

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24655143

研究課題名(和文)シックハウス症候群に対する高感度プローブとしてのDNA付加体損傷の解析

研究課題名(英文)Analysis of DNA adducts damage as a sensitive probe for the sick building syndrome

## 研究代表者

近藤 敏弘 (Kondo, Toshihiro)

佐賀大学・総合分析実験センター・教務員

研究者番号：20186852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はシックハウス症候群の原因物質であるホルムアルデヒドが誘起する結果として発がんにおけるDNA付加体損傷の分析方法を検討した。標準物質であるデオキシリボヌクレオチド3リン酸(dNTPs)の高速液体クロマトグラフィーによる分離条件を検討した。ホルムアルデヒドによるdNTPとアミノ酸の試験管内反応実験を行いHPLCにてdNTP-アミノ酸付加体のシグナルを検索しシグナルピークを検出したが、質量分析では確認できなかった。高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LC/MS)で4種類の標準物質dNTPsの分離を確認した。

研究成果の概要(英文)：The present study examined the methods of analysis of DNA adducts damage in carcinogenesis as a result of formaldehyde is the causative agent of sick house syndrome is induced. It was investigated separation conditions by high-performance liquid chromatography of deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), which is a standard substance. Find the signal of dNTP- amino acid adduct by HPLC carried out in vitro reaction experiment of dNTP and amino acid with formaldehyde was detected signal peak, but was not confirmed by mass spectrometry. It was confirmed the separation of the four types of standard dNTPs in the high-performance liquid chromatography mass spectrometer (LC / MS).

研究分野：環境化学分析

キーワード：核酸関連化学 シックハウス症候群 質量分析

### 1. 研究開始当初の背景

シックハウス症候群は、建材などに含まれる化学物質によって様々な健康障害を生じるものであり、シックハウス症候群に關する化学物質で最も重要視されているのがホルムアルデヒドである。シックハウス症候群の原因物質であるホルムアルデヒドによる健康障害は広く周知されているが、一方で、その障害表出の分子メカニズムについては不明な点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

シックハウス症候群の原因物質であるホルムアルデヒドが誘起する最も深刻な結果として発がんにおける DNA 付加体損傷の關与を検証し、分子機構を明らかにするとともに、DNA 付加体損傷の発生をプローブとした、ホルムアルデヒド障害のバイオマーカーとしての可能性を探ることを目的としている。

### 3. 研究の方法

シックハウス症候群の原因物質であるホルムアルデヒドに暴露された個体並びに細胞のヌクレオチドプール中に生ずる DNA 付加体損傷の分析方法を検討した。

具体的には、文献

(Nucl. Acids. Res. (2010)38(12):3975-3983) に記載の方法に準じ、標準物質であるデオキシリボヌクレオチド 3 リン酸 (dNTPs) を用いて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるヌクレオチド分離条件の検討を行った。

Partisphere SAX-5 HPLC カラムを用いて、0.36M アンモニウムリン酸緩衝液 (pH 3.4 2.5% v/v のアセトニトリル) を移動相として分離を検討した。

しかし、今後、ピークの質量を確認するためには、脱塩が必要となるために、リン酸緩衝液を使用しないシステムを構築したほうがよいと考えた。そこで、リン酸緩衝液を使用しない方法を検討した。

dNTP 分離条件の検討として、アセトニトリル濃度 1.0% と 0.5% での検討を行った。

カラムの種類を他のカラム ShimpakXRODS に変更し検討した。

また、pH の影響を検討し、ぎ酸添加し pH3.44 で検討を行った。ピーク分離については、いずれも著しい改善は見られなかった。

次に、4 種類の dNTP を混合して分析した。さらに、低濃度における高感度分析がどこまで可能であるかを調べた。注入量と HPLC ピーク面積において検量線を作成した。

さらに、ホルムアルデヒドによる dNTP とアミノ酸の試験管内反応実験を行い、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、ホルムアルデヒドと反応後の dNTPs-アミノ酸付加

体生成の有無によるピークの溶出時間の変動やピーク面積の変化を検討した。

dNTP 標準液とホルムルデヒドとアミノ酸 (今回は側鎖のあるリジン) を 37、48 時間の条件でインキュベートし、HPLC でのピークを観察した。

具体的には 3mM GTP と 3mM ホルマリンと 3mM リジンを 37、48 時間の条件で反応させて HPLC でのピークを観察した。

コントロールとして、37、48 時間の条件下での 3mM GTP のみ、3mM GTP と 3mM ホルマリンを使用した。また、反応なしの 3mM GTP と 3mM ホルマリンと 3mM リジン、反応なしの 3mM GTP と 3mM ホルマリン、反応なしの 3mM GTP を HPLC で分析した。

