



## 香料の抗変異原性に関する研究

本研究は、日本農芸化学会2014年度(平成26年度)大会(開催地: 明治大学生田キャンパス)「ジュニア農芸化学会2014」で発表されたものである。香料としてなじみ深いバニリンの突然変異抑制作用に注目し、酵母を用いてそのメカニズムを解析している。身近な食品による発がん抑制の可能性を探りたいへん興味深い研究であった。

### ● 本研究の背景・目的, 方法, 結果および考察

#### 【背景・目的】

がんは日本国民の主要な死亡要因の一つであり、秋田県をはじめとする東北地方では、がん死亡率が毎年上位である。突然変異はがんの原因の一つであり、われわれは、突然変異を抑制する物質の探索を通して、日本国民の健康の維持増進に貢献したいと思い、本研究を着想した。われわれは、食品に使われる香料に着目し、香料の中から突然変異を抑制する機能をもつものを発見し、香りを楽しむのと同時に健康の維持増進を実現することを研究の目的とした。

バニラの香りの主成分であるバニリンは代表的な香料の一つである。バニリンは大腸菌を用いたエームス試験において突然変異抑制効果が認められており、これはDNA修復系の中でも組換え修復によるものであることが示唆されている<sup>(1, 2)</sup>。また、チャイニーズハムスター細胞において紫外線やX線による突然変異の抑制が認められ、マウスにおいてエチルニトロソウレアによる突然変異の抑制が認められている<sup>(3)</sup>。変異原によって誘発される染色体異常の頻度を哺乳動物細胞において減少させることも報告されている<sup>(1)</sup>。

本研究では、DNA酸化損傷による突然変異やゲノム

の不安定性に対して、バニリンがどのように作用するかを出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) をモデルとして用いて検証した。

#### 【方法】

##### 実験1. 1倍体酵母 *S. cerevisiae* YAS106 を用いた点突然変異の検出

- ①酵母 YAS106 を YPD 液体培地において 30°C で 3 日間培養した。
- ②①に DNA 酸化損傷を誘発する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, およびバニリンを加え、30°C で 3 時間培養した。
- ③それを適当な希釈率で YPD 寒天培地とカナバニン含有最少寒天培地 (SC 寒天培地) にまいた。
- ④30°C で 3 日培養した後、生えてきたコロニー数を数えて生菌数を測定した。
- ⑤生菌数の割合を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 非処理時を 1.0 として求めた。また、カナバニン耐性をもたらず点突然変異 (本稿では一塩基置換のほか、フレームシフト変異も含める) の頻度を、(カナバニン含有 SC 培地のコロニー数) / (YPD 寒天培地のコロニー数) として求めた。

##### 実験2. 2倍体酵母 *S. cerevisiae* YAS3001 を用いた相同染色体間の組換えと染色体喪失の検出

- ①酵母菌 YAS3001 を YPD 液体培地において 30°C で 2 日間培養した。
- ②①を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, バニリンとともに 30°C で 3 時間培養した。
- ③それを適当な希釈率で YPD 寒天培地とカナバニン含有 SC 寒天培地にまいた。
- ④30°C で 2 日培養した後、生えてきたコロニー数を数えて生菌数を測定した。
- ⑤生菌数の割合を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 非処理時を 1.0 として求めた。ま

た、LOH (Loss of heterozygosity) 頻度を、(カナバニン含有SC培地のコロニー数)/(YPD寒天培地のコロニー数)として求めた。

⑥カナバニン含有培地に生えたコロニーをYPD寒天培地とリシンを含まないSC寒天培地にレプリカし、30°Cで2日間培養した。YPD寒天培地上でのコロニーの色(Ade<sup>+</sup>酵母:白, Ade<sup>-</sup>酵母:赤), およびリシンを含まないSC寒天培地上での生育の有無を指標として, Ade<sup>+</sup>Lys<sup>+</sup>, Ade<sup>+</sup>Lys<sup>-</sup>, Ade<sup>-</sup>Lys<sup>-</sup>に分類し, それぞれの割合とLOH頻度の積を算出し, 出現頻度を求めた。

⑦Ade<sup>+</sup>Lys<sup>+</sup>のコロニーに対してPCR法を用いて染色体の構造を調べ, Point mutationとGene conversionを判別した。

### 【結果および考察】

#### 実験1

1倍体酵母YAS106でH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とバニリン処理時の生菌数の割合, 点突然変異頻度を調べた。突然変異体の検出に用いたカナバニンは, アルギニンの類似物質であり, アルギニン代謝系に取り込まれることにより, 酵母の生育を阻害する。しかし, *CAN1* 遺伝子に突然変異が起こった酵母では, カナバニンを取り込まなくなり, カナバニン耐性となる。われわれはYPD培地とカナバニン含有培地に生えてきたコロニー数をそれぞれ計測して, 生菌数の割合と突然変異頻度を算出した。

