

—総説—

アセトアルデヒドを由来とする DNA 損傷の分析法に関する研究

稲垣真輔*、江坂幸宏、後藤正志

要約: アセトアルデヒドは生体内で DNA 中のグアニンと反応して N^2 -エチルグアニン (N^2 -Et-Gua) およびサイクリック 1, N^2 -プロパノグアニン付加体 (CPr-Gua) を生成する可能性が示されている。現在、このような損傷塩基の分析を行う際には主に ^{32}P -ポストラベル法が用いられるが、この手法は放射線を用いるため必ずしも安全とはいえず、また、煩雑な分析法であるといった欠点も否めない。本研究ではキャピラリー電気泳動法 (CE) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた DNA 中に含まれるこれらの損傷塩基の安全かつ正確な分析法の開発を行った。その結果、CE を用いた手法では、泳動液の pH や修飾剤濃度を変化させることによりヌクレオチドの泳動挙動を制御することが可能な分離系の構築に成功した。また、CE 用の電気化学検出用のセルを開発し、正常および損傷を受けたグアニンの選択的な検出が可能であることを示した。液体クロマトグラフィー-質量分析法 (LC-MS) を用いた手法では非常に高感度な検出が達成され、実際の DNA 試料の分析にも適用可能と考えられた。さらに、アセトアルデヒドを作用させたヒト培養細胞や仔ウシ胸腺 DNA の分析を行い、DNA 損傷の形態について考察した。これらの手法は ^{32}P -ポストラベル法に代わる、あるいは相補的な分析法として用いられることが期待される。

索引用語: DNA、アセトアルデヒド、 N^2 -エチルグアニン、サイクリック 1, N^2 -プロパノグアニン付加体、キャピラリー電気泳動、液体クロマトグラフィー-質量分析法

Development of Detection Methods for DNA Adducts of Acetaldehyde by Capillary Electrophoresis and Liquid Chromatography

Shinsuke INAGAKI*, Yukihiro ESAKA, Masashi GOTO

Abstract: Acetaldehyde is considered to react with exocyclic amino groups of guanine in DNA to form N^2 -ethylguanine (N^2 -Et-Gua) and cyclic 1, N^2 -propanoguanine adduct (CPr-Gua). Until now, the ^{32}P -postlabeling assay is one of the most useful methods for the detection of DNA adducts, however, it is not a safe one because it requires radioactive compounds. In this study, more safe and precise methods for the detection of DNA adducts using capillary electrophoresis (CE) and high-performance liquid chromatography (HPLC) were developed. Using CE, we have succeeded to develop a separation system which enabled us to control the migration time of nucleotides by changing the pH of the running buffer solution and the concentrations of buffer additives. Also, we developed an electrochemical detection cell for CE, which carried out the selective detection of normal and damaged guanines. Using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), a highly-sensitive detection of DNA adducts was achieved, and it could be used for the analysis of real DNA samples. We discussed about damage in DNA through LC-MS analysis of DNA of cultured human cells and calf thymus DNA which were exposed to acetaldehyde. The developed detection methods are expected to replace the ^{32}P -postlabeling assay or to be complementary to the assay.

Keyphrases: DNA, acetaldehyde, N^2 -ethylguanine, cyclic 1, N^2 -propanoguanine adduct, capillary electrophoresis, liquid chromatography-mass spectrometry

1. 緒言

岐阜薬科大学薬品分析化学教室 (〒502-8585 岐阜市三田洞東 5-6-1)

Laboratory of Pharmaceutical Analytical Chemistry, Gifu Pharmaceutical University
(5-6-1, Mitahora-higashi, Gifu 502-8585, JAPAN)

アセトアルデヒドは環境中に遍在する化学物質であり、またエタノールの代謝生成物であるが、近年の研究により DNA 中のグアニンの環外アミノ基と反応しさらに還元を受けて N^2 -エチルグアニン (N^2 -Et-Gua) を生成することが示唆されている¹⁴⁾。そして、実際にアルコール依存症患者の DNA 中において N^2 -Et-Gua が特異的に多く存在することが報告され⁴⁾、過度の飲酒と疾患、特に発癌との関連からも非常に注目されている。また最近では、 N^2 -Et-Gua の他にアセトアルデヒドが 2 分子付加することによりサイクリック 1, N^2 -プロパノグアニン付加体 (CPr-Gua) も生体内で生成される可能性が示されている⁵⁾。Fig. 1 にそれらの構造式を示す。

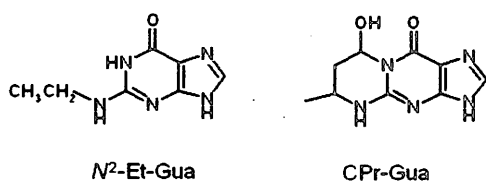


Fig. 1 Chemical structures of N^2 -ethylguanine and cyclic 1, N^2 -propanoguanine.

現在、このような損傷塩基の分析を行う際には、主に³²P-ポストラベル法と呼ばれる手法が用いられることが多い⁶⁻⁸⁾。この手法は非常に高感度な分析法であるものの、放射線が必要とするため必ずしも安全な分析法とはいえない。また、同定能力にも欠けるため、損傷塩基の構造が未知の場合もしくはその標準品が得られない場合、その分析法として適しているとはいえない。さらには、DNA 試料の前処理の過程において数種類の酵素反応を用いるため、その反応率の問題も存在し、やや煩雑な分析法であるといった欠点は否めない。

このような背景をもとに、我々は汎用的な分離分析法であるキャピラリー電気泳動法 (CE) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた DNA 中に含まれるこれらの損傷塩基の安全かつ簡便で、より同定能力の高い分析法の確立を目指した。さらには、これらの方法を用いて、損傷塩基の生成機構を解明することを目的とした検討を行った。本総説では、これらについて詳しく述べる⁹⁻¹⁴⁾。

2. キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) による DNA 中に含まれる N^2 -Et-Gua の分析法の開発

DNA の構成単位であるヌクレオチドは塩基、糖およびリン酸からつくられており、その分離および定量法は以前から報告されている。しかしながら、イオン交換カラムを用いた HPLC を用いた場合、1 回の分析に 1 時間近くも要することがある^{15,16)}。一方、ヌクレオチドは通常、リン酸基が負に荷電することから、電気泳動により分離すること

が可能である¹⁷⁾。CE には HPLC と比較して迅速な分離が可能で、必要とする泳動液および試料は極めて少量ですむといった利点がある。ここでは CE の分離様式の一つであるキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) を用いた DNA 中に含まれる N^2 -Et-Gua の簡便な分析法の開発を検討した。

CZE によるヌクレオチドの分離

本節では DNA 試料を酵素反応により加水分解し、5'末端にリン酸基を有するヌクレオチド、すなわち N^2 -エチル-2'-デオキシグアノシン 5'-リン酸 (N^2 -Et-dGMP) として N^2 -Et-Gua を検出することを想定した。これを検出するためには、正常な塩基を有する 4 種類のヌクレオチド (dAMP・dGMP・dCMP・dTMP) および N^2 -Et-dGMP といった計 5 種類の試料の完全な分離が求められる。

Fig. 2 に泳動液にリン酸緩衝液およびホウ酸緩衝液を用いた際のエレクトロフロログラムを示す。その結果、後者において比較的良好な分離が得られていることがわかる。したがって、ヌクレオチドの分離にはこの付近の pH が適しているものと考えられた。

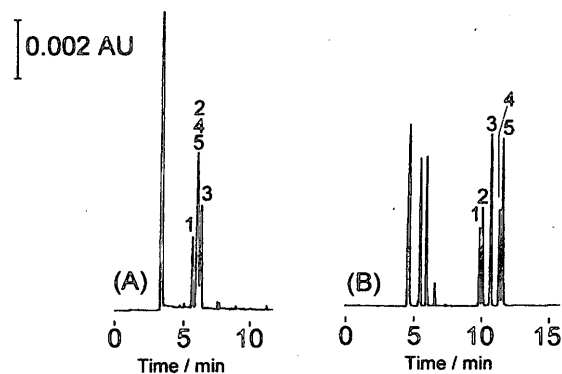


Fig. 2 CZE separations of deoxyribonucleoside monophosphates.

