

# 突然変異抑制効果を持つ物質の探索

## － 科学研究を通しての科学技術人材の育成 －



実施担当者 秋田県立秋田高等学校  
教諭 遠藤 金吾

### 1 はじめに

がんは日本国民の2人に1人が生涯のうち罹患するとされ<sup>1)</sup>、我が国全体で重要な課題となっている。我々の住む秋田県ではがん死亡率が高く、特に食道がん、胃がん、大腸がんでの死亡率は全国1位～6位であり<sup>2)</sup>、大きな問題となっている。細胞のがん化の原因の1つには遺伝情報の変化である突然変異、特に塩基置換などの1、2塩基の変化である遺伝子突然変異がある<sup>3)</sup>。がんはがん原遺伝子やがん抑制遺伝子に突然変異を生じ、常に増殖が促進されたり、細胞周期を抑制できなくなるような変異が生じたりすることを発端とする場合が多い。我々は、がんの一次予防として突然変異抑制効果を持つ物質を発見すれば、人々の健康の維持・増進に貢献できるのではないかと考え、本研究を着想した。本研究の方針として、人々の生活との関わりが深い食品に含まれる成分から突然変異抑制効果を持つ物質を発見することを目的とした。また、対象となりうる物質を選ぶにあたり、幅広く利用され、かつ応用しやすいという観点から、香料に着目した。このような物質の発見によって、香りを楽しみながら手軽に健康増進を図ることができるようになることを期待される。

### 2 材料と方法

#### 2-1 材料

出芽酵母：*Saccharomyces cerevisiae*

DNA酸化損傷による遺伝子突然変異やゲノムの安定性に対してシトラールがもたらす作用を、出芽酵母をモデル生物として用いて検証を行った。出芽酵母を用いるメリットとしては、①ヒトと同じ真核生物であるため、よりヒトに近いデータを得ることが可能であること ②培養が容易で増殖も速いこと ③一倍体の状態でも培養が可能であること が挙げられる。

#### 2-2 方法

- ① 一倍体酵母 YAS106 を 30℃ で 3 日間培養した。
- ② ① に変異原物質として過酸化水素を、遺伝子突然変異を抑制する候補物質としてシトラール、またはシトラールと類似の構造を持つシトラールジメチルアセタール(図 1)、シトロネラール(図 2)をそれぞれ 0.59 μM、5.9 μM、59 μM になるように加え、30℃ で 3 時間培養した(図 3)。

また、過酸化水素を加えない実験区には溶媒である水を、MMS、シトラール、シトラールジメチルアセタール、シトロネラールを処理しない実験区には溶媒であるジメチルスルホキシド(DMSO)を同量加えた。

③ ②を適当な希釈率で完全培地とカナバニン含有最少培地に撒いた。

④ 30℃で3日培養した後、生えてきたコロニー数を数えて菌数を測定し、

遺伝子突然変異 =

$$\frac{\text{カナバニン含有宰相培地に成育したコロニー数}}{\text{完全培地に成育したコロニー数}}$$

として算出した。

完全培地には全ての出芽酵母が生育し、そのコロニー数から全菌数を算出できる。カナバニン含有最少培地にはカナバニン耐性を獲得するという変異が生じた出芽酵母が生育し、そのコロニー数から遺伝子突然変異が生じた菌数や染色体の構造変化が生じた菌数を算出できる。カナバニンとは酵母の生育に必須なアルギニンの類似物質であり、カナバニンの取り込みに関与する *CANI* 遺伝子が正常に機能する場合は誤ってカナバニンが取り込まれて出芽酵母の生育が阻害される。*CANI* 遺伝子に突然変異が起こって機能なくなるとカナバニン耐性を獲得し、そのような出芽酵母はカナバニン含有最少培地下でも生育が可能になる。出芽酵母のゲノムは約 1200 万塩基対、遺伝子は約 7000 存在するが、これら全ての領域での突然変異を検出することは大変な困難が伴う上、生存に必須な遺伝子が突然変異によって機能を失っている細胞は採取すること自体が不可能である。よって、*CANI* 遺伝子領域の突然変異頻度を測定することでゲノム全体での突然変異頻度もほぼ同じ傾向である推定できることから、今回は *CANI* 遺伝子領域のみにターゲットを絞って突然変異を検出することとした。

