

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：24405

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21850

研究課題名（和文）ホルムアルデヒドがスーパーバルキ―DNA鎖間架橋をつくる

研究課題名（英文）Formaldehyde induces superbulky DNA interstrand crosslinks

研究代表者

中村 純（Nakamura, Jun）

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・客員研究員

研究者番号：90804518

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ホルムアルデヒド（FA）がリジン側鎖と反応してできる1,4-dihydropyridine型の付加体がDNA塩基にさらに反応する結果が得られなかった。そこで、グリシドールが体内の代謝を受けて2官能基を持つグリシドアルデヒド（GALD）が作られ、さらにICLを作る可能性があるという仮説を立て実験を行った。その結果、グリシドールはアルコール脱水素酵素（ADH）によりGALDに代謝され、さらにアルデヒドデヒドロゲナーゼ2（ALDH2）により部分的に解毒されることが明らかになった。さらに、Aldh2不全（Aldh2^{*2}）マウスから抽出したALDH2がGALDを解毒代謝しにくいことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトは職業暴露に加え食用精製植物油や電子タバコのペーパーを介してグリシドールに暴露されている。グリシドールはエポキシド構造をもつプロパノールであり、DNAあるいは蛋白と容易に反応し遺伝毒性あるいは細胞毒性を引き起こす。本研究において、グリシドールが体内で活性化されることにより複雑なかつ非常に強い遺伝毒性を引き起こすグリシドアルデヒド（GALD）になることを明らかにした。しかもアルコールを飲んで顔が赤くなる日本人（約半数の日本人）がGALDの毒性を弱めることが苦手である可能性があることが明らかになった。今後、GALDの毒性の感受性についてさらに研究する必要がある。

研究成果の概要（英文）：We could not find any evidence that the 1,4-dihydropyridine-type adducts formed by the reaction of formaldehyde (FA) with lysine side chains further react with DNA bases. We then hypothesized that glycidol may be metabolized in the body to produce glycidaldehyde (GALD), which has two functional groups, and further form ICLs. We found that glycidol is metabolized to GALD by alcohol dehydrogenase (ADH), and is further partially detoxified by aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2). Furthermore, we demonstrated that Aldh2 extracted from Aldh2-deficient (Aldh2^{*2}/K1) mice has difficulty detoxifying and metabolizing glycidol.