次に標準 dNTPs を用いて高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS) によるヌクレオチド分離条件の検討を行い、4 種類の標準 dNTPs の分離を確認した。高速液体クロマトグラフィー質量分析計は島津 LCMS-8030 を使用し、Mastro C18 カラムにて、紫外可視検出器と質量分析検出器を直列に接続し定性分析を行った。紫外外部検出波長は 260nm、質量分析計はエレクトロスプレー検出器を使用した。また、移動相は、0.1% ギ酸水 / 0.1% ギ酸アセトニトリル (50 : 50) を流速 0.2ml/min とした。

### 4. 研究成果

3. 研究方法の文献に記載の方法に準じ、標準 dNTPs を用いて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるヌクレオチド分離条件の検討を行った。4 種類のピークが分離されることを確認した。

標準物質 dATP, dTTP, dGTP, dCTP を各 1 mg/ml の濃度に調製し、HPLC への注入量を 10  $\mu$  L (10  $\mu$  g) とし、個別に保持時間を調べた。

保持時間の短いものから、dCTP 溶液の保持時間は 8.08 分、dTTP 溶液は 10.08 分、dATP 溶液は 13.60 分、dGTP 溶液は 22.60 分であった。

次に、4 種類の dNTP を混合して分析した。さらに、低濃度における高感度分析がどこまで可能であるかを調べた。注入量と HPLC ピーク面積において検量線を作成した。

絶対量として 0.05  $\mu$ g、0.1  $\mu$ g、1.0  $\mu$ g での測定ができた。0.05  $\mu$ g まで測定可能であることを確認した。

さらに、ホルムアルデヒドによる dNTP とアミノ酸の試験管内反応実験を行った。dNTPs-アミノ酸付加体のシグナルを検索し高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるシグナルピークを検出した。

3mMdGTP と 3mM ホルマリンと 3mM リジンを 37、48 時間の条件で反応後の HPLC のクロマトでは、最も大きいピークである保持時間 19 分付近の dGTP の他に、保持時間 11 分付近に新しいピークが出てきた。これを dNTPs-アミノ酸付加体のシグナルと推測した。そこで高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS) による質量分析を行った。

LC/MS での分析には不揮発性の塩類を含む移動相が使用できないため、高耐圧ステンレスフリー LC カラム Mastro C18 を使用した。

37、48 時間の条件で反応させて 3mM GTP と 3mM ホルマリンと 3mM リジンの場合と 3mM GTP と 3mM ホルマリンの場合と、3mM GTP だけの場合の HPLC でのピーク形状は、明らかに異なっていた。

反応後の分子量が 680 付近と推測し、ピークを検索したが、それに相当するピークを確認できなかった。結果的には、高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS) による質量分析では dNTPs-アミノ酸付加体のシグナルを確認できなかった。

LC/MS による dNTP の個別分析として、dGTP 分析を行った。dGTP 標準物質を調製し、カラム無しで最適化 (Q1 スキャン、プロダクトイオンスキャン) を行った。MastroC18 カラム取り付け後に検量線作成 (MRM モードで定量) を行った。

その結果、10 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 1600 µg/ml の検量点での検量線作成を行った。1 µg/ml と、0.01 µg/ml の検量点は除外した。

標準 dNTPs を用いて高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS) によるヌクレオチド分離条件の検討を行い、4 種類の標準 dNTPs の分離を確認した。

Mastro C18 カラムにて、紫外可視検出器と質量分析検出器を直列に接続し定性分析を行った。紫外可視検出器における保持時間は短いものから、dCTP 溶液の保持時間は 1.15 分、dTTP 溶液は 1.47 分、dGTP 溶液は 1.66 分、dATP 溶液は 1.89 分であった。

質量分析検出器の MS クロマトグラムにて、m/z468 (dCTP), m/z500 (dTTP), m/z508 (dGTP), m/z492 (dATP) を確認した。

このように、質量分析計 (LC/MS) による生体試料中の dNTP 測定が可能であることを確認した。ホルムアルデヒドと生体物質との反応した後の障害を表すバイオマーカー検索の手段として活用できることが示唆された。

## 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)

なし

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 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 0 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

近藤 敏弘 (Kondo Toshihiro)  
佐賀大学・総合分析実験センター・教務員  
研究者番号: 20186852

### (2) 研究分担者

寺東宏明 (Terato Hiroaki)  
佐賀大学・総合分析実験センター・准教授  
研究者番号: 00243543

### (2) 研究分担者

徳山由佳 (Tokuyama Yuka)  
佐賀大学・総合分析実験センター・教務員  
研究者番号: 30398135

### (2) 研究分担者

市場正良 (Ichiba Masayoshi)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号: 60184628

(3)連携研究者  
なし