

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (S)

研究期間：2006～2010

課題番号：18101003

研究課題名 (和文) DNA アダクトーム解析による未知 DNA 損傷の構造決定とその生物影響評価

研究課題名 (英文) Identification of new DNA damages by DNA adductome analysis

研究代表者：

松田知成 (MATSUDA TOMONARI)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50273488

研究成果の概要 (和文)：遺伝子の本体である DNA は様々な環境要因によって攻撃を受けて傷ついてしまう。我々は、化学物質が DNA に結合して生じる DNA 付加体を網羅的に検出する DNA アダクトーム法を開発し、ヒトの臓器中の主要な DNA 付加体が、脂質の過酸化により生成することを突き止めた。その他、飲酒、アクリルアミド、ナノ粒子、大気汚染物質などが引き起こす DNA 付加体の定量法を開発し、その影響の一端を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：DNA, a principal genetic material, is damaged by attacking from various environmental factors. We developed a method named "DNA adductome" to detect DNA adducts comprehensively, and found that major DNA adducts in human organ are formed from lipid-oxidation. Additionally, we developed the method to quantify DNA adducts caused by alcohol drinking, acrylamide, nano-particles, air-pollutants, to clarify their health risk.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	34,200,000	10,260,000	44,460,000
2007年度	13,900,000	4,170,000	18,070,000
2008年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2009年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
総計	74,800,000	22,440,000	97,240,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：DNA アダクトーム、DNA 付加体、突然変異、LC/MS/MS

1. 研究開始当初の背景

DNA付加体は、発がんや老化の原因であると考えられている。DNA付加体は、外来の紫外線、放射線、発癌物質などによって引き起こされるだけでなく、体内で生じる活性酸素、活性窒素、過酸化脂質などによっても引き起こされる。生体内の微量なDNA付加体を定量することは今まで困難であったが、研究代表

者は以前から高速液体クロマトグラフータンデム質量分析器 (LC/MS/MS) を用いた測定法に着目して研究を進め、様々なDNA損傷を高感度 (一億塩基あたり一個のレベル) で正確に定量できることを示してきた。このことは、ある種のDNA付加体の生体内での存在を証明したり、DNA付加体と発癌物質曝露の関係、DNA修復酵素や薬物代謝酵素の遺伝子多

型とDNA付加体の関係などを解析する研究に道を開いたことになり、化学発癌研究の一つのブレークスルーである。研究代表者は、LC/MS/MSを用いて、既知DNA付加体の定量解析をするだけでなく、生体内のDNA付加体を網羅的に解析する手法を開発し、「DNAアダクトーム解析」と命名した。ヒト臓器DNAのDNAアダクトーム解析から生体内には未知の重要なDNA付加体がまだまだ多数存在することがわかってきた。

2. 研究の目的

本研究では、DNAアダクトーム解析によって生体内で普遍的に検出されるDNA付加体について、その化学構造と生物影響を明らかにすることを主目的とした。

3. 研究の方法

DNA付加体の解析は、DNAを酵素的に分解し、生じたデオキシヌクレオシドをLC/MS/MSで検出・定量した。多くのDNA付加体はLC/MS/MSで分析する際、塩基とデオキシリボース間のグリコシド結合が開裂する特徴的な開裂パターンを示すので、LC/MS/MS分析の際、プリカーサーイオンとプロダクトイオンの m/z の差を116（デオキシリボースの喪失分）に設定すると感度よく測定できる。この性質を利用して、プリカーサーイオンとプロダクトイオンの m/z 差を116に保ちながら、しらみつぶしに測定していく方法がDNAアダクトーム法である。この手法を中心として、様々な生体試料についてDNA付加体の解析を行った。多くは、他研究機関との共同研究で行ったが、ヒトのサンプルを扱う場合は、各研究機関で倫理委員会の承認を得、さらに、提供者の同意を得ている。

