原　著

出芽酵母における過酸化脂質分解物から誘発される遺伝子突然変異に関する研究

The major lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal induces mutations in *Saccharomyces cerevisiae.*

和田真実　清水雅富　細田明美　ピーター・グルーズ　碓井之雄

Mami WADA,　Masatomi SHIMIZU,　Akemi HOSODA,　Petr GRÚZ,　Yukio USUI

東京医療保健大学
TOKYO HEALTHCARE UNIVERSITY

〈原著論文〉

出芽酵母における過酸化脂質分解物から誘発される遺伝子突然変異に関する研究

The major lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal induces mutations in *Saccharomyces cerevisiae*.

和田真実[1]　清水雅富[1]　細田明美[1]　ピーター・グルーズ[2]　碓井之雄[1]

[1]東京医療保健大学 医療保健学部 医療栄養学科
[2]国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 第二室

Mami WADA[1], Masatomi SHIMIZU[1], Akemi HOSODA[1], Petr GRÚZ[2], Yukio USUI[1]

Division of Medical Nutrition, Tokyo Healthcare University, Tokyo, Japan[1]
Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan[2]

要　　旨：不飽和脂肪酸から誘導される過酸化脂質は、細胞内のDNAに直接作用し、DNA損傷を生じることが報告されている。そこで本研究では、出芽酵母の*S. cerevisiae* 7B株を用いて、n-6系不飽和脂肪酸から誘導される過酸化脂質分解物である4-HNE、4-ONEが、遺伝子突然変異誘発能を有するかスクリーニング試験を行った。その結果、4-HNEにおいて、カナバニン耐性を指標とした遺伝毒性試験では濃度依存的に突然変異頻度が増加し、0.0075 mg/mL処理において約31.8倍増加した。また4-HNEにおける、7B株中の*CAN1*遺伝子座で生じる突然変異のシークエンス解析の結果、G：C→T：Aへのトランスバージョン型変異が44%と最も多かった。
しかし、4-ONEにおいては、遺伝子突然変異の誘発は見られなかった。これらの結果から、7B株において4-HNEは、突然変異誘発物質であることが示唆された。

キーワード：過酸化脂質、4-ヒドロキシ2-ノネナール、4-オキソ2-ノネナール、DNA損傷、突然変異

Keywords：lipid peroxide (LPO), 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), 4-oxo-2-nonenal (4-ONE), DNA damage, mutation

受付：2012年3月30日　　受理：2012年9月20日

はじめに

現在、我が国の平均寿命は男性79.64歳、女性86.39歳[1)]であり、世界でも有数の“長寿国”として知られている。また、65歳以上の高齢者人口は現在すでに20%を超えており、2030年には30%、すなわち国民の3人に1人が高齢者という、世界のどの国も経験していない高齢化社会を迎えることが予想されている[2)]。加齢自体は誰しも避けられないことではあるが、加齢に伴う老化症状の遅延や、老化に関連した疾病の予防に効果的な対策は必要である。いつ、どのような要因が老化やそれに関連する疾病、生活習慣病を誘導しているかを同定できれば、効果的な予防法の開発につながると期待される。

老化や生活習慣病、日本人の三大死因（悪性新生物、心疾患、脳血管疾患）は、遺伝的素因と環境要因（食事、運動、ストレス）によってもたらされると考えられている。そのリスクファクターの1つとして取り上げられるのが、食品中の脂質である。脂質はヒトにとってエネルギー産生の主要な基質であるとともに、細胞膜の主要な構成成分、あるいは生理活性物質としても利用される重要な栄養素の1つである。脂質の供給は食事に起因しており、脂質の過剰摂取は、生活習慣病をはじめとする多くの疾病を誘導する代名詞とされている。しかし、脂質の摂取量が少な過ぎても多過ぎても健康に悪影響を及ぼす可能性があり、近年の日本人40～69歳男女を対象にしたコホート研究の結果では、飽和脂肪酸の摂取量が少ない場合、脳出血罹患率の増加が認められている[3)]。

