

トリプトファン燃焼物Trp-P-2に対するフラボノイドの 脱変異原性の検討

住田 導彦・高山美佐子*

Michihiko SUMIDA, Misako TAKAYAMA

Desmutagenicity of L-tryptophan-pyrolyzed substance, Trp-P-2 by flavonoids

ガンの発生頻度と発生部位は環境条件に支配され、その主要因は外部から摂取される化学物質すなわち食生活そのものであり、ヒトのガンの35%が食生活に起因するといわれている¹⁾。これら発ガン物質としてはアミノ酸やタンパク質の加熱分解物、かび毒であるアフラトキシン、亜硝酸塩とアミノ酸類から生成されるN-ニトロサミン類、南国で食用とされるソテツの実に含まれるサイカシン等があげられる。それらの発ガン物質を検索するには一般に長い期間と、高額な経費が必要である。しかしながら、松島ら²⁾は発ガン物質の多くには突然変異誘導作用があることを報告しており、細菌に対する突然変異性を証明するAmes testでは発ガン物質の90%以上に変異原性があることがわかっている^{3~5)}。Sugimura⁶⁾、Nagao and Sugimura⁷⁾はアミノ酸やタンパク質の焦げにはTrp-P-1、Trp-P-2、Glu-P-1、Glu-P-2、IQ、MeIQ等の10種類のheterocyclic amine系の変異原性が存在することを明らかにしたため、食品の安全性の観点にたつて関心もたれてきた。一方、各種の天然物、特に植物成分には抑制物質が含まれているといわれている。そこで我々は焦げの生成物質の一つである変異原性物質3-amino-1-methyl-5-H-prido[4,3-b]indol(Trp-P-2)に対する数種類のフラボノイドによる脱変異原性の有無について検討した。

材料と方法

変異原性物質としてTrp-P-2 (acetate)は 1×10^{-4} ~ 1×10^{-32} mol/lに希釈し、脱変異原性物質としてのFlavone(2-phenylchromone)、Quercetin(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)、Myricetin(3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavone)は各々 1×10^{-2}

~ 1×10^{-8} mol/lに調整した。脱変異原性物質を添加しない対照としてはdimethyl sulfoxide (DMSO)を使用した。実験システムとしてはAmesらの方法によるプレインキュベーション法により行った^{8,9)}。菌株は塩基対置換型変異株の*Salmonella typhimurium* TA100 (Sal. TA100)を使用した。実験法の概略としてはTrp-P-2 0.1mlに対して、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)とフラボノイド0.1mlを混合し、ニュートリエントブロスで37°C、12時間振盪培養した被検菌液0.1mlを添加し、振盪温浴中で37°C、20分間プレインキュベート処理をした。この一連の処理後トッブアガー2mlを加えて混合してから、最小グルコース寒天平板上に重層し、37°C、48時間培養後、平板上に生じたヒスチジン非要求復帰変異株(His⁺ revertants)のコロニー数を計測した。

結 果

Fig. 1にフラボンによるTrp-P-2の脱変異原性を示した。すなわちAmes testによると、対照としてTrp-P-2をDMSOに溶解し、Sal. TA100に作用させると、濃度の上昇に比例してHis⁺ revertant colony数の増加が見られ、Trp-P-2は明らかに強力な変異原性物質であることが示された。これに対して各種濃度のフラボンを添加すると、濃度の上昇に従って、Trp-P-2の復帰変異活性の減少が観察され、 1×10^{-2} mol/lにおいては2,000~3,000分の1まで完全に脱変異された。Fig. 2はクエルセチンによるTrp-P-2の脱変異原性を示したものである。これをフラボンと比較すると濃度に依存した脱変異原性が観察されるのは同様であり、その活性は弱いことが判明した。Fig. 3はミリセチンによるTrp-P-2の脱変異原性を示したものであるが、実験範