4. 研究成果

本研究ではDNAアダクトーム法等を用いて様々な分子疫学研究や化学物質の曝露実験を展開した。

まず、飲酒は明らかに発がんの危険因子であるが、我々はマウスに飲酒させると各臓器にDNA付加体が生じること、さらにアセトアルデヒド脱水素酵素（Aldh2）をノックアウトしたマウスでは、その付加体量が明らかに増えることを確認した。このことは、お酒を飲むと顔が赤くなる人（ALDH2欠損者）は飲酒により、多くのDNA付加体を形成する可能性を示唆している。また、アルコール依存症患者の血液中のDNA付加体を調べた結果、ALDH2欠損者は正常なALDH2を持っている人たちに比べて有意にDNA付加体が増えていた。これら一連の研究はアルコールによる発がんメカニズムの一端を明らかにしたばかりでなく、体質とDNA損傷性の関係を定量的に示す、分子疫学研究の成功例となった（論文4, 10, 16, 22）。

また、ポテトチップなどの食品中に広く含まれるアクリルアミドの遺伝毒性を評価するため、アクリルアミドを投与した動物臓器のDNA付加体を測定し、年齢や臓器による違いを明らかにしたり（論文2）、フラレーン等のナノ粒子によって生じるDNA損傷性の評価を行ったり（論文1, 8）、さらに、大気汚染中の変異原物質3-ニトロベンツアンスロンによるDNA付加体の構造と、その突然変異誘発性について明らかにした（論文9, 12-15, 17, 19-21）。また、DNAアダクトーム法を新しい遺伝毒性評価法として適用するための応用研究も、製薬会社との共同研究で進めてきた（論文3）。

一方、本研究の主目的である、ヒト臓器DNA中に普遍的に存在するDNA付加体の構造を明らかにするため、献体の剖検サンプル

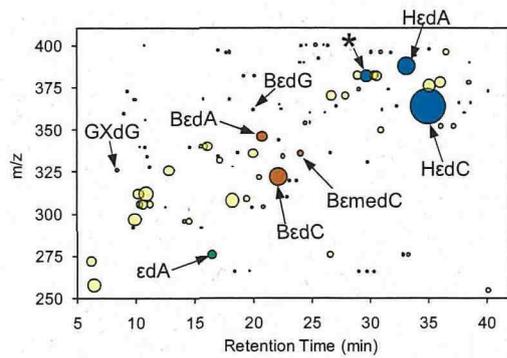


図1 ヒト肺のDNAアダクトームマップ
このバブル図の各バブルがDNA付加体を表している。同定された付加体は矢印を付した。

について解析を行った。まず、いくつかの臓器のDNAでDNAアダクトーム解析を行った結果、ある人の肺のDNAで極めて多くのDNA付加体が検出された(図1)。検出された主なDNA付加体のm/z値と保持時間の情報から同定作業を進めた結果、これらは、脂質が酸化されて生じる4-oxo-2-(E)-nonenal (4-OHE)および4-oxo-2-(E)-hexenal(4-OHE)が引き起こすDNA付加体と同一のものであることが明らかになった(図2)。

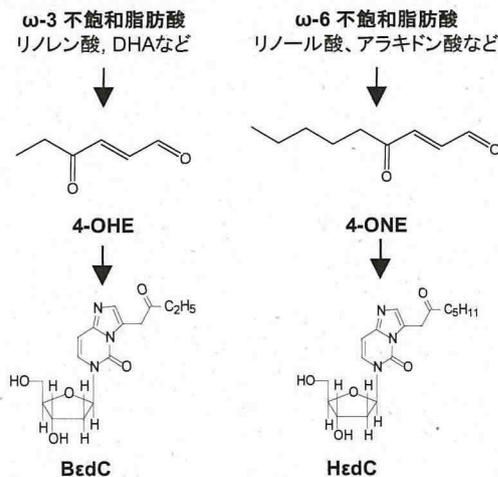


図2 脂質の酸化により生じるDNA付加体
リノレン酸等の ω -3不飽和脂肪酸が酸化すると4-OHEが生じ、DNAを攻撃してB ϵ dC等のDNA付加体を引き起こす。また、リノール酸等の ω -6不飽和脂肪酸は酸化により4-OHEを生じ、H ϵ dC等のDNA付加体を引き起こす。

