) の培養液に 2 mM の CaCl_2 と P1 ファージ液を加え 37°C で 20 分間静置した後、軟寒天液を用いて TY プレート上に広げた。 37°C で一晩培養して、2 ml の TY 培地と 1 ~ 2 滴のクロロホルムを加えた。溶菌液を試験管に移し低速遠心により P1 ファージ液を得た。WP2 株 (trpE, malB) および、ZA159 株 (uvrB, trpE, malB) の培養液に上記の P1 ファージ液を $\text{m.o.i.} = 0.2 \sim 0.4$ で 30 分間感染させた。遠心して未吸着ファージを除いた後、適当な希釈を行いマルトース最少寒天プレートにまいた。2 日間培養して得られた Mal^+ 組換え体の中から UV に対する感受性が親株に比べて著しく増大している変異株を分離した。

4. 抗突然変異活性の測定

WP2s 株 (trpE, uvrA)、ZA159 株 (trpE, uvrB) および TK603 株 (his, uvrA) の対数増

殖期の菌液をリン酸緩衝液で2度洗った後、変異原物質溶液を加え37°Cで15~60分間処理した。処理した菌液は2回の遠心・洗浄操作により変異原物質を除きリン酸緩衝液に懸濁させた。Trp⁺復帰突然変異体数を測定するため菌懸濁液の一部を桂皮アルデヒドを種々の濃度で添加したSEM寒天プレート上にまいた。生存菌数は菌懸濁液を適当に希釈した後、同種のSEM寒天プレートで測定した。またHis⁺復帰突然変異体の検出にはHCA寒天プレートを用いた。いずれも37°Cで3日間培養した後、復帰突然変異体と生存菌のコロニー数を計数して誘発突然変異頻度を求めた。

5. Trp⁺ 復帰突然変異の解析

Trp⁺の表現型としてプレート上に出現した復帰変異体についてサプレッサー変異の占める割合を調べるため、T4 ochre ファージに対する感受性を調べた。このファージはオーカーコードン(UAA)に対するサプレッサー変異

をもつ宿主菌においてのみ増殖が可能である。4-NQO および MNNG によって誘発された Trp^+ クローンを各々 100 個ずつ任意に選択した。ペプトン寒天プレートにまずファージ液をストリークし、さらに各々の Trp^+ クローンの培養液をクロスストリークした。37°C で一晩培養した後、溶菌の有無を調べた。

6. SOS 修復欠損株における突然変異の誘発
TK603 株 (umu^+ , his) および TK610 株 (umuC , his) の対数増殖期の菌液をリン酸緩衝液中で 2 度洗い、各々の変異原物質で 15 ~ 60 分間処理した。遠心・洗浄操作を 2 回くり返すことにより変異原物質を除き、再び緩衝液に懸濁させた。菌懸濁液の一部、および適当に希釈した液を HCA 寒天プレートにまき His^+ 復帰変異体数と生存菌数を調べた。コロニーは 3 日間 37°C で培養した後数えた。両株における His^+ 変異体の誘発頻度を求め比較をした。

7. DNA 損傷を受けた菌の生存率に対する効果

種々の DNA 修復変異株を用いて、リン酸緩衝液に懸濁した対数増殖期の菌液を 4-NQO または AF-2、ENNG、MNNG で処理した。この処理は菌の生存率がおおよそ 1~20 % になるような濃度および時間を設定して行った。処理を行った菌はリン酸緩衝液で洗った後に希釈を行い、トリフトン寒天プレートと 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の桂皮アルデヒド含有のトリフトン寒天プレートに同量ずつまいた。37°C で 3 日間培養して生存菌のコロニー数を数えた。

第3節 結果

1. 抗突然変異作用

第1章において論述したように、桂皮アルデヒドやバニリンなどのもつ抗突然変異作用は4-NQOやUV誘発突然変異に対しては認められたが、MNNG誘発突然変異に対しては全く認められなかった。この桂皮アルデヒドの4-NQO誘発突然変異に対する抗突然変異作用は、大腸菌B株由来のWP2s (uvrA, trpE) 株のみに認められる特殊な現象では無く、uvrB 変異株であるZA159 (Δ uvrB, trpE) 株や大腸菌K-12株由来のTK603 (uvrA, his) 株におけるHis⁺復帰突然変異でも認められることから、大腸菌において見られる共通な現象であると考えられた(表3-2.)。そこで、種々のタイプの変異原物質による誘発突然変異に対する桂皮アルデヒドの抗突然変異作用の強さについて調べた。WP2s株を各々の変異原物質で、プレート当たり約500~700のTrp⁺復帰変異体が得られるような濃度で処理した。表3-3. に示

したように、桂皮アルデヒドは 4-NQO の他に AF-2 およびキャプタン誘発突然変異に対して強い抗突然変異作用を示したが、MNNG や MNU のようなメチル化剤による誘発突然変異には全く効果を示さなかった。一方、 β -プロピオラクトン (β -PL) やエチル化剤である ENNG、ENU、EMS、および、DES による誘発突然変異に対しては弱い抗突然変異作用を示し、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の桂皮アルデヒド存在下で約 15 ~ 30 % の変異体数の減少が認められた。

Table 3-2 Antimutagenic effect of cinnamaldehyde on 4-NQO-induced mutagenesis in *uvr*⁻ derivatives of *E. coli* B/r and K-12.

Strain	4-NQO (μ g/ml· 15 min)	Cinnamaldehyde in agar plate (μ g/ml)	Viable cells /plate	Trp ⁺ (or His ⁺) revertants /plate
WP2s	2	0	26	1126
<i>uvrA</i>		20	43	600 (47) ^a
<i>trpE</i>		30	54	310 (72)
		40	60	140 (88)
ZA159	2	0	87	2588
<i>uvrB</i>		20	84	1054 (59)
<i>trpE</i>		30	67	546 (79)
		40	67	254 (90)
TK603	4	0	76	952
<i>uvrA</i>		40	77	525 (45)
<i>his</i>		60	68	165 (83)

a) % decrease in the number of revertants per plate

Table 3-3

Antimutagenic effect of cinnamaldehyde on chemically induced mutagenesis in *E. coli* WP2s (*uvrA*, *trpE*).

Mutagen treatment		Cinnamaldehyde in SEM agar medium ($\mu\text{g/ml}$)	Viable cells /plate	Induced revertants /plate	M.F. *	% de- crease
MNU	250 $\mu\text{g/ml}$, 60'	0	76	627	165	0
		30	77	636	165	
MNNG	3 $\mu\text{g/ml}$, 60'	0	109	490	89.9	1
		30	113	502	88.8	
ENU	200 $\mu\text{g/ml}$, 60'	0	291	714	49.1	30
		30	295	508	34.4	
ENNG	5 $\mu\text{g/ml}$, 60'	0	150	714	95.2	37
		30	159	474	59.6	
DES	200 $\mu\text{g/ml}$, 60'	0	211	652	61.8	27
		30	224	507	45.3	
EMS	1300 $\mu\text{g/ml}$, 60'	0	223	729	65.4	15
		30	217	600	55.3	
β -PL	30 $\mu\text{g/ml}$, 60'	0	220	666	60.5	36
		30	237	462	39.0	
Captan	2 $\mu\text{g/ml}$, 15'	0	180	553	61.4	67
		30	190	195	20.5	
4-NQO	1.8 $\mu\text{g/ml}$, 15'	0	260	742	57.1	81
		30	308 ^a	163	10.6	
AF-2	0.4 $\mu\text{g/ml}$, 60'	0	191	533	55.8	82
		30	273 ^a	141	10.3	

Experiments were carried out at several doses giving about 500 to 700 revertants per plate, and the representative data were shown. All the determinations are averages of 3 plates. The ranges of spontaneous Trp^+ revertants per plate were from 2 to 8. * Induced mutation frequency ($\text{Trp}^+ / 10^7$ cells).

^a, Significant increase in the number of viable cells was observed on the cinnamaldehyde-containing plates compared with that on the cinnamaldehyde-free plates.

2. Trp⁺ 復帰突然変異の解析

WP2s 株のトリプトファン要求性は *trpE* 遺伝子内のオーカー (ochre) 変異によるものである (Bridges et al., 1967)。したがって Trp⁺ の表現型となる復帰突然変異体は、このオーカー変異の位置での塩基対の変化による突然変異 (*trp⁺* mutation) と、tRNA 遺伝子内の突然変異の結果生じるオーカーコドンのサッレッサー変異 (*sup⁻* mutation) のいずれかによって生じる (Bridges et al., 1967; Osborn & Person, 1967)。そこで、桂皮アルデヒドの抗突然変異作用における 4-NQO と MNNG 誘発突然変異の差異が、この突然変異の2種の型の割合の違いに起因するものか否かを調べた。表3-4. に示したように、4-NQO 誘発突然変異も MNNG 誘発突然変異もそのほとんどはサッレッサー変異によるものであり、両者に質的な違いは認められなかった。

Table 3-4

Characterization of Trp⁺ revertant clones using T4 ochre mutant phage

Mutagen	No. of clones examined / Total revertants induced	Phage growth		% of suppressor mutation
		[+] (suppressor mutation)	[-] (<u>trpE</u> gene mutation)	
4-NQO				
2 µg/ml	100 / 627	94	6	94
MNNG				
2 µg/ml	100 / 825	92	8	92

3. SOS 修復欠損株における突然変異の誘発
桂皮アルデヒドが強い抗突然変異効果を示す UV、4-NQO、および、AF-2 誘発突然変異は、いずれも SOS 修復過程での修復ミスによってその突然変異のほとんどが生じると考えられている (Kato & Shinoura, 1977)。そこで、桂皮アルデヒドが SOS 修復を阻害することがその作用機構であるか否かについて調べた。すなわち、表 3-3. に示した各々の変異原物質について、SOS 修復欠損株である TK610 (umuC, his-4) と、その野生株 TK603 (umuC⁺, his-4) に対する突然変異誘発頻度を比べ、突然変異生成における SOS 修復の関与の程度を調べた。その結果を表 3-5. に示した。ENNG、ENU、EMS、および、DES の 4 種のイタリ化剤誘発突然変異は umuC 遺伝子の機能を必要とせず、両株に同程度の突然変異誘発が認められた。逆に、4-NQO、AF-2 誘発突然変異は umuC⁻ 変異株ではほとんど認められなかった。一方、キャプタン、および、 β -PL によ

る突然変異は umuC 遺伝子機能にかかりの依存性が、また、MNNG、MNUのメチル化剤による誘発突然変異はわずかな umuC 遺伝子機能依存性が認められた。

このように、桂皮アルデヒドが全く抗突然変異活性を示さなかった MNNG、MNU 誘発突然変異は、その一部は SOS 修復の際の修復ミスによって生じると考えられ、一方、桂皮アルデヒドが弱い抗突然変異作用を示した ENU、ENNG、EMS、DES などのメチル化剤誘発突然変異は umuC 遺伝子依存性の SOS 修復とは無関係に生じることが明らかとなった。したがって、桂皮アルデヒドが SOS 修復の過程を阻害するという仮説のみでは桂皮アルデヒドの抗突然変異作用をうまく説明することはできなかった。

Table 3-5

Mutation induction in the $umuC^+$ and $umuC^-$ strains.

Mutagen treatment		TK603 ($uvrA^-$, $umuC^+$)			TK610 ($uvrA^-$, $umuC^-$)			Ratio $\frac{M.F. (umuC^-)}{M.F. (umuC^+)}$
		Survivals / plate	Induced His ⁺ /plate	M.F.*	Survivals / plate	Induced His ⁺ /plate	M.F.*	
MNU	75 µg/ml, 60'	183	1769	96.7	157	1206	76.8	0.79
MNNG	2 µg/ml, 60'	150	734	48.9	105	411	39.1	0.80
ENU	75 µg/ml, 60'	120	634	52.8	124	611	49.3	0.93
ENNG	2.5 µg/ml, 60'	123	429	34.9	123	387	31.5	0.90
DES	200 µg/ml, 60'	135	618	45.8	111	519	46.8	1.02
EMS	1500 µg/ml, 60'	124	1057	85.2	144	1200	83.3	0.98
β-PL	100 µg/ml, 60'	113	750	66.4	97	212	21.9	0.33
Captan	2 µg/ml, 15'	100	816	81.6	107	77	7.20	0.088
4-NQO	2 µg/ml, 15'	89	868	97.5	87	5	0.57	0.0058
AF-2	0.4 µg/ml, 60'	86	362	42.1	96	2	0.21	0.0050

Experiments were carried out at various doses and the representative data were shown. All the determinations are averages of 2 plates. The ranges of spontaneous His⁺ revertants per plate : TK603 (6 - 15), TK610 (1 - 9).

* Induced mutation frequency (His⁺ / 10⁷ cells).

4. DNA 損傷を受けた菌の生存率に対する効果

第1章においても少し触れた様に、桂皮アルデヒドの抗突然変異活性を調べる際に SEM 寒天培地を用いたが、寒天培地中に桂皮アルデヒドが存在することにより誘発突然変異体数が減少する反面、4-NQO などの変異原で処理された菌の生存率の方は逆に高くなるという現象が認められた (表3-3., 表3-6.)。そこで、この現象に着目し抗突然変異作用との関連性について調べた。WP2s 株 (*uvrA*) を 4-NQO、AF-2、MNNG、または ENNG で 15 ~ 60 分間処理し、変異原物質を遠心により除いた後適当に希釈を行い、トリプトン寒天プレートと桂皮アルデヒドを 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で含有するトリプトン寒天プレートに同量ずつまいた。図3-2. に示したように、4-NQO および AF-2 で処理した菌の生存率は桂皮アルデヒド含有培地では著しく高くなり、対照のプレート上よりもはるかに多くのコロニーの形成が認められた。こ

の生存率が高くなる現象は ENNG で処理した場合にも弱く認められたが、MNNG で処理された菌においては全く観察されなかった。一方、MNU、ENU、EMS、DES などは抗菌力が弱いため上記のような実験を行うことは困難であった。このように、桂皮アルデヒドの抗突然変異作用と生存率を高める作用との間には相関が認められ、この生存率を高める作用が何らかの形で突然変異体の減少に結びついているものと推定された。

ところで、多くの DNA 修復変異株では突然変異が起きないか、あるいは極めて低い頻度でしか起こらない。そのため、これらの変異株を用いて抗突然変異活性を調べることはできないうが、菌の生存率に対する効果は容易に調べることができる。そこで種々の DNA 修復変異株での桂皮アルデヒドの効果と比較するために、図 3-2. に示したような 4-NQO に対する生存曲線を作り、1% 生存率を与える処理を行った時の桂皮アルデヒド含有培地でのコ

□ニ一数の増加率を求めた。大腸菌 B 株由来の WP2 系統株 (表 3-7.) においては、4-NQO 処理した菌の生存率の上昇は除去修復欠損株である uvrA 変異株 (WP2s)、uvrB 欠失変異株 (ZA159)、uvrA、polA 変異株 (WP67) がいずれも同程度であり、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の桂皮アルデヒドが存在することにより約 9 倍の著しい上昇が認められた。また、70 ロテアーゼ耐性の Lex A リゾレックスー蛋白をもつ lexA (Ind⁻) 変異株 (CM561, CM611) では uvrA 遺伝子の有無にかかわらず約 2.5 倍の弱い増加が観察されたが、RecA 蛋白機能を失った recA (Def) 変異株 (CM571) や一本鎖 DNA 結合蛋白に変異をもつ ssb 変異株 (ZA545)、uvrB、ssb 変異株 (ZA516) では全く効果が認められなかった。

一方、大腸菌 K-12 株由来の AB1157 系統株 (表 3-8.) においても uvrA 変異株 (TK603) で約 2.7 倍の生存率の上昇が認められた。この増加率は WP2s (uvrA) 株よりも低いものであったが、これは大腸菌 K-12 株と B 株との桂皮ア

ルデヒドに対する感受性の差によるものと考えられた。生存率の上昇効果は DNA 組換機能に關与する遺伝子のうち recB、recC 変異を導入 (MO1594、JC3914) することによって弱まったが、recF 変異の導入 (JC3913、JC3881) による影響は認められなかった。また、recA (Def) 変異株 (AB2463、JM12123、AB2480) 2" は uvrA 遺伝子の有無にかかわらず、いずれも B 株の場合と同様に全く効果が認められなかった。一方、SOS 修復欠損株である umuC、uvrA 変異株 (TK610) 2" は親株である TK603 (uvrA) 株よりも強い約 3.8 倍の増加率が認められた。さらに、RecA 蛋白が DNA 損傷はしに高温で活性化される tif 温度感受性変異株 (GC714) 2" は 40°C で培養した場合に約 6.8 倍の著しい生存率の上昇が観察された。

以上、4-NQO 処理した菌の生存率を高める作用には recA、ssb の両遺伝子機能が必須であり、uvrA、uvrB、polA、recF、umuC の遺伝子機能は直接關与していいことが、さらに、

lexA、recB、recC の遺伝子機能に、一部依存していることが判明した。

Table 3-6 Effect of cinnamaldehyde on cellular viability of WP2s treated with 4-NQO or AF-2.

