

polyclonal anti-DNMT1 (ab19905; Abcam, Cambridge, UK)、rabbit polyclonal anti-DNMT3A (SC-20703; Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Santa Cruz, CA, USA)、mouse monoclonal anti-DNMT3B (IMG-184A; Imgenex Corporation, San Diego, CA, USA)およびmouse monoclonal anti- β -actin (Abcam)の各1次抗体を用いてWestern blotを行った。なお、2次抗体には、anti-rabbit/mouse Immunoglobulin G antibodies (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA, USA)を使用した。

4. 増殖および凝集試験

各培地にてDNMT阻害剤である5-アザ-2'-デオキシチジン (5AZ) 存在下もしくは非存在下に於て30度で振盪培養を行い、経時的に濁度 (OD600) を測定した。相対的凝集活性 (Relative flocculation activity) は、試験管の直径 (T) と凝集の直径 (F) を測定し、次式を用いて算出した。

$$\text{Relative flocculation activity} = 100 \times (F/T)$$

5. Reverse-Transcription (RT)-PCR 解析

酵母細胞よりRNAを抽出後、Super Script® One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Life technologies, USA) を使用しRT-PCRを行った。なお、使用したプライマーは以下の通りである。*FLO1*, 5'-CTCATCGCTATATGTTTTTGG-3' (forward) および 5'-CGAGTAAACAACCTTCATTGG-3' (reverse); *FLO11*, 5'-GTCACGACGGCTATTCCAACCACAGTTATTACC-3' (forward) および 5'-GAATACAACCTGGAAGAGCGAGTAGCAACCAC-3' (reverse); *ACT1*, 5'-ATTCTGAGGTTGCTGCTTTGG-3' (forward) および 5'-GAAGATTGAGCAGCGGTTTGC-3' (reverse)。

C. 研究結果

1. ヒト *DNMT* 酵母における *DNMT* の発現確認
育種したヒト *DNMT* 酵母 YPH250/pY2hD1_pY3hD3A および、YPH250/pY2hD1_pY3hD3B における各 *DNMT* の発現をWestern blotにより確認した。ガラクトース誘導性の *GAL1* プロモーターを用いていることから、SG培地で培養後24時間までの発現プロファイルを解析した。その結果、両ヒト *DNMT* 酵母において、24時間で各 *DNMT* の発現が確認された。YPH250/pY2hD1_pY3hD3B 株では、*DNMT1* については16時間からの発現を認めた (図1)。

2. ヒト *DNMT* 酵母の増殖曲線

通常の酵母の培養に使用されるグルコースを炭素源としたSD培地における増殖レベルを確認した。その結果、SD培地において、ヒト *DNMT* 酵母である YPH250/pY2hD1_pY3hD3A および、YPH250/pY2hD1_pY3hD3B は、ベクターコントロールである YPH250/pY2_3 に比べて増殖速度の低下が観察された。ただし、*DNMT* 阻害剤である5AZ (100 μ M) では、認められた増殖抑制は解除されなかった (図2A)。

ヒト *DNMT* 酵母育種に使用した発現ベクターは *GAL1* プロモーターであり、ガラクトースを炭素源とした培地 (SG培地) において各 *DNMT* の発現が確認されている (図1)。そこでSG培地におけるヒト *DNMT* 酵母の増殖レベルを検証した。その結果、SD培地で得られた結果と同様に、ベクターコントロールである YPH250/pY2_3 の増殖レベルに比べ、ヒト *DNMT* 酵母の YPH250/pY2hD1_pY3hD3A および YPH250/pY2hD1_pY3hD3B の増殖は遅延・抑制されていることが確認された。しかし、同増殖阻害は、SD培地での結果と同様に、5AZ (100 μ M) では解除されなかった (図2B)。

3. ヒト *DNMT* 酵母の凝集反応

酵母の増殖阻害の原因の一つとして凝集が予想されるため、SG 培地におけるヒト *DNMT* 酵母の凝集レベルを確認した。その結果、ベクターコントロールの YPH250/pY2_3、ヒト *DNMT* 酵母である YPH250/pY2hD1_pY3hD3A、YPH250/pY2hD1_pY3hD3B の両株ともに凝集は確認されなかった。

一方、増殖試験において SG 培地と同様に SD 培地においてもヒト *DNMT* 酵母の増殖阻害が確認されたことから、SD 培地におけるヒト *DNMT* 酵母の凝集試験を行い、増殖状態を確認した。その結果、驚いたことに SD 培地においては、ヒト *DNMT* 酵母である YPH250/pY2hD1_pY3hD3A、YPH250/pY2hD1_pY3hD3B の両株においてのみ、凝集が誘発されることが明らかとなった (図 3)。

4. ヒト *DNMT* 酵母の凝集におよぼす 5AZ の影響

SD 培地において、ヒト *DNMT* 酵母が凝集性を示したことから、次に SD 培地で認められた凝集に対する DNMT 阻害剤の影響を検討した。その結果、5AZ 濃度依存的にヒト *DNMT* 酵母の凝集が抑制されることが明らかとなった。YPH250/pY2hD1_pY3hD3A、YPH250/pY2hD1_pY3hD3B の両株とも 100 μ M から有意に認められ、200 μ M ではその凝集は完全に抑制された(図 4)。

5. *FLO1/FLO11* の RT-PCR 解析

ヒト *DNMT* 酵母の凝集性因子 Flocculin 遺伝子群(*FLO1/FLO11*)の転写レベルを、RT-PCR により解析した。*Flo11* とハウスキーピング遺伝子である *ACT1* mRNA レベルは、検討した 3 株 (YPH250/pY2_3、YPH250/pY2hD1_pY3hD3A、YPH250/pY2hD1_pY3hD3B)では差は認められなかった。一方、ベクターコントロールである YPH250/pY2_3 と比べ、ヒト *DNMT* 酵母である

YPH250/pY2hD1_pY3hD3A、YPH250/pY2hD1_pY3hD3B では *FLO1*mRNA の転写量が亢進していることが明らかとなった(図 5A)。

*FLO1*mRNA 量がヒト *DNMT* 酵母では亢進していたことから、その亢進に対する DNMT 阻害剤の影響を検討した。5AZ (200 μ M) 存在下において、ヒト *DNMT* 酵母である YPH250/pY2hD1_pY3hD3A、YPH250/pY2hD1_pY3hD3B の *FLO1*mRNA レベルの亢進は抑制されることが明らかとなった(図 5B)。

D. 考 察

エピ変異原検出系を世界に先駆けて構築することを目的に、ゲノム DNA メチル化レベルが低いとされる真核生物、出芽酵母 *S. cerevisiae* にヒト DNMT 遺伝子をトランスジェニックした「ヒト *DNMT* 酵母」2 株 (YPH250/pY2hD1_pY3hD3A、YPH250/pY2hD1_pY3hD3B) をプラットフォームに、初年度は DNMT 阻害剤に対する応答性を検討した。その結果、グルコースを C 源とする培地においてヒト *DNMT* 酵母は凝集性を呈し、同表現型は DNMT 阻害剤である 5AZ により濃度依存的に抑制された(図 3, 4)。哺乳類細胞において DNMT は、DNA 複製時にシトシンのホモログとしてゲノムに取り込まれた 5AZ と核内で共有結合し分解を受けるとされる (Br. J. Haematol., 126 (2004), pp. 629–636)。したがって、本結果はヒト *DNMT* 酵母細胞内において発現したヒト DNMT が酵母核内のゲノム DNA をメチル化することを、またその凝集反応は可塑性を保持しつつゲノム DNA メチル化により制御されることを示唆する。また、今回育種した 2 株のヒト *DNMT* 酵母は共に凝集性を獲得したことから、両酵母細胞内でそれぞれ発現している *de novo* DNMT の DNMT3A もしくは 3B は、凝集に関わる遺伝子領域の同じ遺伝子座のシトシンにメチル基を付加することでその凝集性を制御している可能性も推測される。

