総 説

食品の加工・調理に伴う変異原物質の生成に関する研究†

篠 原 和 毅

九州大学農学部食糧化学工学科

Study on Formation of Mutagens in Processing and Cooking of Foods

Kazuki SHINOHARA

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University,
Fukuoka, 812

近年、食品ないし食品成分の加熱分解により Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, IQ などのような強い変異原活性物質が生じ^{1)~3)}, しかも発がん性も明らかにされ^{4)~6)}, 食生活に占める加工食品の利用度が著しく増大していることから、食品の安全性について大きな問題を提示し、社会的にも注目されている。しかしこれらの物質の多くは日常の加工・調理条件とは異なったかなり高温で処理して得られたものである。したがって日常の食生活に即した加工・調理条件下でもこのような変異原物質が生成するか否かを確かめることはきわめて重要な課題である。

食品の加工、調理ないし貯蔵の過程において、食品は種々の化学的、物理的变化をうけるが、とくに注目されるのは食品成分間の反応であって多くの相互作用が知られている⁷⁾。そのなかで最も広範にしかも比較的温和な条件下で起こる代表的な反応としてアミノ化合物とカルボニル化合物との反応、すなわちアミノカルボニル反応 (Maillard 反応) があり、食品の褐変、特異的な香りや抗酸化能の発現、さらには有効性リジンなどアミノ酸の損失に伴う栄養価の低下などの要因となっている (Maillard 反応全般に関して 1982 年、米国、ラス・ベガスにおいて「The Maillard Reaction in Food and Nutrition」のタイトルでシンポジウムが開かれた⁸⁾)。この反応系は非常に複雑であってその機構は完全に解明されていないが、主なる中間体としてレダクトン類やオゾン類の生成が知られている。これら中間生成物は、一般に不安定であって反応性に富み、生体に対しても何らかの影響を及ぼすことが予想される。著者らはこのような観点

から、アミノカルボニル反応に着目し、加熱温度を 100℃以下に限定し、アミノ化合物と糖ないしレダクトン類との反応による変異原物質の生成を種々の条件下で系統的に検討し、微弱ながらも変異原物質の生成を認めるとともに数種の本体を解明した。さらに突然変異の発現と DNA の損傷との密接な関連性を指摘し、突然変異の発現機構を推定するため DNA 損傷機構の解明を行なった。以下これらの研究の概要を述べる。

1. アミノ酸-糖系による変異原物質の生成

1) アミノ酸とグルコース (Glc) との反応褐変液の変異原活性

アミノ酸と糖とのアミノカルボニル反応のモデル反応として、まず 1 M Lys·HCl と等モルの Glc を 100℃で反応させ、得られた褐変液の変異原活性を *Salmonella typhimurium* TA 100 を用いる Ames 法⁹⁾により試験した結果、図 1 に示すように褐変液が比較的狭い供試量域において明らかな変異原活性を示すことを認めた¹⁰⁾。しかしその活性は弱く、TA 100 の陽性試薬である 4-ニトロキノリン-N-オキシド (4-NQO) が 1 µg 当たり約 9,900~14,600 個の変異体を生じるのに対し、褐変液の最適濃度 0.2 ml (65 mg 褐変物/plate) は約 730 個の変異体を生成したにすぎない。4-NQO の量作用曲線が直線関係にあると仮定するとこの値は、4-NQO の 0.01 µg あるいはそれ以下に相当する。

Lys·HCl のほか、多くのアミノ酸も Glc と 100℃で 10 時間加熱反応することによって、TA 100 ないし 98 に対し微弱ながらも変異原活性を生成する (表 1)¹¹⁾¹²⁾。その活性はアミノ酸の種類によってかなり異なり、また供試菌の種類、S-9 mix の添加、無添加によっても異

† この総説は昭和 59 年度学会賞の受賞の対象となったものである。

表 1. アミノ酸とグルコースとの複変反応液の *Salmonella typhimurium* に対する変異原活性

Strain	TA 100										TA 98									
	-					+					-					+				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4
S-9 mix																				
Dose ml/plate	0.1	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4
Glycine	275	451	230	187	188	130	144	186	35	47	20	13	246	240	146	—				
Alanine	530	566	123	119	134	133	135	134	30	23	18	13	38	36	38	42				
Valine	203	277	218	109	165	138	148	168	26	0	6	17	51	87	33	24				
Leucine	192	269	336	400	150	167	185	194	33	29	17	28	44	52	28	21				
Isoleucine	199	319	246	157	240	224	329	332	48	30	19	0	68	36	28	0				
Serine	195	257	262	267	141	161	138	121	15	14	13	6	39	37	38	38				
Threonine	223	315	104	48	164	103	99	165	41	15	9	7	20	0	0	0				
Aspartic acid	153	173	140	106	91	86	123	144	34	41	30	20	43	56	50	47				
Asparagine	139	146	162	242	160	164	178	194	27	27	39	32	36	39	30	31				
Glutamic acid	119	103	89	68	165	153	131	108	47	37	0	0	32	25	31	36				
Glutamine	208	309	455	353	183	138	145	147	51	60	39	15	41	49	38	33				
Lysine	645	739	152	30	252	297	119	106	15	16	20	12	52	32	34	39				
Arginine	683	754	676	559	218	235	156	145	17	34	0	0	85	97	82	66				
Phenylalanine	200	253	281	313	372	365	343	260	25	21	11	7	51	36	28	24				
Tyrosine	134	178	186	246	150	142	164	186	33	19	17	13	15	19	18	16				
Tryptophan	129	139	118	101	141	153	155	153	24	16	7	0	17	9	0	0				
Cysteine	369	213	30	30	763	1,669	769	396	77	76	48	25	128	159	146	88				
Cystine	166	198	134	130	138	131	131	120	27	24	22	36	51	82	53	50				
Methionine	196	262	340	416	165	179	187	253	42	20	11	5	46	26	39	49				
Proline	163	183	314	294	129	153	156	214	27	30	35	20	39	37	36	34				
Control	129					136					28					33				
4-NQO 0.1 μ g	1,800					130														
DEN 70 μ mol	198					352					38					70				

The bold type of numerical value was used when the number of revertants formed in the test was over twice that in the control.

