

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

レポーター遺伝子導入動物を用いたクロロプロパノール類の発がん機序の解明

分担研究報告書

LC-MS/MSによる網羅的DNA損傷解析を用いた1,3-DCPの遺伝毒性機序の検索

研究分担者： 石井 雄二（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長）

研究要旨

本研究において明らかになった 1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP) の突然変異誘発性について、その機序の解明を目的として突然変異の原因となる DNA 損傷の検索を行った。遺伝毒性・発がん性包括試験における対照群及び 1,3-DCP 240 mg/L 投与群のラット肝臓について、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた網羅的 DNA 損傷解析を行った結果、DNA アダクトームマップにおいて 1,3-DCP に特異的な DNA 付加体由来するスポットは検出されなかった。in vitro において 1,3-DCP と deoxyguanosine の反応を検討した結果、1,3-DCP の代謝物と考えられている epichlorohydrin から生じる 7-(3-chloro-2-hydroxypropyl) guanine (CHP-N7-Gua) の生成が確認された。in vivo における同付加体の形成を確認するため、LC-MS/MS による分析法を構築し、DNA の前処理法を検討した。対照群及び 1,3-DCP 240 mg/L 投与群のラット肝臓から抽出した DNA を 95°C、15 分でインキュベーション後、脱離した CHP-N7-Gua を LC-MS/MS で測定した結果、同付加体のピークは検出されなかった。以上より、1,3-DCP の突然変異誘発機序において epichlorohydrin を介して生じる CHP-N7-Gua の関与は乏しいと考えられた。

A. 研究目的

1,3-Dichloro-2-propanol (1,3-DCP) は主に植物性たん白の酸加水分解で生じるクロロプロパノール類の一つで、大豆たんぱくを加水分解して製造する調味料や、チーズ、穀加工品などに含まれる。本剤はラットの肝臓、腎臓、甲状腺及び舌等に発がん性を示すことが報告されている。また、in vitro 遺伝毒性試験はいずれも陽性であることから、その発がん性には遺伝毒性機序の関与が疑われるものの、in vivo におけるラット骨髄小核試験及びラット肝 UDS 試験が陰性であることから、決定的な確証は得られていない。一方、令和元年及び2年において本研究で実施した *gpt delta* ラットを用いた中期発がん評価系による 1,3-DCP の遺伝毒性及び発がんプロモーション作用の検索において、1,3-DCP がラット肝臓で突然変異を誘発することが明らかとなり、肝

発がん過程における遺伝毒性機序の関与が明らかになった。そこで本研究では、1,3-DCP の遺伝毒性機序について検討した。

DNA 損傷は化学発がん課程における最も早期のイベントであり、原因となる DNA 損傷の解明は、発がん課程の理解だけでなく、バイオマーカーとしての応用も期待される^{文献 1)}。DNA 損傷の研究には放射性同位体を用いたポストラベル法が使用されていたが^{文献 2,3)}、近年では検出感度の向上に伴い質量分析計を用いた検出例が数多く報告されている^{文献 4,5)}。また、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた網羅的 DNA 損傷解析は、deoxynucleoside が MS/MS のフラグメンテーションにおいて容易に deoxyribose を脱離する特徴を利用し、deoxyribose に由来する m/z 116 の差を生じる分子を網羅的に検出することから、未知の DNA 損傷の検索に有用である^{文献 6,7)}。

本年度は *gpt delta* ラットを用いた包括的

毒性試験において 1,3-DCP を 13 週間投与したラット肝臓について、LC-MS/MS を用いた網羅的 DNA 損傷解析を行った。また、*in vitro* における 1,3-DCP と deoxyguanosine (dG) の反応で生じる DNA 付加体を検索し、生成が確認された 7-(3-chloro-2-hydroxypropyl) guanine (CHP-N7-Gua) について、分析法の構築とラット肝臓での検出を試みた。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

1,3-DCP, dG 及び deoxyribonucleic acid from calf thymus は sigma-aldrich (東京) から購入した。Epichlorohydrin は東京化学工業(東京)から購入した。LC-MS 用蒸留水, acetonitrile 及び formic acid は関東化学 (東京) から入手した。