ヒト *DNMT* 酵母は、SD および SG の両培地において増殖遅延・抑制を示した(図 2)。ヒト *DNMT* 発現コンストラクトは *GAL1* プロモーター制御下にあることから、本結果は SD 培地においても漏出的にヒト *DNMT* が発現している可能性を示唆する。さらに、酵母 YPH250 株細胞内におけるヒト *DNMT* 発現は細胞周期に影響をおよぼすこと、またその影響は 100 μ M 5AZ 存在下では変化が認められなかった事実を総合的に考察すると、ヒト *DNMT* 酵母ゲノム上の細胞周期に関わる遺伝子(サイクリン、サイクリン依存性キナーゼなど)の発現制御を *DNMT* は不可逆にかく乱していることも予想させる。DNA メチル化によるエピジェネティックな制御は哺乳類細胞では各種ヒストン修飾による制御機構より比較的安定とされる (Science, 351 (2016), pp. 720–724)。したがって、5AZ によりヒト *DNMT* 酵母が示す生育阻害が回復しないとする本研究結果は、これまでの哺乳類細胞で得られた知見と矛盾しないとも言える。

酵母の凝集に関与する遺伝子群として *Flocculin* が知られている。出芽酵母のゲノム解析で使用されたリファレンス株 S288C から派生したとされる YPH250 株は、*Flocculin* 遺伝子である *FLO1/FLO11* の転写因子の 1 つ *FLO8* にナンセンス変異を持つとされる (Genetics, 144 (1996), pp. 967–978)。したがって、通常 YPH250 株は凝集性を示さない。今回の解析から、*FLO1* 遺伝子の転写がヒト *DNMT* 酵母で亢進しその誘導が 5AZ により抑制されたことから、5AZ 抑制性ヒト *DNMT* 酵母凝集反応は *FLO1* により誘導されていることが強く示唆される。さらに *FLO1* 遺伝子のプロモーターが *DNMT3A* および *3B* の両酵素により DNA メチル化を受ける可能性もこの解析から推測される。これは、2 種類の *de novo* DNA メチル化酵素が上述のとおりヒト *DNMT* 酵母細胞内のゲノム上で同じ遺伝子座 (CpG 配列) をメチル化する可能性を指摘したことと一致す

る。

今回育種した、酵母 YPH250 株をベースとした 2 株のヒト *DNMT* 酵母は、野生株と異なる表現型として凝集性を示した。ヒト *DNMT* 酵母において凝集性関連遺伝子の 1 つ *FLO1* は 5AZ によりその誘導が抑制されることから、哺乳類細胞で一般的に認められる制御とは逆に *FLO1* プロモーター領域はメチル化により活性化されること、また比較的安定なエピジェネティックな制御と考えられる DNA メチル化が同プロモーター領域では可逆的であることが示唆される。これは、ヒト *DNMT* 酵母の *FLO1* プロモーター領域の大きな特徴と考えられる。また、漏出的と推測されると仮定した場合、一般的に各種薬剤に対して哺乳類細胞より感受性が低いとされる酵母特有のバイオアッセイ時の問題点を補っている可能性がある。試験法として本研究を考察した場合、検出に Ames 試験と同様に特殊な機材を必要としないバイオマーカーを同定できた本研究は、食品添加物等の化学物質全般のスクリーニング毒性試験系として好適であり、また動物愛護管理法が定める「3R」にも資する点で有用性は高いとも言えよう。

E. 結論

本研究では、内在性 *DNMT* を持たないとされる出芽酵母 *S. cerevisiae* にヒト *DNMT* 遺伝子を形質転換し、エピ変異原である *DNMT* 阻害剤の検出系の構築を試みた。育種したヒト *DNMT* 酵母はグルコース培地において凝集性を示し、その表現型は *DNMT* 阻害剤である 5AZ により濃度依存的に抑制された。以上の結果は、凝集性をバイオマーカーにヒト *DNMT* 酵母をエピ変異原のスクリーニング系に応用できることを示している。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

1. Sugiyama, K., Takamune, M., Furusawa, H. and Honma, M.: Human DNA methyltransferase gene-transformed yeasts display an inducible flocculation inhibited by 5-aza-2'-deoxycytidine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456, 689-694 (2015).

学会発表

1. 杉山圭一、古沢博子、清水雅富、本間正充 : 酵母凝集反応を利用した新規なエピ変異原可視化検出系の開発、日本農芸化学会大会講演要旨集 (2016・札幌) (2016, 3 札幌) .
2. Sugiyama, K., Furusawa, H. and Honma, M.: Epigenetic modifiers are visibly detectable by human DNMTs transgenic yeast, International Symposium for RIKEN Epigenetics Program 2016 (2016.2 和光).
3. 杉山圭一、古沢博子、本間正充: *In vivo* DNAメチル化酵素阻害可視化システムの開発、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会プログラム (2015・神戸) 445 (2015, 12 神戸) .
4. 杉山圭一、古沢博子、本間正充: 酵母をプラットフォームとしたエピジェネティック変異原検出系構築の試み、日本環境変異原学会第44回大会 (福岡) プログラム・要旨集 (2015・福岡) 103 (2015, 11 福岡) .
5. Sugiyama, K., Furusawa, H. and Honma, M.: Molecular breeding of yeasts for detection of DNA methyltransferase inhibitor, Environmental Mutagenesis and Genomics Society 46th Annual Meeting (2015, 9 ニューオリンズ・米国).

6. 清水雅富、グループ ピーター、細田明美、碓井之雄、杉山圭一、本間正充: ω -3系多価不飽和脂肪酸の過酸化反応によって産生されるアルデヒド類による変異原性試験、第57回日本脂質生化学会 (2015, 5 東京) .
7. Gruz, P., Shimizu, M., Hosoda, A., Kojo, A., Usui, Y., Sugiyama, K. and Honma, M.: Mutagenicity of polyunsaturated fatty acid peroxidation products in the standard Ames assay, 12th Asian Congress of Nutrition (2015, 5 横浜).

- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

表 1 使用した菌株

Strain name	Genotypes
YPH250/pY2_3	MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 p[2μ URA3] p[2μ TRP1]
YPH250/pY2hD1_pY3hD3A	MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 p[2μ URA3 hDNMT1] p[2μ TRP1 hDNMT3A]
YPH250/pY2hD1_pY3hD3B	MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 p[2μ URA3 hDNMT1] p[2μ TRP1 hDNMT3B]

