

微生物の生産する
新規なタンパク質性変異抑
制因子の構造と機能

平成6年度科学研究費補助金
「一般研究（C）」
研究成果報告書

（課題番号 05660116）

平成7年3月

研究代表者 大澤俊彦
（名古屋大学農学部助教授）

RAKEN
05660116

図・本館

はしがき

研究組織

研究代表者：大澤俊彦（名古屋大学農学部助教授）

研究分担者：内田浩二（名古屋大学農学部助手）

研究経費

平成5年度 1、400、000円

平成6年度 700、000円

研究発表

(1)学会誌等

Shiraki, M., Hara, Y., Osawa, T., Kumon, H., Nakayama, T. and Kawakishi, S., Antioxidative and antimutagenic effects of theaflavins from black teas, *Mutation res.*, 323, 29-34 (1994)

Nakayama, T., Ogiso, Y., Osawa, T. and Kawakishi, S., Suppression of hydrogen peroxide-induced cytotoxicity toward Chinese hamster lung fibroblasts by decylubiquinone, a Coenzyme Q analogue, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1702-1704 (1994)

Uchida, K. and Kawakishi, S., Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu, Zn-superoxide dismutase exposed to H₂O₂, Selective generation of 2-oxo-histidine at the histidine-118, *J. Biol. Chem.*, 269, 2405-2410 (1994)

| | |
|---------|-------|
| 名古屋大学図書 | |
| 和B | 86235 |

(2)口頭発表

Osawa, T., Protective role of plant phenols in oxidative DNA damage, Forth International Conference on Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (Banff, Canada), 1994.9.

内田浩二、酸化ストレスマーカーとしての修飾ヒスチジン、第9回活性酸素・フリーラジカルに関する研究会(群馬)1994.7.

Osawa, T., Sugiyama, Y., Uchida, K. and Kawakishi, S., Novel class of antioxidative and cancer preventive phytochemicals ; Beta-diketones, Third AACR/JCA Joint Conference (Hawaii) 1995.2.

(3)出版物

大澤俊彦、がんを防ぐ52の野菜、法研(東京)1994.5

Osawa, T., Plant antioxidants; Protective role against oxygen radical species, Cosmetics and Toiletries magazine, 109, 77-81 (1994)

Uchida, K. and Stadtman, E.R., Quantification of 4-hydroxynonenal protein adducts, Method Enzymol., 233, 371-380 (1994)

成果報告

はじめに

今までに食品をはじめとする天然素材から多種多様な変異抑制因子の検索が試みられ、テルペンやタンニン類などの多種多様な植物成分が突然変異抑制作用を有していることが明らかになったが、タンパク質性の因子は全く見いだされていなかった。ところが、微生物の代謝産物、特に放線菌の代謝産物中には、制癌物質や抗菌物質、タンパク分解酵素阻害物質など様々な生理活性物質が見いだされているが、その多くはペプチドタイプやタンパク質性物質である。このような背景で、ペプチド性、タンパク質性変異抑制因子の検索を目的に、高分子透過性という特性を持つ大腸菌の変異株を検定菌としてさらに検索を行い、新しいタンパク質性変異抑制因子が存在することが推定された。

そこで、本研究では、まず、この因子の単離・精製を行い、構造を明らかにすることを第一の目標とする。さらに、除去修復能欠損株やSOS修復機能欠損株など様々な大腸菌の変異株を用いてこの物質の持つ変異抑制機構を明らかにするとともに、最近、申請者の研究室で確立している培養細胞系をも用いて、このタンパク質性変異抑制因子の作用メカニズムを明らかにすることを第二の目的とする。さらに、このタンパク質性変異抑制因子の抗体を作製し、微生物のみならずほ乳動物におけるこうしたタンパク質性変異抑制因子の存在について検索し、細胞の変異やがん化との関連性について明らかにすることを目的に本研究を行った。