B-2. 網羅的 DNA 損傷解析

令和元年度及び 2 年度に実施した *gpt delta* ラットを用いた 1,3-DCP の包括的毒性試験において採取した肝臓を解析に供した。対照群及び 240 mg/L 投与群の肝臓から、和光純薬社製 DNA エキストラクター WB キットを用いて抽出した DNA を 100 µg に調整し、Tris-HC (pH7.4) 及び DNase I を加えてインキュベーション (37°C, 3 hr) した。次に、Sodium acetate (pH4.2), ZnCl₂ 及び nuclease P1 を加えてインキュベーション (37°C, 3 hr) した。Tris-HCl buffer (pH9.0) を加えた後、alkaline phosphatase 及び phosphodiesterase I を加えインキュベーション (37°C, 16~18 hr) し、Vivacon 500R (10 kDa; Sartorius 社製) 及び Ultrafree (0.22 µm; Millipore 社製) でフィルトレーション後、LC-MS/MS による測定に供した。

LC-MS/MS は Agilent 社製 LC 1100 シリーズ及び Quattro Ultima Pt mass spectrometry system (Waters 社製) を用いた。カラムは関東化学社製 Mightysil RP-18GP (2.0 x 150 mm, 5 µm) を用いた。移動相は

溶液 A: 蒸留水 (0.001% formic acid 添加) と溶液 B: acetonitrile (0.001% formic acid 添加) の混液を流速 0.2 ml/min で送液し、カラムを溶液 A/B=99/1 で安定させた。グラジエント条件は以下に記す。0-5 min: 溶液 A 99%, 5-10 min: 溶液 A 99% > 90%, 10-35 min: 溶液 A 90% > 10%, 35-45 min: 溶液 A 10%。MS/MS のイオン化にはエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) のポジティブイオンモードを用いた。その他の条件は以下に記す。Capillary voltage: 3 kV, cone voltage: 15 V, Collision energy: 15 eV, Source temperature: 120°C, Desolvation temperature: 400°C, Cone gas flow: 60 L/hr, Desolvation gas flow: 600 L/hr。検索質量範囲は m/z 250 ~ 650 とした。

B-3. 1,3-DCP と dG の *in vitro* 反応

10 mg/mL に調製した dG 溶液を Tris HCl (pH7.4), Sodium acetate (pH4.2) または Tri HCl (pH9.0) で 5 mg/mL に希釈し、1 mL に 1,3-DCP を 20 µL 加えて 37°C, 60 時間インキュベーションした。反応後、Ultrafree (0.22 µm; Millipore 社製) でフィルトレーションし、LC-MS/MS による測定に供した。

液体クロマトグラフィー/ダイオードアレイ検出器/タンデム質量分析計 (LC-DAD-MS/MS) は Agilent 社製 LC 1100 シリーズ及び Quattro Ultima Pt mass spectrometry system (Waters 社製) を用いた。カラムは関東化学社製 Mightysil RP-18GP (2.0 x 150 mm, 5 µm) を用い、移動相は溶液 A: 蒸留水 (0.1% formic acid 添加) と溶液 B: acetonitrile (0.1% formic acid 添加) の混液を流速 0.2 ml/min で送液し、カラムを溶液 A/B=99/1 で安定させた。グラジエント条件は以下に記す。0-5 min: 溶液 A 99%, 5-10 min: 溶液 A 99% > 90%, 10-35 min: 溶液 A 90% > 10%, 35-45 min: 溶液 A 10%。DAD の検出波長は 254 nm とした。MS/MS のイオン化には ESI 法のポジティブイオンモード及びネガティブイオンモードを用い、MS スキャン及び MS/MS スキャンを行

った。イオン化条件は以下に記す。Capillary voltage: 3 kV, cone voltage: 15 V, Collision energy: 5~30 eV, Source temperature: 120°C, Desolvation temperature: 400°C, Cone gas flow: 60 L/hr, Desolvation gas flow: 600 L/hr. 測定質量範囲は m/z 50~600 とした。

B-4. 7-(3-chloro-2-hydroxypropyl) guanine (CHP-N7-Gua) の合成と分析

10 mg/mL の deoxyguanosine 溶液に epichlorohydrin を 20 μ L 添加し, 37°C で 6 時間インキュベーションした。反応後, HPLC を用いて CHP-N7-Gua を分取し標準品を得た。

