

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510075

研究課題名(和文) UVA光反応によるニトロソアミン類のDNA・蛋白・生体膜傷害とシグナル伝達擾乱

研究課題名(英文) UVA activated N-nitrosoproline induced damages on DNA, protein and membrane, and disturbance of signal transduction

研究代表者

有元 佐賀恵 (Arimoto, Sakae)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：90212654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：近紫外光(UVA)がニトロソアミン、特にニトロソ化アミノ酸のニトロソプロリン(NPRO)に吸収され、DNA損傷し、DNAに新規付加体を生じることを見出した。また、蛋白モデルのアミノ酸・膜モデルの脂質に対してもNPROは光反応し、生成物を生じた。ヒト皮膚角化細胞由来の培養細胞にUVA活性化NPROは遺伝子毒性を示した。また、NPROの光反応に伴い、一酸化窒素の発生があり、光毒性の一因と分かった。

研究成果の概要(英文)：We investigated near-ultraviolet radiation (UVA) mediated chemical reaction of N-nitrosoproline (NPRO) with DNA, deoxynucleosides, amino acids and membrane lipids, and isolated several new products from the UVA-irradiated mixture. Photogenotoxicity was found with NPRO towards human derived keratinocyte cells. Nitric oxide was released during photoreaction of NPRO to create active radicals that can give phototoxicity.

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：環境解析学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：ニトロソプロリン UVA DNA損傷 一酸化窒素 アルキルラジカル DNA付加体 遺伝毒性 小核形成

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の背景として、まず光毒性については、太陽光紫外線が皮膚がんのリスク要因であることはよく知られており、皮膚透過性の高い長波長部の近紫外線(UVA)も皮膚がんを引き起こすことが知られている。しかもUVAはDNAに直接的には吸収されないため、細胞内の何らかの物質が光エネルギーを吸収して、そのエネルギーをDNAやタンパクに伝えて光傷害を起こす光増感反応が定説となっている。しかしながら、細胞内の何が光増感物質として働いているのかについては諸説があり、はっきりしていない。また、光と化合物という複数の要因の複合影響による光毒性機構についてはまだそれほど広くは研究されていない。

(2) ニトロソアミン・ニトロソ化アミノ酸について、ニトロソアミン類は食品やタバコ煙などに広く含まれ、ヒトは日常的に暴露しているほか、内在的には胃内でアミノ酸がニトロソ化されたニトロソ化アミノ酸が検出されている。たとえばプロリンが胃中で亜硝酸と反応して生じたニトロソプロリンは血中を循環していることが知られており、健康なヒト尿から日常的に3.5-6g/日が検出されている。しかし、ニトロソプロリンは薬物代謝活性化されず、無害と考えられてきた。

(3) 研究動機として、申請者は、それまでの研究で、ニトロソアミン類が薬物代謝酵素によらなくても、UVAで光活性化され、一酸化窒素ラジカルとアルキルラジカルを生じることを見いだしたので、胃などで生成したニトロソアミン、とくにニトロソ化アミノ酸が全身循環して皮膚で日光などのUVAを浴び、光傷害を起こす可能性があると考えた。つまり、代謝的に安定なニトロソ化アミノ酸がNOの運搬体となって、皮膚においてUVAを浴びた部位にNO並びにアルキルラジカルを放出し、遺伝毒性を発揮し、生理機能の擾乱をしている可能性があると考えたことが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胃などで生成したニトロソ化アミノ酸やニトロソアミンが全身循環し、皮膚において長波長紫外線を浴びた部位にNOやアルキルラジカル・活性酸素種を放出し、遺伝毒性を発揮し、生理機能を擾乱する可能性、ならびに体外汚染としてタバコ等に起因するニトロソアミン類が皮膚に付着して光障害を起こす可能性を追求するための基礎研究を行うことである。そのために、ヒト由来皮膚培養細胞やモデル化合物に対する、UVAによるニトロソ化アミノ酸・ニトロソアミン類の光毒性として、DNA損傷性、細胞膜機能障害、シグナル伝達系酵素活性への影響などへの関与を明らかにし、生じるDNAや膜脂質・タンパクの損傷分子の構造解析を行い、反応機構を解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 光活性化には、温度制御した照射チャンバー内で、UVAランプによる照射を行った。混在するUVB光はソフトガラスによるフィルターで除いた。