Treatment	Dilution	Cinnamaldehyde in plate ($\mu\text{g/ml}$)	No. of colonies /plate	% survival	Increased ratio
None	10^{-6}	0	284 ± 16	100	1
		20	276 ± 16	97	0.97
		30	265 ± 11	93	0.93
		40	263 ± 18	93	0.93
4-NQO	$\frac{1}{5} \times 10^{-4}$	0	88 ± 5	1.5	1
		20	220 ± 29	3.9	2.6
		30	353 ± 24	6.2	4.1
		40	478 ± 29	8.4	5.6
AF-2	$\frac{1}{5} \times 10^{-4}$	0	43 ± 6	0.76	1
		20	170 ± 24	3.0	3.9
		30	236 ± 23	4.2	5.5
		40	235 ± 11	4.1	5.4

Cells were treated with 4-NQO at 10 $\mu\text{g/ml}$ or AF-2 at 2 $\mu\text{g/ml}$ for 15 min and then mutagen was removed by centrifugation. After appropriate dilution, 0.1 ml aliquots were spread on SEM agar plate with and without cinnamaldehyde (5 plates per each point).

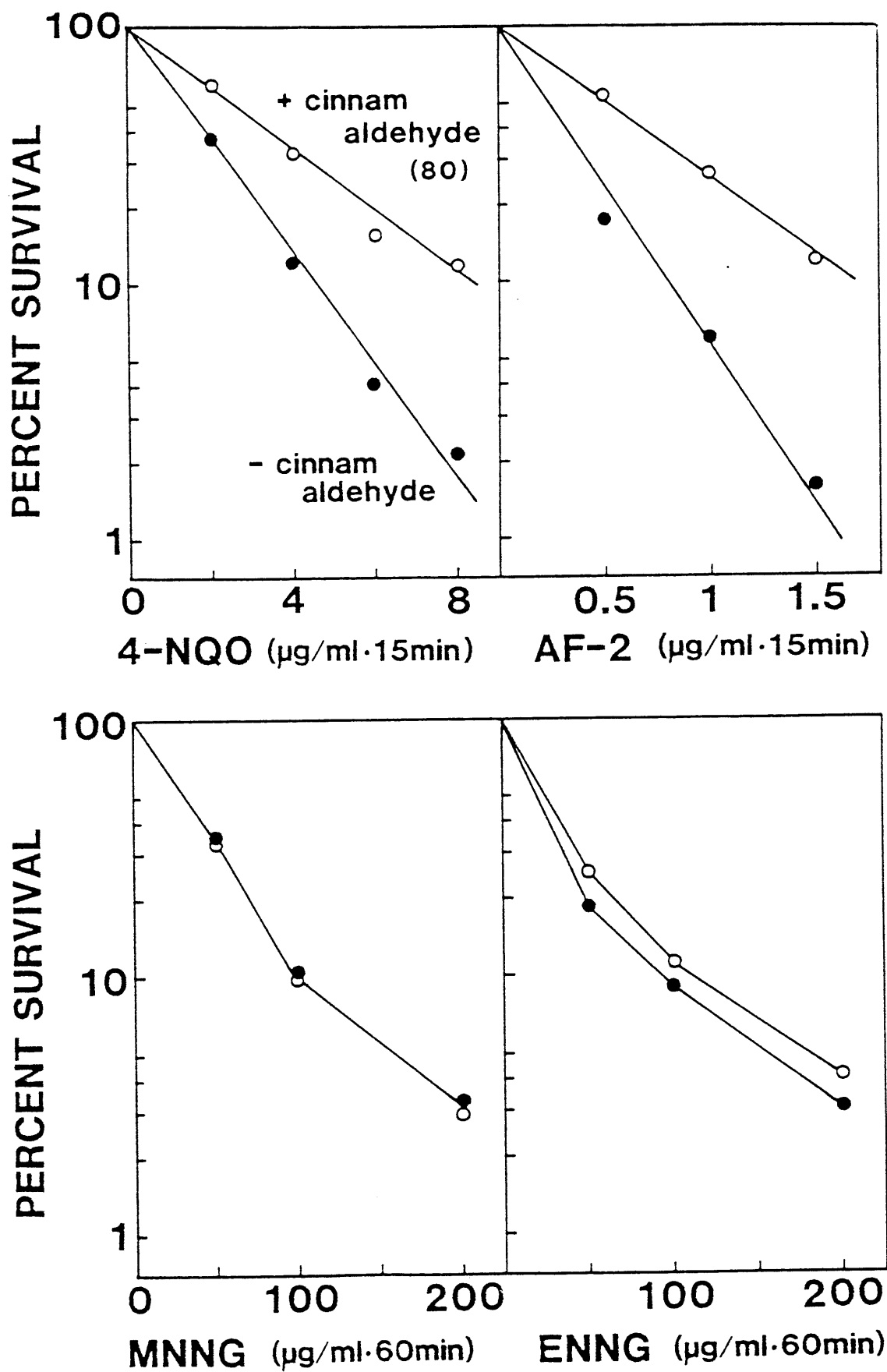


Fig. 3-2 Effect of cinnamaldehyde on cellular viability of WP2s after treatment with mutagens. Cells were treated with mutagens at indicated doses for 15 min (4-NQO and AF-2) or 60 min (MNNG and ENNG). Treated cells were washed, diluted and then spread on tryptone plates (●) and those containing 80 µg/ml cinnamaldehyde (○).

Table 3-7 Effect of cinnamaldehyde on cellular viability of DNA repair mutants of *E. coli* B/r after treatment with 4-NQO.

Strain	4-NQO treatment (min)	Cinnamaldehyde in plate	No. of colonies / plate	% survival	Increased ratio at 1% survival
WP2s <u>uvrA155</u>	None	-	160	100	8.5
		+	172	103	
	10 µg/ml (15)	-	96	3.0	
		+	466	15	
CM561 <u>lexA102</u>	None	-	199	100	2.6
		+	207	104	
	100 µg/ml (60)	-	74	3.7	
		+	142	7.1	
CM571 <u>recA56</u>	None	-	132	100	1.0
		+	122	92	
	10 µg/ml (15)	-	77	5.8	
		+	79	5.9	
WP67 <u>uvrA155</u> <u>polA1</u>	None	-	106	100	9.8
		+	103	97	
	10 µg/ml (15)	-	181	8.5	
		+	621	29	
CM611 <u>uvrA155</u> <u>lexA102</u>	None	-	144	100	2.5
		+	141	98	
	2 µg/ml (15)	-	177	1.2	
		+	439	3.0	
ZA159 <u>ΔuvrB</u>	None	-	182	100	9.0
		+	196	108	
	20 µg/ml (15)	-	151	2.5	
		+	880	15	
ZA545 <u>ssb-113</u>	None	-	146 ^a	100	0.30
		+	141 ^a	97	
	20 µg/ml (15)	-	92 ^a	1.9	
		+	31 ^a	0.64	
ZA516 <u>ΔuvrB</u> <u>ssb-113</u>	None	-	94 ^a	100	1.0
		+	87 ^a	93	
	1 µg/ml (15)	-	133 ^a	1.4	
		+	134 ^a	1.4	

Treated and untreated cells were diluted and spread on tryptone agar plates with and without 80 µg/ml cinnamaldehyde. ^a incubated at 30°C for 3 days.

Table 3-8 Effect of cinnamaldehyde on cellular viability of DNA repair mutants of *E. coli* K-12 after treatment with 4-NQO.

Strain	4-NQO treatment (min)	Cinnam- aldehyde in plate	No. of colonies / plate	% survival	Increased ratio at 1% survival
TK603 <u>uvrA6</u>	None	-	204	100	2.7
		+	213	104	
	10 µg/ml (15)	-	253	2.5	
		+	582	5.7	
AB2463 <u>recA13</u>	None	-	103	100	0.95
		+	105	102	
	30 µg/ml (15)	-	318	3.1	
		+	299	2.9	
JM12123 <u>recA123</u>	None	-	139	100	0.55
		+	135	97	
	20 µg/ml (15)	-	787	5.7	
		+	518	3.8	
AB2480 <u>uvrA6</u> <u>recA13</u>	None	-	91	100	0.28
		+	62	68	
	0.2 µg/ml (15)	-	198	2.2	
		+	75	0.83	
M01594 <u>uvrA6</u> <u>recB21</u>	None	-	100	100	1.5
		+	91	91	
	2 µg/ml (15)	-	213	2.1	
		+	315	3.1	
JC3914 <u>uvrA6</u> <u>recB21</u> <u>recC22</u>	None	-	69	100	1.4
		+	66	96	
	2 µg/ml (15)	-	144	4.2	
		+	183	5.3	
JC3913 <u>uvrA6</u> <u>recF143</u>	None	-	113	100	3.2
		+	122	108	
	2 µg/ml (15)	-	214	1.9	
		+	517	4.6	
JC3881 <u>recB21</u> <u>recC22</u> <u>recF143</u>	None	-	102	100	1.8
		+	105	103	
	40 µg/ml (15)	-	112	3.3	
		+	184	5.4	

Table 3-8 (continued)

TK610	<u>uvrA6</u>	None	-	177	100	
	<u>umuC36</u>		+	181	102	
		10 µg/ml (15)	-	183	1.0	
			+	696	3.8	3.8
GC714	<u>uvrA</u>	None	-	143 ^a	100	
	<u>tif-1</u>		+	134 ^a	94	
			-	148 ^b	100	
			+	141 ^b	95	
		20 µg/ml (15)	-	361 ^a	2.5	
			+	794 ^a	5.5	2.6
			-	269 ^b	1.8	
			+	1413 ^b	9.5	6.8

Treated and untreated cells were diluted and spread on tryptone agar plates with and without 80 µg/ml cinnamaldehyde.

^a incubated at 30°C for 3 days. ^b incubated at 40°C for 2 days.

第4節 考察

桂皮アルデヒドの抗突然変異作用は 4-NQO、および AF-2 誘発突然変異に対して著しい効果があり、MNNG、および MNU 誘発突然変異に対しては全く効果が認められなかった。これは変異原物質である 4-NQO と MNNG とで突然変異が生じる位置 (trpE 遺伝子内と sup 遺伝子内) の割合が量的に異なるためではなく、両者で突然変異生成機構が質的に異なるためであると考えられた。大腸菌では、4-NQO や AF-2 はいずれも突然変異生成に umuC 遺伝子機能 (SOS 修復) を必要とする変異原物質であり (表 3-5.)、突然変異は SOS 修復の際の修復ミスによって生じる。したがって、桂皮アルデヒドの抗突然変異作用としては次のような機構が考えられる。

- (1) 突然変異生成の原因となる SOS 修復過程の阻害作用。
- (2) SOS 修復における修復精度を高める作用。
- (3) 除去修復や組換修復などの正確な DNA 修復

系の促進作用。

ところで、MNG、およびMNU誘発突然変異は umuC 遺伝子機能に一部依存していた。つまり突然変異の一部は SOS 修復の過程で生じると考えられるが、桂皮アルデヒドは全く抗突然変異作用を示さなかった。これとは逆に、桂皮アルデヒドが弱い抗突然変異作用を示した ENNG、ENU、EMS、DES 誘発突然変異は、いずれも umuC 遺伝子機能を必要とせず、SOS 修復過程以外の経路で突然変異が生じると考えられる。一方、SOS 修復機構は DNA に損傷を受けた菌が突然変異という代償を払ってまで生き残るための言わば緊急の誘導性の DNA 修復経路であり、もしこの修復系が阻害されるならば菌の生存率は低下することが予想されるが、少なくとも菌の生存率が上昇することは考えられない。このようなことから、桂皮アルデヒドが SOS 修復を阻害するという 1 番目の仮説では矛盾なく説明することができよう。さらに、4-NQO 処理した菌の生存率

を高める桂皮アルデヒドの作用は umuC 変異 (SOS 修復欠損) の導入により、いっそう増強された。したがって、SOS 修復における修復の正確度を高めるという2番目の作用仮説も適切でよいと考えられる。

ところで、桂皮アルデヒドにより DNA 損傷を受けた菌の生存率が上昇するということは、この物質によって DNA 修復が促進されることを示唆している。この場合、突然変異誘発頻度は下がることから、その促進を受ける DNA 修復系は正確な修復系でなければならぬ。

4-NQO あるいは AF-2 によって生じた DNA 損傷のほとんどは、図 3-3 に示した3種類の経路によって修復を受ける。第1は除去修復経路で、野生株 (uvr⁺) の場合は DNA 損傷の大半がこの経路で修復される。この修復機構には、uvrA、uvrB、uvrC、polA、lig 遺伝子などが関与し、その修復は極めて正確であると考えられている。なぜならば、除去修復能欠損株では 4-NQO による誘発突然変異頻度が著しく高

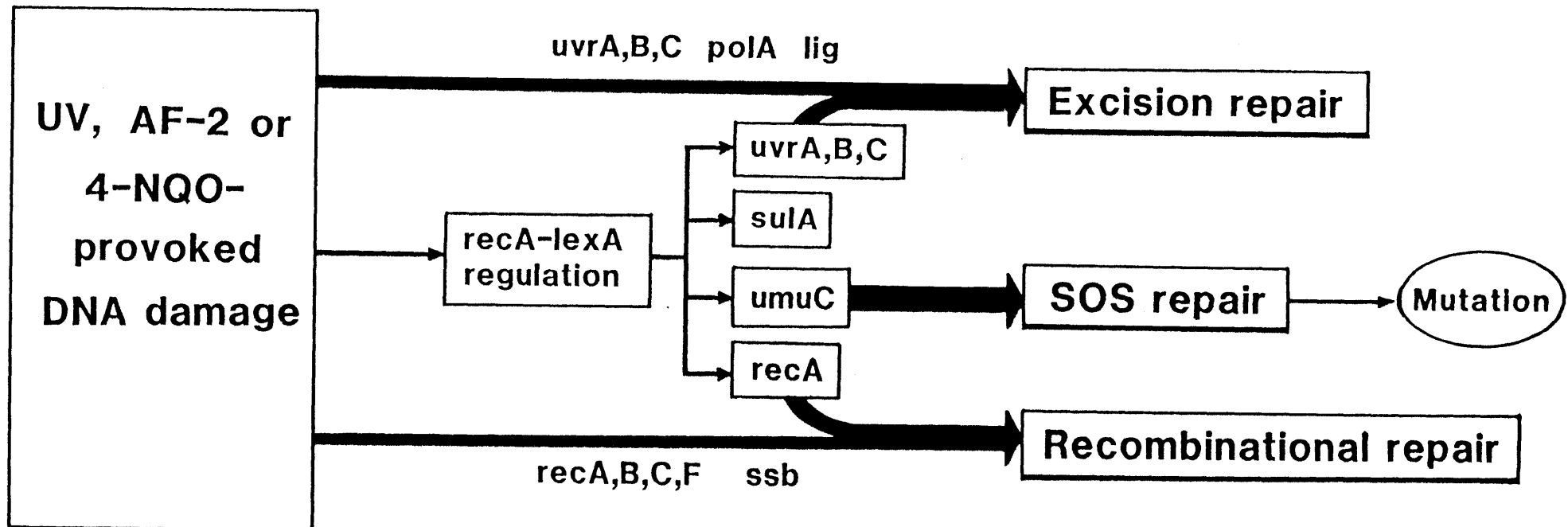


Fig. 3-3 DNA repair pathways for DNA damages provoked by UV, AF-2 or 4-NQO.

