

令和元年6月15日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00562

研究課題名(和文) ポリADPリボース加水分解産物を用いたDNA損傷性物質の定量的活性評価法の開発

研究課題名(英文) Development of DNA damaging agents using poly(ADP-ribose) hydrolysates

研究代表者

高村 岳樹 (Takamura, Takeji)

神奈川工科大学・工学部・教授

研究者番号：50342910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷時に生成するポリADPリボース(PAR)に着目し、その加水分解産物であるリボシルアデノシン(R-Ado)を定量するシステムの構築を行った。種々の変異原性物質で処理した培養細胞から、PARを単離し、加水分解後、LC/MS/MSにより分析することで高感度にR-Adoを定量できることがわかった。R-Adoの生成量は変異原性物質の濃度に依存することが明らかとなり、定量性が示された。種々の変異原物質の投与により、小核試験によるDNA損傷性の強度とR-adoの生成量に相関性があることもわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

身の回りには多くの変異・がん原性物質が存在している。バクテリアを用いる変異原性試験は、これまでも多くの分野で用いられてきており、すでに多くのデータが蓄積されている。一方で培養細胞を用いる遺伝毒性検出系ではヒトリスクを考える上で重要であるが、結果の判定に多くの時間を費やすために労力のいる仕事である。そこで、DNAに損傷が生じたときに起こる細胞内イベントを定量することでより簡潔に、そして精度の良い方法を構築するために、DNA損傷時に生じるポリADPリボース(PAR)の生成に着目した。生成したPARは加水分解後、小分子であるリボシルアデノシンへと変化するため、高感度の分析が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Poly(ADP-ribose) (PAR) is a well known polymer molecule that is produced when DNA strand scissions are formed by the action of alkylating reagents. Because PAR is easily hydrolyzed by the enzymes like phosphatase and phosphodiesterase to form ribosyl-adenosine (R-Ado). Because, quantification of R-Ado is, therefore, estimated to know the amount DNA scissions in cells, high sensitive detection system of R-Ado was required. PAR was initially purified from the cell treated with mutagens, and hydrolyzed by several enzymes to form R-Ado efficiently. Obtained R-ado solution was quantified by the LC/MS/MS. Amounts of R-Ado was well correlated with the activity of the mutagen that formed micronucleus in cells. Moreover, we found that formation rate of PAR is differed among several mutagens.

研究分野：環境発がん

キーワード：変異原の検出 ポリADPリボース

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

環境中や内因性の遺伝毒性物質の DNA 損傷活性の測定には様々なバイオアッセイが用いられている。一般にこれらの方法は半定量的であり、また試験には長時間を必要とする事が多い。このため、迅速に化合物の DNA 損傷能を定量的に検出する系が求められている。また環境汚染物質による DNA 損傷活性を評価するために、細胞内メカニズムに機軸を置いた「報告例のない新たな評価系」を開発することで、従来とは異なった視点からの DNA 損傷性化合物（遺伝毒性物質）の再評価を行うことが可能であり、新規の系と従来の方法論と合わせて化合物のリスク評価に大いに貢献することが期待される。そこで本研究では遺伝毒性物質の DNA 活性損傷活性を定量的に検出する系として、細胞内の DNA 損傷応答として知られているポリ ADP リボースに注目し、その加水分解産物を高感度に定量する方法を用いることで、DNA 損傷活性の新たな定量評価の方法論を構築し、さらに構築した系の評価を他の方法論と比較しながら行うことを目的とする。

PAR 由来の R-Ado を DNA 損傷性物質の活性測定に用いた研究はこれまでに報告例がない。技術的に類似の研究となるのは国内にはなく、国外の以下の 2 例である。単離した PAR を加水分解後、得られた R-Ado をエテノ体へと化学修飾させ、HPLC-蛍光検出で測定する方法では PAR より生じる R-Ado 分析の先駆的な研究であるが、HPLC による分離・定量にはクロマト分離が不十分で必ずしも成功していない（Jacobson, M.K. et al., Posttranslational covalent modifications of proteins, Academic Press, 1983, p343）、一方、PAR を加水分解後、得られる R-ado を LC/MS/MS により分析する方法である（Martello et al., ACS Chem. Biol. 2013, 8, 1567-1575）は本申請研究と技術的な面

