

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19510073

研究課題名（和文）環境発がん物質 3-ニトロベンゾアントロンの新規核酸付加体の検出とその生体影響評価

研究課題名（英文）Evaluation of novel DNA adducts derived from 3-nitrobenzanthrone, a carcinogen present in atmospheric environment.

研究代表者 高村 岳樹（TAKAMURA TAKEJI）

神奈川工科大学・工学部・准教授

研究者番号：50342910

研究成果の概要：3-ニトロベンゾアントロンの究極活性体である O-アセチル-3-ヒドロキシアミノベンゾアントロンと核酸の一つであるデオキシアデノシン-5-リン酸との解析を行った。核酸付加体に相当する、HPLC ピークの分取を繰り返し、NMR による解析を行った。その結果デオキシアデノシンのアミノ基にアントロン骨格の 2 位が結合した通常の DNA 付加体の他に、リン酸部位にベンゾアントロンが結合したリン酸付加体の生成が明らかとなった。構造はリン酸部位の酸素とアントロンの 2 位が結合したものであり、同様の付加体はチミンやシチジンの 5-リン酸体との反応でも得られる事がわかった。いずれも収率は約 0.2% であった。得られるリン酸付加体は酵素的な安定性についても検討した。フォスフォジエステラーゼや、アルカリフォスファターズなどのいずれの酵素にも耐性があり、リン酸とベンゾアントロン部位または核酸部位の結合の酵素的加水分解はほとんど進行しなかった。そのためこの付加体は、細胞内で生成すると、酵素的には不活性であり、耐性があるものと推定された。今後、DNA との反応で、リン酸付加体の生成の確認や細胞内での存在を詳細に検討する必要がある

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：放射線・化学物質影響

科研費の分科・細目：環境学 放射線・化学物質影響科学

キーワード：発がん物質，DNA 付加体

1. 研究開始当初の背景

環境中には様々な発がん性物質が存在するが、その中で 3-nitrobenzanthrone (図 1) は大気中に存在する発がん性物質として、わが国で初めて見いだされた化合物である。これまでにこの化合物は DNA に付加体を生成す

ることにより、発がんへと惹起される事が明らかとなっている。実際に、ラットに経気導入したばあい、3-NBA 由来の DNA 付加体が数種類発見されている。3-NBA 由来の DNA 付加体はこれまでに試験管内の反応で 4 種類同定されている (図 2)。

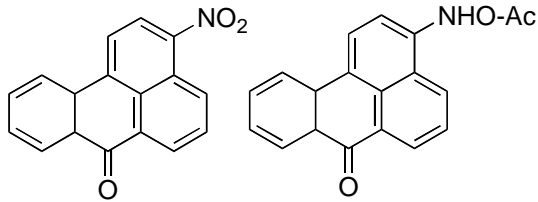
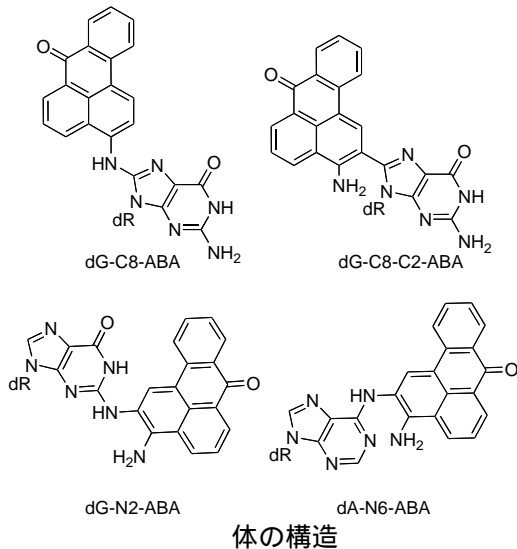


図1 3-NBA とその究極活性体の化学構造

一般にニトロ基を有する化合物は生体内に入ると代謝活性化されDNA付加体を生成する。このときニトロ基はヒドロキシアミンに一旦還元された後、アセチル転移酵素により、O-アセチル化され、O-アセチルヒドロキシアミン誘導体(究極活性体とよぶ)が生成する(図1)。アセチル化されたヒドロキシアミンのN-O結合は非常に切れやすく、自発的に開裂しナイトレニウムイオンを生成する、このイオンは活性が高く、求電子的に反応をひきおこす。そのためDNAも攻撃対象となり、DNAに対する付加反応を引き起こす。これまでに、3-NBA由来のDNA付加体で構造の明らかになったものはdeoxyguanosineの8位に3-aminobenzanthrone(3-ABA:3-NBAのニトロ基が還元している)のアミノ基を介して結合しているものN-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthrone(dG-C8-ABA)、deoxyguanosineの8位に3-ABAの2位の炭素を介して結合しているもの2-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthrone(dG-C8-C2-ABA)、deoxyguanosineの環外のアミノ基に3-ABAの2位の炭素を介して結合しているもの2-(2'-deoxyguanosin-N²-yl)-3-aminobenzanthrone(dG-N2-ABA)、deoxyadenosineの環外のアミノ基に3-ABAの2位の炭素を介して結合しているもの

