

厚生労働行政推進調査事業補助金
循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策研究事業
分担研究報告書

アルデヒドによる付加体の形成と種々の毒性発現のメカニズム

研究分担者 中村 純 大阪府立大学

研究要旨

加熱式および電子タバコのエアロゾルにはホルムアルデヒド (FA) およびアセトアルデヒド (AA) などのカルボニル化合物が検出される。そのカルボニル化合物が脂質過酸化に由来するマロンジアルデヒド (MDA) と複雑に反応してハイブリッド型 (1,4-dihydropyridine [DHP] 型) リジン付加体および DNA 付加体が産生されることをわれわれはこれまでに明らかにしてきた。2020 年度の研究では、FA および AA が細胞膜の構成成分であるリン脂質に DHP 型付加体をつくる可能性を検討した。アミノ基を持つリン脂質 (アミノリン脂質) のホスファチジルエタノールアミン (PE) およびその頭部のエタノールアミンをそれぞれ MDA の存在下で FA あるいは AA と 37°C にて反応させた。その結果、M2FA-/M2AA-リジン付加体と同質の蛍光波長および吸光度を示す物質が検出された。さらに、PE に検出された付加体はホスホリパーゼ D あるいは強酸による加水分解によりエタノールアミン付加体として検出されることが明らかになった。新たに検出された M2FA-/M2AA-PE 付加体が膜の特性、膜輸送体、チャネル、受容体、および酵素の機能の変調などに影響することで細胞死ならびに免疫細胞の活性化を引き起こす可能性が考えられる。また、アルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) が動物レベルで組織内の高濃度の FA の解毒に関与している可能性を示唆する結果をマウスを用いて報告した。東アジア人の約 50% が ALDH2 の低機能変異体であるドミナントネガティブ ALDH2*2 対立遺伝子を持っており、ALDH2*1/*2 (ヘテロ型) の ALDH2 機能は野生型と比較して FA の解毒機能が著しく低い。低活性型 ALDH2*2 アレルを持つ人が加熱式および電子タバコのエアロゾルに含まれる高濃度の FA および AA に暴露された場合、野生型のアレル (ALDH2*1/*1) のみを持つ人に比べ FA に起因した呼吸器毒性が強くなる可能性について今後の検討が必要と考えられる。

A. 目的

電子タバコと加熱式タバコ製品のエアロゾルから種々のカルボニル化合物が検出される[1]。これらのカルボニル化合物はプロピレングリコール (PG) およびグリセロール (VG) が加熱されることにより産生される。カルボニル化合物は、生体内の高分子 (DNA およびタンパク質など) に直接反応し付加体を形成する[2]。さらに、電子タバコと加熱式タバコ製品のエアロゾル内に存在するラジカル、重金属、および多環芳香族炭化水素 (PAH) などが呼吸器の中で酸化ストレスを惹起する[3]ことによって脂質過酸化が引き起こされ、マロンジアルデヒド (MDA) を

含む内因性の反応性アルデヒドの形成をもたらす。

われわれはこれまでに、電子タバコと加熱式タバコ製品のエアロゾル中に含まれるホルムアルデヒド (FA) あるいはアセトアルデヒド (AA) が MDA と反応することにより抗原性の高い炎症性 1,4-ジヒドロピリジン (DHP) タイプの付加体 (M2FA あるいは M2AA) を蛋白および DNA に作ることを明らかにした。そこで 2020 年度は、細胞膜の構成成分であるアミノ基を持つリン脂質 (アミノリン脂質) にも同様の付加体ができるか否か、さらにその検出法の検討を行った。

また、FA の生体内における毒性学的影響に及ぼすアルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) の重要性に関してノースキャロライナ大学 (米国) と共同研究を実施した。ALDH2 の主たる基質はアルコール飲料に含まれるエタノールが代謝される時に大量に産生される AA である。ALDH2 はその AA を酢酸塩に代謝、無害化する。ALDH2 には、一塩基多型 (ALDH2*2) が存在し、特に日本を含めた東アジア諸国の人口の約 50% で不活性型の ALDH2*2 のアレルを持つ人がいる。ALDH2 は試験管内で FA の代謝にも関与していることが報告されていることから、われわれは FA の主たる代謝酵素であるアルコール脱水素酵素 5 (Adh5) に加え Aldh2 を共に欠損したマウスを作製し、Aldh2 の FA 代謝の重要性を生体レベルで検討を行った。