研究計画・方法

スクリーニングのためのバイオアッセイに用いた検定菌としては、大腸菌、特に高分子透過性の性質を持つ*E. coli* MP-1株と共に枯草菌である*B. subtilis* NIG1125株を用いた。さらに、変異抑制因子の単離・精製とともに変異抑制機構の解明のためには除去修復欠損株で

ある WP 2 s 株も含めて検討を行った。

変異抑制因子の単離・精製は、各種カラムクロマトグラフィーと共に分取用 H P L C を含めた大量分離・精製手段を用いて、先に述べたような微生物による評価系を用いた変異抑制活性を指標に行われた。また、単離された変異抑制因子の構造解析は、600 MHz-NMR や FAB-MS, FT-IR などの最新の機器分析を用いられた。さらに、各種プロテアーゼによる特異的な加水分解により得られたアミノ酸をはじめとする各種フラグメントの構造解析も同時に行うことにより全構造の決定が行われた。

また、当研究室では、組織傷害に伴い生ずる変性タンパク質に関する有機化学的研究及び高感度分析法の開発による変性タンパク質の微量検出に多くの経験を持ち、ペプチドやタンパク質に対する抗体作製についても熟練している。そこで、この経験を応用した免疫化学的手法を用いた変異抑制因子の分析、特に、単離・精製された活性物質に対するポリクローナル抗体の作製を試みる。得られた抗体を用い、個体間あるいは組織間での変異抑制因子の細胞内分布を明確にし、細胞の変異・がん化との関連性について検索することも、本研究の大きな目的である。

従来の研究経過

高分子透過性の変異株の大腸菌、*E. coli* MP-1 と共に枯草菌である *B. subtilis* NIG1125株を検定菌として、293 種類の放線菌の代謝物の変異抑制活性を検討した結果、最も強い活性を示した *Streptomyces* SP AJ 9455 株に着目した。タンク培養法用いて300リッターという大量培養を行って得られた培養濾液を濃縮し、数段階のカラムクロマトグラフィーを行って予備精製を行った後、大腸菌、*E. coli* MP-1株と共にWP2s株を用いた変異抑制活性を指標に分取用 H P L C を含めた大量分離・精製手段を用いて単一物質と推定される BA-1、BA-2と命名した2種類の変異抑制因子を単離・精製することができた。そのうち、BA-2については、機器分析の結果、図-1に示されたような構造であることが明らかにされ、変異抑制機構についても検討されて詳細が報告されている。

ところが、BA-1と命名された活性物質については、100マイクログ

ラムという微量しか得ることができなかつた。そこで、まず、電気泳動を用いての分析を行ったところ、図-2に示すように、分子量7000-10000と推定される結果を得た。ところが、各種機器分析を行ったところ、この物質はまだ完全に純粋ではなく、不純物を含むと推定されたので、さらに単離・精製を試みることとなった。