図 1. リジンとグルコースとの褐変反応液の *Salmonella typhimurium* TA 100 に対する変異原活性

表 2. *Salmonella typhimurium* に対する変異原活性によるアミノ酸とグルコースとの褐変反応液の分類

Group	Browned solutions (Glc)	Activity			
		TA 100		TA 98	
		-S-9	+S-9	-S-9	+S-9
A	Lys·HCl, Leu, Ser, Thr, Met, Gln, Pro	+	↓	— (+)	—
B	Arg, Gly, Ala, Val	+	↓	—	↑
C	Cys	+	↑	+	↑
D	Phe, Ile	+	↑*	—	— (+)
E	Trp, (Cys) ₂ , Tyr, Asp, Asn, Glu	—	—	—	—

* Depending on dose.

なる。それらの様相から試験したアミノ酸-Glc 反応系を大別してみると概略5群にわけられる(表2)。A群は Lys·HCl-Glc 系を代表とするもので TA 100 に対して S-9 mix が不在の場合に活性を示すが、S-9 mix を添加するとむしろ活性が低下し、TA 98 に対して S-9 mix の有無にかかわらず活性を示さないかあるいは示しても活性の弱いグループである。このグループには Leu, Ser, Thr, Met, Pro および Gln 系なども属する。B群は Arg-Glc 系を代表とするもので、TA 100 に対しては、A群と同じ傾向を示すが、TA 98 に対してもとくに S-9 mix 存在下でのみ活性を示すグループで Gly, Ala, Val 系などもB群に属する。C群は Cys-Glc 系であって試験した褐変液のなかで最も高い変異原活性を有する。両株に対し S-9 mix 非存在下でも活性を有し、かつ S-9 mix によりともに活性は高められる。D群は Phe-Glc

系に代表されるように活性が供試量および S-9 mix により異なる区である。E群は Trp-Glc 系および Glu-Glc 系を代表とする系である。単独の加熱分解では強い変異原物質、Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1 などを生成する Trp あるいは Glu は Glc と 100°C, 10 時間反応させた場合には S-9 mix の有無にかかわらず活性の生成はほとんど認められない。この傾向は (Cys)₂, Tyr, Asp および Asn 系でも同様である。なお表1においては対照区の2倍以上の変異体を生じたものを陽性と判定した。また Glc, アミノ酸を単独に 100°C で10時間加熱処理しても変異原活性は確かめられない¹⁰⁾。

2) 褐変液の DNA 損傷作用

突然変異ないしがんの発現は DNA 分子の損傷と密接に関連することが考えられる。著者らの研究室においてヒドロキシルアミン¹³⁾¹⁴⁾、オキシム¹⁵⁾、亜硝酸¹⁴⁾、過酸化水素¹⁶⁾¹⁷⁾、3,4-ベンズピレン¹⁷⁾、20-メチルコランスレン¹⁷⁾、ニトロソグアニジン¹⁸⁾¹⁹⁾、マイトマイシン C¹⁷⁾¹⁹⁾、リグニン²⁰⁾、ステロイド系^{21)~23)} およびカテコールアミン系ホルモン¹⁵⁾²⁴⁾²⁵⁾などをはじめ、多くの突然変異ないしウイルス誘起物質、発がん剤、制がん剤がいずれも DNA 鎖を切断することを認めており、DNA の適切な切断が上記諸現象における主要な始動過程の一つであると推定している²²⁾²⁶⁾²⁷⁾。これらのことは DNA 損傷能の検定が変異原物質、発がんないし制がん物質の検索の一指標になることを示唆する。上記化合物のほか、アスコルビン酸 (AsA)、トリオースレダクトン (TR) およびそれらの関連化合物など、食品あるいは食品の加工、調理過程に広くみられるレダクトン化合物もとくに Cu²⁺ 共存下で DNA に損傷を与える^{27)~30)}。アミノカルボニル反応の初期中間生成物にエンジオールないしエナミノール (アミノ) レダクトンの生成が推定されている⁷⁾。アミノ酸と Glc との褐変液が変異原活性を示すことから、褐変液の DNA 損傷能をアガローススラブゲル電気泳動法³¹⁾により試験した。その結果、変異原活性を有する反応系はいずれもとくに Cu²⁺ 共存下で DNA の複製切断を起こした(図2)。その切断能はアミノ酸の種類により異なり、Glu, Lys·HCl, Met などの場合に強い傾向がみられる。Cys, Ile および Asn と Glc との反応液は Cu²⁺ 非共存下でも DNA 損傷能を有する。このような DNA の損傷はきわめて速やかに開始され、DNA の低分子化はすでに反応開始1分後においても観察される。もちろん処理時間を長くするほど低分子化反応は進み、数時間後には 10⁵ ダルトン以下の分子量分布をもつ DNA 断片を生成する。

3) 褐変液の Rec-assay

In vitro ではあるが DNA 損傷能を有するアミノ酸と Glc との褐変液の大部分は *Bacillus subtilis* H17 (Rec⁺,

図 2. アミノ酸とグルコースとの褐変反応液の DNA 損傷作用

表 3. アミノ酸とグルコースとの褐変反応液の Rec-assay

AA(Glc)	Δ Inh. zone(mm)/dose(mg)
Met, (Cys) ₂ , Tyr	0
Gln, Ser, Pro, Leu	0.002-0.004
Ile, Gly, Asn, Phe, Val	0.004-0.006
Ala	0.006-0.008
Lys-HCl	0.008-0.010
Trp, Thr	0.010-0.015
Glu, Arg	0.015-0.020
Asp, His, Cys	0.020<
4-NQO	0.200<

arg⁻, try⁻) および M45 (Rec⁻, arg⁻, try⁻) を用いる Rec-assay³²⁾ に対しても陽性を示す (表3)。その活性はアミノ酸の種類により異なるが, Asp, Glu, His, Arg, Trp, Thr, Cys および Lys-HCl などの反応系は比較的に明白な生育阻止帯の差を示し, そのほか Ala, Phe, Gly, Val および Asn なども陽性を示す。このことは, 褐変液中に菌体 DNA に損傷を与える物質が生じていることを示唆する。しかし Rec-assay の結果は Ames 試験のそれとは必ずしも一致しなかった。

