

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460469

研究課題名(和文) DNAアダクトーム解析のためのDNA付加体およびアミダイトの合成基盤の構築

研究課題名(英文) Synthetic studies of DNA adducts and its amidites for DNA adductome analysis.

研究代表者

松島 芳隆 (Matsushima, Yoshitaka)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：20282816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：入手容易な2-置換フラン誘導体から脂質酸化物(OHE、ONE)の簡易合成法を確立した。その後、これらと各種2'-デオキシヌクレオシドとの反応(共役付加-環化反応)について検討を行い、OHE(or ONE)と2'-デオキシシトシン(or 2'-デオキシグアノシン)の反応について、HPLCによる精製に頼らず、通常の前製(クロマトグラフィーや再結晶)によりそれぞれ目的のDNA付加体(OHE-dC、OHE-dG、ONE-dC、ONE-dG)などを合成することに成功した。さらに、アミダイト体への変換反応について検討し、効率的な合成法を開発した。このほか脂質酸化物以外の要因によるDNA付加体も合成した。

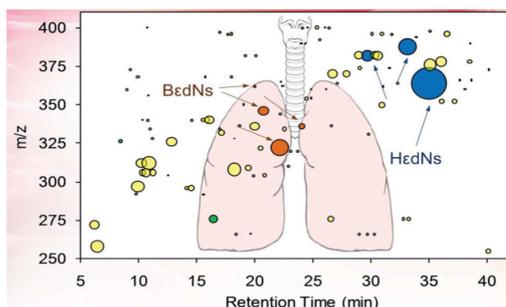
研究成果の概要(英文)：Lipid-peroxidated products (OHE and ONE) were synthesized from the corresponding 2-substituted furans, which are commercially available. Thus obtained OHE (or ONE) were next reacted with 2'-deoxycytosine (or 2'-deoxyguanosine) performing the conjugate addition-cyclization to afford DNA adducts; namely, OHE-dC, OHE-dG, ONE-dC, and ONE-dG, respectively without HPLC separation. Furthermore, transformation to their amidites from these DNA adducts was effectively conducted. In addition, other kind of DNA adducts were synthesized.

研究分野：有機合成化学

キーワード：DNA付加体 アダクトーム アミダイト がん 塩基除去修復酵素 有機合成 脂質酸化物

1. 研究開始当初の背景

活性酸素による酸化損傷や脂質酸化による過酸化脂質の生成などの結果生じた DNA 付加体は突然変異を誘発することが多く、さまざまな臓器において発がんを引き起こすと考えられている。最近 DNA 付加体を網羅的に解析する目的で「DNA アダクトーム解析」が提案されており、例えば、酸化損傷によって生じる 8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)は、アデニンと結合するため突然変異を引き起こすことが知られているが、塩基除去修復酵素 OGG1 と MYTH (MYH) は、それぞれ 8-OHdG とそれに対合したアデニンを DNA 中から除去する働きを持つため、MYH の遺伝的変異がポリポシスを引き起こし、家族性大腸腺腫症(Familial Adenomatous Polyposis: FAP)の原因となる。報告されている多くの MYH 変異型の除去活性の検討はこれまで十分でなかったが、連携研究者の梶村教授らがヒト MYH の大腸菌組み換えタンパク質の高純度精製に成功し、MYH が 8-OHdG と対合したアデニンの除去活性を持つことなどを確認している。また、8-OHdG 以外にも脂質酸化物が DNA 塩基と反応して生じる DNA 付加体が種々報告されてきた。



アダクトームマップの例 (肺) H. Sugimura, T. Matsuda et al. Chem. Res. Toxicol., 2010, 23, 1442-1448. 表紙図より

2. 研究の目的

比較的構造の簡単なエテノシトシン(etheno-dC)やエテノアデニン(etheno-dA)は塩基除去修復酵素 TDG や MPG によって除去されることが知られている。しかし、側鎖のある付加体については報告がなく、その塩基除去修復経路は明らかでない。そこで各種付加体に対するヒト塩基除去修復酵素の活性を調べ、その修復経路を明らかにすることを目標とした。脂質酸化による DNA 付加体は生体内では極微量にしか生成されず入手が極めて困難である。そこで塩基除去修復酵素の修復経路の解明に必要な DNA オリゴマーを手に入れるために、各種 DNA 付加体を効率的に有機合成化学的に得る方法を開発するのが目的となる。

3. 研究の方法

(1) 脂質酸化物(OHE、ONE)の合成法の確立：DNA 付加体の合成に必要な脂質酸化物は、2-置換フラン誘導体から *N*-ブロモスクシンイミド(NBS)や *m*-クロロ過安息香酸

