

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：34104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659372

研究課題名(和文) 核酸アダクトを指標とする飲酒に起因する健康被害の解析

研究課題名(英文) Analysis of drinking-derived genetic damage by measuring acetaldehyde adducts

研究代表者

出屋敷 喜宏 (DEYASHIKI, YOSHIHIRO)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：00202193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：飲酒により生体内で生じるエタノール代謝物であるアセトアルデヒドの核酸に対する影響を解明するために、GMP (guanosine monophosphate) のアセトアルデヒド付加体であるCyclic 1,N2-propanoguanosine monophosphate : CPr-Gua-P) およびその脱リン酸化体 (Cyclic 1,N2-propanoguanosine : CPr-Gua) の合成法および測定法を確立し、その測定法が培養動物細胞を用いた核酸損傷を指標とする健康被害の評価に有用であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the influence of acetaldehyde, a metabolite of ethanol taken by drinking, on nucleic acids, the synthesis methods of 1,N2-propanoguanosine monophosphate adduct and 1,N2-propanoguanosine adduct from acetaldehyde were established and the measurement methods of the adducts were developed. The measurement methods were useful to evaluate the genetic damage by acetaldehyde in cultured mammalian cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：核酸 代謝 社会医学 飲酒 遺伝子損傷

1. 研究開始当初の背景

飲酒で摂取されるエタノールは、アルコール脱水素酵素によりアセトアルデヒドに代謝され、さらにアセトアルデヒドはアルデヒド脱水素酵素により酢酸に代謝される。この代謝過程で生じるアセトアルデヒドは、毒性の高い、反応性に富む化合物で、生体内で酸化ストレスの原因物質のひとつとして作用する他、付加体形成(アダクト形成)にも関わる。

これまでに、アセトアルデヒドの核酸アダクトとして複数の DNA アダクトが報告され、遺伝子(二本鎖 DNA)上のアダクト形成が染色体遺伝子の点変異出現に関与することが提唱されている。この点変異は、アダクト形成塩基についての「不正確な DNA 複製」の結果であるとされているが、その他の原因の可能性はこれまでに提示されていない。

また、飲酒は、口腔、咽頭、喉頭、食道および肝臓における発がんの強力な危険因子であることが知られており、食道癌リスクの高さは、赤血球の MCV(平均容積)とアルコール代謝酵素の各遺伝子型から指摘可能とされている。しかしながら、糖尿病患者の1~2ヶ月前の平均血糖値を反映するグリコヘモグロビンのように、飲酒習慣の履歴をたどるためのバイオマーカーは、今のところ見出されていない。

我々は、これまでのアセトアルデヒドの遺伝毒性発現への関与に注目した研究から、アセトアルデヒドの DNA アダクトとして cyclic 1,N²-propanoguanine が生じ、このアダクトの生成は塩基性アミノ酸存在下の緩和な条件で促進されることを見出し、ヒト白血球由来細胞(HL-60)の培養系を用いて、このアセトアルデヒドの DNA アダクトが生細胞でも生じることを示すとともに、LC-MSを用いた定量検出系を確立した。

このような経緯から、生細胞内で RNA アダクトが形成し、このことによる RNA が関与する機能(翻訳過程など)の異常が細胞機能に影響を及ぼすものと考え、その解析基盤となる本研究を立案するに至った。また、核酸アダクトの定量法は、アダクト形成により遺伝子上に蓄積された核酸アダクトあるいは血液や尿へ排泄される核酸アダクトを飲酒習慣のバイオマーカーとして位置づけることを可能にし、検査時の生活状況(生活習慣)やアルコール代謝酵素の遺伝子型を包括した飲酒起因の健康被害の評価に有用であろうと考えた。

2. 研究の目的

大量に飲酒する人やアルコール依存症者等における飲酒起因の健康被害を核酸の損傷を指標として解析するために、核酸アダクトの定量分析法を確立し、その細胞機能(RNA 機能)への影響を解析する基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) Cyclic 1,N²-propanoguanosine monophosphate (CPr-Gua-P) および 1,N²-propanoguanosine (CPr-Gua) の合成