4) 褐変液の受精卵細胞に及ぼす突然変異作用

上記のようにアミノカルボニル反応物が微生物に対して突然変異誘起能を有するが, 人体への影響を明らかにするためにはこのような細菌系についての 1 次試験に統

いて中間的な高等動物種を用いて 2 次的に試験し, 活性の高いものに関して哺乳類などを用いて変異原さらには発がん試験を行なう必要がある。中間的動物種としてはまず昆虫類をあげることができる。とくに蚕の場合, 遺伝子組成が確かな多数の突然変異系統が保存され³³⁾, 突然変異の検出も容易なものが多い。とくに卵色 (卵殻の内側にある漿液膜の色) の突然変異は検出しやすく, また 1 頭の雌蛾から 400~600 個の卵を得ることができ, 変異原物質の検定にすぐれた材料である。卵色に関して正常遺伝子をもつ雌の蛹に, 化蛹後 3~4 日経過した羽化前 5~6 日に羽原基を通して種々の濃度の褐変液 10 μ l を注射し, 羽化後赤卵遺伝子をホモにもつ雄と交配して産卵させ, 卵中の赤卵数と受精卵数との割合を突然変異誘発頻度として求めた。その結果, 陽性突然変異剤として用いたマイトマイシン C が 6 μ g 当たり 1.7~3.3 (平均 2.5) $\times 10^{-4}$ の頻度の活性を示すのに対し, 褐変液では微弱ながら 5~10 $\times 10^{-4}$ 程度の活性を示し, 0.01 μ g ニトログアニジンとほぼ同程度であった³⁴⁾。その活性はアミノ酸の種類によって異なり, Ile, Gln および Phe 系などで比較的高く, Gly, Val, Asn 系などの活性は低かった。

5) 反応条件の影響

Glc のほか, ガラクトース (Gal), フラクトース (Fru), アラビノース (Ara), キシロース (Xyl), ラクトース (Lac), ショ糖 (Suc) およびマンノース (Man) などの糖もアミノ酸と反応して変異原物質を生成する¹¹⁾。これらの場合も変異原活性はアミノ酸と糖の組合せによって異なる (図3)。たとえば Lys-HCl と Fru, Gal, Ara, Xyl との反応液は TA 100 (-S-9 mix) に対してごく狭い範囲で活性を示し, S-9 mix の添加により活性は低下するが, Lac, Man, Suc とでは活性の生成はみられない。TA 98 に対する活性も Xyl, Ara で認められ S-9 mix により低下するが, Suc の場合は逆に S-9 mix を添加した場合にのみ活性が認められる。Arg の場合, 同じく Fru, Xyl および Lac で TA 100 (-S-9 mix) に対し活性を示し S-9 mix により活性は低下するが, その他の糖類すなわち Gal, Ara, Man および Suc では活性の生成はみられない。しかし TA 98 に対する活性は S-9 mix 無添加の場合にのみ Fru および Suc との褐変液にみられる。Cys との反応液は Lac と Suc で TA 100 (-S-9 mix), Fru で TA 100 (+S-9 mix) に対する若干の活性を示す。一方, TA 98 に対する活性は微弱ではあるが S-9 mix 無添加において Xyl 以外のすべての糖で認められるが, S-9 mix を加えるといずれも活性の生成はみられない。Phe は Gal, Xyl, Ara と反応しても TA 100 (-S-9 mix) に対して比較的高い活性を生じ, また Fru および Lac でも多少の活

図 3. 種々のアミノ酸と糖との褐変反応液の *Salmonella typhimurium* に対する変異原活性 (+) S-9 mix 添加

図 4. アミノ酸とグルコースとの褐変反応液の褐変度と変異原活性の経時的変化

性を示すが、いずれも S-9 により活性を失う。TA 98 に対してはほとんど活性は認められない。Trp は試験したすべての糖において 100°C、10 時間の加熱条件下では変異原活性を生成しなかった。

一般に、アミノカルボニル反応液の褐変度はその初期においては加熱時間に応じて増強されるが、それとともに変異原活性の生成も同様に高められる傾向がみられる。しかし、褐変度と変異原活性の生成とは厳密な相関性は認められず、アミノ酸の種類により変動する (図 4)。たとえば Lys-HCl、Met、Gly、Thr-Glc 系においては変異原活性の生成は加熱時間の延長に伴い高めら

れるが、Glu-Glc 系は 6 時間、Phe および Ser 系では 8 時間加熱した褐変液に活性のピークがあり、それ以後は低下する。Glu 系は活性の生成が認められない E 群に属すが、それは 10 時間加熱反応液の場合であって、最高活性を示す 6 時間反応液で検定すれば若干の陽性といえる。他方、Cys および Arg 系では 8 時間加熱まではほとんど変異原活性は生成されないが、10 時間加熱で急激に高い活性を示す。これらの結果は、変異原活性は褐変反応に伴って生成されるが褐変度とは厳密な相関関係は認められず、変異原本体が褐変色素 (メラノイジン) そのものではないことを示唆する。これは他の糖との反応においても同様である。一方、1~2 時間程度の加熱では変異原活性の生成はいずれの反応液においてもほとんど認められない。

変異原活性の生成はアミノ酸と糖との反応時における pH によっても変動する。それもまたアミノ酸の種類によって異なる。たとえば Cys-Glc 褐変液は幅広い pH 領域での反応においても S-9 mix 無添加下に TA 100 に対し活性を示すが、S-9 mix 添加による活性上昇は pH 7 のものでとくに顕著である (図 5)。Lys-HCl-Glc 系は pH 2 での反応 (100°C、10 時間) において TA 100 (-S-9 mix) に対する強い活性を生じ、Arg-Glc 系の反応液は pH 7 において TA 100 (-S-9 mix) に対し最も強い活性を生成する。Phe-Glc 褐変液の TA 100 (-S-9 mix) に対する活性は pH 2 および 7 で生成される。Trp-Glc 系ではいずれの pH でも活性の生成は認められない。

このようにアミノ酸と糖とのアミノカルボニル反応は、比較的微弱ではあるが変異原活性物質を生成する。その生成はアミノ酸、糖の種類すなわち反応組成および

図 5. システインとグルコースとの反応時における pH の変異原活性に及ぼす影響

△, ▲ pH 2, ○, ● pH 7, □, ■ pH 12.