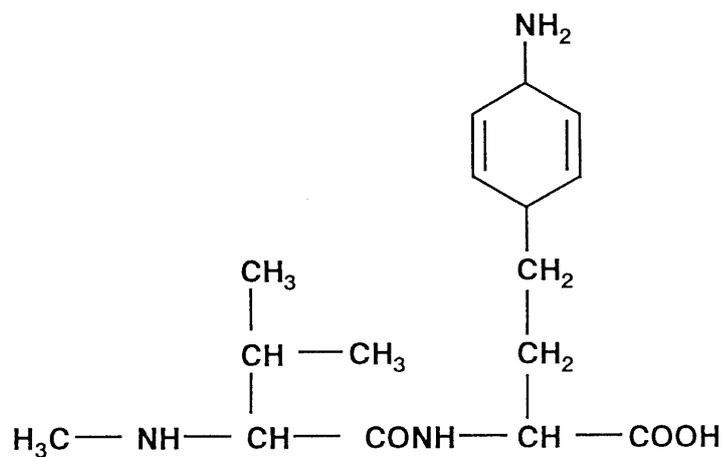


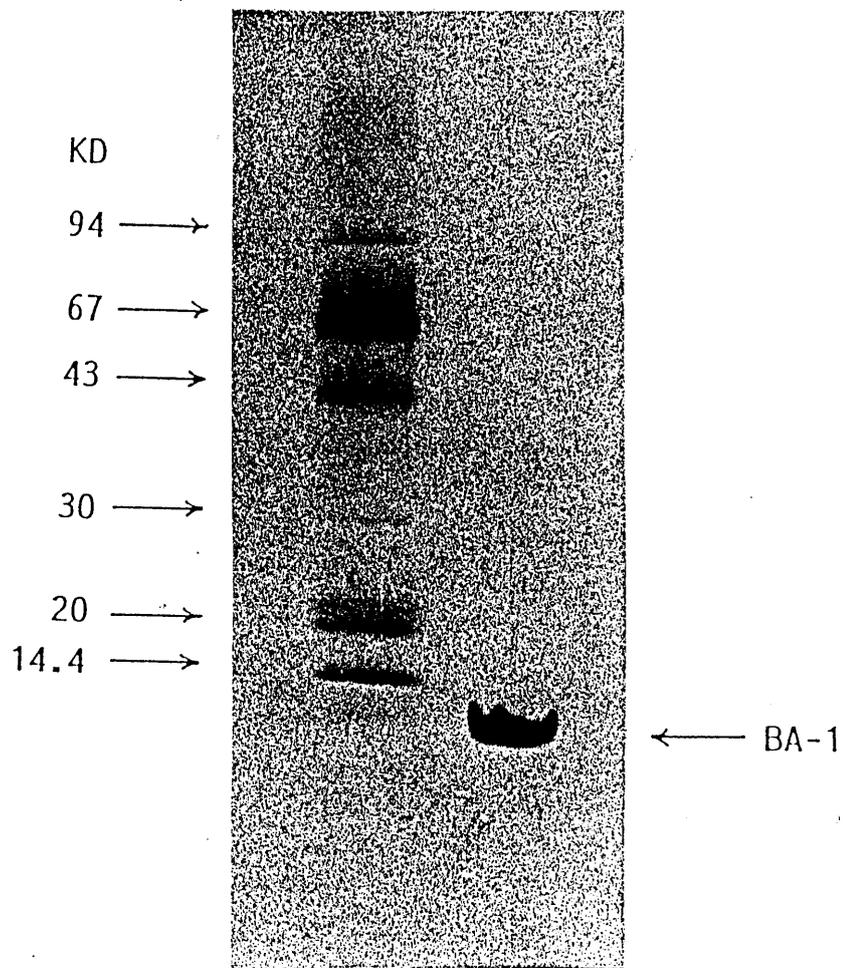
図-1 BA-2の構造

本研究での成果

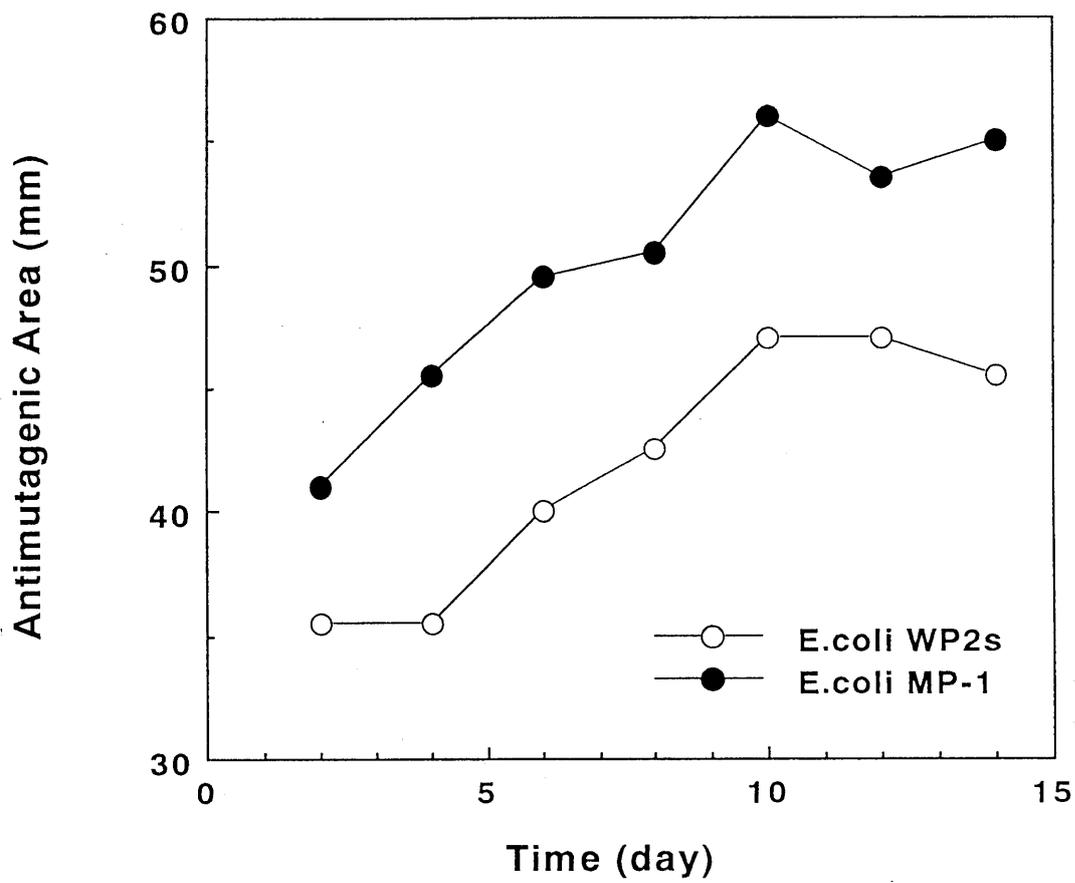
今回は、タンク培養法ではなく振とう培養法を用いたバッチ法を用いることとした。まず、培養条件についても再検討を行うこととした。*Streptomyces* SP AJ 9455 株について、変異抑制活性を指標にして検討を進めた結果、図-3に示したように、大腸菌 *E. coli* MP-1株でも WP2s 株の場合でも培養10日目で最も強い活性を示し、その後は余り活性の増加はみられなかった。そこで、10日間の培養を行い、得られた培養濾液を減圧濃縮し、図-4に示したような数段階のカラムクロマトグラフィーによる予備精製を行った後、大腸菌、*E. coli* MP-1株と共にWP2s株を用いた変異抑制活性を指標に分取用HPLCを含めた大量分離・精製手段を用いて単一物質と推定される活性物質、1.4mgを得ることができた。

