
環境変異原・がん原の生物防除

Studies on the prevention of environmental mutagens by biological means

代表研究者	国立遺伝学研究所変異遺伝部長	賀田恒夫	
	Head, Dept. of Induced Mutation, National Inst. of Genetics	Tsuneo KADA	
協同研究者	東京大学農学部教授	菱田泰治	
	Prof. Dept. of Agricultural Chem., The Univ. of Tokyo	Yasuji MINODA	
	国立がんセンター研究所室長	長尾美奈子	
	Chief of Laboratory, National Cancer Centre Res. Inst.	Minako NAGAO	
	京都工芸繊維大学教授	林屋慶三	
	Prof. Kyoto Univ. of Industrial Arts and Textile Fibers	Keizo HAYASHIYA	

In order to invent biological means of prevention of environmental mutagens, trials were made to identify important mutagens which are closely related to our foods and to find desmutagens working on them. It was found that heating and pyrolysis of amino acids or proteins yielded several potent mutagens such as Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1 and IQ. These mutagenic activities were destroyed by treatment, at pH 3.0, with nitrous acid of physiological concentrations as well as with extracts of a number of vegetables, such as cabbage, broccoli, burdock, etc. Peroxidases were identified as one of desmutagenic principles involved in vegetables. Screenings of desmutagens acting on sterigmatocystin and mitomycin C were also done. It was found that a number of *Pseudomonas* species produced desmutagenic factors.

Another type of agents reducing induced mutabilities in microbial systems consisted of factors working as antagonists in cellular mutagenesis *in vivo*. We identified a number of natural antimutagens including mammalian placental factors as well as green tea (*camellia*) factors.

As a model of biological mutagen-suppressing mechanisms *in vivo*, silkworms were studied, since they used to eat mutagenic flavonoids of mulberry without own considerable induced-mutabilities. We found that some of flavonoids were transformed into inactive forms in cocoon.

研究目的

微生物などを用いる変異原検出手法の発達によって、我々の生存する環境の中に多種多様な変異原物質が存在することが明らかとなった。また、多くの発がん物質が、突然変異活性を有することが示され、簡易な変異原検出法によって、発がん活性の消長を追求することが可能になった。人工的に合成・利用する化学物質は人為的なコントロールのもとにあるが、天然由来の変異原・がん原を排除することはきわめて困難であ

る。

我々は、環境中の変異原・がん原を積極的に不活化・防除することは、ヒトに対する遺伝毒性や癌の生成を予防するのに役立つと考えた。そこで食品などに含まれる変異原・がん原を検出するとともに、これをやはり、天然由来の因子によって不活化することを試みた。とくに食品の中に生成するタンパク質・アミノ酸加熱分解物マイコトキシンやフラボン類の失活に関して知見を得るため、以下の研究を行なった。

研究経過と結果

〔1〕長尾らは、従来種々のアミノ酸加熱分解物、とくに Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1 などを分離精製し、化学構造を決定するとともに、その変異原性・がん原性に関して解析をすすめてきた。さらに実際の食生活に即して丸干いわしを焼き、そのメタノール抽出物から、サルモネラ菌に対して強い変異原性を示す物質を分離・精製したところ、2-Amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline であることを明らかにした。この物質を IQ と略称し、加熱した牛肉スープの中にも存在していることを確かめた。また、IQ を 5-6-Diamino-quinoline を素材料として合成し、天然のものと同じの生物活性を有することを示した。さらに 3-Amino- γ -carbolino 化合物の化学構造と生物活性との相関を約 10 種の化合物に関して検索した。

これらの加熱生成変異原は、pH 3 の酸性条件下で生理的濃度の亜硝酸によって分解・不活化されることが示された。これら Heterocyclic aromatic amine 類の-NH₂ 基が-OH に置換される。また、2-Amino- α -carbolino は不活性な脱アミノ化合物がさらにニトロソ化されて、変異原活性を有する物質に変換された。一方、焼肉、焼魚、トーストなどに含まれるノルハルマンは、単独では変異原性を示さないアニン、*O*-トルイジン、イェロ-OB などの芳香族アミン発癌性化合物と共存させると、肝代謝活性因子 S9 mix のもとに変異原性が陽性になる。ノルハルマンのような助変異原因子は環境変異原・がん原の防除を考える際に考慮すべき重要点と思われる。

〔2〕賀田らは、ヒトの生活と密接な関係のある食品などに含まれる Desmutagens (変異原不活化因子) についての研究を行なった。トリプトファン加熱生成物である Trp-P-1 あるいは Trp-P-2 を標品として用い、これと混合・反応させることにより、その DNA 傷害性・突然変異誘発性を失わせる活性が、キャベツ、ゴボウ、エノキダケ、トウモロコシなどに有することを見いだした。キャベツからは一種のヘモタンパク質を分離・精製しその Peroxidase 活性が Trp-P 不活