反応時間や反応時の pH などの反応条件によって変動する。アミノカルボニル反応による変異原物質の生成については上記のほか、Lys, Arg およびクレアチンと Glc との加熱反応液のクロロホルム抽出液³⁵⁾, 121°C, 1 時間の加熱下ではあるが、pH 7 および 10 での Fru ないし Glc と Arg, Lys, Ser, Gln および Glu との反応物³⁶⁾, マルトールとアンモニアとの褐変反応物³⁷⁾, あるいは AsA と Trp を 37°C で 2 か月間保温した反応液³⁸⁾等に変異原活性が確かめられている。

6) 褐変液の変異原活性の変動

褐変液中に生成した変異原活性は AsA および TR などの還元剤の存在により低下する (図 6)。Cys, ペニシラミン, ジチオスレイトールによっても多少の抑制効果が認められ、また *N*-アセチルシステインでも低濃度で

図 6. リジンとグルコースとの褐変反応液の変異原活性に及ぼす還元剤の影響

● Cysteine, ○ *N*-acetyl-cysteine, ▲ penicillamine, △ dithiothreitol, ■ TR, □ AsA.

は AsA, TR とほぼ同程度の効果を有する。AsA と Cys はソルビン酸と亜硝酸ナトリウムとの反応から分離された変異原物質, 1,4-ジニトロ-2-メチルピロールの活性を抑制することも報告されている³⁹⁾。逆に Cys およびその誘導体は Trp-P-1, Trp-P-2 の変異原活性を高めることも認められている⁴⁰⁾。他方、褐変反応液自身変異原物質を生成するにもかかわらず、褐変液はニトロソグアニジンやニトロフロレンなどの強い変異原物質の活性を抑える作用を有している。このような抗突然変異物質について Kada ら⁴¹⁾⁴²⁾ は種々の蔬菜液中にその存在を認めている。

2. 変異原物質の分離⁴³⁾

1) Phe-Glc 系の変異原物質

Phe と Glc とを 100°C, 10 時間加熱反応させた褐変液を蒸留水に対して透析したのち、内液および外液を減圧濃縮し変異原活性および DNA 損傷活性を試験し、外液に両活性を認めた。このことは変異原物質が反応の比較的初期に生じる低分子中間体であることを示す。つぎに外液の減圧乾固物のエタノール可溶画分を DEAE-セルロースおよび Dowex 50 カラムクロマトグラフィーにより分画し、活性画分を部分精製した。本画分は NMR スペクトルからなお若干の成分の混合物ではあるが、とくに 5-ヒドロキシメチルフルフラール (HMF) の存在が推定された (図 7)。そこで、シリカゲル薄層クロマトグラフィーを行ない、UV 照射により 6 個のスポットを検出、このうちの 하나가 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) 陽性であり *R_f* 値も市販 HMF のものと一致した。DNA 切断能および変異原活性も HMF に相当するスポットならびに市販 HMF にみられた。さらに NMR および Mass スペクトルも完全に一致することから、Phe-Glc 系で生成する変異原の本体の一つは HMF であると結論された。分離した HMF 画分と市販 HMF の TA 100 ならびに TA 98 に対する S-9 mix の影響などもほぼ一致した。

2) Lys-HCl-Glc 系の変異原物質

Lys-HCl-Glc 系についても同様に透析外液を DEAE-セルロース, CM-セルロースカラムクロマトグラフィー処理し、4 画分を得、さらに薄層クロマトグラフィーを行ない、UV で 5 個のスポットを検出した。主スポット 4 は DNPH およびニンヒドリン陽性を示したが、スポット 5 は DNPH のみ陽性であって HMF と一致した。これらのスポットは DNA 切断能を有する。スポット 4 はその UV スペクトルからピロール誘導体であることが推定された。加藤ら⁴³⁾は、Lys-HCl と Glc とのアミノカルボニル反応の中間体として ϵ -(2-ホルミル-5-(ヒドロキシメチル)ピロール-1-イル)ノルロイシンの生成

図 7. フェニルアラニンとグルコースとの褐変反応液からの変異原物質の分離

を確認している。スポット 4 の抽出液の UV および NMR スペクトルならびに 4 種の溶媒による薄層クロマトグラフィーの挙動は、いずれも加藤らの標品とよく一致した。したがって Lys·HCl-Glc 系に生じた変異原物質は HMF のほかに上記のようなピロール誘導体であると推定された。

3) Cys-Glc 系の変異原物質

Cys-Glc 系の褐変反応液を透析し、外液をメチレンクロライドに転溶後、水蒸気蒸留で揮発性成分を分離し、無水硫酸マグネシウムで脱水後減圧濃縮した。本標品は褐変液の場合と同様に TA 100 および TA 98 の両株に対し活性を示し、かつ S-9 mix により活性化される。そのガスクロマトグラムおよび Mass スペクトルはいずれも 2-メチルチアゾリジン(2-MTD)の合成品のものと一致した。またこの合成試料も同様に変異原活性を示した。このように Cys-Glc 系から生成される変異原物質の一つは 2-MTD であると推定された。この化合物はすでに Fujimaki ら⁴⁴⁾により含硫アミノ酸の加熱分解により、また Shibamoto ら⁴⁵⁾によりシステアミンと Glc, アセトアルデヒドあるいはグリオキザールとの反応により生成することが確認されている。このように Phe, Lys·HCl および Cys と Glc との反応からフラン、ピロールおよびチアゾリジン誘導体の変異原物質として同定された(図 8)が、さらに多くのものの存在も予想され、その解明は今後の課題である。なお、HMF を含むフラン化合物はハムスター卵母細胞の染色体異常を起こすことが報告されている⁴⁶⁾。

図 8. フェニルアラニン、リジンあるいはシステアミンとグルコースからの変異原物質

4) HMF の生成条件

上記変異原物質のうち、HMF を含むフラン化合物については定量法を検討し、高速液体クロマトグラフィー(Zorbax ODS 逆相分配カラム)を用い、試料の前処理を 0.2 μ のフィルターを通すことにより、より迅速な分離、定量ができることを明らかにした。HMF の生成は各種アミノ酸と Glc ないし Fru との反応において認められ、アミノ酸のなかではとくに Asp, Glu において顕著である。また Val, Phe, Thr などのアミノ酸でも明らかな生成がみられる。HMF の生成量は加熱時間に応じ増加する。加熱後 5°C で貯蔵した場合には HMF のさらなる生成あるいは分解はみられない。また pH 2

