

令和元年6月20日現在

機関番号：33903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K17924

研究課題名(和文) 酵素処理差別化を用いたDNA付加体のオミクス分析法の開発と非侵襲的分析への展開

研究課題名(英文) Development of quantitative analysis methods for DNA adducts using selective enzymatic treatment

研究代表者

村上 博哉 (MURAKAMI, Hiroya)

愛知工業大学・工学部・准教授

研究者番号：40515128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体内におけるDNAは、さまざまな化学物質に暴露されており、それらが原因でDNA付加体が形成する。それら生成したDNA付加体が、がん化の原因となると考えられており、種々のDNA付加体の定量分析が進められている。本研究課題では、液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化-タンデム型質量分析法(LC-ESI-MS/MS)を用いた網羅的なDNA付加体の定量分析手法の開発を目指し、前処理系や分離系、検出系などに関する高性能化について検討を行なった。その結果、前処理系の開発などでは、固相抽出用の新規な吸着分離剤の開発について研究を進め、その高性能化を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における前処理系や分離系、検出系などに関する種々の検討で得られた研究成果は、今後の網羅的なDNA付加体の定量に貢献できる成果であることから、本分野のさらなる発展に寄与できるものである。そのため、今後のがん研究などにおけるDNA付加体の定量を支援する可能性があり、将来的には医療分野への貢献も期待できる。さらに、前処理系に関する検討により得られた成果は、本研究課題のDNA付加体の定量分析だけにとどまらず、その他の様々な分野における定量分析の高性能化を可能にする知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：DNA is exposed to a variety of chemical compounds, which generate various DNA adducts in DNA. Because DNA adducts generated in DNA have been thought to relate to the mutagenic and carcinogenic effect, a variety of DNA adducts have been quantitated and studied. In this research, to develop the quantitative method for the comprehensive DNA adducts analysis by using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS), we have studied the improvements of performance of pretreatment, separation and the sensitive in ESI-MS. In these studies, for example, new sorbents for solid phase extraction were developed for the pretreatment of DNA adducts.

研究分野：分析化学

キーワード：DNA付加体 網羅的 前処理 質量分析 クロマトグラフィー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体中の DNA は、様々な化学物質に日常的に晒されており、それら化学物質の付加などが起こり、その結果、損傷を受けている。それらの損傷で生成する DNA 付加体は、がん発症のファーストステップであると考えられており、DNA 中における生成量が以前より注目されている。しかし、DNA 中における DNA 付加体の残存量は、生体中の高度な修復機構の存在により極微量であり、 $10^6 \sim 10^9$  個の正常塩基のうちわずかに数個程度でしか存在しないことが知られている。そのため、定量手法には非常に高い感度が要求される。その定量手法として、以前は非常に高い感度を有する  $^{32}\text{P}$  を利用した放射標識法が用いられていたが、安全性の問題などからその代替法の開発が求められていた。その代替法として、近年では液体クロマトグラフィー エレクトロスプレーイオン化 タンデム型質量分析法 (LC-ESI-MS/MS) を用いた定量手法が用いられるようになってきている。LC-ESI-MS/MS は、非常に高感度であることに加えて、MS を駆逐することにより化合物の構造情報を得ることも可能であることから、未知・既知の DNA 付加体の検出が可能となる。そのため、LC-ESI-MS/MS を利用した DNA 付加体の定量結果が数多く報告されている。またそれらに加えて、網羅的に DNA 付加体を解析・評価する DNA adductomics の概念が注目されていることから、LC-ESI-MS/MS を用いた定量手法の高性能化も求められている。