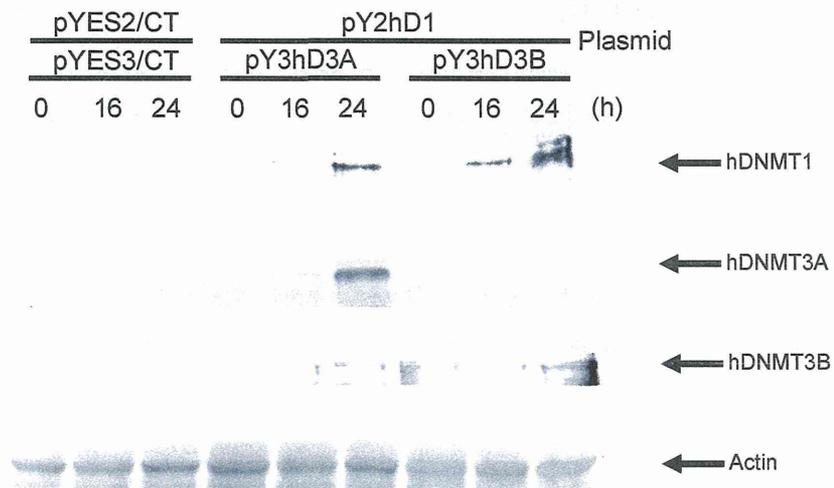


図 1 各ヒト *DNMT* 酵母の *DNMT* 発現レベル

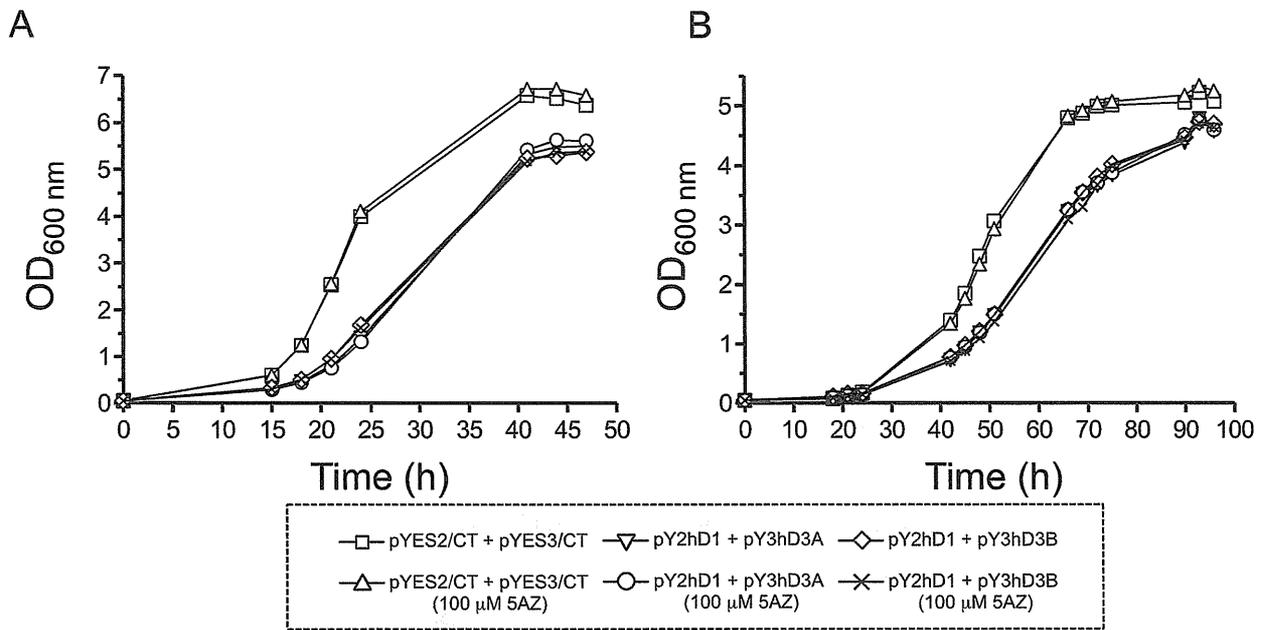


図2 各ヒト *DNMT* 酵母の増殖曲線

A: グルコース培地 (SD 培地) , B: ガラクトース培地 (SG 培地)