さらに、加熱式タバコ製品から産生されるエアロゾル中に存在するブタジエン (BD) のヒトにおける主たるエポキシ化代謝物である 3,4-epoxybutan-1,2-diol (EBD) の新たな遺伝毒性メカニズムを明らかにした。EBD は一つのエポキシ基と二つの水酸基 (ジオール) を持つ化合物である。同様の化合物は加熱式タバコ製品からのエアロゾル中に検出されるグリシドールがある。EBD およびグリシドールはエポキシ基を一つ持つことから一官能基化合物と考えられている。しかし、EBD がさらにアルコール脱水素酵素による代謝を受け、二つの水酸基のうちの一つがアルデヒド基に代わることで 2 官能基型の化合物となり、鎖間架橋を引き起こす可能性がある。そこで、DT40 細胞を用いた遺伝毒性検出法を使い、BD の 3 種のエポキシ化代謝体の遺伝毒性のメカニズムを比較する研究を実施した。

A. 方法

FA/AA による DHP 型リン脂質付加体の形成

FA および AA を、37°C で PBS 中にて MDA とエタノールアミン (EA) とを反応させた。反応液は HPLC-ダイオードアレイ検出器 (DAD) を用い分析し、いくつかのピークを分離した。さらに UV 吸収スペクトルと蛍光特性の両方をもとに DHP-EA 付

加体と思われるピークを精製した。また、同様に FA および AA を、37°C でクロロフォルム/水 (1/1) 中にて MDA とジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) とを反応させた。修飾された DPPE は 1 あるいは 10N の塩酸または 1N の水酸化カリウムを用いて加水分解し、EA 付加体を解離させた。また、ホスホリパーゼ D (PL-D) を用いて同様に DPPE から EA 付加体を加水分解させた。その後、上述と同様に HPLC-DAD 法にて DHP-EA を検出した。

FA に対する感受性と ALDH2 機能

細胞内の FA は、主に細胞質中の ADH5 によって解毒される (図 1)。その ADH5 酵素のバックアップメカニズムとして機能すると考えられている代謝経路としてミトコンドリアに分布する ALDH2 の存在が提案されている。しかし、ALDH2 の FA の解毒に関する *in vivo* における重要性はほとんどわかっていない。そこで、我々はマウスを用いて FA 代謝の主要経路と代償経路の両方の遺伝子を欠損させた。すべてのマウス実験は、ノースキャロライナ大学動物実験施設の施設内動物管理使用委員会の審査委員会によって承認され実施された。マウスは、病原体のない、温度および光が制御された動物施設に、12 時間の明/暗サイクルで飼育され、標準的な餌と水が自由に与えられた。C57BL/6J バックグラウンドの *Aldh2 ko* マウス[4]および *Adh5 ko* マウス[5]を入手した。*Aldh2^{-/-}/Adh5^{-/-}* マウスを交配することにより、*Aldh2/Adh5 double ko (dko)* マウスの樹立を試みた。

エポキシ基と水酸基の両方持つ化合物が代謝によりアルデヒド基を持つ 2 官能基代謝体となり遺伝毒性を惹起する新たなメカニズムについて

DT40 細胞と DT40 細胞由来の一連の DNA 修復遺伝子変異細胞を使用した 96 穴プレートベースの遺伝毒性検出アッセイを実施した[6,7]。浮遊細胞 (ウェルあたり 75 μ l 中に約 1200 細胞を浮遊) を 96 穴プレートに播種し、BD のエポキシ化代謝物に曝露した。使用した被験物質を滅菌

1XPBS で段階希釈し、適切な濃度を得た。化学物質への暴露後、細胞は約 7~8 細胞周期の間分裂させた。次に、細胞生存率を XTT アッセイで測定した。プレートリーダーを使用し吸光度を測定後、GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA) を用いて 50%致死濃度 (LC₅₀) の定量を行った。さらに、野生型と DNA 修復欠損変異細胞を比較するため、相対 LC₅₀ を算出した。

