

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12344

研究課題名(和文)ホルミル基を有する変異誘発性DNA損傷の高感度検出と生体試料への応用

研究課題名(英文) Sensitive detection of mutagenic DNA damages containing formyl groups and its application to biological samples

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒドロキシアミノ基を有するBODIPY誘導体(8-(4-((2-(aminoxy)acetamido)methyl)phenyl)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene)の合成に成功した。この化合物はDNA損傷の一つである脱プリンサイトのデオキシリボースおよびメチル化シチジンの酵素的酸化産物である5-formylcytidineと反応し蛍光性物質を容易に生成することがわかった。一方でDNAの参加損傷物である8-oxo-deoxyguanosineやFAPY-dAなどとは反応せず、選択性の高い試薬であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAの損傷(または内因性の修飾)には様々な種類があるが、ホルミル基(アルデヒド基)を有するDNA損傷に関しては、LC/MS/MSなどによる分析では感度が低く、十分に分析がなされていない。そこで、遺伝毒性物質の作用等によって生じる「ホルミル基を有するDNA損傷」を高感度かつ網羅的に分析する試薬を合成した。これにより種々のDNA試料について網羅的な分析を行い、各種損傷を定量することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：The synthesis of BODIPY derivatives with hydroxyamino groups (8-(4-((2-(aminoxy)acetamide)methyl)phenyl)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) was successful. It was found that this compound reacts with deoxyribose, which is one of the DNA damages. Moreover, it reacted with 5-formylcytidine, an enzymatic oxidation product of methylated cytidine, to easily produce a fluorescent substance. On the other hand, it did not react with 8-oxo-deoxyguanosine and FAPY-dA, which are DNA oxidation damages, and was found to be a highly selective reagent.

研究分野：環境化学

キーワード：アルデヒド検出 DNA損傷 蛍光プローブ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

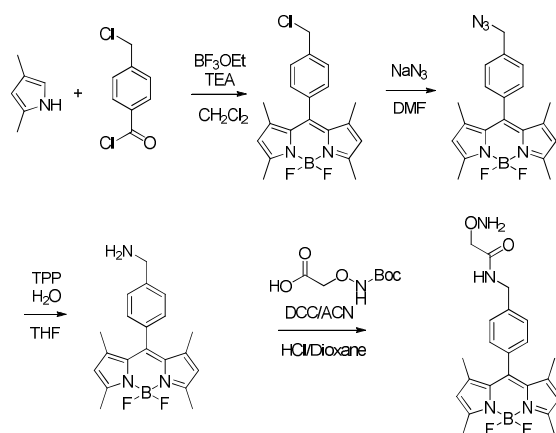
細胞内 DNA には様々な DNA 損傷が生じており、内在性の因子も多数にある。DNA の酸化等によるアルデヒド基 (ホルミル基) の生成はその一つであり、5-formyluracil や脱プリン/ピリミジン塩基で生じたアプリニックサイト (AP サイト) で生成するデオキシリボースもアルデヒドに相当する。これらに加え、最近では DNA 中の 5-methyl-dC (5mdC) が TET を代表とする酵素による脱メチル化反応にともない、5mdC のメチル基が酸化され hydroxymethyl 基、さらに酸化され 5-formyl-dC (fdC) となることが明らかにされている。fdC は細胞内でヒストンなどのタンパク質と反応し DNA とクロスリンク反応を行い、DNA の伸長停止や変異挿入に関わることも知られている。こうした細胞中の DNA 損傷や生物学的な反応等により生じるホルミル基を有する DNA 損傷 (または修飾) を検出することは、DNA 損傷性物質の作用機序や、それにより生じる DNA の変異挿入の有無、DNA の損傷部位の特定、更には未知の DNA 損傷の同定などに大きく寄与するため、効率的な分析方法論の開発が望まれていた。

### 2. 研究の目的

電子吸引性のホルミル基を有する DNA 損傷は LC/MS において感度が不十分であるため高感度の検出できない。そのためホルミル基を有する DNA 修飾体はこれまでに十分に分析されていない。これまでに DNA 中に生じるアルデヒドを検出する目的で、本研究では、いくつかのホルミル基を有する化合物を同時に検出可能なホルミル基に対して汎用的な反応性プローブとより感度の高い蛍光団を組み合わせた化合物の合成を行う。そこでヒドロキシアミンと BODIPY を結合する安定かつ新規な化合物を合成する。得られた蛍光性ヒドロキシアミンと fdC、AP サイトとの反応を試み、この反応を用いて分析方法の開発を行うとともに、培養細胞から抽出した DNA に対する反応の最適化を行い、どのようなホルミル基を有する DNA 損傷を検出可能か、その適応範囲を検討する。