Table 3-9 DNA repair genes and their products

Gene	Gene product	SOS regulation
<i>lexA</i>	LexA repressor protein	+
<i>lig</i>	DNA ligase	-
<i>polA</i>	DNA polymerase I	-
<i>recA</i>	RecA protein (protease)	+
<i>recB</i>	Exonuclease V subunit	-
<i>recC</i>	Exonuclease V subunit	-
<i>recF</i>	?	-
<i>ssb</i>	Single-strand DNA-binding protein	+
<i>umuC</i>	UmuC protein (function unknown)	+
<i>uvrA</i>	UvrABC endonuclease subunit	+
<i>uvrB</i>	UvrABC endonuclease subunit	+
<i>uvrC</i>	UvrABC endonuclease subunit	+

くはるからである。uvrA、uvrB、uvrC 遺伝子は Uvr ABC エンドヌクレアーゼの、polA 遺伝子は DNA ポリメラーゼ I の、また、lig 遺伝子は DNA リガーゼの構造遺伝子である (表 3-9)。
 DNA 損傷はもう一つの正確な修復系である組換え修復経路によっても修復が行われる。
 この修復機構には recA、recB、recC、recF、ssb 遺伝子などが関与する。recB、recC 遺伝子はエキソヌクレアーゼ V の構造遺伝子であるが、recF 遺伝子産物は同定されていない。
 これら recB、recC、recF 遺伝子はいずれが機能を失っても DNA 組換え頻度が低下する (Kato et al., 1977)。recA 遺伝子産物である RecA 蛋白質はそのプロテアーゼ活性により SOS 反応を制御する機能以外に、DNA 組換え反応においても必須の成分であり、recA (Def) 変異株では遺伝的組換えが全く起こらない。また、ssb 遺伝子は一本鎖 DNA 結合蛋白質の構造遺伝子である。ssb 変異株でも SOS 反応の誘発が起きないことから、RecA 蛋白質の酵素活性発現に

この一本鎖DNA結合蛋白が必須の役割を果たしているものと考えられている (Lieberman & Witkin, 1983)。第3の修復経路は誘導性の修復経路で SOS 修復と呼ばれているものである。DNA 損傷が引きがねになり、RecA 蛋白のプロテアーゼ活性が活性化され LexA リプレッサー蛋白を分解する。その結果、SOS 遺伝子群の発現が起き、umuC 遺伝子の関与する SOS 修復が働く。umuC 遺伝子産物の 45,000 ダルトンの蛋白質の機能は現在不明である。umuC 変異株では 4-NQO 誘発突然変異が起こるから、SOS 修復系では修復の際に誤りを起こし易いと考えられている。なお、SOS 反応の誘導状態下では uvrA、uvrB、uvrC、recA、ssb 遺伝子の発現量も増えるため、同時に除去修復や組換修復系も活性化を受けることになる。

以上、3種類のDNA修復系が4-NQOによって生じたDNA損傷に働く訳であるが、桂皮アルデヒドの抗突然変異作用や生存率を高める

作用は除去修復能欠損株 (uvrA) で認められた現象なので、桂皮アルデヒドが促進させる正確な DNA 修復系は組換修復機構であると推定された。事実、桂皮アルデヒドによる生存率の上昇作用の強さは菌の DNA 組換能とよく一致し、組換能の全くない recA 変異株では桂皮アルデヒドの効果は認められず、組換能の低下した recB、recC 変異株では桂皮アルデヒドによる生存コロニー数の増加の程度も弱かった。また、RecA 蛋白の増幅量とも良い相関を示し、RecA 蛋白の増幅が起きない lexA (Ind⁻) 変異株での効果は弱く、一方、tif 変異株を 40℃ で培養して RecA 蛋白量を増幅させると桂皮アルデヒドの効果も強く認められた。umuC 変異株では RecA 蛋白量が増えていると報告されているが (Salle & Paoletti, 1983)、やはりこの変異株では桂皮アルデヒドの効果が強く現われた (表 3-8.)。したがって、以上のことから桂皮アルデヒドは RecA 蛋白に作用することによって正確な DNA 修復系である

組換修復系を活性化し、その結果として、突然変異誘発頻度の低下と DNA 損傷を受けた菌の生存率の上昇が起きるものと考えられた。

第 5 節 要約

紫外線や 4-NQO 誘発突然変異に対して強い抗突然変異作用を示す桂皮アルデヒドについて、種々の変異原物質による誘発突然変異に対する抗突然変異作用の強さを調べた。その結果、AF-2 およびキャプタンによる誘発突然変異に対しても桂皮アルデヒドは顕著な抗突然変異作用を示すことが判明した。また、桂皮アルデヒドは ENU、ENNG などのエチル化剤誘発突然変異に対しては弱い抗突然変異作用を示したが、MNU、MNNG などのメチル化剤誘発突然変異に対しては全く効果がなかった。

一方、これらの変異原物質による突然変異誘発パターンを知る目的で、SOS 修復能欠損株 (umuC 変異株) を用いて突然変異生成における SOS 修復の関与の程度を調べた。その結果、桂皮アルデヒドが抗突然変異活性を示したエチル化剤による誘発突然変異は umuC 変異株と野生株とで差は認められず、したがって SOS 修復経路とは無関係に突然変異が生じ

ることが判明した。また、桂皮アルデヒドの効果が悪かったメチル化剤により誘発される突然変異は野生株に比べ umu C 変異株の方が頻度が低く、したがって、突然変異の一部分は SOS 修復の際に生じると考えられた。これらのことから、桂皮アルデヒドの抗突然変異作用を突然変異生成の一因である SOS 修復経路の阻害で説明することはできなかった。

ところで、桂皮アルデヒドの作用により 4-NQO 誘発突然変異体数が減少する反面、4-NQO 処理によって DNA に損傷を受けた菌の生存率は桂皮アルデヒドが存在することによって著しく上昇することを見い出した。4-NQO 以外にもいくつかの変異原物質について調べたところ、この生存率を高める作用の強さと抗突然変異作用の強さとの間には相関が認められた。すなわち、AF-2 処理菌体の生存率は桂皮アルデヒドを作用させることにより著しい上昇が観察されたが、MNNG 処理菌体の生存率は桂皮アルデヒドの影響を受けなかった。

また、ENNG 処理菌体ではその生存率に対し桂皮アルデヒドが弱い上昇作用を示した。したがって、突然変異抑制と生存率上昇の両現象は桂皮アルデヒドの同一の作用の結果あらわれるものと考えられた。

桂皮アルデヒドによる生存率上昇作用は、この物質が DNA 修復系を活性化、促進していることを強く示唆するものであった。そこで、4-NQO 処理により DNA 損傷を与えた菌の生存率に対する桂皮アルデヒドの効果を種々の DNA 修復変異株を用いて調べた。その結果、桂皮アルデヒドの作用には recA 遺伝子機能が必須であり、RecA 蛋白質欠損により遺伝的組換え能が全くなくなつた recA (Def) 変異株では桂皮アルデヒドの作用は認められず、また、組換え能の低下した recB、recC 変異株や RecA 蛋白質の増幅が起きない lexA (Ind⁻) 変異株では桂皮アルデヒドの作用は弱いことが判明した。一方、tif 温度感受性変異株を高温で培養して RecA 蛋白質量を増幅させると桂皮アルデヒ

された Trp⁺ 復帰変異体が減少する原因としては次のような場合が考えられる。図 1-5. に示したように、1 番目には 4-NQO あるいはその代謝活性化体が桂皮アルデヒドやバニリンなどの因子と直接反応を起こして不活性化される場合である。今回の実験条件下では 4-NQO で菌を処理した後、2 回の洗浄によって 4-NQO を除いてから抗突然変異因子に作用させているため上記の可能性は低いものと考えられた。しかも、4-NQO または 4-HAQO と桂皮アルデヒドやバニリンなどの抗突然変異因子とをリン酸緩衝液中であらかじめ 15 分間接触させても 4-NQO や 4-HAQO の突然変異誘発活性の低下が認められなかったことから、突然変異抑制作用は変異原物質の不活性化では説明されなかった。

2 番目には 4-NQO から 4-HAQO への細菌細胞内での代謝活性化反応の阻害が起きた場合である。この可能性も桂皮アルデヒドやバニリンなどの因子が 4-HAQO 誘発突然変異に対

第 6 節 参考文献

- Bachmann, B. J. (1972) Pedigree of some mutant strains of Escherichia coli K-12, Bacteriol. Rev., 36, 525-557.
- Bachmann, B. J. (1983) Linkage map of Escherichia coli K-12, Edition 7, Microbiol. Rev., 47, 180-230.
- Bridges, B. A., R. E. Dennis, and R. J. Munson (1967) Mutation in Escherichia coli B/r WP2 try⁻ by reversion or suppression of a chain termination codon, Mutation Res., 4, 502-504.
- Bridges, B. A., R. P. Mottershead, A. M. Rothwell, and M. H. L. Green (1972) Repair-deficient bacterial strains suitable for mutagenicity screening: Tests with the fungicide captan, Chem-Biol. Interact., 5, 77-84.
- Castellazzi, M., J. George, and G. Buttin (1972) Prophage induction and cell division in E. coli, Mol. Gen. Genet., 119, 153-174.
- Hill, R. F. (1965) Ultraviolet-induced lethality and reversion to prototrophy in Escherichia coli strains with normal and reduced dark repair ability, Photochem. Photobiol., 4, 563-568.
- Howard-Flanders, P., L. Theriot, and J. B. Stedeford (1969) Some properties of excision-defective recombination-deficient mutants of Escherichia coli K-12, J. Bacteriol., 97, 1134-1141.
- Irbe, R. M., L. M. E. Morin, and M. Oishi (1981) Prophage (ϕ 80) induction in Escherichia coli K-12 by specific deoxyoligonucleotides, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 78, 138-142.
- Johnson, B. F. (1977) Genetic mapping of the lexC-113 mutation, Mol. Gen. Genet., 157, 91-97.

- Kato, T., and Y. Shinoura (1977) Isolation and characterization of mutants of Escherichia coli deficient in induction of mutations by ultraviolet light, *Mol. Gen. Genet.*, 156, 121-131.
- Kato, T., and E. Nakano (1981) Effects of the umuC36 mutation on ultraviolet-radiation-induced base-change and frameshift mutations in Escherichia coli, *Mutation Res.*, 83, 307-319.
- Kato, T., R. H. Rothman, and A. J. Clark (1977) Analysis of the role of recombination and repair in mutagenesis of Escherichia coli by UV irradiation, *Genetics*, 87, 1-18.
- Lieberman, H. B., and E. M. Witkin (1983) DNA degradation, UV sensitivity and SOS-mediated mutagenesis in strains of Escherichia coli deficient in single-strand DNA binding protein: Effects of mutations and treatments that alter levels of exonuclease V or RecA protein, *Mol. Gen. Genet.*, 190, 92-100.
- Mount, D. W. (1977) A mutant of Escherichia coli showing constitutive expression of the lysogenic induction and error-prone DNA repair pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 74, 300-304.
- Osborn, M., and S. Person (1967) Characterization of revertants of E. coli WU36-10 and WP2 using amber mutants and an ochre mutant bacteriophage T4, *Mutation Res.*, 4, 504-507.
- Salles, B., and C. paoletti (1983) Control of UV induction of RecA protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 80, 65-69.
- Villani, G., S. Boiteux, and M. Radman (1978) Mechanism of ultraviolet-induced mutagenesis: Extent and fidelity of in vitro DNA synthesis on irradiated templates, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 75, 3037-3041.

Witkin, E. M., and D. L. George (1973) Ultraviolet mutagenesis in polA and uvrA derivatives of E. coli B/r: evidence for an inducible error-prone repair system, *Genetics*, 73, 91-108.

Witkin, E. M., J. O. McCall, M. R. Volkert, I. E. Wermundsen (1982) Constitutive expression of SOS functions and modulation of mutagenesis resulting from resolution of genetic instability at or near the recA locus of Escherichia coli, *Mol. Gen. Genet.*, 185, 43-50.