化の原因であることを見いだした。長尾らは、種々な Peroxidase の作用を調べたところ、牛乳中の Lactoperoxidase、西洋ワサビ中の Horseradish peroxidase、ヒトの Myeloperoxidase が同様に働くこと、2-Amino- α -carbolino の失活についても有効であることを示した。さらに賀田らは、ゴボウに含まれる分子量 30 万を主体とする複合タンパク質について精製をすすめ、その化学的性質を調べた結果、アニオン性を具備した高分子であることが判明した。

数年前より研究を続けてきた食品添加物ソルビン酸と亜硝酸との反応で生じる変異原に関して、カボチャ、サヤエンドウ、ヤマイモ、グリーンピースなどが不活化的に働くこと、もっとも強力な変異原生成物 (Y) は、ビタミン C によって還元的不活化されることが示された。

一方、賀田らは、変異原の作用を既に受けた細胞に働いて、突然変異誘発の頻度を著しく低下させる因子 (antimutagens) が動植物体中に種々含まれることを見いだした。その例として、椿科 (緑茶・紅茶)、しいたけなどの抽出物がある。また、ヒト、サル、イヌ、ブタ、ウシ、ラットなどの胎盤組織の抽出物が見いだされた。このものの Antimutagen 活性の一部として 2 価コバルトが検出され、SOS DNA 修復のエラーを抑制することとして作用機構が説明された。

〔3〕藪田らは、環境変異原を植物あるいは微生物培養物中の成分で不活化するための検索を行なった。方法としては枯草菌胞子を用いた rec-assay 法により、カビ毒のステリグマトシスチン、放線菌由来のマイトマイシン C の変異原性の消失を目安とした。種々の食用植物を Mura-shige-Skoog 基本培地を用いてカルス化し、そのカルス抽出液に不活化活性を検索したが有効な植物は得られなかった。Pseudomonas に属する二、三の菌体抽出物がステリグマトシスチンに対して有効であることを見いだしたが、著効のものは得られなかった。また、多数の微生物由来の試料がマイトマイシン C を強く不活化することを見いだした。マイトマイシン C は元来、放線菌由来の制癌剤であるが、場合によってはその毒性が

化学療法における効果を制限している。そこでマイトマイシンCを不活化する最大の活性を有する菌株を選出し、不活化因子の性状を調べた。そして *Pseudomonas*, *Bacillus* など、4 株を得たが、いずれも活性因子はタンパク質であり、cofactor, 金属イオンなどの低分子もその活性発現に関与していると考えられた。*Pseudomonas* 属の I 株について、その活性因子の精製をすすめている。

[4] 林屋らは次のことを明らかにした。カイコは変異原性フラボノイドを含む桑を常食しているが、特に変異性が高いわけではない。そこで、カイコがなんらかの変異原不活性化機構をもっているのではないかと考え、桑抽出液、桑関連フラボノイド類、カイコ緑菌種大造の菌フラボノイド抽出物およびそれらの加水分解物について、サルモネラ菌類を用いて変異原性を調べた。その結果、ケルセチン、ケンフェロールなどの桑葉フラボノイドのアグリコンおよび菌色素加水分解物は、TA 98, TA 100 株に対して強い変異原性を示すが、緑菌フラボノイド抽出物は非変異原性であることを認めた。このことから、カイコ体内での変異原性フラボノイドの非変異原性フラボノイドへの転換の機構の究明が、生体による変異原の解毒、不活化の機構の研究モデルとして利用できることがわかった。今までの研究結果から配糖体化による変異原不活性化機構が存在することが示唆された。

結論と考察

本研究では、天然性の変異原・がん原を防除する方法として、同じく天然由来の不活化因子の探索の試みを行ない、三、四の例を見だし、その作用の解析を通じてこのようなアプローチの有効性を確認した。

本研究の結果、浮き彫りにされた多くの未解決の諸点については、今後さらに研究を続けることにより環境変異原の毒性の防除を通じて、ヒトの健康の増進に役立つと考えられた。

発表論文

- 1) Fujino, T., A. Matsuyama, M. Nagao and T. Sugimura: Inhibition by norharman of metabolism of benzo [a] pyrene by the microsomal

mixed function oxidase of rat liver. *Chem. Biol. Interactions*, 32, 1-12 (1980).