Conditions: running solution, (A) 10 mM phosphate buffer (pH 7.8), (B) 100 mM borate buffer (pH 9.25); capillary, 50 cm×0.050 mm i.d., 30 cm effective length; applied voltage, 10.0 kV; current, (A) 7 μ A, (B) 19 μ A; detection wave length, 210 nm. Peaks: 1, N^2 -Et-dGMP; 2, dAMP; 3, dCMP; 4, dTMP; 5, dGMP.

このとき、泳動液の pH に対し、ヌクレオチドの電気泳動移動度 (m_{ep}) をプロットしたものを Fig. 3 に示す。pH 9.25 以上の領域で、dAMP および dCMP が pH の影響を受けずにほぼ一定の値をとったのに対し、dGMP および dTMP では急激な移動度の増加が見られ、分離挙動に大きな変化が見られた。これは dGMP および dTMP が核酸塩基の構造中にカルボニル基が隣接する NH 基を有し、それぞれ 9.7 および 10.0 という pK_a の値を持つため、泳動液の pH 変化により解離が進み、実効電荷が増加したためと考えられる。

なお、このことを裏付けるように、同じように NH 基を有する N^2 -Et-dGMP もこれらと同様の挙動をとっている。

このプロットにも示されるように、泳動液の pH を変化させることでヌクレオチドの電荷を選択的に変化させ、分離のコントロールを行うことが可能であった。分離時間が短いことも考慮すると、pH 9.25 から 9.5 付近が最適な分離条件の一つであることがわかる。

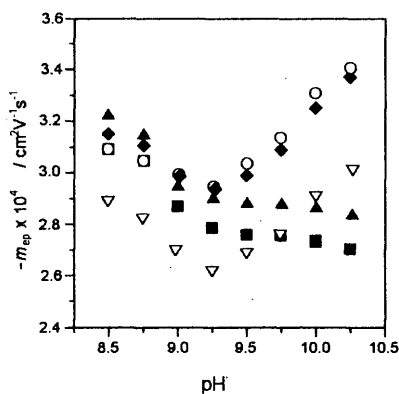


Fig. 3 pH Dependence on the electrophoretic mobility (m_{ep}) of the deoxyribonucleoside monophosphates. Conditions: Running solution, 100 mM borate buffer (pH 8.5-10.25). Symbols: (■) dAMP, (○) dGMP, (▲) dCMP, (◆) dTMP, (▽) N^2 -Et-dGMP.

ポリエチレングリコールの添加による泳動挙動の変化

生体中において N^2 -Et-dGMP は正常な dGMP と比較して極微量しか存在しないため、これを検出するためにはより完全な分離が必要となると予想される。そこで、分離様式として水素結合性の相互作用や疎水性相互作用を付加することが可能なポリエチレングリコール (PEG) を修飾剤として用いることを検討した^{18,19)}。

Fig. 4 に示したのは、pH 9.5 における $m_{ep}/m_{ep,0}$ の値を PEG 濃度に対してプロットしたものである ($m_{ep,0}$: PEG と相互

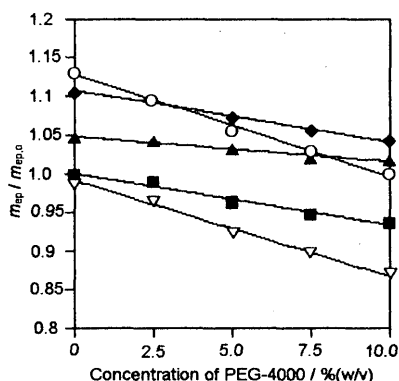


Fig. 4 Dependence of the relative electrophoretic mobility ($m_{ep}/m_{ep,0}$) of the deoxyribonucleoside monophosphates on the concentration of PEG-4000 in the running solution (pH 9.5). Reference: ortho-phthalaldehyde acid. Symbols as in Fig. 3.

作用をほとんど生じない基準物質の電気泳動移動度)。ヌクレオチドがそれぞれ異なる強さで PEG と相互作用するため、緩衝液の pH を変化させたときは異なった分離の

挙動を得ることが可能であった。PEG 濃度の上昇につれ検出順にも変化が生じ、また N^2 -Et-dGMP と dAMP との分離も改善されている。PEG 濃度をパラメーターに泳動挙動を調節し、pH 9.5 においては [PEG] = 6.5 % (w/v) で最適な分離を得ることができた。

Fig. 5 に泳動液に PEG を含むものおよび含まないもののエレクトロフェログラムを示す。PEG を添加することにより分離キャピラリーの有効長が短いにもかかわらず良好な分離が得られ、より短時間での分析も可能ながわかる。

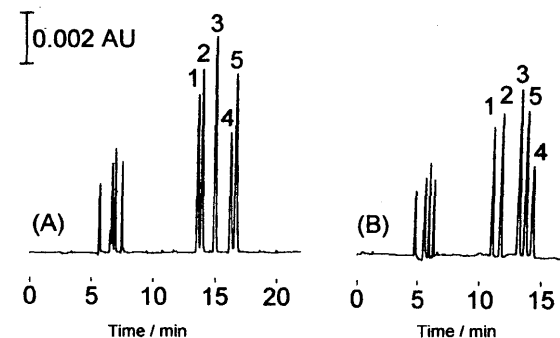


Fig. 5 CZE separations of the five deoxyribonucleoside monophosphates (A) in the absence and (B) in the presence of 6.5 % (w/v) PEG-4000 as buffer additive. Conditions: running solution, (A) 100 mM borate buffer (pH 9.5), (B) 100 mM borate buffer containing 6.5 % (w/v) PEG-4000 (pH 9.5); capillary, 50 cm x 0.050 mm i.d. (effective length for (A) 30 cm, for (B) 20 cm); applied voltage, 10.0 kV; current, (A) 22 μ A, (B) 16 μ A. Other conditions as in Fig. 2.