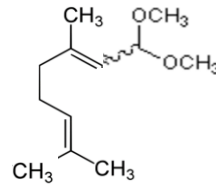


図1 シトラールジメチルアセタールの構造式

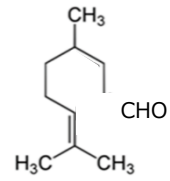


図2 シトロネラールの構造式



図3 培養の様子

### 3 結果

シトラールジメチルアセタール存在下では、シトラールを用いた場合(図4)と異なり、0.5mM 過酸化水素の添加によって上昇した遺伝子突然変異頻度は低下せず(図5A)、シトロネラール存在下でも同様であった(図5B)。

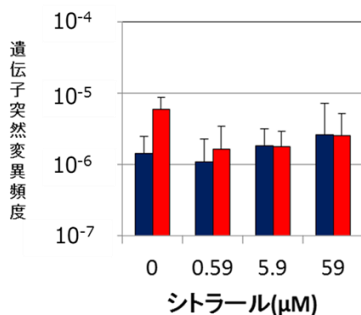


図4 遺伝子突然変異頻度

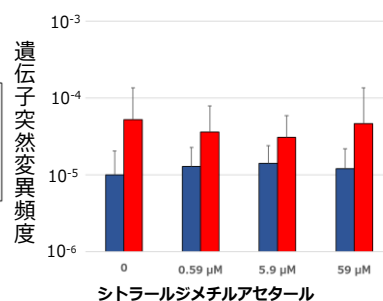
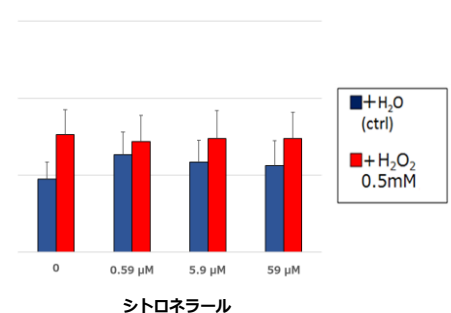


図5 遺伝子突然変異頻度

A : シトラールジメチルアセタール処理時



B : シトロネラール処理時

## 4 考察

シトラールジメチルアセタール、シトロネラールではいずれも遺伝子突然変異抑制効果は確認できなかったことにより、シトラールの持つ遺伝子突然変異抑制効果は還元性のあるアルデヒド基、それに隣接するやはり還元性のある C-C 間二重結合のどちらも必須であり、酸化還元反応によって DNA 酸化損傷が生じることを抑制している可能性が濃厚であることが示唆された。

これについて文献調査を行ったところ、C-C 間二重結合を持つだけでなく、それに隣接するようにアルデヒド基を持つ化合物では、通常のエポキシ化よりも高効率にエポキシ化物を生成する

ことがわかった(図 6)<sup>4)</sup>。シトラールはこれによって、アルデヒド基や C-C 間二重結合それぞれ単独だけでは実現できないようなより大きな還元性を示した可能性が示唆された。