(2) NPROの光活性化によるデオキシヌクレオシドとの反応解析には、上記照射チャンバー内で、NPROとデオキシヌクレオシドの混合溶液を照射し、得られたサンプルをHPLC解析ならびにLCMSMS解析した。見出された新規付加体については、HPLCによる精製分取を繰り返して必要量を採取し、MS・NMRなどの機器分析により構造を同定した。

(2) NPROの光活性化によるDNA損傷解析には、NPROとDNAの混合溶液を照射後、DNAを透析とエタノール沈澱で精製し、ヌクレオシドまで酵素分解後、HPLCおよびLCMSMS解析した。

(3) アミノ酸に対するNPROのUVA活性化反応解析も同様にHPLCおよびMS等により解析した。

(4) 細胞膜モデルとしての脂質に可溶化したNPROの光遺伝毒性は、光反応後生成物を抽出して、その変異原性をエイムス試験により検出した。

(5) ヒト由来皮膚ケラチノサイト培養細胞に

対するUVA活性化NPROの遺伝毒性は、小核試験により調べた。

(6) NPROのUVA活性化過程におけるNO産生は、グリース法により測定した。

(7) 光動力学的解析のための単波長照射は、自然科学研究機構基礎生物学研究所の大型スペクトログラフを共同利用して行った。

4. 研究成果

(1) NPROの光活性化によるDNAの損傷を解析し、反応生成物の構造解析を行った、その結果、UVA照射によりNPROから一酸化窒素(NO)放出が見られ、NOあるいはNO放出に伴い生じたアルキルラジカルと核酸との反応生成物が期待された。そこで、核酸モデルとしてのデオキシヌクレオシドに対する損傷解析をおこない、デオキシグアノシン(dG)とNPROの光反応で、8-オキソデオキシグアノシン(8-oxodG)、デオキシイノシン、デオキシオキザノシンが生成することが分かった。さらに既知の付加体に加えて、新規の核酸付加体2種類が生じることを見出し、単離同定を行い、(R)-, (S)-8-(2-pyrrolydyl)-dG (G1, G2)と構造決定した。また、デオキシアデノシン(dA)とNPROの光反応を解析し、好気下での反応生成物として、デオキシイノシンならび新規の核酸付加体2種類が生じることを見出し、単離同定を行い、dAの2位置換体(R)-, (S)-2-(2pyrrolydyl)-dA (P1, P2)を単離同定した。一方、dAとNPROの嫌気下での光反応では、dAの8位置換体(R)-, (S)-8-(2-pyrrolydyl)-dA (A1, A2)が形成した。好気下ではdGやdAの8位は酸素ラジカルの付加による8-oxodGの方が優先する可能性が考えられ、エネルギー移動によるタイプI型反応と、活性酸素種の関与するタイプII型反応の競合の可能性が考えられる。さらに、光活性化NPROはDNAと反応し、上記の付加体(G1, G2, P1, P2, A1, A2)を生じることが分かった。

(2) また、NPROの光活性化によるタンパクとの反応に関しては、反応モデルとしてチロシンやグルタチオンがNPROの光分解によって生じる一酸化窒素によりニトロ化を受けてニトロチロシンやS-ニトログルタチオンを生じることを明らかとした。

(3) ヒト由来皮膚培養細胞に対する光毒性解明をおこなった。すなわち、ニトロソプロリンが血液を介して全身循環し、太陽光などのUVA照射部位で毒性を発揮するというモデルから、血液系細胞および皮膚表皮系細胞でのモデル研究が適切と考えた。そこでまず、ヒト由来表皮ケラチノサイト培養細胞NCTC2544細胞およびHaCaT細胞を使った光遺伝毒性検出系の確立を行った。この系を用い、光活性化したNPROの光遺伝毒性を研究したところ、UVA照射量及びNPRO用量依存的にDNA損傷を起こし小核形成を誘起し、培養細胞で遺伝毒性を示すことが分かった。同時に、細胞培養液に用量依存的にNOが検出された。また、血液系細胞として既に遺伝毒性検出法が確立されているリンパ芽球細胞WTK-1細胞を用いて、NPROが光活性化により遺伝毒性を示すことを明らかとした。

(4) 細胞膜モデルとして、脂質(トリオレイン)や脂肪酸に溶かしたNPROにUVA照射したのち、生成物を抽出し変異原性を調べたところ、照射依存的に変異原性が見られ、新規変異原性物質が生じていることが分かった。