LC-MS/MS は Agilent 社製 LC 1100 シリーズ及び Quattro Ultima Pt mass spectrometry system (Waters 社製) を用いた。カラムは関東化学社製 Mightysil RP-18GP (2.0 x 150 mm, 5 μ m) を用いた。移動相は溶液 A: 蒸留水 (0.1% formic acid 添加) と溶液 B: acetonitrile (0.1% formic acid 添加) の混液を流速 0.2 mL/min で送液し, カラムを溶液 A/B=98/2 で安定させた。グラジエント条件は以下に記す。0-10 min: 溶液 A 98% > 80%, 10-15 min: 溶液 A 80% > 10%, 15-17 min: 溶液 A 10% > 98%, 17-30 min: 溶液 A 98%。MS/MS のイオン化には ESI のポジティブイオンモードを用いた。その他の条件は以下に記す。Capillary voltage: 3 kV, cone voltage: 25 V, Collision energy: 12 eV, Source temperature: 120°C, Desolvation temperature: 400°C, Cone gas flow: 60 L/hr, Desolvation gas flow: 600 L/hr. マルチリアクションモニタリング (MRM) で m/z 244 > 152 を検出した。

CHP-N7-Gua の DNA からの脱離条件を検討するため, 100 μ g/ml の Calf thymus DNA に epichlorohydrin 20 μ L を添加し, 37°C, 6 時間インキュベーションした。得られた DNA を①37°C で 12, 24 及び 48 時間, ②70°C で 0.5, 1, 2, 4 及び 6 時間, ③95°C で 0.25, 0.5, 1 及び 2 時間インキュベーションし, Amicon Ultra (3K,

Millipore 社製) でフィルトレーション後, LC-MS/MS による測定に供した。測定結果から CHP-N7-Gua 量が最大となるインキュベーション温度及び時間を設定した。

令和元年度及び 2 年度に実施した *gpt* delta ラットを用いた 1,3-DCP の包括的毒性試験において採取した肝臓を DNA 中 CHP-N7-Gua の測定に供した。和光純薬社製 DNA エキストラクター-WB キットを使用して抽出した DNA を 1 mg/ml に調整し, 400 μ L を 95°C, 15 分インキュベーションした。反応後, フィルトレーションし, ろ液 300 μ L を遠心濃縮装置 SpeedVac (Thermo Fisher 社製) を用いて乾固し, 30 μ L の蒸留水に再溶解し, LC-MS/MS による測定に供した。

C. 研究結果

C-1. LC-MS/MS を用いた網羅的 DNA 損傷解析

対照群及び 240 mg/L 投与群の肝臓の網羅的 DNA 損傷解析の結果から作製した DNA アダクトームマップを Figure 1 に示す。対照群, 1,3-DCP 投与群ともに複数の DNA 塩基に由来するスポットが検出されたものの, 1,3-DCP 投与群に特異的なスポットは検出されなかった。

C-2. 1,3-DCP と dG の *in vitro* 反応

1,3-DCP と dG を *in vitro* において種々の条件下で反応させた後, 反応液を LC-DAD で測定した結果, pH7.4 及び pH9.2 の条件下において約 18.5 分に未知のピークを検出した (Fig. 2)。同ピークについて LC-MS/MS を用いてポジティブイオンモード及びネガティブイオンモードで MS スキャン及び MS/MS スキャンを実施した。MS スペクトラムでは ESI+で m/z 244, ESI-で m/z 242 のイオンが認められたことから, その質量数は 243 と考えられた (Fig. 3)。また, MS/MS スペクトラムでは ESI+で m/z 152 のプロダクトイオンが, ESI-で m/z 150

のプロダクトイオンが検出された (Fig. 4). これらの結果から, unknown adduct は 1,3-DCP から Cl が脱離して guanine の N7 位に付加した CHP-N7-Gua と考えられた (Fig. 5).

C-3. CHP-N7-Gua の分析

Epichlorohydrin と dG の反応によって CHP-N7-Gua の標準品を合成し^{文献 8)}, 前項で示した未知ピークと一致することを確認した. 標準品を用いて LC 及び MS/MS 条件を検討し, 同付加体の分析法を構築した. さらに, CHP-N7-Gua の DNA からの脱離条件を検討するため, epichlorohydrin と DNA を反応させた後, 種々の条件下でインキュベーションを行った結果, 95°C, 15 分のインキュベーションによって脱離した CHP-N7-Gua のピーク面積が最大となった.