研究分野：遺伝毒性

キーワード：グリシドール グリシドアルデヒド ALDH2

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

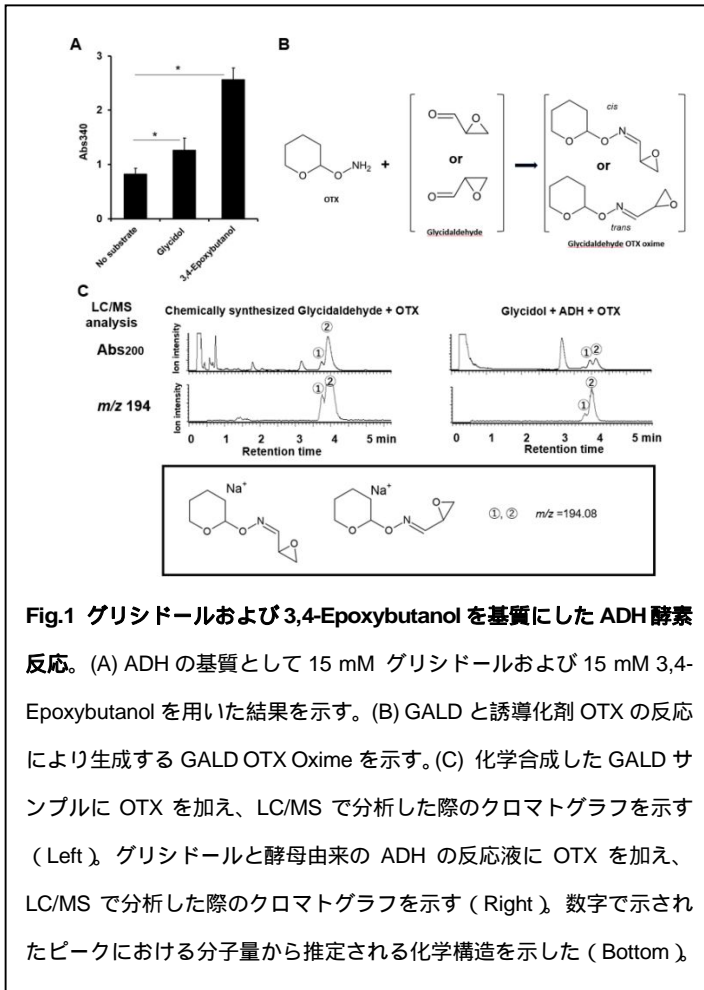
我々は脂質過酸化で作られるマロンジアルデヒド (MDA) 2 分子がホルムアルデヒド (FA) とリジン側鎖のアミノ基と反応し、安定な 1,4-dihydropyridine (DHP) 型の M2FA を形成することを 2017 年に報告した (PMID: 28883613)。この FA 由来の非常に安定な付加体 M2FA は環状構造からなり、外環に 2 個のアルデヒド基を持つ。本研究の目的はその付加体がスーパーバルキー DNA 鎖間架橋 (SBICL) を作ることを証明することであった。しかしながら、M2FA が付加したリジンアナログ (6-ACA : aminocaproic acid) と DNA 塩基を反応させた後に HPLC 分析した結果、M2FA-6ACA と塩基の複合体は検出されることはなかった。恐らく M2FA 分子の外環アルデヒドは短鎖アルデヒドに比較し DNA との反応性が非常に低い可能性がある。結論として、M2FA が SBICL を作る可能性は非常に低いあるいはないと考えられた。そこで、生体内に存在する可能性がある FA 以外のアルデヒドによる DNA 鎖間架橋 (ICL) の形成メカニズムとその生物学的重要性について研究を行うことを考えた。ターゲットのアルデヒドはグリシドアルデヒド (GALD) である。グリシドールが体内の代謝を受けて 2 官能基を持つ GALD に変わり ICL を作る可能性があるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

グリシドールはエポキシド基を持つプロパノールで IARC によりグループ 2A に分類されている発がん物質である (PMID: 11100412)。ヒトは職業曝露に加えて、最近では電子タバコのペーパーを介してグリシドールに暴露される場合がある。また、食用精製油および乳幼児調整粉乳に含まれる食品汚染物質を介してグリシドールに暴露される。グリシドールは反応性の高いエポキシド基を持つため DNA をアルキル化することにより種々の DNA 付加体を形成し、遺伝毒性を示すと考えられている。われわれはグリシドールとアルコール脱水素酵素 (ADH) の反応により生成するであろう Glycidaldehyde (GALD) が 2 つの官能基を持つことにより、架橋剤として DNA 鎖間架橋 (ICL) を形成すると考えた。また、GALD がアルデヒドデヒドロゲナーゼ 2 (ALDH2) により解毒される可能性があると考えた。

3. 研究の方法

アクロレインを酸化する Payne の方法 (J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 18, 4901–4904) で GALD を合成した。合成された GALD の純度は約 90% であった。GALD サンプルに O-(tetrahydropyran-2-yl)hydroxylamine (OTX) を加え 37°C、30min インキュベーションした後、LC-MS を用いてサンプル内の GALD-OTX 結合物の存在を確認した。グリシドールが NAD⁺ 依存性の ADH の基質になりうるかをこれまで報告された方法に従い測定した (J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 18, 4901–4904)。グリシドールが酵母由来 ADH あるいはヒト肝臓サイトゾール中の ADH の基質になりうるかを HPLC を用いて GALD を定量することで評価した。DT40 および HAP 1 細胞およびそれぞれの変異体細胞に被験物質を加え 2~3 日間曝露し、細胞毒性を評価した。ICL の検出には、直鎖化した plasmid (pRS313) を、1,2:3,4-diepoxybutane (DEB)、グリシドール、あるいは GALD と反応させ、その後 DNA 抽出を行った。アルカリ性電気泳動には 0.8% 変性アガロースゲルを用いた。電気泳動の完了時に FluoroStain™ DNA 蛍光染色色素を用いて染色した。GALD が NAD⁺ 依存性の ALDH2 の基質になりうるかを XTT 法を用いて評価した。実験には Human recombinant