B. 結果および D. 考察

FA/AA による DHP 型リン脂質付加体の形成

脂質過酸化は MDA や 4-hydroxynonenal (4-HNE) などのアルデヒドを産生し、そのアルデヒドが DNA や蛋白 (システイン、リジン、ヒスチジン) などの求核部位に共有結合することで付加体を形成する。これまでに、アルデヒドによる DNA や蛋白の修飾が生ずる生物学的影響についても研究されてきている [8]。一方、反応性が高いアルデヒドがホスファチジルエタノールアミン (PE) などのアミノリン脂質 (図 2) の求核部位に共有結合 (マイケルおよびシッフ塩基付加物を形成) する結果生ずる付加体については報告されてはいるものの、その病態生理学的影響はほとんど理解されていない。細胞膜および膜貫通タンパク質の機能における膜脂質である PE の重要な役割を考えると、その修飾が細胞内のさまざまなプロセスに影響を与えることが考えられる。アルデヒド-PE 付加物が膜の特性、膜輸送体、チャネル、受容体、および酵素の機能の変調などに影響することで細胞死ならびに免疫細胞の活性化を引き起こす可能性は容易に想像できる。さらに、PE 代謝の障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、非アルコール性肝疾患などの多くの慢性疾患や、アテローム性動脈硬化症、インスリン抵抗性、肥満などの生活習慣病に関与している。これらの疾患はこれまでわれわれが行ってきた M2FA-/M2AA-リジン付加体に起因す

ると考えられる疾患とオーバーラップすることも興味がある。

これまで α , β -不飽和アルデヒド (4-HNE など) と PE との反応によりさまざまな付加物が形成されることが報告されている。一方、脂質過酸化により生ずる主たるアルデヒドである MDA が PE ヘッドグループを修飾し、複雑な付加体を生成することが報告されている。たとえば、MDA と特定の PE とのインキュベーションにより、ジヒドロピリジン型の PE (DHP-PE : M2AA-PE) が試験管内において生成されることが明らかになっている [9]。

先行研究では、*in vitro* の実験において MDA と単一の構造の PE を反応させ、修飾された PE を HPLC を用いて分離し、DHP-PE 付加体の質量解析を実施している。しかし、細胞内には様々な種類の PE 分子 (脂肪酸の構造が異なる PE) が存在することから、DHP-PE の総量を測定するにはさらに検討が必要であった。そこで、アルデヒドによって修飾された PE の頭部構造の EA をリン酸部位から解離させた後、分離解析する方法が必要であると考えた。

まず、PE の 1 つである DPPE (図 3) を MDA の存在下で FA あるいは AA と 37°C にて反応させた。反応液はリジン、MDA、および FA あるいは AA との反応と同様に黄色となり (図 3)、DHP-リジンの励起波長に近い 365nm の波長で蛍光性の物質が検出された。このことから、DHP 型の付加体 (DHP-DPPE) が産生されている可能性が考えられた (図 3)。DHP-DPPE からアルデヒドによって修飾された EA を切り出す方法には、ホスホリパーゼ D (PL-D)、強塩基あるいは強酸による加水分解がある。切り出される可能性がある DHP-EA には FA によって作られる可能性のある M2FA-EA および AA による M2AA-EA が考えられる (図 3)。そこで、EA を MDA の存在下で FA あるいは AA とインキュベーションを行い DHP-EA が検出されるかを確認した。生理食塩水を用いて EA を MDA の存在下で FA ないしは AA を 37°C にて反応させ、その反応液中に DHP-EA が存在するか否かを HPLC-DAD

を用いて確認した。その結果、UV 吸光度スペクトラムをもとに M2FA-EA および M2AA-EA と考えられるピークが検出された (図4)。さらに、365nmの波長で蛍光性が検出されたことから、M2FA-EA および M2AA-EA がそれぞれ分離されたものと考えられた。

DHP-EA の強酸および強塩基の耐性を調べたところ、強酸にはある程度の安定性を認めたが、強塩基によって不安定な性状が確認できた。そこで、DHP-DPPE からの DHP-EA の解離反応には PL-D による酵素反応あるいは強酸による加水分解を用いることとした。次に、M2FA-DPPE および M2AA-DPPE を PL-D 処理あるいは強酸処理した反応液を HPLC による分析にかけたところ、精製された M2FA-EA および M2AA-EA のピークと同じ保持時間にピークを検出できたことから、これらの加水分解処理により DHP-EA が DHP-PE から切断可能であることが明らかになった (図4)。今後さらに検討を加え、定量的な解析ができるよう研究を続ける。

FA に対する感受性と ALDH2 機能

細胞内に存在する FA は、主に細胞質中の ADH5 ($K_m = 0.12-6.5 \mu M$) によって解毒される (図1)。その ADH5 酵素のバックアップメカニズムとして機能する代謝経路としてミトコンドリアの ALDH2 ($K_m = 170-400 \mu M$) の存在が提案されている。しかし、ALDH2 の FA の解毒に関する *in vivo* における重要性はほとんどわかっていない。そこで、我々は FA 代謝の主要経路と代償経路の両方の遺伝子を欠損させた (*Adh5/Aldh2 dko*) マウスの作製を試みた。