(*m*CPBA)を用いる手法を詳細に検討する。

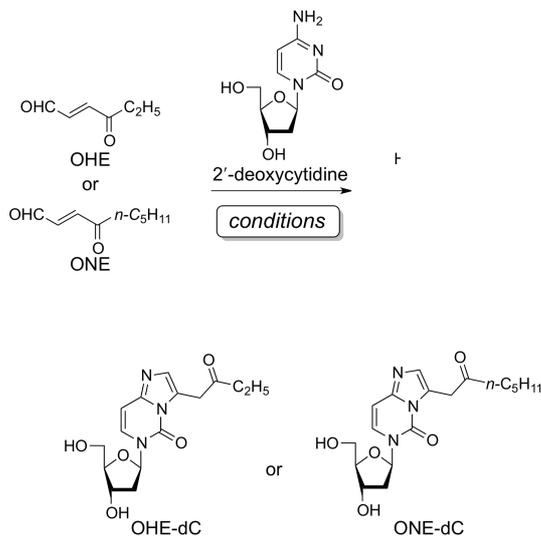
(2) 脂質酸化物と各種 2'-デオキシヌクレオシド(dA、dC、dG)による DNA 付加体の効率的な合成法の確立：DNA 付加体は生体内で DNA の塩基部分と脂質酸化物(OHE、ONE)が共役付加-環化反応することにより生じ、エテノ体(etheno-dA や etheo-dC)や側鎖のあるもの(OHE-dC、ONE-dC)などが検出されている。側鎖の無い etheo 体以外はその効率的な合成法は報告されておらず、例えば、OHE-dC の合成に関する報告はあるが、極小スケールであり、HPLC による精製の必要があるため、その後の DNA オリゴマー作成に用いるには十分量が得られないと考えられるため、脂質酸化物(OHE、ONE)と各種 2'-デオキシヌクレオシド(dA、dC、dG)の共役付加-環化反応について、条件検討を重ね、最適な pH・温度・濃度などを見いだす。詳細な検討により反応収率はもとより、実用性の高い方法による生成物の精製(オープンカラムによるクロマトグラフィーや再結晶など)を実現し、十分な物質量を確保する。

(3) 各種 DNA 付加体のアミダイト体への変換：各種 DNA 付加体を十分量供給できる体制を構築した後、塩基除去修復酵素の活性試験に供する DNA オリゴマーを合成するため、ホスホアミダイト法を採用し、DNA オリゴマーの合成前駆体へ導く。

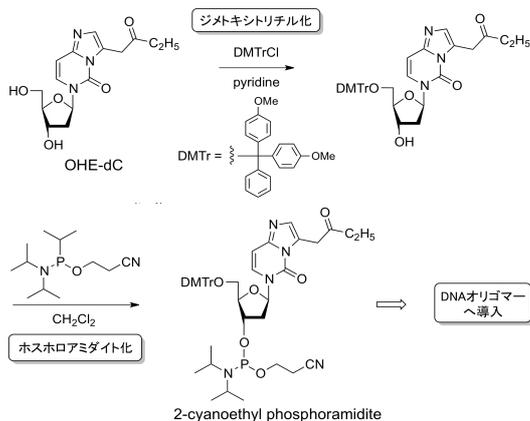
4. 研究成果

(1) 脂質酸化物(OHE、ONE)の簡易合成法を確立：入手容易な 2-置換フラン誘導体を出発原料とし、*m*-クロロ過安息香酸(*m*CPBA)を用いる手法を検討し、この後の DNA 付加体の大量合成に十分な量の OHE および ONE をそれぞれ合成することに成功した。

(2) 脂質酸化物と各種 2'-デオキシヌクレオシドによる DNA 付加体の効率的な合成法を確立：(1)で合成した脂質酸化物(OHE、ONE)と各種 2'-デオキシヌクレオシドとの反応(共役付加-環化反応)について検討を行い、2'-デオキシシトシン、および 2'-デオキシグアノシンの付加体については、HPLC による精製に頼らず、通常の前駆体(クロマトグラフィーや再結晶)によりそれぞれ目的の DNA 付加体(OHE-dC、OHE-dG、ONE-dC、ONE-dG)を十分量合成することに成功した。ただし、dA と脂質酸化物の付加体については、現在までに効率的な合成を達成するに至っていない。



(3) 各種 DNA 付加体のアミダイト体への変換に成功：合成した各種 DNA 付加体 (OHE-dC、OHE-dG、ONE-dC、ONE-dG) について、①ジメトキシトリチル化 ②ホスホロアミダイト体への変換、の2段階を詳細に検討し、アミダイト体の効率的な合成を行った。



(4) 脂質酸化物以外の要因による DNA 付加体、およびその調製に必要な化合物も合成した。

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 3 件)

① N. Akiba, K. Shiizaki, Y. Matsushima, O. Endo, K. Inaba, Y. Totsuka, Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane, *Mutagenesis*, 査読有, Vol. 32, 2017, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex014>

② C. Du, N. Kurabe, Y. Matsushima, M. Suzuki, T. Kahyo, I. Ohnishi, F. Tanioka, S. Tajima, M. Goto, H. Yamada, H. Tao, K. Shinmura, H. Konno, H. Sugimura, Robust quantitative assessments of cytosine modifications and changes in the expressions of related enzymes in gastric cancer, *Gastric Cancer*, 査読有, Vol. 18, 2015, pp. 516–525.

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs1020-014-0409-4>

③ M. Goto, K. Shinmura, Y. Matsushima, K. Ishino, H. Yamada, Y. Totsuka, T. Matsuda, H. Nakagama, H. Sugimura, Human DNA glycosylase enzyme TDG repairs thymine mispaired with exocyclic etheno-DNA adducts, *Free Radical Biology and Medicine*, 査読有, Vol. 76, 2014, pp. 136–146.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.044>

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

松島 芳隆 (MATSUSHIMA, Yoshitaka)
東京農業大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：20283816

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

梶村 春彦 (SUGIMURA, haruhiko)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00196742

(4) 研究協力者

()