酒向らの方法(Tetrahedron Lett. 43 (2002) 6701-6703)に準じて、guanosine monophosphate または guanosine とアセトアルデヒドをアルギニン存在下にリン酸緩衝液(pH8.0)中で反応させ、生成物を固相抽出カラムにより精製した。合成した両化合物の構造は、質量分析および NMR 分析により解析した。

(2) HPLC 分析および LC/MS/MS 分析

HPLC 分析は、カラムに TSK-GEL ODS-100V(30 x 150 mm, 3 μm)を用いて、移動相を 0.1%酢酸水溶液とアセトニトリルとする濃度勾配溶出により行った。MS/MS 分析は、装置に AB Triple Quad 5500 を用いて、プレカーサーイオンを m/z 431.84、プロダクトイオンを m/z 210.7 (Cyclic 1,N²-propanoguanosine monophosphate の場合)またはプレカーサーイオンを m/z 354.1、プロダクトイオンを m/z 222.1 (Cyclic 1,N²-propanoguanosine の場合)として行った。

(3) 高分子 RNA(酵母抽出物)のアセトアルデヒド処理とアルカリ分解

高分子 RNA とアセトアルデヒド(50 mM)を水溶液中(RNA 分解酵素不在条件)37 で反応させた後、終濃度 1 M となるよう水酸化ナトリウムを添加し、アルカリ分解により高分子 RNA を単分子(モノヌクレオチド)化した。

(4) 高分子 RNA の酵素的分解とモノヌクレオチドの脱リン酸化反応

高分子 RNA(酵母抽出物または培養細胞抽出 total RNA)の酵素的分解には、Nuclease P1 を用い、生じたモノヌクレオチドの脱リン酸化には、大腸菌アルカリ性脱リン酸酵素(BAP)を用いた。

(5) 培養動物細胞のアセトアルデヒド処理と total RNA の抽出

ヒト由来細胞(HepG2 または HL60)を所定濃度のアセトアルデヒド存在下に一定時間培養し、培地を除去した後、RNA 抽出試薬を用いて total RNA を抽出した。この total RNA は、アルカリ分解または酵素的分解後、測定試料または脱リン酸化用試料とした。

4. 研究成果

(1) Cyclic 1,N²-propanoguanosine monophosphate および 1,N²-propanoguanosine の合成

GMP(guanosine monophosphate)のアセトアルデヒドアダクトである Cyclic 1,N²-propano- guanosine monophosphate

adduct (CPr-Gua-P) および 1,N²-propano-guanosine (CPr-Gua) を合成し、精製標品について質量分析及び NMR 分析によりその構造を確認した。CPr-Gua-P の場合、約 80 mg の 3'-GMP 2Na 水和物および約 50 mg の guanosine から研究実施に充分量の合成標品を得た。なお、反応効率については、精製化合物の塩形成等を考慮する必要があり、この点については詳細な検討を要する。

(2)HPLC 分析および LC/MS/MS 分析

CPr-Gua-P の HPLC 分析および LC/MS/MS 分析

高分子 RNA (酵母抽出物) のアルカリ分解産物に過量の合成標品 (CPr-Gua-P) を添加し、HPLC における分離を検討した結果、高分子 RNA 由来のモノヌクレオチドと CPr-Gua-P のピーク (図中の最大ピーク、保持時間約 17.5 分) は明瞭に分離し、CPr-Gua-P の検出は検討試料に共存する高分子 RNA 分解産物の影響を受けないことが明らかとなった (図 1)。

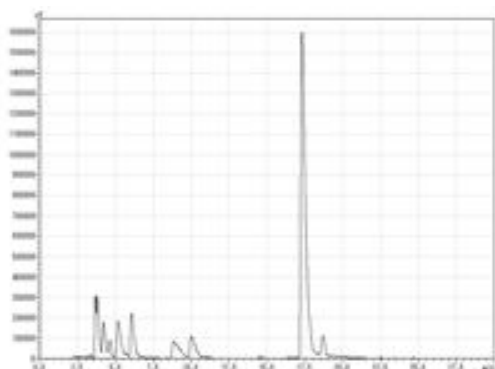


図 1 高分子 RNA (酵母抽出物) のアルカリ分解産物と合成標品 (CPr-Gua-P) の分離

Conditions:

eluant, acetonitrile and 0.1 % acetic acid aqueous solution; column, TSK-GEL ODS-100V(150 × 3.0 mm); column temperature, 30 °C; flow-rate, 0.4 mL/min, detection wavelength, 260 nm.

