

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510064

研究課題名 (和文) ニトロソ化アミノ酸のUVA光増感で生じるNOの核酸・蛋白修飾と生体システム攪乱

研究課題名 (英文) DNA and protein modification and disturbance on cell system with NO produced from photo-reactivation of N-nitrosated amino acids

研究代表者

有元 佐賀恵 (ARIMOTO SAKAE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90212654

## 研究成果の概要 (和文)：

N-ニトロソアミノ酸のUVA光増感による反応機構は、まずN-ニトロソ基が光子を吸収して光開裂してNOを放出し、2次反動的にアルキルカチオンラジカルや活性酸素種が生じて、DNA切断、酸化傷害、アルキル化傷害、ひいては突然変異を引き起こすことが明らかとなった。さらに、光増感反応により生成するDNA損傷の同定を行い、N-ニトロソアミノ酸の一つニトロソプロリンの光反応で新規のDNA付加体を同定した。また、ニトロソプロリンの光反応に伴い、アミノ酸残基のニトロ化・ニトロソ化が起きた。この光反応は太陽光でも起きた。したがって、ニトロソプロリンは太陽光照射でヒト体内でもDNA付加体形成やアミノ酸のニトロ化・ニトロソ化を起こす可能性のあることが分かった。

## 研究成果の概要 (英文)：

The N-nitroso moiety of N-dialkylnitrosamines absorbs UVA photons, UVA-photolysis of N-dialkylnitrosamines brings release of nitric oxide, and subsequent production of alkyl radical cations and active oxygen species follow as secondary events, which cause DNA strand breaks, oxidative and alkylative DNA damages and mutation. Photoproducts from NPRO and dA were isolated, analyzed by MS and NMR, and identified as deoxyinosine and (R)-, (S)-2-(2-pyrrolidyl)-2'-deoxyadenosine. When UV light of 365 nm was irradiated to a neutral mixture of N-nitrosoproline, glutathione and tyrosine, S-nitrosoglutathione and 3-nitrotyrosine were generated. These results suggest that N-nitrosoproline may induce nitrosation and nitration of cellular components in humans with sunlight.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,200,000 | 660,000   | 2,860,000 |
| 2009年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 2010年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：複合新領域

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：ニトロソプロリン、DNA 損傷、近紫外光、一酸化窒素、アミノ酸修飾、光変異原性、光毒性、ニトロソチロシン

### 1. 研究開始当初の背景

太陽光による皮膚の光傷害の 95%以上が、皮膚に深く浸透する長波長紫外線光(UVA) (315nm-400nm)によると言われている。そのうち短波長成分 (315-340 nm)の UVA2 照射のみならず、長波長成分 UVA1 (340-400 nm) 照射によってもヘアレスマウスに皮膚発癌の生じることが報告されている。しかし、DNA は UVA1・UVA2 領域に光吸収を持たないため、直接的な光反応による DNA 傷害は考えにくく、何らかの光増感物質が UVA を吸収し、DNA に光エネルギーを移しているか、あるいは酸素などを活性化して DNA 障害を引き起こしていると考えられる。UVA による光毒性、特に DNA への光傷害性や光発癌性において、光増感物質として外来性の物質の介在とともに、常時存在する内在性物質の影響が大きいと考えられている。これまで、内在性光増感物質としてポルフィリン類・メラニン・フラビン類などの他、アミノ酸トリプトファンの分解産物、ホルミルキヌレニンが研究されている。そこで、体内アミノ酸の N-ニトロソ化体、とくにニトロソ化アミノ酸が光増感物質として光傷害に関与しているのではないと考えた。

