

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：33903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860024

研究課題名(和文)全DNA損傷体定量分析のための超高感度分析プラットフォーム構築

研究課題名(英文)Development of ultrasensitive and simultaneous quantitative method for DNA adducts

研究代表者

村上 博哉 (Murakami, Hiroya)

愛知工業大学・工学部・講師

研究者番号：40515128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：DNA付加体はガンへの関連が疑われ、バイオマーカーとしての重要性が指摘されている。その一方で生体中の高度な修復機構により、百万から十億個の未損傷体中にわずか数個程度と極微量であるため、分析手法には非常に高い感度が要求される。本研究ではLC/MSおよびCE/MSでの定量法の確立を目的とし、汎用機でも定量可能な高感度分析システムの構築を目指し、検討を行った。その結果、従来法と比較して一桁以上の感度上昇に成功した。

研究成果の概要(英文)：Quantitation and identification of DNA adducts, which was induced by genotoxic compounds and their reactive metabolites, can be important for understanding the carcinogenic process and risk assessment. Sensitive methods have been used for the quantitation of DNA adducts because almost all of DNA adducts will be removed by inherent DNA repairing system, typically corresponding to a few adducts in million - billion normal 2'-deoxynucleosides. In this research, a more highly sensitive method than general one in liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry was studied. By optimizing each condition, we achieved an improvement in sensitivity by one order of magnitude in each system.

研究分野：医歯薬学

キーワード：DNA付加体 質量分析 高感度

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の報告によると、3人に1人がガンによって命を落としている。このガン化について、各種化学物質に由来して生成するDNA付加体の塩基配列中での発生が、そのファーストステップであると考えられており、これまで多くの研究がなされてきている。しかし恒常的に生成する多くのDNA付加体は、生体に存在する高度な修復機構により、除去・修復されるのが一般的である。そのため、生体内において存在するDNA付加体の残存量は、DNA付加体の種類にもよるが、 $10^6 \sim 10^9$ 個あたりにわずか数個程度でしかないことが知られている。またそれに加えてDNA付加体研究の研究対象は、生体由来の血液や臓器であり、分析に供することが可能試料量は非常に限定的となるため、採取可能なDNA量は限られてしまう。一般的なDNAを対象とする研究であれば、PCRなどを用いて微量のDNAを増幅し、測定可能量にすることは可能である。しかし本研究の測定対象であるDNA付加体の分析を行う場合、PCRなどを用いてDNA付加体を増幅することは不可能であり、採取可能なDNA中に存在するものしか分析系に供することができない。そのため定量手法には非常に高い感度が要求される。その定量手法としては、放射性物質である ^{32}P を用いた放射標識法が、非常に高い感度を有しているため、以前より用いられてきている。しかし放射標識法では、その著しく高い感度が放射性物質である ^{32}P を用いることで得られているため、安全性およびハンドリングの面から測定者を限定する手法であることから、代替法の開発が求められてきている。

その代替法として近年、液体クロマトグラフィー エレクトロスプレーイオン化 質量分析装置(LC-ESI-MS)を用いた定量手法が注目されている。LC-ESI-MSは、近年の各種オミクス分析へ適用されることによって高感度化の需要が非常に高まり、劇的な感度上昇が起こっている機器である。しかし現状では、上述の通りDNA中におけるDNA付加体の存在確率の低さに加え、入手可能なDNAの絶対量の少なさを考慮すると、現在多くのラボなどで使用されている汎用機での測定は困難な状況である。そのため現状では、最新鋭の装置を利用したものや、エレクトロスプレーイオン化時に生成する液滴を微細化することによって、イオン化効率を改善し、汎用のエレクトロスプレーイオン化装置よりも高感度化が可能なナノエレクトロスプレーイオン化を用いた高感度化などを利用した手法が利用されている。これらの手法は、DNA付加体生成とガンとの関連性を明らかにする上で非常に重要な手法であり、いくつかの結果も見えてきている。しかし多検体試料中のDNA付加体の定量を考慮すると、より多くの施設での使用が可能な汎用性のあるLC-ESI-MSを用いた定量手法の開発が求められている。