我々が日常の食事から摂取する脂質の大半は脂肪酸である。脂肪酸は大きく分けて飽和脂肪酸（SFA）、一価不飽和脂肪酸（MUFA）、多価不飽和脂肪酸

（PUFA：n-6系、n-3系）に分類される。脂肪酸の中でもPUFAは酸化されやすく、特に生体内で生じる活性酸素（Reactive oxygen species：ROS）により酸化され、過酸化脂質を生じる。さらに、代謝、還元、分解などの過程において、DNAに付加しやすい生成物質であるアクロレイン（acrolein）、マロンジアルデヒド（MDA）、4-ヒドロキシ2-ノネナール（4-hydroxy-2-nonenal：4-HNE）、4-オキソ2-ノネナール（4-oxo-2-nonenal：4-ONE）などが生成される。これらは、DNAと反応することでDNA損傷を引き起こし、突然変異や老化、悪性新生物のイニシエーションを誘発する可能性があることが報告されている[4)]。脂肪酸の種類の違いから、代謝や生成される多種類の過酸化脂質が生体にどのような影響を及ぼしているか明確になれば、脂質摂取における新しい選択肢が広がり栄養学的にも新しい知見になると考えられる。

そこで本研究では、出芽酵母の*Saccharomyces cerevisiae*（*S. cerevisiae*）をテスター用に改良した株である*S. cerevisiae* 7B株を用いて、脂質から誘導される過酸化脂質分解物である4-HNEと4-ONEからの、遺伝子突然変異誘発能のスクリーニングを行うことを目的とした。

方　法

1.　過酸化脂質分解物

本研究で使用した過酸化脂質分解物である4-hydroxy-2-nonenal（4-HNE）はCALBIOCHEM社から、4-oxo-2-nonenal（4-ONE）はCayman Chemical社から購入した（Fig. 1）。

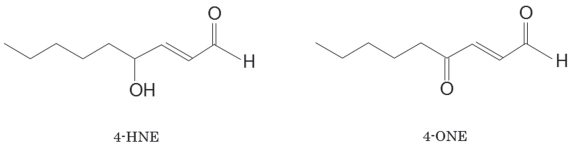

Fig.1　Chemical structures of 4-HNE and 4-ONE.

2.　試験菌株

試験菌株として本研究では、出芽酵母の*S. cerevisiae* 7B株（*MATa　CAN1 his7-2 leu2-3,112 ura3-Δ　trp1-289 ade2-1 lys2-B12*）を用いた。本試験菌株を用いてカナバニン耐性を指標にすることで、*CAN1*遺伝子座で起こる塩基置換、フレームシフト、欠失などの突然変異を検出することができる。

3.　試験用培地

試験菌株の培養にはYPD溶液（1% yeast extract, 1% Bacto peptone, 2% dextrose）を用い、生存率検出用の培地として、YPD溶液にAgarを20 g/L加えて作成したYPD培地を用いた。

突然変異検出用培地として、下記の栄養源にカナバニンを含む寒天平板培地を用いた。栄養源は、0.67% yeast nitrogen w/o amino acid；2% dextrose；0.04 mg/L L-arginine；1 mg/L L-aspartic acid；10 mg/L adenine；20 mg/L L-histidine, L-methionine, L-isoleucine, urasil；50 mg/L L-threonine, L-luecine, L-lysine, L-phenylalanine, L-tryptophanを用い、そこにAgar 20 g/L及び60 mg/L L-canavanineを加えて使用した。

全ての実験における水は、超純水製造器（Gradient A10 Milli-Q®）で作成した超純水を用いた。

4.　遺伝毒性試験

試験菌株の前培養は、YPD培地に培養しておいた単一コロニーを10 mLのYPD溶液に加え、28℃、150 rpm前後で48時間振とう培養した後、保存菌株70μLを10 mLのYPD溶液に植菌し、28℃、150 rpm前後で4時間振とう培養した。