Adh5/Aldh2 dko マウスは、生後 21 日を過ぎて生存することはほとんどなく、非常にまれなケースとして、*Adh5/Aldh2 dko* マウスが生後 25 日まで生存した [10]。*Adh5/Aldh2 dko* マウスの体重は、*Aldh2*^{-/-}/*Adh5*^{+/-} および *Aldh2*^{-/-}/*Adh5*^{+/+} マウスの約 37% 程度にすぎなかった (図 5A および B)。この結果に基づくと、*Adh5/Aldh2 dko* 動物は、部分的な合成致死性または致死性の表現型を示していることが考えら

れる。この致命的な影響は ADH5 と ALDH2 の両方を不活性化することにより、マウスの胎児または新生児に内因性 FA が蓄積した可能性が高い。

われわれの論文が発表されてから 6 か月後に英国ケンブリッジ大学および京都大学の研究グループが共同して実施した研究の報告から、*Adh5/Aldh2 dko* マウスの諸臓器に FA 由来の DNA 付加物が単独の遺伝子欠損マウスより著しく増加していることが報告されている [11]。一方、AA 由来の DNA 付加体の増加は認められていない。

これらの研究の重要な点は、FA 解毒に関与する 2 つの主要な代謝経路の同時破壊が、マウスの胎児期および出生後早期に部分的な合成致死性をもたらすことである。東アジア人の約 50% が ALDH2 の低機能変異体であるドミナントネガティブ ALDH2*2 対立遺伝子を持っており、ALDH2*1/*2 (ヘテロ型) の ALDH2 機能は ALDH2*1/*1 (野生型) と比較して 8% 未満であると報告されている [16]。ALDH2*1/*2 の遺伝子型のヒト肝臓ミトコンドリアにおける FA の ALDH 活性は、野生型 (ALDH2*1/*1) の ALDH 活性の約 30% であると報告されている [12]。したがって、ALDH2*2 アレルを持つヒトでは、電子タバコと加熱式タバコ製品のエアロゾールに含まれる FA および AA の影響が野生型のヒトより強くでる可能性があると考えられる。(図 6)。今後、ALDH2*2 対立遺伝子を持つヒトに注意をはらった疫学調査が必要と思われる。

エポキシ基と水酸基の両方を持つ化合物である BD 代謝物の遺伝毒性の新たなメカニズムについて

BD は燃焼たばこ煙および加熱式たばこのエアロゾールなどにも含まれるヒトの既知発癌性物質である。BD は二つの炭素-炭素二重結合をもつ化合物である。ヒトでは、主として CYP2E1 などによって 1 つ炭素-炭素二重結合がエポキシ化されて (図7)、さらにミクロゾームエポキシドヒドロラーゼ (mEH) によって加水分解される。さらに、CYP2E1 などによって、もう一つの炭素-炭素二重結合が

エポキシ化されることでエポキシ基と水酸基の両方持つ EBD が生成される。われわれは、最近、この 1 官能基（エポキシ化）化合物である EBD があたかも 2 官能基様のクロスリンク型の遺伝毒性を引き起こすことを明らかにした[13]。EBD は他の BD 由来のエポキシ化代謝体と比べて最も弱い遺伝毒性を示すヒトの BD エポキシ化代謝体と考えられている。その一方で、EBD はヒトの体内で最も高濃度存在するエポキシ化代謝体でもある。EBD を DT40 ミュータント細胞を用いた遺伝子毒性アッセイ[14]にかけたところ、FA 暴露で認められた結果[7]と類似した現象が観察された。特に DNA 鎖間架橋を修復するファンconi貧血 (FANC) 関連遺伝子のミュータントの感受性が高い結果が得られた。この結果は、EBD が代謝過程において鎖間架橋をつくる代謝物ができる可能性を示唆するものである。

水酸基を持たない一官能基エポキシ化代謝物の 3,4-エポキシ-1-ブテン (EB) は FANC 欠損細胞において高感受性を示すことはない。すなわち、1 個のエポキシ基とジオールがそろった時にクロスリンク型の遺伝毒性を示す。細胞質に存在するアルコール脱水素酵素は一級および二級アルコールの酸化反応を触媒する。1,2-diol を持つ EBD と類似した構造をもつ BD 代謝物の 1-ブテン-3,4-ジオール (BDD) は細胞質 ADH が作用した場合、C-2 にカルボニル基をもつ HMVK と C-1 にカルボニル基を持つ HBAL が作られる[15]。可能性として、1,2-ジオールをもつ EBD が細胞質に存在する ADH により C-1 あるいは C-2 にカルボニル基ができることで EBD 分子のエポキシ基と合わせて 2 官能基をもち、DNA 鎖間架橋ができる可能性が考えられた。EBD に類似した構造のグリシドールはエポキシ基と水酸基の両方持つ化合物である。グリシドールは加熱式タバコや電子タバコの保湿剤が過熱されることによりエアロゾル内に産生される化合物である。このグリシドールはこれまで 1 官能基化合物と考えられてきているが、EBD と同じように ADH により水酸基がアルデヒドとなることで 2 官能基化