次に OTX と GALD の誘導体の分子量に相当する $m/z=194$ の 2 つのピークを確認した (Fig. 1C、左)。これら 2 つのピークは GALD OTX oxime isomers (cis and trans) であると考えられる (Fig. 1B および 1C、下)。これと同様の 2 つのピークが ADH とグリシドールの反応サンプル中でも確認できた (Fig. 1C、右)。これらの結果から、グリシドールは酵母由来の ADH により代謝され GALD が生成されることが明らかになった。

グリシドールおよび GALD は FANCD2 欠損細胞に細胞毒性を示す。

FANCD2 を欠損した培養細胞と野生型細胞に GALD の親化合物であるグリシドールを曝露した。グリシドール曝露により、WT と比べ FANCD2 KO の細胞で増

ALDH2 あるいはマウス肝臓から抽出したミトコンドリア画分を用いた。

4. 研究成果

ADH はグリシドールを基質として GALD を産生する。

基質に用いたグリシドールおよび 3,4-Epoxybutanol は酵母由来の ADH と反応させることで NAD^+ の有意な上昇を示した (Fig. 1A)。さらに酵母由来の ADH とグリシドールの反応液中に GALD が存在するかを HPLC/LC-MS を用いてテストした。分析には波長 200nm に吸光を持ちアルデヒド基と結合して安定な誘導体を形成する OTX を用いた (Fig. 1B)。まず、化学合成した GALD サンプルの分析により保持時間 4.0min 付

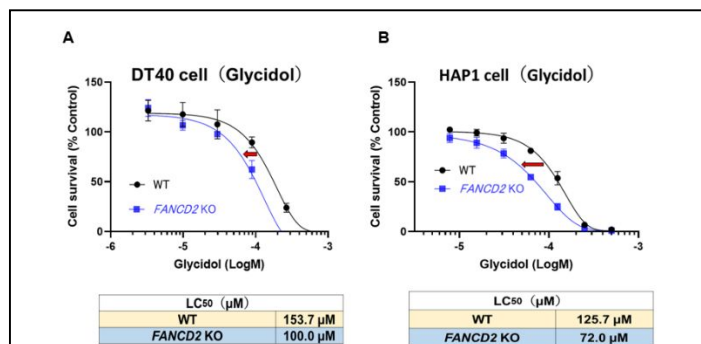


Fig.2 野生型および FANCD2 欠損の DT40 細胞 (A) および HAP1 細胞 (B) のグリシドール曝露による細胞増殖抑制を示す。

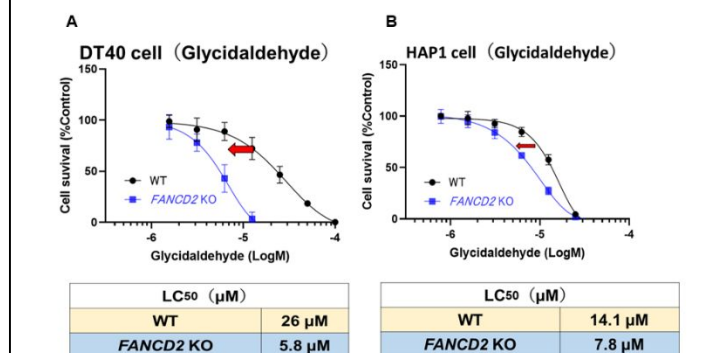


Fig.3 野生型および FANCD2 欠損の DT40 細胞 (A) および HAP1 細胞 (B) の GALD 曝露による細胞増殖抑制を示す。

殖抑制が認められることが明らかになった (Fig. 2)。この結果は、培養細胞が産生する ADH によりグリシドールから GALD 産生され、それが DNA に ICL を形成した可能性が考えられた。さらに、*FANCD2 KO* 細胞の GALD に対する高感受性が認められた (Fig. 3)。これ