表 4. アミノ酸とグルコースとの反応による HMF の生成

Amino acid (Glc)	HMF, $\mu\text{g/ml}$ ($OD_{470\text{nm}}$)		
	pH 2	pH 7	pH 12
Phe	1,795 (5.6)	437 (26.5)	369 (62.8)
Thr	3,212 (12.0)	1,907 (67.4)	319 (60.0)
Cys	27 (0.8)	16 (1.8)	32 (3.5)
Trp	100 (5.0)	ND (23.7)	ND (49.0)
Asn	73 (39.5)	133 (62.5)	116 (74.0)
Asp	8,479 (5.1)	242 (57.5)	157 (64.7)
Lys·HCl	826 (60.1)	867 (80.7)	10 (109.6)
Arg	2,226 (3.2)	381 (26.6)	ND (55.8)
Control	40 (0.0)	24 (4.2)	22 (13.6)

0.5 M AA + 0.5 M Glc.

で反応させた場合、褐変度は低いが HMF の生成は著しく増加し、pH 7 以上での反応においては褐変反応は進行するがその生成量は低い(表 4)。しかし、HMF の生成量と表 1 における変異原活性とは相関性は認められなかった。

5) レダクトン化合物の変異原活性

HMF およびピロール化合物はアミノカルボニル反応においてシッフの塩基、オゾンを経由して生成される比較的初期反応中間体である。一方、アミノカルボニル反応においてはアマドリ転位物のエノール型である 1,2-エナミナールや 2,3-エンジオール中間体の生成が推定されている。これらはレダクトン類に属し、強い還元力を有する反応性に富む化合物である。レダクトン化合物のこのような特性はそれら分子中のエンジオール $[-C(OH)=C(OH)-]$ あるいはその OH 基の 1 個または 2 個が $NH_2(NH-R)$ 基や SH 基で置換されたエナミノール $[-C(OH)=C(NH-)-]$ 、エンジアミン $[-C(NH-)=C(NH-)-]$ 、チオールエノール $[-C(OH)=C(SH)-]$ 、エナミンチオール $[-C(NH-)=C(SH)-]$ などに大きく依存している⁴⁷⁾。これらレダクトン化合物はアミノカルボニル反応のほか、その副反応であるストレッカー分解反応に

図 9. トリオースレダクトンとアミノ酸および核酸関連化合物との反応

よっても生じ、食品の褐変、変香、抗酸化能の発現あるいは栄養価の低下などに重要に関与している。さらに AsA やフラボノイド化合物のように食品成分としても、またカテコールアミン類のように生体成分としても重要な機能を果たしている。エンジオールレダクトンの OH 基は、アミノ基と容易に縮合してエナミノールあるいはエンジアミン構造を生成することが知られているので⁴⁸⁾⁴⁹⁾、最も簡単な構造をもつ代表的エンジオールレダクトンである TR を用い、アミノ化合物との反応を試みた。本反応は広義にはアミノカルボニル反応に属するが、アミノレダクトン反応として区別されている⁶⁰⁾。その結果、TR と種々のアミノ酸および核酸関連化合物との反応による褐変を認めるとともに⁵¹⁾⁵²⁾、その中間体として図9に示すように Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp などのアミノ酸およびグアニン誘導体との縮合物(アミノレダクトン)を結晶状に得た^{53)~56)}。これら縮合物は、アマドリ転位物のエノール型の推定構造と同じ構造をもつ。TR はそのほか α -アミノサリチル酸、ヒ

ドロキシルアミン、オキシム化合物、尿素およびヒドロキシウレアとも反応する⁵⁷⁾。

AsA, TR および TR とアミノ化合物との縮合物は DNA 損傷能ならびに抗腫瘍能を有し、それらの作用は Cu^{2+} によって増強される^{57)~58)}。これらも条件によっては突然変異を惹起しうるものが考えられる。事実、Stich ら⁵⁹⁾は AsA- Cu^{2+} 混液の変異原活性および DNA 切断活性を確かめているが、われわれも図 10 に示すように、これらレダクトン化合物が単独あるいは Cu^{2+} 存在下に TA 100 に対して突然変異を誘起することを認めた⁶⁰⁾⁶¹⁾。とくに AsA ないし TR はある特定の条件においてのみ活性を示す。AsA はビタミン C として重要な食品成分でありこれが変異原活性を示すことはきわめて重大な問題を提起すると思われるが、その誘起条件は限られており、活性も微弱である。AsA 自身は変異原活性を示さず、また 50 mM までは致死効果も認められない⁶⁰⁾。これに 1/1,000 ないし 1/5,000 程度の Cu^{2+} を加えた場合に 5 mM 前後でのみ活性を示す。TR の場

図 10. アスコルビン酸、トリオースレダクトンおよびトリオースレダクトンとアミノ化合物との縮合物の単独あるいは Cu^{2+} 共存下における *Salmonella typhimurium* TA 100 に対する変異原活性

合も 5 mM 前後においてのみ有効であって、 Cu^{2+} を加えると 1~5 mM 程度となり、10 mM 以上ではまったく活性はみられない。他方、AsA の OH 基の 1 個がリン酸基で置換されたアスコルビン酸-2-リン酸にはほとんど活性は認められず⁶⁰⁾、突然変異の発現においても核酸損傷や抗腫瘍作用の場合と同様エンジオール構造が重要であることを示している。これらエンジオールレダクトンに対し、アミノレダクトンの変異原活性は高いように思われる。しかしこれらの場合比較的高濃度を必要とする。これらレダクトン化合物は、蚕の卵母細胞に対して弱いがらも突然変異誘起能をもつ⁶¹⁾。このような機能のほか、レダクトン類は菌の増殖抑制作用も有する⁶²⁾。