この際、PEG 添加による効果を考えるため、pH 8.5 および 9.0・9.5・10.0 における各ヌクレオチドと PEG との複合体形成定数 (K) を見積もり、Table 1 に示した。pH 8.5 における K の値は N^2 -Et-dGMP > dGMP \approx dAMP (プリン塩基) > dCMP \approx dTMP (ピリミジン塩基) と、塩基の疎水性の順となっており、PEG が主に疎水性相互作用によるセクターとして働いていることが示唆された。

Table 1 Estimated values of complex formation constants^{a)}.

Analytes	$K \times 10^3 / (\% \text{ w/v})^{-1b}$			
	pH of running solutions			
	8.5	9.0	9.5	10.0
dGMP	8.4	10.9	11.6	14.1
dAMP	8.4	7.9	6.7	10.3
dTMP	4.2	4.9	6.0	10.0
dCMP	4.7	4.7	3.0	6.4
N^2 -Et-dGMP	13.8	12.6	12.6	16.8

a) These values were estimated using ortho-phthalaldehyde acid as a reference.
b) (% w/v) is a unit of the concentration of PEG used in estimation of the K values.

一方、dGMP および dTMP に解離が生じると考えられる高い pH 領域 (pH 9.5 もしくは pH 10.0) においては、 K の値は dGMP > dAMP および dTMP > dCMP という傾向を示した。これは、PEG の添加により dGMP および dTMP

の解離が抑えられ、電気泳動移動度が抑えられた結果、見かけ上大きな値を持ったものと考えられる。したがって、PEG は疎水性相互作用のセクターとしての役割と試料の解離状態を変化させるという2種類の役割を演じ、これによりヌクレオチドの分離をコントロールしているものと考察された。

β-シクロデキストリンの添加による泳動挙動の変化

泳動液の修飾剤として PEG の他に、β-シクロデキストリン (β-CD) を用いた検討も行った。この結果、各ヌクレオチドの泳動挙動に対し、PEG 添加時とは異なる効果が得られた。pH 9.5 の条件において、[β-CD] = 7.5 mM のときに最適な分離が得られた。Fig. 6 にそのエレクトロフェログラムを示す。

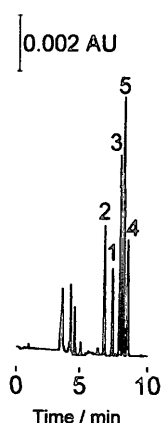


Fig. 6 CZE separation of the five deoxyribonucleoside monophosphates in the presence of 7.5 mM β-CD as buffer additive.

Conditions: running solution, 100 mM borate buffer containing 7.5 mM β-CD (pH 9.5); applied voltage, 10.0 kV; current, 17 μA. Other conditions as in Fig. 2.

泳動液の pH を変化させ、PEG を用いた場合と同様に複合体形成定数を算出し、評価を行った (Table 2)。その結果、 K の値は泳動液の pH の影響を受けることなく、常に $dAMP > dGMP > N^2\text{-Et-dGMP} \approx dCMP > dTMP$ という傾向を示した²⁰⁾。したがって、ヌクレオチドと β-CD との相互作用は核酸塩基の解離状態の影響をほとんど受けない

Table 2 Estimated values of complex formation constants.

Analytes	$K \times 10^3 / (M)^{-1}$			
	pH of running solutions			
	8.5	9.0	9.5	10.0
dGMP	27.4	22.4	27.8	30.5
dAMP	52.4	45.1	54.3	64.2
dTMP	10.7	8.9	13.7	20.4
dCMP	14.9	16.4	17.8	23.8
$N^2\text{-Et-dGMP}$	14.6	13.1	20.3	27.0

ことが考えられた。塩基の解離は溶媒和分子を増加させ、その親水性を増すことにより β-CD への取り込みを抑制すると予想したが、結果はこれと異なるものであった。

スタッキングによるオンライン濃縮

CE を実試料の分析に用いる際に常に問題となるのは、キャピラリー内径に相当する著しく短い検出光路長に由来する濃度感度の低さである。紫外吸収検出法による検出限界は一般に $10^{-4} \sim 10^{-6}$ M 程度といわれており、この濃度感度では実際の生体試料中に含まれる DNA から $N^2\text{-Et-dGMP}$ を検出することは難しいと考えられる。

そこで、この問題を解決するため、近年 CE の分野で発達してきたスタッキングによるオンライン試料濃縮法を検討した^{21,22)}。ここでは分離キャピラリー全体を用いた whole capillary stacking による試料濃縮を行った。蒸留水に溶解した試料をキャピラリーすべてに注入し、通常分離を行う方向と逆の極性の電圧を印加して試料濃縮を行い、電流値が回復したところで極性を交換し、電気泳動による分離を行った。Fig. 7 に落差法による通常の試料注入およびスタッキングによる試料濃縮を行った際のエレクトロフェログラムを示す。

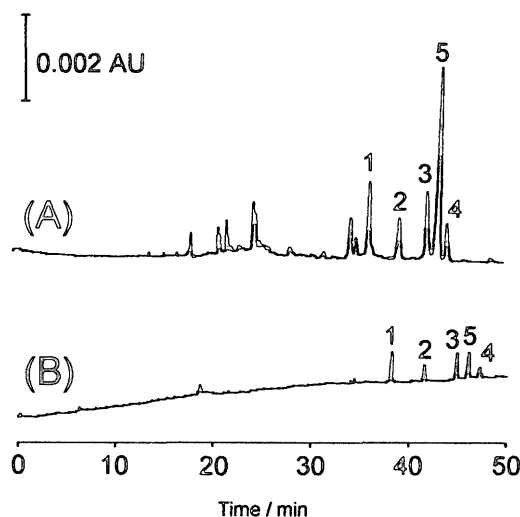


Fig. 7 PEG-assisted CZE separation of the five deoxyribonucleoside monophosphates with on-line preconcentration (A) by stacking and (B) without preconcentration.

Conditions: sample solution, (A) 1.0 μM of each analyte (see text for the stacking method), (B) 80 μM (siphoning, at a height of 17 cm for 20 s); running solution, 100 mM borate buffer containing 6.5 % (w/v) PEG-4000 (pH 9.5); capillary, 100 cm × 0.050 mm, i.d., 80 cm effective length; applied voltage 20.0 kV; current 17 μA. Other conditions as in Fig. 2.

落差法を用いた場合、 $N^2\text{-Et-dGMP}$ の検出限界は 1.5×10^{-6} M ($S/N=3$) であったが、スタッキングによる試料濃縮を用いることにより検出限界を約 4.0×10^{-8} M まで、すなわち約 40 倍改善することが可能であった。

この結果から紫外吸収検出法においても、一般的な数 mM の濃度でヌクレオチドが存在する DNA 試料を用いると仮定し、割合として 10^5 個程度の正常な dGMP に対して 1 個の $N^2\text{-Et-dGMP}$ が存在すれば検出可能と試算される。

先に述べた Fang らの報告によれば、アルコール依存症患者の白血球および顆粒球の DNA における N^2 -Et-dGMP の存在割合は 10^7 個の正常なヌクレオチドに対して数個程度といわれており、検出システムの濃度感度をさらに 2 桁上昇させることができれば実試料の分析が可能となる。これは光路長を長くするためにキャピラリーを Z 型に曲げたセルを併用すること、あるいは紫外吸収検出法よりも高感度な検出方法であるレーザー励起蛍光検出 (LIF) の導入などにより達成可能と考える。