### 3. 研究の方法

合成は右図の方法で行うこととした。すなわち、蛍光性物質である BODIPY の 8 位にベンジルアミンを導入した化合物をまず作成し、得られた化合物に対してさらにヒドロキシアミン酢酸誘導体をアミド結合で結合させるものである。最終的に BOC を脱保護することにより、目的の化合物を得ることが可能となる。目的の化合物が得られれば、さらにいくつかの代表的な DNA 損傷物質との反応を試みそれらの高感度分析方法について検討をおこなった。



### 4. 研究成果

細胞中の DNA には様々な損傷が生じている。これらの損傷は UV や環境因子に由来する外的要因に起因する場合の他、内在性の因子も多数に存在している。これらの損傷は、通常、速やかに修復されるが、修復を逃れた場合突然変異を誘引し、細胞のがん化の要因となる。DNA に生じた損傷の一部にはアルデヒド基（ホルミル基）を有するものがあり、アプリニック/アピリミジン残基や、エピゲノムに關与するホルミルデオキシシチジンなどが相当する。これらの損傷を網羅的に分析する、なおかつ予想される新たなホルミル基を有する DNA 損傷部位を効率よく同定、定量するために、これらのホルミル基と効率的に反応する蛍光プローブが必要となるため、この合成方法について検討した。蛍光団として BODIPY を採用し、BODIPY にヒドロキシルアミノを結合させる合成するルートを検討した。4- (Chloromethyl)benzoyl chloride に対して 2,4-dimethylpyrrole を作用させ、8-(chloromethyl)-phenyl-BODIPY 骨格を合成した。いくつかの反応条件を検討し、おおよそ収率 25%程度で合成することが可能であった。得られた化合物の八口ゲン部位をアミノ基に変換させるためにシュタウディンガー反応を用いた。当量のアジ化ナトリウムを室温で処理させることで八口ゲン基をアジドとした。系中からナトリウムアジドを溶媒抽出で取り除いた後、引き続きトリフェニルフォスフィン・水で処理することでアミノ体とした。化合物 3 からの収率は 17%であった。この反応からさらに BOC 保護をした O-(carboxymethyl)hydroxylamine を反応させ、目的とする化合物の合成を試みた。BOC 保護を行った Carboxymethylhydroxylamine と、8-Phenyl-BODIPY カルボン酸誘導体とのカップリング反応に関しては、DCC を用いた常法により効率よく反応が進むことが明らかとなった。その後の BOC の脱保護により、目的とする化合物が得られるが、脱保護剤の作用により BODIPY 環内の N-B 結合が切断されることが明らかとなった。脱保護剤としていくつかの検討を行った。アセトニトリル中で、TMSI を用いる反応では、0 で反応が進行するが、副反応を制御することができなかった。また、塩酸-メタノールの系では、室温で 24 時間程度で、化合物の蛍光性が失われることを見出した。30%トリフルオロ酢酸 ジクロロメタンを用いる系では、わずかながら化合物を得ることができるが収率は極めて低い。このことから、蛍光物質として BODIPY を用いることが、必ずしも目的化合物を得る上で、最適ではないと考えられた。

BOC で保護を行ったヒドロキシアミンを 8-phenyl-BODIPY 誘導体と反応では脱保護の時点で収量が極端に低下することから、保護基をフタルイミドに変更し、合成ルートを確立することを試みた。合成したフタルイミド BODIPY 誘導体はヒドラジン処理により、容易に脱保護されることが分かった。またこの化合物は溶媒量を適切に用いることで、脱保護後、沈殿することが分かったため、反応後の精製が格段に容易となり、大量に合成する方法論の確立も可能となった。得られたヒドロキシアミノ BODIPY 誘導体は 5-メチルシチジンの酵素的酸化物であるホルミルシチジンや、脱プリンサイトであるデオキシリボースとアニシジンの存在下、容易に反応することが分かった。一方で、酸化損傷である 8-オキソグアニンや FAPY-A などとは反応せず、選択的に DNA 損傷を修飾することが明らかとなった。得られた化合物は HPLC-蛍光検出により高感度に分析することが可能となった。一方で、生成物は安定性が低く、光存在下では反応生成物が迅速に分解されるという欠点を有していることも明らかとなったため、反応温度などの条件によっては検出できない可能性も示された。このため、より、厳密な反応条件の管理が必要となることが分かった。一方で、ホルミル基選択的に修飾できる本試薬は、細胞内の DNA 損傷を網羅的に検出できる可能性があり、今後、試薬の安定性など