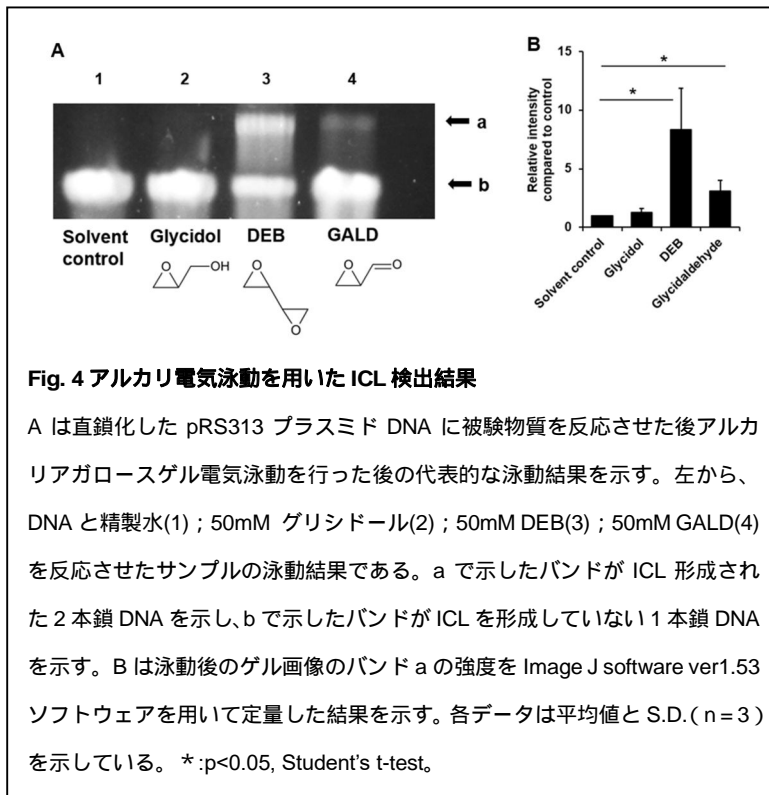


Fig. 4 アルカリ電気泳動を用いた ICL 検出結果

A は直鎖化した pRS313 プラスミド DNA に被験物質を反応させた後アルカリリアガロースゲル電気泳動を行った後の代表的な泳動結果を示す。左から、DNA と精製水(1)；50mM グリシドール(2)；50mM DEB(3)；50mM GALD(4)を反応させたサンプルの泳動結果である。a で示したバンドが ICL 形成された 2 本鎖 DNA を示し、b で示したバンドが ICL を形成していない 1 本鎖 DNA を示す。B は泳動後のゲル画像のバンド a の強度を Image J software ver1.53 ソフトウェアを用いて定量した結果を示す。各データは平均値と S.D.(n=3) を示している。*:p<0.05, Student's t-test.

らの結果から、培養細胞内においても GALD は DNA に対して ICL を形成する可能性が強く示唆された。

GALD が DNA 鎖間架橋 (ICL)をつくる

GALD を直鎖化したプラスミド DNA と反応させたのちにアルカリアガロースゲル電気泳動法を用いて ICL の検出を試みた。DNA に ICL が形成された場合、DNA の移動度に差ができることを利用して ICL を検出した。ICL を形成しない陰性対照 (Solvent) サンプル (Fig. 4A., Lane 1) とグ