合物になり、鎖間架橋の形成を含めた強い遺伝毒性を引き起こす可能性がある。

E. 結論

加熱式および電子タバコのエアロゾルには種々のカルボニル化合物が含まれる。カルボニル化合物の中でもヒトにおける発癌性が証明されている FA および AA は 1 ないし 2 個の炭素からなる反応性が高いアルデヒドである。これら FA/AA は酸化ストレス下で多種多様な炎症性ハイブリッド型 (M2FA/M2AA) リジン付加体および DNA 付加体を産生することを明らかにしてきた。今回、蛋白および DNA に加え、細胞膜成分であるアミノ基を持つリン脂質のひとつである PE についても M2FA/M2AA が付加することを明らかにした。修飾された PE は細胞膜の特性、膜輸送体、受容体、および酵素の機能の変調などに影響を及ぼす可能性があり、細胞死ならびに細胞死に付随して免疫細胞の活性化を引き起こす可能性がある。

過剰な FA を ALDH2 が解毒する可能性があることをマウスの実験により明らかにした。この結果から、不活性型 ALDH2*2 アレルを持った人が加熱式および電子タバコのエアロゾルに含まれる高濃度の FA に暴露された場合、野生型のアレルのみを持つ人に比べ FA に起因した呼吸器毒性を強く示す可能性がある。ALDH2*2 アレルを持つヒトに関する疫学調査が今後必要と思われる。

引用文献

1. Uchiyama S, Noguchi M, Sato A, Ishitsuka M, Inaba Y, Kunugita N. Determination of Thermal Decomposition Products Generated from E-Cigarettes. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2020;33:576–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31950825>
2. Nakamura J, Nakamura M. DNA-protein crosslink formation by endogenous aldehydes and AP sites. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. Elsevier B.V.; 2020 [cited 2020 Mar 12];88:102806. Available

- from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32070903>
3. Menicagli R, Marotta O, Serra R. Free Radical Production in the Smoking of E-Cigarettes and their Possible Effects in Human Health. *Int J Prev Med* [Internet]. 2020;11:53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32577183>
 4. Kitagawa K, Kawamoto T, Kunugita N, Tsukiyama T, Okamoto K, Yoshida A, et al. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidation of methoxyacetaldehyde; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh2 gene targeting mouse. *FEBS Lett* [Internet]. 2000 [cited 2020 Mar 12];476:306–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913633>
 5. Liu L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, et al. Essential Roles of S-Nitrosothiols in Vascular Homeostasis and Endotoxic Shock. *Cell*. Cell Press; 2004;116:617–28.
 6. Hashimoto K, Sharma V, Sasanuma H, Tian X, Takata M, Takeda S, et al. Poor recognition of O6-isopropyl dG by MGMT triggers double strand break-mediated cell death and micronucleus induction in FANC-deficient cells. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget%0Awww.impactjournals.com/oncotarget/
 7. Ridpath JR, Nakamura A, Tano K, Luke AM, Sonoda E, Arakawa H, et al. Cells deficient in the FANC/BRCA pathway are hypersensitive to plasma levels of formaldehyde. *Cancer Res*. 2007;67:11117–22.
 8. Zarkovic N, Cipak A, Jaganjac M, Borovic S, Zarkovic K. Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *J Proteomics* [Internet]. 2013;92:239–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23438936>
 9. Guo L, Chen Z, Amarnath V, Davies SS. Identification of novel bioactive aldehyde-modified phosphatidylethanolamines formed by lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2012;53:1226–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22898174>
 10. Nakamura J, Holley DW, Kawamoto T, Bultman SJ. The failure of two major formaldehyde catabolism enzymes (ADH5 and ALDH2) leads to partial synthetic lethality in C57BL/6 mice. *Genes Environ* [Internet]. 2020 [cited 2020 Jun 16];42:21. Available from: <https://genesenvironment.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41021-020-00160-4>
 11. Dingler FA, Wang M, Mu A, Millington CL, Oberbeck N, Watcham S, et al. Two Aldehyde Clearance Systems Are Essential to Prevent Lethal Formaldehyde Accumulation in Mice and Humans. *Mol Cell* [Internet]. 2020;80:996-1012.e9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33147438>
 12. Wang R-S, Nakajima T, Kawamoto T, Honma T. Effects of aldehyde dehydrogenase-2 genetic polymorphisms on metabolism of structurally different aldehydes in human liver. *Drug Metab Dispos* [Internet]. 2002 [cited 2020 Mar 12];30:69–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744614>
 13. Nakamura J, Carro S, Gold A, Zhang Z. An unexpected butadiene diolepoxide-mediated genotoxicity implies alternative mechanism for 1,3-butadiene carcinogenicity. *Chemosphere* [Internet]. 2021;266:129149. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33310515>
 14. Ridpath JR, Takeda S, Swenberg JA, Nakamura J. Convenient, multi-well plate-based DNA damage response analysis using DT40 mutants is applicable to a high-throughput genotoxicity assay with characterization of modes of action. *Environ Mol Mutagen*. *Environ Mol Mutagen*; 2011;52:153–60.
 15. Powley MW, Walker VE, Li Y, Upton PB, Swenberg JA. The importance of 3,4-epoxy-1,2-butanediol and hydroxymethylvinyl ketone in 3-butene-1,2-diol associated mutagenicity. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2007;166:182–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279707000336>