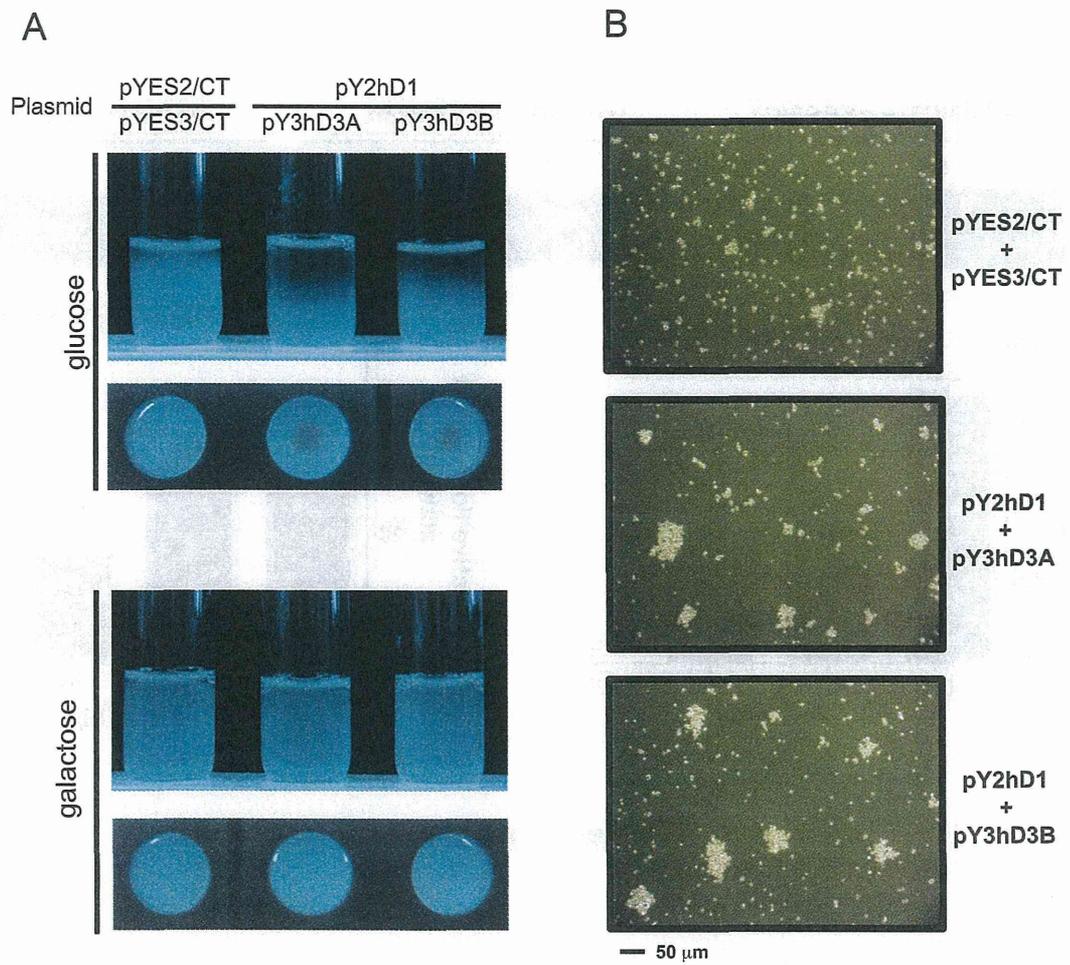


図3 各ヒト *DNMT* 酵母の増殖状態

A: 各酵母の培養試験管, B: SD 培地での各酵母のデジタル顕微鏡写真

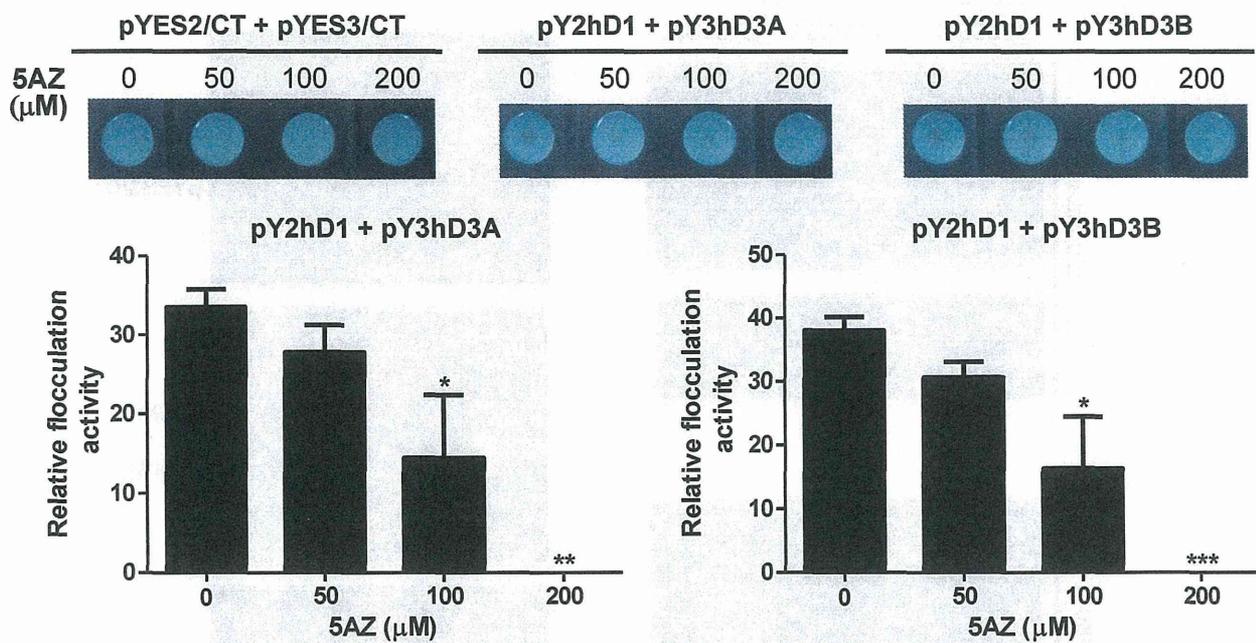


図4 ヒト *DNMT* 酵母の凝集におよぼす 5AZ の影響

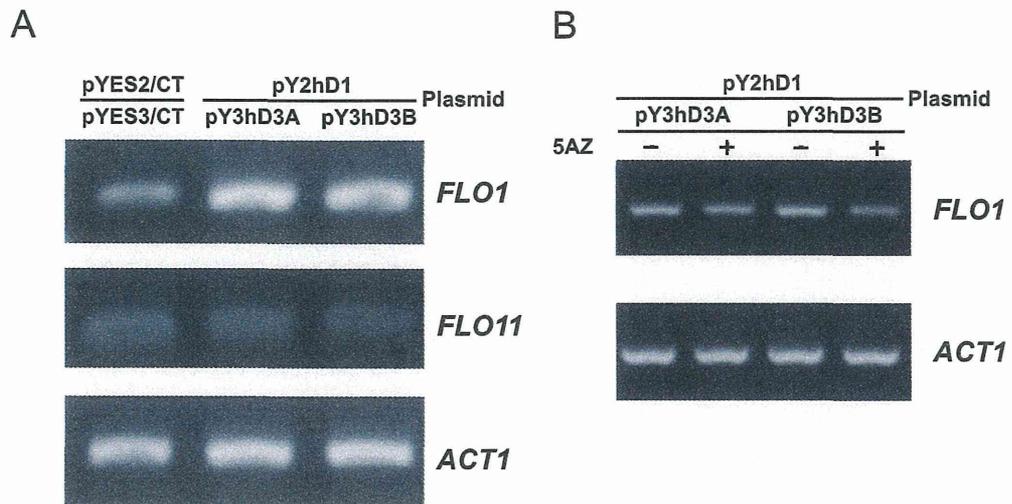


図5 Flocculin 遺伝子の転写レベル

A: 各酵母での Flocculin 遺伝子の転写レベル

B: *FLO1* 遺伝子の転写レベルにおよぼす 5AZ の影響

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための新戦略法に関する研究

分担研究課題名：DNAアダクトの定性・定量評価とアダクトのカタログ化に関する研究

研究分担者：戸塚ゆ加里 国立がん研究センター研究所 発がん・予防研究分野 ユニット長

研究要旨

DNA付加体の網羅的解析手法を用いて、DCPに由来する付加体の探索を行ったところ、[M+H: 430.23]のDNA付加体がDCP曝露に特徴的なものとしてスクリーニングされた。現在、この付加体の化学構造の同定について検討を行っている。

A. 研究目的

ジクロロメタンやジクロロエタン等のハロゲン系炭化水素は主に工業溶剤として幅広く使用されている。また、ジクロロメタンおよび1,2-ジクロロプロパン(1,2-DCP)は、最近、職業性胆管がんの原因物質であることが示唆されているが、これらハロゲン系炭化水素と印刷業従事者で多発するヒト胆道がんとの関係は未だ良くわかっていない。本研究では、これらハロゲン系炭化水素の発がんメカニズムの解明や曝露の指標として有用な、ハロゲン系炭化水素由来のDNA付加体の解析を目的として、質量分析器機を用いたDNA付加体の網羅解析法（DNAアダクトーム法）を用いて検討を行った。

B. 研究方法

Ames 試験に用いる試験菌株である、*Salmonella typhimurium* TA100 に 1,2-DCP(6000ppm, 15000ppm)を4時間気層曝露した後にバクテリアを回収し、ゲノムDNAの抽出を行った。DNAを各種ヌクレアーゼによりモノヌクレオシドに分解し、生成するDNA付加体を質量分析機器(AB SCIEX, TripleTOF TT6600)を用いて網羅的に解析した。得られたデータを主成分(PCA)解析により解析し、1,2-DCP曝露に相関する付加体の抽出を実施した。

C. 研究結果

1,2-DCPを曝露したバクテリアDNAのアダクトーム解析を行なった結果を図1に示す。主成分(PCA)解析を行なったところ、各曝露群毎のクラスターに分類されることがわかった。次にPCA解析のLoading plotの結果から、1,2-DCPに相関する付加体の探索を行ったところ、Name22 [M+H: 430.23]のDNA付加体が1,2-DCP曝露と相関するものとしてスクリーニングされた(図2)。そのMS/MS解析データから、この付加体は親MSが430.23であり、412.12, 286.17, 229.15, 155.08のフラグメントを有することが推測された。現在、この付加体の化学構造の同定について検討を行っている。

(倫理面への配慮)

今年度の研究には該当しないが、本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishino K, Kato T, Kato M, Shibata T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H,

Totsuka Y. Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2015, Feb 4;16(2):3474-92.

2. Komiya M, Fujii G, Miyamoto S, Takahashi M, Ishigamori R, Onuma W, Ishino K, Totsuka Y, Fujimoto K, Mutoh M. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice. *Cancer Sci.* 2015 Aug 27.