そこで、得られた活性物質について、まず、電気泳動による検討を行ったところ、今回は検出されず低分子性のペプチドではないかと推定された。そこで、まず、マススペクトルによる質量分析を検討したところ、図-5に示すように分子量436と推定されたが決定に至らないという結果が得られた。そこで、活性物質のアミノ酸分析を行ったところ、BA-2と同様にアンモニア、リジンに近接したピーク以外に新たなピークが観測された(図-5)。そこで、さらに、¹H-NMRを用いた解析を行ったところ、図-6に示すようなスペクトルが得られた。現時点では、¹³C-NMRの結果が得られておらず、また、2次元NMRも十分な結果が得られていないので、構造についての知見は不十分である。しかしながら、¹H-NMRのデータと共に図-7に示したようなアミノ酸分析の結果より、リジン及びオルニチンを部分構造として含むことが推測されたが構造の詳細については現在検討中である。

単離された活性物質の突然変異抑制作用については、大腸菌、*E. coli* MP-1株と共にWP2s株を用いて変異抑制活性が確認されている。その結果の一部を表-1に示しているが、現時点では、得られた試料が微量であるために、Disk法を用いた定性的な結果のみしか得られていない。現在、分子構造の決定を目的に、各種機器分析による構造解析と共に、各種プロテアーゼを用いての加水分解の特異性などペプチドとしての性質や各種微生物変異原性試験法による検討を進めている。