DNA 付加体の定量分析では、上述のとおり大過剰に共存する未損傷体中の DNA 付加体の定量が求められることから、LC-ESI-MS/MS などの分析に供する前段階における試料の適切な前処理が必要不可欠となる。その前処理手法としては、固相抽出法などが用いられており、我々も DNA 付加体の定量に最適化された固相抽出法について報告している。また DNA 付加体の分析では、分析対象となる DNA に対して酵素処理を施し、モノマーである 2'-deoxynucleoside へと変換し、定量を行うのが一般的な手法として利用されている。その一方で、酵素が未損傷体と DNA 付加体を区別 (差別化) することが可能であることが知られている。さらに、微量成分である DNA 付加体の定量では、測定に必要な試料量の低減や汎用機器での定量を可能にするために、LC-ESI-MS/MS を用いた定量法のさらなる高感度化が求められているのが現状となっている。これらに加えて近年では、DNA 付加体の定量に限らず、一般的に血液などの侵襲的試料中の成分をマーカーとして利用するアプローチから低・非侵襲的試料の利用が望まれている。そのため、これまでの血液や臓器などに由来する DNA を利用した DNA 付加体の定量分析に加え、非侵襲的試料を利用した DNA 付加体の定量手法の確立も求められている。

以上のような理由より、LC-ESI-MS/MS を用いた DNA 付加体の高精度定量分析において、固相抽出などを用いた前処理、LC などの分離系、MS の高感度化などのさらなる高性能化が求められていた。

### 2. 研究の目的

以上のような背景のもとに本研究では、酵素を利用した DNA 付加体の選択的な抽出法の確立や、固相抽出法を用いた前処理手法の高性能化について検討を進めた。さらに親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)-ESI-MS/MS を用いた DNA 付加体の定量分析手法のための分離系の改善や感度改善などについても同様に検討を進めた。本成果報告では、これらの中でも、前処理手法の改善を目的として進めた固相抽出用の吸着分離剤の開発に関して重点をおいて報告する。

一般的に固相抽出法では、様々なメーカーから市販されている吸着分離剤を利用した固相抽出法が開発され、定量分析に利用されている。我々も DNA 付加体の定量分析における前処理手法として、市販の固相抽出用吸着分離剤を利用し、前処理を施し、定量分析を進めてきている。市販の吸着分離剤でも高精度な前処理が可能となる。その一方で、固相抽出に供するのみで、分析対象物のみを選択的に抽出・濃縮することは、非常に困難である試料を対象とすることが多く、洗浄溶媒などを種々選択し、夾雑成分を除去するのが一般的である。そのため、前処理手法としてはある程度の妥協をしたものとなっているのが現状となっている。そのため、固相抽出用の吸着分離剤の高性能化が必要不可欠であるが、固相抽出用の吸着分離剤の開発は、これまで企業が進めてきている部分が多く、基礎研究に関する報告がそれほど多くないのが現状である。そこで、DNA 付加体において我々が利用している逆相型の吸着分離剤の高性能化について検討を進めた。さらに逆相型の吸着分離剤の開発と並行し、DNA 付加体などの核酸関連化合物が高極性であることから、それらの化合物に対しても高い捕捉特性を有する吸着分離剤の開発を目指し、HILIC 型の固相抽出用の吸着分離剤の開発についても検討を進めた。

### 3. 研究の方法

(1) 逆相型吸着分離剤では、以前よりスチレン ジビニルベンゼン共重合体を用いたものが利用されてきている。一方、近年では hydrophilic-lipophilic balance (HLB) 型の逆相型吸着分離剤が汎用的に利用されるようになってきている。HLB 型の逆相型吸着分離剤は、逆相モードを発現させるための疎水性モノマー (ジビニルベンゼン (DVB) など) に加え、親水性モノマーを配合することによって合成されたものである。親水性モノマーは、疎水性モノマーだけでは困難である濡れ性などを吸着分離剤に付与することを可能にし、極性化合物の捕捉を可能にする。本研究では、DVB を母骨格とし、様々な親水性モノマーを選択し、細孔物性等を最適化することによって、極性化合物の捕捉特性の改善を行った。