- 2) Hirano, K., T. Hagiwara, Y. Ohta, H. Matsumoto and T. Kada: rec-assay with spores of *Bacillus subtilis* with and without metabolic activation. *Mutation Res.* (1982) (in press).
- 3) Inoue, T., K. Morita and T. Kada: Purification and properties of desmutagenic factor from plant for mutagenic principle of tryptophan pyrrolisate. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 345-353 (1981).
- 4) Inoue, T., Y. Ohta, Y. Sadaie and T. Kada: Effect of cobaltous chloride on spontaneous mutation induction in a *Bacillus subtilis* mutator strain. *Mutation Res.*, 91, 41-45 (1981).
- 5) Kada, T.: Mutagenicity of selected chemicals in rec-assay in *Bacillus subtilis*. "Comparative Chemical Mutagenesis" (Ed. F. J. de Serres), Plenum Press, New York (in press).
- 6) Kada, T.: The DNA-damaging activity of 42 coded compounds in the rec-assay. "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" (Eds. F. J. de Serres and J. Ashby), Progress in Mutation Res., Vol. 1, Elsevier North-Holland, Inc., pp. 175-182.
- 7) Kada, T., K. Hirano and Y. Shirasu: Screening of environmental mutagens by the rec-assay system with *Bacillus subtilis*. "Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Direction" (Ed. A. Hollaender and F. J. de Serres), Plenum Press, New York (in press).
- 8) Kada, T., T. Inoue and M. Namiki: Environmental desmutagens and antimutagens. "Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology" (Ed. E. Klekowsky) (in press).
- 9) Kada, T., T. Inoue, A. Yokoizuma and L. B. Russell: Combined genetic effects of chemicals and radiation. *Rad. Res.*, Proc. 6th ICRR (Ed. S. Okada *et al.*) pp. 711-720.
- 10) Kanematsu, N., M. Hara and T. Kada: Rec-assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutation Res.*, 17, 109-115 (1980).
- 11) Kasai, H., S. Nishimura, K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura: Chemical synthesis of 2-amino-3-methylimidazo (4,5-f) quinoline (Q), a potent mutagen isolated from broiled fish. *Proc. Japan Acad.*, 56, 382-384 (1980).
- 12) Mochizuki, H. and T. Kada: Antimutagenic action of mammalian placental extracts on mutations induced in *Escherichia coli* by UV radiation, γ -rays and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Mutation Res.* (in press).
- 13) Mochizuki, H. and T. Kada: Antimutagenic action of cobaltous chloride on Trp-*P*-1-induced mutations in *Salmonella typhimurium* TA

- 98 and TA1538. *Mutation Res.* (in press).
- 14) Nagao, M., Y. Takahashi, H. Yamanaka and T. Sugimura: Mutagens in coffee and tea. *Mutation Res.*, 68, 101-106 (1979).
 - 15) Nagao, M., Y. Takahashi, K. Wakabayashi and T. Sugimura: Mutagenicity of alcoholic beverages. *Mutation Res.*, 88, 147-154 (1981).
 - 16) Nagao, M., Y. Takahashi, T. Yahagi, T. Sugimura, K. Takeda, K. Shudo and T. Okamoto: Mutagenicities of γ -carboline derivatives related to potent mutagens found in tryptophan pyrolysates. *Carcinogenesis*, 1, 451-454 (1980).
 - 17) Namiki, M., S. Udaka, T. Osawa, K. Tsuji and T. Kada: Formation of mutagens by sorbic acid-nitrite reaction; Effects of reaction conditions on biological activities. *Mutation Res.*, 73, 21-28 (1980).
 - 18) Osawa, T., H. Ishibashi, M. Namiki and T. Kada: Desmutagenic actions of ascorbic acid and cysteine on a new pyrrole mutagen formed by the reaction between food additives: sorbic acid and sodium nitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 835-841 (1980).
 - 19) Sugimura, T., M. Nagao: Mutagenic factors in cooked foods. CRC Critical reviews in Toxicology, pp. 189-209 (1979).
 - 20) Takahashi, Y., M. Nagao, T. Sugimura, E. Todo and I. Murata: Mutagenicities of new non-alternant isomers of benzo [α] pyrene. *Mutation Res.*, 78, 295-299 (1980).
 - 21) Takahashi, Y., M. Nagao, T. Fujino, Z. Yamaizumi and T. Sugimura: Mutagens in Japanese pickle identified as flavonoids. *Mutation Res.*, 68, 117-123 (1979).
 - 22) Takeda, K., K. Shudo, T. Okamoto, M. Nagao, K. Wakabayashi and T. Sugimura: Effect of methyl substitution on mutagenicity of 2-amino-dipyrido [1, 2-a:3', 2'-d] imidazole, Glu-P-2. *Carcinogenesis*, 1, 889-892 (1980).
 - 23) Tsuda, M., Y. Takahashi, M. Nagao, T. Hirayama and T. Sugimura: Inactivation of mutagens from pyrolysates of tryptophan and glutamic acid by nitrite in acidic solution. *Mutation Res.*, 78, 331-339 (1980).
 - 24) Wakabayashi, K., M. Nagao, T. Kawachi and T. Sugimura: Co-mutagenic effect of norharman with *N*-nitrosamine derivatives. *Mutation Res.*, 80, 1-7 (1981).
 - 25) Yamanaka, H., M. Nagao and T. Sugimura: Mutagenicity of pyrrolizidine alkaloids in the Salmonella/Mammalian-microsome test. *Mutation Res.*, 68, 211-216 (1979).
 - 26) Yamada, M., M. Tsuda, M. Nagao, M. Mori and T. Sugimura: Degradation of mutagens from pyrolysates of tryptophan, glutamic acid and globulin by myeloperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90, 766-776 (1979).