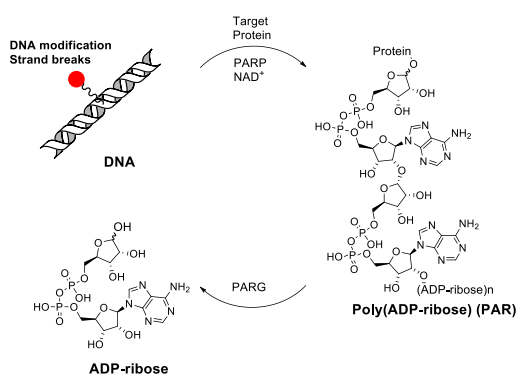


図1 PARPによるPARの生成
PARは200量体程度までのポリマーになる。

（Jacobson, M.K. et al., Posttranslational covalent modifications of proteins, Academic Press, 1983, p343）、一方、PAR を加水分解後、得られる R-ado を LC/MS/MS により分析する方法である（Martello et al., ACS Chem. Biol. 2013, 8, 1567-1575）は本申請研究と技術的な面（LC/MS/MS の使用）で同様の手法を用いている。しかしながら、PARP 活性阻害薬剤の開発が主たる目的であり、本申請研究に於ける「変異原性物質の活性検出系構築」の研究とは異なり着眼点も異なっている。

2. 研究の目的

ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) は DNA の切断などの損傷時に DNA 損傷部位近くのタンパク質 (ヒストンなど) に、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)を基質として ADP リボースを付加重合させる酵素である。PARP を介したこの重合反応は、DNA の切断時に極めて短時間に生じることが知られている。生成したポリ (ADP-リボース) (PAR) は一定時間、核内に蓄積され、その後、加水分解酵素 (PARG) により、モノマーの ADP-リボースに分解され、NAD へ再利用される。この一連の細胞内反応において、細胞内の PAR の蓄積は DNA の損傷量と相関が有るため、細胞内の PAR の測定が可能となれば、環境中の DNA 損傷物質の早期の検出系として期待できる。そこで、本申請研究では、細胞内の蓄積された PAR の新たな検出系を構築し、その適応範囲、従来からの方法論との比較を行い、本開発方法の長所、短所を明らかにすることを目的とし、さらには、迅速な検出

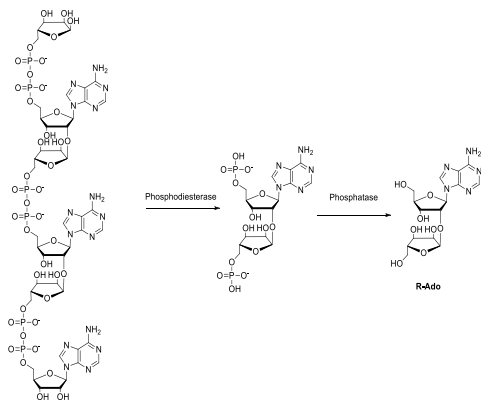


図2 PARからのR-Adoの生成

体を用いる②および③では操作が煩雑であり、定量性に限界がある。そのためDNA損傷性物質の「迅速な検出」や「損傷能の強度の相互比較」には、不向きな欠点がある。これらの欠点を埋める新たな方法論の構築を行う。

PARは生体内ではPARGによりADPリボースに加水分解されるが、単離したPARにフォスファターゼ等を人為的に作用させ、ホスホジエステル結合を標的として加水分解を行うと、PAR由来のR-Adoが生成する(図2)。そのため、生成するR-Adoを定量することにより、細胞内のPARの蓄積を知ることが可能であり、ひいてはDNAの損傷を定量することが可能である。

3. 研究の方法

研究はいくつかに分けて行った。

(1) PolyADPリボースの精製とか水分海産物の定量法の開発

いくつかの培養細胞を用いて、過酸化水素処理をするときに生じるR-Adoの回収方法を検討した。その後、LC/MS/MSによる分析条件を最適化した。

(2) 種々のアルキル化剤に対するR-Adoの生成定量

最適化した条件で、種々の変異原性物質で培養細胞を処理し、生成するR-Adoの定量を行うとともに、既存の方法との感度の比較を行った。

(3) 標準物質のR-Adoの合成方法の検討

文献記載の方法でR-Adoの合成を試みた。行った方法ではいくつかの問題点があり、まだ解決には至っていない。そのため研究成果は(1)と(2)について記載した。

4. 研究成果

(1) R-Adoの回収方法の検討

PARの細胞からの回収には既知文献を参考にし、その回収方法の検討を行った。その結果、細胞をTCAによる細胞の固定化を氷上静置(30分間)で行い、その後、アルカリ処理によるPARのタンパク質からの脱離処理を行った。アルカリ処理後、高濃度のMOPS bufferを使用し、pHを調整後、RNase、DNase、Proteinaseで処理を行った。得られた加水分解産物は、microRNA精製キットを使用して、PARの回収を行った。このとき、アルカリ脱離の後塩酸を使用した再再現性が乏しいこと、また精製キットを用いない場合でも、目的とするPAR