(2) HILIC では、固定相表面に形成される水和層との分配により分離が達成されると言われている。さらに HILIC では、固定相における水和層形成を可能にしている極性官能基に由来する二次効果相互作用が発現し、それらの相互作用も化合物の分離に影響を与えることが知られている。そこで本研究では、DNA 付加体との親和性の発現を期待し、合成した親水性基材樹脂に対して、アデニンを修飾した HILIC 型固相抽出用樹脂を合成し、その捕捉特性について検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 逆相型吸着分離剤の開発では、DVB をベースに、3 種類の親水性モノマー (ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)、glycerol dimethacrylate (GDMA)、trimethylolpropane trimethacrylate (TMPTMA)、Fig. 1) を採用し、各条件で合成を行い、その捕捉特性について詳細に検討を進めた。まず親水性モノマーによる影響を調べるために、DVB/親水性モノマーの量比を 8/2 とし、それらの吸着分離剤の極性化合物の捕捉特性について評価を行った。なお、極性化合物としては、uracil や uridine、adenine などの核酸関連化合物を用いて評価を行った。その結果、3 種類の親水性モノマーの中で、GDMA と TMPTMA を配合した樹脂において、比較的高い捕捉特性を確認した。そこでこれら 2 種類の親水性モノマーに注目し、HLB の最適化について検討を進めたところ、親水性モノマー比の増加に伴い、極性化合物の捕捉特性が相対的に減少することが明らかとなった。また、親水性モノマーの増加により、極性相互作用の増強も期待されたが、捕捉選択性に関しては大きな変化は観察されなかった。以上の結果から、DVB/親水性モノマー=8/2 の量比に固定し、細孔物性を変化させることによる捕捉特性の変化について検討した。

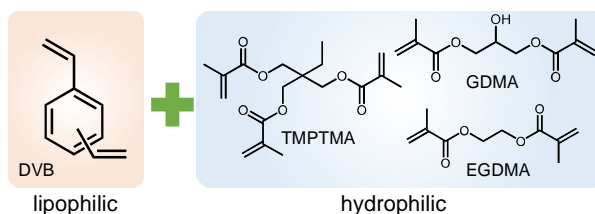


Fig. 1 本研究で用いたモノマー

次に、細孔の形成に重要な役割を担う、細孔調節剤の影響について検討を進めた。細孔調節剤としては、上述までの合成においては、butyl acetate (BuOAc) と 3-methyl-1-butanol (isoamylalcohol, IAA) を、BuOAc/IAA=4/1 のものを利用していましたが、溶解度パラメーター等を考慮し、toluene (TOL) に変更し、モノマーに対して等倍量および 2 倍量を加え、それぞれ吸着分離剤の合成を行い、それらの捕捉特性について評価を行った。まず、TMPTMA を親水性モノマーとして含有した吸着分離剤では、細孔調節剤を BuOAc/IAA から TOL へと変更することによって、極性化合物の捕捉特性の改善が確認された。またモノマーに対して TOL を 2 倍量にすることによって、さらに捕捉特性の改善を確認することができた。その一方で、GDMA 含有の吸着分離剤では、細孔調節剤の種類や量の変更による捕捉特性の大きな改善は確認することができなかった。そこでそれぞれの樹脂に関して、比表面積の測定を行ったところ、DVB/GDMA では細孔調節剤の種類や量の変化に伴う比表面積の変化がそれほど大きくなかった。その一方で、DVB/TMPTMA では種類の変更および量の変更によるそれぞれの樹脂における比表面積の拡大を確認することができた。そこで、さらなる比表面積の拡大を検討するために、55%純度の DVB を利用した合成から 80%純度の DVB へと変更することによる影響について検討を行った。その結果、比表面積の拡大を DVB/GDMA および DVB/TMPTMA の吸着分離剤のそれぞれで確認することができた。さらに比表面積の拡大に伴い、極性化合物の捕捉特性の改善も確認することができた。

これら最適化された吸着分離剤について、様々な極性化合物に対する捕捉特性を市販品の逆相型の吸着分離剤と比較したところ、我々が開発した吸着分離剤が市販品と比較して、極性化合物への高い捕捉特性を有していることが明らかとなった。