本試験では、10 mLのYPD溶液が入った三角フラスコに、4-HNE処理として0.0005、0.001、0.0025、0.005、0.0075、0.01、0.025、0.05 mg/mL、4-ONE処理として0.001、0.025、0.05 mg/mLの濃度になるように加えた後、前培養した試験菌株の培養液を0.1 mLずつ加え、28℃、150 rpm前後で24時間振とう培養した。また、コントロールとして、過酸化脂質分解物の溶媒であるエタノールを用いて同様の実験を行った。培養後、培養液をγ線滅菌済み遠心チューブに移し、4℃、1000×gで10分間遠心分離にて菌体を回収した後、150 mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）を5 mL加え懸濁した。懸濁液をカナバニン含有突然変異検出用培地に0.2 mL塗布し、28℃のインキュベーター内で3日間培養した。また、生存率への影響を見るために、同様の懸濁液を150 mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）にて10^5倍希釈した後、YPD培地に0.1 mL塗布し、28℃のインキュベーター内で2日間培養した。培養後、各培地に生育したコロニーを数え、生存率と突然変異頻度を算出し、遺伝毒性評価を行った。*CAN1*遺伝子変異体頻度は、*CAN1*遺伝子変異体数を生菌数で除して算出した。また、すべての測定値について平均値と標準偏差を求めた。

Table 1 Primers of PCR and Sequence analysis.

	Primer
PCR	
Forward	CAGTTTTTAATCTGTCGTCAATCG
Reverse	TCCCTTAAACTTTCTTTTCGGTG
Sequence	
1	TTCTTCAGACTTCTTAAC
2	TGGGCGCTCTTATATCAT
3	GTCCAGGTATAATATCTA
4	GTGGTGTTCCATACATTG

5. *CAN1*遺伝子変異のスペクトラム解析

カナバニン含有突然変異検出用培地に生育したカナバニン耐性コロニーを*CAN1*遺伝子変異体候補コロニーとし、変異スペクトラムを分析するためにシークエンス解析を行った。Colony direct PCRにて2種類のPCR用プライマーを用い（Table 1）、*CAN1*遺伝子を含むDNA断片を増幅させた。PCR産物にExoSAP-IT（GE Healthcare）を添加し、37℃で15分間、80℃で15分間反応させた。*CAN1*遺伝子のコード配列1773 bps内部、及びその上流にシークエンス用プライマーを設定し（Table 1）、BigDye Terminater v1.1 Cycle Sequencing Kit（Life Technologies）を用いて、サイクルシークエンシング反応を行った。その後、ABI3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）によって塩基配列を決定した。得られた配列変化のデータから変異スペクトルを作成した。各プライマーは、つくばオリゴサービス株式会社に合成を依頼した。

Table 2 *S. cerevisiae* 7B after 24 h 4-HNE or 4-ONE treatment under growth conditions.

	Concentration (mg/ml)	Living cells ($\times 10^6$/ml) after 24h treatment	Growth (%)	no.of mutants colonies	Mutant frequencies (per 10^{-5}living cells) Canavanine resistant[a,b]
4-HNE	0 (Ethanol)[c]	263	100	7	1.3±1.5(8)
	0.0005	332	126	4	0.7±0.4(3)
	0.001	211	80	29	6.9±6.8(9)
	0.0025	188	71	13	3.3±13.4(3)
	0.005	249	95	123	24.6±2.3(3)
	0.0075	160	61	132	41.4±13.5(3)
	0.01	199	76	16	4.0±2.4(6)
	0.025	65	25	1	0.5±0.8(6)
	0.05	18	7	1	3.7±1.6(3)
4-ONE	0 (Ethanol)[c]	144	100	2	0.7±0.3(3)
	0.001	115	80	1	0.4±0(3)
	0.025	0.1	0.07	0	0±0(3)
	0.05	0.001	0.0001	0	0±0(3)

Results represent data pooled from experiments with 3-9 plates per dose.
[a]Numbers in parentheses indicate the number of independent experiments.
[b]The numbers showed (average colony number)±(standard deviation).
[c]For negative controls, cells were treated with solvent alone (final concentration of 0.5% v/v ethanol).