3. キャピラリー電気泳動用電気化学検出セルの開発と DNA 中に含まれる N^2 -Et-Gua 分析法の開発

前でも少し述べたように、紫外吸収などの光学検出法は HPLC および CE の検出法として広く用いられているが、内径の細いキャピラリーを用いる CE ではセル体積が小さく光路長がどうしても短くなるため、Lambert-Beer の法則が示すように濃度感度の面では非常に不利である。この問題を解決するため、これまでに LIF が開発され、CE においても非常に高感度な分析が可能となっている。しかしながら、LIF は複雑な装備が必要であり、また、その装置は極めて高価である。一方、電気化学検出 (ECD) ではその検出原理上、セル体積が小さい条件下でも濃度感度が犠牲となりにくいといった長所があり、CE の検出法として非常に適した手法と考えられる。また、HPLC 用の検出器を転用すれば比較的安価に入手することが可能である。1987 年の Wallingford らによる報告以来²³⁾、その装置および応用に関する研究が数多く行われている²⁴⁾。そして、電気化学検出は CE においても HPLC と同様に高感度および高選択的な分析が可能なが実証されている。そこで、筆者らは、まず CE 用の電気化学検出セルの開発に着手し、それを DNA 損傷の分析へと応用することを試みた。

キャピラリー電気泳動用電気化学検出セルの開発

Fig. 8 に筆者らが開発したエンドキャピラリー検出型の電気化学検出セルの概略図を示す。検出セル本体の材質はダイフロンであり、中央の穴に白金線を 2 本挿入し固定した。1 つは電気泳動用の電極であり、もう 1 つは電気化学検出用の対極の役割を果たしている。参照電極には銀/塩化銀電極を上部の穴から差し込んで使用した。キャピラリーと電極間の距離はスクリューを回転させることにより調整することが可能である。従来、作用電極の設定は、x,y,z マイクロポジショナー上に電極を固定して顕微鏡などを通して観察しながら電極先端をキャピラリー出口に近づけるように移動させて行いが、この操作はかなりの熟練を要する。それに対して、今回開発したセルでは、スクリューによる調節を行うのみで作用電極の設定が可能であり、非常に簡

便な操作ですむといった利点が存在する。

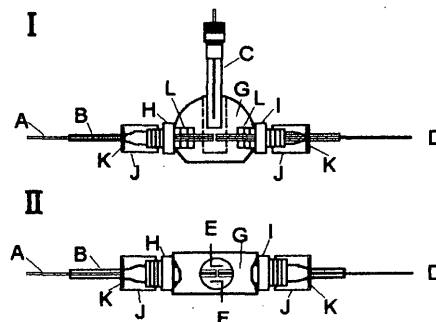


Fig. 8 Handy electrochemical detection cell for capillary electrophoresis. I, side view; II, top view.

A, separation capillary; B, glass tube; C, Ag/AgCl reference electrode; D, micro-disk working electrode; E, auxiliary platinum electrode; F, electrophoresis platinum electrode; G, detection cell body; H, separation capillary holder; I, working electrode holder; J, rubber ferrule; K, nut; L, screw.

CE-ECD による DNA 損傷の分析

この検出セルを用い、 N^2 -エチル-2'-デオキシグアノシン (N^2 -Et-dG) や DNA が酸化傷害を受けた際の代表的な生成物である 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OH-dG) の分析を試みた。なお、核酸塩基の中で電気化学的に活性な物質は実質上グアニンのみであるため、電気化学検出を用いることにより、正常なグアニンおよび損傷を受けたグアニンの選択的な検出が可能となるといった利点もある。そのため、DNA 中および尿に含まれる 8-OH-dG を分析するには電気化学検出の HPLC を用いるのが現在主流となっている^{25,26)}。もし CE で同様の分析が可能になれば、必要とする試料量が極めて微量ですむことや試料の前処理がほとんど不要という CE 独特の長所が生きてくると考えられる。なお、前節では 5'末端にリン酸基を有するヌクレオチドの形で損傷塩基を検出することを想定したが、ここでは後で述べるように濃度感度の高い、ヌクレオシドの形で検出することを試みた。

まず、4 種類の正常なヌクレオシドと 2 種類の損傷を受けたヌクレオシドを CE で分離する必要があり、紫外吸収検出を用いてそれらの分離を確認した。泳動液に 20 mM のホウ酸緩衝液 (pH 9.5) を用いた場合、 N^2 -Et-dG と 2'-デオキシチミジン (dT) のピークは完全に重なっていた。また、2'-デオキシアデノシン (dA) および 2'-デオキシシチジン (dC) は電荷を持たないため、CZE による相互分離は不可能であった。そこで、電荷を持たない試料も分離可能なミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) による分離を試みた。その結果、Fig. 9 に示すように、損傷を受けたヌクレオシドを含む 6 種類の試料を良好に分離することができた。

続いてヌクレオシドの電気化学検出について検討を行った。作用電極にはカーボンファイバーのマイクロ電極を使

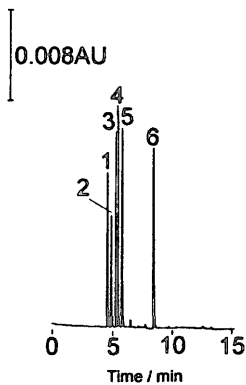


Fig. 9 MEKC separations of four normal deoxyribonucleosides, N^2 -Et-dG and 8-OH-dG.

Conditions: running solutions, 20 mM borate buffer (pH 9.5) containing 80 mM SDS; capillary, 50 cm \times 0.050 mm, i.d. (effective length, 30 cm); applied voltage, 10 kV; current, 15 μ A; detection wavelength: 210 nm. Peaks: 1, dC; 2, dT; 3, dA; 4, dG; 5, 8-OH-dG; 6, N^2 -Et-dG.

用することとした。キャピラリーと電極間の距離がエレクトロフェログラムに与える影響について、その距離を変化させて考察を行った。その距離は短すぎるとベースラインのノイズレベルが増加して検出感度が低下してしまい、逆にその距離が長すぎるとピークがブロードになり分離が低下してしまう。詳細な検討の結果、キャピラリーと作用電極との間の距離は 100 μ m が最適であった。Fig. 10 に示したのは、CE-ECD によりヌクレオシドの標準試料を分析した際に得られたエレクトロフェログラムである。キャピラリーの有効長 (50 cm) 以外は Fig. 9 と同じ分離条件と同じ 6 種類のヌクレオシドを含む試料を用いている。グアニンを有するヌクレオシド 3 種類が選択的に検出されている一方で、dA、dC および dT はこの電位で不活性なため検出さ

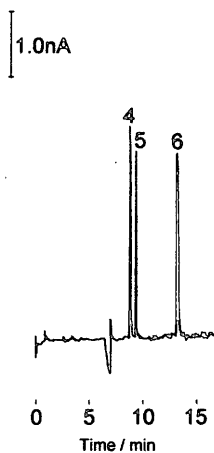


Fig. 10 Selective detection of dG, 8-OH-dG and N^2 -Et-dG using CE-ECD.