2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里、中釜 斉：質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明
第 42 回日本毒性学会学術大会, 2015 年 7 月
2. Yukari Totsuka, Yingsong Lin, Mamoru Kato, Yasushi Totoki, Tatsuhiro Shibata, Yoshitaka Matsushima, Hitoshi Nakagama : Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) 日本癌学会学術総会 . 2015 年 10 月
3. 戸塚ゆ加里：ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析による発がん要因の探索, 第 44 回日本環境変異原学会. 2015 年 12 月
4. 秋場 望、椎崎一宏、遠藤 治、三牧幸代、土原一哉、中釜 斉、戸塚ゆ加里：職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び 1,2-ジクロロプロパンの変異原性に対するグルタチオン-S-転移酵素の影響、第 44 回日本環境変異原学会. 2015 年 12 月

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

E. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

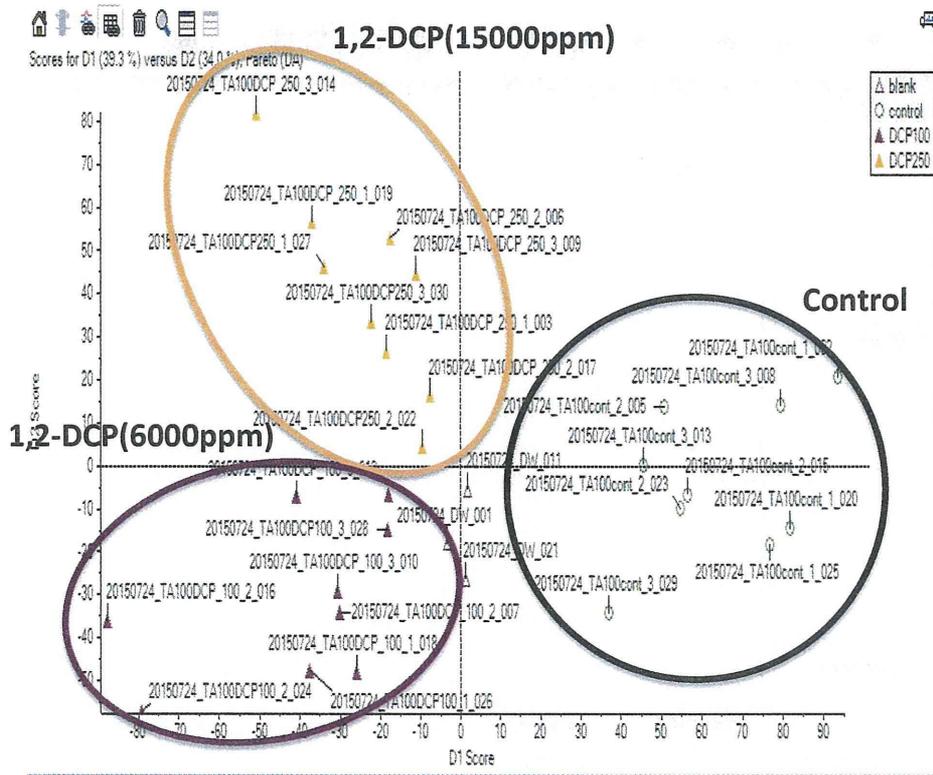


図1 1,2-DCP曝露したバクテリアのアダクトーム解析結果

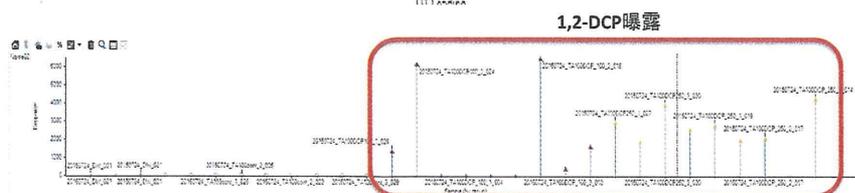
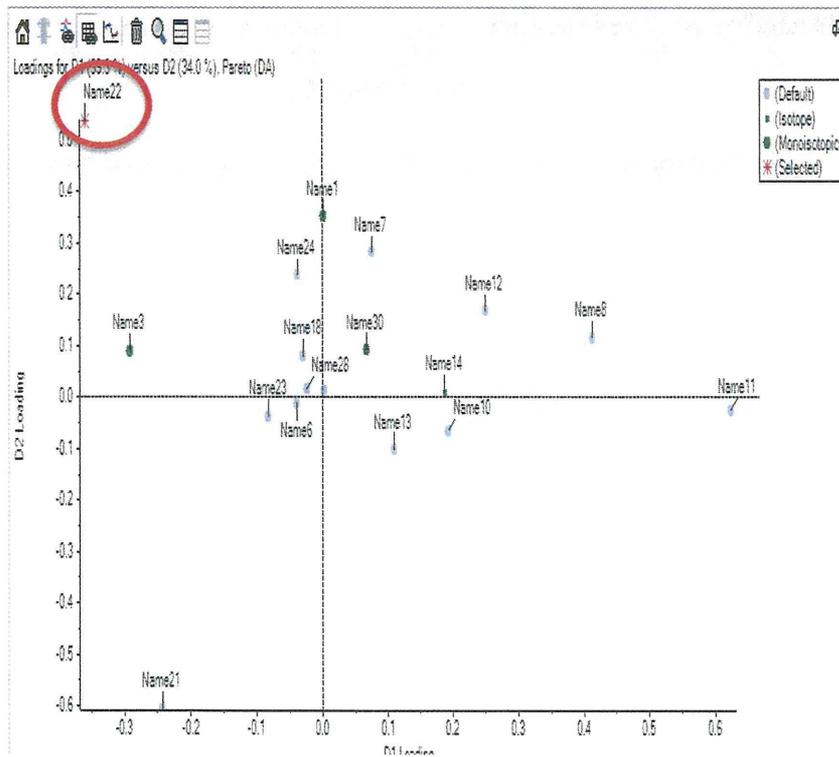