構築した LC-MS/MS による分析法を用いて, 対照群及び 1,3-DCP 投与群のラット肝臓 DNA の測定を行った結果, CHP-N7-Gua のピークは検出されなかった.

D. 考察

LC-MS/MS による網羅的 DNA 損傷解析は deoxyribose に由来する m/z 116 の差を生じる分子を網羅的に検出する方法である. 従って, 本法において 1,3-DCP による DNA 損傷が検出されなかったことは, 1,3-DCP による DNA 損傷が酵素処理過程において分解又は DNA から脱離することを示唆するものと考えられた.

1,3-DCP と dG の *in vitro* における反応を検討した結果, 中性又は塩基性条件下において epichlorohydrin から生じる DNA 付加体 CHP-N7-Gua の生成が確認された. 生体では 1,3-DCP の一部が代謝され epichlorohydrin を生じることが報告されている^{文献 9)}. 一方, *in vitro* 条件下においても CHP-N7-Gua が生成したことは, 1,3-DCP の分解によって epichlorohydrin が生じるこ

とを示唆していると考えられた. また, dG の N7 位のアルキル化は, Gua と deoxyribose の結合を減弱させることから, これらの付加体は容易に DNA から脱離する^{文献 10)}. それ故, 網羅的 DNA 損傷解析において CHP-N7-Gua を検出することは困難と考えられた.

一方, 構築した LC-MS/MS による CHP-N7-Gua の分析法を用いて 1,3-DCP を投与したラット肝臓から抽出した DNA を分析した結果, CHP-N7-Gua のピークは検出されなかった. このことから, 1,3-DCP の突然変異における CHP-N7-Gua の関与の可能性は乏しいと考えられた.

一般的に CHP-N7-Gua のように DNA から塩基が脱離すると DNA 鎖には AP-site が形成され, G:C-T:A transversion や欠失変異を生じることが知られている^{文献 11,12)}. 一方, 本年度の研究成果において, 1,3-DCP を投与した *gpt delta* ラットの肝臓及び腎臓では G:C-A:T transition が高頻度に認められた. これら変異スペクトラムの違いは 1,3-DCP の突然変異の原因が CHP-N7-Gua ではないことを支持するものと考えられた. 一方, 1,3-DCP の誘発する変異が G:C-A:T transition であったことは, dG に生じる付加体が突然変異の主な原因であることを示唆している. 1,3-DCP の突然変異機序の解明には, dG を中心とした損傷塩基のさらなる検索が必要と考えられた.

E. 結論

網羅的 DNA 損傷解析を用いた 1,3-DCP から生じる DNA 付加体検索において特異的 DNA 付加体の形成は認められなかった. *In vitro* では 1,3-DCP と dG の反応において CHP-N7-Gua が生成したものの, 1,3-DCP を投与したラット肝臓において同 DNA 付加体の生成は認められず, 1,3-DCP の突然変異への寄与は乏しいと考えられた.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 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

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

参考文献

- 1) Rundle A. Carcinogen-DNA adducts as a biomarker for cancer risk. *Mutat. Res.* 600, 23-36 (2006).
- 2) Singh R, Gaskell M, Le Pla R C, Kaur B, Azim-Araghi A, Roach J, Koukouves G, Souliotis V L, Kyrtopoulos S A, and Farmer P B, Detection and quantification of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts in mouse liver by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison with ³²P-postlabeling. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 868–878 (2006).
- 3) Pfau W, Brockstedt U, Söhren K D, and Marquardt H. ³²P-post-labelling analysis of DNA adducts formed by food-derived heterocyclic amines: Evidence for incomplete hydrolysis and a procedure for adduct pattern simplification. *Carcinogenesis* 15, 877–882 (1994).
- 4) Ishii Y, Suzuki Y, Hibi D, Jin M, Fukuhara K, Umemura T, Nishikawa A, Detection and quantification of specific DNA adducts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the livers of rats given estragole at the carcinogenic dose. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 532-541 (2011).
- 5) Ishii Y, Inoue K, Takasu S, Jin M, Matsushita K, Kuroda K, Fukuhara K, Nishikawa A, Umemura T, Determination of lucidin-specific DNA adducts by liquid chromatography with tandem mass spectrometry in the livers and kidneys of rats given lucidin-3-O-primeveroside. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1112-1118 (2012).
- 6) Kanaly RA, Hanaoka T, Sugimura H, Toda H, Matsui S, Matsuda T, Development of the adductome approach to detect DNA damage in humans. *Antioxid Redox Signal* 8, 993–1001 (2006).
- 7) Ishii Y, Takasu S, Kuroda K, Matsushita K, Kijima A, Nohmi T, Ogawa K, Umemura T, Suzuki Y, Umemura T, Combined application of comprehensive analysis for DNA modification and reporter gene mutation assay to evaluate kidneys of gpt delta rats given madder color or its constituents. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 2467-2475 (2014).
- 8) Singh US, Decker-Samuelian K, Solomon JJ, Reaction of epichlorohydrin with 2'-deoxynucleosides: characterization of adducts. *Chem. Biol. Interact.* 99, 109-128 (1996).
- 9) Waidyanatha S, Gaudette NF, Hong Y, Fennell TR, Formation of epichlorohydrin, a known rodent carcinogen, following oral administration of 1,3-dichloro-2-propanol in rats. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 1787-1795 (2014).
- 10) Ishii Y, Matsushita K, Kuroda K, Yokoo Y, Kijima A, Takasu S, Kodama Y,