さらにこのLC-ESI-MSを用いたDNA付加体

分析に関しては、DNA adductomics と呼ばれるアプローチへの利用が注目を集めており、多くの review も報告されている。このDNA adductomics とは、これまでのDNA付加体研究において進められてきた、発ガン性物質とそれに由来して生成するDNA付加体の生成量などの関連性を評価する手法ではなく、様々なDNA付加体を網羅的に定量し、発がんリスクのインフォマテックス評価が可能との考えのもと発案された手法である。この戦略は、バイオマーカー探索などを考慮しても非常に重要な戦略であるが、上述の通り、DNA付加体量の絶対量の少なさが原因で、超高感度定量分析手法の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、様々な原因によって生成するDNA付加体に関して、網羅的な定量分析を可能にする手法の確立を目的とし、研究を行った。研究の方向性としては、前処理から検出までの一連の流れをもう一度見直し、検出器としてはESI-MSを、分離系にはLCに加え、キャピラリー電気泳動(CE)などを駆使し、超高感度定量分析手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 選択的DNA付加体捕捉用前処理デバイスの開発

DNA付加体のオミクス分析を考慮した場合、多検体試料の同時前処理が必要不可欠となる。その簡便かつ高選択的な前処理手法の開発を目指し、検討を行った。方法としては、マイクロピペット用チップに選択性を出すことが可能な固定相担体を充填し、固定相の種類および洗浄溶液などに関して最適化を行い、DNA付加体分析用に最適化された前処理手法の確立を行った。

(2) 分析システムとしての高感度化に関する検討

DNA付加体分析手法には、非常に高い感度が要求される。本研究では、分析システムの高感度化を目指し、ESI時のイオン化効率の改善を目的とし、用いる溶離液の組成に関して検討を行った。具体的には、有機溶媒組成とそれに加える添加剤などがDNA付加体の感度に与える影響などに関して検討を行った。

(3) CE/MS分析に向けた高感度手法の開発

さまざまな分析プラットフォームの開発は、LC/MSのみでは不可能なDNA付加体の定量を可能にする。本研究では、LC/MS以外の測定手法として、DNA付加体のnucleotide体を測定対象物質としたCE/MSによる高感度DNA付加体の定量分析手法の確立を検討した。具体的には、主に二点のことを検討し、CE分析において欠点となっている試料注入量の増量を目指し、オンライン濃縮などを駆使した試料注入量の増加、とESI高感度を目指したnucleotide体の陽イオン化、の二点に関して検討を行った。

4. 研究成果

(1) 選択的 DNA 付加体捕捉用前処理デバイスの開発

まず、DNA の酵素処理時に大過剰に生成する未損傷体を除去し、選択的に DNA 付加体を捕捉することが可能な前処理チップの作製および条件の最適化を行った。前処理チップとしては、我々はこれまでの検討で、DNA 付加体を選択的に捕捉可能な前処理デバイスに関して報告しており (Anal. Sci., 2011, 27, 217), それらの知見をベースにし、遠心機による多検体試料の同時前処理を可能とするチップの作製の検討を行った。まずはじめにチップに充填する固定相に関して検討を行ったところ、従来用いていた ODS を、poly(styrene-divinylbenzene) (SDB) に変更することによって、DNA 付加体の保持能および未損傷体の除去率が改善できることが明らかとなった。

次に前処理時に選択性を出すための手段として、未損傷体を除去するための洗浄溶媒に関して検討を行った。なお DNA 付加体のモデル化合物としては、acetaldehyde 由来の DNA 付加体として知られている *N*²-ethyl-2'-deoxyguanosine (EtdG) および cyclic 1,*N*²-propano-2'-deoxyguanosine (CPrdG) を用いて検討を行った。一般的に逆相型の固相抽出法において洗浄溶媒として利用される水での処理では、十分な 2'-deoxyadenosine (dA) の除去を達成することができなかった。それを改善するために、未損傷体および DNA 付加体に関して HPLC の分離挙動を検討していると、Figure 1 に示すようにギ酸を添加することで酸性条件にした溶離液を使用すると、dA などの保持時間が

劇的に短くなることが明らかとなった。この現象は、溶離液を酸性条件下にすることで dA にプロトンが付加してイオン化し、その結果、保持時間が早くなったものであると思われる。この結果は、ギ酸水溶液を洗浄溶液として用いることで、dA の除去効率を上げられる可能性を示唆するものであった。そこでギ酸を洗浄溶液として利用した時の未損傷体および DNA 付加体の回収率の比較を行った。その結果を Table に示す。ギ酸を添加することによって、水を洗浄溶媒として用いていた時と比較して dA の回収率が減少、つまり除去が効率的に進行することが明らかとなった。以上の結果より、0.1%ギ酸水溶液を洗浄溶液として用いることにした。