図2 1,2-DCP曝露と相関する付加体の探索結果

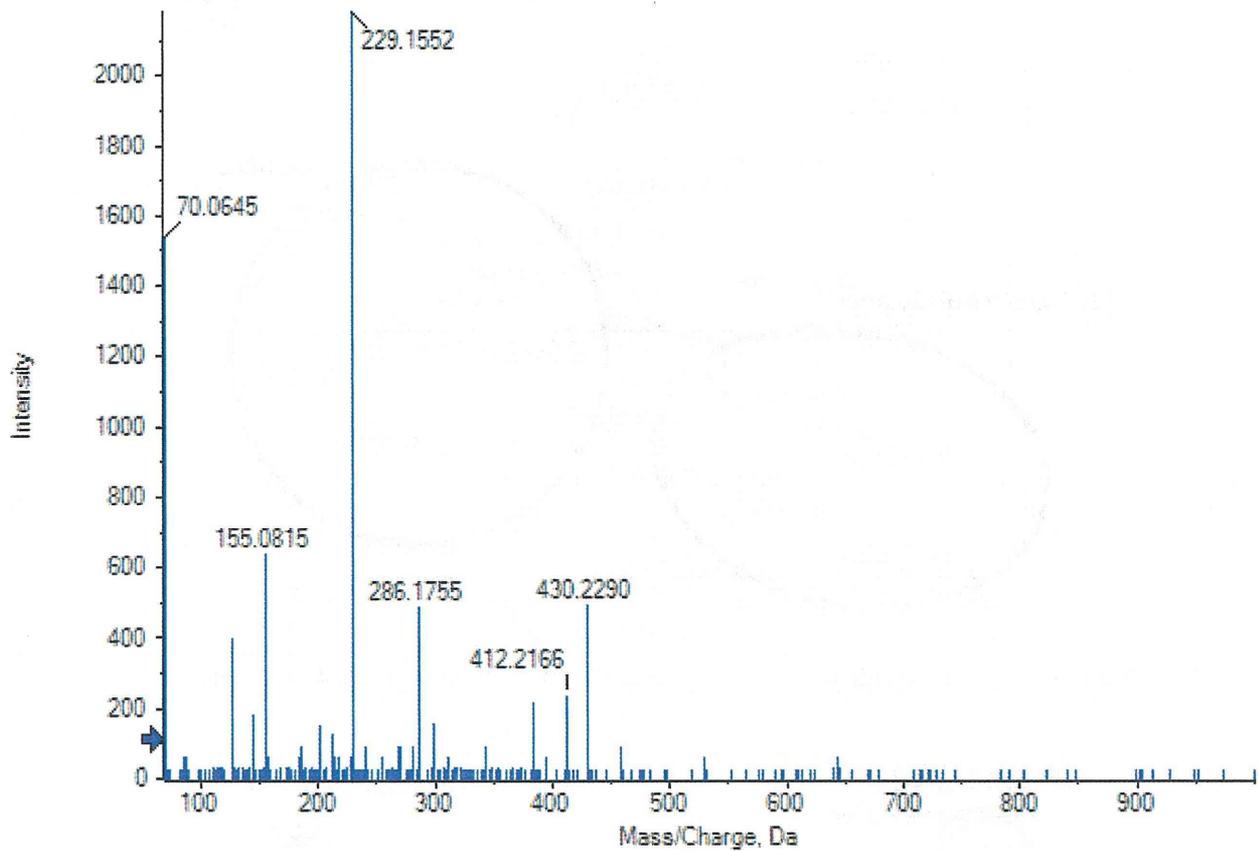


図3 1,2-DCP曝露と相関する付加体(Name22)のMS/MSデータ

分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための新戦略法に関する研究

分担研究課題名：重要なDNAアダクトの合成と、ターゲットベクターへの導入に関する研究

研究分担者： 高村 岳樹 神奈川工科大学工学部 分子生物学研究室 教授

研究要旨

PhIPのデオキシグアノシン(dG)-C8付加体を得るため、簡便な方法論の構築を行った。付加体合成の原料となる臭素化dG誘導体は、シリル保護dGを酢酸溶媒中プロモスクシンイミドを加える事で効率よく生成物が得られることが明らかとなった。また得られた化合物はO⁶位にベンジル基(Bn)の保護基、N²位にジメトキシトリチル基(DMTr)を入れることで、付加体の化学合成にふさわしい保護8-Br-dGとした。PhIPとの反応は、Pd触媒、Xantphos、炭酸セシウムを用い、さらにDMSOを溶媒として150 °Cで反応させ、保護基のついたdG-C8-PhIPの付加体を40～60%の収率で得ることができた。得られた化合物はさらに、ジクロロメタン溶媒中5%トリクロロ酢酸を処理して、DMTr基を脱保護し、さらに、Pd blackを用いて水素添加によりベンジル基を脱保護した。環外のアミノ基はさらにDMF-DMAでアミジン保護を行った。得られた化合物はさらに、triethylamine-trihydrogenfluorideで処理し、シリル基を外した。得られた化合物は、デオキシリボースの5'位の水酸基にジメトキシトリチル基を導入するが、それには2,6ルチジン/DMF混合溶媒中、DIPEA存在下でトリチルクロライドを60°Cに加熱処理することで得られた。最終的にアミダイト体は*N,N*-tetraisopropyl phosphorodiamidateをジイソプロピルアミノテトラゾリト存在下、ジクロロメタン中で行った。得られたアミダイトとはオリゴ合成に供与したが、残存するphosphorodiamidateの影響のため現時点では合成品を得ることはできなかった。

A. 研究目的

食品中の変異原物質はDNAを損傷し、変異を誘発することが知られているが、変異誘発機構については、十分に理解されている状態ではない。変異誘発機構の解明には、損傷塩基を含んだ短鎖オリゴヌクレオチドである、部位特異的修飾オリゴヌクレオチドを用いた*in vitro*の系による損傷乗り越え修復(TLS)の研究がなされてきており、多くの知見が蓄積されている。一

方で、*in vivo* TLSの例としてはバクテリアを用いる系やヒト細胞株を用いる系など様々であるが、系によっては、異なるTLSの結果を与えることがわかっている。そのため、いくつかの*in vivo*の系を組み合わせることにより、得られる情報を相互に比較し、動物個体に変異原物質を投与した際の変異データから得られる知見を担保することが重要である。

ヒトが暴露する可能性のある変異・発がん性物質は様々であるが、上述のように既存の動物個体データを活用できるものは多くない。焼肉などの加熱食品中に含まれるがん原性ヘテロサイクリックアミンの一つである2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP 図1) は、Ames試験などバクテリアを用いる変異原性試験では、比較的低い変異原性を示すが、ラットに対し大腸がんや乳がんを誘発することが知られている。またAPC遺伝子に変異を誘発することが明らかとなっている。PhIPのTLS試験ではAPC遺伝子に部位特異的にPhIP修飾を施したものをを用いたin vitroの系が知られているが、in vivo TLSのデータは存在しない。そこで、in vivo TLSに向けたPhIP修飾オリゴヌクレオチドの合成を試みた。

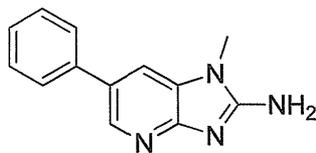


図1 PhIPの化学構造

B. 研究方法

PhIPの部位特異的修飾オリゴヌクレオチドを合成する目的で、まず、対象となるPhIP付加体について検討した。PhIPの付加体については、2種類の存在が知られているが、その化学構造が明らかになっているのは一般的なデオキシグアノシン(dG)の8位の修飾体(dG-C8付加体)のみである。そこで、PhIPのdG-C8の付加体を有するオリゴヌクレオチドの合成を行うこととした。合

成には図3のスキームに従い、合成を進めた。

(倫理面への配慮)

ヒトおよび動物を用いない実験であるため、必要な倫理審査はない。廃液などの観点から、不必要な量の溶媒の使用をしないなど、環境に影響を与える部分で注意しながら実験を行った。

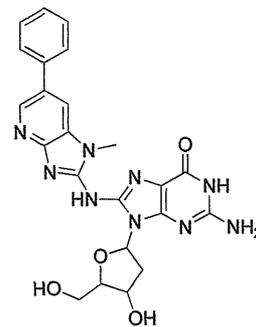


図2 dG-C8-PhIPの化学構造

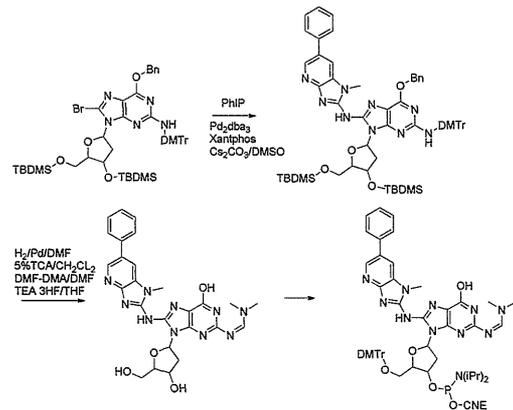


図3 dG-C8-PhIPの合成スキーム

C. 研究結果

一般的なdGのC8の付加体合成ではdGの8位のブロモ体(8-Br-dG)が必要である。これまでに8位のブロモ体の合成は、dGを臭素またはN-ブロモスクシンイミド(NBS)で合成するものが一般的だった。しかしな