リシドールサンプル (Fig. 4A., Lane 2) では 1 本鎖の状態のバンド (b) が 1 本のみ確認できた。

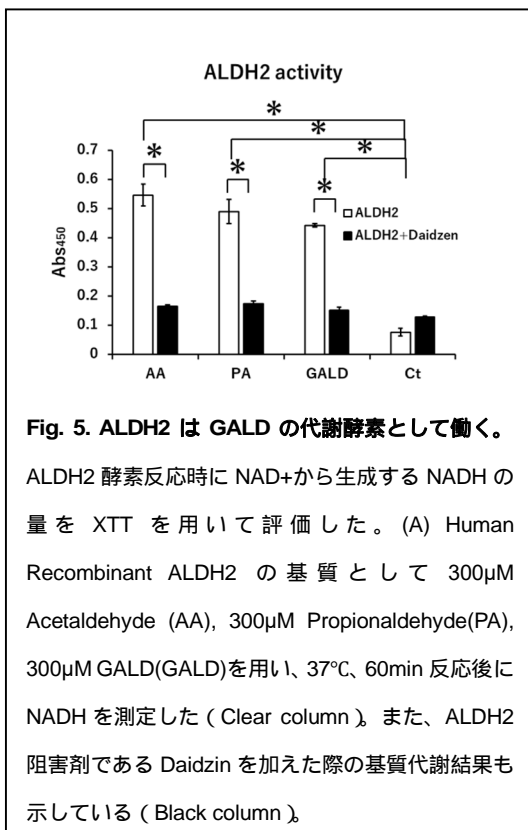


Fig. 5. ALDH2 は GALD の代謝酵素として働く。

ALDH2 酵素反応時に NAD+から生成する NADH の量を XTT を用いて評価した。(A) Human Recombinant ALDH2 の基質として 300μM Acetaldehyde (AA), 300μM Propionaldehyde(PA), 300μM GALD(GALD)を用い、37°C、60min 反応後に NADH を測定した (Clear column)。また、ALDH2 阻害剤である Daidzin を加えた際の基質代謝結果も示している (Black column)。

分子中に 2 個のエポキシド基を持ち ICL を形成することで知られる 1,2,3,4-diepoxybutane (DEB、陽性対照) (PMID: 14966999) サンプルではバンド (b) に加え、ICL を形成し 2 本鎖の状態で泳動されたバンド (a) の 2 本のバンドが確認できた (Fig. 4A., Lane 3 ; Fig 4B)。GALD サンプルでも DEB 同様に a および b のバンドが確認できた (Fig. 4A., Lane 4 ; Fig 4B)。これらの結果から、GALD が ICL をつくることが明らかになった。ADH とグリシドールの反応サンプル分析により GALD の生成が認められたこと、FANC-Deficient 細胞でグリシドールおよび GALD の毒性が強く認められた結果を合わせて考慮すると、グリシドールが ADH により代謝されることにより生成する GALD が細胞内の DNA に ICL を形成する可能性が高いと考えられる。

不活性型 Aldh2*2 の KI マウスの肝臓は GALD を代謝する活性が著しく低い。

アルデヒドの代謝に重要な働きをする酵素であるヒト ALDH2 の遺伝子には遺伝子多型が存在し、東アジアの約 40% の人、全世界では約 6 % の人が一塩基置換の Rs671 変異 (ALDH2*2) を保有する。ALDH2*2 が発現する ALDH2 酵素はドミナント ネガティブで作用するため ALDH2*2 保有者の ALDH2 活性がアセトアルデヒド (AA) に加え、ホルムアルデヒド、プロピオンアルデヒド (PA) などに対し非常に低いことが知られている (PMID 11744614)。そこで、GALD が精製された活性型のヒト Recombinant human ALDH2 によって代謝されるかを評価した。ALDH2 は反応時に NAD⁺ を使用し NADH を放出する。その NADH を測定することで基質代謝を評価した。まず、これまでに ALDH2 の基質として知られている AA および PA を陽性対照物質として使用した。AA、PA を加えたサンプルは基質を加えていない陰性対象サンプルと比較して Abs450 の有意な上昇が確認できた (Fig. 5)。そこで、GALD を基質として加えたところ陰性対象サンプルと比較して Abs450 の有意な上昇が認められた。また、3 種の全ての基質で ALDH2 阻害剤の Daidzin を加えた場合、Abs450 の有意な低下が認められた (Fig. 5)。