### 2. 研究の目的

まず、作業仮説として、「生体内で生成した N-ニトロソ化アミノ酸が長波長紫外線に対する内在性光増感剤となり、活性中間体経由、もしくはエネルギー移動により DNA に傷害を与える。また、内在性 N-ニトロソ化アミノ酸が NO ラジカルやアルキルカチオンラジカルの運搬体として働いて、照射部位で放出する。ひいては急性の皮膚傷害や光発癌にも関与する」と考えた。この作業仮説に基づいて、次の研究を行うことを目的とした。すなわち、(i) N-ニトロソ化アミノ酸などの N-ニトロソ化合物の光反応により発生する NO ラジカル・アルキルカチオンラジカルと DNA との反応解析、(ii) 光反応により発生した NO と活性酸素種によるチロシン残基の 3-ニトロチロシン化、(iii) ニトロソ化アミノ酸の光増感による培養細胞・実験動物皮膚へ影響(変異・発現影響)の解明、を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) N-ニトロソ化アミノ酸などの N-ニトロソ化合物の光反応により発生する NO 放出と光

変異原性・DNA 切断等の反応解析方法

UVA 照射は 20W ブラックライトにフィルターをかけて波長 320-400 nm 以外をカットし、360 nm における照射強度 4.3-5.4 W/m<sup>2</sup>として、25℃に保った照射チャンバー内で行った。変異原性はエイムテストで検出した。DNA 切断はφX174 DNA RFI 型の 2 本鎖環状 DNA が一本鎖切断により RFII となり、電気泳動の移動度が増加することにより検出した。光反応後の DNA 上に生じた 8-oxodG/dG 測定は LC-ECD 法によった。反応溶液中への NO 放出はグリース法により定量した。

(2) N-ニトロソ化アミノ酸のひとつ N-ニトロソプロリンの光反応により発生するラジカルとヌクレオシドとの反応解析方法

N-ニトロソプロリンと各デオキシヌクレオシドを含む緩衝液をマイクロプレートに入れ、4℃の恒温器中で攪拌しながら UVA (320-400 nm, 586 ± 94.6 μW/cm<sup>2</sup>) を 12 時間照射した。反応液からサンプルを取り、HPLC を用いて照射溶液中の生成物ピークを解析した。さらにこれらのピークを分取し、LC/MSMS や NMR などにより構造解析を行った。

(3) N-ニトロソ化アミノ酸のひとつ N-ニトロソプロリンの光反応により発生するラジカルと DNA との反応解析方法

NPRO と子牛胸腺 DNA を含む緩衝液を 24 穴マイクロプレートに入れ、4 時間、UVA (586±94.6 μW/cm<sup>2</sup>) を照射した。照射方法は、(2)と同様である。照射後、得られた溶液を透析チューブに入れ、Tris-EDTA 緩衝液 (pH 8.0) を入れたビーカーの中に浸し、攪拌しながら 4℃で一晩透析した。その後、nuclease P1 と alkaline phosphatase でヌクレオチドまで分解し、HPLC 分析、LC/MSMS 解析を行った。

(4) 光反応により発生した NO と活性酸素種によるチロシン残基の 3-ニトロチロシン化解析方法

UV 照射は、光源に UV365/254 nm の選択照射が可能な低圧水銀ランプを用いた。365 nm および 254 nm の光量はそれぞれ 785±65 μW および 830±30 μW であった。太陽光の照射実験も行った。そのとき、太陽光中の UV365 nm と 254 nm の光量はそれぞれ 635±275 μW と 0.00-0.03 μW であった。ニトロソプロリン

とグルタチオンおよびチロシンの中性混合液へUV及び太陽光を1時間まで照射し、一定時間毎にサンプルを採取し、直ちにHPLCで分析を行った。生成物はESI-MSを用いて同定した。

(5) ニトロソ化アミノ酸の光増感による培養細胞への影響(変異・発現影響)研究方法  
まずニトロソアミノ酸のUVA・可視光の吸収による化合物の活性化評価系を確立することを目的として、ヒト表皮ケラチノサイトNCTC2544細胞による光小核形成試験の研究を行った。光照射はsolar-simulatorおよび20Wブラックライトにフィルターをかけて波長320-400nmとした装置を用いた。ついで、ニトロソプロリンによる光小核形成を研究した。