がら、これらの方法は水を反応溶媒として用いるため、反応の進行に伴い生成する酸の影響で、脱プリンをする副反応が起こる可能性があり、反応の制御には困難が伴う。そこで、まずdGの水酸基を一般的なシリル基であるTBDMS基で保護した後、臭素化することを試みた。その結果、シリル保護dGの臭素化は酢酸溶媒中、等量のNBSを加える事で、効率よく生成物が得られることが明らかとなった。生成物の精製は酢酸エチルによる溶媒抽出、および炭酸ナトリウムによる中和の処理で、脱プリン体を得ることなく反応物を得ることが可能となった。得られた化合物はO⁶位にベンジル基(Bn)の保護器、さらに、N²位にジメトキシトリチル基(DMTr)を入れることで、付加体の化学合成にふさわしい、保護8-Br-dGとなる。先行研究により、他のdG-C8付加体ではO⁶位のベンジル保護は必要なく、ジオキサン溶媒で150 °Cの反応温度で進行することが知られている。そのため、同様の系を本PhIPのdG-C8付加体の合成に用いてみた。しかしながら、PhIPの溶媒に対する低い溶解性により、反応はほとんど進行しないことがわかった。そのため、過去文献と同様に、dG-C8付加体の合成をすすめることとした。O⁶位をベンジルアルコールでミツノブ反応を用いて保護し、さらにN²位のアミノ基を4,4'-dimethoxytrityl基で保護した後、PhIPとの反応は、Pd触媒存在下、フォスフィンリガンドをとってXantphosを用い、炭酸セシウムを塩基とし、さらにDMSOを溶媒として150 °Cで反応させた。原料の消失を確認後、目的とする保護基のついたdG-C8-PhIPの付加体を40~60%の収率で得ることができた。得られた化合物はさらに、ジクロロ

メタン溶媒中5%トリクロロ酢酸を処理して、DMTr基を脱保護し、さらに、Pd blackを用いて水素添加によりベンジル基を脱保護した。得られた化合物はオリゴヌクレオチド合成にふさわしいようにアミダイト化する必要が有るため、環外のアミノ基はDMF-DMAでアミジン保護を行った。既報ではDMF中で処理することにより、沈殿が得られるためそれをろ過することで目的物を得ているが、DMF溶媒を完全に留去することにより、より高い収率で目的物が得られることがわかった。得られた化合物はさらに、triethylamine-trihydrogenfluoride (TEA 3HF)で処理し、シリル基を外した。得られた化合物は、デオキシリボースの5'位の水酸基にジメトキシトリチル基を導入するが、それには2,6ルチジン/DMF混合溶媒中、DIPEA存在下でトリチルクロライドを60°Cに加温処理することで得られた。最終的にアミダイト体は*N,N*-tetraisopropyl phosphorodiamidateをジイソプロピルアミノテトラゾリト存在下、ジクロロメタン中で行った。得られたアミダイトとはオリゴ合成に供与したが、残存するphosphorodiamidateの影響のため合成品を得ることはできなかった。

D. 考察

既報の方法に改良を加える事で、より簡便に目的化合物を合成することを試みた。原料となるdG修飾体はシリル保護をしたdGを臭素化する新たな方法論を見出した。しかしながら、他は既報通りの方法論が現時点では最適であった。無保護の核酸塩基をダイレクトに修飾することが可能となれば、より効率的な合成が可能となるが、これ

については引き続き検討する。いっぽう得られたアミダイトは一定量の原料の混入が確認されており、これはオリゴ合成の妨害成分となりうる、より、効率的な精製法の確立が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1: Misaki K, Takamura-Enya T, Ogawa H, Takamori K, Yanagida M. Tumour-promoting activity of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated or nitrated derivatives. *Mutagenesis*. 2016;31(2):205-13.

2: Takamura-Enya T, Tokutake M. Novel speciation analysis of copper in river water: observation of soluble anionic copper–ligand complexes *Limnology*. 2016 17, 117-125

2. 学会発表

1: 高村岳樹、環境汚染物質による DNA 損傷の新たな検出法の開発、日本環境変異原学会第 44 回大会（福岡 2015）

2: 益谷美都子、Rafiqul Islam、藤森浩彰、佐々木由香、小泉史明、井上謙吾、松野研司、石川吉伸、高村岳樹、大川原正
がん治療の分子標的候補としての PARG の検討 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会（2015 神戸）

3: 高村 岳樹、小笠原楓、益谷 美都子
DNA 損傷マーカーとしてのリボシルアデノシンの検出、日本薬学会第 136 年会（2016 横浜）

4: 橋本亜紀子、高村岳樹、ソラレン結合型水溶性フラレンの合成と *in vitro* における評価 日本化学会 第 96 春季年会（2016 京都）

5: 山中岳寛、高村岳樹、デオキシグアノシンの酸化損傷を検出する蛍光-消光プローブの合成と評価（2016 京都）

F. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための新戦略法に関する研究

分担研究課題： 重要な DNA アダクトの合成に関する研究

研究分担者：正田 卓司 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 主任研究官

研究要旨

生命の設計図である DNA に化学物質が結合すると、その遺伝子の機能が破壊される。このような DNA アダクトが蓄積すると細胞の癌化につながると考えられる。そのため、DNA アダクトの生成機構、除去、修復機構を明らかにすることは極めて重要である。本研究では、安井らが開発した TATAM 法に必要な DNA アダクト含有オリゴ DNA を提供するために、DNA 合成に使用するホスホロアミダイト体の合成法を確立することを目的とする。本年度は 2 種類の DNA アダクトの合成を試みた。まずはヘテロサイクリックアミンなどの DNA アダクトのうち、高い発がん性を有する 2-aminofluorene 付加体 (dG-C8-AAF) の合成を試みた。しかしながら、8 位へのアセチル基導入が難航し、目的物を得ることができなかった。次に、食品中の焦げなどに含まれる MeIQx の付加体 (dG-C8-MeIQx) の合成を試みた。現在までに MeIQx の塩基への導入に成功しており、今後ホスホロアミダイト体の合成及びオリゴ DNA の合成を行う。

A. 研究目的

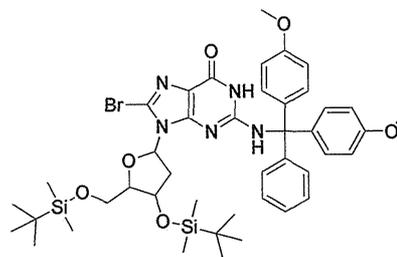
生物は常に多種多様な化学物質にさらされており、それら化学物質が生体分子と結合することで、その生体分子の正常な機能は破壊される。生命の設計図である DNA も化学物質と結合し、DNA アダクトを形成する。そのため、DNA アダクトの生成機構をはじめ、その除去機構、除去後の修復機構などの詳細を明らかにすることは極めて重要である。この分野での古典的な研究は個体あるいは細胞に化学物質を与え続けてがん化した細胞から DNA アダクトを検出、同定するといったものである。しかしながら、実際に生じた DNA アダクトが、細胞の発がん性に与えた影響について定量的に解析された例はほとんどなかった。一方、安井らが開発した TATAM 法¹⁾は、DNA 損傷と発がん性を定量的に解析できる手法であり、DNA アダクトと発がん性の関係を詳細

に解明することが可能になると考えられる。そこで本研究では、TATAM 法に必要な DNA アダクト含有オリゴ DNA を供給するために、その DNA アダクトの合成および、そのホスホロアミダイト体の合成を行うこととした。

DNA アダクトのホスホロアミダイト体

を合成するには、デオキシグアノシン (dG) を出発原料とし、その構造に含まれる窒素原子 (N) や酸素原子 (O) を適切に保護することが重要である。DNA アダクトにはグアニン塩基の 1 位、2 位、8 位に N があり、6 位に O がある (Figure 1)。一般的には、6 位 O をベンジル (Bn) 基で、2 位をジメトキシトリチル (DMTr) 基で保護した化合物を合成中間体として用い、ホスホロアミダイト体合成前に 6 位 Bn 基は脱保護するが、6 位 Bn 基の脱保護条件は化合物の構造や実験環境の影響を受けやすく、反応条件が一定しないなどの間

題があり、適宜反応条件の検討が必要となる。本研究では Figure 2 に示したアミノフルオレン付加体 (dG-C8-AAF) および MeIQx 付加体 (dG-C8-MeIQx) を選択し、それぞれの合成中間体についての反応条件検討を行った。