図2 これまで明らかになっている DNA 付加



2-(2'-deoxyadenosin-N⁶-yl)-3-aminobenzanthrone(dA-N6-ABA)の4種類である(図2)。このうち生体内で見いだされる付加体はdG-C8-ABA, dG-N2-ABA, dA-N6-ABAであり、生体内で見いだされる4種類の付加体のうち1種類がいまだに未同定である。

2. 研究の目的

生体内で未同定の付加体の構造を明らかにするには、試験管内での反応を行い、構造決定をし、その化合物が生体内にあるかを明らかにする事が、必須の手段である、これまでに、試験管内の反応では、一般的に核酸成分として、2'-deoxyguanosine や 2'-deoxyadenosine を用いて反応が行われてきた。一方、これらの核酸成分をリン酸基もつけた状態、すなわち 2'-deoxyguanosine 5'-phosphate や 2'-deoxyadenosine 5'-phosphate を用いて試験管内の反応を行うと、リン酸部位に付加体を形成したと考えられるHPLCピークが観察される。このリン酸付加体はこれまで報告例がほとんどなく、その生体に対する影響は未知である。そのため、このリン酸付加体の構造を明らかにし、その生体影響を調べる事が、本研究の目的である。

3. 研究の方法

3-NBA由来の究極活性体を合成し、それと2'-deoxyadenosine 5'-phosphateと反応させ、リン酸付加体に由来するHPLCを分極し、NMR測定を用いて構造決定をする。一方で、このリン酸付加体の別途合成法を開発し、オリゴDNA合成へ展開する方法の構築を行った。3-NBAの究極活性体は、まず、原料である3-NBAを0でPd/Cの存在下、ヒドラジン処理する事により、ヒドロキシアミノ体を得る事が出来た。ヒドロキシアミノ体の選択的なO-アセチル化はさらにピルボニトリルとTBD-methyl-polystyreneを用いる事により、THF溶媒を用いる事により生成できた。得られた究極活性体は非常に不安定なため、すぐに基質である2'-deoxyadenosine 5'-phosphateと反応させた。このとき、炭酸ナトリウム水溶液でpHを6~7となるように調整した。反応は、数分のうちに完結した。脂溶性の成分をクロロホルムで除去後、水溶液の画分をHPLCに供与した。反応の指標となるdA-N6-ABA 5'-phosphateと未知のHPLCピークを確認した。その未知ピークをNMR測定に必要な量となるまで反応、分取を繰り返した。推定されるリン酸付加体を合成するために必要な、基質の合成を行った。推定構造は

3-ABA の 2 位にリン酸基が結合したものであるため、別途合成には 2-hydroxy-3-nitrobenzanthrone (2-OH-3-NBA) が必要となる。2-OH-3-NBA はこれまでに合成方法が示されていない。そこで、2-bromo-3-nitrobenzanthrone から合成する方法を開発した。2-bromo-3-nitrobenzanthrone は DMSO 溶媒中水酸化カリウム水溶液を処理する事により、得る事が出来る事がわかったが、収率は 20 ~ 30 % と低い。そこで、Pd(0) を共存させる事により、90 % 近くまで収率が向上する事がわかった。得られた 2-OH-3-NBA は、次のリン酸化の反応に用いた。

HPLC 分取で得られたリン酸付加体はその生体影響をみる手がかりとして、種々の加水分解酵素により、その抵抗性を調べた。

4. 研究成果

3-NBA の究極活性体、O-acetyl-3-hydroxyaminobenzanthrone を常法にしたがい合成し、それと、2'-deoxyadenosine 5'-phosphate と反応させた。反応溶液は THF:水 = 1:1 の溶液を用いた。リン酸付加体は溶液の pH6~8 が至適であり、これ以上酸性にすると生成しない。反応後、クロロホルムで脂溶性成分を取り除き、水分画を HPLC により精製した。このとき、水溶性画分には、リン酸付加体の他、反応しなかった 2'-deoxyadenosine 5'-phosphate および、その N6 位に 3-ABA が付加した dA-N6-ABA の 5'-リン酸体が存在した (図 3)。

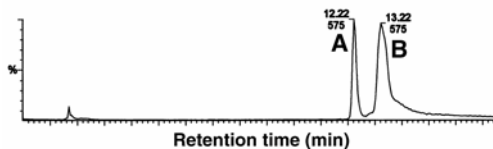


図 3 3-NBA の究極活性体と 2'-deoxyadenosine 5'-phosphate の反応生成物の LC-MS クロマトグラム、ピーク A は構造未知のリン酸付加体、B は図 1 中の dA-N6-ABA の 5'-リン酸体 (いずれも $m/z = 575$)

