

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510076

研究課題名（和文）環境発がん性物質によるタンパク質付加体の解析と生体影響

研究課題名（英文）Analysis of Protein adducts derived from environmental carcinogens and their biological activities

研究代表者

高村 岳樹（TAKAMURA TAKEJI）

神奈川工科大学・工学部・教授

研究者番号：50342910

研究成果の概要（和文）：

発がん性物質である 3-ニトロベンゾアントロン（NBA）が、タンパク質についてどのような修飾を行うかを明らかとすると共に、その生体影響を明らかにすることを目的とする。NBA はタンパク質構成成分である、リシン、システイン、トリプトファンに修飾を行い、そのうちリシン修飾については、その化学構造を別途合成により明らかとした。これらはヒストン修飾も行うことも明らかとした。しかしながら、生体内での検出は感度の問題もありできなかった。

研究成果の概要（英文）：

3-nitrobenzanthrone is a newly discovered environmental carcinogen. In this study, in order to know protein modification with NBA, several experiments were performed. NBA was found to modify lysine, cysteine and tryptophan in moderate yields. Chemical structure of lysine modified with NBA was also revealed by the independent chemical synthesis. This material was found in protein hydrolysates that has been treated with NBA. However, in vivo formation of this compound was not assigned in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

近年のがん研究の進展で、発がんの初期過程は、「発がん性物質による DNA の修飾とそれに伴う遺伝子の変化」のみならずエピジェネティックな変異が重要であることが分かってきている。エピジェネティックな変異を誘発する因子は多数、報告されているが、細胞

内環境を変化させる因子として、タンパク質の修飾があげられる。とくにクロマチンなどの核内タンパク質に修飾が起これば、遺伝子の発現調節へと密接に影響を及ぼすことは容易に想像され、また機能性蛋白質への修飾はその機能変化による毒性の発現が憂慮される。2000 年以降「反応性の高い求電子化

化合物」によるタンパク質付加体に関する研究発表が次第に増加してきたが「発がん性物質によるタンパク質付加体の化学構造および修飾位置に関する研究」は、国内外での報告例はない。上述のように発がん性物質によるタンパク質修飾は、今後、十分注目をされる分野であるため、発がん性物質のタンパク質付加体生成の基礎的なデータの提出が必要とされている。発がん性物質によるタンパク質付加体生成の未解決の問題点：発がん性物質は細胞内で親電子化合物(究極活性体)へと活性化され、細胞内のタンパク質や DNA を攻撃する。そのタンパク質付加体は、これまで発がん性物質の暴露の指標として用いられてきた。例えば、発がん性物質のヘモグロビン付加体としてヒト血液試料から検出され、その構造は「システイン」に結合していることが分かっている。一方、発がん物質であるアミノビフェニルはアルブミン中の「トリプトファン」と BaP に関しては「アスパラギン」と結合することが示されているが、そのいずれも化学構造や結合位置については不明である。近年、ある種の親電子化合物を細胞に投与すると、細胞内の特定のタンパク質の部位特異的に修飾が起こることが示されている。

2. 研究の目的

発がん性物質によるタンパク質修飾の意義：発がん性を示す化合物が、細胞内のタンパク質を攻撃し、それらの一部を修飾するという事実—タンパク質付加体生成—はすでに 1940 年代に明らかになっている。しかしながら、発がん性物質によるタンパク質付加体研究では化学的な構造が十分に解明されていない、標的タンパク質が不明である、修飾されたタンパク質の機能変化および、それに伴う生態影響などが明らかにされていない等の問題点が山積している。それらの研究は国内外での報告例はほとんどないため、本申請研究でタンパク質付加体の化学構造を含めた全容解明に向けた新たな方法論の確立と、その生体影響について深く研究する。

3. 研究の方法

(1) 発がん性物質の究極活性体の合成
発がん性物質として、申請者が大気環境中より見いだした 3-ニトロベンゾアントロン (3-NBA) の究極活性体は既に合成方法が確立しているため、それに従って合成を行う。

(2) 究極活性体と保護アミノ酸との付加体生成反応の解析
親電子化合物による攻撃を受けやすいアミノ酸としてシステイン、リジン、チロシン、トリプトファンの 4 種類を用いる。アミノ酸の末端アミノ基は、究極活性体の反応対象となるため、その部位を保護したアミノ酸を用

