

氏 名	よね ざわ ゆう すけ 米 沢 雄 介
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	論 理 博 第 1402 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	活性酸素生成物質および消去物質検索のためのバイオアッセイの開発

論文調査委員 (主 査) 教 授 今 福 道 夫 教 授 佐 藤 矩 行 教 授 米 井 脩 治

論 文 内 容 の 要 旨

フリーラジカルなどの活性酸素は、細胞内での通常の代謝過程で不断に発生しているが、放射線や種々の酸化剤によっても産生する。活性酸素は多くの生活習慣病、がん、老化の主たる原因であることが明らかにされてきていることから、生体内の活性酸素の生成や消去は予防医学上の重要なテーマとなっている。環境中に存在する多くの物理的および化学的要因のうち、変異原性や発がん性を示すものの中で、その作用機構として活性酸素を産生するものが多いことが示唆されている。したがって、環境中の化学物質において、活性酸素を生成する性質の有無を知ることはきわめて重要である。現在までの活性酸素の生成や消去作用を示す化学物質の研究は、主として電子スピン共鳴法などの *in vitro* でおこなわれるものであった。しかし、生体内の複雑な過程を経て生成や消去する活性酸素を検討するためには、*in vitro* だけではなく、*in vivo* で行われなければならない。この目的のため、申請者は、環境中から *in vivo* で活性酸素生成物質および消去物質を検索することを目的とした2種類のバイオアッセイシステムを開発した。一つは、大腸菌の活性酸素消去系欠損株を作成し、種々の活性酸素に高感受性を示す菌株を選択して、「化学物質の毒性と活性酸素の関与」を調べる簡便な試験法「カットソード (kat-sod) アッセイ」を開発した。このカットソードアッセイを環境中の化学的および物理的変異原に適用し、わが国で食品添加物として使用されているイソチオシアン酸アリル、X線および太陽光などが細胞内活性酸素産生能を有することを明らかにした。次に、申請者は、活性酸素の消去物質を検索するための「ムットテスト (Mut-test)」を開発した。これは、大腸菌 *mutT* 遺伝子欠損株の示す高い自然突然変異頻度を利用したものであるが、その自然突然変異は細胞内で発生する活性酸素によるものであることが分かっている。このムットテストを用いて、抗酸化性が知られているビタミン類、ポリフェノール類やカテキン類の活性酸素消去能を求め比較したところ、このテストの定性的な意義を確かめることができた。申請者は、さらにムットテストにカットソードアッセイを組み合わせることにより、魚油に含まれる多価不飽和脂肪酸の活性酸素消去能を証明し、その消去機構を明らかにすることができた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

スーパーオキシドや過酸化水素などの活性酸素は、細胞内での通常の代謝過程で常に発生しているが、電離放射線や種々の化学酸化剤によっても産生する。活性酸素は多くの生活習慣病、がん、老化の主要因であるとされている。したがって、生体内の活性酸素の生成やその消去の機構、活性酸素の防御の研究は生物学のみならず予防医学上の重要な課題となってきた。さらに、環境中に存在する多くの物理的および化学的要因のうち、変異原性や発がん性を示すものの中で、その作用機構として細胞内で活性酸素を産生するものを同定することはきわめて重要である。申請者の研究の目的は、環境中から活性酸素生成物質および消去物質を検索することである。スーパーオキシドや過酸化水素に対する防御システムとして、細胞はSOD (スーパーオキシドディスムターゼ) およびカタラーゼ、ペルオキシダーゼを備えている。これらの酵素が発生した活性酸素を消去する役割を果たしている。したがって、これらの酵素を欠損した大腸菌はこれらの活性酸素の致死作用や突然変異誘発作用に高感受性を示す。申請者はSOD およびカタラーゼの機能をすべて欠損した大腸菌菌株を

作成して、化学物質の毒性と活性酸素の関与を調べる簡便な試験法「カットソードアッセイ」を開発した。このカットソードアッセイを環境中の化学的および物理的変異原に適用して、欧米では使用が禁止されているのにわが国では食品添加物として使用が認められているイソチオシアン酸アリル、X線および太陽光などが細胞内活性酸素産生能を有することを明らかにした。これらの結果は、申請者の開発したカットソードアッセイが活性酸素を生成する環境要因のスクリーニングに有効であることを示した。

次に、申請者は、活性酸素の消去物質を検索するための「ムットテスト(Mut-test)」を開発した。これは、大腸菌 *mutT* 遺伝子欠損株の示す高い自然突然変異頻度を利用したものであるが、その自然突然変異は細胞内で発生する活性酸素によるものである。したがって、このテスト株の高い自然突然変異頻度を抑制する化学物質が検出できれば、その原因は細胞内の活性酸素の生成を軽減させたことだと結論できる。申請者は、このムットテストの定性的な意義を確かめ、さら、にムットテストにカットソードアッセイを組み合わせることにより、魚油に含まれる多価不飽和脂肪酸などの活性酸素消去能を証明し、その消去機構を明らかにした。

本研究では、開発された活性酸素の生成あるいは消去物質の作用がどのような機構で起こったのか、そのメカニズムの研究がやや不足しているが、環境毒性の見地から見た本研究の意義は大きい。これらの研究の学問上の意義は大きく、申請者の学術研究に対する熱意と能力の高さが十分に推察できた。よって本論文は京大博士（理学）の学位論文として価値あるものと認め歪。なお、添付論文に報告されている研究業績を中心に、関連分野に関する試問を行った結果、適切に解答が得られたので合格と認定した。