3. DNA 損傷様式³¹⁾⁶⁴⁾⁶⁵⁾

変異原活性をもつ化合物が DNA に損傷を与え、DNA 損傷能を有する化合物が変異原活性を示す多くの証明が得られ、突然変異の発現が DNA の損傷と密接に関連することが示唆される。他方、DNA をレダクトンなど核酸損傷剤で処理すると DNA および RNA ポリメラーゼに対するプライマー活性はその作用条件によって変動する⁶⁶⁾。またレダクトン化合物はポリゾームおよびリボゾームに作用しタンパク合成に影響を与える⁶⁷⁾。このように核酸の損傷は DNA の複製、転写、翻訳の各過程の活性に影響を及ぼし、これが突然変異をもたらす要因になることが考えられる。したがって、変異原物質の DNA 損傷作用を検討することによって、突然変異の発現機構の解明に有益な知見が得られるものと思われる。そこで AsA および TR をモデル化合物として用い、それらの DNA 損傷作用をアガローススラブゲル電気泳動法により検討した。AsA および TR の DNA 損傷はとくに Cu^{2+} によって増強される。レダクトン- Cu^{2+} 混液は λ ファージ DNA (3.2×10^7 ダルトン) にきわめて迅速な損傷を起こし、比較的均一な分子量分布をもつ低分子 DNA 断片 (1.5×10^5 ダルトン) のみを生成する (図 11)。このことは混液が λ DNA を非特異的に切断するのではなく、ある程度特異性をもって損傷を起こすことを示唆する。この損傷作用にはエンジオール基が重要に関与し、その酸化を必要とする。 Cu^{2+} はその酸化を促進する。またカタラーゼ、ヒドロキシルラジカル捕捉剤によって阻害されることからヒドロキシルラジカルが損傷に重要に関与する⁶⁸⁾。しかし、 Cu^{2+} 存在下でのレダクトン類の酸化速度 (すなわち、ラジカルの生成速度) と DNA 損傷能とは必ずしも一致しない。もしラジカル分子種のみが DNA 損傷に関与しているのであれば、DNA 分子の損傷は非特異的に起こり、図 11 のような均一な低分子断片は生じず、幅広い分子量分布をもつ低分子 DNA 断片を与えるであろう。このことはレダクトン-

図 11. アスコルビン酸あるいはトリオースレダクトンの Cu^{2+} 共存下における λ ファージ DNA 損傷作用

図 12. Cu^{2+} で前処理した DNA に対するアスコルビン酸、あるいはトリオースレダクトンの作用

9.5 mM DNA を 950 (DNA-A), 95 (DNA-B) および 9.5 (DNA-C) μM Cu^{2+} で前処理したのち反応させた。

Cu^{2+} 混液による DNA 損傷作用にはラジカルの関与に加えて他の要因が必要であることを推定させる。一方、DNA は Cu^{2+} による AsA および TR の酸化を抑制する。また、あらかじめ Cu^{2+} を DNA に作用させて得た Cu^{2+} -DNA 複合体は AsA および TR の酸化能を有する。これらのことは、 Cu^{2+} の DNA 分子への結合もレダクトン類の DNA 損傷作用に大きく寄与すること

を示唆する。そこであらかじめ数種の濃度の Cu^{2+} で DNA を処理し、遊離の Cu^{2+} を除き、DNA に結合している Cu^{2+} の含量を求めると、 Cu^{2+} は処理濃度に応じ DNA に結合する。このような Cu^{2+} が結合した DNA に AsA あるいは TR を作用させると DNA は Cu^{2+} の結合量に応じ損傷を受ける(図12)。また AsA あるいは TR は初めに Cu^{2+} で処理し、続いて EDTA で処理した DNA よりも Cu^{2+} のみで前処理した DNA をより効果的に切断する。このことは DNA に結合した Cu^{2+} には容易に EDTA 処理で除去されるものとされないものの2種類が存在していることを示す。他方、 Cu^{2+} 共存下における AsA あるいは TR の DNA 損傷活性は Cu^{2+} 濃度依存性を示さず、過剰濃度の Cu^{2+} 存在下では損傷活性は低下する。最大の活性は DNA と Cu^{2+} の濃度比が 4:1 のときにみられる。このように Cu^{2+} 共存下での AsA および TR の DNA 損傷作用には Cu^{2+} の DNA 分子への結合も重要に関与し、DNA 分子に結合した Cu^{2+} が遊離の Cu^{2+} よりも効果的な促進活性をもつことが推定された。

つぎに AsA- あるいは TR- Cu^{2+} 混液によって低分子化された DNA をアルカリ性ホスファターゼ (APase) 処理し、5'-OH 末端のリン酸基を除去したのち、ポリヌクレオチドキナーゼによる $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の取込みを調べた。その結果、取込みは APase 未処理および処理 DNA とともに観察され、低分子化された DNA の 5'-OH 末端基の約 40% がリン酸ジエステル結合として、また残り

の約 60% が遊離の OH 基として存在していることが推定された(図13)。また低分子化された λ DNA の 5'-OH 末端のヌクレオチド組成は均一でなく、しかもその組成は native λ DNA のそれとは著しく異なり、 $d\text{CMP}$ を多量に 5'-OH 末端に生成する(表5)。これらの結果から AsA あるいは TR- Cu^{2+} 混液は 5'-OH 末端基にリン酸ジエステル結合ならびに OH 基を有するように、また 5'-OH 末端ヌクレオチドに $d\text{CMP}$ を多量に生成するように、 λ DNA に損傷を与えることが推定された。同様な結果は芳香族レダクトンであるエピネフィリン (Ep) においても得られている²⁵⁾。他方、 Cu^{2+} の DNA 分子への結合部位の一つとして G-C 対が考えられており⁶⁹⁾⁷⁰⁾、5'-OH 末端における多量の $d\text{CMP}$ の生成と考え合わせるとレダクトン類の DNA 損傷部位の一つが Cu^{2+} が結合する G-C 対であることが推察される。そのほか Ep の場合に明らかにされているようなリン酸結合への直接的な攻撃による損傷²⁵⁾、ヒドロキシラジカルの糖部分への攻撃による脱塩基に伴う糖リン酸骨格の開裂⁷¹⁾、塩基の修飾に伴う脱塩基反応⁷²⁾あるいは二重鎖 DNA の挿入による損傷⁷²⁾の可能性も考えられる。AsA ないし TR- Cu^{2+} 混液の場合、ラジカルが DNA 損傷に関与しているが、 Cu^{2+} の特異的な DNA 分子への結合が重要にレダクトン類の DNA 損傷作用に特異性を与えているものと思われる。