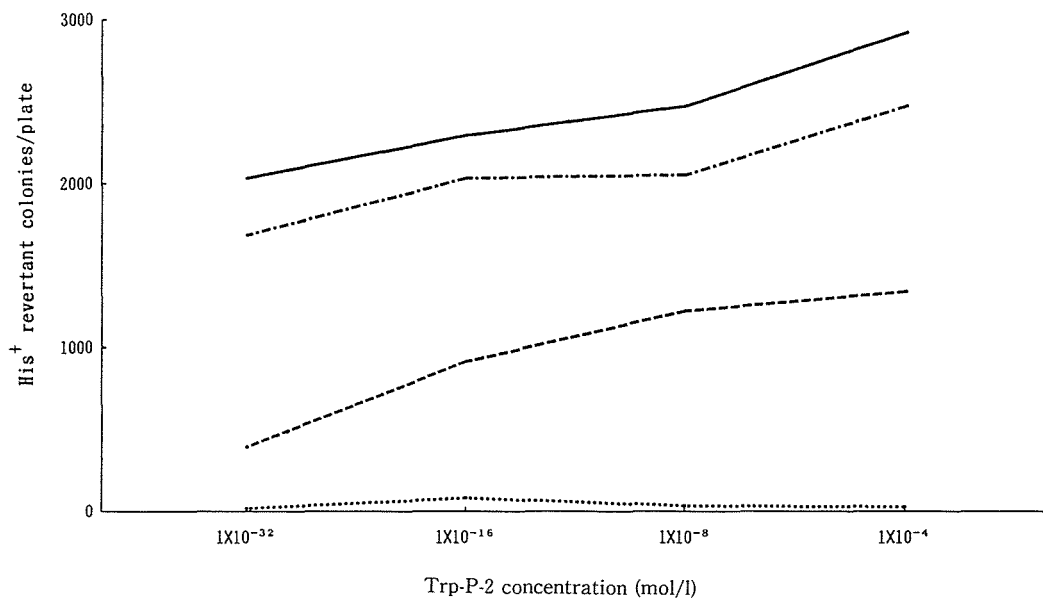


Fig. 1. Desmutagenicity of Trp-P-2 by flavone, — none, - - - - 1×10^{-8} mol/l flavone, - · - · 1×10^{-4} mol/l, ····· 1×10^{-2} mol/l.

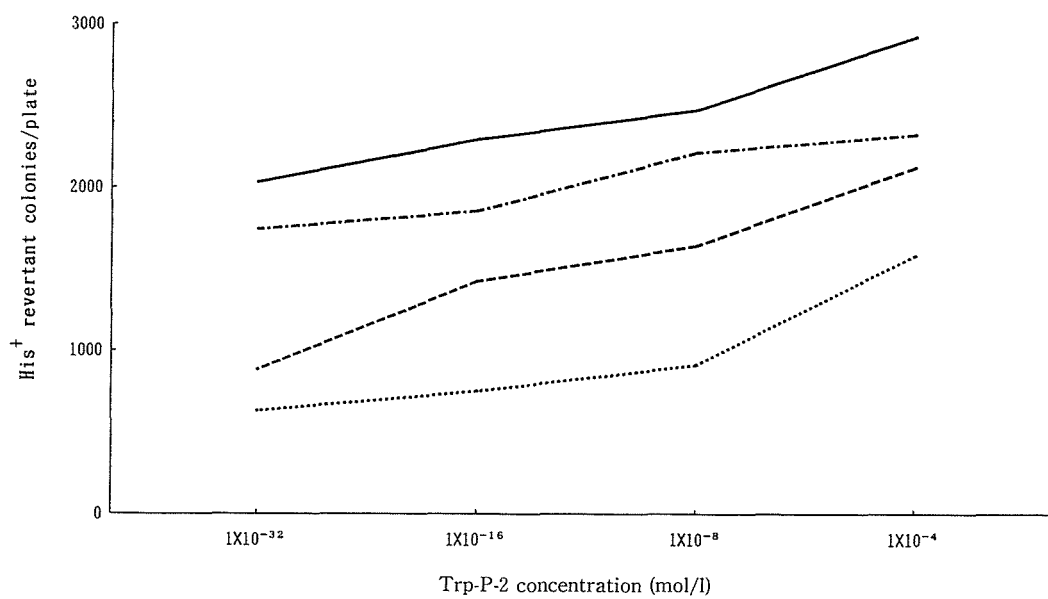


Fig. 2. Desmutagenicity of Trp-P-2 by quercetin, — none, - - - - 1×10^{-8} mol/l quercetin, - · - · 1×10^{-4} mol/l, ····· 1×10^{-2} mol/l.