Table 洗浄溶液の種類による回収率の変化

	miliQ	0.1 % FA	1 % FA
dC	0.1 ± 0.1	0	0
dG	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1
T	0.4 ± 0.4	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.1
dA	12.9 ± 2.2	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2
CPrdG(S,S)	100.0 ± 1.3	99.1 ± 0.4	99.1 ± 0.6
CPrdG(R,R)	99.5 ± 1.5	99.4 ± 0.8	102.8 ± 0.7
EtdG	95.8 ± 1.9	99.2 ± 0.5	97.1 ± 0.1

これらの洗浄溶液の選択に加え、溶液の添加方法などの最適化を行うことによって、高回収率・高除去率での前処理が可能であることを見出した。その最適化を行った条件・手法を用いて前処理した時の結果を Figure 2 に示す。約 6 桁程度高濃度で存在していた未損傷体を 10^{-9} M まで除去可能な条件の最適化に成功した。このとき DNA 付加体の回収率は、CPrdG (S,S) : $92.4 \pm 3.4\%$, CPrdG (R,R) : $96.4 \pm 3.1\%$, EtdG : $89.9 \pm 3.1\%$ と高い回収率を維持した。

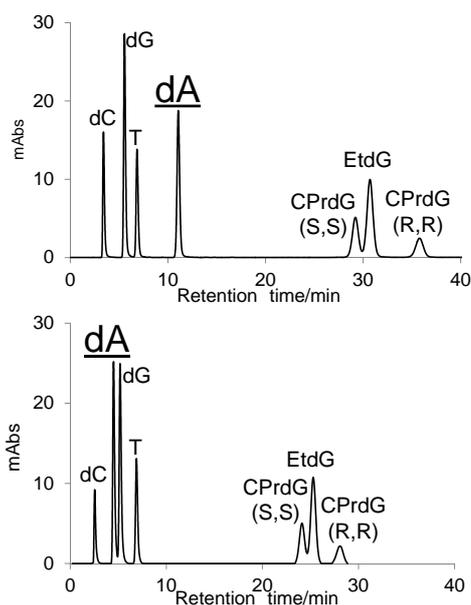


Fig. 1 溶離液にギ酸を添加した時の HPLC クロマトグラムの変化。上がギ酸無添加，下がギ酸添加時の測定結果

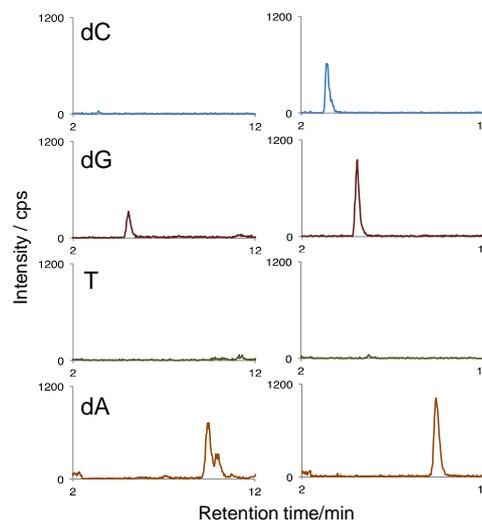


Fig. 2 前処理チップ処理時における未損傷体の除去の効果。左図が前処理チップ処理後，右図が 10^{-9} M の標準試料測定時のピーク強度

2) 分析システムとしての高感度化に関する検討

DNA 付加体は、極性が比較的高いため、低有機溶媒組成の溶離液を用いた逆相カラムによる分離が主に用いられている。低有機溶媒組成を用いた逆相カラムでの分離は、良好な分離が達成可能であるが、検出器として用いる ESI-MS におけるイオン化時の脱溶媒プロセスなどを考慮すると、用いる溶離液は高有機溶媒組成であることが理想的である。そこでまず、一般的な逆相に用いられる低有機溶媒組成下と高有機組成下における DNA 付加体の ESI-MS での検出感度がどれくらい異なるのか、検討を行った。なお低有機溶媒組成における分離では逆相モードを、高有機溶媒組成下における測定では、極性の高い化合物でも分離可能な hydrophilic interaction chromatography (HILIC) を用い、また DNA 付加体のモデル化合物として、EtdG を用いて検討を行った。Figure 3 には、それぞれの分離モードにおいて EtdG を測定したときの multiple reaction monitoring (MRM) でのクロマトグラムの結果を示す。なお測定に用いた試料は、逆相モードでは、 10^{-7} M の DNA 付加体試料を、HILIC モードでは、 10^{-8} M の DNA 付加体試料をそれぞれ注入した結果である。MRM でのクロマトグラムを比較したところ、濃度の違いと保持時間が異なるためピーク強度としては小さくなっているが、ピーク面積値では約 13 倍程度高感度化が可能であることが現在までの検討で明らかとなっている。また 2 種類 (CPrdG と EtdG) の DNA 付加体であるが、分離することが可能であり、また未損傷体との分離も可能であることが明らかとなった (データ非掲載)。