(2) HILIC モードでの分離では、固定相における水和層形成が非常に重要な役割を担う。そこで、基材樹脂として親水性を付与することが期待できる glycidyl methacrylate (GMA) と EGDMA および GMA と GDMA の共重合体をそれぞれ合成し、GMA に存在するエポキシ基を介してアデニンを修飾した HILIC 型の吸着分離剤の合成を行った (Fig. 2)。その結果、合成したアデニン修飾樹脂に関して、元素分析を行った結果、アデニンが修飾されていることが明らかとなった。

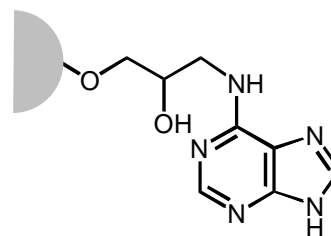


Fig. 2 アデニン修飾型樹脂

そこで合成した樹脂について、HILIC 条件下における核酸関連化合物の捕捉特性について評価を行った。まず基材樹脂の捕捉特性を評価するために、基材樹脂中のエポキシ基を開環したジオール型樹脂 (アデニンは未修飾) の合成を行い、核酸関連化合物の捕捉について検討した。その結果、ジオール型の樹脂では、核酸関連化合物を明確に捕捉することはできなかった。その一方で、アデニンを修飾した吸着分離剤においては、架橋剤の種類に限ることなく、極性化

合物の捕捉を確認することができた。これらは、修飾されたアデニンに由来する水和層の形成に加えて、アデニンに由来する水素結合等の二次効果相互作用が発現し、核酸関連化合物の捕捉が起こった可能性が考えられる。またその捕捉特性は、基材樹脂の架橋剤として用いたEGDMAとGDMAの違いにより、捕捉特性も異なることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 6 件)

岩政衣美、三木雄太、井上嘉則、江坂幸宏、村上博哉、手嶋紀雄、“DNA付加体の網羅的分析を目指したHILIC分離条件の検討”、分析化学、査読有、67、2018、479-484、

<https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.67.479>

三木雄太、村上博哉、尾宮美保、江坂幸宏、井上嘉則、手嶋紀雄、“アデニンを修飾した新奇吸着分離剤の核酸関連化合物に対する固相抽出特性”、分析化学、査読有、67、2018、445-451.

<https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.67.445>

Hiroya Murakami, Takuya Aoyanagi, Yuta Miki, Hiroki Tomita, Yukihiro Esaka, Yoshinori Inoue, Norio Teshima, “Effects of hydrophilic monomers on sorptive properties of divinylbenzene-based reversed phase sorbents”, Talanta, 査読有, 185, 2018, 427-432.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.093>

Yukihiro Esaka, Kenji Hisato, Takuhei Yamamoto, Hiroya Murakami, Bunji Uno, “Evaluation of type A endonucleases for quantitative analysis of DNA damages due to exposure to acetaldehyde using capillary electrophoresis”, Anal. Sci., 査読有, 34, 2018, 901-906.

<https://doi.org/10.2116/analsci.18P087>

Hiroya Murakami, Ruri Horiba, Tomoko Iwata, Yuta Miki, Bunji Uno, Tadao Sakai, Kazuhiro Kaneko, Yasushi Ishihama, Norio Teshima, Yukihiro Esaka, “Progress in a selective method for the determination of the acetaldehyde-derived DNA adducts by using HILIC-ESI-MS/MS”, Talanta, 査読有, 177, 2018, 12-17.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.055>

村上博哉、神谷修平、柘植政宏、葛谷真美、森田健太郎、酒井忠雄、手嶋紀雄、“鉄鋼中リン定量法の高度化を指向した酸化処理の視覚情報収集とフローインジェクション吸光度分析”、分析化学、査読有、65、2016、387-392.