CE conditions were the same as in Fig. 9 except effective capillary length, 50 cm; detection potential, +1.0 V (vs. Ag/AgCl). Peaks: 1, dC; 2, dT; 3, dA; 4, dG; 5, 8OH-dG; 6, N^2 -Et-dG (the former three were not detected, see text).

れていないことがわかる。

CE-ECD による dG の検出限界は 1.0×10^{-6} M ($S/N=3$) であり、紫外吸収検出を用いた場合とほぼ同じであった。8-OH-dG については 5.9×10^{-7} M と紫外吸収検出を用いた場合よりも良好な値が得られている。なお、電気化学検出では dGMP の濃度感度は約 1.0×10^{-5} M と dG よりも 10 倍程度低く、ヌクレオチドの形よりもヌクレオシドの形で損傷塩基の分析を行った方がよいと判断された。

CE-ECD による DNA 加水分解試料の分析

実際にこの装置を用いた DNA 試料の分析を検討した。仔ウシ胸腺 DNA を加水分解酵素および脱リン酸化酵素で処理し、ヌクレオシドとして分析を行った。Fig. 10 にその際に得られたエレクトロフェログラムを示す。キャピラリーの有効長は紫外吸収検出を用いた (A) では 30 cm、電気化学検出を用いた (B) では 50 cm である。後者では、試料溶液中の共存物の影響を受けずに 4 種類の正常なヌクレオシドの中で dG のみが選択的に検出されていることがわかる。

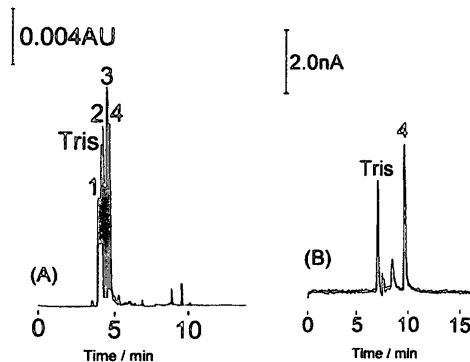


Fig. 11 Analysis of the hydrolysis of calf thymus DNA using CE with (A) UV detection and (B) amperometric detection.

Conditions: capillary, 50 cm \times 0.050 mm, i.d.; effective length, (A) 30 cm (B) 50 cm; detection; (A) 210 nm for UV absorbance detection and (B) +1.0 V for amperometric detection. Other conditions were the same as in Fig. 10.

この実験において、前濃縮などを行わない DNA の加水分解試料中に含まれる正常な dG の濃度は約 2.0×10^{-4} M と見積もられた。これは 10^3 個の正常な dG に対し、数個程度の割合で 8-OH-dG が存在すれば検出可能なことを意味している。実際の生体 DNA 中に 8-OH-dG が $10^4 \sim 10^6$ 個の正常な dG に対して数個程度の割合で存在する²⁶⁾ことを考慮すると、CE-ECD 装置の濃度感度の改善はもちろんのこと、効果的な前濃縮方法の開発が望まれる。前者では、今回開発したセルを CE 由来の電場から検出器を分離したオフカム式に改良できれば、電気ノイズの著しい減少による S/N 比の向上が得られ、濃度感度が改善されると思われる。後者では、スタッキング^{21,22)}やスウィーピング²⁷⁾などとい

ったオンラインでの試料濃縮法を使用することにより、さらなる高感度化が達成されることが期待される。

4. LC-MSによるアセトアルデヒドを由来とするDNA損傷の分析

前にも述べたが、³²P-ポストラベル法は非常に高感度な分析法であるものの同定能力に欠けるため、損傷塩基の構造が未知の場合やその標準品が得られない場合、その分析法として適しているとはいえない。したがって、高い同定能力を有する質量分析計 (MS) の活用は非常に有効と考えられ^{28,29)}、これを利用した分析が数多く報告されている。そこで、本節では高い同定能力を有し、なおかつ高感度な分析が可能であるLC-MSを用いた分析法の検討を行った。

LC-MSによるN²-Et-GuaおよびCPr-Guaの分析

ここではDNAを塩酸で処理することにより遊離させたプリン塩基の形で損傷体の分析を行った³⁰⁾。これはエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) による検出を行った場合、核酸塩基の形の方がヌクレオシドやヌクレオチドの形よりもイオン化効率が高いため、その結果として、数十倍から百倍程度濃度感度がよかったためである。HPLCによる分離にはODSカラム (Hypersil ODS) を用いた。移動相には10 mMの酢酸アンモニウム水溶液とメタノールの混合液 (85 : 15) を用い、アイソクラティックの条件下で分析を行った。

揮発性の塩である酢酸アンモニウムを移動相に添加したのは、ESI-MSにより検出を行う際にイオン化を補助し濃度感度が改善されることを期待してのことであるが、結果としてアデニンとグアニンの分離の改善にも貢献した。Fig. 12にアデニン、グアニン、N²-Et-GuaおよびCPr-Guaの標準試料の分離を行ったクロマトグラムを示す。これらの試料は8分以内に良好に分離された。

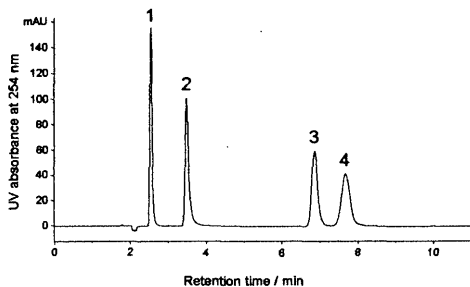


Fig. 12 Representative reversed-phase HPLC profile of the standard solution of adenine, guanine, N²-Et-Gua and CPr-Gua. Conditions: eluant, 10 mM ammonium acetate and 15 % methanol; column, Hypersil ODS (5 μm; 125 mm×4.0 mm); flow-rate, 0.50 mL/min; detection wave length, 254 nm; column temperature, 30 °C. Peaks: 1, guanine; 2, adenine; 3, N²-Et-Gua; 4, CPr-Gua.

続いてMSによる検出を行った。試料のイオン化にはエレクトロスプレー法 (ESI) を用い、正のイオン化モードで分析を行った。N²-Et-GuaのESI-MSスペクトルでは、[M+H]⁺に相当するm/z = 180.1において最も大きいピークが観測され、CPr-Guaにおいてもm/z = 222.1において最も大きいピークが観測された。そこで、m/zの値をm/z = 180.1および222.1に設定し、選択イオン検出 (SIM) による測定を行った。その結果、N²-Et-Guaの検出限界は3.0×10⁻¹⁰ M (絶対量で6.0×10⁻¹⁵ mol) であった (S/N = 3)。同様に、CPr-Guaの検出限界は1.0×10⁻⁹ M (絶対量で2.0×10⁻¹⁴ mol) であった。得られたマスクロマトグラムのピーク面積により検量線を作成したところ、5.0×10⁻⁹ Mから1.0×10⁻⁶ Mの領域において、非常に良好な直線性が得られている。