第4章 RecA蛋白質の *in vitro* 酵素反応に対する桂皮アルデヒドの作用

第1節 緒言

前章で述べた様に抗突然変異因子の桂皮アルデヒドの作用機構として、RecA蛋白質の関与する組換修復系への作用が考えられた。このDNA損傷に対する組換修復反応の詳細は今のところ不明であるが、最近RecA蛋白質が大量に精製されるようになり (Ogawa et al., 1978; Shibata et al., 1979)、RecA蛋白質のもつ種々の酵素活性が明らかになってきた。RecA蛋白質はその特異的プロテアーゼ活性 (Roberts et al., 1978) の他に、一本鎖DNA依存性ATPase活性 (Ogawa et al., 1978)、超ラセンDNA (RFI DNA) 依存性ATPase活性 (Shibata et al., 1979)、相同性DNA依存性ATPase活性 (Ohtani et al., 1982)、相同性DNA対合 (Dループ形成) 反応 (Shibata et al., 1979)、Dループ解離反応 (Shibata et al., 1982)、ヘテロ二重鎖の伸長反応 (Cox & Lehman,

1981)、DNA鎖の交換反応 (DasGupta et al., 1981)、一本鎖DNA依存性二重ラセン巻きもどし反応 (Cunningham et al., 1979) などの諸反応を司る。これらの諸反応は互いに独立した反応ではなく、いずれも二重鎖DNAの巻きもどしと、その際の相同性DNAの対合反応に対する観察法の違いによるものである。

そこで、本章においては RecA 蛋白の in vitro 反応のうち、一本鎖DNA依存性 ATP 加水分解 (ATPase) 活性、RFI DNA依存性 ATPase 活性、相同性のあるDNAの対合によるDループ形成反応、および、ヘテロ二重鎖の伸長反応を指標として、桂皮アルデヒドの影響について調べた結果について論述する。

第2節 材料と方法

1. ファージおよび菌株

- (1) fd-一本鎖 DNA ファージ
- (2) ϕ X174 am3 一本鎖 DNA ファージ
- (3) E. coli K-12, F⁺ S26

fd ファージの宿主菌として用いた。

- (4) E. coli C, HF4714

ϕ X174 am3 ファージの宿主菌として用いた。

いづれも国立遺伝学研究所の井上正博士より入手した。

2. 培地および緩衝液

- (1) M9CA 培地 (1ℓ 中の組成)

Na_2HPO_4	6 g
KH_2PO_4	3 g
NaCl	0.5 g
NH_4Cl	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	14.7 mg

グルコース	4 g
カザミノ酸	2.5 g
チミン	20 mg

(2) TESM 緩衝液 (pH 7.4)

20 mM Tris-Cl

5 mM EDTA

50 mM NaCl

20 mM MgCl₂

(3) SSC 緩衝液

0.15 M NaCl

0.015 M クエン酸ナトリウム

(4) 10× SSC 緩衝液

1.5 M NaCl

0.15 M クエン酸ナトリウム

(5) TAE 緩衝液 (pH 8)

40 mM Tris

5 mM 酢酸ナトリウム

1 mM EDTA

(6) TE (0.1) 緩衝液 (pH 7.5)

10 mM Tris-Cl

0.1 mM EDTA

(7) TE (1) 緩衝液 (pH 7.5)

10 mM Tris-Cl

1 mM EDTA

(8) Rec A 緩衝液 (pH 7.5)

50 mM Tris-Cl

0.3 mM EDTA

5 mM ジチオスレイトール (DTT)

10 % グリセリン

(9) C IV 緩衝液 (pH 7.5)

128 mM Tris-Cl

720 μ g/ml ウシ血清アルブミン (BSA)

3. 試薬および材料

(1) ウシ血清アルブミン (BSA)

ベ-リンガー・マンハイム社より購入した。
この BSA 中に DNase の混入が正しいことは、 ϕ X174
ファ-ージの RFI DNA と $MgCl_2$ の存在下で 37°C
30 分間インキュベートした後、電気泳動パタ-
ーンに変化が認められ正しいことで確認した。

(2) ポリエチレングリコール (PEG 6000)

Koch-Light Laboratories 社より購入した。結晶
を乳鉢で細かく研いで粉末状にして用いた。

(3) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) およびラ

ウロイルサルコシン酸ナトリウム (Sarkosyl)

SDS はメルク社より、また、sarkosyl は東
京化成工業より購入した。

(4) アデノシン - 5' - 三リン酸 (ATP)、アデノシン - 5' - ニリン酸 (ADP)、アデノシン - 5' - 一リン酸 (AMP)、フレアチンリン酸、およびジチオスレートール (DTT)

ATP・2Na とフレアチンリン酸・2ナトリウムはシグマ・ケミカルより、ADP・Na および AMP・Na は和光純薬工業より、DTT は半井化学薬品より購入した。いずれも蒸留水に溶かした後 NaOH を加えて pH 7.5 に調整した。

(5) ニトロセルロースフィルター

0.45 μm の孔径のニトロセルロースフィルター (Santorius membrane filter SM11306) を用いた。使用直前に 10×SSC 緩衝液で洗った。

(6) ポリエチレンジイミン薄層カラム

Macherey-Nagel 社製の Polygram Cel 300 PEI を用いた。プラスチックシート上の薄層カラムに溝をつけ、1×10 cm の帯状に区分けた。蒸留水で洗った後、ドライヤーでよく乾燥さ

せて使用した。

(7) 酵素

豚臓リボヌクレアーゼ A (RNase A, type I-AS)、リゾチーム、クレアチンキナーゼ (CKase, type I) はシグマ・ケミカルより購入した。また、制限酵素 Hpa I は宝酒造から購入した。RNase 溶液は、あらかじめ 80°C で 10 分間の熱処理をして混在する DNase 活性を除いた。

(8) RecA 蛋白

RecA 蛋白 ($36.2\mu\text{M}$) は理化学研究所、微生物学研究室の柴田武彦博士より分与されたものを用いた。

(9) fd ファージの環状一本鎖 DNA (ssDNA) および DNA 断片の調製

M9CA 培地で培養した対数増殖期にある大腸菌 S26 株の培養液 ($\text{OD}_{600} = 0.23$) に fd ファージを感染多重度 (m.o.i.) 約 6 で感染させた。37

℃で5時間振とう培養した後、8,000 rpm, 4℃で5分間遠心を行い上清のファージ液を集めた。NaClを最終濃度が0.5 Mになるように加え、さらにPEG6000の粉末を2%加え、4℃で2時間攪拌を行った。4℃に一晩静置した後、8,000 rpm, 4℃で10分間遠心を行いファージ粒子のペレットを得た。少量のTESM緩衝液に懸濁し、再び10,000 rpm, 4℃で10分間の遠心により上清を回収した。密度 $\rho=1.2 \sim 1.4$ の範囲で塩化セシウム溶液を重層したチューブにファージ液をのせ、25,000 rpm, 4℃で20時間遠心した。ファージ粒子のバンド部分を回収し、SSC緩衝液に対して一昼夜4℃で透析を行った。得られたファージ精製液(約 $2 \times 10^{13}/\text{ml}$)にSDSを0.1%加え、48℃で5分間加温した。TE(1)緩衝液で飽和したフェノール液を等量加え、48℃で15分間抽出を行った後、室温で3,000 rpm, 5分間の遠心を行い水層を分離した。フェノール処理を再度くり返した後、等量のエーテルを加えフェノールを抽出し、水層を

TE (0.1) 緩衝液に対して透析を行った。得られた fd ファージの環状一本鎖 DNA (fd ssDNA, 300 μ M) の一部を 100°C で 7 分間の熱処理を行って ssDNA 断片を調製した。

(10) ϕ X174 ファージの一本鎖 DNA 断片の調製

M9CA 培地で培養した対数増殖期の大腸菌 HF4714 株の培養液に CaCl_2 を最終濃度 1 mM とするように加え、 ϕ X174 am3 ファージを m.o.i. = 3 で感染させた。37°C で約 4 時間振とう培養を続け、溶菌が認められたところで 8,000 rpm, 4°C で 10 分間の遠心を行い上清を集めた。NaCl を最終濃度 0.5 M で添加し、さらに PEG-6000 を 10% 加えて 4°C に 24 時間放置した後、8,000 rpm, 4°C, 10 分間の遠心により ϕ X174 ファージ粒子のペレットを得た。以下、fd ファージの場合と同様の操作で塩化セシウム平衡密度勾配遠心 ($\rho = 1.2 \sim 1.6$) によりファージを精製し、SDS 処理、フェイール処理を行い、 ϕ X174 ssDNA (320 μ M) を調製した。ssDNA 断

片は 100°C 、7 分間の熱処理を行って調製した。

(II) fd ファージの閉環状二重鎖 DNA (RFI DNA) の調製

M9CA 培地で培養した S26 株の菌液 (約 $4 \times 10^8/\text{ml}$) に fd ファージを $\text{m.o.i.} = 20$ で感染させた。15 分後にクロラムフェニコールを $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 加え、さらに 2 時間培養を続けた。8,000 rpm, 4°C 、10 分間の遠心により集菌し、少量の緩衝液 (10% ショ糖、50 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, pH 8.0) に懸濁させた。リゾチームを $0.5 \text{ mg}/\text{ml}$ 、sarkosyl を 0.1% 加えて 4°C に 10 分間静置して溶菌させた。50,000 rpm, 4°C 、60 分間の遠心により得られた上清についてフェノール処理を 3 回くり返した。 $1/15$ 容の 4 M NaCl と 2.5 容のイタノールを添加し -20°C に一晩静置した。8,000 rpm, 4°C 、10 分間の遠心により DNA を沈殿させ、少量の TE(1) 緩衝液に溶かした。 37°C で 10 分間 RNase 処理 ($200 \mu\text{g}/\text{ml}$) を行い、ショ糖密度勾配 (5~20% ショ糖 / 10 mM Tris-Cl,

1 mM EDTA、1 M NaCl、pH 7.5) による 25,000 rpm、2°C、19 時間の遠心を行った。各フラクションに分けて採取し、 A_{260} の吸収を測定して fd ファージの二重鎖 DNA (dsDNA) モノマーの分画を集めた (図 4-1, 分画番号 7~9)。3 容のエタノールを加えて DNA を沈殿させ、30,000 rpm、4°C で 60 分間遠心し、上清を除き少量の TE(1) 緩衝液に溶かした。TE(0.1) 緩衝液に対して透析を 4°C で一晩行った。得られた fd ファージの開環状二重鎖 DNA (RF I DNA, 251 μ M) 中に開環状二重鎖 DNA (RF II DNA) がほとんど存在しないことを電気泳動によって確かめた。

(12) ^3H 標識した fd ファージ RF I DNA

^3H -チミジンで標識された fd ファージの RF I DNA (319 μ M) は、国立遺伝学研究所の井上正博士より分与されたものを用いた。

(13) ^3H 標識した fd ファージの直鎖状二重鎖 DNA (RF III DNA) の調製

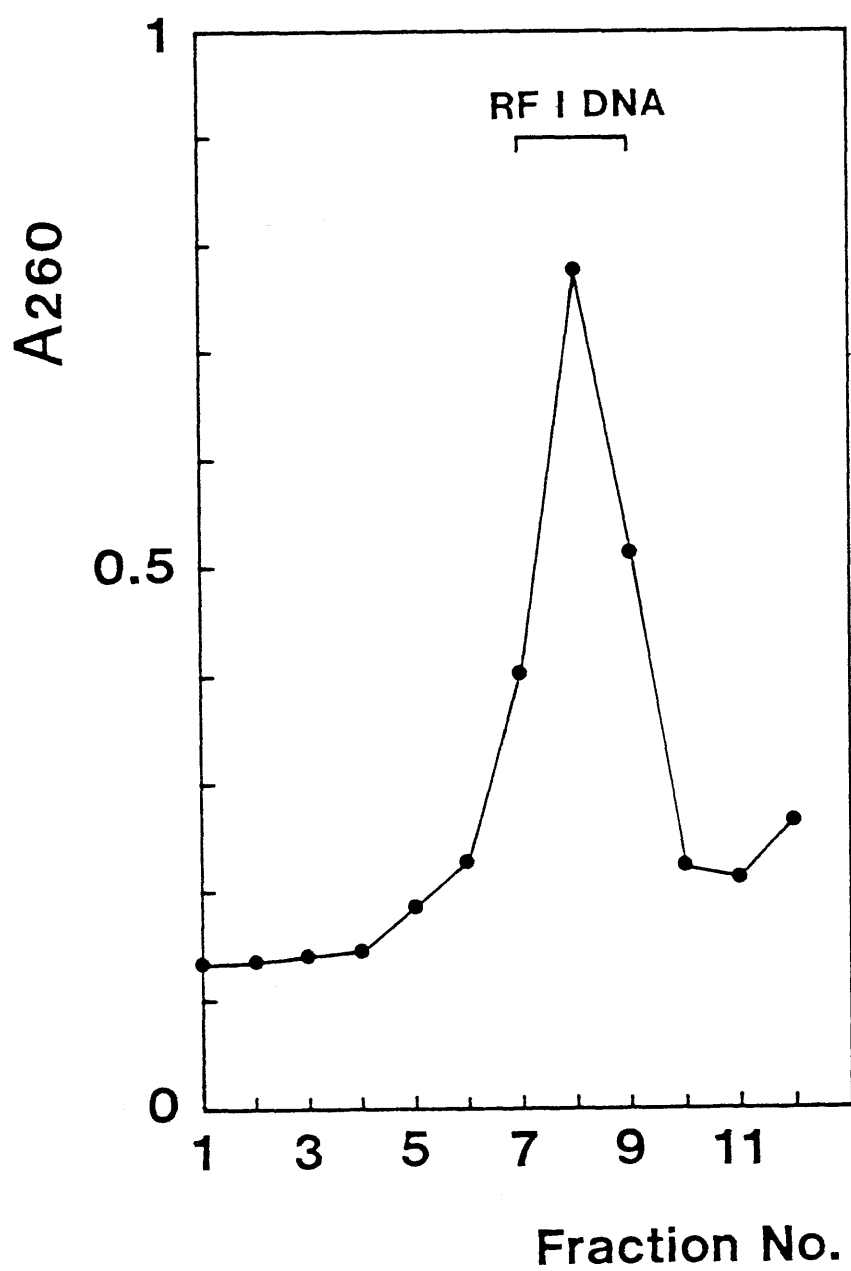


Fig. 4-1 Purification of RF I DNA from fd phage.

^3H - fd RFI DNA ($319\mu\text{M}$) を 10 mM Tris-Cl (pH 7.5)、 10 mM MgCl_2 、 1 mM DTT 存在下で制限酵素 HpaI で 8 時間処理して、Blunt end をもつ直鎖状二重鎖 DNA (RF III DNA) にした。フェノール処理を 2 回行い、水層を TE(0.1) 緩衝液に対して一晩透析した。得られた DNA 中に RFI DNA、および、RF II DNA が混在していることをアガロース電気泳動で確認した。

4. 電気泳動

DNA の電気泳動には 1% アガロースゲルを用いた。アガロース (type II) はシグマ・ケミカルより購入した。水平型サブマリン式電気泳動装置で TAE 緩衝液を泳動用緩衝液として用い、染色にはエチジウムブロマイドを $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ にするように加えた。30~60 分間染色した後、トランスイルミネーターを用いて UV 照射をすることにより DNA のバンドを観察した。

5. RecA 蛋白の DNA 依存性 ATPase 活性

(1) 反応停止液

3 mM ATP

3 mM ADP

3 mM AMP

25 mM EDTA (pH 9.0)

(2) 展開溶媒

0.5 M LiCl

1 M HCOOH

(3) ssDNA 依存 ATPase 活性

標準反応液組成 (20.5 μ l)

(最終濃度)

CTV 緩衝液

2.5 μ l

—

fd ssDNA 断片 (112 μ M)1.1 μ l6 μ MRecA (4.5 μ M)4.0 μ l0.9 μ MMgCl₂ (100 mM)1.2 μ l

6 mM

桂皮アルデヒド (10 mM)

6.0 μ l

3 mM

¹⁴C-ATP (13 mM)2.0 μ l

1.3 mM

TE(0.1) 緩衝液

残量

—

桂皮アルデヒドは TE(0.1) 緩衝液に、10 mM まで溶解した。RecA 蛋白を加えない対照の場合には RecA 緩衝液を 4 μ l 加えた。したがって、反応液中の緩衝液の成分は最終的に 30 mM Tris-Cl、0.1 mM EDTA、1 mM DTT である。氷上に置いた 96 穴のマイクロタイタープレートに上記成分を順次加えてよく混合させた後、37°C の温湯に移し 30 分間反応させた。直ちに氷水中に移して冷却し 12 μ l の停止液を加えて反応を止めた。各々の反応液を 10 μ l ずつポリエチレンイミン薄層カラムにスポットし、風乾させた後 LiCl/HCOOH 溶媒を用いて室温で約 30 分間展開させた。底の方から ATP、ADP、AMP の順に分離されるので、各々のスポットを紫外線照射によりその位置を確認しハサミで切り離した。各スポット中の ^{14}C 量を液体シンチレーションカウンタで測定した。ADP / (ATP + ADP + AMP) の割合を計算して ATPase 活性に対する桂皮アルデヒドの作用を調べた。

(4) RFI DNA 依存 ATPase 活性

標準反応液組成 (20.5 μ l)		(最終濃度)
CTV 緩衝液	2.5 μ l	—
fd RFI DNA (151 μ M)	2.7 μ l	20 μ M
RecA (5.1 μ M)	4.0 μ l	1 μ M
MgCl ₂ (20 mM)	1.0 μ l	1 mM
桂皮アルデヒド (10 mM)	6.0 μ l	3 mM
¹⁴ C-ATP (13 mM)	2.0 μ l	1.3 mM
TE(0.1) 緩衝液	残量	—