こうして同定されたDNA付加体について、LC/MS/MSによる定量系を作り、ヒト68臓器について定量を行った結果、4-OHEによるDNA付加体は平均して 10^7 塩基あたり1個存在していた。これは他の付加体と比較して極めて高いレベルであった。以上のことより、生体内の脂質の酸化が、ヒト臓器におけるDNA損傷形成に重要な寄与をしていることが明らかとなった(論文6,7)。

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40件)

すべて査読あり

1. Matsuda, S., Matsui, S., Shimizu, Y., and Matsuda, T. (2011) Genotoxicity of colloidal fullerene c(60), *Environ Sci Technol* 45, 4133-4138.
2. Koyama, N., Matsuda, T., and Honma, M. et al. (2011) Acrylamide genotoxicity in young versus adult gpt delta male rats, *Mutagenesis*. in press
3. Kato, K., Kawanishi, M., Yagi, T., Matsuda, T., et al (2011) Application of the DNA adductome approach to assess the DNA-damaging capability of in vitro micronucleus test-positive compounds, *Mutat Res* 721, 21-26.
4. Oyama, T., Nagayoshi, H., Matsuda, T., and Kawamoto, T. et al. (2010) Effects of acetaldehyde inhalation in mitochondrial aldehyde dehydrogenase deficient mice (Aldh2^{-/-}), *Front Biosci (Elite Ed)* 2, 1344-1354.
5. Matsuda, T. (2010) Anticipated Mutation Assay Using Single-molecule Real-time (SMRT™) Sequencing Technology, *Genes and Environment* 32, 21-24.

6. Kawai, K., Chou, P. H., Matsuda, T., and Kasai, H. et al. (2010) DNA modifications by the omega-3 lipid peroxidation-derived mutagen 4-oxo-2-hexenal in vitro and their analysis in mouse and human DNA, *Chem Res Toxicol* 23, 630-636.
7. Chou, P. H., and Matsuda, T. et al. (2010) Detection of lipid peroxidation-induced DNA adducts caused by 4-oxo-2(E)-nonenal and 4-oxo-2(E)-hexenal in human autopsy tissues, *Chem Res Toxicol* 23, 1442-1448.
8. Totsuka, Y., Kawanishi, M., and Wakabayashi, K. et al. (2009) Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems, *Part Fibre Toxicol* 6, 23.
9. Schmeiser, H. H., Takamura-Enya, T., and Arlt, V. M. et al (2009) The genotoxic air pollutant 3-nitrobenzanthrone and its reactive metabolite N-hydroxy-3-aminobenzanthrone lack initiating and complete carcinogenic activity in NMRI mouse skin, *Cancer Lett* 284, 21-29.
10. Nagayoshi, H., and Matsuda, T. et al (2009) Increased formation of gastric N(2)-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase-2 knockout mice treated with ethanol, *Mutat Res* 673, 74-77.
11. Kawanishi, M., and Yagi, T. et al (2009) Genotoxicity of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, a novel mutagen in ambient air and surface soil, in mammalian cells in vitro and in vivo, *Mutagenesis* 24, 279-284.
12. Gamboa da Costa, G., Takamura-Enya, T., and Phillips, D. H. et al. (2009) Quantification of 3-nitrobenzanthrone-DNA adducts using online column-switching HPLC-electrospray tandem mass spectrometry, *Chem Res Toxicol* 22, 1860-1868.
13. Nishida, H., Kawanishi, M., Takamura-Enya, T., and Yagi, T. (2008) Mutagenic specificity of N-acetoxy-3-aminobenzanthrone, a major metabolically activated form of 3-nitrobenzanthrone, in shuttle vector plasmids propagated in human cells, *Mutat Res* 654, 82-87.
14. Takamura-Enya, T., Kawanishi, M., Yagi, T., and Hisamatsu, Y. (2007) Structural identification of DNA adducts derived from 3-nitrobenzanthrone, a potent carcinogen present in the atmosphere, *Chem Asian J* 2, 1174-1185.
15. Nagy, E., Adachi, S., Takamura-Enya, T., Zeisig, M., and Moller, L. (2007) DNA adduct formation and oxidative stress from the carcinogenic urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone and its isomer 2-nitrobenzanthrone, in vitro and in vivo, *Mutagenesis* 22, 135-145.
16. Matsuda, T., et al (2007) Increased formation of hepatic N2-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase 2-knockout mice treated with ethanol, *Carcinogenesis* 28, 2363-2366.
17. Kanno, T., Kawanishi, M., Takamura-Enya, T., Arlt, V. M., Phillips, D. H., and Yagi, T. (2007) DNA adduct formation in human hepatoma cells treated with 3-nitrobenzanthrone: analysis by the (32)P-postlabeling method, *Mutat Res* 634, 184-191.