仔ウシ胸腺DNA中に含まれるN²-Et-GuaおよびCPr-Guaの分析

ここまでの結果は、検出感度としては³²P-ポストラベル法と比較して一桁以上劣るものの、実試料の分析も十分に可能であると考えられた。そこで、仔ウシ胸腺DNAをリン酸緩衝液 (pH 8.0) 中でアセトアルデヒドと反応させた試料の分析を行った。反応溶液を蒸留水に対して透析を行った後に塩酸処理し、LC-MSによって分析した。Fig. 13に示したのは仔ウシ胸腺DNAとアセトアルデヒドを37 °Cの条件下で48時間反応させた試料を分析したものである。その結果、CPr-Guaが28.4±6.4 adducts/10⁵ Gua (n = 3) の頻度で存在していたのに対し、N²-Et-Guaは検出されなかった。

一方、アセトアルデヒドのみではなく水素化シアノホウ素ナトリウム (NaBH₃CN) などの還元剤^{5,31)}が共存する条

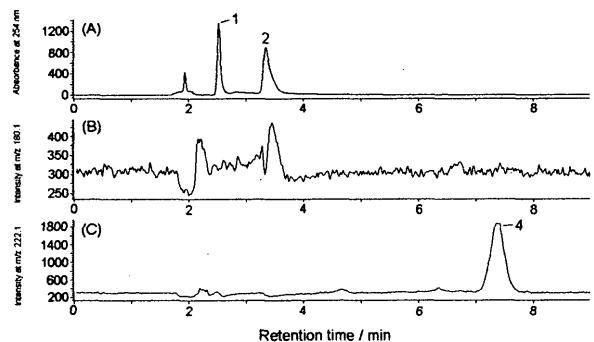


Fig. 13 Reversed-phase HPLC profile of the hydrolyzed calf thymus DNA exposed to 1.8 M acetaldehyde for 48 h. (A) UV detection, (B, C) MS detection. Conditions: selected ion monitoring, m/z 180.1 and m/z 222.1. Other conditions as in Fig. 12.

件下で反応させたDNA試料からはN²-Et-Guaがかなりの頻度で生成し、1381±172 adducts/10⁵ Gua (n = 3) という定量結果が得られた (Fig.14)。これらの結果はN²-Et-Guaが生成するためには適切な還元剤が必要であることを意味している。現時点では明らかにされていないが、生体内でどの

ような還元剤が N^2 -Et-Gua の生成に関与しているか、アセトアルデヒドによる損傷塩基の生成メカニズムを解明する上で重要な問題であり、今後の研究が待たれる。

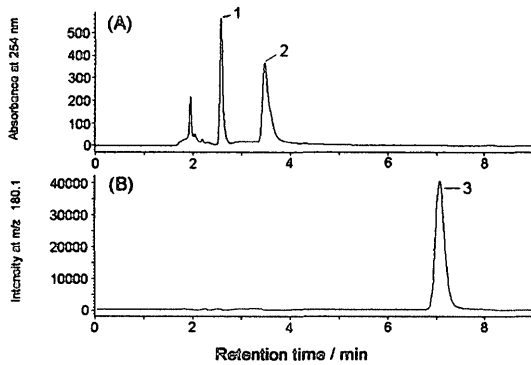


Fig. 14 Reversed-phase HPLC profile of the hydrolyzed calf thymus DNA exposed to 1.8 M acetaldehyde in the presence of 110 mM NaBH_3CN for 0.5 h. (A) UV detection, (B) MS detection. Conditions: selected ion monitoring, m/z 180.1. Other conditions as in Fig. 12.

ヒト白血球由来細胞 (HL-60 細胞) の培養と DNA の分析

より生体に近い状況での知見を得るため、生細胞中におけるアセトアルデヒドの作用形態を調べた。ヒト白血球由来細胞である HL-60 細胞をアセトアルデヒド存在下で培養し、その DNA を抽出して LC-MS による分析を行った。

ここでは、アセトアルデヒドを短期間暴露することにより受ける影響、いわゆる急性毒性について考察するため、比較的高濃度 (50 mM) に調製した培地中で 24 時間培養を行った。Fig. 15 にその細胞中に含まれる DNA の分析をした結果を示す。CPr-Gua が明確に検出された一方で (2.75 adducts/ 10^5 Gua)、 N^2 -Et-Gua が検出されていないことがわかる。この知見は、生体内においてもアセトアルデヒドによって CPr-Gua が生成することを強く示唆するものであり、今後 *in vivo* での詳細な検討が必要である。

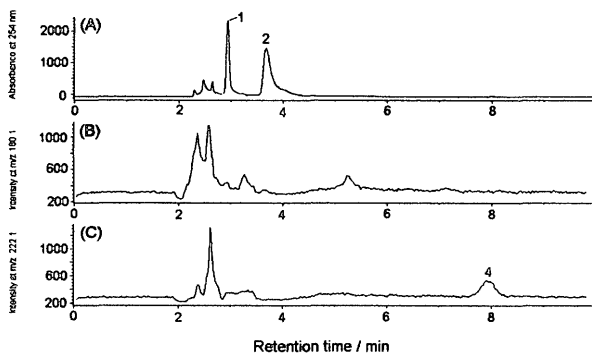


Fig. 15 Reversed-phase HPLC profile of the hydrolyzed sample of DNA isolated from HL-60 cells exposed to 50 mM acetaldehyde for 24 h. (A) UV detection, (B, C) MS detection. Conditions: selected ion monitoring, m/z 180.1 and m/z 222.1. Other conditions as in Fig. 12.

セミマイクロ LC-MS による高感度化

なお、その後の検討の結果、分離カラムに内径の細いセミマイクロカラム (内径 2.0 mm) を用いることにより、 N^2 -Et-Gua および CPr-Gua の高感度化と迅速な分析が達成されている。このようなカラムを用いたのは、従来よりも分離過程での試料の拡散を小さくすることにより、濃度感度をさらに向上させるためである。

その結果、 N^2 -Et-Gua および CPr-Gua の検出限界は、それぞれ 9.0×10^{-11} M (絶対量で 1.8×10^{-15} mol) および 2.5×10^{-10} M (絶対量で 5.0×10^{-15} mol) まで改善された ($S/N = 3$)。これは通常のカラムを用いた場合と比較して、それぞれ 3.3 倍および 4.0 倍改善されたことになる。

これらの結果は、実際の DNA 試料中に含まれるグアニンの濃度から逆算すると、少なくとも 10^7 個の正常なグアニンに対して数個の割合で N^2 -Et-Gua が DNA 中に存在すれば検出可能であることを意味している。このことは、本法により実際にアルコール依存症患者の DNA 中から N^2 -Et-Gua を検出することが十分に可能になったことを示している⁴⁾。

5. ヒストン添加による DNA 中における CPr-Gua 生成反応の解析への応用

CPr-Gua を生成するためにはグアニン 1 分子に対してアセトアルデヒド 2 分子を必要とする。そのため、その濃度が低い生理的な条件下ではその生成は不利になることが考えられる。しかし、一方で、塩基性アミノ酸であるアルギニンおよびリシンなど一部のアミノ酸を添加することにより、グアニンを含有するヌクレオシドおよびヌクレオチドからサイクリック $1,N^2$ -プロパノ付加体を生成する反応が顕著に促進されることが、酒向らによって明らかにされている^{32,33)}。そこで、ヌクレオシドやヌクレオチドのみではなく、二本鎖および一本鎖の DNA に対しても同様の促進効果が得られるかどうかを、LC-MS を用いた解析を通して調べることとした。また、反応の触媒としてモノマーのアミノ酸のみではなく、生体内で常に DNA と一緒に存在するタンパク質であるヒストンを添加することによる効果についても検討を行った。ヒストンは DNA のパッケージング (詰め込み) に関与している主要なタンパク質であるが、その一次構造はアルギニンやリシンなどの塩基性アミノ酸に富んでいる³⁴⁾。そこで、塩基性アミノ酸の出所をヒストンと仮定して以下の実験を行った。