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (4 件)

(1) Nakamura J, Holley DW, Kawamoto T, Bultman SJ. The failure of two major formaldehyde catabolism enzymes (ADH5 and ALDH2) leads to partial synthetic lethality in C57BL/6 mice. *Genes Environ.* 2020 Jun 3;42:21. PMID: 32514323.

(2) Tian S, Nakamura J, Hiller S, Simington S, Holley DW, Mota R, Willis MS, Bultman SJ, Luft JC, DeSimone JM, Jia Z, Maeda N, Yi X. New insights into immunomodulation via overexpressing lipoic acid synthase as a therapeutic potential to reduce atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2020 Oct-Nov;133-134:106777. PMID: 32750408.

(3) Nakamura J. Potential Doxorubicin-Mediated Dual-Targeting Chemotherapy in FANC/BRCA-Deficient Tumors via Modulation of Cellular Formaldehyde Concentration. *Chem Res Toxicol.* 2020 Oct 19;33(10):2659-2667. PMID: 32876438.

(4) Nakamura J, Carro S, Gold A, Zhang Z. An unexpected butadiene diolepoxide-mediated genotoxicity implies alternative mechanism for 1,3-butadiene carcinogenicity. *Chemosphere.* 2020 Nov 30;266:129149. PMID: 33310515.

2. 学会発表 (3 件)

(1) Nakamura J, Carro S, Gold A, Zhang Z. Unexpected 3-Butene-1,2-Diol-Mediated Genotoxicity Implies Alternative Mechanism of 1,3-Butadiene Carcinogenesis. *Environmental Mutagenesis & Genomics Society Virtual Annual Meeting* 2020 年 9 月

(2) 中村純, Carro S, Gold A, Zhang Z. エポキシブタンジオールの遺伝毒性の解析により明らかになったブタジエンの新たな発癌メカニズム。日本環境変異原学会、年次大会 O4-1 2020 年 11 月

(3) 中村純 ホルムアルデヒド/アセトアルデヒドにより産生される蛍光性付加体と免疫反応。日本分子生物学会年会、フォーラム、環境因子と生体防御機構をイメージする！ 2020 年 12 月

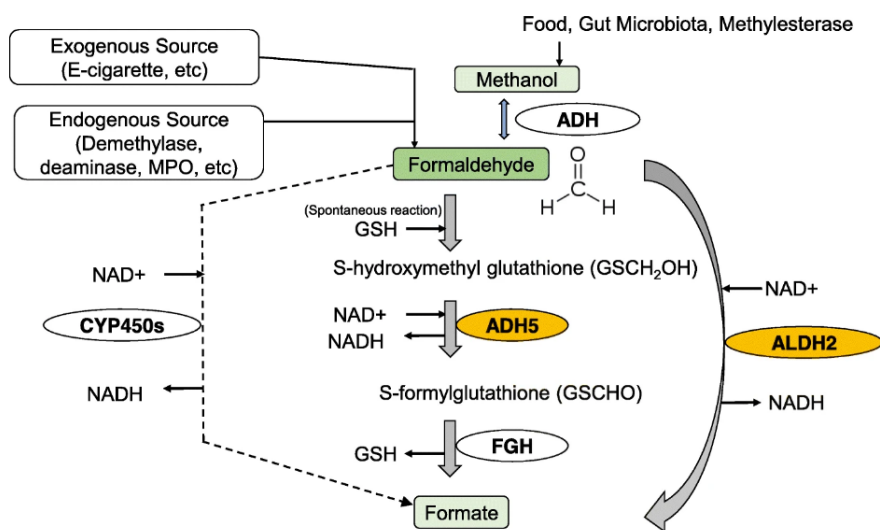
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