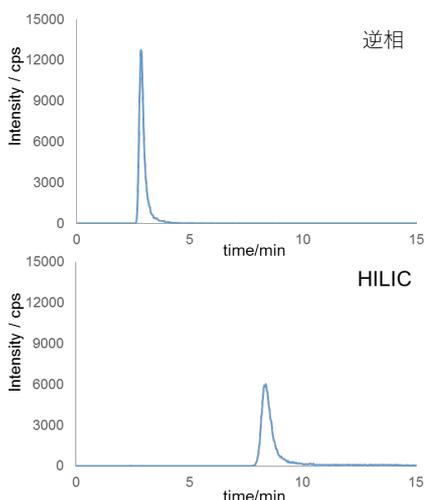


Fig. 3 逆相および HILIC モードで分析した時の MRM クロマトグラム

さらなる高感度化を目指し、溶離液に加える添加剤に関して検討を進めた。その結果、一般的に用いられている酢酸アンモニウムと比較すると、重炭酸アンモニウムを添加剤

として選択することにより、EtdG および CPrdG のピーク強度が数倍増加することが明らかとなった。

(3) CE/MS 分析に向けた高感度手法の開発

まず、CE 分析において欠点となっている注入量の改善を目指し、電気的注入を含めたオンライン濃縮を用いた高感度化の検討を行った。その結果、現在までに約 2000 倍の感度上昇を達成しており、今後さらなる注入系の最適化などの検討を行っていく予定である。

また CE/MS の高感度化に関しては、nucleotide の陽イオン化を用いた感度改善の検討を行った。陽イオン化に関しては、無機金属を用いることによって、nucleotide 体と錯体を形成させ、陽イオン化させることを検討した。その結果、電気泳動過程において nucleotide に金属錯体を形成させることで、陽イオン化が可能である手法を現在までに見出している。またさらに本手法を用いることで、検出感度も negative mode での測定と比較して positive mode にて一桁以上の高感度化が達成可能であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1, G. Giakisikli, A. A. Quezada, J. Tanaka, A. N. Anthemidis, H. Murakami, N. Teshima, T. Sakai, 「Automatic On-Line Solid Phase Extraction-Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Exploiting Sequential Injection Analysis for Trace Vanadium, Cadmium and Lead Determination in Human Urine Samples」, *Anal. Sci.*, 査読有, 31, 383-389, 2015 【DOI: 10.2116/analsci.31.383】

2, Y. Esaka, N. Kato, H. Murakami, B. Uno, H. Murata, M. Inuma, T. Tanaka, 「Simultaneous Analysis of Polymethoxyflavones and Flavanone glycosides in Citrus Fruits by Micellar Electrokinetic Chromatography Using Sodium Deoxycholate」, *Chromatography*, 査読有, 35, 155-162, 2014 【DOI: 10.15583/jpchrom.2014.025】

3, Y. Esaka, F. Rin, M. Kobayashi, R. Osako, H. Murakami, B. Uno, 「Stepwise Elution Method in Micellar Electrokinetic Chromatography via Sequential Use of Lithium Perfluorooctadecyl Sulfonate and Lithium Dodecyl Sulfate」, *J. Chromatogr. A*, 査読有, 1358, 261-268, 2014 【DOI:10.1016/j.chroma.2014.06.073】