結　果

1. 4-HNE、4-ONEの*S. cerevisiae* 7B株への影響

7B株に4-HNEまたは4-ONE処理を行った結果、4-HNEにおいては、0.0005 mg/mL処理で生存率が126％と増加したが、その他の濃度においては、濃度依存的に生存率が低下し増殖阻害が見られた（Table 2）。4-ONEにおいては、4-HNE同様濃度依存的に生存率が低下し、0.025 mg/mL処理では生存率0.07％、0.05 mg/mL処理では0.0001％と強い増殖阻害が見られた（Table 2）。これらのことから、4-HNE、4-ONEともに7B株に対して強い細胞毒性があり、特にそれは4-ONEで顕著であった。

2. 4-HNE、4-ONEの*S. cerevisiae* 7B株に対する遺伝毒性への影響

過酸化脂質分解物である4-HNEや4-ONEの酵母に対する遺伝毒性への研究報告はあまりない。そこで本研究では、7B株に対する遺伝毒性試験を行った。その結果、4-HNEで24時間処理をすることで、突然変異頻度が、0.001 mg/mL処理で約5.3倍、0.005 mg/mL処理で約18.9倍、0.0075 mg/mL処理で約31.8倍と、濃度依存的に増加した。一方で、0.01、0.025、0.05 mg/mLと高濃度では突然変異頻度は減少し、細胞毒性が強くなる傾向が見られた（Table 2）。このことから、4-HNEは出芽酵母に対し突然変異を誘発する物質であることが示唆された。また、4-ONEにおいては、今回の試験結果からは7B株に対する遺伝毒性への影響は見られなかった。

3.　4-HNEから誘導される*CAN1*遺伝子変異の解析

先行試験の結果より、7B株に対する4-HNEの遺伝毒性の影響が見られたことから、7B株中の*CAN1*遺伝子座における、4-HNEから誘発される突然変異体についてシークエンス解析を行なった。その結果、4-HNEから誘発される突然変異は、G：C→T：Aが44%（5/16）と最も多く、次いで、A：T→T：Aの19%（3/16）、G：C→A：Tの13%（2/16）、A：T→G：Cの13%（2/16）、A：T→C：Gの13%（2/16）であった（Table 3）。このことから、4-HNEから誘発される突然変異は塩基置換型変異であり、その多くはG→Tへの変異を誘発する可能性が示唆された。

Table 3　Base substitutions induced by 4-HNE in *CAN1* mutants.

Nucleotide position	Nucleotide substiution[a]	DNA sequence at the site of mutation[b]
Transversions		
509	G ---> T	AAT GGT TAC
509	G ---> T	AAT GGT TAC
509	G ---> T	AAT GGT TAC
1372	G ---> T	GGT GTT GCA
1372	G ---> T	GGT GTT GCA
1392	G ---> T	GCA TGG TTA
1079	C ---> A	ACT TCT CCC
950	T ---> A	TAC GTT TCT
1754	T ---> A	AAA TTT TGG
1265	T ---> G	GGT GTT CCA
1393	T ---> G	TGG TTA TTT
1087	A ---> T	TTT ATT ATT
Transitions		
980	G ---> A	TTC CGT GGT
1018	G ---> A	ATT GGA CTT
1192	T ---> C	GGT TCC ATT
1412	A ---> G	TCG CAC ATC

Cells of 7B strain were treated with 0.0075 mg/ml 4-HNE.
[a] The coding strand is shown.
[b] The mutant nucleotide is underlined, in the otherwise wild-type sequence.