図1 ホルムアルデヒド代謝。



ホルムアルデヒド (FA) は主に ADH5 経路を介して無害化される。FA は非酵素的に GSH に結合し、ADH5 によって酸化され、さらに FGH によってギ酸に代謝される。ALDH2 は、ADH5 依存性解毒システムのバックアップ酵素として存在する。

図2 FA と脂質過酸化由来の MDA と生体内高分子との想定される不可逆的反応

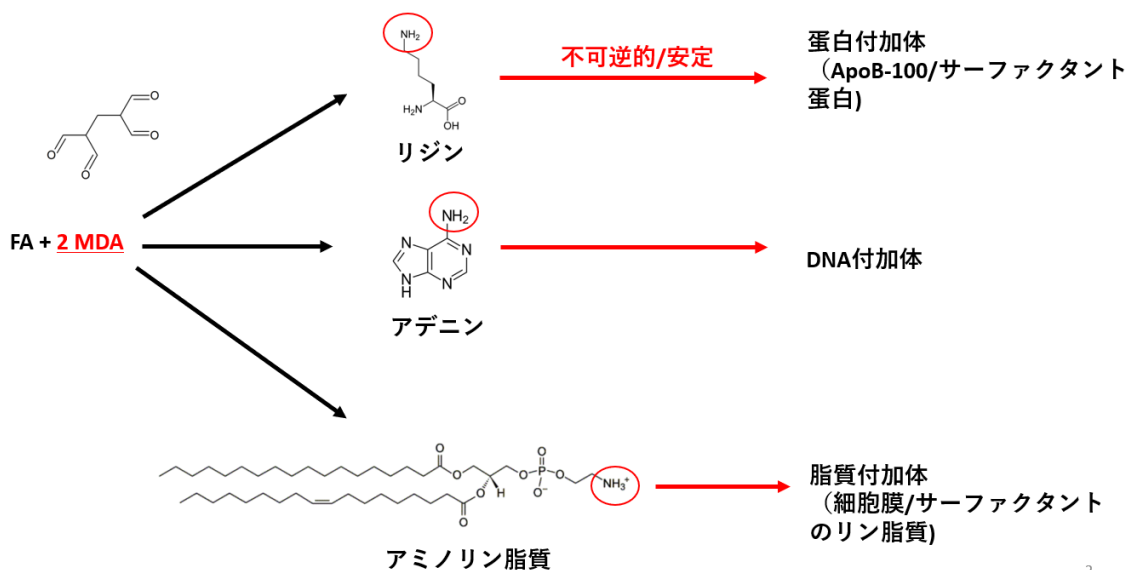


図3 アミノリン脂質に作られる DHP 型付加体

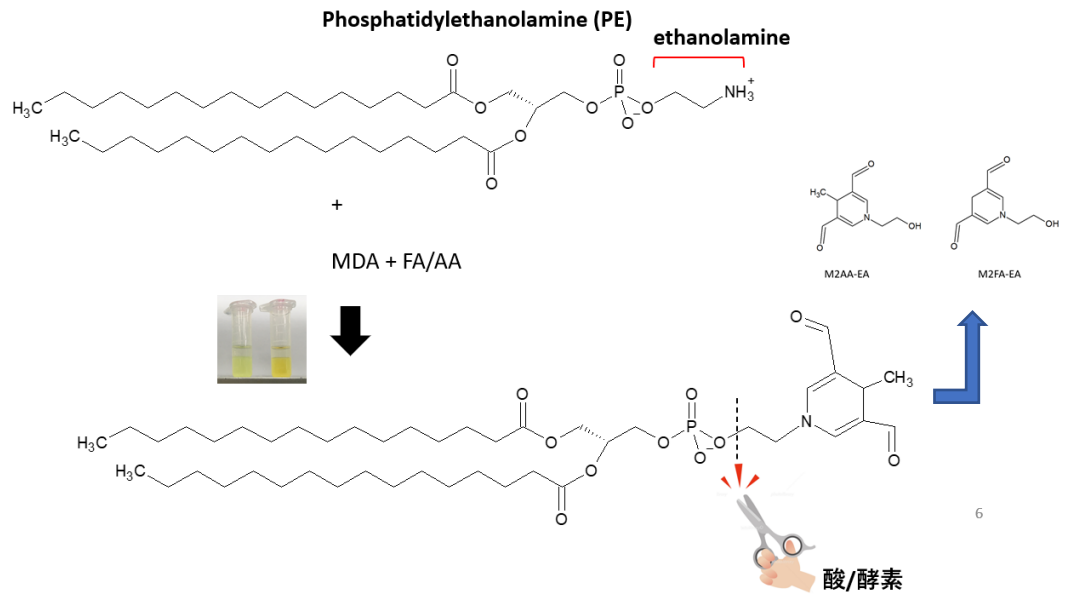
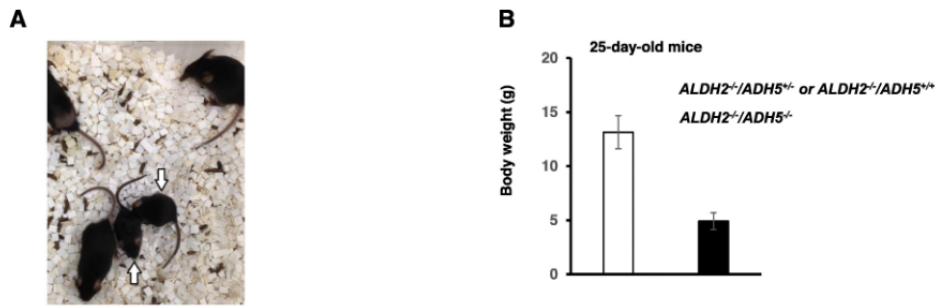


図4 精製された M2FA-EA と M2FA-DPPE から加水分解された M2FA-EA

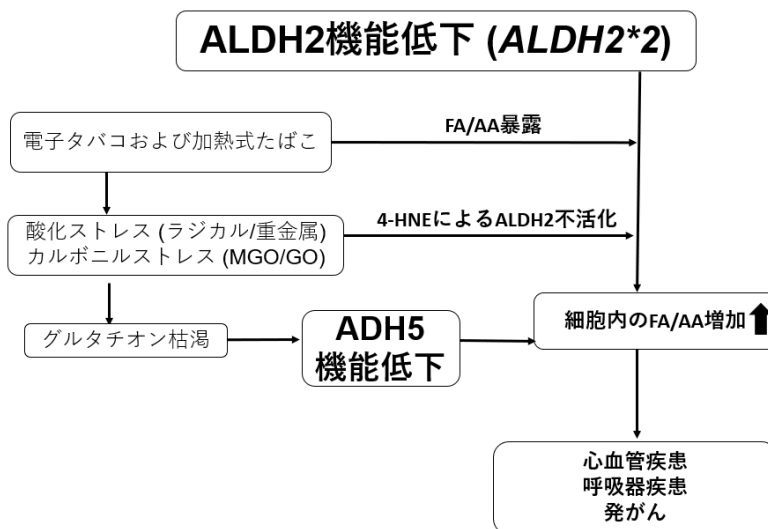


図5 Aldh2^{-/-} Adh5^{-/-}マウスの一般的な外観、体重および臓器重量。



A. ケージ内の 25 日齢の *Aldh2*^{-/-} *Adh5*^{-/-} マウス (白い矢印) および *Aldh2*^{-/-} *Adh5*^{+/-} および *Aldh2*^{-/-} *Adh5*^{+/+} マウスの一般的な外観。**B.** *Aldh2*^{-/-} *Adh5*^{-/-} マウス (n = 2) および *Aldh2*^{-/-} *Adh5*^{+/-} および *Aldh2*^{-/-} *Adh5*^{+/+} マウス (n = 3) の体重 (平均 ± SD)。

図 6 *ALDH2**2 対立遺伝子を持つ個人の内因性ホルムアルデヒドによって引き起こされる可能性のある人間の病気の仮説的なメカニズム。



加熱式タバコのエアロゾルに含まれる化合物は *ALDH2**2 アレルを持つ日本人の FA/AA の解毒に大きな負荷をかける。さらに、グルタチオンの枯渇を介した *ADH5* の FA 解毒経路の障害を引き起こし、細胞内の FA 濃度を増加する可能性がある。

図 7 1,3-ブタジエン (BD) の代謝活性化経路および EBD の代謝活性化による鎖間架橋形成の仮説スキーム。