37°C で 30 分間反応させ、ssDNA 依存 ATPase の場合と同様の操作で測定した。

6. RecA 蛋白の D ループ形成反応

二重鎖 DNA とそれと相同性のある一本鎖 DNA とを RecA 蛋白存在下で反応させると、一本鎖 DNA とそれと相補性のある二重鎖 DNA の一方の鎖が水素結合によりヘテロ二重鎖を形成し、あまった鎖が追いつかれた結果 D ループ (Displacement loop) と呼ばれる構造をもつ

た DNA 複合体を形成する (図 4-2.)。D ループの形成の測定は、二重鎖 DNA はニトロセルロースのフィルター ($0.45 \mu\text{m}$) を通過してしまうが、D ループをもつ二重鎖 DNA はフィルターに全て捕足されてしまうという原理を利用した (Shibata et al., 1980)。

(1) 反応停止液

0.7 % sarkosyl

23 mM EDTA (pH 9.0)

(2) 標準反応液組成 ($20.5 \mu\text{l}$) (最終濃度)

CTV 緩衝液	$2.5 \mu\text{l}$	—
^3H -fd RFI DNA ($50 \mu\text{M}$)	$1.5 \mu\text{l}$	$3.7 \mu\text{M}$
fd ssDNA 断片 ($4.1 \mu\text{M}$)	$2.0 \mu\text{l}$	$0.4 \mu\text{M}$
RecA ($5.1 \mu\text{M}$)	$4.0 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{M}$
MgCl_2 (100 mM)	$2.4 \mu\text{l}$	12 mM
桂皮アルデヒド (10 mM)	$5.1 \mu\text{l}$	2.5 mM
ATP (26 mM)	$1.0 \mu\text{l}$	1.3 mM
TE (0.1) 緩衝液	残量	—

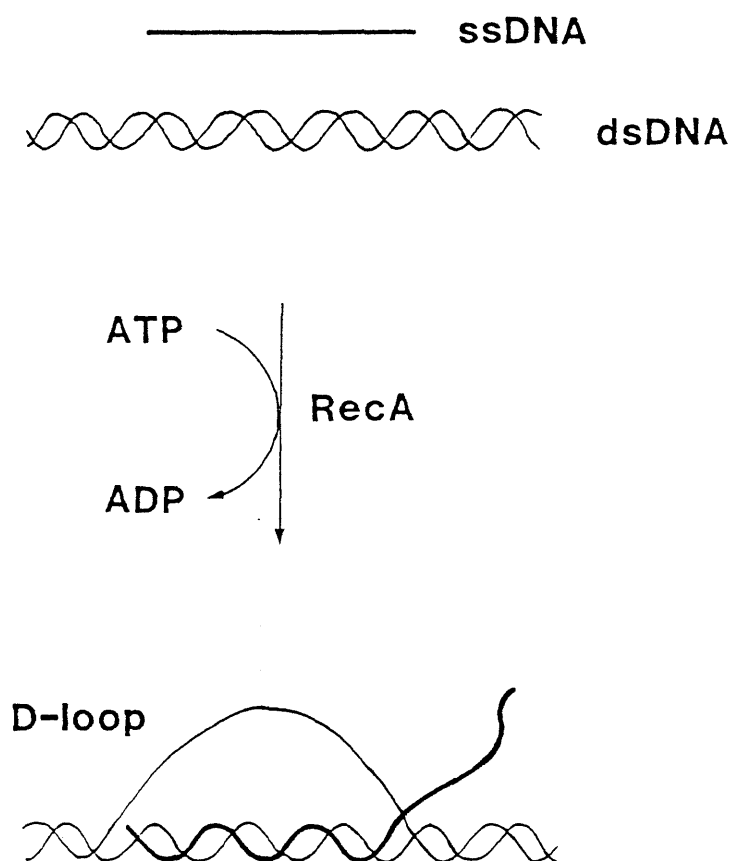


Fig. 4-2 Model for the formation of displacement loop (D-loop) by double-stranded DNA (dsDNA) and homologous single-stranded DNA (ssDNA).

(3) KCl を加えた反応系

標準反応液組成 (20.5 μ l)		(最終濃度)
CTV 緩衝液	2.5 μ l	—
^3H -fd RFI DNA (50 μ M)	1.5 μ l	3.7 μ M
fd ssDNA 断片 (4.1 μ M)	2.0 μ l	0.4 μ M
RecA (1.0 μ M)	4.0 μ l	0.2 μ M
MgCl ₂ (100 mM)	2.5 μ l	12 mM
KCl (200 mM)	2.5 μ l	24 mM
桂皮アルデヒド (10 mM)	3.5 μ l	1.7 mM
ATP (26 mM)	1.0 μ l	1.3 mM
TE (0.1) 緩衝液	残量	—

(4) DIL-70 の定量

氷水上で冷却したマイクロタイタープレートに各成分を加え、よく混合した後 37°C の温湯に移して反応を開始させた。種々の時間反応させた後 43 μ l の反応停止液を加えて混合し、すばやく別のマイクロタイタープレートに全量に移し氷水で冷却させた。15~60 分間 0°C に静置して RecA 蛋白に吸着した ^3H -RFI DNA を

解離させた。反応液 $60\mu\text{l}$ を冷却した $500\mu\text{l}$ の $25\text{ mM EDTA (pH 9.0)}$ 溶液に加えて希釈液を作り、その $50\mu\text{l}$ をニトロセルロースフィルターにしみ込ませ ^3H 量を測定して希釈液中の ^3H 総量を計算した。一方、希釈液 $200\mu\text{l}$ を冷却した 1 ml の $10\times\text{SSC}$ 溶液に加えて、 41°C で 4 分間加熱し非特異的に結合している RFIDNA と ssDNA とを解離させた。直ちに 7 ml の $10\times\text{SSC}$ 溶液を加えて冷却させ、ニトロセルロースフィルターを通して吸引し、 10 ml の $10\times\text{SSC}$ 溶液で洗って D ループをもつ二重鎖 DNA 以外の RFIDNA をフィルターから除いた。フィルターを乾燥させた後、 ^3H 量を測定して D ループ量を計算した。

7. RecA 蛋白のヘテロ二重鎖の伸長反応

(1) 反応停止液

0.7% sarkosyl

$23\text{ mM EDTA (pH 9.0)}$

(2) 標準反応液組成 (20.5 μ l)		(最終濃度)
CTV 緩衝液	2.5 μ l	—
^3H -fd RF III DNA (17.6 μM)	2.3 μ l	2 μM
fd-ssDNA (82 μM)	2.0 μ l	8 μM
RecA (15.4 μM)	4.0 μ l	3 μM
MgCl ₂ (100 mM)	2.7 μ l	13 mM
桂皮アルデヒド (10 mM)	4.0 μ l	2 mM
ATP (26 mM)	1.0 μ l	1.3 mM
クレアチンリン酸 (31 mM)	1.0 μ l	1.5 mM
CKase (100 μ /ml)	1.0 μ l	5 μ /ml
TE (0.1) 緩衝液	残量	—

(3) Λ テロ二重鎖 DNA の定量

Λ テロ二重鎖の伸長反応は ATP の連続的加水分解を必要とし ADP により阻害される (Cox & Lehman, 1981)。そこでクレアチンリン酸と ADP に CKase を作用させて ATP を再生させる系を取り入れた。 Λ テロ二重鎖を形成した DNA (Joint molecule) は D ループの場合と同様の操作で測定した。

第 3 節 結果

1. ATPase 活性

RecA 蛋白質は一本鎖 DNA を補助因子として ATP を ADP と無機リン酸に分解する活性をもつ。この ATPase 活性は Mg^{2+} を必要とする反応である。そこで、fd ssDNA 断片を補助因子とした時の RecA 蛋白質の ATPase 活性に対する桂皮アルデヒドの効果を調べた。図 4-3. に通常の $MgCl_2$ 濃度 (6mM) での活性を、また図 4-4. には低濃度の $MgCl_2$ (1mM) 存在下での ATPase 活性を示した。いずれの反応条件下においても 2~3 mM の桂皮アルデヒドの添加により、ssDNA 依存 ATPase 活性の弱い阻害が認められた。

一方、超ラセンをもつ閉環状二重鎖 DNA も低い Mg^{2+} 濃度下では一本鎖 DNA と同様に RecA 蛋白質の ATPase 活性の補助因子になり得る。そこで、fd ファージの RFIDNA を補助因子として 1mM $MgCl_2$ 存在下で ATPase 活性を測定し、桂皮アルデヒドの効果を調べた。図 4-5. に示

した様に、RFI DNA 依存 ATPase 活性は桂皮アルデヒドを加えることにより著しく阻害され、約 3 mM の桂皮アルデヒド添加により ATPase 活性はほとんど認められなくなった。

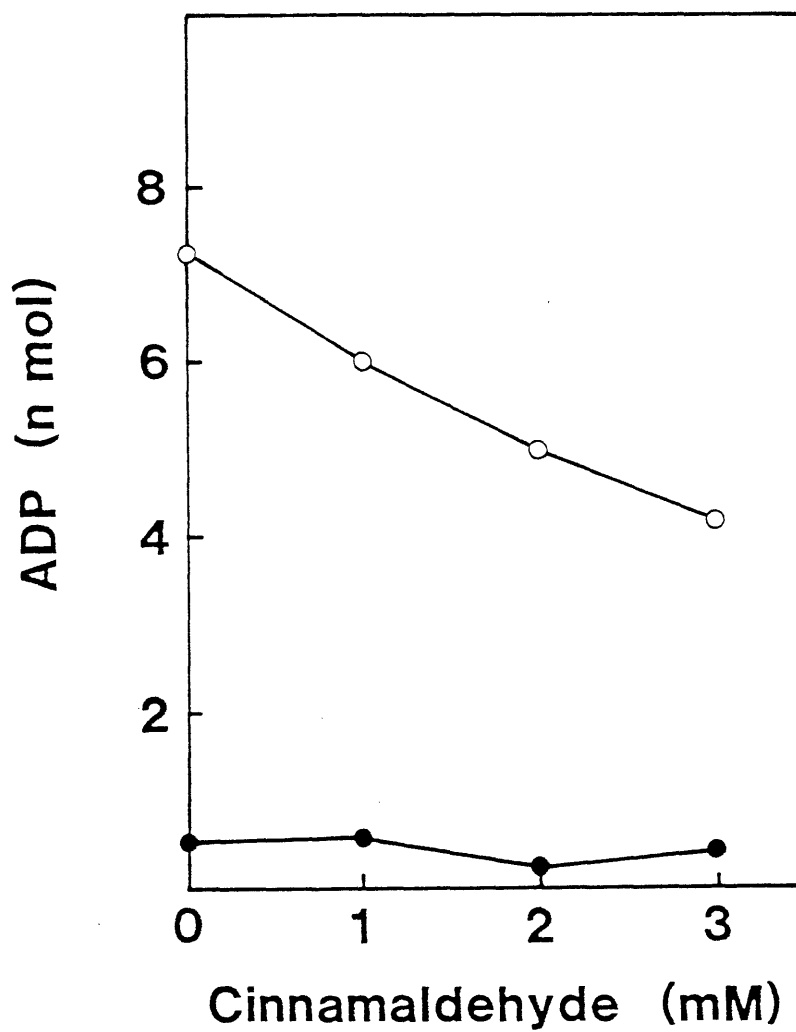


Fig. 4-3 Effect of cinnamaldehyde on ssDNA-dependent ATPase activity. Reaction mixture contained 0.9 μM RecA, 6 mM MgCl_2 and 1.3 mM ^{14}C -ATP. ATPase activity was assayed after 30 min incubation at 37°C in the presence of 6 μM fd ssDNA fragments (○) and the absence of ssDNA (●).

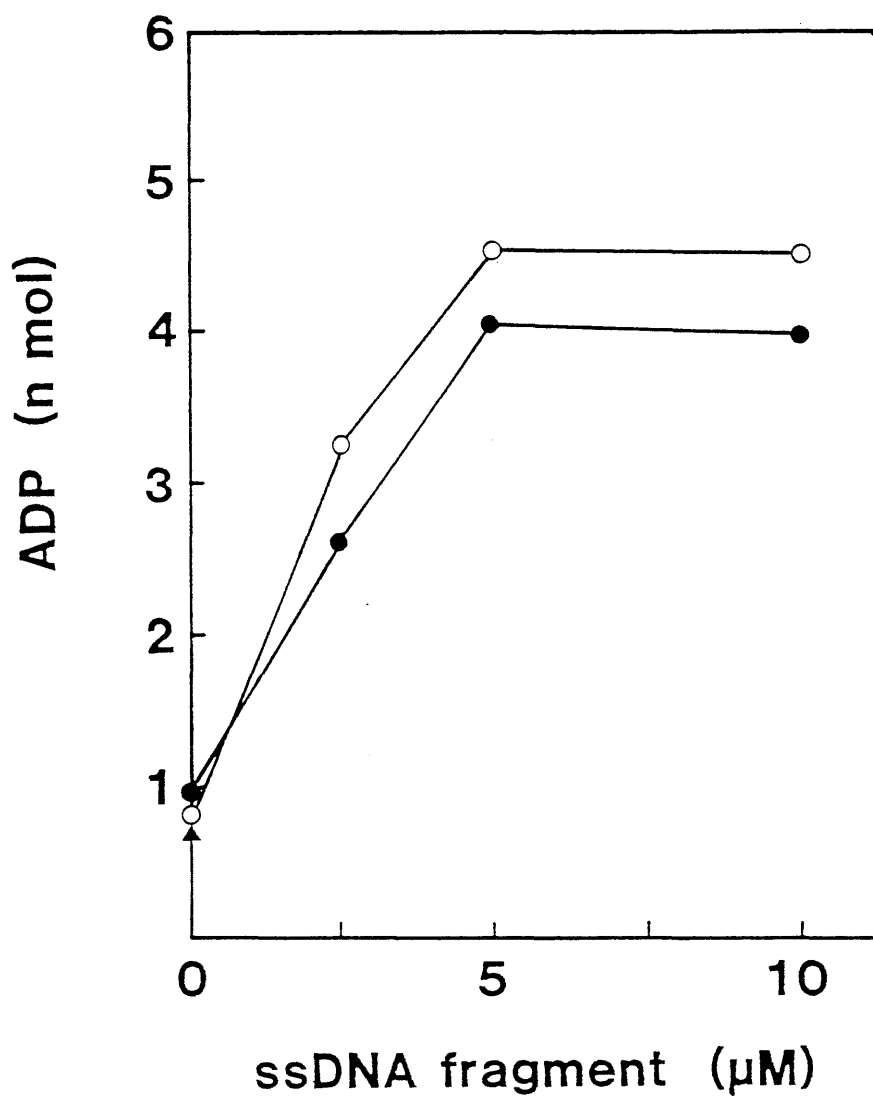


Fig. 4-4 Effect of cinnamaldehyde on ssDNA-dependent ATPase activity at low MgCl_2 concentration. Reaction mixture contained $0.5 \mu\text{M}$ RecA, 1 mM MgCl_2 , 1.3 mM ^{14}C -ATP and fd ssDNA fragments. \circ , without cinnamaldehyde; \bullet , 2.5 mM cinnamaldehyde; \blacktriangle , without RecA.