まず、基質に dG を使い、サイクリック $1,N^2$ -プロパノ付加体生成におけるヒストンの添加効果について考察した。反応は生理的な条件下で反応を行った (pH 7.0~8.0 の 100 mM リン酸緩衝液中で反応温度 37 °C)。その際に得られたサイクリック $1,N^2$ -プロパノ-2'-デオキシグアノ

シン付加体 (CPr-dG) の生成量を Table 3 に示す。ヒストン添加により、CPr-dG の生成が顕著に促進されていることがわかる。なお、アセトアルデヒドおよびその二量体であるクロトンアルデヒド (2-ブテナール) の両者の場合において、CPr-dG の生成量は弱塩基性の条件下の方が多かったが、これは以前に報告された L-アルギニンなどのアミノ酸を用いた場合と同様の結果である。

Table 3 pH Dependence of the CPr-dG formation in the reaction of dG with acetaldehyde or crotonaldehyde in the presence of histones.

Aldehydes	pH	CPr-dG / %
Acetaldehyde (AA)	7.0	14.5
Acetaldehyde	7.5	19.6
Acetaldehyde	8.0	20.7
Crotonaldehyde (CA)	7.0	36.3
Crotonaldehyde	7.5	44.6
Crotonaldehyde	8.0	45.9

Reaction conditions: a mixture of dG (2.9 mg, 0.010 mmol) and histones (1.5 mg) in 100 mM phosphate buffer (pH 7.5, 7.5 or 8.0) (1.0 mL) containing an appropriate aldehyde [acetaldehyde (50 μ L) or crotonaldehyde (12.5 μ L)] was heated at 37 $^{\circ}$ C in a sealed tube for 4 days with stirring.

続いて、dG に代わり仔ウシ胸腺 DNA を用いて検討を行った。各反応条件下において得られた仔ウシ胸腺 DNA 中に含まれる正常なグアニンに対する CPr-Gua の含量を Table 4 に示す (CPr-Gua/Gua の値で評価)。また、Fig. 16 にヒストン添加試料の LC-MS による分析結果を示す。反応溶液 1.5 mL 中へ 9.0 mg のヒストンを添加することにより、アセトアルデヒドによる CPr-Gua の生成量は 8 倍増幅されていることがわかる。また、クロトンアルデヒドを用いた場合では 25 倍増幅されていた。

Table 4 Reactions of calf thymus DNA with acetaldehyde and crotonaldehyde in the presence of calf thymus histones or L-arginine.

Aldehydes	Pretreatment of DNA ^{c)}	Amino acids or protein	Relative Ratio of CPr-Gua/Gua
AA	-	None	2.72×10^{-4}
AA	-	Histones (9.0 mg)	2.27×10^{-3}
AA	+	Histones (9.0 mg)	1.95×10^{-2}
AA	+	Histones (2.0 mg)	5.70×10^{-3}
AA	+	L-Arg (2.0 mg)	2.82×10^{-2}
CA	-	None	5.83×10^{-4}
CA	-	Histones (9.0 mg)	1.46×10^{-2}
CA	+	Histones (9.0 mg)	1.04×10^{-1}
CA	+	Histones (2.0 mg)	2.61×10^{-2}
CA	+	L-Arg (2.0 mg)	1.37×10^{-1}
None	-	None	Not Detected
None	+	None	Not Detected

Reaction conditions: a mixture of calf thymus DNA (1.0 mg) and calf thymus histones (2.0 mg or 9.0 mg) or L-arginine in 100 mM phosphate buffer (pH 7.5, 1.5 mL) containing an appropriate aldehyde [acetaldehyde (50 μ L) or crotonaldehyde (12.5 μ L)] was heated at 37 $^{\circ}$ C in a sealed tube for 18 h with stirring.

c) DNA solutions were incubated in a chamber at 95 $^{\circ}$ C for 10 min and then cooled on ice to form single-stranded DNA.

ヒストン 9.0 mg 添加時の CPr-Gua の生成量は、熱処理により一本鎖に開裂させた DNA についてはさらに増加し

た。二本鎖 DNA でヒストンを添加しなかった場合と比較して、アセトアルデヒドやクロトンアルデヒドを作用させたとき、それぞれ 72 倍と 178 倍の生成量があった。この結果は、二本鎖 DNA における水素結合が、反応サイトへのアルデヒドの接近を妨げていることを考慮すれば説明できる。CPr-Gua の生成量はヒストンの添加量を 4.5 倍に増量すると、アセトアルデヒドもしくはクロトンアルデヒドと反応させた際にそれぞれ 3.4 倍および 4.0 倍となり、ヒストンの添加量にほぼ比例して増加していた。

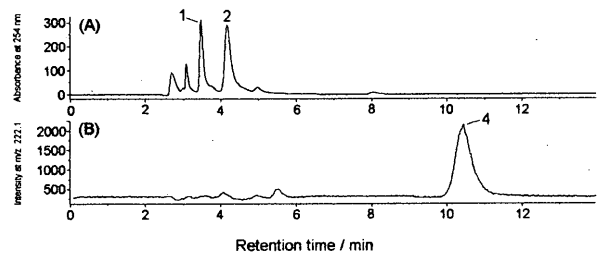


Fig. 16 Representative semi-micro HPLC profile of the hydrolyzed calf thymus DNA sample exposed to 0.60 M acetaldehyde in the presence of 6.0 mg/mL histone for 18 h. (A) UV detection, (B) MS detection.

Conditions: eluant, 10 mM ammonium acetate and 15 % methanol; column, Develosil ODS-UG-3 (3.7 μ m; 150 mm \times 2.0 mm); flow-rate, 0.15 mL/min. Selected ion monitoring, m/z 222.1. Other conditions as in Fig. 12.