☒ - 2 B A - 1 の S D S - P A G E



diskには、100mg/mlの除菌培養液を50 μ lのせた。

図 - 3 培養期間と突然変異抑制効果

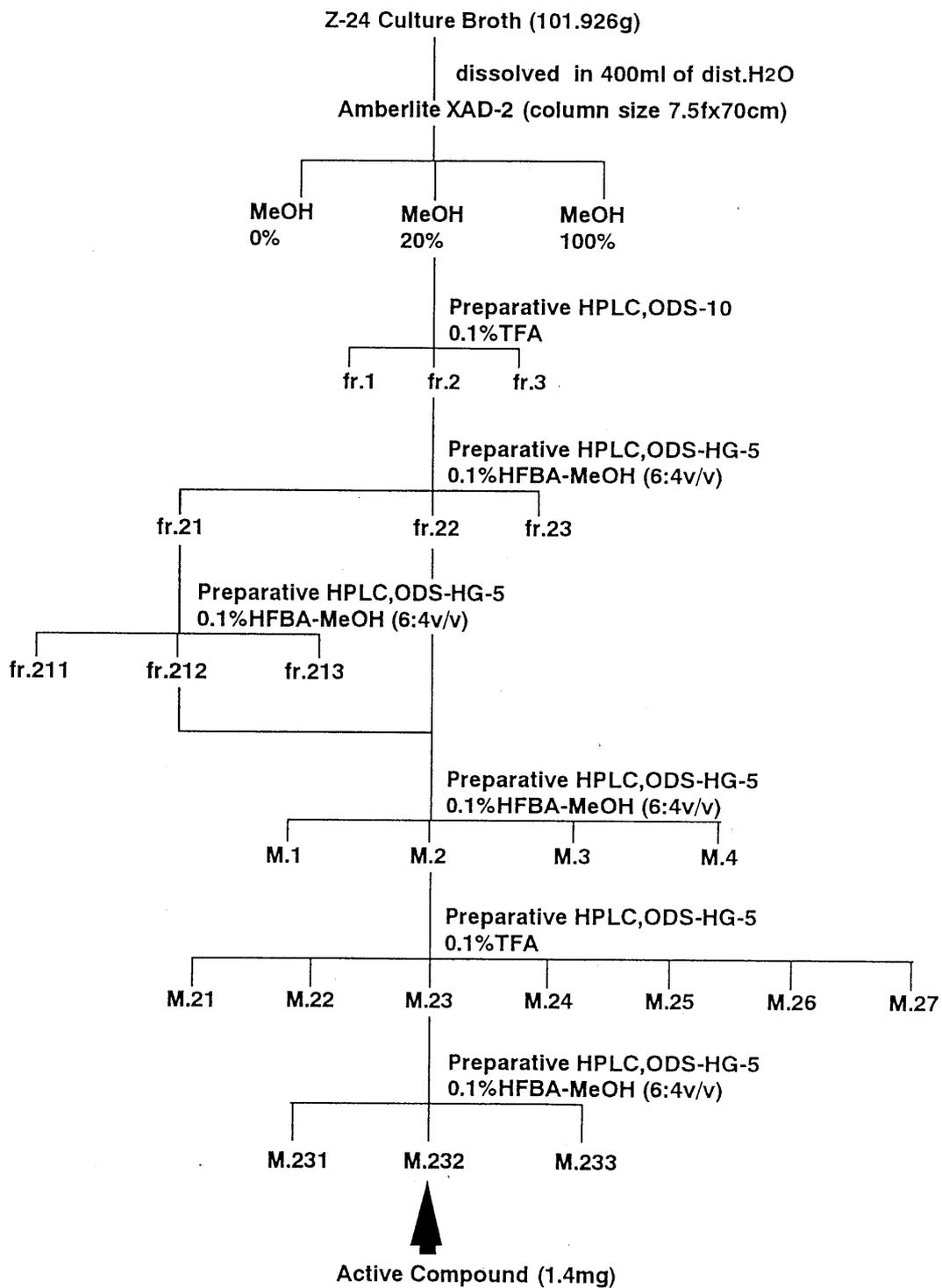


図-4 活性物質 (BA-1) の単離・精製