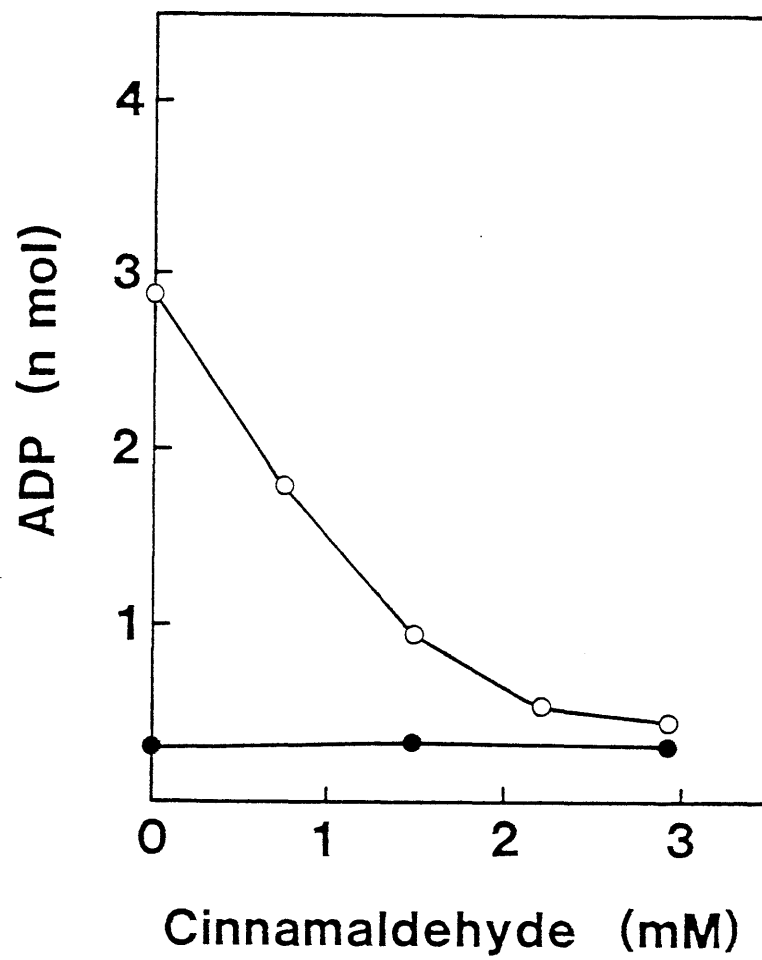


Fig. 4-5 Effect of cinnamaldehyde on RF I DNA-dependent ATPase activity.

Reaction mixture contained 1 μ M RecA, 1 mM MgCl_2 and 1.3 mM ^{14}C -ATP.

○, 20 μ M fd RF I DNA; ●, without RF I DNA.

2. Dループ形成反応

閉環状二重鎖DNAとそれと相同性のある一本鎖DNAとを基質として RecA 蛋白質で反応させると二重ラセンの巻きもどしが起こり、一本鎖DNAがそれと相補的の二重鎖DNAの一方の鎖とで二重鎖を形成し、あまった他方の鎖が追いついてDループと呼ばれるヘテロ二重鎖DNA複合体を形成する。反応にはATPと Mg^{2+} が補助因子として必要である。このヘテロ二重鎖形成は遺伝的組換え反応の初期段階と考えられている。ここでは fd RFI DNA および fd ssDNA 断片を基質として用いDループ形成反応に対する桂皮アルデヒドの効果を調べた。12 mM $MgCl_2$ 濃度下で 0.8 μ M の RecA 蛋白質で反応させた場合、Dループ量は約4分間の反応時間で最大に達し、さらに反応を続けるとDループの解離反応が進み30分でDループのほとんどが解離した(図4-6.)。一方、ssDNA断片として相同性のよい ϕ X174 ファージ由来のssDNAを用いた場合にはDループの形成は認

められなかった。この反応系に 2.5 mM の桂皮アルデヒドを添加したが、Dル-7°の形成および解離パターンに顕著な変化は認められなかった (図4-6.)。そこで次に $MgCl_2$ 濃度を 3 ~ 13 mM に変化させ、4 分間の反応による Dル-7°形成量を調べた。4 mM 以下の $MgCl_2$ 濃度では Dル-7°の形成がほとんど認められず、8 mM 以上の $MgCl_2$ 濃度で最大量の Dル-7°形成が認められた。2.5 mM の桂皮アルデヒドの添加はこの Dル-7°形成量のパターンに多少の変化を与えた (図4-7.)。そこで 8 mM $MgCl_2$ および 6 mM $MgCl_2$ 濃度下での Dル-7°形成反応に対する桂皮アルデヒドの効果をさらに詳しく調べた。図4-8. に結果を示したが、 $MgCl_2$ 濃度が 6 mM の場合は桂皮アルデヒドを添加してもほとんど差は認められなかったが、8 mM の場合には桂皮アルデヒドによるわずかな阻害作用が観察された。ところで、Dル-7°の形成反応は反応液中に 25 mM 程度の KCl が存在することにより阻害される (柴田, 私信)。

この KCl の D ループ形成反応阻害作用に対し
て桂皮アルデヒドが阻害作用を弱める効果がある
か否かについても検討した。12 mM $MgCl_2$
濃度下での 0.2 μM RecA 蛋白質による D ループ
形成は 24 mM の KCl の添加により阻害された。
この反応系にさらに 1.7 mM の桂皮アルデヒド
を加えたが D ループの形成は認められなかった
(図 4-9.)。

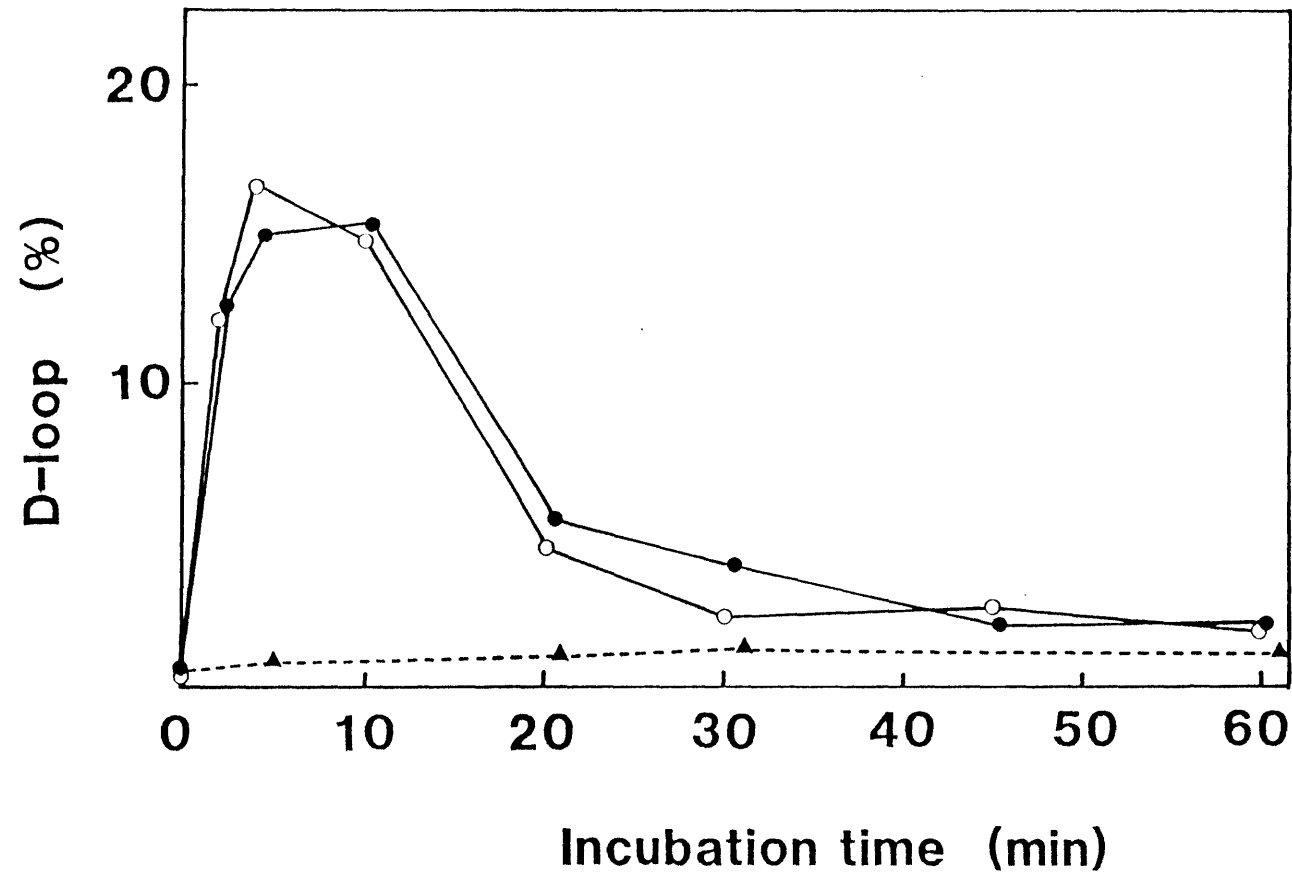


Fig. 4-6 Effect of cinnamaldehyde on D-loop formation. Reaction mixture contained 0.8 μM RecA, 0.05 μM fd ssDNA fragments, 3.7 μM ^3H -fd RF.I DNA, 12 mM MgCl_2 and 1.3 mM ATP. O, without cinnamaldehyde; ●, 2.5 mM cinnamaldehyde; ▲, ϕX174 ssDNA fragments instead of fd ssDNA fragments.

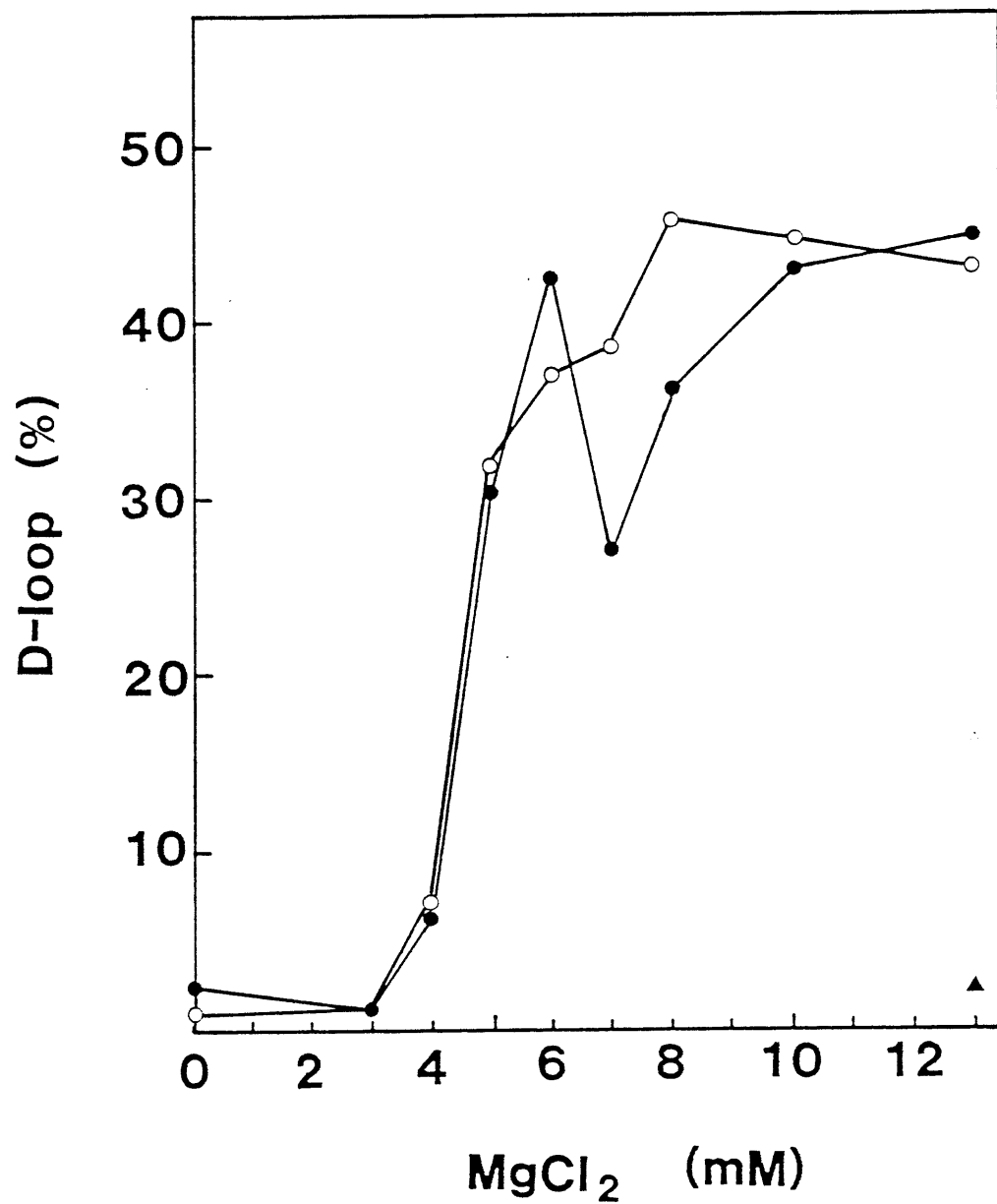


Fig. 4-7 Effect of cinnamaldehyde on Mg^{2+} -optimum in D-loop formation. Reaction mixture contained 1 μM RecA, 0.4 μM fd ssDNA fragments, 3.7 μM ^3H -fd RF I DNA and 1.3 mM ATP. \circ , without cinnamaldehyde; \bullet , 2.5 mM cinnamaldehyde; \blacktriangle , ϕX174 ssDNA fragments instead of fd ssDNA fragments.

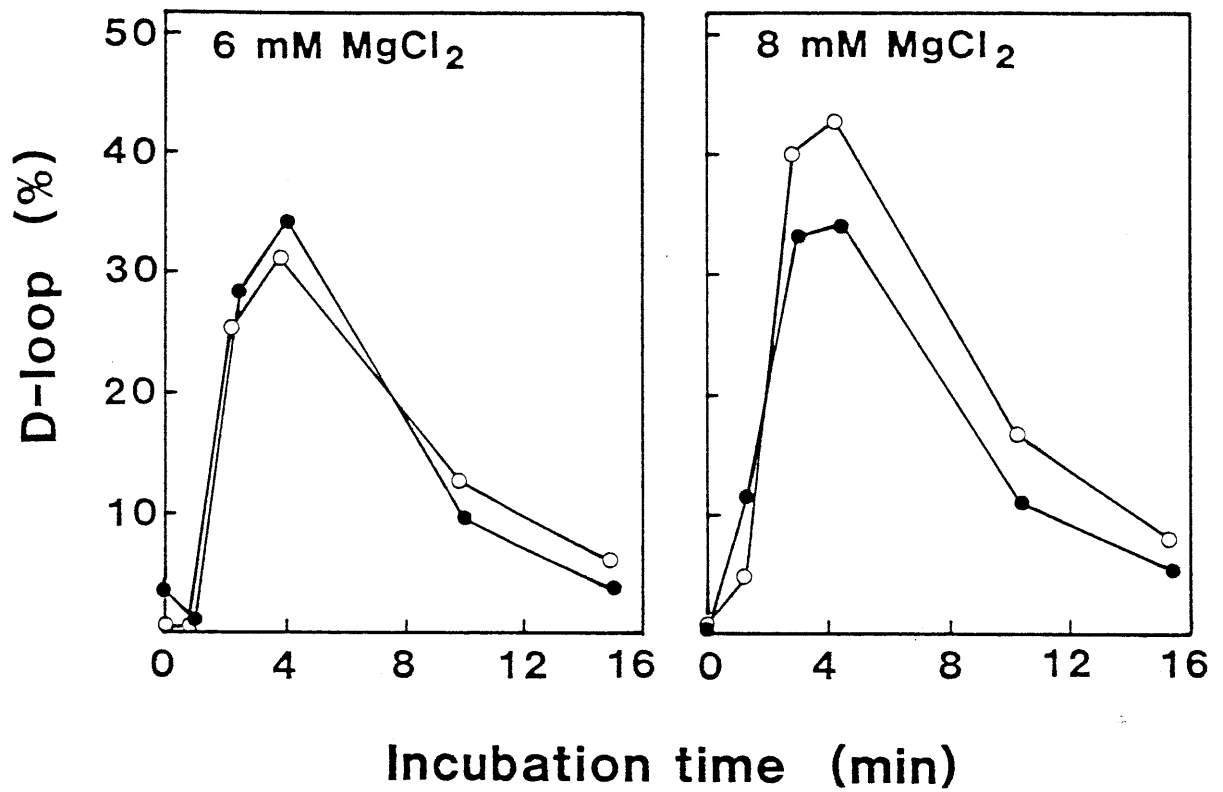


Fig. 4-8 Effect of cinnamaldehyde on D-loop formation at different MgCl₂ concentrations. Reaction mixture contained 1 μ M RecA, 0.4 μ M fd ssDNA fragments, 3.7 μ M ³H-fd RF I DNA, 6 or 8 mM MgCl₂ and 1.3 mM ATP. ○, without cinnamaldehyde; ●, 2.5 mM cinnamaldehyde.