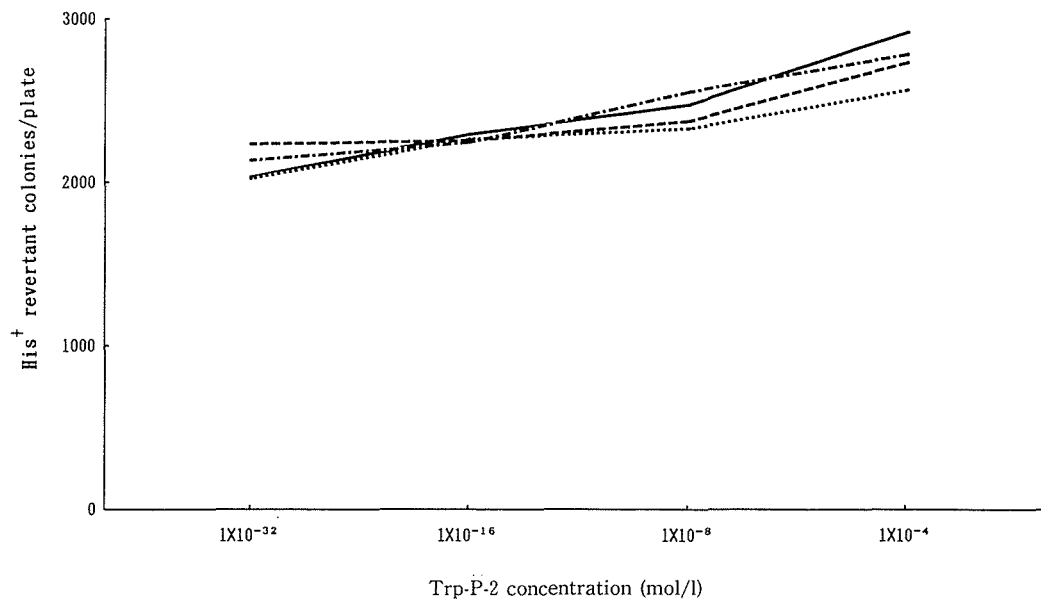


Fig. 3. Desmutagenicity of Trp-P-2 by myricetin, — none, - - - - 1×10⁻⁸ mol/l. myricetin, - · - · 1×10⁻⁴ mol/l, ····· 1×10⁻² mol/l.

囲内の各濃度においてまったく脱変異作用を見ることができなかった。

考 察

我々が常時摂取している食品の中には、アミノ酸やタンパク質の燃焼生成物にとくに高い変異原性を示すものがある。なかでもL-トリプトファン¹⁰⁾の500~700°Cにおける燃焼分解物は高い活性を示し、その活性分画はTrp-P-1、Trp-P-2として分離精製されている¹⁰⁾。このほかにもL-リジン、L-グルタミン酸、L-オルニチンの燃焼物^{11~13)}が変異原性物質として証明されている。そこで、我々は魚肉類のアミノ酸・タンパク質燃焼分解物であり、発がんイニシエーター活性のあるとされるTrp-P-2の変異原性に対して、フラボノイドの抑制作用をOH基数の異なるフラボン、クエルセチン、ミリセチンについて検討した。Trp-P-2は濃度依存的な変異原性を示したが、フラボンは1×10⁻⁸mol/lの低濃度では対象と同じ様式のTrp-P-2の濃度依存的な変異活性をわずかに抑制し、漸次移行しながら1×10⁻²mol/lの高濃度に至って完全な活性抑制作用が認められた。したがって、フラボンの脱変異原性は抑制反応であると考えられる。クエルセチンについてもフラボンと同じ様式の脱変異原作用を示したが、その効果は

弱いと判定できる。Kanazawa¹⁴⁾は変異原性抑制成分として広い範囲の植物に存在するフラボノイドがあり、最も強い抑制成分はガランギン、クエルセチンであったと報告し、Arimoto¹⁵⁾はカテキン類は活性がないか、あるいはフラボノイドよりもかなり活性の低値なことを、さらにクロロフィルにも変異原性抑制活性の有することを報告している。しかし、Samejima¹⁶⁾はクロロフィルの活性はフラボノイドより百倍以上低値であることを示している。賀田¹⁷⁾はブロッコリー、カリフラワー、キャベツ等の野菜抽出物によるアミノ酸燃焼物の変異原性失活力の大きさについて報告している。このようにフラボノイドは他の植物成分と比較すると変異原活性抑制作用は強いといえる。ちなみに、ほとんどの植物に変異原活性抑制作用が認められるのは、植物中のフラボノイドの直接作用によるものと考えられる。しかしながら、ミリセチンには実験濃度において変異原活性抑制作用が認められなかった。したがって、フラボノイドの種類により抑制作用がかなり異なるものと考えられる。これらの脱変異原活性の強さの違いはフラボノイドの分子構造の違いにあるものと思われるが、フラバノンとフラバノールにみられるC²-C³間の二重結合の飽和の異なりに起因するものか、OH基の置換数に起因するものか今後検討が必要である。フラボノイドの脱変異原性の作用機序として考えられるも