#### 4. 研究成果

(1) N-ニトロソ化アミノ酸などのN-ニトロソ化合物の光反応により発生するNO放出と光変異原性・DNA切断等の反応解析結果

N-ジアルキルニトロソアミン(ニトロソプロリン他7種類)の存在下、UVA照射すると、エムステストにおいて代謝活性化無しで、光変異原性が検出された。スーパーヘリカルDNAをN-ジアルキルニトロソアミンの存在下でUVA照射すると一本鎖切断が観察された。φX174 DNAのN-ニトロソモルホリンとUVAによる一本鎖切断はラジカル消去剤やSODにより阻害された。子牛胸腺DNAをN-ジアルキルニトロソアミンとUVA処理すると、8-oxodG/dGが生成した。アクションスペクトルを調べたところ、N-ジアルキルニトロソアミンのUVA反応によるNO生成および変異原性誘起が、ニトロソアミンのUV吸収曲線と一致し、ニトロソアミンが光増感剤であることが分かった。N-ジアルキルニトロソアミン340nmにおける吸光度と、光反応によるNO生成量に有意な相関関係があった。以上より、N-ジアルキルニトロソアミンのUVA光反応では、まずN-ニトロソ基が光子を吸収して光開裂してNOを放出し、2次反応的にアルキルカチオンラジカルや活性酸素種が生じて、DNA切断、酸化傷害、アルキル化傷害、ひいては突然変異を引き起こすと考えられることが明らかとなった。

(2) N-ニトロソ化アミノ酸のひとつニトロソプロリン(NPRO)の光反応により発生するラジカルとヌクレオシドとの反応解析。

ニトロソプロリン存在下で、dAにUVA照射すると、HPLC分析により3つの新規ピークが検出された。このうち1つは、デオキシアデノシン(dA)のデアミネーションにより生成することが報告されている2'-deoxyinosine(dI)とよく似た保持時間、吸収スペクトルを

示した。このため、dIの標品を用いてUVA照射サンプルのコクロマト分析を行ったところ、標品とピーク的一致が確認された。よって、反応溶液中でのdIの生成が確認された。残りの2つは、HPLC分析からは判断できなかったため、これらをP1、P2としてLC/MS/MS、NMRによる構造解析を行った。初めにLC-MS/MS分析のニュートラルロスキャンを行った。P1、P2がdA付加物であると仮定するとdeoxyriboseに相当する質量116のフラグメントイオンが脱離する。分析の結果、P1、P2ともに分子量320のdA付加物である可能性が示唆された。次にNMR測定を行った。dAと比較すると、P1及びP2の<sup>1</sup>H NMRスペクトルでは、H2位のピークが消失していた。また、1.9 - 4.5 ppm付近に新たなHのピークが検出されていた。さらに、<sup>13</sup>C NMR測定を行った結果、dAと比較すると、両方ともC2のピークの化学シフトが低磁場側に移動していた。従って、P1及びP2はdAの2位が置換された構造をしているのではないかと考えられる。以上のNMR測定の結果と、LC-MS/MS分析より分子量が320になることから、P1及びP2の構造を推定すると、dAの2位のHがNPRO由来のpyrrolidine骨格で置換された2-(2-pyrrolidyl)-2'-deoxyadenosineであると考えられる。この二つの反応生成物から推定された構造は同じであるが、この構造はα位に不斉炭素を持つので、P1及びP2は互いに鏡像異性体であり、(R)-、(S)-2-(2-pyrrolidyl)-2'-deoxyadenosineであると考えられる。

(3) ニトロソプロリンの光反応により発生するラジカルとDNAとの反応解析。

DNAをニトロソプロリン存在下でUVA照射後、加水分解処理した試料溶液及びdA、dT、dG、dC各1mMを含むスタンダードのHPLC分析を行い、クロマトグラムを比較した。試料溶液に、それぞれdA、dT、dG、dCに相当するピークが確認された。さらにA1、A2、P1、P2、G1、G2の6つの反応生成物が検出された。LC/MSMS解析を行ったところ、P1、P2は上記(2)のP1、P2と同じ化合物であり、DNA中でもヌクレオシドでの反応と同様に、dAがニトロソプロリンと光反応し、付加体が生じたことが分かった。また、A1、A2はDNAのdAがニトロソプロリンと光反応してP1、P2以外の付加体を生じたものと考えられ、G1、G2はDNAのdGが光反応して、新たな修飾塩基が生じたことが分かった。