Nishikawa A, Umemura T, Acrylamide induces specific DNA adduct formation and gene mutations in a carcinogenic target site, the mouse lung. *Mutagenesis*, 30, 227-245 (2015).

- 11) Randall SK, Eritja R, Kaplan BE, Petruska, J and Goodman, MF, Nucleotide insertion kinetics opposite abasic lesions in DNA. *J. Biol. Chem.*, 262, 6864–6870 (1987).
- 12) Kokoska RJ, McCulloch SD and Kunkel TA, The efficiency and specificity of apurinic/apyrimidinic site bypass by human DNA polymerase η and *Sulfolobus solfataricus* Dpo4. *J. Biol. Chem.*, 278, 50537–50545 (2003).

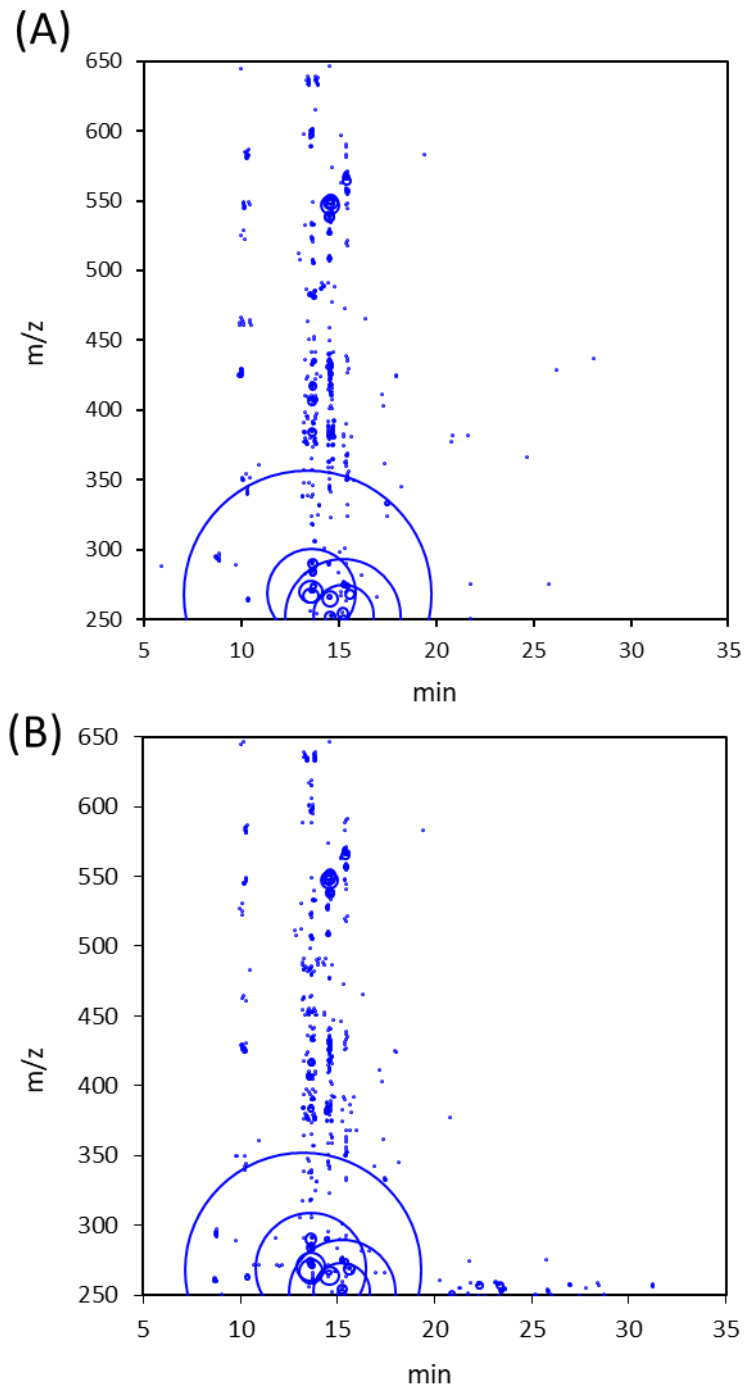


Fig.1 DNA adductome maps of liver of rat in control group (A) and 1,3-DCP group (B).

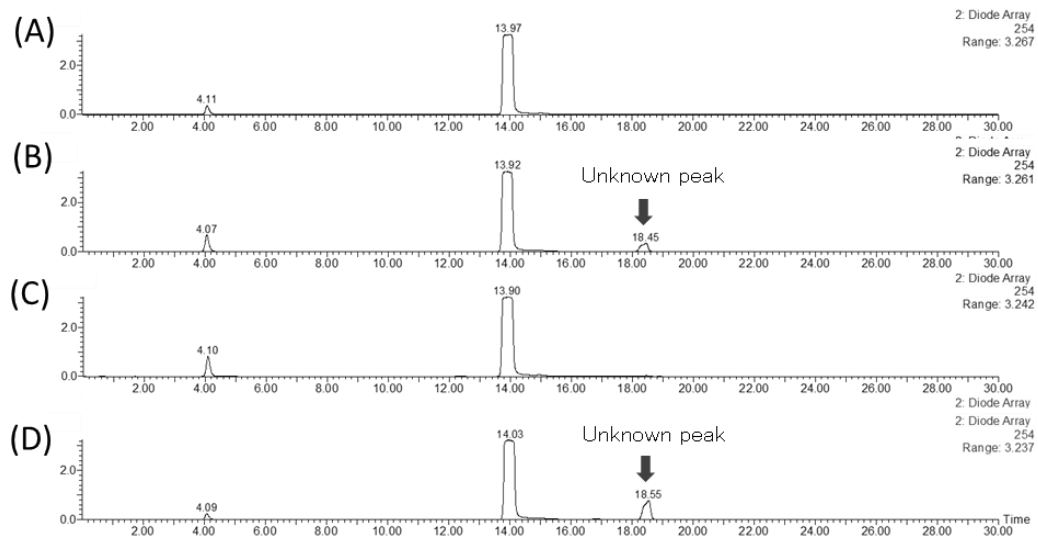


Fig.2 LC-DAD chromatograms (UV: 254 nm) of the reaction of dG with/without 1,3-DCP. (A) dG, (B)dG with 1,3DCP at pH7.4, (C) dG with 1,3-DCP at pH4.2 and (D) dG with 1,3-DCP at pH9.0.

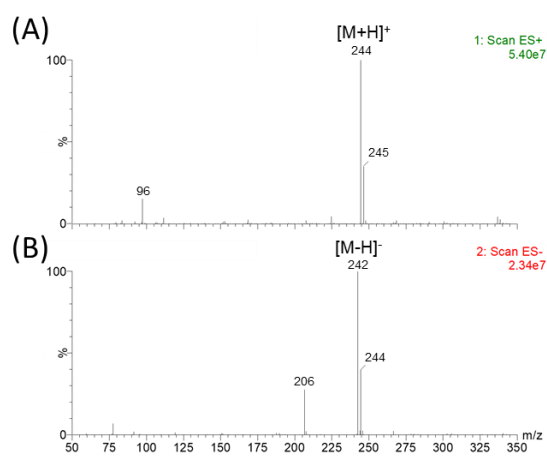


Fig.3 Mass spectra of unknown peak obtained from MS scan analysis using LC-MS for the reaction of 1,3-DCP with dG. Mass analysis was performed in (A) positive ion mode and (B) negative ion mode.