4, H. Murakami, R. Kawamura, T. Sakakibara, Y. Esaka, Y. Ishihama, B. Uno, 「Facile and Effective Pretreatment Using Stop and Go Extraction Tips for LC-MS/MS Analysis of Trace Amounts of DNA Adducts」, *Anal. Sci.*,

査読有, 30, 519-522, 2014 【DOI: 10.2116/analsci.30.519】

〔学会発表〕(計 36 件)

1, 江坂幸宏, 岡本哲郎, 宇野文二, 村上博哉, 鳥村政基, 廣川健, 石濱泰, 動電過給導入 シースレス ESI-MS によるヌクレオチド検出法の開発, 日本薬学回第 135 年会, 2015 年 3 月, 神戸

2, Yukihiro Esaka, Hiroya Murakami, Ryohei Osako, Mika Urushibara, Bunji Uno, Masaki Torimura, Yasushi Ishihama, Takeshi Hirokawa, Development of CE Focusing-ESI-MS Methods for Highly Sensitive Detection of Damaged Nucleotides, 14th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis, 2014 年 12 月, Kyoto

3, 村上博哉, 岩田朋子, 堀場瑠莉, 川島静香, 金子和弘, 宇野文二, 鳥村政基, 手嶋紀雄, 石濱泰, 江坂幸宏, LC-MS を用いた acetaldehyde 由来 DNA 損傷体の高感度定量分析法の開発, 第 25 回クロマトグラフィー科学会議, 2014 年 12 月, 京都

4, 村上博哉, 質量分析法を基盤技術とする DNA 損傷体定量のための分析プラットフォームの構築, 低侵襲な化学診断法のための呼吸・尿バイオマーカー分析法に関する研究会, 2014 年 10 月 10 日, 名古屋

5, 江坂幸宏, 村上博哉, 大迫亮平, 榊原崇芳, 岩田朋子, 堀場瑠莉, 宇野文二, 鳥村政基, 廣川健, 石濱泰, LC/MS および CE/MS を用いた核酸損傷分析法の開発, 日本分析化学会第 63 年会, 2014 年 9 月, 広島

6, 岩田朋子, 村上博哉, 堀場瑠莉, 川島静香, 金子和弘, 石濱泰, 手嶋紀雄, 江坂幸宏, 宇野文二, Acetaldehyde 由来 DNA 損傷体定量のための高感度 HILIC-ESI-MS 分析系の開発, 第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2014 年 8 月 20-21 日, 東京

7, 江坂幸宏, 大迫亮平, 村上博哉, 榊原崇芳, 堀場瑠莉, 岡本哲郎, 宇野文二, 鳥村政基, 廣川健, 石濱泰, CE 高集束 オンライン 錯体化 ESI-MS 法による損傷ヌクレオチド検出法の開発, 第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2014 年 8 月 20-21 日, 東京

8, 川島静香, 村上博哉, 岩田朋子, 堀場瑠莉, 江坂幸宏, 宇野文二, 石濱泰, LC-MS/MS による網羅的 DNA 付加体分析のための迅速前処理手法開発に関する研究, 日本分析化学会第 62 年会, 2013 年 9 月 10-12 日, 大阪

9, 江坂幸宏, 村上博哉, 大迫亮平, 榊原崇芳, 宇野文二, 石濱泰, 廣川健, 損傷ヌクレオチドの CE/ESI-MS 検出の高感度化に関する研究, 日本分析化学会第 62 年会, 2013 年 9 月 10-12 日, 大阪

10, 大迫亮平, 榊原崇芳, 村上博哉, 川島静香, 宇野文二, 石濱泰, 鳥村政基, 廣川健,

江坂幸宏, 金属錯体化による EKS-CE/MS・DNA 損傷体分析法の高感度化, 第 33 回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2013 年 11 月 13-15 日, 東京

11, 大迫亮平, 榊原崇芳, 村上博哉, 川島静香, 宇野文二, 石濱泰, 鳥村政基, 廣川健, 江坂幸宏, DNA 損傷体の高感度分析のためのオンライン濃縮 CE/錯体化/ESI-MS 法の開発, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月, 熊本

〔その他〕

ホームページ

<http://aitech.ac.jp/~analabo>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 博哉 (MURAKAMI, Hiroya)

愛知工業大学・工学部・講師

研究者番号: 40515128