また、標準品との比較から、保持時間の短い 8 つのピーク (図 1 では、保持時間の短い第 1、第 2 ピークは重なって見える) には、アデニン、グアニン、シチジン、ウリジンのリボース 2'-または 3'-位にーリン酸が結合したモノヌクレオチドに相当するものが含まれたが、一部は同定不能であった。

次に、本分離系に基づいて、LC/MS/MS 分析における CPr-Gua-P の検量線を検討したところ、1 - 100 ng/mL の範囲で $r=0.9970$ の良好な検量線が得られた。この測定系により、アセトアルデヒド処理した高分子 RNA (酵母抽出物) について CPr-Gua-P の生成を検討し、酵母 RNA 1mg 当り約 270 ng の CPr-Gua-P を検出した。

さらに、アセトアルデヒド存在下に培養した HepG2 細胞における CPr-Gua-P の生成を検討した。その結果、 1.6×10^7 cells の細胞を 50 mM アセトアルデヒド存在下に 37 °C で 4 時間培養し、抽出した total RNA について、1 mg 当り 15.2 ng の CPr-Gua-P の生成が確認された。この結果から、アセトアルデヒドが高濃度に存在すれば細胞内で CPr-Gua-P が生じることを示すことができた。しかしながら、飲酒後に想定されるアセトアルデヒドの血中濃度における CPr-Gua-P の測定 (健康被害の評価) については更なる感度の向上が必要であることが判明した。

CPr-Gua の HPLC 分析および LC/MS/MS 分析

先の結果から、飲酒後に想定されるアセトアルデヒドの血中濃度に相当する細胞培養条件における CPr-Gua-P の検出が難しいと考えられたことから、CPr-Gua-P の脱リン酸により得られる CPr-Gua の測定系を検討することとした。

まず、高分子 RNA (酵母抽出物) のアルカリ分解産物について、大腸菌アルカリホスファターゼ (BAP) の作用を検討した。

BAP 作用検討の事前に、高分子 RNA アルカリ分解産物と標準品の対応を検討したところ、図 2 に示すクロマトグラムを得た。高分子 RNA (酵母抽出物) のアルカリ分解産物 (黒線) と標準品 (色線、番号付与) の対応が明らかとなった。なお、この場合に共存物の相互作用の影響か、高分子 RNA のアルカリ分解産物中に同定不能な分解産物が検出された。

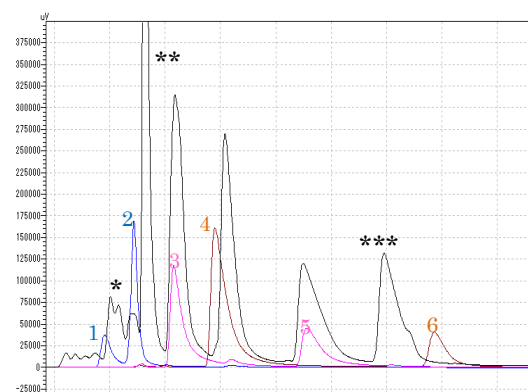


図 2 高分子 RNA アルカリ分解産物と RNA モノヌクレオチドの分離

- 1 : cytidine 3'-monophosphate
- 2 : cytidine 3'-monophosphate
- 3 : 2'(3')-guanosine monophosphate
- 4 : 3'(2')-adenosine monophosphate
- 5 : 2'(3')-guanosine monophosphate
- 6 : 3'(2')-adenosine monophosphate
- * : unknown,
- ** : unknown,
- *** : unknown

続いて、同様の試料（高分子 RNA のアルカリ分解産物および標準品）について、大腸菌アルカリホスファターゼ（BAP）による脱リン酸処理の有効性について検討した。その結果を図 3 に示す。

