

報告番号 ※乙 第 3090号

主論文の要旨

題名 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

氏名 太田 敏博

主論文の要旨

報告番号 ※ ^乙第 号 氏名 太田 敏博

大腸菌WP2s (trpE, uvrA) 株を用いて4-Nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) 誘発突然変異に対する抗突然変異因子の検索をおこなった。菌体を4-NQO で処理したのちに遠心、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-Hydroxyaminoquinoline 1-oxide (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 や4-HAQOを不活性化する作用で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、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (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の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。

大腸菌においては紫外線や4-NQO などの変異原物質によるDNA 損傷が引き金となって種々の SOS反応が誘発される。この SOS反応の誘発は、DNA 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り、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って各々の 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している SOS修復機能もこの SOS 反応の一つであり、したがって誘導性のDNA 修復機構である。そこで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。大腸菌PQ37株は SOS遺伝子の一つである su1A 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。この菌に紫外線を照射した後、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。遺伝子発現後の蛋白質合成段階での阻害作用に起因する 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しらべた。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反応の誘発に対して全く阻害作用を示さないことがわかった。

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。食品添加物、飼料添加物、天然物、抗生物質、農薬、無機塩類など233種の化合物について調べた結果、5-Fluorouracil (5-FU) と5-Fluorodeoxyuridine (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修復機能は紫外線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 (trpE) 株を用いて紫外線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 や FUDR は抗菌性を示さない濃度範囲において Trp⁺ 復帰突然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。

一方、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は、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、Furylfuramide (AF-2) およびCaptan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N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (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、N-methyl-N-nitrosourea (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なかったメチル化剤により誘発される突然変異は、野生株に比べて umuC 変異株の方が頻度が低く、したがって、突然変異の一部は 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経路である SOS修復経路の阻害作用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だした。4-NQO 以外にもいくつかの変異原物質で調べたところ、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添加す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うけなかった。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、桂皮アルデヒドの生存率上昇作用には 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み換え能が全くなかった 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、組み換え能の低下した recB, recC 変異株、および 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生存率上昇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ドの生存率上昇作用もいっそう強くあらわれた。なお、桂皮アルデヒドの生存率上昇作用には uvrA, uvrB, polA, recF, umuC 遺伝子機能は直接関与しなかった。このように、桂皮アルデヒドによる生存率上昇作用の強さは菌体中の RecA 蛋白質の量および機能と密接な関係があった。以上のことから、桂皮アルデヒドは RecA 蛋白質の関与する組み換え修復機能を促進し、この組み換え修復が正確なDNA 修復系であることから、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を引き起すものと考察された。

抗突然変異因子の桂皮アルデヒドの作用点として RecA 蛋白質の関与する組み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 フェージである fd フェージの一本鎖DNA および複製型二重鎖DNA (RF I DNA) を用い、一本鎖DNA 依存性ATP 加水分解 (ATPase) 活性、RF I DNA 依存性 ATPase 活性、相同性のある2種類のDNA (一本鎖DNA 断片と RF I 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な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わずかに抑制された。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またはATPase活性の促進効果を見出すことはできなかった。しかし、この実験で用いた *in vitro* の系は当然のことながら *in vivo* における組み換え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 組み換え反応には、RecA 蛋白質以外にも一本鎖DNA 結合蛋白質や種々のDNA 巻きもどし蛋白などの諸因子が関与していると考えられている。また、組み換え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 組み換え反応を促進する効果を検出することができなかったが、反応系をさらに改良することにより桂皮アルデヒドの組み換え修復促進作用を検出できる可能性があると考えられた。

以上、大腸菌での誘発突然変異に対する抗突然変異因子の検索と、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結果、 α 、 β -不飽和カルボニル構造を持つ一連の抗突然変異因子の存在を明らかにし、さらに、SOS 反応誘発に対する阻害作用を指標とした新たな抗突然変異因子検索法を考案した。また、抗突然変異因子の作用機構については、変異原物質で処理した菌体の生存率に対する抗突然変異因子の効果を、種々のDNA 修復変異株で比較する解析法を確立し、その結果、正確なDNA 修復系の促進作用による突然変異抑制というこれまで知られていなかった新たな作用機構を明らかにした。