

学 位 論 文 題 名

活性酸素によるグリオキサールの生成とその変異誘発能に関する研究

学位論文内容の要旨

【序論】

活性酸素は、生体の生命活動において発生するのみならず、種々の変異原性化学物質や放射線等によっても生成することが知られており、癌に代表される加齢に伴って増加する疾患に関与していると考えられている。これまでに、活性酸素によって生じる DNA 損傷は数多く報告されているが詳細に検討されているものは少ない。本研究では、活性酸素によって生ずる変異原物質であるグリオキサールに着目した。

グリオキサールは種々の食品（醤油、味噌、コーヒー等）や煙草の煙に存在することが知られている。また、グルコースの加熱処理及び自動酸化、あるいは脂質の過酸化においてもグリオキサールの生成が確認されている。サルモネラ菌 TA100、TA102、TA104 株を用いた復帰変異試験（Ames 試験）において、グリオキサールが変異原性を有すること、さらに、グリオキサールが発癌プロモーター活性を有することが報告されている。グリオキサールが DNA に作用すると、DNA 鎖の切断を生じるのみならず、DNA 中のグアニン (dG) 残基に対して特異的に結合し、3 環性の構造をとることが報告されている。

本研究は、活性酸素による DNA からのグリオキサール生成を見出したことに端を発した。グリオキサールが DNA より生成した場合、容易に DNA に作用し付加体を形成し得ると考えられる。そこで、グリオキサールが誘発する変異を解析し、活性酸素による DNA 損傷にグリオキサールが関与している可能性について検討した。

【DNA からのグリオキサール生成】

DNA 及びその関連物質（ヌクレオシド、ヌクレオチド）を活性酸素 (Fe^{2+} -EDTA- O_2) で処理するとグリオキサールが生成することを見出した。その生成量は、活性酸素によって生じる代表的な損傷塩基として知られる 8-ヒドロキシグアニンの約 13~17 倍であった。このことは、グリオキサールが活性酸素によって生じる主要な化合物であることを示唆する。

また、デオキシヌクレオシドを Fe^{2+} -EDTA- O_2 と他の活性酸素産生系 {腎発癌物質であるニトリロ三酢酸 (NTA) の鉄錯体 (Fe^{2+} -NTA- O_2) 処理、及び γ 線照射} で処理した。その結果、生じる損傷塩基 (8-ヒドロキシグアニン、2-ヒドロキシアデニン、5-ヒドロキシシトシン、5-ホルミルウラシル等) の生成量は、処理方法及び反応液の pH により生成の優先順位が異なることを見出した。尚、グリオキサールの生成は Fe^{2+} -EDTA- O_2 処理においてのみ確認された。

【復帰変異試験】

サルモネラ菌 (TA7001-TA7006 及び TA98 株) を用いた Ames 試験 II により 6 種の塩基置換変異及び G:C 塩基対の欠失変異について調べたところ、グリオキサールは G:C 塩基対特異的に変異を誘発した。但し、復帰変異試験で得られた結果は変異原性の有無を表わしているに過ぎないため、個々の変異の誘発頻度を比較することは不可能である。そこで、大腸

菌及び哺乳動物細胞においてグリオキサールが誘発する変異のスペクトルについて検討した。

【大腸菌における変異の解析】

大腸菌 W3110 野生株 (*lacI^r*) に対してグリオキサール処理を行い、 β -ガラクトシダーゼ合成能の有無に基づき *lacI^r* 変異体を選択した。グリオキサール処理による大腸菌の変異率はグリオキサール処理濃度に依存して増加した。グリオキサール処理群における変異率は非処理群の約 75 倍であった。さらに、得られた変異体の *lacI* 遺伝子を解析したところ、両群において、*lacI* 遺伝子上に生じる自然突然変異として知られている 5'-TGGC-3' 配列の付加あるいは欠失による変異が主として検出された。また、グリオキサール処理群においては塩基置換変異の増加が観察された。検出された塩基置換変異の 78% が G:C 塩基対における変異であり、G:C→A:T トランジションが最も高頻度で検出され、次いで G:C→T:A トランスポバージョンが検出された。なお、これらの塩基置換変異において変異のホットスポットは観察されなかった。

【哺乳動物細胞における変異の解析】

大腸菌のサブレッサー tRNA (*supF*) 遺伝子を含有するシャトルベクター pMY189 に対してグリオキサール処理を行った後、サル由来の COS-7 細胞にトランスフェクションした。グリオキサール処理による COS-7 細胞の変異率はグリオキサール処理濃度に依存して増加した。グリオキサール処理群における変異率は非処理群の約 11 倍であった。細胞中において誘発された *supF* 遺伝子上の変異を解析したところ、グリオキサールにより主として塩基置換変異が引き起こされた。G:C 塩基対における変異が、その 83% を占めていた。特に G:C→T:A トランスポバージョンが高頻度で検出され、次いで G:C→C:G トランスポバージョン及び G:C→A:T トランジションが検出された。