考　察

本研究の結果から、過酸化脂質分解物の1つである4-HNEは、*S. cerevisiae* 7B株における、遺伝子突然変異物質であることが示唆された。これまでの研究報告から、原核生物であるサルモネラ菌、大腸菌及び真核生物であるチャイニーズハムスター、ヒト培養細胞においても同様の結果が示されている[5-9]。4-HNE 0.0075 mg/mL処理におけるカナバニン耐性を指標とした遺伝毒性試験で、突然変異頻度が約31.8倍増加したことから、出芽酵母においても4-HNEの遺伝毒性が明らかとなり、その毒性は様々な生物に共通して作用するものであると考えられる。

また、4-HNE処理における、7B株中の*CAN1*遺伝子座で生じる突然変異のシークエンス解析の結果、G：C→T：Aへのトランスバージョン型変異が44%と最も多く、次いでA：T→T：A（19%）、A：T→C：G（13%）、G：C→A：T（13%）、A：T→G：C（13%）となった。4-HNEから誘発される突然変異は、これまでに大腸菌やヒト培養細胞を用いた研究からG：C→T：Aへの変異が報告されており[10]、今回の研究結果からも同様の知見が得られた。4-HNEは、リノール酸やアラキドン酸などのn-6系不飽和脂肪酸を生成源とする過酸化脂質分解物であり、特にDNAのグアニン残基に結合し、6-(1-hydroxy hexanyl)-8-hydroxy-1, N^2-propano-2'-deoxyguanosine（4-HNE-dG）を生成することが報告されている[11-13]。4-HNE-dGはヒトの組織からも検出されており[14]、本研究においても、7B株中にて4-HNE-dGが生成されることによりグアニンからの突然変異が誘発され、G→Tへのトランスバージョン型の点突然変異が生じたものと考えられる。一方で、同様にn-6系不飽和脂肪酸から誘導される過酸化脂質分解物である4-ONE処理においては、今回の研究結果からは遺伝子突然変異の誘発は見られなかった。4-ONEを0.025 mg/mL以上の濃度で処理をすると生存率がほぼ0%となったことから、細胞毒性が強く作用し、細胞死を引き起こしてしまったと考えられる。Chouらの報告によると[15]、ヒト組織中より4-ONEから誘導されるDNA付加体であるheptanone-etheno-2'-deoxycytidine（HεdC）、heptanone-etheno-2'-deoxyadenosine（HεdA）、heptanone-etheno-2'-deoxyguanosine（HεdG）が検出されていることから、4-ONEも7B株における遺伝子突然変異物質である可能性は高い。4-ONEから誘発される遺伝子突然変異については、今後さらなる詳細な研究が必要であると考えられる。

結　論

n-6系不飽和脂肪酸から誘導される過酸化脂質分解物である4-HNE、4-ONEは、*S. cerevisiae* 7B株に対して細胞毒性を有しており、4-HNEにおいて、カナバニン耐性を指標とした遺伝毒性試験では、突然変異頻度を濃度依存的に増加させた。また、7B株中の*CAN1*遺伝子座における、4-HNEから誘発される突然変異体についてシークエンス解析を行なった結果、G：C→T：Aへのトランスバージョン型変異が44%と最も多く、その他のスペクトラム解析においても塩基置換型変異であった。

これらの結果から、4-HNEは出芽酵母においても突然変異誘発物質であることが示唆された。

謝　辞

本研究を進めるにあたり、研究に従事した東京医療

保健大学　医療保健学部　医療栄養学科　紺野奈沙氏、平山裕美氏、藤井未来氏、松崎光平氏、森由利香氏に深く感謝の意を申し上げます。

本研究の一部は、JSPS科研費（20700600）の助成を受けたものです。

引用文献

1）厚生労働省大臣官房統計情報部. 平成22年簡易生命表の概況. *簡易生命表 平成22年*. 東京：厚生労働統計協会 2011; 2.

2）厚生労働省. 第2章 近年の社会経済の変化と家計の動向. 於；厚生労働省編. *平成20年版 厚生労働白書 生涯を通じた自立と支え合い～暮らしの基盤と社会保障を考える～*. 東京：株式会社 ぎょうせい 2008; 46.

3）Iso H, Sato S, Kitamura A, Naito Y, Shimamoto T, Komachi Y. Fat and protein intakes and risk of intraparenchymal hemorrhage among middle-aged Japanese. *Am J Epidemiol*. 2003; 157 : 32-9.