生菌数の割合をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加しないとき(0μM)を1.0として求めると, バニリン非添加時には500μMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって0.17まで減少したのに対して, バニリン添加時には生菌数の減少は見られなかった。これより, DNA酸化損傷に起因する細胞死の抑制にバニリンが関与していることが示唆された。

YAS106は相同染色体をもたないので, 点突然変異しか検出されない。バニリン非添加時には500μMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって点突然変異頻度が自然突然変異に比べて100倍上昇するが(図1□), バニリン添加時は, 点突然変異頻度の上昇は3倍に抑えられた(図1■)。よって, バニリンがH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による点突然変異を抑制していることがわかった。一方, 自然DNA損傷(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>無添加)についてはバニリンによる点突然変異抑制効果は見られなかった。

#### 実験2

実験1より, バニリンの作用としては,

- ①DNA酸化損傷自体が生じるのを抑制している。
  - ②DNA酸化損傷が生じたときに, 組換え修復を活性化させ, 損傷を正常に復帰させる。
- という2つの可能性が考えられる。組換え修復活性化の

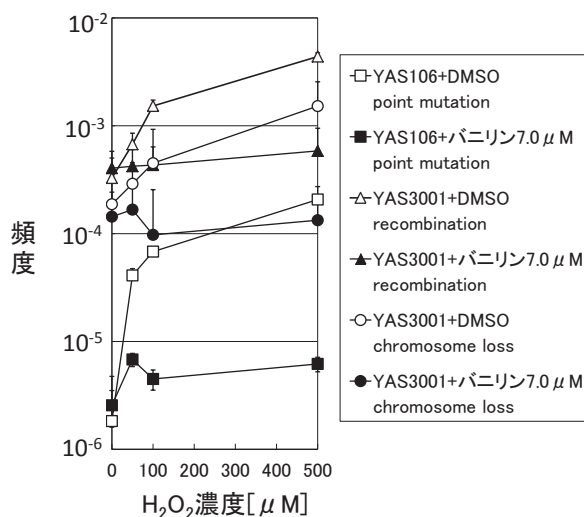


図1 ■1倍体酵母での点突然変異頻度と2倍体酵母での相同染色体間の組換えと染色体喪失の頻度

有無を1倍体酵母で調べることは困難であるため, 2倍体酵母YAS3001を用いてその可能性を検討した。YAS3001は, *CAN1* 遺伝子が(+/-)のヘテロ接合体であり, これが*can1* (-/-)となる, すなわちカナバニン感受性がカナバニン耐性へと変わる過程を解析した。YAS3001では, *CAN1* 遺伝子を含む領域での相同染色体間の組換えや, *CAN1* 遺伝子を含む染色体の脱落, *CAN1* 遺伝子の点突然変異によって, *CAN1* 遺伝子が(+/-)→(-/-)または(-/0)へと変化する。YAS3001の*CAN1* 遺伝子を含む染色体の両末端にはアデニン合成にかかわる*ADE* 遺伝子とリシン合成にかかわる*LYS* 遺伝子が染色体マーカーとして挿入されているため, これらの要求性を調べることにより, *CAN1* 遺伝子が(+/-)→(-/-)または(-/0)へと変化したときに, 相同染色体間での組換えが起こったかどうかを明らかにできる(図2)。すなわち, カナバニン耐性かつAde<sup>+</sup>, Lys<sup>+</sup>であればPoint mutation(*CAN1* 遺伝子内の点突然変異)またはGene conversion(*CAN1* 遺伝子を含むごく狭い範囲での鎖の交換)が起こったと考えられる。このとき, *CAN1* 遺伝子の周辺領域でPCRを行い, Point mutationの入った*CAN1* 遺伝子を含む1.5kbのDNA断片と*can1* Δを含む領域の0.8kbのDNA断片の両方が増幅されればPoint mutationが起こったものと分類し(図2a), *can1* Δを含む領域の0.8kbのDNA断片のみが増幅されればGene conversionが起こったものの(図2b)と判断した。カナバニン耐性かつAde<sup>+</sup>, Lys<sup>-</sup>であるならば, Allelic crossover(*CAN1* 遺伝子を含む染色体末端領域での鎖の交換)が起こったものと判