B. 研究方法

1. 試薬と装置

試薬は和光純薬、東京化成、関東化学から購入し、特に精製せずにそのまま用いた。化合物の精製には中圧分取液体クロマトグラフ (EPCLC-W-Prep, 山善) を用いた。

Microwave 照射装置には Initiater (Biotage) を用いた。

^1H NMR スペクトルは Varian MERCURY VX 400 を用いて測定した。溶媒には CDCl_3 または $\text{DMSO}-d_6$ を用い、化学シフトは TMS を内部標準として用いた。

LCMS は島津 IT-TOFMS (LC 部分: システムコントローラ CBM-20A, ポンプ LC-20A, カラムオープン CTO-10AC, UV/フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M20A) を用いて測定した。カラムは CAPCELL PAK C18 MGII 5 μm , 2.0 x 35 mm (SHISEIDO) を用いた。溶媒は A: 0.1% $\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$, B: 0.1% $\text{HCOOH}/\text{CH}_3\text{CN}$ (いずれも関東化学) を用いた。

2. 合成

1) dG- Λ^2 -DMTr- C^8 -Br-3',5'-diTBDMS (4) の合成

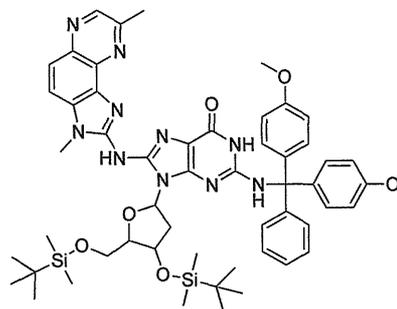
2.23g の化合物 3 を 20ml のピリジンに溶解し、20 ml のピリジンに溶解した 4.0 g の DMTrCl を添加した。室温下、終夜攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣を少量の dichloromethane に溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した (2% methanol/dichloromethane)。2.5 g の化合物 4 (白色固体) を得た (収率 73%)。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.87 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.39 – 7.28 (m, 2H), 7.27 – 7.21 (m, 1H), 7.20 – 7.14 (m, 2H), 7.11 – 6.99 (m, 4H), 6.92 – 6.80 (m, 4H), 5.71 (dd, $J = 10.1, 5.1$ Hz, 1H), 3.96 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 3.72 (s, 6H), 3.57 (m, 1H), 3.29 (m, 1H), 3.07 (dd, $J = 10.9, 8.7$ Hz, 1H), 2.35 (ddd, $J = 13.1, 10.1, 5.3$ Hz, 1H), 1.32 (dd, $J = 13.1, 5.1$ Hz, 1H), 0.85 (s, 9H), 0.84 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H), -0.03 (s, 3H), -0.05 (s, 3H)。

MS (ESI+) $m/z = 898$ [M + Na] $^+$

2) dG- Λ^2 -DMTr- C^8 -MeIQx-3',5'-diTBDMS (17) の合成

十分に窒素置換した 3 ml の THF に化合物 4 (44.3 mg, 0.05 mmol), MeIQx (22.1 mg, 0.1 mmol), xantphos (30.2 mg, 0.05 mmol), Cs_2CO_3 (33.6 mg, 0.1 mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (10.6 mg, 0.01 mmol) を添加し, microwave 照射下, 100 $^\circ\text{C}$, 6h 攪拌した。ろ過した反応液を減圧留去し, シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した。29.3 mg の化合物 17 (黄色固体) を得た (収率 58%)。



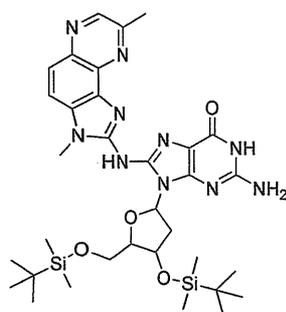
^1H NMR (400 MHz, $\text{Chloroform}-d$) δ 8.62 (s, 1H), 7.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.39 – 7.20 (m, 9H), 6.86 (d, $J = 8.5$ Hz,

5H), 6.70 – 6.62 (m, 1H), 6.05 (s, 1H), 4.62 (s, 1H), 3.97 – 3.88 (m, 1H), 3.83 – 3.66 (m, 11H), 3.30 (s, 1H), 2.72 (s, 3H), 2.00 – 1.88 (br, 1H), 0.93 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), 0.12 (s, 6H), 0.01 (s, 3H), -0.02 (s, 3H).

MS (ESI+) $m/z = 1009 [M + H]^+$

3) dG-C⁸-MeIQx-3',5'-diTBDMS (18) の合成

88.1 mg の化合物 17 を 3% TCA/dichloromethane に溶解し、室温して 1 時間攪拌した。さらに dichloromethane を加え、飽和ギ酸アンモニウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した。37.7 mg の化合物 18 (黄色固体) を得た (収率 61%)。



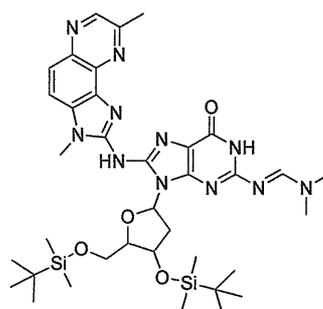
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.85 (br, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.90 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.69 – 6.60 (m, 3H), 4.64 – 4.58 (m, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.77 – 3.63 (m, 3H), 2.96 (s, 3H), 2.09 – 2.04 (m, 1H), 0.92 (s, 9H), 0.76 (s, 9H), 0.11 (s, 3H), 0.10 (s, 3H), -0.09 (s, 3H), -0.12 (s, 3H).

MS (ESI+) $m/z = 707 [M + H]^+$

4) dG-N²-dimethylaminomethylene-C⁸-MeIQx-3',5'-diTBDMS (13) の合成

53.4 mg の化合物 18 を 1 ml の DMF に溶解し、さらに DMF-DMA 2ml を添加した。反応液を室温下 1.5 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣

を少量の dichloromethane に溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した。56.8 mg の化合物 13 (黄色固体) を得た (収率 98%)。



¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.48 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 7.97 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.67 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.68 (dt, $J = 6.1, 3.0$ Hz, 1H), 3.88 – 3.78 (m, 2H, b5), 3.75 (s, 3H), 3.74 – 3.67 (m, 1H), 3.51 – 3.46 (m, 1H), 3.15 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 2.81 (s, 3H), 2.13 – 2.09 (m, 1H), 0.93 (s, 9H), 0.83 (s, 9H), 0.14 (s, 6H), -0.01 (s, 3H), -0.02 (s, 3H).

MS (ESI+) $m/z = 762 [M + H]^+$

C. 結果と考察

1. dG-C8-AAF の合成

dG-C8-AAF の合成ルートを Scheme 1 に示す。6 位の保護基は化合物の構造や実験環境によって適用可能な反応条件が異なること、グアニン塩基上の N は Buchwald-Hartwig 反応には不活性であることから (後述)、6 位保護基は省略可能であると考えた。具体的には dG を出発原料とし、8 位 Br 化、3',5'位 TBDMS 保護、2 位 DMTr 保護、次に Buchwald-Hartwig 法により、8 位 Br 基に 2-aminofluorene を導入した化合物 5 を合成し、さらにその 8 位にアセチル基を導入 (6) し、2 位保護基の iPrPac 基へのかけかえ (7→8) を行った後にホスホロアミダイト体 (11) へ導く計画であった。しかしながら、8 位のアセチル基の導入に難航した。アセチル基の導入は文献²⁾を参考にし、ピリジン溶媒中、無水酢酸、トリエチルア