を向上させて、DNA 損傷の分析を可能とする系を構築する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tajima Yuya, Toyoda Takeshi, Hirayama Yuichiro, Matsushita Kohei, Yamada Takanori, Ogawa Kumiko, Watanabe Kenji, Takamura-Enya Takeji, Totsuka Yukari, Wakabayashi Keiji, Miyoshi Noriyuki	4. 巻 33
2. 論文標題 Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 1907 ~ 1914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00098	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Takeshima Hideyuki, Niwa Tohru, Yamashita Satoshi, Takamura-Enya Takeji, Iida Naoko, Wakabayashi Mika, Nanjo Sohachi, Abe Masanobu, Sugiyama Toshiro, Kim Young-Joon, Ushijima Toshikazu	4. 巻 130
2. 論文標題 TET repression and increased DNMT activity synergistically induce aberrant DNA methylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 5370 ~ 5379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI124070	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kobayashi Takuma, Toyoda Takeshi, Tajima Yuya, Kishimoto Shinji, Tsunematsu Yuta, Sato Michio, Matsushita Kohei, Yamada Takanori, Shimamura Yuko, Masuda Shuichi, Ochiai Masako, Ogawa Kumiko, Watanabe Kenji, Takamura-Enya Takeji, Totsuka Yukari, Wakabayashi Keiji, Miyoshi Noriyuki	4. 巻 34
2. 論文標題 o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N4-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 912 ~ 919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00536	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Nakatsukasa Hiroko, Oda Mayumi, Yin Jinghua, Chikuma Shunsuke, Ito Minako, Koga-lizuka Mana, Someya Kazue, Kitagawa Yohko, Ohkura Naganari, Sakaguchi Shimon, Koya Ikuko, Sanosaka Tsukasa, Kohyama Jun, Tsukada Yu-ichi, Yamanaka Soichiro, Takamura-Enya Takeji, Lu Qianjin, Yoshimura Akihiko	4. 巻 31
2. 論文標題 Loss of TET proteins in regulatory T cells promotes abnormal proliferation, Foxp3 destabilization and IL-17 expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 335 ~ 347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz008	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Hashimoto Akiko, Takamura Enya Takeji, Oda Yoshimitsu	4. 巻 95
2. 論文標題 Synthesis and In Vitro Biological Evaluation of Psoralen Linked Fullerenes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photochemistry and Photobiology	6. 最初と最後の頁 1403 ~ 1411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/php.13138	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Sassa Akira, Fukuda Takayuki, Ukai Akiko, Nakamura Maki, Takabe Michihito, Takamura-Enya Takeji, Honma Masamitsu, Yasui Manabu	4. 巻 41
2. 論文標題 Comparative study of cytotoxic effects induced by environmental genotoxins using XPC- and CSB-deficient human lymphoblastoid TK6 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-019-0130-y	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 三崎 健太郎, 高村 岳樹, 高野 裕久, 井上 健一郎
2. 発表標題 上皮細胞における抗原下生体応答増強活性に対する検出法の確立と多環芳香族化合物 への適用
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会 (沼津)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 琢磨, 田島 悠也, 豊田 武士, 岸本 真治, 松下 幸平, 山田 貴宣, 小川 久美子, 渡辺 賢二, 高村 岳樹, 戸塚 ゆ加里, 若林 敬二, 三好 規之
2. 発表標題 o-Anisidine 曝露ラット尿中代謝物の探索
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会(沼津)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 依田 ひろみ, 安部 和弥, 武尾 英哉, 高村 岳樹, 小池 あゆみ
2. 発表標題 画像認識技術を利用した小核計測アプリケーションの開発
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会(沼津)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村隼平, 高村岳樹
2. 発表標題 マイクロプラスチック分析における分解酵素の利用と評価
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会(オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高村 岳樹, 坂本 柊哉, 小田 美光
2. 発表標題 UMU テストを用いた神奈川県下河川水の変異原性調査
3. 学会等名 第6回アジア環境変異原学会 / 日本環境変異原学会第48回大会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中谷 奈央子 , 福本 航大 , 炬口 茜 , 高村 岳樹 , 八木 孝司 , 川西 優喜
2. 発表標題 各種変異原の突然変異誘発における TLS ポリメラーゼのはたらき
3. 学会等名 第6回アジア環境変異原学会 / 日本環境変異原学会第48回大会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高村 岳樹、森 みずき
2. 発表標題 ドラッグデリバリー担体としてのナノダイヤモンドの有効性の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
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

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