

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (S)

研究期間：2006～2010

課題番号：18101003

研究課題名 (和文) DNA アダクトーム解析による未知 DNA 損傷の構造決定とその生物影響評価

研究課題名 (英文) Identification of new DNA damages by DNA adductome analysis

研究代表者 松田 知成

(MATSUDA TOMONARI)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50273488

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：DNA アダクトーム、DNA 付加体、突然変異、LC/MS/MS

## 1. 研究計画の概要

DNA 付加体を網羅的に解析する手法「DNA アダクトーム解析」を用いてヒト臓器中に存在する未知の DNA 付加体を同定し、その生物学的意義 (突然変異誘発、DNA 修復機構) を明らかにする。

## 2. 研究の進捗状況

## (1) ヒト臓器 DNA アダクトーム解析

共同研究者の協力を得て、ヒト臓器 DNA を収集した。研究実施には所属大学の倫理委員会 の許可を得た。

主要な臓器 DNA について数検体ずつ DNA アダクトーム解析を行った。その結果、臓器間で生成する付加体のパターンが大きく異なることが明らかになりつつある。また、主要な付加体ピークについて、付加体の同定を進めている。その結果脂質過酸化反応によって生成する 4-oxo-2-nonenal や 4-oxo-2-hexenal 由来の DNA 付加体が普遍的に存在することが明らかになった。特に 4-oxo-2-hexenal 由来の DNA 付加体は産業医大の葛西教授らが発見した新規の DNA 付加体であり、今回の共同研究により、ヒト臓器中での存在が初めて明らかになった。また、これら付加体を含めた、過酸化脂質由来 DNA 損傷 20 成分の同時分析法を開発し、約 100 検体のヒト臓器 DNA で精密な定量を行い、ヒト臓器における DNA 損傷の実態の一端を解明した。

## (2) DNA 付加体の生物学的意義の解明

環境発がん性物質 3-ニトロベンゾアントロン (NBA) による DNA 付加体の生物学的意義を解析した。まず、付加体の生成をラットやヒト肝がん由来細胞 HepG2 株を用いて解析したところ、dG-(C8-N)-ABA、dG-(N2-C2)-ABA、

dA-(N6-C2)-ABA の 3 種類の DNA 付加体を検出した。生成量は前 2 者が多かった。次いで、細胞を NBA 曝露後しばらく培養し、細胞に DNA 修復させた後、DNA を回収し LC/MS/MS で分析した。その結果 dG-(N2-C2)-ABA は多く検出されたが他の付加体は減少していた。このことから dG-(N2-C2)-ABA の修復は遅いと考えられる。最後に、NBA 付加体の TLS を調べるため、これら 3 種類の付加体を部位特異的に持つプラスミドを作製した。プラスミドをそれぞれ大腸菌に複製させたところ、dG-(N2-C2)-ABA は他の 2 種類の付加体に比べ、DNA 合成を強く阻害し、また TLS により複製された娘プラスミドも変異が多かった。以上のことから NBA により生じる付加体のうち、dG-(N2-C2)-ABA が最も変異に対する寄与が高いと示唆された。

## 3. 現在までの達成度

## ② おおむね順調に進展している。

当初の研究計画に従って研究を進めており、進捗もおおむね順調である。さらに、当初計画には具体的に入れることができなかった、DNA 修復タンパク質のプロテオーム解析が、連携研究者の技術提供により可能になってきた。これは、まだクリアすべき課題はいくつか残されているが、うまくいけば強力な飛び道具になるので、当初計画よりも深い研究成果が期待できる。

## 4. 今後の研究の推進方策

引き続き未知 DNA 付加体の構造解析を行うと共に、DNA 付加体に特異的に結合するタンパク質をプロテオーム技術を用いて解析する予定である。

5. 代表的な研究成果  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 39 件)