18. Kanaly, R. A., Matsui, S., Hanaoka, T., and Matsuda, T. (2007) Application of the adductome approach to assess intertissue DNA damage variations in human lung and esophagus, *Mutation Research* 625, 83-93.
 19. Arlt, V. M., Glatt, H., Gamboa da Costa, G., Reynisson, J., Takamura-Enya, T., and Phillips, D. H. (2007) Mutagenicity and DNA adduct formation by the urban air pollutant 2-nitrobenzanthrone, *Toxicol Sci* 98, 445-457.
 20. Takamura-Enya, T., Suzuki, H., and Hisamatsu, Y. (2006) Mutagenic activities and physicochemical properties of selected nitrobenzanthrones, *Mutagenesis* 21, 399-404.
 21. Nagy, E., Adachi, S., Takamura-Enya, T., Zeisig, M., and Moller, L. (2006) DNA damage and acute toxicity caused by the urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone in rats: characterization of DNA adducts in eight different tissues and organs with synthesized standards, *Environ Mol Mutagen* 47, 541-552.
 22. Matsuda, T., Yabushita, H., Kanaly, R. A., Shibutani, S., and Yokoyama, A. (2006) Increased DNA damage in ALDH2-deficient alcoholics, *Chem Res Toxicol* 19, 1374-1378.
- micronucleus test, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), 2009年8月20-25日、イタリア、フィレンツェ
3. Matsuda, T., Nagayoshi, H., Oka, M., Yukawa, Y., Hori, K., Kawamoto, T., Muto, M., and Oyama, T.: ALDH2 genotype is critical for DNA adducts formation in mice treated with alcohol and acetaldehyde, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), 2009年8月20-25日、イタリア、フィレンツェ
 4. Matsuda, T., Kanaly, R. A., and Chou, P. H.: DNA adductomics: global survey of DNA damage in human tissues. ECNIS WP6 workshop on new developments: biomarkers of complex mixtures and use of 'omics' technology. 2008年9月21日、クロアチア、ツァヴタット

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 知成 (MATSUDA TOMONARI)
 京都大学大学院・工学研究科・准教授
 研究者番号：50273488

(2) 研究分担者

佐伯 憲一 (SAEKI KENICHI)
 横浜薬科大学・薬学部・准教授
 研究者番号：60254306

高村 岳樹 (TAKAMURA TAKEJI)
 神奈川工科大学・応用化学科・准教授
 研究者番号：50342910

川西 優喜 (KAWANISHI MASANOBU)
 大阪府立大学・産学官連携機構・助教
 研究者番号：70332963

[学会発表] (計 40 件)

1. 松田 知成, 質量分析器、次世代 DNA シーケンサーの変異原研究への応用可能性, 日本環境変異原学会 (JEMS) 第 39 回大会, 2010 年 11 月 16-17 日, つくば
2. Muto, S., Kato, K., Yamamura, E., Kawanishi, M., Yagi, T., Matsuda, T., Sugiyama, A., and Uno, Y. :Significance of DNA adductome analysis in in vitro