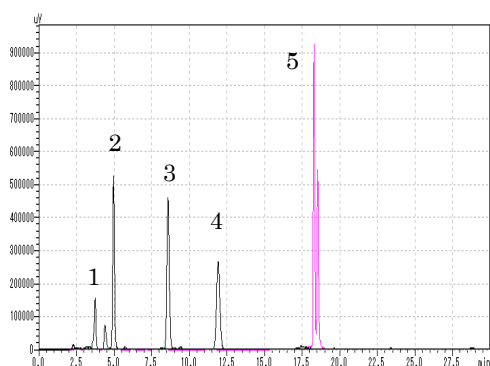


図 3 高分子 RNA アルカリ分解産物脱リン酸化体と CPr-Gua の分離

1 : cytidine 2 : uridine 3 : guanosine
4 : adenosine 5 : CPr-Gua

高分子 RNA のアルカリ分解産物の大腸菌アルカリホスファターゼ（BAP）処理により得られた脱リン酸化体（ヌクレオシド体）は、同定不能な小さなピークが含まれるものの、標準品と同一の保持時間を示した（図 3）。また、培養動物細胞から抽出した total RNA については、図 3 におけるピーク 1 と 2 の間にみられる小さなピークは検出されなかった。

図 2 に示したモノヌクレオチドの分離に比べて、本分離条件におけるヌクレオシド体の分離は良好で、定量に適したピーク形状を得る分離条件が確立できた。なお、CPr-Gua のピークは二峰性となったが、この結果は、CPr-Gua がジアステレオマーとして存在し、構造的異性が分離に反映されたものと考えられる。

以上の結果から、大腸菌アルカリホスファターゼ（BAP）の作用は、高分子 RNA（酵母抽出物）のアルカリ分解により生じるモノヌクレオチドのリボース 2'-または 3'-位のリン酸基の脱リン酸に有効であることが確認できた。

さらに、大腸菌アルカリホスファターゼ（BAP）の作用条件で高分子 RNA の分解（モノヌクレオチド化）ができれば操作の簡便化が図れると考え、BAP 作用条件下に RNA 分解活性を有する Nuclease P1 と BAP の作用を高分子 RNA（酵母抽出物）について検討した。その結果、アルカリ分解と BAP 処理の組み合わせ以上の良好なヌクレオシド化を達成することができた。また、この作用は、培養動物細胞から抽出した total RNA についても同様に有効であった。

LC/MS/MS 分析において、CPr-Gua の合

成標品を用いて検量線を検討したところ、 $0.01 \sim 1 \text{ ng/mL}$ の範囲で $r = 0.9996$ の良好な検量線が得られた。この結果から、CPr-Gua-P の場合に比べ、約 100 倍の感度の向上が得られた。

この測定系により、アセトアルデヒド存在下に培養した HepG2 細胞における CPr-Gua の生成を検討した。その結果、 5.0×10^7 cells の細胞を 10 mM アセトアルデヒド存在下に 37 °C で 3 時間培養し、抽出した total RNA について、1 mg 当り 5.3 pg の CPr-Gua の生成が確認された。

以上から、本研究で確立した CPr-Gua-P および CPr-Gua の分析法は、アセトアルデヒドにより損傷を受けた RNA のグアニン塩基の検出に有用であり、また培養細胞数を多くするなどの条件検討を要するが、飲酒による細胞機能（細胞内 RNA 機能）への影響を解析する基盤となるものと考えられる。

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）

〔学会発表〕（計 2 件）

平井一行、藤澤豊、倉屋雄、森川敏子、村上博哉、酒向孫市、出屋敷喜宏
アセトアルデヒド処理による細胞内核酸アダクト形成
日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27 日
（発表日）熊本市

土谷崇裕、平井一行、藤澤豊、村上博哉、酒向孫市、出屋敷喜宏
アセトアルデヒド由来核酸アダクトの高感度検出
第 60 回日本薬学会東海支部大会、2014 年 7 月 5 日（発表日）鈴鹿市（予定確定）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出屋敷 喜宏 (DEYASHIKI YOSHIHIRO)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授
研究者番号：00202193