

氏名	米原 万紀子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第3617号
学位授与の日付	平成20年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生命分子科学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	ヘムタンパク質の細胞DNA損傷に対する防御能に関する研究
論文審査委員	教授 泉本 勝利 教授 宮本 拓 教授 坂口 英

### 学位論文内容の要旨

活性酸素はDNAを損傷させ、老化、動脈硬化、がん化などの発症に深く関わっている。ヘムタンパク質であるヘモグロビンやミオグロビンは自動酸化でスーパーオキシドアニオン ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) あるいはFenton反応でヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) の活性酸素を発現し、発がんを誘起するということが*in vitro*かつ間接的に類推され定説になっている。この定説では、ヘムタンパク質は食品の安全性に関わる重大な成分ということになる。そこで、*in vivo*により近い培養細胞を用いて、ヘモグロビンについて発がんに関与するDNA損傷のレベルをコメットアッセイ法によって定量的に明らかにすることを目指した。まず、DNA損傷のレベルを定量化するために、細胞の蛍光顕微鏡像をデジタル画像解析する方法を確立した。

試験細胞としてHL-60細胞を用いた。 $\text{H}_2\text{O}_2$ によって細胞を損傷させポジティブコントロールとした。細胞DNA損傷の検出はコメットアッセイ法によって行った。細胞の蛍光顕微鏡像をソフトウェアを用いて画像解析した。DNA損傷レベルはコメットのrectangle (length×height) 等によって評価した。ポジティブコントロールは顕著にDNA損傷を受けたのに対して、 $\text{H}_2\text{O}_2$ にヘモグロビンを共存させると正常細胞と同じく損傷が認められなかった。このことから、ヘモグロビンがFenton反応で活性酸素を発現し、DNAを損傷させるという知見は否定され、むしろヘムタンパク質は活性酸素によるDNA損傷を防御することが示唆された。

喫煙による発がんは、従来は煙中に存在する多様な変異原物質によると考えられていたが、タバコ煙中の活性酸素や喫煙により新たに生体内で発生する活性酸素によるDNA損傷が、変異原物質よりも大きなリスクファクターであると考えられている。タバコ煙のDNA損傷の報告は数多くされているが、同じく煙の利用である燻製食品の燻煙については明瞭な報告はされていない。そこで、燻煙成分の細胞DNA損傷におよぼす影響について検討した。燻煙あるいはタバコの煙を水に捕捉し、細胞DNA損傷レベルをコメットアッセイ法によって比較した結果、タバコ煙では激しい損傷が生じたが、燻煙では損傷しなかった。実際の肉製品の燻煙量をKubelka-Munk修正法で測定し、ベーコンの安全性が確かめられた。

タバコの煙によって細胞DNA損傷が認められたが、食肉抽出液を加えることで損傷が抑制された。食肉抽出液の高分子画分は損傷を抑制した。高分子画分をカラムクロマトグラフィーで分画したところ、ミオグロビンに抑制効果が認められた。

以上の結果より、食品とくに食肉や食肉製品に含まれているヘムタンパク質は積極的に活性酸素消去の機構に関わっていること、発がん成分であるタバコ煙のDNA損傷を抑制することなど、健康機能性を有することを定量的に明らかにした。

## 論文審査結果の要旨

ヘムタンパク質であるヘモグロビンやミオグロビンは自動酸化でスーパーオキシドアニオン ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) あるいはFenton反応でヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) の活性酸素を発現し、発がんを誘起するということが*in vitro*かつ間接的に類推され定説になっている。この定説では、ヘムタンパク質は食品の安全性に係わる重大な成分ということになる。そこで、*in vivo*により近い培養細胞を用いて、ヘモグロビンについて発がんに関与するDNA損傷のレベルをコメットアッセイ法によって定量的に明らかにすることを旨とした。まず、DNA損傷のレベルを定量化するために、細胞の蛍光顕微鏡像をデジタル画像解析する方法を確立した。

正常細胞は円形であるが、細胞DNA損傷のポジティブコントロールは伸長率1.4以上に広く分布した。 $\text{H}_2\text{O}_2$ の1/20モル以上のヘモグロビン共存下で細胞は円形となり、ヘムタンパク質は定説のFenton反応で細胞DNAを損傷するのとは逆に、DNA損傷の抑制が明らかになった。

食肉製品にとって燻煙は古くからの製造工程である。タバコ煙のDNA損傷は数多く報告されている。食肉加工と同等の燻煙あるいはタバコ煙捕捉溶液を調製し、細胞DNAの損傷レベルをコメットアッセイ法によって比較した結果、タバコ煙で激しい損傷が起こるが燻煙では損傷がみられなかった。また、肉製品の燻煙量をKubelka-Munk修正法で測定し、実際のベーコンの安全性が確かめられた。

食肉抽出液はタバコ煙による細胞DNA損傷を抑制した。抽出液の透析外液には抑制効果が認められなかったが、透析内液にDNA損傷抑制効果が認められた。そこで、カラムクロマトグラフィーで分画し、ミオグロビン画分にDNA損傷抑制効果が認められた。

本実験では培養細胞を用いたより*in vivo*に近い系によって、ヘムタンパク質はむしろ積極的に活性酸素消去の機構に関わっていること。また、発がん成分であるタバコ煙に対しても食肉はDNA損傷を抑制することなど、健康機能性をもつことを明らかにした。以上の成果は、食品の安全性に関わるヘムタンパク質の機能を解明したものであり、本論文を博士の学位論文に値するものと判定した。