系へ応用展開できるキットの開発を目標とする。これまでに、細胞内のPARの検出系としては、① PAR活性を測定する目的でのELISAを用いる方法、② PAR抗体を用いるin situ蛍光染色の方法、③ PARを単離した後のゲル電気泳動の方法などがあげられる。①ではDNA損傷をin vitroで検出可能な場合は、有効であるが、多くの遺伝毒性物質は細胞内で代謝活性化を受けDNAの損傷を引き起こすため、そのような化合物を検出するには不向きである。また、PARの抗

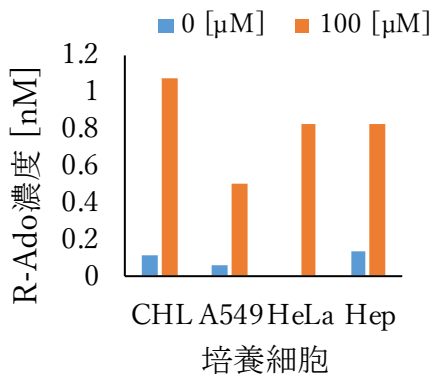


図3 各種培養細胞を用いた過酸化水素添加時における R-Ado の生成

が検出されなかった。キット精製後、得られた PAR は Phosphodiesterase および Phosphatase で処理をし R-Ado まで加水分解させた。標準物質の PAR を用いた場合、この方法による回収率は 70% 程度であることがわかった。

一方、種々の培養細胞 (HeLa, A549, HepG2, CHL/IU) に 100 μM の過酸化水素で処理した場合、いずれの細胞でも R-Ado の生成が確認された。もともと PAR が生成していることも確認された。なかでも CHL 細胞を用いた場合 PAR の生成が多いことが明らかとなった。

(2) LC/MS/MS の条件検討

R-Ado の LC/MS/MS による分析条件の検討を行った。LC/MS/MS で条件最適化を行った。その結果、HPLC および MS/MS の測定条件を以下に示した。その結果、HPLC カラとして ODS 系の InertSustain C18 (2.1×150mm)(GL Sciences)を用い、溶離液として以下のグラジエント溶離により、明瞭なピークを与えることがわかった (溶離液 A: 1 mM ギ酸アンモニウム、溶離液 B: アセトニトリル、グラジエント条件: 0 min から 5 min まで 0% B、5 min から 20 min まで直線勾配で 7.5% B)。また流速は 0.3 mL/min. で分析をおこなった。MS/MS による分析では R-Ado の分子イオンピークからリボースが脱離した m/z 400 → 136 を選択した。イオン化条件は以下のとおりである。(イオン源; カーテングス流量: 40.0 L/min、コリジョンガス流量: 4 L/min、イオンスプレー電圧: 5000 V、イオン源温度: 500 °C、イオン源ガス流量 1: 50 L/min、イオン源ガス流量 2: 80 L/min.) この条件で良好な直線性を有する検量線を作成できることがわかった。

(3) LC/MS/MS による各種変異原物質の R-Ado の生成

小核試験等で用いられることの多い CHL/IU 細胞を用いて、各種変異原性物質の R-Ado 生成能についても検討を行った。一般的に入手可能な変異原性物質であり、アルキル化剤として作用するものを選定した。選んだ化合物はエピクロロヒドリン (Epi)、グリシドール (Gly)、メチルメタンサルホン酸 (MMS)、N-メチル-N-ニトロソグアニジン (MNNG)、マイトマイシン C (MMC) である。MMS や MNNG などの強いアルキル化剤では、処理後 60 分で R-Ado の生成が確認された (図 4)。