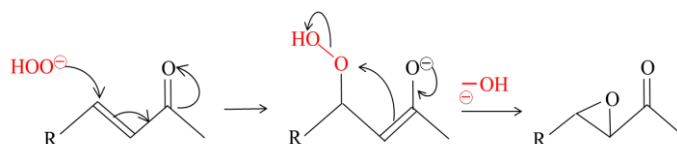


図 6 アルデヒド基と C-C 間二重結合が隣接する化合物におけるエポキシ化<sup>4)</sup>



図 7 カウントと考察の様子

## 5 まとめ

- ① シトラールは過酸化水素によって誘発される遺伝子突然変異を抑制する。
- ② その効果は DNA 修復を促進することによるのではなく、シトラールの持つアルデヒド基による抗酸化作用によるものであるが、アルデヒド基に隣接する C-C 間二重結合との相互作用によってその作用は高められている。
- ③ シトラールは自然 DNA 損傷による遺伝子突然変異にも関与せず、内因性の変異原に対しては効果が望めず、DNA 酸化損傷を完全に除去できるわけではない。
- ④ 染色体の不均衡分配などの分配異常による染色体喪失にも関与しない。という作用機序モデルが示唆された。このような作用機序、特に図 6 のような具体的な反応機構やどのような官能基が関わっているのかが明らかになった点は非常に有意義な成果であった。なぜなら、反応機構が不明であるものを食品に応用したり、情報として有用性を世間に広げていくことは説得力に欠けるので、不可能であるからである。

一方、メチルグリオキサール、カテキンでは、それ自身による抗酸化作用以外に、グルタチオン GSH などの抗酸化因子などを産生する「酸化ストレス応答」を誘導する活性も併せ持つことが報告されている。シトラールも同様の効果をもたらしている可能性も考えられるので、出芽酵母において酸化ストレス応答に中心的な役割を果たしている *YAPI* 遺伝子欠損株を作製し、これに対してシトラール処理をすることによって酸化ストレス応答の関与についてを解析し、シトラールのもたらす抗酸化作用の全容を解明し、食品への応用の基盤となる知見を揃えていくことを行いたい。

今回の研究で、抗酸化作用を強く示すようになる構造(アルデヒド基とそれに隣接する C-C 間二重結合)の存在が明らかになったので、今後はこれを鍵として、食品の香料として用いられている他の物質から、さらに同様な効果が見込める物質を効率よく探索していけると考えられる。今回の研究で、このようなスクリーニングを行う際の鍵となる構造を解明できたことも大きな成果である。

以上の研究成果は、次のような各種学会、発表会にて生徒が発表を行い、受賞した。

- ①平成 29 年度日本動物学会東北支部大会：優秀賞
- ②第 41 回全国高等学校総合文化祭 2017 みやぎ総文  
自然科学部門研究発表生物部門：奨励賞(全国 5 位に相当)  
<https://www.milive.jp/live/2017sobun/b111/> に掲載
- ③第 61 回 日本学生科学賞 秋田県審査会：秋田県知事賞、全国審査：進出
- ④第 52 回秋田県小・中・高等学校児童生徒理科研究発表大会：齋藤憲三・山崎貞一賞  
(第 42 回全国高等学校総合文化祭 2018 信州総文の生物部門の秋田県代表に決定)
- ⑤サイエンスキャッスル東北大会 2017 ポスター発表部門：研究奨励賞

⑥ジュニア農芸化学会 2018：発表

これらの学会発表の準備や発表や論文作成を通して、本研究に携わった生徒たちは、プレゼンテーション能力やコミュニケーション能力、科学的に正しく思考し、正しい形式に則って表現する能力を向上させた。上記の学会発表における数々の受賞はそれを証明していると言える。

また、本研究に携わった生徒に対するアンケート調査を行った結果(図9)、好奇心や科学や理科の実験に対する興味が全員が向上したと回答し、自主性や協調性、粘り強く取り組む姿勢、独創性、問題発見力、問題解決力は83%の生徒が、探求心や発想力、論理力、レポート作成やプレゼンテーション能力は全員が向上したと回答し、能力面でも生徒たちは自身の成長を実感できている。さらに、科学技術や理科数学に対する興味が高まり、学習意欲も向上し、自らの研究に対する理解も深まったと全員が回答し、本研究が研究成果を挙げただけでなく、日本の科学技術の未来を支える人材育成としても効果的に機能したことが示された(このアンケートの結果は日本生物教育学会第102回全国大会にて「科学部での探究活動を通じた人材育成，遠藤金吾」としてポスター発表を行った)。