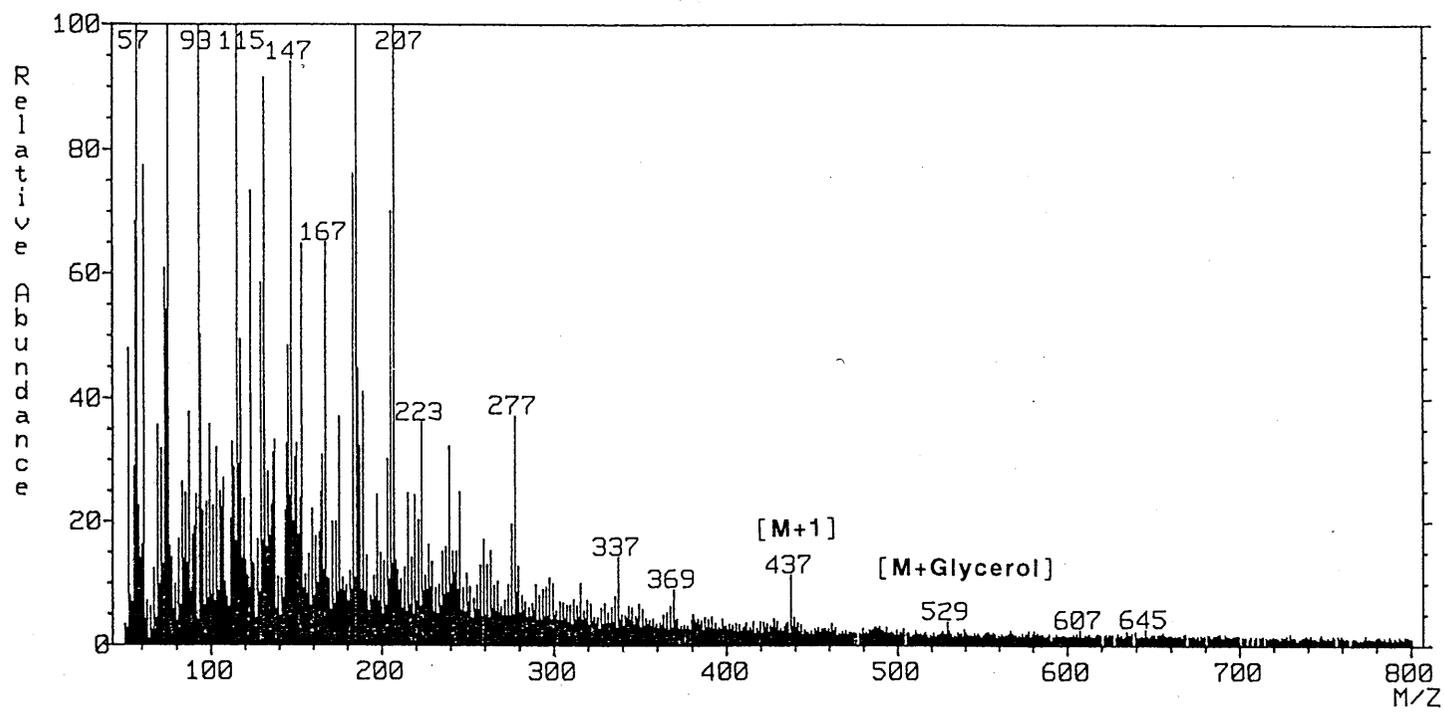
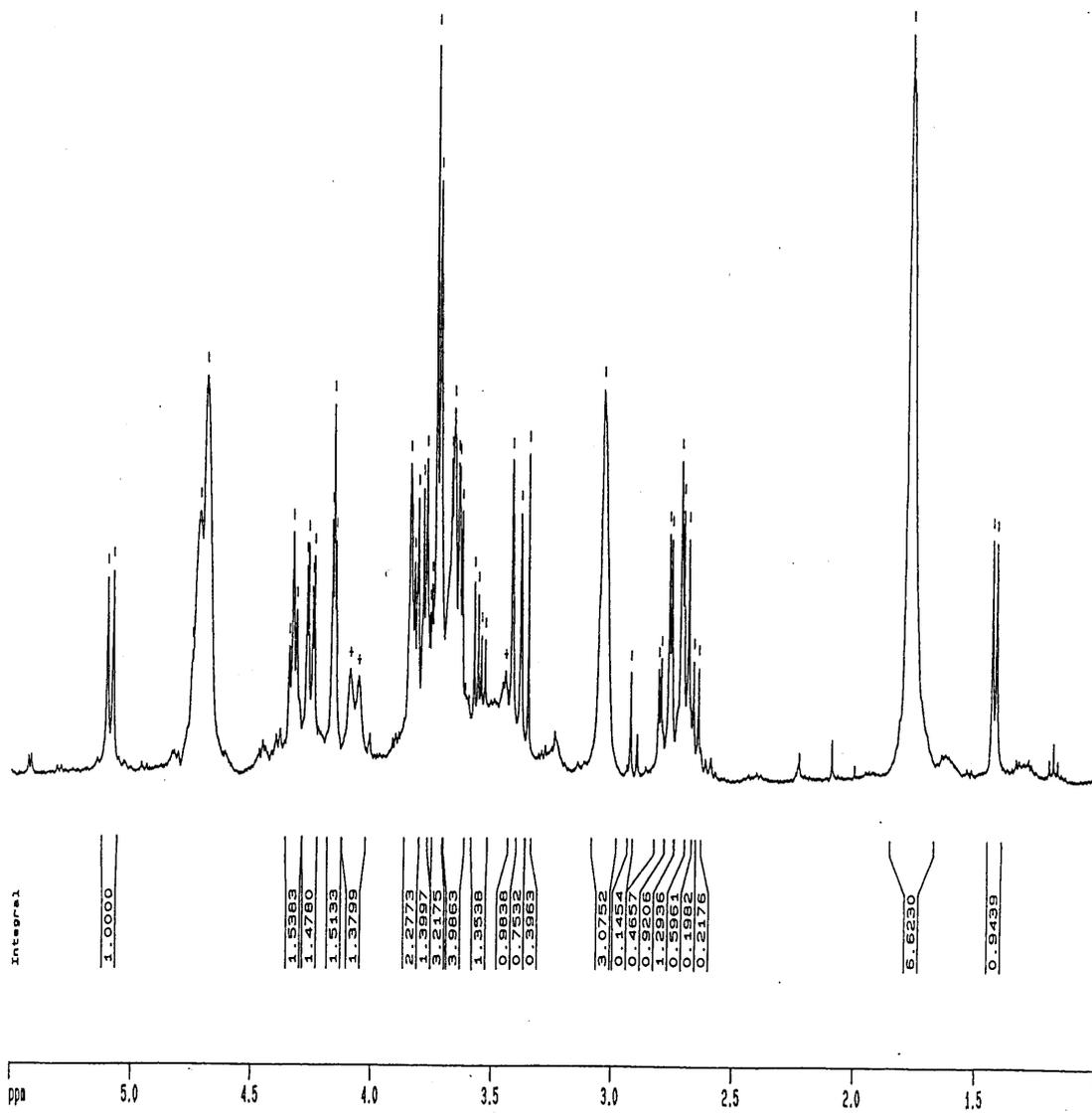