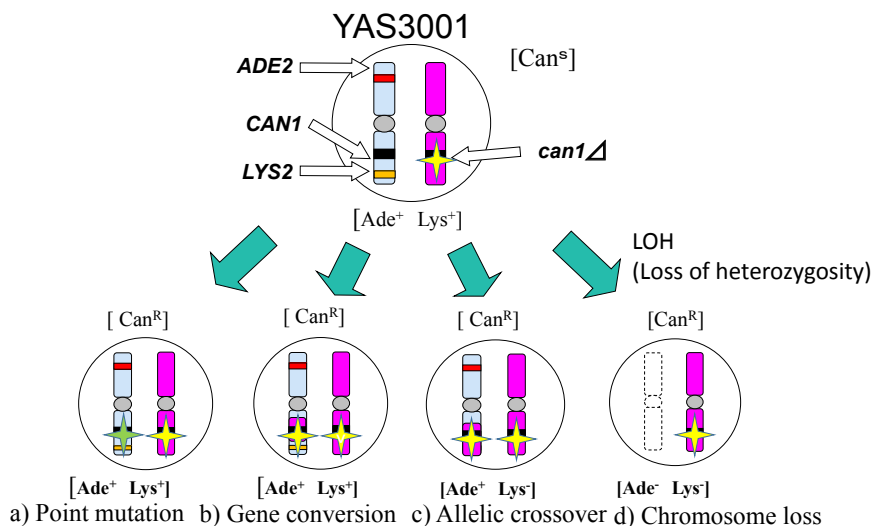


図2 ■ 2倍体酵母におけるLOHの過程と生じた細胞の分類

断した (図2c). カナバニン耐性かつ Ade<sup>-</sup>, Lys<sup>-</sup>であるならば, Chromosome loss (正常 CAN1 遺伝子を含む相同染色体の一方の喪失) が起こったものと判断した (図2d). 図2の a~d の各現象の頻度は, カナバニン耐性になった頻度 (LOH 頻度) × 各現象の起こった割合によって算出した.

どの実験区でも Point mutation (図2a) は検出されなかった. 相同染色体間での組換え (図2b と図2c) については, 自然 DNA 損傷 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 無添加) の場合, 3.3 × 10<sup>-4</sup> の頻度で検出され (図1△), バニリンを添加しても 4.0 × 10<sup>-4</sup> とその頻度はほとんど変わらなかったことから (図1▲), バニリンは相同染色体間での組換えを促進しないことがわかった. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 単独処理では, 図2b と図2c の合算である相同染色体間での組換え頻度は増加し, 500 μM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理では 10 倍 (4.4 × 10<sup>-3</sup>) となったが (図1△), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> とバニリンの同時処理では相同染色体間での組換えの上昇は見られなかった (図1▲). 一方, 染色体喪失 (図2d) については, 自然 DNA 損傷 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 無添加) の場合, 1.4 × 10<sup>-4</sup> の頻度で見られるが, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 単独処理によってその頻度は増加し, 500 μM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理では 10 倍 (1.5 × 10<sup>-3</sup>) となった (図1○). しかし, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> とバニリンの同時処理では染色体喪失の上昇も見られなかった (図1●).

以上のように, バニリンは DNA 酸化損傷による点突然変異を抑制し, 相同染色体間での組換えや染色体喪失も引き起こさないことがわかった.

誘発物質に対しては突然変異抑制効果が期待できる. また, 食品の酸化防止剤としての利用価値もあると考えられる. 一方で, 自然突然変異の抑制効果はないことがわかった. 過剰な期待をせず, 適量で香りとともに食を楽しむことを第一に考えるべきである.

今後は, 同様の実験をほかの香料や食品成分についても行い, 突然変異を抑制する物質, 特に DNA 修復系を活性化したり, 染色体異常を抑制する物質を探索していくことで, 人の健康の維持増進に貢献していきたい.

本研究は東北地方の課題である「がん」に生徒が興味をもち, 調べていくうちにエームス試験を探し当て, 高校の生物実験室でも実施可能な実験であるとして, 自ら提案してきたことと, 「香料」への興味も加わったことで始まった研究である. 何かに興味を抱くことができることと, 興味をもったことについて調べ, 妥当な検証方法を選択し, 地道に検証を続けていけるというのは研究者として重要な素養である. 未来の農学・生命科学を支える研究者となるであろう彼女たちの最初の第一歩となった研究であるという意味でもたいへん意義のある研究である.

謝辞: 本研究は, 科学技術振興機構「中高生の科学部活動振興プログラム」の支援を受けて行っています. この場を借りて御礼申し上げます.

## 文献

- 1) Y. Kuroda & T. Inoue: *Mutat. Res.*, **202**, 387 (1988).
- 2) T. Ohta, M. Watanabe, Y. Shirasu & T. Inoue: *Mutat. Res.*, **201**, 107 (1988).
- 3) H. Imanishi, Y. F. Sasaki, K. Matsumoto, M. Watanabe, T. Ohta, Y. Shirasu & K. Tutikawa: *Mutat. Res.*, **243**, 151 (1990).

(文責「化学と生物」編集委員)

## 本研究の意義と展望

バニリンは抗酸化作用により外因性の DNA 酸化損傷

Copyright © 2014 公益社団法人日本農芸化学会