【結語】

1. 活性酸素の作用により、DNA 及びその関連物質よりグリオキサールが生成することを見い出した。
2. サルモネラ菌を用いた復帰変異試験において、グリオキサールは G:C 塩基対特異的に変異を誘発することを見い出した。
3. グリオキサールは大腸菌において変異を誘発することを明らかにした。誘発された塩基置換変異の大部分が G:C 塩基対における変異であり、誘発頻度の序列は G:C→A:T 変異、次いで G:C→T:A 変異であった。
4. グリオキサールは哺乳動物細胞において変異を誘発することを明らかにした。誘発された塩基置換変異の大部分が G:C 塩基対における変異であり、誘発頻度の序列は G:C→T:A 変異、次いで G:C→C:G 及び G:C→A:T 変異であった。
5. 以上のことから、グリオキサールが活性酸素による変異や発癌に関わっている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	大塚	栄子
副査	教授	松田	彰
副査	助教授	井上	英夫
副査	助教授	周東	智

学位論文題名

活性酸素によるグリオキサールの生成とその変異誘発能に関する研究

申請者は活性酸素によって生ずる変異原物質であるグリオキサールに着目し、グリオキサールが誘発する変異を解析し、活性酸素によるDNA損傷について研究を行って来たが、今回以下の知見を得た。

DNA及びその関連物質（ヌクレオシド、ヌクレオチド）を活性酸素（ Fe^{2+} -EDTA- O_2 ）で処理するとグリオキサールが生成することを見い出した。その生成量は、活性酸素によって生ずる代表的な損傷塩基として知られる8-ヒドロキシグアニンの約13－17倍であった。このことは、グリオキサールが活性酸素によって生ずる主要な化合物であることを示唆する。

また、デオキシヌクレオシドを Fe^{2+} -EDTA- O_2 と他の活性酸素産生系（腎発癌物質であるニトリロ三酢酸（NTA）の鉄錯体（ Fe^{2+} -NTA- O_2 ）処理、及び γ 線照射）で処理した。その結果、生ずる損傷塩基（8-ヒドロキシグアニン、2-ヒドロキシアデニン、5-ヒドロキシシトシン、5-ホルミルウラシル等）の生成量は、処理方法及び反応液のpHにより生成の優先順位が異なることを見い出した。なお、グリオキサールの生成は Fe^{2+} -EDTA- O_2 処理においてのみ確認された。

次に、サルモネラ菌（TA7001-TA7006及びTA98株）を用いたAmes試験IIにより6種の塩基置換変異及びG:C塩基対の欠失変異について調べたところ、グリオキサールはG:C塩基対特異的に変異を誘発した。但し、復帰変異試験で得られた結果は変異原性の有無を表わしているに過ぎないため、個々の変異の誘発頻度を比較することは不可能であるので、大腸菌W3110

野生株 (*lacI*) に対してグリオキサール処理を行い、 β -ガラクトシダーゼ合成能の有無に基づき *lacI* 変異体を選択した。グリオキサール処理による大腸菌の変異率はグリオキサール処理濃度に依存して増加した。グリオキサール処理群における変異率は非処理群の約75倍であった。検出された塩基置換変異の78%がG:C塩基対における変異であり、G:C→A:Tトランジションが最も高頻度で検出され、次いでG:C→T:Aトランスバージョンが検出された。なお、これらの塩基置換変異において変異のホットスポットは観察されなかった。

哺乳動物細胞において変異を調べるために大腸菌のサプレッサーtRNA (*supF*) 遺伝子を含有するシャトルベクターpMY189に対してグリオキサール処理を行った後、サル由来のCOS-7細胞にトランスフェクションした。グリオキサール処理によるCOS-7細胞の変異率はグリオキサール処理濃度に依存して増加した。グリオキサール処理群における変異率は非処理群の約11倍であった。細胞中において誘発された*supF*遺伝子上の変異を解析したところ、グリオキサールにより主として塩基置換変異が引き起こされた。G:C塩基対における変異が、その83%を占めていた。特にG:C→T:Aトランスバージョンが高頻度で検出され、次いでG:C→C:Gトランスバージョン及びG:C→A:Tトランジションが検出された。これらのことから、グリオキサールが活性酸素による変異や発癌に関わっている可能性が示唆された。

以上の業績は、博士（薬学）を授与するに値するものと判断した。