4. む す び

アミノカルボニル反応により、微弱ながら少なくとも若干の変異原物質が生成することが明らかになった。本反応は食品の加工、調理ないし貯蔵などに伴って広範にしかも温和な条件下に起こることから日常の食生活に重要な問題を提供する。しかしここで用いた条件は 100°C で 10 時間というモデル反応であって、今後さらに具体的な日常の食生活に即した条件下での検討が必要である。またアミノカルボニル反応だけでなく、ほかの食品成分間の相互反応系についても種々の反応条件下での詳細な検討はもちろん、変異原の確認およびその強さ、生

図 13. アスコルビン酸あるいはトリオースレダクトンと Cu^{2+} 混液によって処理した DNA への $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の取込み

APase: アルカリ性ホスファターゼ

表 5. アスコルビン酸あるいはトリオースレダクトンと Cu^{2+} 混液によって処理された DNA の 5'-OH 末端ヌクレオチド組成

Nucleotide	Count (cpm)		% of radioisotope		% of purine and pyrimidine nucleotides		Base composition of λ DNA
	AsA	TR	AsA	TR	AsA	TR	
<i>d</i> AMP	397	458	16	18	37	42	26
<i>d</i> GMP	536	750	21	24	(Purine)		24
<i>d</i> CMP	1,198	1,218	47	40	63	58	24
<i>d</i> TMP	400	456	16	18	(Pyrimidine)		26

成量あるいは食品中における含量ないしこれらに対応する手段の確立なども詳しく解明されなければならない。生成した変異原物質についてはもちろん小核試験、染色体異常、優性致死作用などの第2次スクリーニングさらには最終的な発がん試験がなされなければならない。これらの解明によって食品の安全性に関する正確な評価を確立するとともに正しい食生活に導く情報を提供するものと期待される。他方、変異原活性とDNA損傷とに密接な関連性が推定され、一部のレダクトンについてCu²⁺共存下のDNA損傷作用が明らかにされた。これらの結果はDNA損傷能の検定が変異原物質の検索に有効な手段であることを示唆するとともに、突然変異の発現機構の解明に有益な知見を与えるものと考えられる。

この稿を終えるにあたり、終始本研究のご指導、ご鞭撻をいただいた九州大学大村浩久教授に厚くお礼申し上げます。本研究は多くの方々の協力によるものであり深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., Yahagi, T., Seino, Y., Okamoto, T., Shudo, K., Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Iitaka, Y. and Itai, A. : *Proc. Jpn. Acad.*, **53B**, 58 (1977)
- 2) Yamamoto, T., Tsuji, K., Kosuge, T., Okamoto, T., Shudo, K., Takeda, K., Iitaka, Y., Yamauchi, K., Seino, Y., Yahagi, T., Nagao, M. and Sugimura, T. : *Proc. Jpn. Acad.*, **54B**, 248 (1978)
- 3) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T., Spingarn, N.E., Weisburger, J.H. and Nishimura, S. : *Proc. Jpn. Acad.*, **56B**, 278 (1980)
- 4) Takayama, S., Hirakawa, T., Tanaka, M., Kawachi, T. and Sugimura, T. : *Toxicol. Lett.*, **4**, 281 (1979)
- 5) Matsukura, N., Kawachi, T., Morino, K., Ohgaki, H., Sugimura, T. and Takayama, S. : *Science*, **213**, 346 (1981)
- 6) Hosaka, S., Matsushima, T., Hirono, I. and Sugimura, T. : *Cancer Lett.*, **13**, 23 (1981)
- 7) 中林敏郎, 木村 進, 加藤博通 : 食品の変色とその化学, 223 (1962), 光琳書院 (東京)
- 8) Waller, G.R. and Feather, M.S. (eds.) : ACS Symposium Series 215, The Maillard Reaction in Foods and Nutrition (1983), American Chemical Society (Washington, D.C.)
- 9) Ames, B.N., MacCann, J. and Yamazaki, E. : *Mutat. Res.*, **31**, 347 (1975)
- 10) Shinohara, K., Wu, R.-T., Jahan, N., Tanaka, M., Morinaga, N., Murakami, H. and Omura, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 671 (1980)
- 11) Omura, H., Jahan, N., Shinohara, K. and Murakami, H. : ACS Symposium Series 215, The Maillard Reaction in Foods and Nutrition (Waller, G.R. and Feather, M.S., eds.), 537 (1983), American Chemical Society (Washington, D.C.)
- 12) Shinohara, K., Jahan, N., Tanaka, M., Yamamoto, K., Wu, R.-T., Murakami, H. and Omura, H. : *Mutat. Res.*, **122**, 279 (1983)
- 13) Yamafuji, K., Shinohara, K., Yoshihara, F., Iio, M. and Torikai, Y. : *Enzymologia*, **40**, 107 (1971)
- 14) Yamafuji, K. and Hashinaga, F. : *Nature*, **210**, 1158 (1966)
- 15) Murakami, H. and Yamafuji, K. : *Enzymologia*, **38**, 337 (1970)
- 16) Yamafuji, K. and Uchida, Y. : *Nature*, **209**, 301 (1966)
- 17) Yamafuji, K. and Uchida, Y. : *Enzymologia*, **35**, 131 (1968)
- 18) Yamafuji, K., Iiyama, S. and Omura, H. : *Enzymologia*, **43**, 113 (1972)
- 19) 飯山 悟, 村上浩紀, 久良木倫生, 大村浩久 : 農化, **47**, 113 (1972)
- 20) Yamafuji, K. and Murakami, H. : *Enzymologia*, **35**, 139 (1968)
- 21) Yamafuji, K., Shinohara, K., Yoshihara, F., Omura, H. and Ogata, N. : *Enzymologia*, **41**, 183 (1971)
- 22) Yamafuji, K., Iiyama, S. and Shinohara, K. : *Enzymologia*, **40**, 259 (1971)
- 23) Shinohara, K., Omura, H., Fukumoto, Y., Torikai, Y. and Yamafuji, K. : *J. Fac. Agric., Kyushu Univ.*, **19**, 169 (1975)
- 24) Yamafuji, K., Murakami, H. and Shinozuka, M. : *Z. Krebsforsch.*, **73**, 195 (1970)
- 25) 村上浩紀 : 農化, **57**, 55 (1983)
- 26) 山藤一雄 : 食物・癌・分化 (1970), 秀巧社 (福岡)
- 27) 大村浩久 : 栄養と食糧, **31**, 9 (1978)
- 28) 大村浩久 : ビタミン, **48**, 503 (1974)
- 29) Omura, H., Iiyama, S., Tomita, Y., Narazaki, Y., Shinohara, K. and Murakami, H. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **21**, 237 (1975)
- 30) 篠原和毅, 福元裕二, 曾 耀崑, 井上 譲, 大村浩久 : 農化, **48**, 499 (1974)
- 31) Shinohara, K., So, M., Nonaka, M., Nishiyama, K., Murakami, H. and Omura, H. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29**, 481 (1983)
- 32) Kada, T. : *Mutat. Res.*, **38**, 340 (1976)
- 33) Doira, H. : The Silkworm (Tazima, Y., ed.), 53 (1978), Kodansha (Tokyo)
- 34) 山下典子, 土井良宏, ジャハーン・ナズマ, 大村浩久 : 栄養誌, **36**, 202 (1983)
- 35) Yoshida, D. and Okamoto, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2521 (1980)
- 36) Powrie, W.D., Wu, C.H., Rosein, M.P. and Stich, H.F. : *J. Food Sci.*, **46**, 1433 (1981)
- 37) Shibamoto, T., Nishimura, O. and Mihara, S. : *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 641 (1981)
- 38) Kanamori, H., Morimoto, K., Kinase, N. and Tomita, I. : *Chem. Pharmacol. Bull. (Tokyo)*, **28**, 3143 (1980)
- 39) Osawa, T., Ishibashi, H., Namiki, M. and Kada, T. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 835 (1980)
- 40) Negishi, T. and Hayatsu, H. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 97 (1979)