い、付加体生成反応をおこなう。反応生成物は HPLC-MS により解析を行い、コントロール反応試料にはない HPLC ピークの確認とそのピークの質量分析解析を行う。

(3)：アミノ酸付加体の構造解析

アミノ酸付加体の別途合成方法の開発を行う。求電子反応より生成する反応生成物を推定し、合成計画をおこなう。反応生成物の推定には MOPAC などの計算化学的手法を用いる。さらに DNA 付加体生成反応より推定される付加体構造は、C-N 結合を行うものであるため、C-N 結合反応について検討を行う。既に C-N 結合反応について、申請者はきわめて効率的なアリールアミノ化反応 (Buchwald 反応) 条件を報告しているためそれに従って行う。

(4)：アミノ酸付加体の同定

(3) により合成したアミノ酸付加体について、ヒストンおよび、培養細胞に 3-NBA または 3-NBA の代謝活性体を作用させ、回収、加水分解後の LC-MS 解析を行い、タンパク質付加体の存在を明らかとする。

4. 研究成果

(1) 発がん性物質の究極活性体の合成

発がん性物質の究極活性体については、Pd/C 存在下、ヒドラジンの処理により、ヒドロキシアミノ体を得て、さらにピルニトリルの処理により、究極活性体である、N-acetoxy 体を得た。これに関しては、使用する溶媒により、その生成が左右され、DMF 溶媒を用いると生成がほとんどされず、逆に THF を用いることで効率よく反応が進行することがわかった。

(2) 究極活性体と保護アミノ酸との付加体生成反応の解析

(1) で得られた究極活性体をアミノ酸と反応させた、当初、ペプチド鎖を形成するアミノ基を保護する経路で反応を行った。この時、ペプチド鎖を形成するアミノ基にはアセチル基で保護をしたものを用いた。その結果、トリプトファン、システイン、リジンと、N-acetoxy 体の反応で、これら 3 種類のアミノ酸はいずれも 3-NBA 付加体由来の MS ピークを LC-MS により確認することができた。UV ピークの面積 (UV450) から判断した場合、システインおよびリジンと反応生成物はト

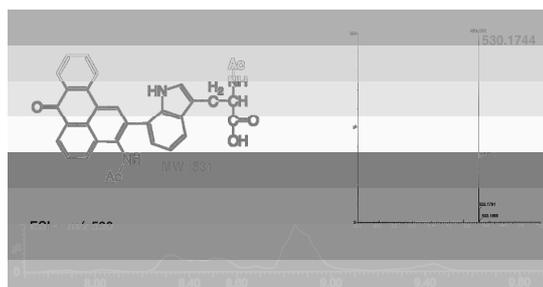


図1 トリプトファンと 3-NBA の究極活性体との反応生成物の LC/MS による解析

リプトファンよりも 10 倍程度収率が多いことを確認した (図 1)。

(3) アミノ酸付加体の構造解析

3-NBA の DNA の付加体はアミノ基との反応が主であることが知られているので、アミノ基との反応生成物であることが推定されるリシン付加体について別途合成方法の開発を行った。当初、銅を用いるウルマンタイプのアニメーション反応により、合成を試みたが、目的の化合物を得ることができなかった。そこでパラジウムを用いるアリールアニメーション反応を用いて同様の反応を行うこととした。数種のフォスフィンリガンドを用いて、検討した結果、このアミノ酸誘導体の効率的別途合成には、BINAP を用いるアリールアニメーションが有効であることが判明した。得られたカップリング化合物は脱保護を行うことにより、目的とするリシン付加体を得ることができた (図 2)。

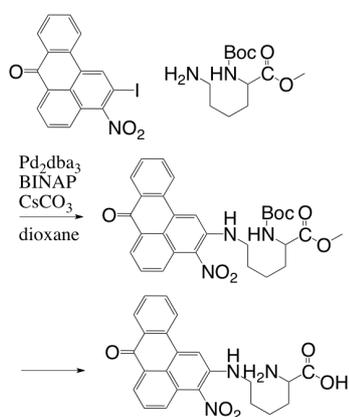


図 2 アミノ酸付加体の合成ルート

(4) アミノ酸付加体の同定

究極活性体である N-acetoxy 体とヒストン (子牛由来) を反応させ、(3) で得られた化合物が存在するかを確認した。反応後、ヒストンを含む溶液は 1N 塩酸で処理をし、90 °C で一時間加水分解させた。得られた溶液を中和して、LC-MS に供与した。その結果、リシン-NBA 付加体の存在を確認することができた。一方、3-NBA を培養細胞に処理し、総タンパク画分を同様に加水分解処理した場合、目的とするピークを得ることができなかった。加水分解処理後の溶液量が比較的多くなることから、付加体のみを濃縮する前処理方法の開発が必要であることが明らかとなった。