なお、付加体生成に対する触媒活性の強い L-アルギニンと L-リシンのヒストン中の総含量は、約 20 % と報告されている³⁴⁾。一方で、上記実験で用いたヒストンの 9.0 mg 中に存在する塩基性アミノ酸量に近いと考えられる 2.0 mg のアルギニンを添加した。その結果、熱処理を加えた仔ウシ胸腺 DNA について、アセトアルデヒドもしくはクロトンアルデヒドを作用させた双方の場合で、顕著なアルギニン添加による付加体生成の触媒効果が見られ、さらにはヒストン 9.0 mg とほぼパラレルな付加体生成量を示していた。これらのことは、ヒストンによる触媒効果は、その中に存在する塩基性アミノ酸が担っていることを示唆している。

ところで、アセトアルデヒドは飲酒後、酵素的分解を経て生成され、それに続くアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) による分解を受けて代謝される。よって、一般には高濃度のまま長時間体内に滞留することはない。しかし、アルコール依存症患者の場合においては、継続的なアルコールの摂取のため、慢性的に高い濃度で滞留していることが考えられる。また、ALDH 欠損の遺伝的素養を持つ人はかなり多く存在し、これらの人の飲酒による発癌リスクは ALDH を欠損していない人と比較して最大 100 倍近くまで上がることが報告されている³⁵⁾。したがって、高い発癌性が知られているクロトンアルデヒド同様、アセトアルデヒドによる発癌メカニズムの解明が求められる。

本節で検討した反応溶液中のアセトアルデヒドの濃度が、生体内で存在しうると考えられる濃度よりはるかに高いことを記しておく。特に、CPr-Gua が生成するにはグアニンに対して 2 倍量のアセトアルデヒドが必要であり、したがって、その濃度の低下により CPr-Gua の生成は確率的に不利となる。生体内における条件により近い、低濃度のアセトアルデヒド存在下での検討が今後必要であると考える。

これらの結果は、生体内においても DNA とアセトアルデヒドもしくはクロトンアルデヒドから CPr-Gua が生成する反応が、ヒストンの存在により促進される可能性を示唆している。そして、DNA は生体内においてヒストンと常に共存しているため、DNA は単独に存在するよりはるかに CPr-Gua を生成しやすい危険な状態にあることを示唆している。

6. 総括

以上、本研究では、アセトアルデヒドを起因とする損傷塩基を標的に、³²P-ポストラベル法に代わるあるいは相補的な DNA 損傷分析法の開発を行ってきた。筆者らが開発した手法は放射線を必要としない安全な分析法であり、より正確で迅速な分析が可能である。とりわけ、LC-MS を用いた手法は高い分離能および同定能力を有するため、複数の損傷塩基の同時分析にも適しており、今後 DNA 損傷の分析法として主流の一つになることが期待される。本研究により得られた成果は DNA の損傷と発癌に関する研究の一助となる知見であると考えている。今後の課題としては、さらなる高感度化を目指し、実際に臨床で使用可能とすること、また一方で、 N^2 -Et-Gua や CPr-Gua がどのような機構で発癌性を導くのかなど、研究を続けていくことが重要である。

7. 謝辞

本研究の遂行にあたり、共同研究者として御懇篤なる御指導を賜りました岐阜薬科大学医薬品情報学研究室・酒向孫市講師ならびに岐阜薬科大学生化学教室・出屋敷喜宏講師に深甚なる謝意を表します。

8. 参考文献

- 1) Vaca, C.E.; Fang, J.L.; Schweda, E.K.H.; *Chem.-Biol. Interact.* 1995, 98, 51.
- 2) C.E. Vaca, J.A. Nilsson, Fang, J.-L.; R.C. Grafström, *Chem.-Biol. Interact.* 1995, 108, 197.
- 3) Fang, J.-L.; Vaca, C.E., *Carcinogenesis* 1995, 16, 2177.
- 4) Fang, J.-L.; Vaca, C.E., *Carcinogenesis* 1997, 18, 627.

- 5) Wang, M.; McIntee, E.J.; Cheng, G.; Shi, Y.; Villalta, P.W.; Hecht, S.S., *Chem. Res. Toxicol.* 2000, 13, 1149.
- 6) Randerach, K.; Reddy, M.V.; Gupta, R.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981, 78, 6126.
- 7) Reddy, M.V.; Gupta, R.C.; Randerath, E.; Randerath, K., *Carcinogenesis* 1984, 5, 231.
- 8) Reddy, M.V.; Randerach, K., *Carcinogenesis* 1986, 7, 1543.
- 9) Esaka, Y.; Inagaki, S.; Goto, M.; Sako, M., *Electrophoresis* 2001, 22, 104.
- 10) Goto, M.; Inagaki, S.; Esaka, Y., *Anal. Sci.* 2001, 17, 1383.
- 11) Inagaki, S.; Esaka, Y.; Sako, M.; Goto, M., *Electrophoresis* 2001, 22, 3408.
- 12) Inagaki, S.; Esaka, Y.; Deyashiki, Y.; Sako, M.; Goto, M., *J. Chromatogr. A* 2003, 987, 341.
- 13) Sako, M.; Inagaki, S.; Esaka, Y.; Deyashiki, Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 3497.
- 14) Inagaki, S.; Esaka, Y.; Goto, M.; Deyashiki, Y.; Sako, M., *Biol. Pharm. Bull.* 2004, 27, 273.
- 15) Huang, M.; Liu, S.; Murray, B.K.; Lee, M.L., *Anal. Biochem.* 1992, 207, 231.
- 16) Loregian, A.; Scremin, C.; Schiavon, M.; Marcello, A.; Plau, G., *Anal. Chem.* 1994, 66, 2981.
- 17) Geldart, S.E.; Brown, P.R., *J. Chromatogr. A* 1998, 828, 317.
- 18) Esaka, Y.; Kano, K., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 445.
- 19) 江坂幸宏, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*) 1998, 47, 819.
- 20) Tadey, T.; Purdey, W.C., *J. Chromatogr. B* 1994, 657, 365.
- 21) Burgi, D.S.; Chein, R.L.; *Anal. Chem.* 1991, 63, 2042.
- 22) Chein, R.L.; Burgi, D.S., *Anal. Chem.* 1992, 64, 1046.
- 23) Wallingford, R.A.; Ewing, A.G., *Anal. Chem.* 1987, 59, 1762.
- 24) Goto, M., *J. Flow Injection Anal.* 1999, 16, 9.
- 25) Park, J.-W.; Cundy, K.C.; Ames, B.N., *Carcinogenesis* 1989, 10, 827.
- 26) Germadnik, D.; Pilger, A.; Rüdiger, H.W., *J. Chromatogr. B* 1997, 689, 399.
- 27) Quirino, J.P.; Terabe, S., *Science* 1998, 282, 465.
- 28) Farmer, P.B.; Sweetman, G.M.A., *J. Mass Spectrom.* 1995, 30, 1369.
- 29) Esaka, Y.; Inagaki, S.; Goto, M., *J. Chromatogr. B* 2003, 797, 321.
- 30) Arimoto-Kobayashi, S.; Kaji, K.; Sweetman, G.M.A.; Hayatsu, H., *Carcinogenesis* 1997, 18, 2429.
- 31) Sako, M.; Kawada, H.; Hirota, K.; *J. Org. Chem.* 1999, 64, 5719.
- 32) Sako, M.; Yaekura, I.; Deyashiki, Y., *Tetrahedron Lett.* 2002, 43, 6701.
- 33) Sako, M.; Yaekura, I., *Tetrahedron* 2002, 58, 8413.
- 34) Sugano, N.; Olson, M.O.J.; Yeoman, L.C.; Taylor, C.W.; Starbuck, W.C.; Busch, H., *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 3589.
- 35) Mizoi, Y.; Tatsuno, Y.; Adachi, J.; Kogame, M.; Fukunaga, T.; Fujiwara, S.; Hishida, S.; Ijiri, I., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1983, 18, 127.

* 本総説は岐阜薬科大学博士論文 (甲第 91 号) の内容を中心にまとめたものである。