(4) 光反応により発生したNOと活性酸素種によるチロシン残基の3-ニトロチロシン化解析

ニトロソプロリンとグルタチオンまたはチロシンの中性混合液へのUVの照射におい

て、それぞれS-ニトロソグルタチオンおよび3-ニトロチロシンが生成することを確認した。365 nm 照射時のS-ニトロソグルタチオンの生成量は254 nm照射時の40倍であった。365 nm照射時の3-ニトロチロシンの生成量は254 nm照射時の2倍であった。ニトロソプロリン、グルタチオン、チロシンの三者を混合した中性溶液への365 nmの照射では、S-ニトロソグルタチオンの生成量は変化しなかったが、3-ニトロチロシンの生成量は1/10倍以下に減少した。同様の実験を太陽光の照射により行ったところ、類似の結果が得られた。本結果より、屋外にて太陽光、とりわけUVAに暴露することにより、ニトロソプロリンがグルタチオンおよびチロシンなどの生体成分と反応し、S-ニトロソグルタチオンや3-ニトロチロシンが生成する可能性がある。また、NOとの反応性が高いといわれるグルタチオンが高濃度に共存していても、3-ニトロチロシンが生成しうることが確認できた。

#### (5) ニトロソ化アミノ酸の光増感による培養細胞への影響 (変異・発現影響)

陽性対照として、良く知られた光遺伝毒性物質8-methoxypsoralenをこのヒト表皮ケラチノサイトNCTC2544細胞系で試験したところ、用量依存的な小核形成が見られ、光遺伝毒性試験系として使用しうると分かった。次に、光毒性は知られるが光遺伝毒性は未知の化合物を試験し、6-methylcoumarin, 3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilideとprotoporphyrin IXの光小核形成を初めて見いだした。また、光吸収がないのに光照射によりCHO細胞に染色体異常を誘起する偽陽性化合物(cycloheximideとdisulfoton)は、NCTC2544細胞に光遺伝毒性を示さなかった。以上により、ヒトケラチノサイトNCTC2544細胞による光小核形成試験は、化合物の光遺伝毒性を評価する系として有用と分かった。そこで、ニトロソプロリンが光照射によりヒト表皮ケラチノサイトNCTC2544に光遺伝毒性を示すかどうかを研究したところ、小核形成を引き起こし、光遺伝毒性があることが分かった。

以上により、N-ニトロソアミノ酸のUVA光増感の過程は、まずN-ニトロソ基が光子を吸収して光開裂してNOを放出し、2次反応的にアルキルカチオンラジカルや活性酸素種が生じて、DNA切断、酸化的傷害、アルキル化傷害、ひいては突然変異を引き起こすと考えられることが明らかとなった。さらに、DNA修飾により生成する損傷の同定を行い、新規付加体を同定した。また、ニトロソプロリンの光反応に伴い、アミノ酸残基のニトロ化・ニトロソ化の起きることが分かった。さらに、

ヒト由来培養細胞においてもニトロソプロリンの光増感反応が起きることを見出した。

今後はヒト由来細胞のDNAや構成蛋白に対するニトロソプロリンの光増感反応をさらに詳しく研究することにより、細胞に内在する光増感物質による、近紫外光の光毒性の解明に寄与できると考えられる。

#### 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 4件)

① Mayumi Horinouchi, Sakae Arimoto-Kobayashi, Photomicronucleus assay of phototoxic and pseudophotoclastogenic chemicals in human keratinocyte NCTC2544 cells, Mutation Research, 査読あり, Vol. 725, 2011, pp. 43-50

② Sakae Arimoto-Kobayashi, Kayoko Sano, Masaki Machida, Keiko Kaji, Keiko Yakushi, UVA activation of N-dialkyl nitrosamines releasing nitric oxide, producing strand breaks as well as oxidative damages in DNA, and inducing mutations in the Ames test, Mutation Research, 査読あり, Vol. 691, 2010, pp. 47-54