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 Takamura-Enya T., Ishii R, Oda Y., Evaluation of photo-genotoxicity using the umu test in strains with a high sensitivity to oxidative DNA damage, 査読有, Mutagenesis 26, No. 4, 2011 pp. 499 - 505, doi:10.1093/mutage/ger008
- ② Takamura-Enya, T., Ishii, R., BODIPY-modified 2'-deoxyguanosine as a novel tool to detect DNA damages, 査読有, Bioorg. Med. Chem. Lett., 21, pp 4206-4209, 2011, doi: 10.1016/j.bmcl.2011.05.084
- ③ Nakano T, Matsushima-Hibiya Y, Yamamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Fukuda H, Ono M, Takamura-Enya T., Kinashi H, Totsuka Y. ADP-ribosylation of guanosine by SC05461 protein secreted from Streptomyces coelicolor, 査読有, Toxicol, 63, 2013, pp55-63, doi: 10.1016/j.toxicol.2012.11.019
- ④ Hidaka H, Tsukamoto T, Oyama T, Mitsutsuka Y, Takamura T., Serpone N. Photoassisted defluorination of fluorinated substrates and pharmaceuticals by a wide bandgap metal oxide in aqueous media, 査読有, Photochem Photobiol Sci. 12, 2013, pp751-759, doi:10.1039/c2pp25358e

[学会発表] (計 11 件)

- ① 高村岳樹, DNA 付加体合成の新展開, 日本環境変異原学会第 39 回大会 (2010) エポカル筑波 (筑波)
- ② 高村岳樹, 石井亮子, DNA アルキル化剤の新規検出試薬の合成と評価, 日本薬学会第 131 年会 (2011) グランシップ静岡 (静岡)
- ③ 石井亮子, 高村岳樹, 大気汚染物質フェナレノンの光遺伝毒性評価, 日本薬学会第 131 年会 (2011) グランシップ静岡 (静岡)
- ④ 高村岳樹, BODIPY 修飾デオキシグアノシンを用いた DNA 損傷性物質の検出, 第 70 会日本癌学会学術総会 (2011) 名古屋国際会議場 (名古屋)
- ⑤ 高村岳樹, 石井亮子, 新規 DNA アルキル化剤検出試薬の合成と評価, フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー (2011) 金沢エクセルホテル東急 (金沢)
- ⑥ 高村岳樹, 石井亮子, 新規アルキル化剤検出試薬としての BODIPY-dG の合成, 評価, 日本環境変異原学会第 40 回大会 (2011) 学術総合センター (東京)

- ⑦ Takamura-enya, T., Ishi, R., Oda Y., Evaluation of photo irradiated genotoxic activity of phenalenone, an aromatic keto compound present in atmospheric environment, Setac Asia Pacific 2012 (2012) ANA Hotel (Kumamoto)
- ⑧ Ishi R., Takamura-enya T., Oda Y., Evaluation of photogenotoxicity of phenalenone derivatives, Setac Asia Pacific 2012 (2012) ANA Hotel (Kumamoto)
- ⑨ Takamura-enya T., Carcinogenicity and DNA adduct formation of a mutagenic environmental pollutant, 3-nitrobenzanthrone, BIT's 5th annual world cancer congress (2012) Beijing International Convention Center, (China)
- ⑩ 高村岳樹, 小田美光, 脂肪酸グリシドールの遺伝毒性 日本環境変異原学会第41回大会 (2012) グランシップ静岡(静岡)
- ⑪ 石井亮子, 高村岳樹, 小田美光, 川西優喜, 八木孝司, フェナレノン誘導体の遺伝毒性及び光遺伝毒性, 日本環境変異原学会第41回大会 (2012) グランシップ静岡(静岡)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高村 岳樹 (TAKAMURA TAKEJI)
神奈川工科大学・工学部・教授
研究者番号：50342910

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：