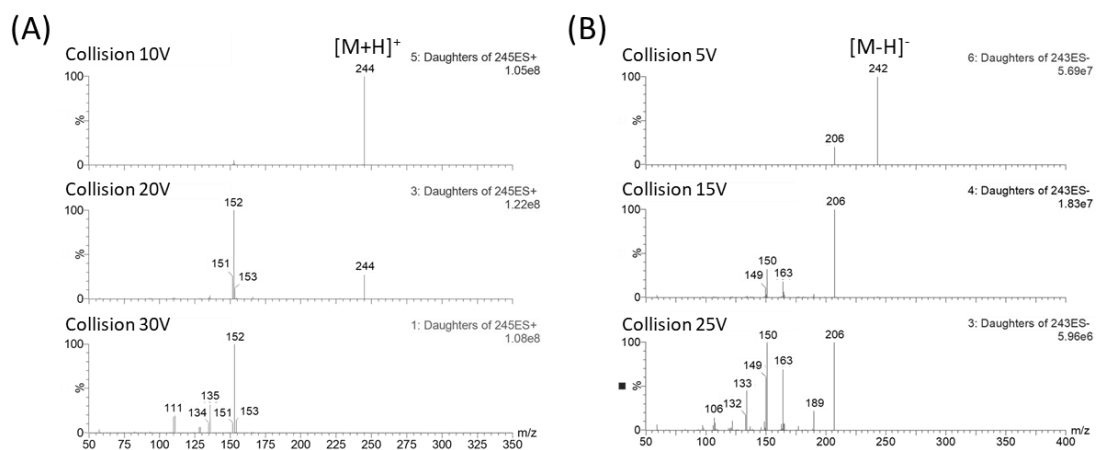


Fig.4 Mass spectra of unknown peak obtained from MS/MS scan analysis using LC-MS/MS for the reaction of 1,3-DCP with dG. Mass analysis was performed in (A) positive ion mode and (B) negative ion mode.