図-5 BA-1のマススペクトル



☒ - 6 BA-1 の 1H-NMR スペクトル
(400 MHz、D₂O)

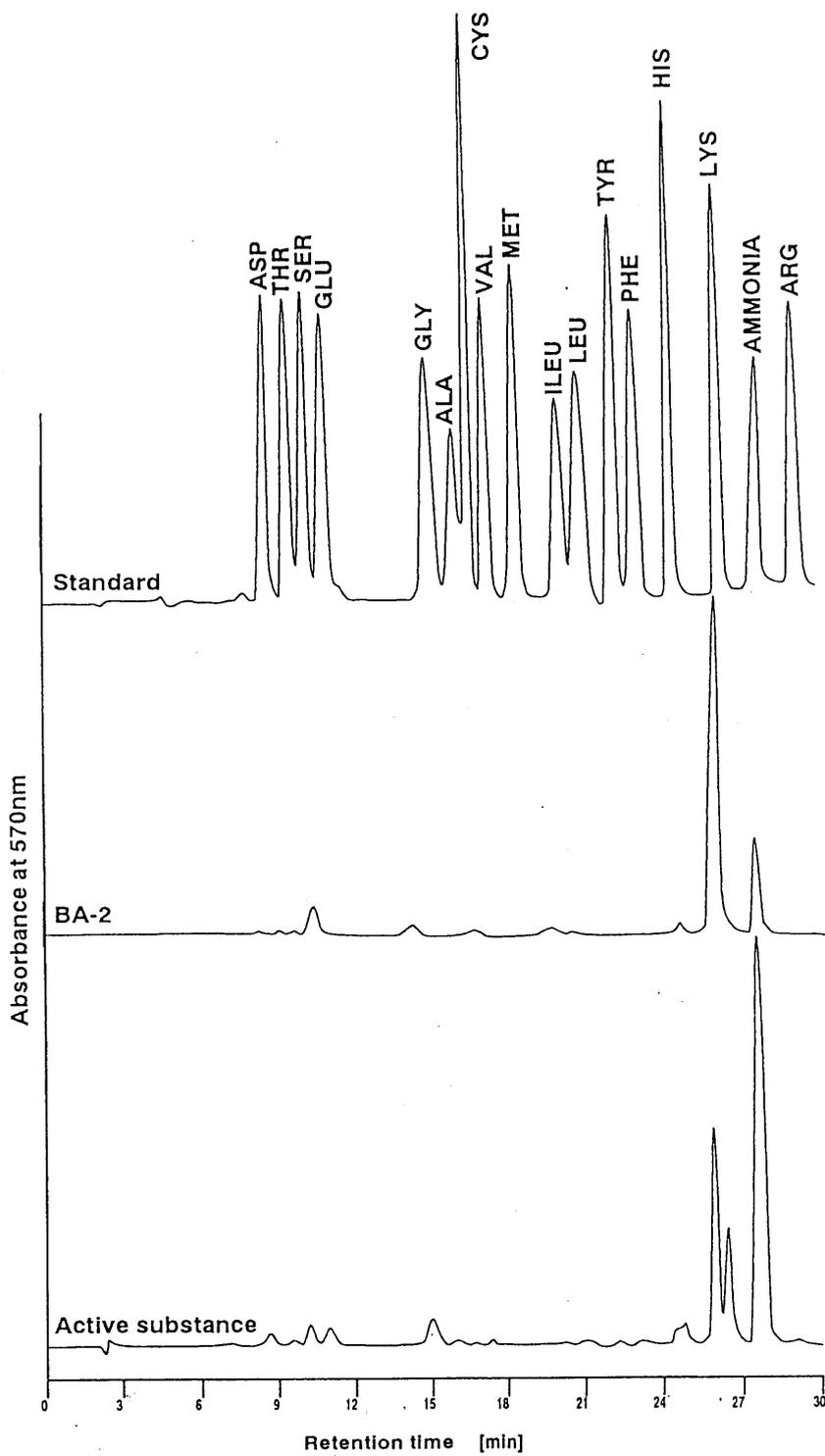


図-7 BA-1のアミノ酸分析

| Sample (μ l) | r (mm) | R (mm) |
|----------------------|--------|--------|
| Active Compound 50 | 11 | 25 |
| | 11 | 26 |
| CoCl ₂ 50 | 17 | 30 |
| | 16 | 28 |
| H ₂ O 50 | 0 | 0 |
| | 0 | 0 |

Sample濃度

Active Compound:0.2mg/ml

CoCl₂ · 6H₂O:10mg/ml

表 - 1 B A - 1 の突然変異抑制効果
ディスク法 (*E. coli* MP-1)