<https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.65.387>

### 〔学会発表〕(計 18 件)

Hiroya Murakami, Development of various sorbents having different separation mode for hydrophilic compounds, International Symposia on Research towards Green Innovation 2018, 2018 Miho Omiya, Hiroya Murakami, Yuta Miki, Yukihiro Esaka, Yoshinori Inoue, Norio Teshima, Development of nucleobase-modified sorbents for HILIC separation, Flow Analysis XIV, 2018

Hiroya Murakami, Emi Iwamasa, Yuta Miki, Yoshinori Inoue, Yukihiro Esaka, Norio Teshima, Study on the optimization of HILIC separation for DNA adductomics, Flow Analysis XIV, 2018

江坂幸宏、村上博哉、久戸賢治、國嶋咲希、吉元亜希子、石濱 泰、手嶋紀雄、宇野文二、DNA塩基損傷の定量的分析手法の構築、日本分析化学会第67年会、2018

村上博哉、岩政衣美、杉山拓也、三木雄太、井上嘉則、江坂幸宏、手嶋紀雄、網羅的DNA付加体定量分析を目指したHILIC分離系の開発、日本分析化学会第67年会、2018

村上博哉、DNA損傷体定量法の高感度化および前処理手法の高性能化に関する研究、第37回分析化学中部夏期セミナー(中部支部・近畿支部合同夏期セミナー)、2018

三木雄太、尾宮美保、江坂幸宏、村上博哉、井上嘉則、手嶋紀雄、核酸関連化合物を修飾した吸着分離剤の捕捉特性評価、第78回分析化学討論会、2018

村上博哉、井上嘉則、手嶋紀雄、前処理技術向上のための固相抽出法の高機能化と流れ分析への展開、第78回分析化学討論会、2018

久戸賢治、山本拓平、村上博哉、宇野文二、江坂幸宏、“アセトアルデヒドによるDNA損傷検出のためのCEによるa型ヌクレアーゼ反応解析”、第37回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2017

江坂幸宏、中村文音、山本拓平、村上博哉、宇野文二、非水系CEを用いた金属錯体の化学量論・錯体構造変化の追跡、第37回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2017

村上博哉、青柳拓哉、三木雄太、富田博貴、井上嘉則、手嶋紀雄、逆相系固相抽出用吸着分離剤における親水性モノマーの影響に関する研究、第28回クロマトグラフィー科学会議、2017

Hayato Araki, Hiroya Murakami, Yuta Miki, Ruri Horiba, Bunji Uno, Yukihiro Esaka, Norio Teshima, Development of highly sensitive quantitative method of acetaldehyde-DNA adducts by LC-ESI-MS/MS, The 21st International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA 2017), 2017

Takuya Aoyanagi, Yuta Miki, Hiroya Murakami, Yoshinori Inoue, Norio Teshima, Comprehensive research on solid phase extraction adsorbent for hydrophilic compounds, The 21st International

Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA 2017)、2017.

Hiroya Murakami, Hayato Araki, Yuta Miki, Bunji Uno, Yukihiro Esaka, Norio Teshima, Development of HILIC-ESI-MS/MS method for DNA adductomics, The 21st International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA 2017), 2017.

村上博哉、青柳拓哉、三木雄太、井上嘉則、手嶋紀雄、親水性化合物へ適用可能な新規前処理用吸着剤開発に関する研究、日本薬学会 137 年会、2017 年

青柳拓哉、村上博哉、三木雄太、井上嘉則、手嶋紀雄、複素環および親水性化合物に特異性を示す新規前処理用吸着剤開発に関する網羅的研究、第 27 回クロマトグラフィー科学会議、2016

荒木逸杜、村上博哉、堀場瑠璃、宇野文二、石濱泰、江坂幸宏、手嶋 紀雄、LC-ESI-MS による DNA 付加体分析のためのイオン化効率改善に関する研究、第 76 回分析化学討論会、2016

村上博哉、高感度 DNA 付加体分析のための前処理手法の開発、第 76 回分析化学討論会、2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://aitech.ac.jp/~analabo>

## 6 . 研究組織

### (1)研究協力者

研究協力者氏名：手嶋 紀雄

ローマ字氏名：(TESHIMA, norio)

研究協力者氏名：江坂 幸宏

ローマ字氏名：(ESAKA, yukihiro)

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。