

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

Identification of new DNA damages by DNA adductome analysis

松田 知成 (MATSUDA TOMONARI)
京都大学・工学研究科・准教授



研究の概要

DNA 付加体を網羅的に解析する手法「DNA アダクトーム解析」を用いてヒト臓器中に存在する未知の DNA 付加体を同定し、その生物学的意義（突然変異誘発、DNA 修復機構）を明らかにする。

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がヒト組織中におけるDNA付加体の全容は明らかになっていない。我々は生体内のDNA付加体を網羅的に解析する手法「DNAアダクトーム解析」を開発してきた。

2. 研究の目的

生体内で普遍的に検出されるDNA付加体について、その化学構造を明らかにし、その突然変異誘発能及びDNA修復メカニズムについても明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト組織DNAのアダクトーム解析を行い、主要なピークの同定を様々な角度から試みる。また、重要なDNA付加体について、突然変異誘発能、DNA修復経路を解明する。

4. これまでの成果

(1) ヒト臓器DNAアダクトーム解析

共同研究者の協力を得て、ヒト臓器DNAを収集した。研究実施には所属大学の倫理委員会の許可を得た。

主要な臓器DNAについて数検体ずつDNAアダクトーム解析を行った。その結果、臓器間で生成する付加体のパターンが大きく異なることが明らかになりつつある。また、主要な付加体ピークについて、付加体の同定を進めている。その結果脂質過酸化反応によって生成する4-oxo-2-nonenalや4-oxo-2-hexenal由来のDNA付加体が普遍的に存在することが明らかになった。特に4-oxo-2-hexenal由来のDNA付加体は産業医大の葛西教授らが発見した新規のDNA付加体であり、今回の共同研究により、ヒト臓器中での存在が初めて明らかになった。また、これら付加体を含めた、過酸化脂質由来DNA損傷20成分の同時分析法を開発し、約100検体のヒト臓器DNAで精密な定量を行い、ヒト臓器におけるDNA損傷の実態の一端を解明した。

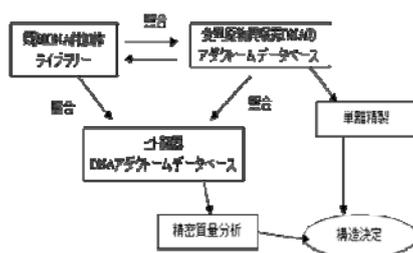


図-1 未知DNA付加体構造決定の概略

[4. これまでの成果 (続き)]

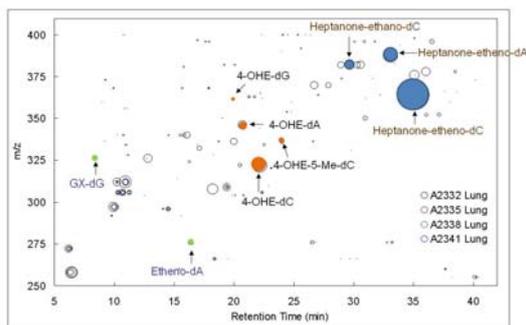


図-2 ヒト肺 DNA のアダクトームマップ
主要な 9 種類の付加体ピークについて同定することができた。

(2) DNA付加体の生物学的意義の解明
環境発がん性物質3-ニトロベンゾアントロン (NBA) によるDNA付加体の生物学的意義を解析した。まず、付加体の生成をラットやヒト肝がん由来細胞HepG2株を用いて解析したところ、dG-(C8-N)-ABA、dG-(N2-C2)-ABA、dA-(N6-C2)-ABAの3種類のDNA付加体を検出した。生成量は前2者が多かった。次いで、細胞をNB A曝露後しばらく培養し、細胞にDNA修復させた後、DNAを回収しLC/MS/MSで分析した。その結果dG-(N2-C2)-ABAは多く検出されたが他の付加体は減少していた。このことからdG-(N2-C2)-ABAの修復は遅いと考えられる。最後に、NBA付加体のTLSを調べるため、これら3種類の付加体を部位特異的に持つプラスミドを作製した。プラスミドをそれぞれ大腸菌に複製させたところ、dG-(N2-C2)-ABAは他の2種類の付加体に比べ、DNA合成を強く阻害し、またTLSにより複製された娘プラスミドも変異が多かった。以上のことからNBAにより生じる付加体のうち、dG-(N2-C2)-ABAが最も変異に対する寄与が高いと示唆された。

5. 今後の計画

引き続き未知DNA付加体の構造解析を行うと共に、DNA付加体に特異的に結合するタンパク質をプロテオーム技術を用いて解析する予定である。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、
連携研究者は一重下線)

1. Okamoto, Y., Chou, P., Kim, S., Suzuki, N., Laxmi, Y., Okamoto, K., Liu, X., **Matsuda, T.** and Shibutani, S. (2008) Oxidative DNA damage in XPC-knockout and its wild mice treated with equine estrogen. *Chem Res Toxicol* 21, 1120-1124.
2. 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.
3. Kanaly, R., Matsui, S., Hanaoka, T. and **Matsuda, T.** (2007) Application of the adductome approach to assess intertissue DNA damage variations in human lung and esophagus. *Mutat Res* 625, 83-93.
4. **Matsuda, T.**, Matsumoto, A., Uchida, M., Kanaly, R., Misaki, K., Shibutani, S., Kawamoto, T., Kitagawa, K., Nakayama, K., Tomokuni, K. and Ichiba, M. (2007) Increased formation of hepatic N2-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase 2-knockout mice treated with ethanol. *Carcinogenesis* 28, 2363-2366.
5. Kawanishi, M., Matsukawa, K., Kuraoka, I., Takamura-Enya, T., Totsuka, Y., Matsumoto, Y., Watanabe, M., Zou, Y., Tanaka, K., Sugimura, T., Wakabayashi, K. and Yagi, T. (2007) Molecular evidence of the involvement of the nucleotide excision repair (NER) system in the repair of the mono(ADP-ribosyl)ated DNA adduct produced by pierisin-1, an apoptosis-inducing protein from the cabbage butterfly. *Chem Res Toxicol* 20, 694-700.
6. **Matsuda, T.**, Yabushita, H., Kanaly, R., Shibutani, S. and Yokoyama, A. (2006) Increased DNA damage in ALDH2-deficient alcoholics. *Chem Res Toxicol* 19, 1374-1378.