リン酸付加体の収率はおおむね 0.5 % 程度であった。HPLC による精製を繰り返し、NMR を用いて構造解析を行った。その結果、リン酸位に 3-ABA の 2 位の炭素が結合した 2-(2'-deoxyadenosine 5'-phosphatyl)-3-aminobenzanthrone である事がわかった (図 4)。同様の、リン酸付加体は thymidine 5'-phosphate を用いても

同様の収率である事が出来た。そのためリン酸付加体の生成には基質特異性はないと考えられる。

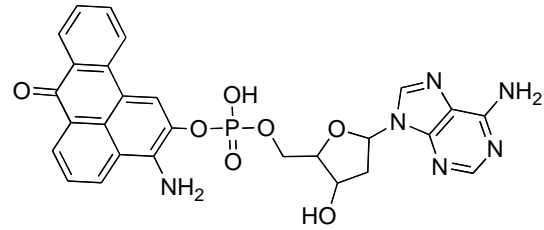


図 4 リン酸付加体の化学構造

この反応精製物の別途合成方法を構築するために、種々の方法を試した。一般にリン酸と水酸基の反応は DCC を用いるカップリング反応が簡便である。そのため、3-ABA の 2 位にリン酸を結合させ、更に、それを核酸のリボース部位の水酸基と反応させる事を試みた。3-ABA のリン酸化は

2-hydroxy-3-nitrobenzanthrone を合成し、そこに bis-t-butyl-phosphoramidite と イミダゾールを用いて行った。アミダイトは過酸化水素を用いて酸化して、さらに得られた 3-nitrobenzanthrone 2-phosphate を DCC を用いてトリチル保護した核酸と反応させたが反応は進行しなかった。同様の反応はナフチルリン酸や、ニトロフェニルリン酸を用いた場合、スムーズに進行したため、この反応の基質として 3-nitrobenzanthrone 2-phosphate は適していない事が推察される、また別のリン酸方法として、核酸のフォスフォルアミダイトを

2-hydroxy-3-nitrobenzanthrone と反応させる事が考えられるが、この反応も進行しなかった。また PCl_3 や $POCl_3$ を用いたカップリング反応も同様に試みたが、いずれも成功しなかった。今後は更に別の反応経路を模索する必要がある。

単離して得られたリン酸付加体の特徴を調べるために、これらの加水分解反応について検討した。Phosphodiesterase やアルカリフォスファターゼ、各種ヌクレアーゼを用いて加水分解反応を試みたが、いずれも抵抗性をしめし、リン酸部位からの切り出しは出来なかった。そのため、生体内で生成した場合これらの付加体は、NER に関連した除去修復により取り除かれる事がなければ、容易には除去されない事がわかった。今後詳しい検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(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 6 件)

1) Sawai, T., Kawanishi, M., Takamura-Enya, T., Yagi, T. Establishment of a method for analyzing translesion DNA synthesis across a single bulky adduct in human cells. Genes and Environment, 31, 24-30 2009. 査読有り

2) Nishida H, Kawanishi M, Takamura-Enya T., Yagi T., 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. 82-87. 2008, 査読有り

3) Terasaki M, Totsuka Y, Nishimura K, Mukaisho K, Chen KH, Hattori T, Takamura-Enya T., Sugimura T, Wakabayashi K. Detection of endogenous DNA adducts, O-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine and 3-ethanesulfonic acid-2'-deoxycytidine, in the rat stomach after duodenal reflux. Cancer Sci. 99, 1741-1746, 2008. 査読有り

4) Kentaro Misaki, Yoshiharu Hisamatsu, Hitomi Suzuki, Takeji Takamura-Enya: Evaluation of the mutagenicity of nitration products derived from phenalenone(1H-phenalen-1-one), Mutagenesis, 23, 359-66, 2008. 査読有り

5) Hirosi Nishida, Masanobu Kawanishi, Takeji Takamura-Enya, Takashi Yagi: 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. 2008. 査読有り

6) Masaru Terasaki, Yukari Totsuka, Koichi Nishimura, Ken-ichi Mukaisho, Kuan-Hao Chen, Takanori Hattori, Takeji Takamura-Enya, Takashi Sugimura Keiji Wakabayashi: Detection of endogenous DNA adducts, O6-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine and 3-ethanesulfonic acid-2'-deoxycytidine, in the rat stomach after duodenal reflux, Cancer Sci., 99, 1741-1746, 2008. 査読有り

(2)研究分担者

(3)連携研究者

6. 研究組織

(1)研究代表者

高村 岳樹 (TAKAMURA TAKEJI)

神奈川工科大・工学部・准教授

研究者番号：50342910