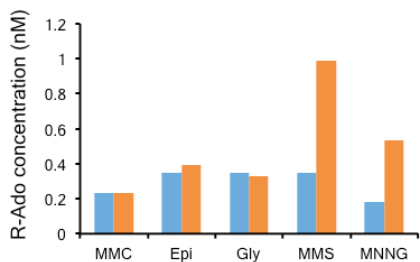


図4 各種変異原物質を投与したときの R-Ado の生成

一方で、Gly および MMC では生成の上昇は確認されなかった。そこで、処理時間の変更し、経時的な変化を確認した。その結果 MMS などは生成後 1 時間ほどで、R-Ado の生成が減少するのに対し MMC は 24 時間後にその生成量が最大となる結果となった。このことは MMC はアルキル化するためにエポキサイドへの代謝が必要であり、そのための時間が別途必要であることを示している。また得られた結果は小核試験とよく相関することがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Nakatsukasa Hiroko, Oda Mayumi, Yin Jinghua, Chikuma Shunsuke, Ito Minako, Koga-Iizuka Mana, Someya Kazue, Kitagawa Yohko, Ohkura Naganari, Sakaguchi Shimon, Koya Ikuko, Sanosaka Tsukasa, Kohyama Jun, Tsukada Yu-ichi, Yamanaka Soichiro, Takamura-Enya Takeji, Lu Qianjin, Yoshimura Akihiko (2019) Loss of TET proteins in regulatory T cells promotes abnormal proliferation, Foxp3 destabilization and IL-17 expression *International Immunology* 31, 335.
2. Kaneko Hiroaki, Ishiwata Shin-Ichi, Liao Yi-Chang, Takamura-Enya Takeji (2018) The genetic diversities and phylogenetic relationships of two genera, *Ecdyonurus* and *Afronurus*, of Heptageniidae (Ephemeroptera) in the Yaeyama Islands and Taiwan *Biogeography* 60, 6
3. 橋本亜紀子、高村岳樹 (2018) フラーレン誘導体の活性酸素発生能および抗酸化作用 *月刊ファインケミカル 後の頁 月刊ファインケミカル* 47, 5
4. 吉野 秀吉、遠藤 和豊、佐藤 千晶、石綿 進一、高村 岳樹、齊藤 貴 (2018) ハンナチェッカーによる河川水中の硝酸イオンおよびリン酸イオンの簡易吸光度測定 *化学と教育* 66, 36.
5. Hashimoto Akiko, Yamanaka Takehiro, Takamura-Enya Takeji (2017) Synthesis of novel fluorescently labeled water-soluble fullerenes and their application to its cellular uptake and distribution properties. *Journal of Nanoparticle Research* 19, 402
6. Someya Kazue, Nakatsukasa Hiroko, Ito Minako, Kondo Taisuke, Tateda Ken-ichi, Akanuma Takashi, Koya Ikuko, Sanosaka Tsukasa, Kohyama Jun, Tsukada Yu-ichi, Takamura-Enya Takeji, Yoshimura Akihiko (2017) Improvement of Foxp3 stability through CNS2 demethylation by TET enzyme induction and activation. *International Immunology* 29, 365

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 坂本柊哉, 高村岳樹, 小田美光(2019) umu 試験を用いた下水処理排水の遺伝毒性評価 日本化学会第 99 春季年会
2. 森みずき 高村岳樹(2018) ナノダイヤモンド-臭化エチジウム複合体の細胞毒性評価 日本化学会第 98 春季年会
3. 橋本 亜紀子 山中 岳寛・高村 岳樹(2018) 蛍光フルーレンの合成と評価 日本化学会第 98 春季年会
4. 橋本亜紀子, 高村岳樹(2018) フラーレン誘導体の遺伝毒性及び細胞毒性の評価第 43 回 日本化粧品学会
5. 森 みずき, 高村 岳樹(2018) 変異原性物質エチジウムブロマイドの細胞毒性評価 日本環境変異原学会第 47 回大会
6. Mizuki Mori, Takeji Takamura-Enya (2018) Cytotoxicity evaluation of nanodiamond doped with ethidium bromide, 2nd International Conference and Exhibition on Nanomedicine and Drug Delivery (国際学会)
7. 前迫 侑也, 椎崎 一宏, 高村 岳樹, 戸塚 ゆ加里 職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析) (2018) 日本環境変異原学会第 47 回大会
8. 中谷 奈央子, 炬口 茜, 福本 航大, 倉岡 功, 高村 岳樹, 川西 優喜, 八木 孝司 (2018) 各種変異原による突然変異誘発における各 TLS ポリメラーゼの働き 日本環境変異原学会第 47 回大会
9. 高村 岳樹、村上 湖都美、小笠原 楓、益谷 美都子(2016) ポリ (ADP-リボース) 加水分解産物を用いた新規な DNA 損傷活性測定法の開発 日本環境変異原学会第 45 回大会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：益谷 美津子
ローマ字氏名：Masutani Mitsuko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。