4）Grúz P, Shimizu M. Origins of age-related DNA damage and dietary strategies for its reduction. *Rejuvenation Research*. 2010; 13 (2-3) : 285-287.

5）Marnett LJ, Hurd HK, Hollstein MC, Levin DE, Esterbauer H, Ames BN. Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in Salmonella tester strain TA104. *Mutat Res*. 1985; 148 (1-2) : 25-34.

6）Benamira M, Marnett LJ. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal is a potent inducer of the SOS response. *Mutat Res*. 1992; 293 (1) : 1-10.

7）Kowalczyk P, Cieśla JM, Komisarski M, Kuśmierek JT, Tudek B. Long-chain adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal to DNA bases cause recombination, base substitutions and frameshift mutations in M13 phage. *Mutat Res*. 2004; 550 (1-2) : 33-48.

8）Cajelli E, Ferraris A, Brambilla G. Mutagenicity of 4-hydroxynonenal in V79 Chinese hamster cells. *Mutat Res*. 1987; 190 (2) : 169-71.

9）Hussain SP, Raja K, Amstad PA, et al. Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97 (23) : 12770-5.

10）Feng Z, Hu W, Amin S, Tang MS. Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient and -deficient human cells. *Biochemistry*. 2003; 42 (25) : 7848-54.

11）Douki T, Ames BN. An HPLC-EC assay for 1, N^2-propano adducts of 2'-deoxyguanosine with 4-hydroxynonenal and other alpha, beta-unsaturated aldehydes. *Chem Res Toxicol*. 1994; 7 (4) : 511-8.

12）Yi P, Zhan D, Samokyszyn VM, Doerge DR, Fu PP. Synthesis and 32P-postlabeling/high-performance liquid chromatography separation of diastereomeric 1, N^2-1,3-propano) -2'-deoxyguanosine 3'-phosphate adducts formed from 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Res Toxicol*. 1997; 10 (11) : 1259-65.

13）Wacker M, Schuler D, Wanek P, Eder E. Development of a (32) P-postlabeling method for the detection of 1,N (2) -propanodeoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal in vivo. *Chem Res Toxicol*. 2000; 13 (11) : 1165-73.

14）Chung FL, Nath RG, Ocando J, Nishikawa A, Zhang L. Deoxyguanosine adducts of t-4-hydroxy-2-nonenal are endogenous DNA lesions in rodents and humans: detection and potential sources. *Cancer Res*. 2000; 60 (6) : 1507-11.

15）Chou PH, Kageyama S, Matsuda S, et al. Detection of lipid peroxidation-induced DNA adducts caused by 4-oxo-2 (E) -nonenal and 4-oxo-2 (E) -hexenal in human autopsy tissues. *Chem Res Toxicol*. 2010; 23 (9) : 1442-8

Abstract：Accumulation of DNA damage with advancing age due to failing repair is one of the key molecular pathologies in aging and chronic disease such as cancer. Lipid peroxidation (LPO) is a main source of endogenous damage in tissue DNA and is linked to chronic inflammatory processes underlying numerous degenerative diseases. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) represent the direct source of this damage. The DNA adducts formed from the peroxidation products of n-6 PUFAs studied so far include the derivatives of 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and 4-oxo-2-nonenal (4-ONE).

In this study we examined the mutagenic activity of 4-HNE and 4-ONE in the haploid strain 7B of *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae* 7B).

At 0.0075 mg/ml 4-HNE increased the frequency of forward mutations to canavanine resistance 31.8 times during a 24 h growth period in the strain 7B. Mutational spectra have been determined with in the *CAN1* gene of 4-HNE-treated in *S. cerevisiae* 7B. G:C→T:A transversions (44%) were most prevalent. On the other hand, under the same treatment conditions the frequencies of forward mutations in the *S.cerevisiae* 7B was not increased with 4-ONE. These results suggest that the peroxidation product of n-6 PUFAs 4-HNE is significantly mutagenic in *S. cerevisiae*.