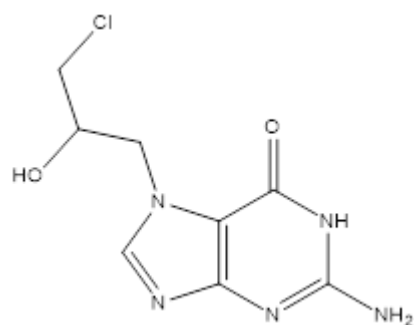


Fig.5 Chemical structure of CHP-N7-Gua

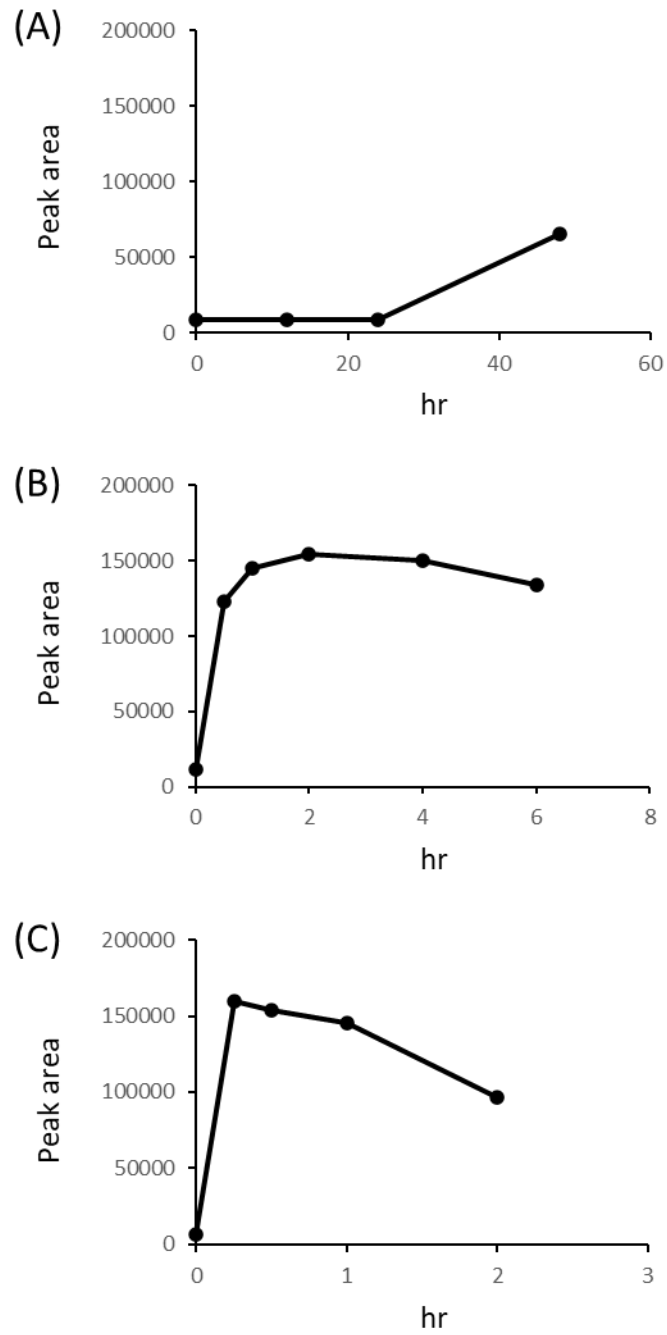


Fig.6 Time dependent changes in peak area of CHP-N7-Gua at (A) 37°C, (B) 70°C and (C) 95°C.

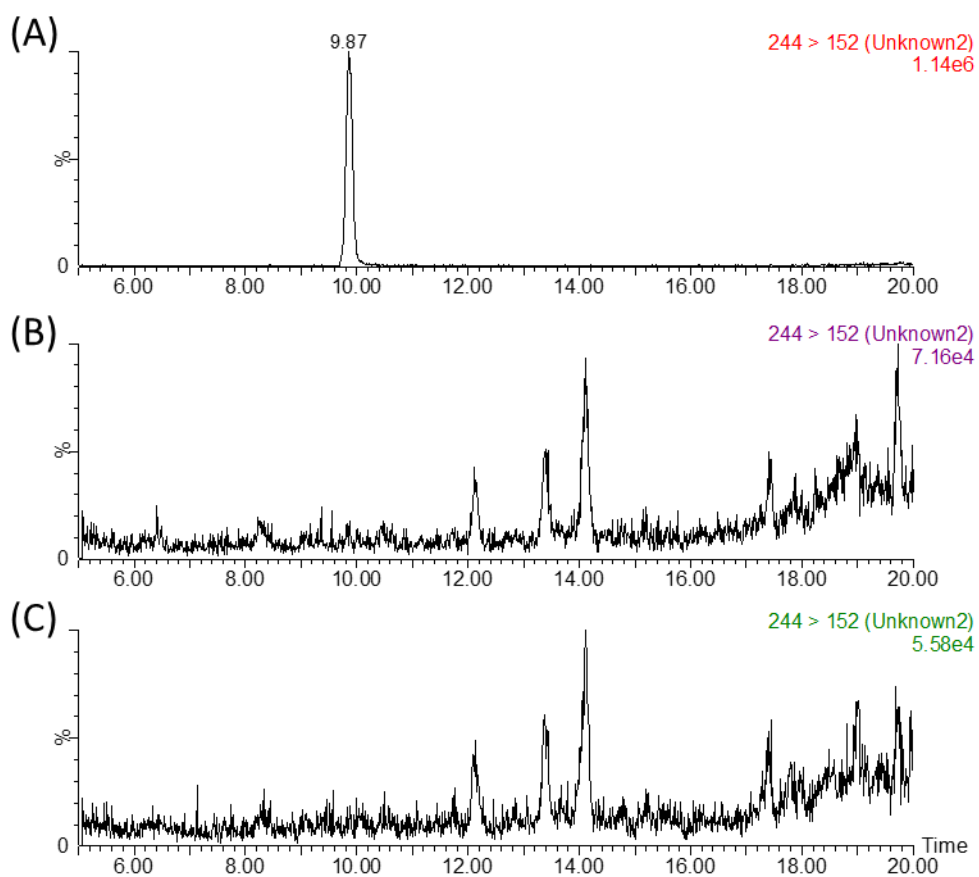


Fig.7 MRM chromatograms of CHP-N7-Gua in rat liver DNA sample. (A) CHP-N7-Gua standard, (B) liver from rat in control group and (C) liver from rat in 1,3-DCP 240 mg/L group.