精製されたヒト ALDH2 を用いた実験により GALD が基質として代謝されることが明らかになったことから、次に ALDH2*2 由来の ALDH2 酵素が GALD をどの程度代謝するかについて検討を行った。本研究では、ヒトの ALDH2*2 型の Rs671 変異を C57BL6/N マウスに一塩基置換によって引き起こした Aldh2-E506K ノックインマウス (ヒト ALDH2*2 に相当、以後 Aldh2*2 マウスと呼ぶ) を用いた (Manuscript under preparation)。マウスの肝臓から取り出した粗製ミトコンドリア抽出物を使用し、上記同様、XTT 試薬を用いたアッセイ方法で肝臓内の Aldh2 により GALD が代謝されるかどうかについて調べた。WT マウスの肝臓から取り出した抽出物を用いて Aldh2 活性を評価したところ、PA に加えて GALD で Abs450 が基質なしの陰性対照サンプルと比べ、有意に上昇した (Fig. 6)。さらに全ての基質で、WT と比較して ALDH2*2 マウス肝臓からの抽出物を用いた場合で Abs450 の顕著な減少が認められた。これらの結果から、GALD は Aldh2*2 マウス肝臓ミトコンドリア画分内の Aldh2 により代謝されるものの、代謝能は WT 型の酵素より著しく低いことが明らかになった。すなわち、グリシドールの暴露量にもよるが、体内で毒性発現レベルの GALD が代謝活性化により産生された場合、グリシドール対して ALDH2*2 を保有する人々が高感受性を示す可能性があることが示唆された。

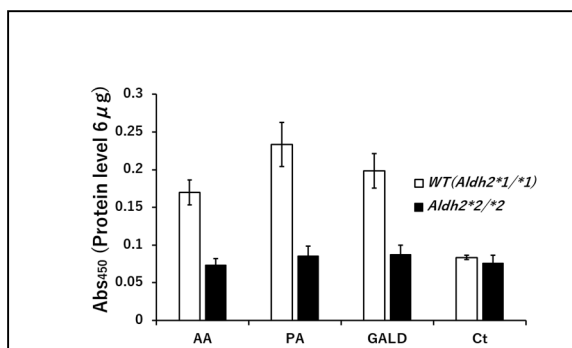


Fig. 6. ALDH2 不活性型マウスの肝臓を用いた ALDH2 酵素活性測定結果 XTT 試薬を用いてマウス肝臓ミトコンドリア画分内に含まれる ALDH2 酵素反応時に生成する NADH の量から酵素活性を評価した。また、今回、WT (Aldh2*1/*1)、Aldh2*2/*2 のヒト遺伝子ノックインマウス肝臓を用いて実験を行った。