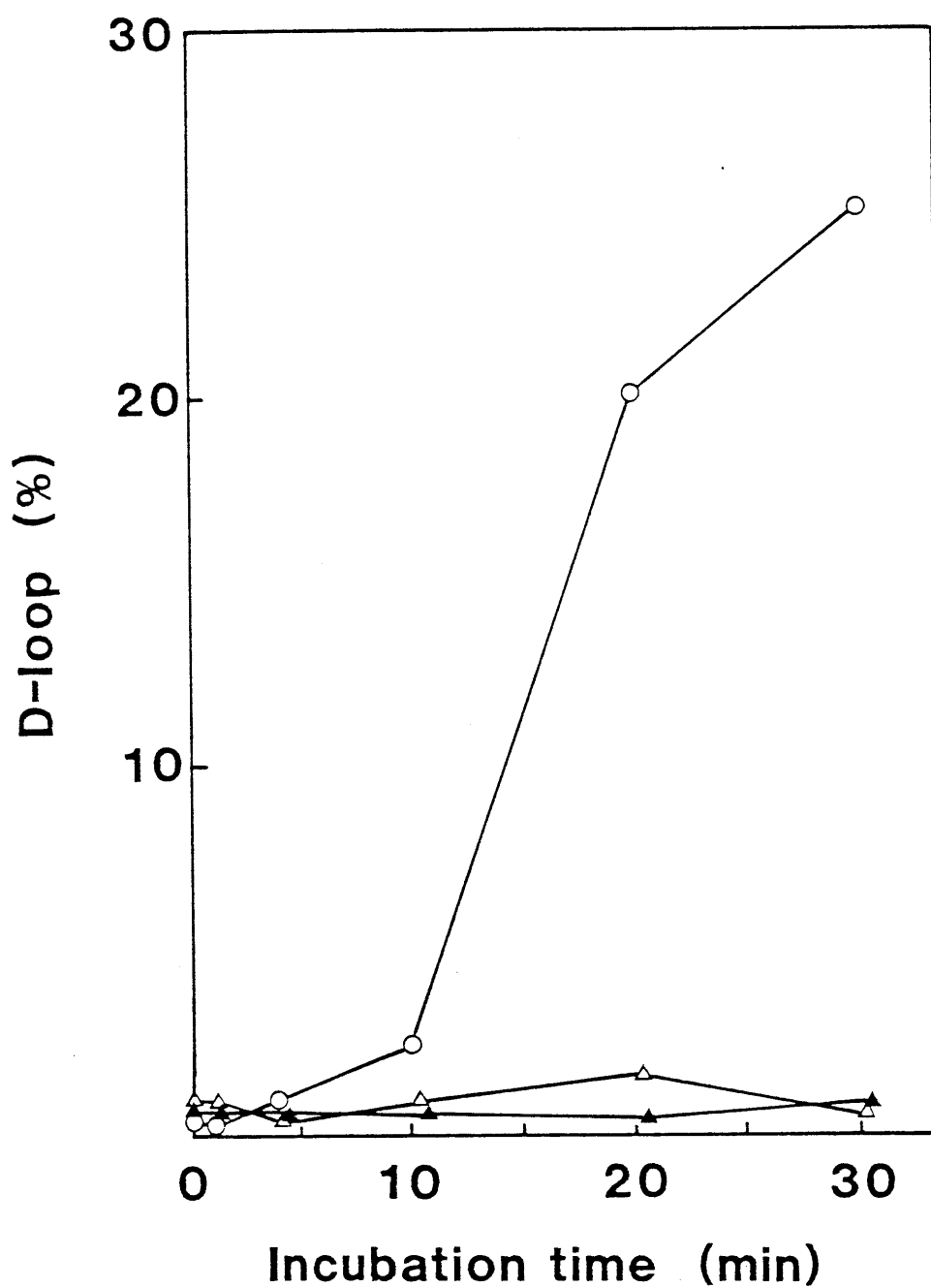


Fig. 4-9 Effect of cinnamaldehyde on D-loop formation in the presence of KCl. Reaction mixture contained 0.2 μM RecA, 0.4 μM fd ssDNA fragments, 3.7 μM ^3H -fd RF I DNA, 12 mM MgCl_2 and 1.3 mM ATP. \circ , without KCl; \triangle , 24 mM KCl; \blacktriangle , 24 mM KCl and 1.7 mM cinnamaldehyde.

3. ヘテロ二重鎖の伸長反応

図4-6. に示した条件下でDループ形成反応を続けると、初期に形成されたDループはその後解離してゆく。これはDループ形成反応の際に生じるATPの分解産物であるADPが反応を阻害するためである(柴田、私信)。この際にADPを反応系から除きATPを充分に供給させると、初期に形成されたヘテロ二重鎖領域は単一方向に伸長してゆく(Strand transfer)。ここではfdファージのBlunt endをもつ直鎖状二重鎖DNA(RFⅢ DNA)と環状一本鎖DNA(ssDNA)とを基質として用い、ヘテロ二重鎖DNA(Joint molecule)の伸長反応を調べた。

RecA蛋白質のATPase活性により生じたADPはクレアチンリン酸存在下でクレアチンキナーゼを作用させることにより再びATPにもどしてATPを循環させた。13mM $MgCl_2$ 存在下で高濃度のRecA蛋白質(3 μ M)で反応させヘテロ二重鎖の量を測定した場合、5分間の反応でヘテロ二重鎖の量は増加し続けた。この反応系

に 2mM の桂皮アルデヒドを加えることにより
弱い阻害効果が観察された (図4-10.)。

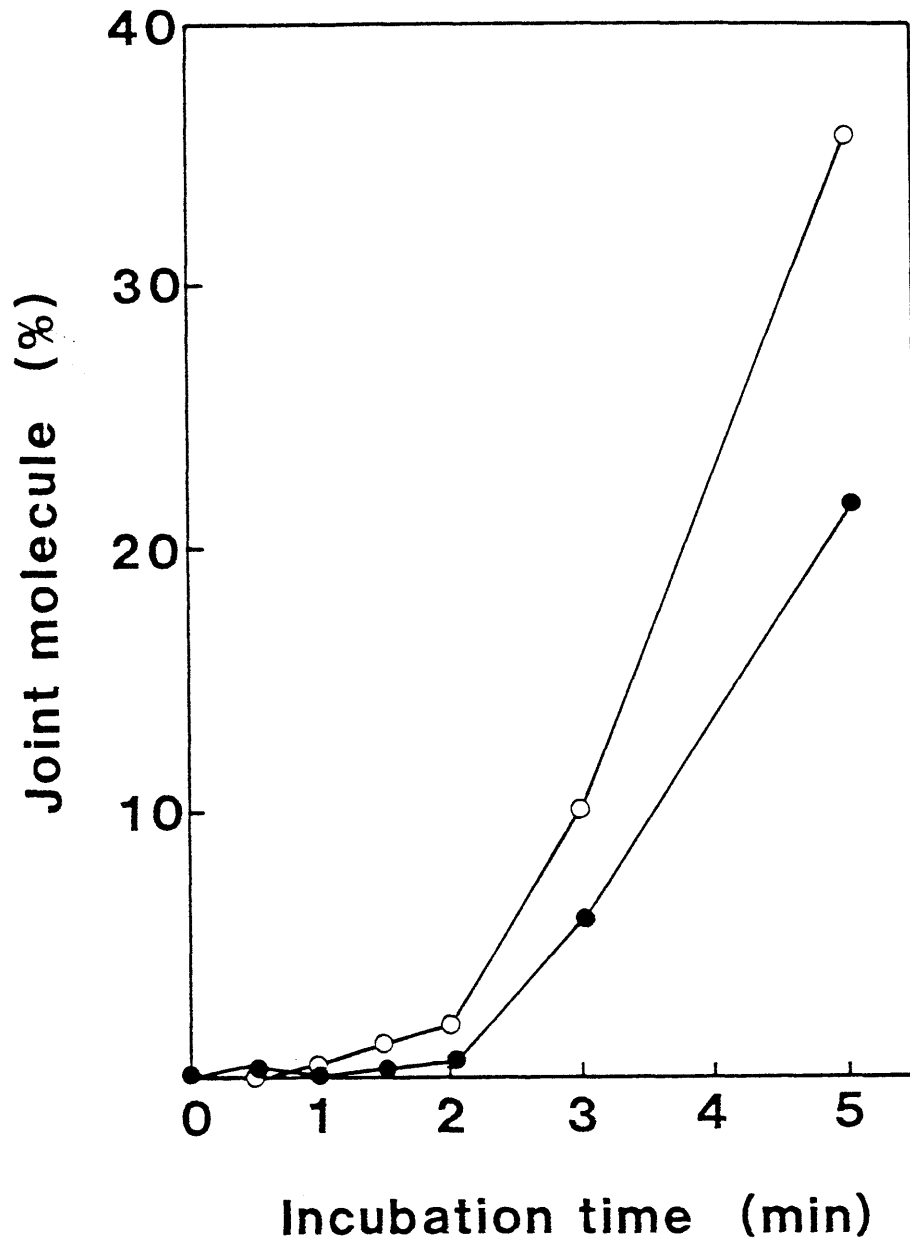


Fig. 4-10 Effect of cinnamaldehyde on the formation of joint molecule. Reaction mixture contained 3 μM RecA, 8 μM fd ssDNA, 2 μM ^3H -fd RF III DNA, 13 mM MgCl_2 , 1.3 mM ATP, 1.5 mM creatine phosphate and 100 u/ml creatine kinase. \circ , without cinnamaldehyde; \bullet , 2 mM cinnamaldehyde.

第4節 考察

DNAの遺伝的組換え反応および組換え修復反応において中心的な機能をもつと考えられている RecA 蛋白質は2種類の DNA 間の相同性 (Homology) を見いだして、二重鎖 DNA の巻きもどしとヘテロ二重鎖形成を行い、また、その過程で ATP の水解が伴う。 *recA* 遺伝子産物である分子量約 40,000 の RecA 蛋白質は対数増殖期にある大腸菌では1個の細胞内に 800~1,200 分子の RecA 蛋白質が存在し、 SOS 機能誘発時にはこれが 20~50 倍に増加する (Salles & Paoletti, 1983)。 RecA 蛋白質によるヘテロ二重鎖形成反応は次のように進むと考えられている。まず、一本鎖 DNA と RecA 蛋白質とが複合体を形成する。この際、一本鎖 DNA 結合蛋白質 (SSB) が存在すると RecA・一本鎖 DNA 複合体が安定化される (Cox & Lehman, 1982)。通常の濃度の Mg^{2+} (10 mM) 存在下では RecA 蛋白質と一本鎖 DNA との結合は pH 6~8 の領域で一定の結合能を示すのに対して、二重鎖 DNA との結合

は至適 pH が 6.2 であり pH7 以上ではほとんど結合が起こらない (McEntee et al., 1979)。しかし、低濃度 (1mM) の Mg^{2+} 条件下では pH7.5 でも ATP に依存した二重鎖 DNA との結合が起こる (Shibata et al., 1979)。RecA・一本鎖 DNA 複合体が形成されると、続いて相同な二重鎖 DNA が巻きもとされてヘテロ二重鎖 (D ループ) 形成が起こる。反応は通常の Mg^{2+} 濃度、pH7.5 の条件下で起き、RecA・一本鎖 DNA・二重鎖 DNA 複合体が形成される。この際に、一本鎖 DNA と二重鎖 DNA との間に相同性があるとしても複合体は形成されるが、もし相同性があれば二重鎖 DNA の巻きもとが起こり、次いでヘテロ二重鎖が形成される。形成されたヘテロ二重鎖領域はさらに ATP の連続的な水解を伴いながら一方に伸長してゆく (Strand transfer)。

本章においてはこの RecA 蛋白の司る反応に対する桂皮アルデヒドの効果を種々の測定法で調べた。その結果、いくつかの条件下にお

いて桂皮アルデヒドによる弱い阻害作用は認められたが、少なくともDループの形成あるいはATPase活性を促進するような効果を見出すことはできなかった。しかし、このことは第3章において推論した桂皮アルデヒドの組換修復機構の促進作用の可能性を全く否定するものではない。なぜならば、ここに示したDループ形成反応は組換反応の初期段階であり、遺伝的組換反応や組換修復反応はさらに多くの反応ステップから成り立っている現象である。in vitroにおけるヘテロ二重鎖形成反応は本章に示したようにRecA蛋白のみでも起こるが、生体内では一本鎖DNA結合蛋白や種々のDNA巻きもどし蛋白、例えば、 ω 蛋白（トポイソメラーゼI）、RecB,C蛋白（エキソヌクレアーゼV）、UvrD蛋白（ヘリカーゼII）などが重要な役割をもっており関与していると考えられる。また、遺伝的組換反応と組換修復反応の最大の相違は基質となるDNAに損傷があるか否かということである。組換修復

反応においては DNA 上にチミン二量体やアルキル化された塩基などが存在するため、局所的に非相同な DNA 間でのヘテロ二重鎖形成になる。本章では塩基配列が全く均一な DNA 分子間でのヘテロ二重鎖形成を調べた訳であるが、この点も生体内で実際に起きている組換え修復反応と多少異なるところである。今後、組換え修復反応の分子学的な詳細が明らかになれば桂皮アルデヒドの作用も解明できるものと思われる。