のはいくつかあり、Kada and Shimoi¹⁸⁾の示すように、フラボノイドはTrp-P-2によるDNA損傷を修復するのか、DNA損傷以前にTrp-P-2を吸着することにより不活化するのか、あるいはP450酵素による変異原活性化を阻害するのか、今後検討が必要であると考えられる。

要 約

Salmonella typhimurium TA100に対して、既知の変異原性物質であるトリプトファン燃焼物Trp-P-2と脱変異原性物質としてフラボノイドを同時にプレインクベーションし、Ames法によって、フラボノイドのTrp-P-2による変異原性の抑制効果を検討した。

フラボン系はTrp-P-2に対して強い濃度依存性抑制反応を示し、 1×10^{-2} mol/lで完全に脱変異原性を示した。ケルセチンは弱い濃度依存性抑制反応を示した。ミリセチンはまったく脱変異原性を示さなかった。

文 献

- 1) 石館守三、生活環境と発癌、pp 1-2、朝倉書店、東京、1979。
- 2) 松島泰次郎、杉村隆、東京医学、28、245-253、1974。
- 3) Ames BN, Durston WE, Yamasaki E and Lee FD, Proc Nat Acad Sci USA, 70, 2281-2285, 1973。
- 4) Ames BN, McCann J and Yamasaki E, Mutation Res, 31, 347-364, 1975。
- 5) Maron DM and Ames BN, Mutation Res, 113, 173-215, 1983。
- 6) Sugimura T, Mutation Res, 150, 33-41, 1985。
- 7) Nagao M and Sugimura T, Mutation Res, 290, 43-51, 1993。
- 8) 矢作多貴江、蛋白質核酸酵素、20、1178-1189、1975。
- 9) 労働省安全衛生部化学物質調査課、新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック、pp 20-29、53-74、中央労働衛生協会、東京。
- 10) Sugimura T, Kawachi T, Nagao M, Yahagi M, Seino Y, Okamoto T, Shudo K, Kosuge T, Tuji K, Wakabayashi K, Iitaka Y and Itai A, Proc Jpn Acad, 53, 58-61, 1977。
- 11) Wakabayashi K, Tsuji K, Kosuge T, Takeda K, Yamaguchi K, Shudo K, Iitaka Y, Okamoto T, Yahagi T, Nagao M and Sugimura T, Proc Jpn Acad, 54, 596-571, 1978。
- 12) Yamamoto T, Tsuji K, Kosuge T, Okamoto T, Shudo K, Takeda K, Iitaka T, Yamaguchi K, Seino Y, Yahagi T, Nagao M and Sugimura T, Proc Jpn Acad, 54B, 248-250, 1978。
- 13) Yokota M, Narita K, Kosuge T, Wakabayashi K, Nagao M, Sugimura T, Yamaguchi K, Shudo K, Iitaka Y and Okamoto T, Chem Pharm Bull, 29, 1473-1475, 1981。
- 14) Kanazawa K, Kawasaki H, Samejima H, Ashida H and Danno G, J Agric Food Chem, 43, 410-414, 1995。
- 15) Arimoto S, Fukuoka S, Itome C, Nakano H, Rai H and Hayatsu H, Mutation Res, 287, 293-305, 1993。
- 16) Samejima K, Kanazawa K, Ashida H and Danno G, J Agric Food Chem, 43, 410-414, 1995。
- 17) 賀田恒夫、遺伝、34、49-54、1980。
- 18) Kada T and Shimoi K, BioEssays, 7, 113-116, 1987。

(受付 1. 3. 1996)

Summary

We investigated whether some flavonoids eliminate mutagenic action of Trp-P-2, being one of L-tryptophan-pyrolyzed substances. According to the Ames test with *Salmonella typhimurium* TA100, flavone revealed complete desmutagenic activity against the Trp-P-2 treated organisms at the concentration of 1×10^{-2} mol/l, quercetin weak but gradual as increasing its concentration, and miristin not at all.