本研究においてグリシドールが体内の ADH の代謝を受けて 2 官能基を持つ GALD に変わり細胞内で ICL を作る可能性があると考えられた。さらに、肝臓ミトコンドリア内で発現する ALDH2 が GALD を解毒代謝することを明らかにした。加えて、ヒト代謝機能不全型 ALDH2*2 遺伝子ノックインマウスの肝臓ミトコンドリアの不活性型 ALDH2*2 が GALD を解毒代謝しにくいことを明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tian Shaomin, Nakamura Jun, Hiller Sylvia, Simington Stephen, Holley Darcy W., Mota Roberto, Willis Monte S., Bultman Scott J., Luft J. Christopher, DeSimone Joseph M., Jia Zhenquan, Maeda Nobuyo, Yi Xianwen	4. 巻 133-134
2. 論文標題 New insights into immunomodulation via overexpressing lipoic acid synthase as a therapeutic potential to reduce atherosclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vascular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 106777 ~ 106777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vph.2020.106777	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura Jun	4. 巻 33
2. 論文標題 Potential Doxorubicin-Mediated Dual-Targeting Chemotherapy in FANC/BRCA-Deficient Tumors via Modulation of Cellular Formaldehyde Concentration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 2659 ~ 2667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura Jun, Carro Sujey, Gold Avram, Zhang Zhenfa	4. 巻 266
2. 論文標題 An unexpected butadiene diolepoxide-mediated genotoxicity implies alternative mechanism for 1,3-butadiene carcinogenicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 129149 ~ 129149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemosphere.2020.129149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura Jun, Holley Darcy W., Kawamoto Toshihiro, Bultman Scott J.	4. 巻 42
2. 論文標題 The failure of two major formaldehyde catabolism enzymes (ADH5 and ALDH2) leads to partial synthetic lethality in C57BL/6 mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-020-00160-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Jun, Nakamura Mai	4. 巻 88
2. 論文標題 DNA-protein crosslink formation by endogenous aldehydes and AP sites	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 102806 ~ 102806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2020.102806	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計10件(うち招待講演 2件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yuya Fujia, Jun Nakamura, Zhenfa Zhang, Tomonari Matuda, Masanobu Kawanisi
2. 発表標題 Alcohol dehydrogenase-mediated activation of glycidol leads to the generation of DNA-crosslinking metabolites
3. 学会等名 13th International Conference on Environmental Mutagens, Ottawa, Canada (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田優也、中村純、Zhenfa Zhang、松田智成、高田穰、川西優喜
2. 発表標題 アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)と Glycidol の反応代謝物による新規 DNA 鎖間架橋形成経路に関する研究
3. 学会等名 変異機構研究会・第33回夏の学校
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田優也、中村純、Zhang Zhenfa、松田知成、川西 優喜
2. 発表標題 アルコールデヒドロゲナーゼとGlycidolから生成される反応代謝物のDNA架橋形成能評価
3. 学会等名 日本放射線影響学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田優也, 中村純, Zhang Zhenfa, 松田知成, 高田穰, 川西 優喜
2. 発表標題 アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)を介した新規 DNA 鎖間架橋形成経路に関する研究
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村純、藤田優也、松田知成、川西優喜
2. 発表標題 電子タバコのペーパーなどに含まれるグリシドールが代謝活性化され DNA 鎖間架橋を誘導する
3. 学会等名 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村純
2. 発表標題 ホルムアルデヒドによるストレスがもたらす生体への影響
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村純
2. 発表標題 ホルムアルデヒド/アセトアルデヒドにより産生される蛍光性付加体と免疫反応
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 純, Sujeý Carro, Avram Gold, Zhenfa Zhang
2. 発表標題 エポキシブタンジオールの遺伝毒性の解析により明らかになったブタジエンの新たな 発癌メカニズム
3. 学会等名 日本環境変異原学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jun Nakamura, Sujeý Carro, Avram Gold, Zhenfa Zhang
2. 発表標題 Unexpected 3-Butene-1,2-Diol-Mediated Genotoxicity Implies Alternative Mechanism of 1,3-Butadiene Carcinogenesis
3. 学会等名 Environmental Mutagenesis & Genomics Society Virtual Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jun Nakamura, Masanobu Kawanishi, Takashi Yagi, Toshiya Okada, Naoki Kunugita
2. 発表標題 Antigenic, Inflammatory DHP-Lysine Adducts Are Induced by Aldehydes in the Vapor of Both Flavored and Unflavored E-cigarettes and Heated Tobacco Products
3. 学会等名 Society of Toxicology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	松田 知成 (Matsuda Tomonari) (50273488)	京都大学・工学研究科・教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	川西 優喜 (kawanishi Masanobu) (70332963)	大阪公立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授 (24403)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of North Carolina at CH			
米国	University of North Carolina at CH			
米国	University of North Carolina at CH			
米国	ジョージア工科大学			