1. Okamoto, Y., Chou, P., Kim, S., Suzuki, N., Laxmi, Y., Okamoto, K., Liu, X., Matsuda, T. and Shibutani, S. (2008) Oxidative DNA damage in XPC-knockout and its wild mice treated with equine estrogen. *Chem Res Toxicol* 21, 1120-1124. (査読有り)
2. Nishida, H., Kawanishi, M., Takamura-Enya, T. and Yagi, T. (2008) Mutagenic specificity of N-acetoxy-3-aminobenzanthrone, a major metabolically activated form of 3-nitrobenzanthrone, in shuttle vector plasmids propagated in human cells. *Mutat Res* 654, 82-87. (査読有り)
3. Kanaly, R., Matsui, S., Hanaoka, T. and Matsuda, T. (2007) Application of the adductome approach to assess intertissue DNA damage variations in human lung and esophagus. *Mutat Res* 625, 83-93. (査読有り)
4. Matsuda, T., Matsumoto, A., Uchida, M., Kanaly, R., Misaki, K., Shibutani, S., Kawamoto, T., Kitagawa, K., Nakayama, K., Tomokuni, K. and Ichiba, M. (2007) Increased formation of hepatic N2-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase 2-knockout mice treated with ethanol. *Carcinogenesis* 28, 2363-2366. (査読有り)
5. Kawanishi, M., Matsukawa, K., Kuraoka, I., Takamura-Enya, T., Totsuka, Y., Matsumoto, Y., Watanabe, M., Zou, Y., Tanaka, K., Sugimura, T., Wakabayashi, K. and Yagi, T. (2007) Molecular evidence of the involvement of the nucleotide excision repair (NER) system in the repair of the mono(ADP-ribosyl)ated DNA adduct produced by pierisin-1, an apoptosis-inducing protein from the cabbage butterfly. *Chem Res Toxicol* 20, 694-700. (査読有り)
6. Matsuda, T., Yabushita, H., Kanaly, R., Shibutani, S. and Yokoyama, A. (2006) Increased DNA damage in ALDH2-deficient alcoholics. *Chem Res Toxicol* 19, 1374-1378. (査読有り)

[学会発表] (計 60 件)

1. 川西優喜, 西田裕, 石井宏, 菅野毅治, Robert Fuchs, 松田知成, 高村岳樹, 八木孝司: 大気汚染物質 3-ニトロベンズ

- アントロンによる DNA 付加体の生成と TLS・突然変異、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月 9 日~12 日
2. Kyoko Kato, Eiji Yamamura, Masanobu Kawanishi, Takashi Yagi, Tomonari Matsuda, Akio Sugiyama, Yoshifumi Uno: Significance of DNA adductome analysis in vitro micronucleus test. 第 37 回日本環境変異原学会、沖縄、2008 年 12 月 4 日~6 日
  3. Kazuaki Kawai, Pei-Hsin Chou, Masaaki Inoue, Tomonari Matsuda, Hiroshi Kasai: Detection of 4-OHE-DNA adducts in human lung tissue. 第 37 回日本環境変異原学会、沖縄、2008 年 12 月 4 日~6 日
  4. Yoshiyuki Yukawa, M. Muto, K. Hori, Y. Ezoe, S. Arai, H. Nagayoshi, T. Matsuda, T. Oyama, T. Chiba: Distribution of Acetaldehyde and DNA Adducts in Aldehyde Dehydrogenase 2-knockout Mice after Intraperitoneal Administration of Ethanol. 第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、2008 年 10 月 28 日~30 日
  5. Tomonari Matsuda, Robert A. Kanaly and Pei-Hsin Chou: DNA adductomics: global survey of DNA damage in human tissues. ECNIS WP6 workshop on new developments: biomarkers of complex mixtures and use of 'omics' technology. 21 Sept., 2008, Cavtat, Croatia
  6. 松田知成、周 佩欣、河井一郎、葛西宏: DNA アダクトーム解析による過酸化脂質由来 DNA 塩基損傷の網羅的解析、第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会、京都、2008 年 6 月 19 日~20 日