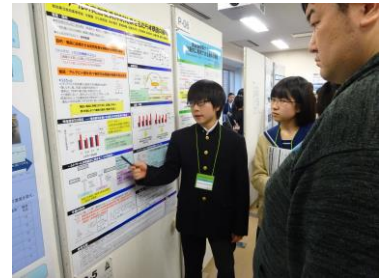
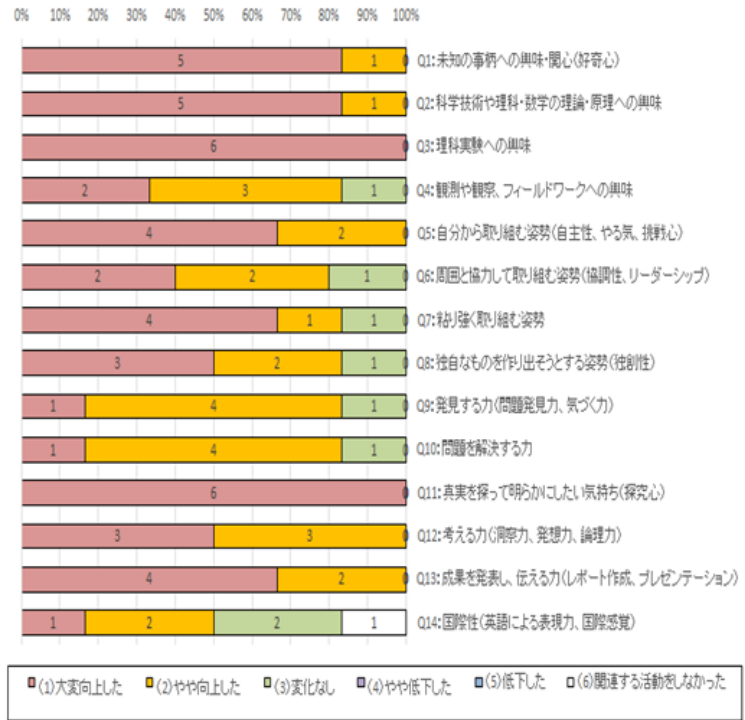


図8 生徒の学会発表の様子



謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご援助を賜りました公益

財団法人中谷医工計測技術振興財団と、研究に対してご助言を頂いた東北大学大学院生命科学研究科・日出間純准教授にこの場を借りて厚くお礼申し上げます。

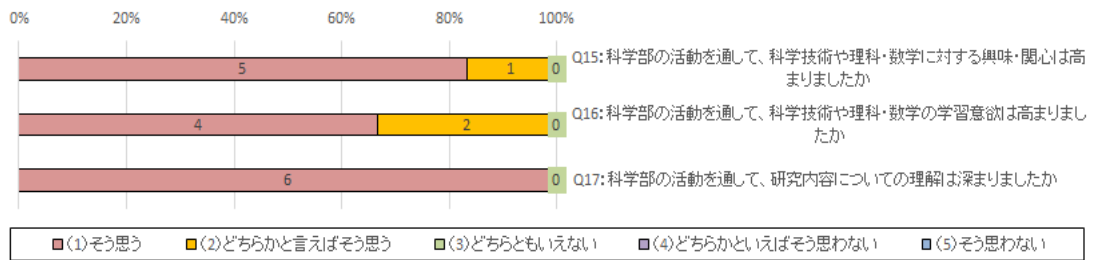


図9 生徒へのアンケート結果

参考文献

- 1) 国立がんセンターがん情報サービス「がん登録・統計」：2013年累積罹患リスクおよび2015年累積死亡リスクより
- 2) 秋田県健康環境センター保健衛生部：死亡統計からみた秋田県の疾病状況に関する報告書 3－2010年秋田県の年齢調整死亡率－
- 3) Wu S, Powers S, Zhu W, Hannun YA. :Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*. 2016;529(7584):43-7.
- 4) 小方芳郎, 田伏岩夫. 過酸化水素による有機物の酸化反応. *有機合成化学協会誌* 1960. Vol. 18No. 6 : 368-387.

以上