第5節 要約

抗突然変異因子、桂皮アルデヒドの作用点として RecA 蛋白質の関与する組換え修復反応が考えられたため、RecA 蛋白質の司る種々の酵素反応に対する桂皮アルデヒドの効果を in vitro の反応系で調べた。大腸菌より精製された RecA 蛋白質と一本鎖 DNA ファージである fd ファージの一本鎖 DNA および複製型二重鎖 DNA (RFI DNA) を用いて、一本鎖 DNA 依存性 ATP 加水分解 (ATPase) 活性、RFI DNA 依存性 ATPase 活性、相同性のある2種の DNA (一本鎖 DNA 断片と RFI DNA) の対合によるヘテロ二重鎖 (Dループ) 形成反応、および、ヘテロ二重鎖の伸長反応を様々な条件下で検討した。ATPase 活性はいずれも桂皮アルデヒドの添加により阻害された。Dループ形成反応は 8 mM の濃度の $MgCl_2$ 存在下においてわずかに阻害が認められた以外は桂皮アルデヒド添加による変化は観察されなかった。また、ヘテロ二重鎖の伸長反応も桂皮アルデヒド存在下

ではわすかに抑制された。したがって、本試験条件下では桂皮アルデヒドによるヘテロ二重鎖形成反応、あるいは ATPase 活性の促進効果を見いだすことはできなかった。しかし、ここで調べた in vitro の系は当然のことながら in vivo における組換反応の全てを再現しているものではない。例えば、生体内における DNA 組換反応には RecA 蛋白質以外にも一本鎖 DNA 結合蛋白質や種々の DNA 巻きもどし蛋白質などの諸因子が関与していると考えられている。また、組換修復反応の場合は塩基に種々の損傷をもった DNA が対象になっていることなどである。現段階では in vitro において桂皮アルデヒドが DNA 組換反応を促進する効果を検出することができなかったが、本論文で述べてきたように桂皮アルデヒドが in vivo において recA 遺伝子機能に依存した DNA 修復系を促進する作用は非常にはっきりした実験事実であるため、RecA 蛋白質の in vitro での反応系の諸条件をさらに改良することにより桂皮ア

ルデヒドの組換修復促進作用を検出できる可能性があると考えられた。

ATP : adenosine 5'-triphosphate

第 6 節 参考文献

- Cox, M. M., and I. R. Lehman (1981) RecA protein of Escherichia coli promotes branch migration, a kinetically distinct phase of DNA strand exchange, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 78, 3433-3437.
- Cox, M. M., and I. R. Lehman (1982) RecA protein-promoted DNA strand exchange, J. Biol. Chem., 257, 8523-8532.
- Cunningham, R. P., T. Shibata, C. DasGupta and C. M. Radding (1979) Single strands induce recA protein to unwind duplex DNA for homologous pairing, Nature, 281, 191-195.
- DasGupta, C., A. M. Wu, R. Kahn, R. P. Cunningham and C. M. Radding (1981) Concerted strand exchange and formation of Holliday structures by E. coli RecA protein, Cell, 25, 507-516.
- McEntee, K., G. M. Weinstock and I. R. Lehman (1979) Initiation of general recombination catalyzed in vitro by the recA protein of E. coli, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 76, 2615-2619.
- Ogawa, T., H. Wabiko, T. Tsurimoto, T. Horii, H. Masukata and H. Ogawa (1978) Characteristics of purified recA protein and the regulation of its synthesis in vivo, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 43, 909-915.
- Ohtani, T., T. Shibata, M. Iwabuchi, K. Nakagawa and T. Ando (1982) Hydrolysis of ATP dependent on homologous double-stranded DNA and single-stranded fragments promoted by recA protein of Escherichia coli, J. Biochem., 91, 1767-1775.
- Roberts, J. W., C. W. Roberts, N. L. Craig and E. M. Phizicky (1978) Activity of the Escherichia coli recA-gene product, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 43, 917-920.

- Salles, B., and C. Paoletti (1983) Control of UV induction of recA protein, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 80, 65-69.
- Shibata, T., C. DasGupta, R. P. Cunningham and C. M. Radding (1979) Purified Escherichia coli recA protein catalyzes homologous pairing of superhelical DNA and single-stranded fragments, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 76, 1638-1642.
- Shibata, T., C. DasGupta, R. P. Cunningham and C. M. Radding (1980) Homologous pairing in genetic recombination: Formation of D loops by combined action of recA protein and a helix-destabilizing protein, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 77, 2606-2610.
- Shibata, T., T. Ohtani, P. K. Chang and T. Ando (1982) Role of super-helicity in homologous pairing of DNA molecules promoted by Escherichia coli recA protein, J. Biol. Chem., 257, 370-376.

第5章 総合考察

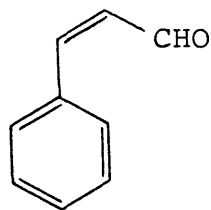
本論文においては、大腸菌での誘発突然変異に対する抗突然変異因子 (Bio-antimutagen) の検索と、新たに見い出された抗突然変異因子の作用機構の解明を目的として研究を行った。

本研究を開始した時点において、変異原物質による誘発突然変異に対しその突然変異生成過程で働いて抑制作用を示すと考えられる物質としては、塩化コバルト、カフェイン、アンチパインが知られていたが、抗突然変異因子の系統だったスクリーニングはまだ行われていなかった。また、抗突然変異因子の作用機構にいたっては、その解析手法が確立されていなかったために抗突然変異因子の研究は現象論にとどまっていた。

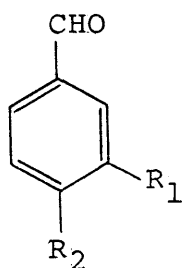
本研究では、まず、43種類の香料成分を試料として抗突然変異因子のスクリーニングを行った。その結果、桂皮アルデヒド、クマリン、ウンベリフェロン、アニスアルデヒド、エチルバニリン、および、バニリンの6種類

の新たな抗突然変異因子を見い出した。また、これらの化合物には共通した α, β -不飽和カルボニル構造が存在することを明らかにした(図5-1.)。その後、植物成分のスクリーニングから検出された抗突然変異因子のプロトアネモニン(Minakata et al., 1983)も同様の構造をもつ化合物であることがわかった。最近、黒田らはクマリン、ウンベリフェロン、およびプロトアネモニンがラクトン環構造をもつことに注目し、23種のラクトン化合物について抗突然変異活性を調べている。その結果、 α -メチレンブチルラクトン、5,6-ジヒドロ-2H-ピラン-2-オン、エスクレチン、4-メチルエスクレチンの4化合物に活性があることを報告しているが(Kuroda et al., 1986)、いずれも α, β -不飽和カルボニル構造をもつラクトン化合物であった。さらに、柿沼らは α, β -不飽和カルボニル構造をもつフラノン系化合物の誘導体を数多く合成して抗突然変異活性の増強効果を調べ、最終的に、5-ビニ

[$-\text{CH}=\text{CH}-\overset{\textstyle |}{\text{C}}=\text{O}$] : α,β -unsaturated carbonyl functionality



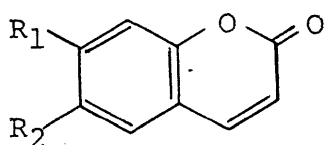
: *trans*-cinnamaldehyde



$\text{R}_1 = \text{OCH}_3$ $\text{R}_2 = \text{OH}$: vanillin

$\text{R}_1 = \text{OC}_2\text{H}_5$ $\text{R}_2 = \text{OH}$: ethyl vanillin

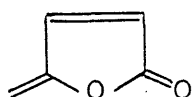
$\text{R}_1 = \text{H}$ $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$: *p*-anisaldehyde



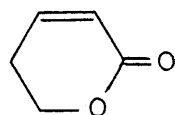
$\text{R}_1 = \text{H}$ $\text{R}_2 = \text{H}$: coumarin

$\text{R}_1 = \text{OH}$ $\text{R}_2 = \text{H}$: umbelliferone

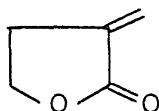
$\text{R}_1 = \text{OH}$ $\text{R}_2 = \text{OH}$: esculetin



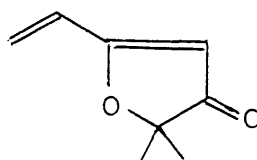
: protoanemonin



: 5,6-dihydro-2H-pyran-2-one



: α -methylene butyrolactone



: 5-vinyl-3(2H)furanone

Fig. 5-1 Structure of bio-antimutagens.

ル - 3(2H) フラノンという活性の強い合成抗突然変異物質を得ることに成功している (Kakinuma et al., 1986)。そして、この化合物は強力な Michael 反応の受容体 ($RCH=CHX$, X は強い陰性の原子団) であることから、DNA 修復系の蛋白質の SH 基の修飾に関与していると推定している。

ところで、これらの抗突然変異因子の検索手段としては、調べようとする物質を含んだ寒天プレートに変異原物質で処理した菌をまいて突然変異コロニー数を測定する方法をとっている。抗突然変異因子の検索法としてはこれが唯一の手法であった。そこで本研究においては第2章で論述した様に新たな抗突然変異因子の検索法を考案した。突然変異の大部分は SOS 反応誘発によって誘導される SOS 修復系が働く際に生じることが知られているので、この SOS 反応の誘発に対する阻害作用を指標にすることによって抗突然変異因子の検出が可能であると考えた。SOS 遺伝子の発

現量は $sulA::lacZ$ 融合遺伝子をもつ菌株を用いることにより簡単に定量することができた。この方法により、5-FU と FUDR の新たな抗突然変異活性をもつ物質が見い出された。これらの物質は桂皮アルデヒドやバニリンとは異った作用機構をもつ抗突然変異因子であることも明らかにした。SOS 反応の誘発を阻害することにより抗突然変異活性を示す物質は、第2章で述べた新たな検索法を用いることにより、短時間で簡便に検索ができるようになった誤である。

抗突然変異因子の作用機構に関しては第3章で明らかにした様に、正確な DNA 修復系の活性化・促進作用による突然変異の抑制というこれまでになかった新しい概念を導き出した。桂皮アルデヒドは DNA 修復の活性化因子として報告された最初の例である。また、この作用機構は、変異原物質処理によって DNA に損傷を受けた細胞の生存率に対する抗突然変異因子の効果を、種々の DNA 修復変異株に

ついて比較することによって判明したものである。この解析法が発端になり、それまで作用機構が不明であった塩化コバルトにもDNA修復活性化作用があることが判明してきた。また最近では、タンニン酸の抗突然変異作用も除去修復機能の活性化によって説明されるようになった (Shimoi et al., 1985)。このように本研究によって抗突然変異因子の作用機構の解析法の1つが確立され、さらにDNA修復の促進作用をもつ抗突然変異因子が環境中に存在することが判明した。

ところで、以上述べてきた抗突然変異因子の作用はいずれも大腸菌あるいはサルモネラ菌の細菌細胞レベルで観察された現象である。哺乳動物を含む高等生物細胞でこれらの因子がどのような効果を示すかは興味深い問題である。クマリンに関しては、マウスにおいてベンツピレン投与により誘発される染色体異常を抑制するとの最近の報告があり (Morris et al., 1985)、また、抗ガン作用も報告されてい

る (Wattenberg et al., 1979)。一方、バニリンについても、チャニーズ・ハムスターの培養細胞に対し、マイトマイシンCによる染色体異常の誘発頻度を低下させること、しかも、組換現象の一種である姉妹染色分体交換の誘発頻度は上昇させる作用をもつことがわかってきた (佐々木、私信)。微生物において認められた現象が哺乳動物細胞でも観察された意義は大きく、今後の研究が大いに期待されるところである。

以上、本論文では大腸菌における抗突然変異因子の検索法と作用形式について論じたが、抗突然変異因子の研究は抗がん剤としての応用面だけでなく、生物におけるDNA修復機構や突然変異生成の機構の解明にも役立つものと考えられる。

参考文献

- Kakinuma, K., J. Koike, K. Ishibashi, W. Takahashi and H. Takei (1986) Structure-activity relationship and design of an antimutagen against the UV-induced mutation of Escherichia coli, Agric. Biol. Chem., 50, 625-631.
- Kuroda, M., D. Yoshida and S. Mizusaki (1986) Bio-antimutagenic effect of lactones on chemical mutagenesis in Escherichia coli, Agric. Biol. Chem., 50, 243-245.
- Minakata, H., H. Komura, K. Nakanishi and T. Kada (1983) Protoanemonin, an antimutagen isolated from plants, Mutation Res., 116, 317-322.
- Morris, D. L., V. M. S. Ramanujam and M. S. Legator (1985) Coumarin inhibits micronuclei formation in male ICR mice by benzo(a)pyrene and alters the pattern of urinary metabolites, International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (Kansas), Abstract, p.104.
- Shimoi, K., Y. Nakamura, I. Tomita and T. Kada (1985) Bio-antimutagenic effects of tannic acid on UV and chemically induced mutagenesis in Escherichia coli B/r, Mutation Res., 149, 17-23.
- Wattenberg, L. W., L. K. T. Lam and A. V. Fladmoe (1979) Inhibition of chemical carcinogen-induced neoplasia by coumarins and α -angelicalactone, Cancer Res., 39, 1651-1654.

謝辞

本研究を行うにあたり終始ご指導、ご支援を賜わりました残留農薬研究所、毒性部長、白須泰彦博士、ならびに国立遺伝学研究所、変異遺伝部、賀田恒夫教授に深甚なる感謝の意を表します。

論文作成にあたりご助言を載せました名古屋大学、農学部、穂高重三教授に厚くお礼申し上げます。

また、菌株を分与下さいました Pasteur 研究所、M. Hofnung 博士、大阪大学、医学部、加藤武司博士、東京大学、応用微生物研究所、大石道夫教授、名古屋大学、農学部、山形秀夫博士、および Yale 大学、B.J. Bachman 博士にお礼申し上げます。

RecA 蛋白を用いた研究の遂行にあたり多大なるご協力をいただきました国立遺伝学研究所、変異遺伝部、井上正博士、および理化学研究所、微生物学研究室、柴田武彦博士、安藤忠彦博士に深く感謝いたします。

また、本研究は以下の残留農薬研究所、毒性部、第3研究室の方々の助言と協力なしには為し得なかったものです。森谷正明博士、渡辺佳津子研究員、仲村直子研究員、塚本令子研究員、渡辺三恵研究員。ここに記して厚くお礼申し上げます。

報文目録

- 1) Ohta, T., K. Watanabe, M. Moriya, Y. Shirasu and T. Kada: Antimutagenic effects of cinnamaldehyde on chemical mutagenesis in Escherichia coli. Mutation Res., 107, 219-227, 1983.
- 2) Ohta, T., K. Watanabe, M. Moriya, Y. Shirasu and T. Kada: Anti-mutagenic effects of coumarin and umbelliferone on mutagenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide or UV irradiation in E. coli. Mutation Res., 117, 135-138, 1983.
- 3) Ohta, T., K. Watanabe, M. Moriya, Y. Shirasu and T. Kada: Analysis of the antimutagenic effect of cinnamaldehyde on chemically induced mutagenesis in Escherichia coli. Mol. Gen. Genet., 192, 309-315, 1983.
- 4) Ohta, T., M. Watanabe, R. Tsukamoto, Y. Shirasu and T. Kada: Antimutagenic effects of 5-fluorouracil and 5-fluorodeoxyuridine on UV-induced mutagenesis in Escherichia coli. Mutation Res., 173, 19-24, 1986.
- 5) Ohta, T., M. Watanabe, K. Watanabe, Y. Shirasu and T. Kada: Inhibitory effects of flavourings on mutagenesis induced by chemicals in bacteria. Food Chem. Toxicol., 24, 51-54, 1986.
- 6) Kada, T., T. Inoue, T. Ohta and Y. Shirasu: Antimutagens and their modes of action. Antimutagenesis and Anticarcinogenesis: Mechanisms, (Eds.) Shankel, D.M., P.E. Hartman, T. Kada and A. Hollaender, Plenum Press, New York, pp.181-198, 1986.