③ Atsushi Naka, Toshinori Suzuki, Sakae Arimoto-Kobayashi, Nitrosation of Glutathione and Nitration of Tyrosine by N-Nitrosoproline with Ultraviolet Light, Genes and Environment, 査読あり, Vol. 32, 2010, pp. 75-84

④ Mayumi Horinouchi, Sakae Arimoto-Kobayashi, Copper phthalocyanine sulfonate - mediated oxidative degradation of 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2(NHOH)), a direct-acting mutagen derived from Trp-P-2 by metabolic activation, Genes and Environment, 査読あり, Vol. 31, 2009, pp. 64-68

[学会発表] (計 12件)

① 堀ノ内真弓, 有元佐賀恵, 培養ヒトケラチノサイトによる化学物質の光細胞毒性・光遺伝毒性試験, 日本環境変異原学会第40回大会, 2011年11月21日, 東京都

② 青山周平, 佐野嘉容子, 波多野力, 木村幸子, 有元佐賀恵, N-ニトロソプロリンの光活性化による核酸修飾, 第33回日本光医学・光生物学会, 2011年7月22日, 大阪市

③ 有元佐賀恵, 根岸友恵, 岡本敬の介, 薬師径子, ニトロソアミンはUVAを吸収してNOを放出し、2次的にDNAの鎖切断・酸化的傷害・突然変異を誘発する, 日本薬学会第131

年会、2011年3月28日、静岡市

④有元佐賀恵、N-dialkyl nitrosamines はUVAを吸収してNOを放出し、DNAの鎖切断・酸化傷を引き起こし、突然変異を誘発する、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会、2010年12月7日、神戸市

⑤Shuhei Aoyama, Kayoko Sano, Tsutomu Hatano, Sachiko Kimura, Sakae Arimoto-Kobayashi, Analysis of photoproducts from a UVA-irradiated mixture of N-nitrosoproline with 2'-deoxyadenosine、第37回国際核酸化学シンポジウム、2010年11月10日、横浜市

⑥森脇直史、鈴木利典、有元佐賀恵、N-ニトロソプロリンの不飽和脂肪酸中での光活性化、第32回日本光医学・光生物学会、2010年7月30日、東京都

⑦青山周平、佐野嘉容子、木村幸子、波多野力、岡本敬の介、根岸友恵、有元佐賀恵、N-ニトロソプロリンとデオキシアデノシンのUVA光反応解析、日本薬学会第130年会2010年3月28日、岡山市

⑧森脇直史、根岸友恵、岡本敬の介、有元佐賀恵、N-ニトロソプロリンのUVA光反応におけるNOの産生、第48回日本薬学会中国四国支部学術大会、2009年11月7日、徳島市

⑨仲 敦史、鈴木利典、有元佐賀恵、紫外線照射下でのN-ニトロソプロリンによるグルタチオンのニトロソ化とチロシンのニトロ化、第31回日本光医学・光生物学会、2009年7月24日、大阪市

⑩佐野嘉容子、町田雅希、根岸友恵、岡本敬の介、鈴木利典、木村幸子、有元佐賀恵、UVA光活性化N-ニトロソプロリンによるデオキシグアノシンの反応生成物解析、第47回日本薬学会中国四国支部学術大会、2008年11月8日、岡山市

⑪有元佐賀恵、佐野嘉容子、町田雅希、N-ニトロソプロリンとデオキシグアノシンのUVA光反応生成物、第67回日本癌学会学術大会、2008年10月28日、名古屋市

⑫有元佐賀恵、UVA活性化N-nitrosoprolineと2'-deoxyguanosineとの反応生成物の解析、第30回日本光医学会・光生物学会2008年7月11日、松江市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

有元 佐賀恵 (ARIMOTO SAKAE)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90212654

### (2) 研究分担者

木村 幸子 (KIMURA SACHIKO)  
兵庫県立大学・環境人間学部・助教

研究者番号：70225035

(H19→H20：連携研究者)

### (3) 連携研究者

該当無し