- 41) Kada, T., Morita, K. and Inoue, T. : *Mutat. Res.*, **53**, 351 (1978)
- 42) Morita, K., Hara, M. and Kada, T. : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1235 (1978)
- 43) Nakayama, T., Hayase, F. and Kato, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1201 (1980)
- 44) Fujimaki, M., Kato, S. and Kurata, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1144 (1969)
- 45) Mihara, S. and Shibamoto, T. : *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 62 (1980)
- 46) Stich, H.F., Rosin, M.P., Wu, C.H. and Powrie, W.D. : *Cancer Lett.*, **13**, 89 (1981)
- 47) 野村男次, 大村浩久 : レダクトンの化学 (1969), 内田老鶴園新社 (東京)
- 48) Euler, H., Hasselquist, H. and Nomura, D. : *Arki. Kemi.*, **15**, 283 (1960)
- 49) 野村男次 : 農化, **35**, 444 (1961)
- 50) 野村男次 : 化学の領域, **12**, 432 (1958)
- 51) 篠原和毅, 曾 耀崑, 井上 譲, 佐藤雅子, 大村浩久 : 九大農学芸誌, **28**, 139 (1974)
- 52) 李 鎮夏, 篠原和毅, 村上浩紀, 大村浩久 : 農化, **52**, 11 (1978)
- 53) 大村浩久, 井上 譲, 江藤正義, 曾 耀崑, 篠原和毅 : 九大農学芸誌, **29**, 61 (1974)
- 54) 篠原和毅, 曾 耀崑, 朱 光枝, 内野文弘, 大村浩久 : 農化, **49**, 463 (1975)
- 55) 篠原和毅, 朱 光枝, 曾 耀崑, 村上浩紀, 大村浩久 : 九大農学芸誌, **30**, 157 (1976)
- 56) Lee, J.-H., Shinohara, K., Murakami, H. and Omura, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 279 (1979)
- 57) 大村浩久, 藤田明男, 佐藤雅子, 大槻 実, 飯尾雅嘉 : 九大農学芸誌, **28**, 79 (1974)
- 58) 篠原和毅, 曾 耀崑, 富田純史, 井上 譲, 尊田民喜, 村上浩紀, 大村浩久 : 九大農学芸誌, **34**, 59 (1979)
- 59) Stich, H.F., Karim, T., Koropatnic, J. and Lo, L. : *Nature*, **260**, 722 (1976)
- 60) Omura, H., Shinohara, K., Maeda, H., Nonaka, M. and Murakami, H. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **24**, 185 (1978)
- 61) Shinohara, K., Lee, J.-H., Tanaka, M., Murakami, H. and Omura, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1737 (1980)
- 62) 山下典子, 篠原和毅, ジャハン・ナズマ, 鳥飼芳秀, 土井良宏, 大村浩久 : 栄養と食糧, **34**, 367 (1981)
- 63) 篠原和毅, 前田秀夫, 野中美智子, 村上浩紀, 大村浩久 : 栄養と食糧, **34**, 76 (1981)
- 64) Shinohara, K., So, M., Nonaka, M., Nishiyama, K., Murakami, H. and Omura, H. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29**, 481 (1983)
- 65) Shinohara, K., So, M., Nonaka, M., Nishiyama, K., Murakami, H. and Omura, H. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29**, 671 (1983)
- 66) Tomita, Y., Shinohara, K., Fujiki, H., Murakami, H. and Omura, H. : *J. Fac. Agric., Kyushu Univ.*, **24**, 21 (1979)
- 67) Tomita, Y., Shinohara, K., Fujiki, H., Murakami, H. and Omura, H. : *J. Fac. Agric., Kyushu Univ.*, **24**, 37 (1979)
- 68) 藤木博明, 富田純史, 野中美智子, 篠原和毅, 村上浩紀, 大村浩久 : 九大農学芸誌, **36**, 19 (1981)
- 69) Eichhorn, G.L. and Clark, P. : *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **53**, 586 (1965)
- 70) Zimmer, C.H., Luck, G., Fritzsche, H. and Triebel, H. : *Biopolymer*, **10**, 441 (1971)
- 71) Ishida, R. and Takahashi, T. : *Nucleic Acid Res.*, Spec. Publ. **2**, 135 (1976)
- 72) Deniss, I.S. and Morgan, A.R. : *Nucleic Acid Res.*, **3**, 315 (1976)

(昭和59年8月24日受理)