(5) 光動力学的特性を研究したところ、320-400 nmの単波長照射による小核形成曲線・NO産生曲線は、ともにNPROの吸光度曲線に沿うことから、NPROのUVA吸収によるNN結合の開裂が光反応律速と考えられることが分かった。

(6) 得られた研究成果により、NPROは、生体内における光感受性化合物として、UVAの内因性光増感剤として働き、光遺伝毒性を引

き起こしていると考えられ、UVAの光毒性機構の一端を明らかにできたと考えられる。今後はさらに、モデル動物等のin vivoにおけるNPROの光毒性研究を行う必要があると考えられる。

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 2 件)

Arimoto-Kobayashi, S., Machida, M., Sano, K., Aoyama, S., Asahi, C., Tanaka, N., Okamoto, K., Negishi, T., Kimura, S. and Suzuki, T., Mutagenicity and NO formation from UVA irradiated N-nitrosoproline, and characterization of photoproduct formed in UVA-irradiated mixture of N-nitrosoproline with 2'-deoxyguanosine in neutral solution, Genes and Environment, 査読有, Vol. 36 (2), 2014, 00-00, DOI: org/10.3123/jemsge.2014.004

Aoyama, S., Sano, K., Asahi, C., Masaki Machida, Okamoto, K., Negishi, T., Kimura, S., Suzuki, T., Hatano, T. and Arimoto-Kobayashi, S., Near ultraviolet radiation-mediated reaction between N-nitrosoproline and DNA: Isolation and identification of two new adducts, (R)- and (S)-8-(2-pyrrolidyl)-2'-deoxyguanosine, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 査読有, Vol. 276, 2013, 1-7, DOI: org/10.1016/j.jphotochem.2013.11.009

[学会発表](計 9 件)

Arimoto-Kobayashi, S., Moriwaki, N., Tanaka, N., Okamoto, K. and Negishi, T., Release of nitric oxide and formation of mutagenic substance from UVA irradiated N-nitrosoproline in non-aqueous lipids, 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRR12014), 2014年3月23日-26日, 京都

有元佐賀恵, 日本環境変異原学会シンポジウムII「光遺伝毒性の最近の動向」招待講演「変異原性物質とDNAの光化学反応」, 日本環境変異原学会42回大会, 2013年11月29-30日, 岡山

Arimoto-Kobayashi, S., Aoyama, S., Asahi, C., Sano, K., Machida, M., Okamoto, K., Negishi, T., Kimura, S., Suzuki, T. and Hatano, T., Near ultraviolet light-mediated reaction between N-nitrosoproline and DNA: Isolation and identification of new adducts, The 6th Asia and Oceania Conference on

Photobiology, 2013年11月10日-13日, シドニー

田中範子, 森脇直史, 岡本敬の介, 根岸友恵, 佐藤聡, 有元佐賀恵, UVA活性化N-ニトロソプロリンによるヒトケラチノサイト由来細胞への遺伝毒性, 第35回日本光医学・光生物学会, 2013年7月12-13日, 浜松

旭千春, 青山周平, 岡本敬の介, 根岸友恵, 波多野力, 有元佐賀恵, N-ニトロソプロリンのUVA光反応によるDNA付加体形成, 第35回日本光医学・光生物学会, 2013年7月12-13日, 浜松

有元佐賀恵, 青山周平, 田中範子, 佐野嘉容子, 根岸友恵, 波多野力, 鈴木利典, 木村幸子, UVA活性化N-ニトロソプロリンによる新規核酸付加体, 第34回日本光医学・光生物学会, 2012年7月27-28日, 神戸
堀ノ内真弓, 有元佐賀恵, 培養ヒトケラチノサイトによる化学物質の光細胞毒性・光遺伝毒性試験, 日本環境変異原学会第40回大会, 2011年11月21-22日, 東京

Aoyama, S., Sano, K., Hatano, T., Kimura, S. and Arimoto-Kobayashi, S., Analysis of photoproducts from a UVA-irradiated mixture of N-nitrosoproline with 2'-deoxyadenosine or 2'-deoxyguanosine, The 5th Asia and Oceania Conference on Photobiology, 2011年7月30日-8月1日, 奈良

青山周平, 佐野嘉容子, 波多野力, 木村幸子, 有元佐賀恵, N-ニトロソプロリンの光活性化による核酸修飾, 第33回日本光医学・光生物学会, 2011年7月22-23日, 大阪

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有元 佐賀恵 (SAKAE ARIMOTO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 90212654

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし