

| | | |
|------|---------|---|
| 報告番号 | 乙第 5376 | 号 |
|------|---------|---|

電離放射線およびフリーラジカルによるDNAの酸化的損傷に
関する研究

Studies on Oxidative Damage to DNA Caused by Ionizing Radiation
and Free Radicals

森 利明
Toshiaki Mori

①

電離放射線およびフリーラジカルによるDNAの酸化的損傷に
関する研究

Studies on Oxidative Damage to DNA Caused by Ionizing Radiation
and Free Radicals

1998年3月

森 利 明
Toshiaki Mori

目次

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 第1章 序論 | 1 |
| 1. 電離放射線とフリーラジカルが生体におよぼす効果について | 1 |
| 2. DNA 塩基損傷研究の背景 | 4 |
| 3. 8-hydroxydeoxyguanosine の発見と高感度測定方法について | 5 |
| 参考文献 | 7 |
| 第2章 HPLC-EC および GC/MS による測定システムの構築 | 11 |
| 1. HPLC-EC 測定システムの構築 | 11 |
| 2. GC/MS 測定システムの構築 | 14 |
| 参考文献 | 16 |
| 第3章 光フェントンタイプ試薬とDNAの光反応で生成する 8-hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG)に関する研究 | 24 |
| Abstract | 24 |
| 1. 緒言 | 24 |
| 2. 実験 | 24 |
| 3. 結果と考察 | 25 |
| 参考文献 | 28 |
| 第4章 リボフラビン添加の光励起反応で生成するDNA塩基損傷の 特徴に関する研究 | 30 |
| Abstract | 30 |
| 1. 緒言 | 30 |
| 2. 実験 | 31 |
| 3. 結果と考察 | 33 |
| 参考文献 | 35 |
| 第5章 マウスの全身放射線照射で肝クロマチンに生成する DNA 塩基損傷に関する研究 | 40 |
| Abstract | 40 |
| 1. 緒言 | 40 |
| 2. 実験 | 41 |
| 3. 結果 | 44 |
| 4. 考察 | 45 |
| 参考文献 | 48 |

| | |
|-----------------------------------------------------------|----|
| 第6章 L5178Y由来の放射線感受性株 (M10) の放射線照射における DNA塩基損傷の特徴に関する研究 | 54 |
| Abstract | 54 |
| 1. 緒言 | 54 |
| 2. 実験 | 55 |
| 3. 結果 | 56 |
| 4. 考察 | 57 |
| 参考文献 | 59 |
| 第7章 ラットに腎癌を誘発する鉄-NTAを投与したときに腎クロマチン に生じるDNA塩基損傷に関する研究 | 65 |
| Abstract | 65 |
| 1. 緒言 | 65 |
| 2. 実験 | 66 |
| 3. 結果 | 68 |
| 4. 考察 | 69 |
| 参考文献 | 72 |
| 第8章 ラットへの鉄-NTA投与で腎クロマチンに生じる チミン-チロシン結合の研究 | 78 |
| Abstract | 78 |
| 1. 緒言 | 78 |
| 2. 実験 | 79 |
| 3. 結果 | 80 |
| 4. 考察 | 81 |
| 参考文献 | 83 |
| 第9章 結論 | 88 |
| 1. 総括 | 88 |
| 2. 本研究で得られた成果と展望 | 89 |
| 参考文献 | 94 |
| 謝辞 | 95 |
| 出版物目録 | 96 |
| その他の出版物目録 (参考) | 97 |

第1章 序論

1. 電離放射線とフリーラジカルが生体におよぼす効果について

生体が電離放射線（以下、放射線）に被爆すると、細胞内にはヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$ ラジカル)などの反応性に富むフリーラジカルが発生する。これらは近傍の分子とすみやかに反応して、生体分子はさまざまに変化する。なかでも遺伝情報をつたえるDNAが損傷を受けると、細胞死や発癌、突然変異などの傷害が発生する。

放射線は発癌の因子としてもっとも重要なもののひとつである。放射線によって起こったと考えられる人間の癌についての最初の報告は、1902年 Fricben¹⁾ によっておこなわれた。その後、1911年に Hesse²⁾ が 94の症例を集めて「レントゲン癌」の総説をまとめている。X線やラジウムの発見で、医療に放射線が利用されはじめるとともに、早い時期から放射線と発癌との関係が注目されるようになった。

職業的に放射線を受ける機会の多い人びとに白血病が多発していることは知られていたが、中でも March³⁾ が1933~42年の10年間についてアメリカの医師の死因調査をおこない、放射線科医師の白血病による死亡率が、その他の医師にくらべて10倍以上であり統計的に有意と報告したことは注目される。しかしこの時期には放射線と白血病の関係は、医師の「職業病」とする考えもあって、放射線と発癌の関係が一般の関心をひくことは少なかった。

社会的に放射線被爆と発癌の関係が注目されるようになったのは広島・長崎への原爆投下が契機になった。わが国は太平洋戦争の末期に、広島・長崎と二度にわたって原子爆弾の攻撃を受けた歴史をもっている。投下された原子爆弾は今日の核兵器の性能からみれば、その威力ははるかに小さいものであった。それにもかかわらず一瞬にして都市は破壊され、あらゆる生きとし生けるものの命が奪われた。核兵器はいったん使用されたときにはその被害の甚大さもさることながら、生き残った被爆者のなかに白血病をはじめとする癌が多発する事実からもわかるように、細胞の遺伝子に損傷をあたえる残虐な性質をもっている。この結果、広島・長崎で大量の放射線被爆者が生み出されることとなった。終戦直後から詳細な調査研究活動がおこなわれた結果、被爆から数年間たって白血病が多発していることがわかり世界に衝撃をあたえた。さらに長期間の観察をおこなうと、放射線被爆が白血病以外の癌の発生にも密接な関係にあることがしだいに明らかになった。この調査は現在も続けられている。そして今日では広島・長崎の被爆者の膨大な統計データをもとにして、放射線被爆と発癌リスクの関係が定量的に論議できるようになった⁴⁾。国際放射線防護委員会 (ICRP) が放射線作業従事者の防護策にかかわる基本原則を勧告しているが、広島・長崎のデータは、被爆リスクを推定するうえで貴重な資

料となっていることをわれわれは忘れてはならない。

放射線が物質にどのような化学変化を与え、それが発癌などの傷害の原因になるのだろうか。動植物の体内には約75%の水が含まれているので、放射線により水分子が変化する様子を知らなければならない。

Frickeらは1930年代に放射線のおよぼす化学的な効果について集中した研究をおこない、水がX線で分解することや、鉄(II)イオンが酸化されることを報告した^{5,6)}。放射線化学研究はFrickeがその基礎をきづいたといっても過言ではなく、彼の業績は放射線の吸収線量(dose)をはかるFricke化学線量計として現在でも広く活用されている。しかし当時はこのような反応をおこす活性種について具体的なことは分からず、active intermediate, $(\text{H}_2\text{O})_{\text{act}}$ とあらわされた。

1944年にWeissはこの活性種が $\cdot\text{OH}$ ラジカルと水素原子($\cdot\text{H}$)だということをNatureに発表した⁷⁾。さらに研究が進むと、この水素原子は一種類ではないという認識が広まり⁸⁾、水和電子(solvated electron, e_{aq}^-)の存在が提唱されるようになった。

1960年代はそれまでの成果をふまえて放射線化学研究が大きく飛躍する時期となった。1962年には、77Kのアルカリ低温ガラスマトリックスを放射線照射し、ESRと光吸収スペクトルの測定で e_{aq}^- が検出された⁹⁾。またHartとBoagは、放射線化学反応を高速度で追跡するパルスラジオリシス法を開発し、水和電子の水溶液中での生成を確認した¹⁰⁾。これ以降、ESRとパルスラジオリシス法は、放射線化学反応の研究にはなくてはならない手段として、不安定活性種の同定と反応速度論の研究に応用され、多くの成果をあげることとなった。

また水和電子は、亜酸化窒素ガス(N_2O)と反応して $\cdot\text{OH}$ ラジカルに変換できることがDaintonとPetersonの論文で明らかになり¹¹⁾、水の放射線分解の基本的な機構はほぼ解明された。表1-1に、X線や γ 線による水の放射線分解のG値を示す。G値とは吸収された放射線のエネルギー100eVあたりに生成する分子数である。

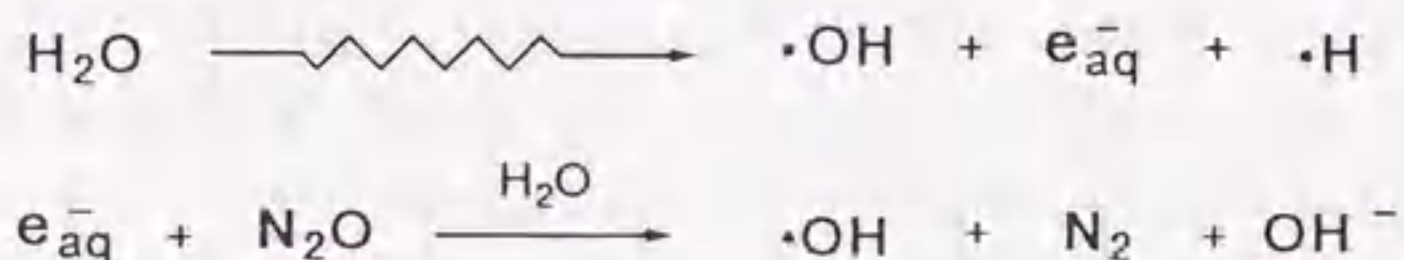


表1-1 X線や γ 線による水の放射線分解のG値 (pH 4~9)

| 水和電子 (e_{aq}^-) | $\cdot\text{OH}$ ラジカル ($\cdot\text{OH}$) | 水素原子 ($\cdot\text{H}$) | 水素分子 (H_2) | 過酸化水素 (H_2O_2) |
|-------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| 2.8 | 2.8 | 0.55 | 0.45 | 0.75 |

生物学の分野では1930年代に突然変異の発生を数学的に扱う手法がとりいれられるなど、それまでの観察と分類を中心とした定性的な手法から脱却して、放射線の生物影響を定量的に扱うようになった¹²⁾。そして放射線化学研究の成果を取り入れながら、放射線生物学という新たな学問分野が戦後発展することになった。

ところでフリーラジカルの研究は1900年にGombergが、トリフェニルメチルラジカルの存在を確認したときに始まるといわれている¹³⁾。その後しばらく空白の時期があったが、1930年代にはいり基礎化学、応用化学の両面で研究が活発になり、以来フリーラジカルの化学は急速に発展した。そして今日では高分子化学や有機化学工業などになくてはならない位置を占めるようになった。

水の放射線分解で生成する $\cdot\text{OH}$ ラジカルなどの活性種 ($\cdot\text{OH}$, e_{aq}^- , $\cdot\text{H}$ など) はフリーラジカルであり、放射線化学の研究がすすむにつれて $\cdot\text{OH}$ ラジカルなどの活性酸素種が引き起こす酸化反応が、生物にきわめて深刻な影響をあたえることが分かってきた。

現在地球上には好気性生物が主流となっているが、生物が地球に誕生した三十数億年前には、大気中の酸素濃度は現在の1万分の1程度であったと推定されている。この当時の生物にとって、酸素はきわめて有害であった。しかし生物進化の過程で、嫌気性生物の中から酸素障害を防ぐ機構をそなえた好気性生物が出現した。それらは酸素を利用することによってより多くのエネルギーを利用できるようになった。1分子のグルコースから、発酵によっては2分子のATPが生産できるにすぎないが、酸素を電子受容体とする酸素呼吸によると36分子のATPを生産することができる。この結果、好気性生物は嫌気性生物より進化のうえで有利な位置を占めるようになった。

好気性生物は、過酸化水素やスーパーオキシド (O_2^-) など活性酸素を消去・分解する酵素や、活性酸素の生成そのものを抑制するなど多様な酸素障害の防御機構を持っている。1969年にMcCordとFridovichが、 O_2^- を分解する酵素、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) を報告したことは有名である¹⁴⁾。SOD以外に活性酸素を消去する酵素は数多く存在している。また細胞内にはL-アスコルビン酸やグルタチオン(GSH)など、ラジカルスカベンジャーや抗酸化剤として働く低分子の化合物が数多く含まれている。しかし活性酸素の消去機能が、機能しなくなったり欠けたりすると、活性酸素は細胞膜や遺伝子DNAに損傷を与えるようになる。

細胞内で発生する活性酸素やフリーラジカルが、発癌や突然変異さらには老化などに深く関係していることは、近年多くの研究者の認めるところとなっている。特にDNAが損傷を受けると、遺伝情報の正常な発現が乱され、生物に深刻な影響がおよぶことになる。

DNAの損傷には、一本鎖切断 (single strand break) や二本鎖切断 (double strand break), 塩基の修飾 (modification), 塩基の脱離, 糖の化学変化, 塩基とタンパク質の結合などがある。DNAと $\cdot\text{OH}$ ラジカルとの反応では、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルが糖鎖に付加する割合は全体の約 20%程度で、残りは塩基の部分と反応すると見積もられている¹⁵⁾。したがって放射線照射やフリーラジカルとDNAの反応で、DNAにどのような化学変化が起こっているのかということ調べることは、放射線の生物影響や酸素障害などの機構を解明するためだけでなく、DNAの変異が原因でおこる発癌や、さらには細胞の老化にともなっておこる種々の疾病などの解明にも重要である。

2. DNA塩基損傷研究の背景

マウスを放射線照射すると、10 Gy以上の線量で1週間以内に大部分が死んでしまう。1 Gy = 10^4 erg/g だから 1 erg = 2.39×10^{-8} cal から計算すると、10 Gyの放射線照射で細胞がうけるエネルギーは、水の温度をわずかに1千分の2度上昇させる程度でしかない。高分子に 10 Gyを照射しても外見上の物理的な変化は何もみられない。にもかかわらず生物が死ぬということは、放射線の標的が細胞内にあることを意味している。その標的分子がDNAだということは、今日ではよく知られている。

放射線がDNAにどのような変化を与えるのかという観点から、DNA塩基と水の放射線分解で生成する活性種 ($\cdot\text{OH}$, e_{aq}^- , $\cdot\text{H}$) との反応速度定数と反応機構が詳細に調べられた¹⁶⁾。DNA塩基は水和電子や $\cdot\text{OH}$ ラジカルなどと速やかに反応して、さまざまな生成物を生じる。これらの変化したDNA塩基を修飾塩基 (modified base) という。

放射線化学の研究から多くの修飾塩基の生成が確認されたが、それらが生物学的にどのような効果を持つのかという研究は、まだ緒についたばかりである。たとえばチミングリコール (ThyGly)は *in vitro* 実験で DNAの複製 (replication)をブロックすることがわかった¹⁷⁾。グアニンの五員環の部分が開裂した 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) も同様の作用を持つことが確認された¹⁸⁾。DNAのreplicationがブロックされるということは、これらの化合物の生成は細胞死につながるということを意味する。また修飾を受けた塩基は、G:C, T:Aという正常な塩基対を形成できず、突然変異を誘発する場合もある。

1960年代から70年代にかけて、DNA塩基が放射線照射でどのように変化するか活発に研究された。このような放射線化学研究では、しばしば数千Gyにもおよぶ線量を使用されている。実際この程度の線量を照射しないと生成物の分析が難しいためである。しかし生物にはもっと少ない線量で障害が現れる。マウスなど実験動物を使った実験では、数Gyの照射で発癌や突然変異などの生物影響が現れはじめ、

数百Gy以上の照射では、神経細胞の障害で数時間以内に死んでしまう。

しかし数百Gyの照射線量で、DNAに及ぶ効果を化学的に調べようとしても、変化した化合物の生成量は微量であり、検出には困難がともなう。したがって放射線の生物影響を修飾塩基の生成を指標にして調べようとする、あらかじめ目標とする化合物を決めることと、高感度の検出方法を確立することが必要になる。つまりDNA損傷のマーカとなるような生物学的に意味のある特定の修飾塩基に目標を決めて、それが微量でも分析可能ならば、この目的に合致することになる。

現在このような化合物として8-hydroxyguanine (正しくは 7,8-dihydro-8-oxo-guanine, 8-OH-Gua)が、医学や生化学の分野でDNAの酸化的損傷を評価するマーカーとしてしばしば利用されている。

3. 8-hydroxyguanineの発見と高感度測定方法について

DNA塩基は放射線やフリーラジカルとの反応でさまざまに変化する。変化した塩基をDNA修飾塩基 (DNA modified base)という。その一例を図 1-2 に示している。これらの不正常的なDNA塩基が生物にどのような影響を与えるのか (または与えないのか) などの解明は始まったばかりである。DNA修飾塩基の中で、現在比較的良好に研究され、DNAの酸化的損傷のマーカーとしてしばしば用いられる化合物のひとつに8-OH-Guaがある。

8-OH-Guaはそのヌクレオシド体である8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) が、1984年に国立がんセンター研究所の葛西、西村らによって発見された¹⁹⁾。また翌年には、米国National Institute of Standards and Technology (NIST)のDizdarogluによってDNAの放射線照射でも生成していることが報告された²⁰⁾。さらに1986年にFloydらは、8-OHdGがHPLCに電気化学検出器 (EC detector, 以下簡単にECと省略) を組み合わせると高感度に検出できること。また実際に細胞のDNAで生成していることを報告した²¹⁻²²⁾。

その後の研究で、8-OH-Guaはかなりの割合でアデニンと対を形成すること。8-OH-Guaを含む状態でDNAのreplicationがすすむと、G:C → T:Aへのトランスバージョンの原因になることがわかった²³⁻²⁶⁾。図 1-3にその様子を図示する。

HPLC-EC法によって8-OHdGの測定が比較的簡単におこなえるようになったことと、この化合物が突然変異を誘発するということから、8-OHdGは放射線や活性酸素によるDNAの酸化的損傷を評価するマーカーの一つとして医学、生化学、放射線化学など広い分野で活発に研究されるようになった。

しかしここで注意しなくてはならないことは、8-OHdGの生成が確認できたから

といて、それだけが DNA 損傷のすべてではないということである。DNA を HPLC-EC 法で分析すると、きわめて多くのシグナルが現れる。8-OHdG は多くの DNA 成分が溶出した後にカラムから出てくるので、結果的に分析しやすいということであって、8-OHdG と同じリテンションタイムのところに妨害成分が出てくるようなサンプルであれば、HPLC-EC 法でも分析できなくなってしまう。また HPLC の場合、標準物質とリテンションタイムが同じであれば、目的の化合物だと判定しているが、これも実際のところ、多くの成分が含まれている DNA のようなサンプルを分析するときなど、それが本当に目的の化合物かどうかという点に常に注意しなくてはならない。HPLC では室温が少し変化するだけでリテンションタイムが変動することにも留意しておかなくてはならない。いずれにしても HPLC-EC 法で分析することのできる DNA 修飾塩基は、8-OHdG とアデニンが変化した 8-hydroxy-2'-deoxyadenosine (8-OHdA) など電気化学的に活性なものに限られる²⁷⁾。

微量の DNA 修飾塩基を測定する手法の一つに、GC/MS の応用がある。GC にキャピラリーカラムを使用すればリテンションタイムは安定し、多成分の分離にきわめて効果的である。またこの場合、MS で化合物の質量を確認することができるので、同定を正確におこなうことができる。定量したい化合物のフラグメントイオンを適切に選択すれば selected ion monitoring (SIM) 法で高感度の微量分析が可能になる。

この方法を DNA 修飾塩基の研究に応用して大きな成果をあげているのが、米国 NIST の Dizdaroglu らのグループである²⁸⁻²⁹⁾。GC/MS 法では、分析の対象とする標準物質さえ準備できれば、一回の分析で複数の化合物を同時に定量することができる。GC/MS 法で得られる情報量は HPLC-EC 法よりも多く、チミン、シトシン、グアニン、アデニンの DNA 塩基のすべてについて、その変化を見ることができる。

以上要約すると、HPLC-EC 法は比較的簡単な装置で容易にデータを得ることができるという特徴がある。一方 GC/MS 法は機器が HPLC に比べて高価で、サンプルの前処理などに時間をとられる。また HPLC-EC 法よりも分析に時間がかかるというデメリットなどがあるものの、得られる情報量は HPLC-EC 法よりも多い。

したがって両者のメリット、デメリットを十分ふまえてこれらのシステムを DNA 損傷の研究に応用すれば、放射線やフリーラジカルが DNA におよぼす影響を化学的な立場から研究するうえで大いに役立つことが期待される。しかし従来おこなわれてきた研究は、どちらか一方の手段を使って得た結果で議論することが多く、両システムを使用する研究者間の交流は必ずしも十分とは言えなかった。

本論文では放射線照射や、活性酸素との反応で、遺伝情報をつたえる DNA にど

のような塩基の変化が生じるのかということを知るため、第一にそれを知るための化学的な分析手法を確立すること。第二点として、その手法を用いて *in vitro* および *in vivo* でさまざまな実験をおこなって、どのようなDNA修飾塩基が生成するのか、その特徴を研究した。

具体的には、DNAの光励起反応、マウスや細胞の放射線照射、ラットへの発癌物質の投与などでDNA塩基が化学的にどのように変化するのかということ、HPLCやGC/MS法を応用して調べた。

参考文献

- 1) Frieben, *Deutsche Med. Wchnschr.*, **28** (Suppl.), 334 (1902).
- 2) Hesse, O., *Fortschr. a. d. Geb. d. Röntgenstrahlen*, **15**, 82 (1911).
- 3) March, H. C., *Radiology*, **43**, 275 (1944).
- 4) 例えば Cancer in atomic bomb survivors, (Shigematsu, I. and Kagan, A., Eds.), Jpn. Sci. Soc. Press, Tokyo (1986).
- 5) Fricke, H. and Brownscombe, E. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **55**, 2358 (1933).
- 6) Fricke, H. and Hart, E. J., *J. Chem. Phys.*, **3**, 60 (1935).
- 7) Weiss, J., *Nature (Lond.)*, **153**, 748 (1944).
- 8) Hayon, E. and Allen, A. O., *J. Phys. Chem.*, **65**, 2181 (1961).
- 9) Schulte-Frohlinde, D. and Eiben, K., *Z. Naturforsch.*, **17a**, 445 (1962).
- 10) Hart, E. J. and Boag, J. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 4090 (1962).
- 11) Dainton, F. S. and Peterson, D. B., *Nature (Lond.)*, **186** (1960).
- 12) Zimmer, K. G., *Strahlentherapie*, **51**, 179 (1934).
- 13) Gomberg, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **22**, 757 (1900).
- 14) McCord, J. M. and Fridovich, I., *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049 (1969).
- 15) von Sonntag, C., *The chemical basis of radiation biology*, Taylor & Francis, London 1987.
- 16) Steenken, S., *Chem. Rev.*, **89**, 503 (1989).
- 17) Ide, H., Kow, W. K. and Wallace, S. S., *Nucleic Acids Res.*, **13**, 8035 (1985).
- 18) Boiteux, S. and Laval, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 552 (1983).
- 19) Kasai, H. and Nishimura S., *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2137 (1984).
- 20) Dizdaroglu, M., *Biochemistry*, **24**, 4476 (1985).
- 21) Floyd, R. A., Watson, J. J., Wong, P. K., Altmiller, D. H. and Rickard, R. C., *Free Radic. Res. Commun.*, **1**, 163 (1986).
- 22) Floyd, R. A., Watson, J. J., Harris, J., West M. and Wong, P. K., *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. 137, 841 (1986).

23) Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A. P., *Nature*, **349**, 431 (1991).

24) Wood, M. L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E. and Essigmann, J. M., *Biochemistry*, **29**, 7024 (1990).

25) Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S. and Loeb, L. A., *J. Biol. Chem.*, **267**, 166 (1992).

26) Moriya, M., Ou, C., Bodepudi, V., Johnson, F., Takeshita, M. and Grollman, A. P., *Mutat. Res.*, **254**, 281 (1991).

27) Berger, M., Anselmino, C., Mouret, J.-F. and Cadet, J., *J. Liquid Chromatogr.*, **13**, 929 (1990).

28) Fuciarelli, A. F., Wegher, B. J., Gajewski, E., Dizdaroglu, M. and Blakely, W. F., *Radiat. Res.*, **119**, 219 (1989).

29) Dizdaroglu, M., *FEBS Lett.*, **315**, 1 (1993).

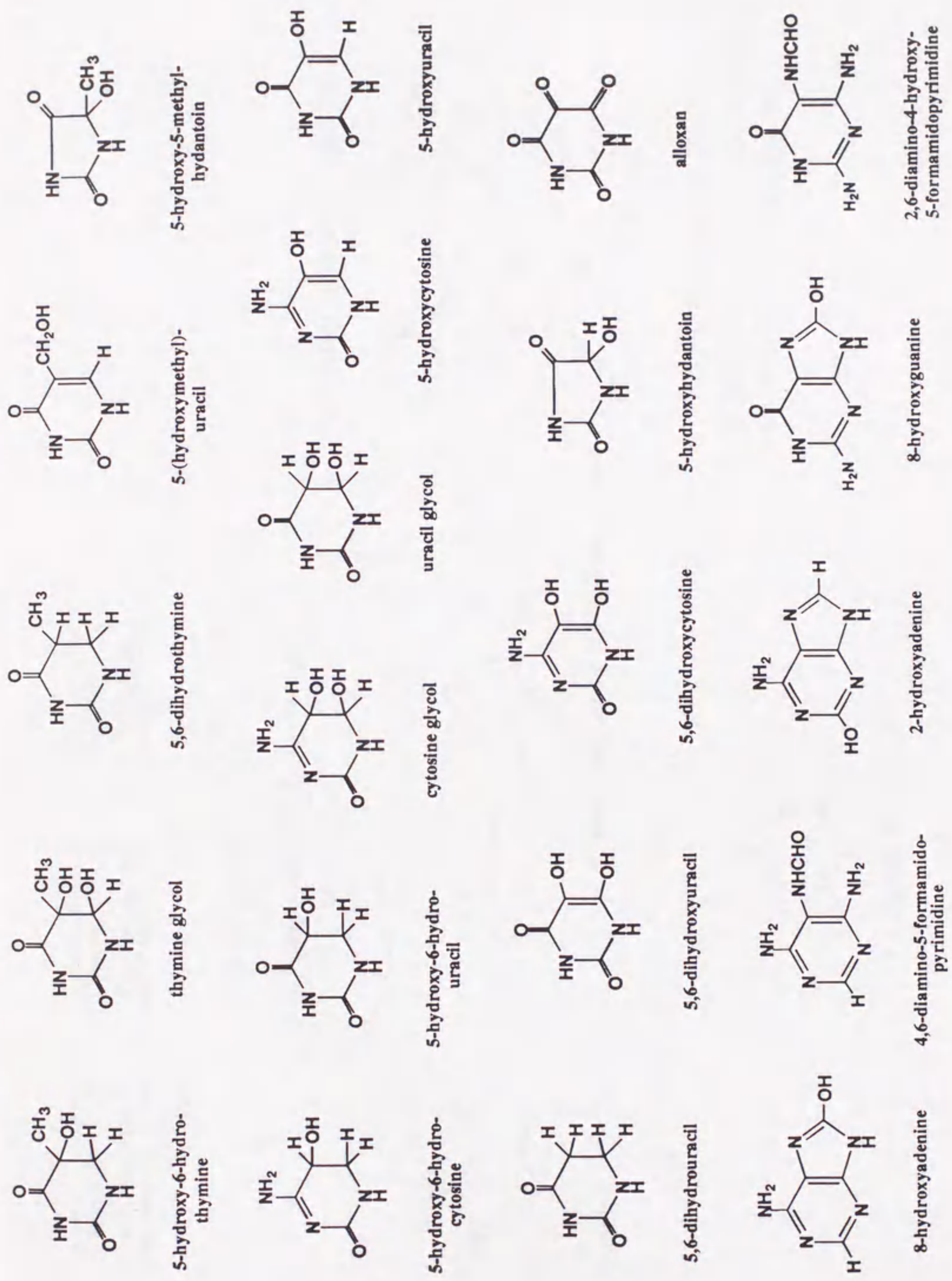
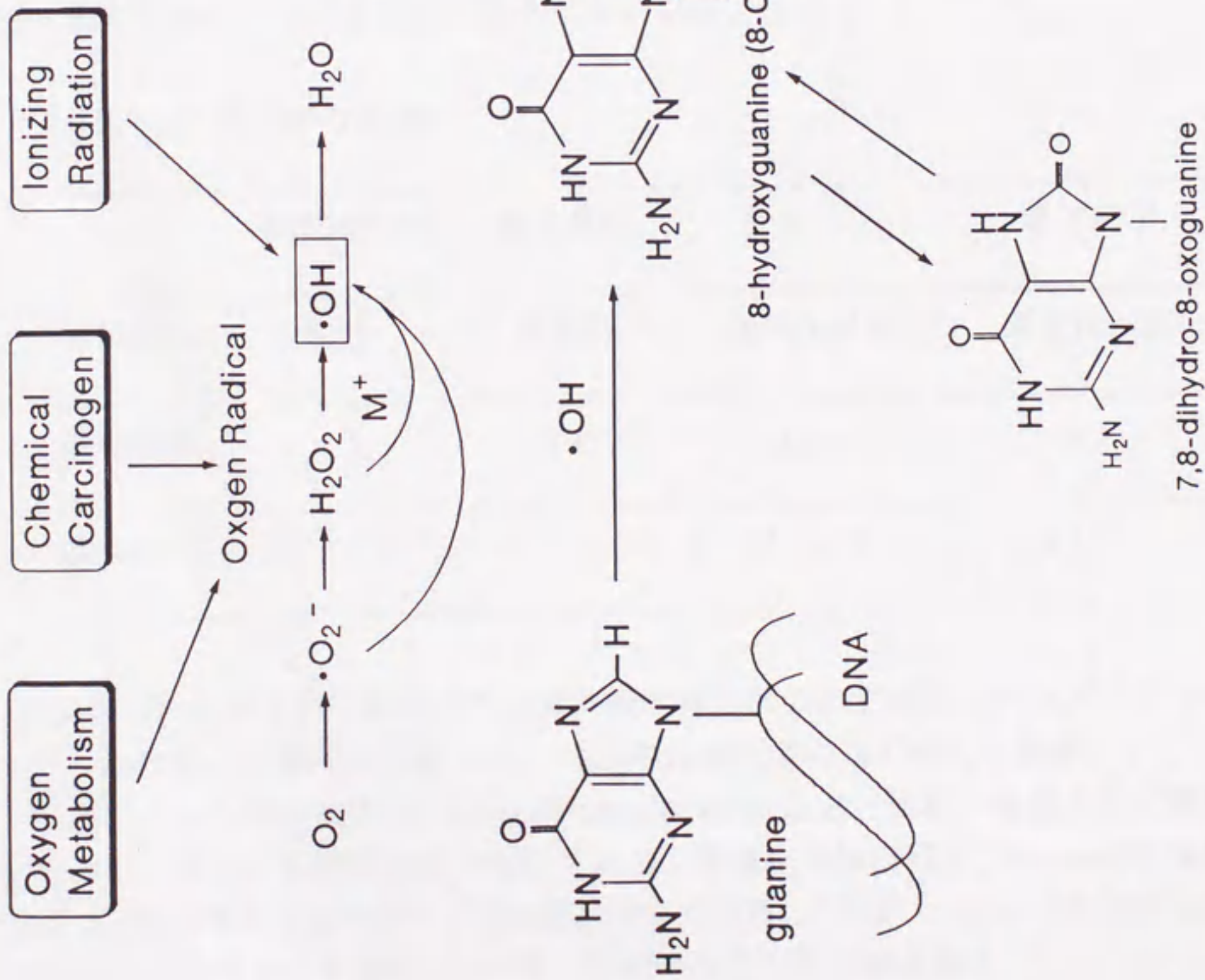
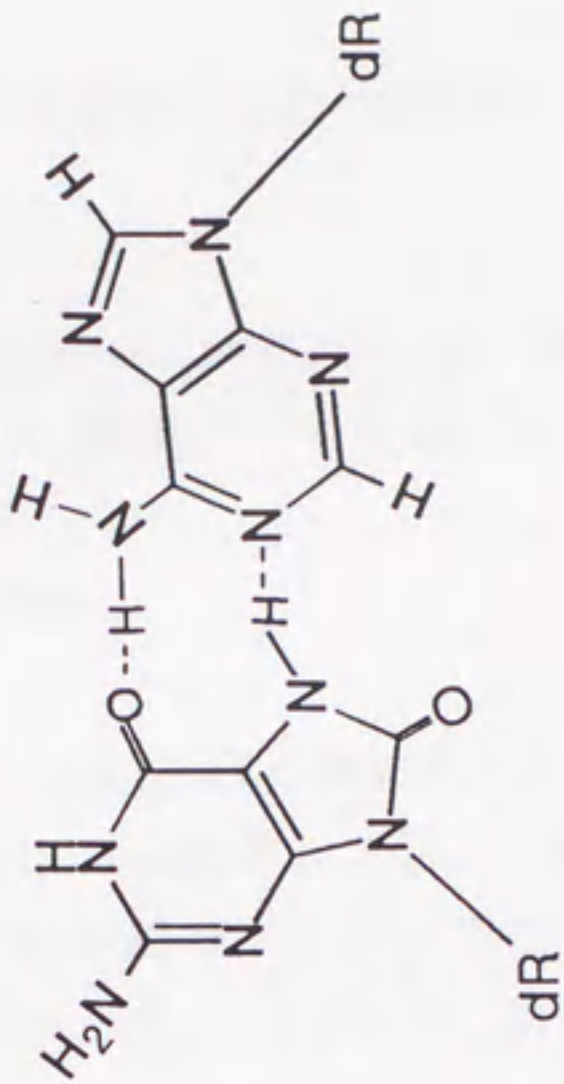


図1-2 DNA修飾塩基のうちこれまでGC/MS法で検出されているもの..



8-hydroxyguanine adenine



グアニン塩基が回転し、アデニンと2カ所で水素結合する。このためDNAの複製の際にG:CからT:Aへの変異がおこる。

図1-3 8-hydroxyguanineの生成とadenineとミスペアを形成する様子。

第2章 HPLC-ECおよびGC/MSによる測定システムの構築

本章ではDNA中に通常ごくわずかししか生成しない修飾塩基を分析するための高感度測定方法と、そのシステムの構築について述べる。

1. HPLC-EC測定システムの構築

DNAの酸化的損傷のマーカとして広く使われている 8-OHdGを検出・定量するため、8-OHdGを合成し、HPLC-EC測定システムを構築した。

市販のcalf thymus DNAには 10万個のグアニン当たり製品のロットにもよるが、数個から数十個程度の 8-OH-Guaが含まれている。細胞中では修復酵素の働きで不正常的な塩基は除去修復されるので *in vivo*でのコントロールDNA中の8-OH-Gua量は10万個のグアニン当たり1個ないしそれ以下である¹⁾。

HPLCをこの目的に応用するためには、分析対象となるDNAのインジェクション量を仮に10 μ gとすると、大ざっぱにみつもって10 μ g \times 10⁻⁵、つまり100ピコグラム (pg) 程度の量であっても検出できる感度が必要となる。

○ HPLC検出器の比較

| | 示差屈折率 | 紫外吸収 | 蛍光 | 電気化学 |
|------|-----------------|--------|---------------|--------|
| 応用範囲 | 一般的 | 選択的 | 選択性が高い | 選択性が高い |
| 検出限界 | μ g | ng | pg | pg |
| 直線範囲 | 3×10^3 | 10^4 | $10^4 - 10^6$ | 10^5 |

HPLCの検出器として使用される紫外吸収検出器の測定限界はナノグラム (ng)である。したがって紫外吸収法では、DNA中の極微量の 8-OHdGを検出することはできない。しかし8-OHdGは phenolやcatecholamineなどと同様、電極表面で酸化されるので、電気化学的な分析が可能である。電気化学検出器(EC detector)は選択性が高く、検出限界は数十ピコグラム(pg)程度である。したがってHPLCの検出器にEC detectorを使用すると8-OHdGを分析・定量することが可能となる。

ところでEC detectorにはアンペロメトリック方式とクーロメトリック方式の2方式がある。以下簡単に両システムの特徴をのべる。

○アンペロメトリック検出器

アンペロメトリック検出器は、作用電極表面でおこる酸化または還元電位の変化を測定するもので、測定する物質の濃度に比例した電流のシグナルが得られる。電極表面で酸化もしくは還元される物質は、一般に10~15%程度である。また作用電極表面に電解物質が付着しやすいため、必要に応じて研磨するなどの作業が必要になる。市販の電気化学検出器の大半はこの方式だが、メーカーによっては電極の分解組立が比較的容易なもの、または熟練を要するものなど、さまざまに微妙な差があるのが現状である。

○クーロメトリック検出器

クーロメトリック検出器は、広い意味ではアンペロメトリック検出器のひとつといえる。微細で多孔性のポーラスグラファイト電極に溶液が流れこむ形式になっている。このため電気化学的に活性な化合物はほぼ100%反応することになり、アンペロメトリック方式にくらべて得られる信号強度が10~20倍大きく、高感度の分析が可能となる。現在この方式の検出器は、米国ESA社の製品が信頼できるとして広く普及している。しかしながら検出器の価格がアンペロメトリック方式にくらべて約2倍と高価であり、電極は経年劣化する。この場合、電極セルをすべて交換しなくてはならないなど、アンペロメトリック方式にくらべて維持費が高くつくという弱点がある。

EC detectorの選択にあたっては、分析する対象、すなわち *in vitro* 実験での測定が主となるのか、それとも *in vivo* かなど、費用と効果の両面からの検討がもとめられる。当初、試行的に複数のメーカーの機種を使用してみたが、BAS社のEC detector (LC-4C) が、感度の面でも、メンテナンスの面でも最適と判断し、これを選択した。この機種では8-OHdGの分析には酸化電位を600 mVに設定するのが適当であった。

8-OHdGの合成

8-OHdGは葛西らの方法によって合成した²⁾。合成のプロセスを要約すると以下のとおりである。

2'-deoxyguanosine 1gを pH 6.8, 0.1 M のリン酸バッファー溶液 100 mlに溶かし, L-アスコルビン酸 0.015 Mと 0.1 M の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を加え, 37 °Cで3時間反応した。8-OHdGは, 直径 25 mm, 長さ25 cmの分取用ODSカラムで, メタノール/水 (10/90, v/v), 流量 10 ml/min, 室温でリテンションタイム 21.9 minに溶出してくるピークを分取した。収量は約 5%であった。

最近でこそ 8-OHdGは薬品メーカーから購入できるようになったが, この実験をおこなった当時は, 国立がんセンターの葛西博士が合成した8-OHdGが, 国内で一種のスタンダードのような位置を占めていた。そこで葛西博士から 8-OHdGの標準品を提供していただき, ここで合成した 8-OHdGを希釈してHPLC-EC測定をおこない, 比較検討した。その結果, 同一化合物であることを確認した。

DNA中の8-OHdGの分析方法

100 μg の DNAをアルゴンガスで3分間飽和した水 100 μl に溶かし, 95 °Cで3分間加熱した後, 氷水で急冷してdenatureした。これに1 Mのsodium acetate (pH 4.8)溶液 2 μl と nuclease P1 (Yamasa) を4 μg 加え, 37 °Cで1時間放置して nucleotideにまでDNAを分解した。引き続き1 Mのtris-HCl (pH 7.2) 16 μl と1.3 unitsのalkaline phosphatase (type III from *E. coli*, Sigma)を加えて, 37 °Cで2時間放置し, 塩基を nucleosideにした。これをHPLC-EC法で分析した。図2-1にHPLCで塩基が分離される様子を示した。

HPLCの移動層には, 10%のメタノールを含む水溶液 (20 mMのsodium acetate/10 mMのcitric acid 緩衝液, pH 4.3)を用いた。移動層の流量は 1 ml/minである。なお EC detectorは移動層の脈流に敏感にレスポンスするので, 脈流ノイズをおさえるために HPLCポンプとカラムの間にダンパー (Shimadzu製)を挿入した。

8-OHdGの分析には 15 cm のODSカラムを使用し, カラム温度は 37 °Cに保った。インジェクトしたサンプルはカラムで分離された後, EC detectorをとおり, 次に UV detectorに入る。UV detectorの波長は 290 nmに設定した。

あらかじめ 5 ng/mlの8-OHdGと 0.5 mg/mlの 2'-deoxyguanosine (dG) の標準サンプルをそれぞれHPLCにインジェクトして, 8-OHdGは EC detectorで, dGは UV detectorで検出し, それぞれのピーク面積の比をもって $8\text{-OHdG}/\text{dG} = 1/10^5$ の標準値とした³⁾。

本論文ではこの測定方法を応用して光フェントン試薬とDNAの反応でおこるDNA損傷の研究に応用した。その結果については次章で述べる。

2. GC/MSシステムの構築

GC/MS は大阪府立大学先端科学研究所の装置を使用した。MS 部分は日本電子データムの磁場型質量分析計 JMS-DX-303 mass spectrometer, GC は Hewlett-Packard の 5890 gas chromatograph である。サンプルの分離には fused silica capillary column を使用した。カラムは 12 m x 0.2 mm (i.d.), coated with crosslinked 5% phenylmethyl silicone, film thickness 0.33 μm のものが最適であった。

標準物質の合成

試薬として入手できない標準物質はそれぞれ文献のとおり合成した。それらは 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua)⁴⁾, 8-hydroxyadenine (8-OH-Ade)⁵⁾, 2-hydroxyadenine (2-OH-Ade)⁶⁾ である。hypoxanthine, xanthine, acetonitrile, *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) とギ酸は Wako から, thymine- $\alpha, \alpha, \alpha, 6\text{-}^2\text{H}_4$ (Thyd₄) は Nacalai Tesque から, calf thymus DNA, 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyAde) と 8-azaadenine は Sigma から, 8-OH-Gua は Aldrich から購入した。

サンプルの酸加水分解と誘導化

GC で DNA 塩基の分析をおこなうためには, DNA から塩基を切り離す必要がある。そのため 100 μg の DNA をガラスチューブに移して凍結乾燥をおこなった後, 60%のギ酸 0.5 ml を加えて脱気封管し, 130 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間加熱した。あらかじめこの反応条件で分析目的の化合物は分解しないことを確認した。この際の注意として, ギ酸はできるだけ新しいものを使用することが望ましい。開封から 1 年以上経過したギ酸では, 酸加水分解の際に, 微量の目的化合物が分解するなどの問題がおこったことを明記しておく。

酸加水分解したサンプルを再度凍結乾燥した後, 乾燥窒素雰囲気下で 100 μl の BSTFA/acetonitrile (4/1, v/v) を加え, 130 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間加熱してトリメチルシリル化 (TMS 化) した。図 2-2 に修飾塩基がトリメチルシリル化される様子を図示した。この後 GC/MS-SIM 法で多成分の DNA 塩基の定量分析をおこなった。

各修飾塩基の測定には, 一定量の 8-azaadenine を加え, これを内部標準 (internal standard) として定量をおこなった。あらかじめそれぞれの目的化合物の標準溶液を作成しておき, 8-azaadenine とのピーク面積比から検量線を作成した。測定値については DNA 中の修飾塩基の存在量を求めるため, DNA の量を求める必要がある。

そのために Thyd₄ を internal standard に用いて、サンプル中のチミン (Thy) 量を求めることで DNA 量を推定した。

GC/MS 法の場合、インジェクトするサンプル量は 1 μ l 程度にすることが望ましい。これ以上インジェクトするとカラムは急速に劣化し、微量成分を分析することがむづかしくなる。TMS 化した各修飾塩基の化学構造と、それぞれ定量に用いたイオンを図 2-3 に示す。また図 2-4 と図 2-5 には、GC での分離の様子と、検量線の一例を示す。

図 2-5 からわかるように本システムの測定限界値は 10 pg 前後である。インジェクトする DNA の量を約 1 μ g と見積もると、10 万個の DNA 塩基当たり、約 1 個の修飾塩基の測定が可能ということになる。

GC/MS 法ではインジェクトできるサンプル量が HPLC-EC 法より少ないので、HPLC-EC 法にくらべると結果的に感度は少々劣ることになる。しかし 8-OH-Gua 以外の修飾塩基を測定することができることから DNA 損傷の実体を把握するうえで、HPLC-EC 法よりも多くの情報が得られるというメリットがある。

この方法を DNA の水溶液にリボフラビンを追加し、可視光照射をおこなったときにおこる DNA 損傷の研究に応用して、損傷を受けるプリン塩基を特定することができた。この結果については第 4 章で述べる。

isotope dilution GC/MS 法

GC/MS 法を用いた DNA 塩基損傷の研究で数多くの実績をあげている米国 NIST の Dizdaroglu 博士と共同研究をおこなった。

GC/MS 法で定量をおこなう際には、分析したい化合物それぞれについて安定同位体で置換した標準物質を内部標準として用いる isotope dilution GC/MS 法が最善の策である⁷⁾。しかし安定同位体で置換した化合物を入手することは困難で、合成も容易でない。また研究費の面からも実施するには大きな制約がある。

米国 NIST の Dizdaroglu 博士は、安定同位体で置換した DNA 修飾塩基を 10 種類近く保有し、DNA 塩基損傷の研究では他の追随を許さない高い研究水準を維持している⁸⁾。図 2-6 と図 2-7 に安定同位体で置換した修飾塩基のマスペクトルを示す。これからわかるように、目的の修飾塩基と同じリテンションタイムのところに置換した安定同位体の数だけ質量の異なるスペクトルがあらわれる。この面積比から、DNA 中の修飾塩基の量を測定することができる。

isotope dilution GC/MS 法を *in vivo* の DNA damage 研究に応用した結果については第 5 章から第 8 章の項で述べる。

以下の章では、増感剤を添加して光化学反応をおこなった場合、マウスや細胞の放射線照射、ラットに腎癌を誘発する発癌物質を投与した場合、など *in vitro* や *in vivo* で DNA にさまざまな損傷をあたえる実験をおこない、DNA にどのような塩基損傷が生じるのかということをおこなった。HPLC-EC 法と GC/MS-SIM 法を応用して調べた研究結果について順次述べていく。

参考文献

- 1) Halliwell, B., *in* DNA and Free Radicals (Halliwell, B. and Aruoma, O. I., Eds.), pp. 67, Ellis Horwood Ltd., London (1993).
- 2) Kasai, H. and Nishimura S., *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2137 (1984).
- 3) Yamamoto, F., Kasai, H., Togashi, Y., Takeichi, N., Hori, T. and Nishimura, S., *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 508 (1993).
- 4) Cavalieri, L. F. and Bendich, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2587 (1950).
- 5) Fuciarelli, A. F., Wegher, B. J., Gajewski, E., Dizdaroglu M. and Blakely, W., *Radiat. Res.*, **119**, 219 (1989).
- 6) Bendich, A., Tinker J. F. and Brown, G. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3109 (1948).
- 7) Watson, J. T., *Methods in Enzymol.*, **193**, 86 (1990).
- 8) Dizdaroglu, M., *FEBS Lett.*, **315**, 1 (1993).

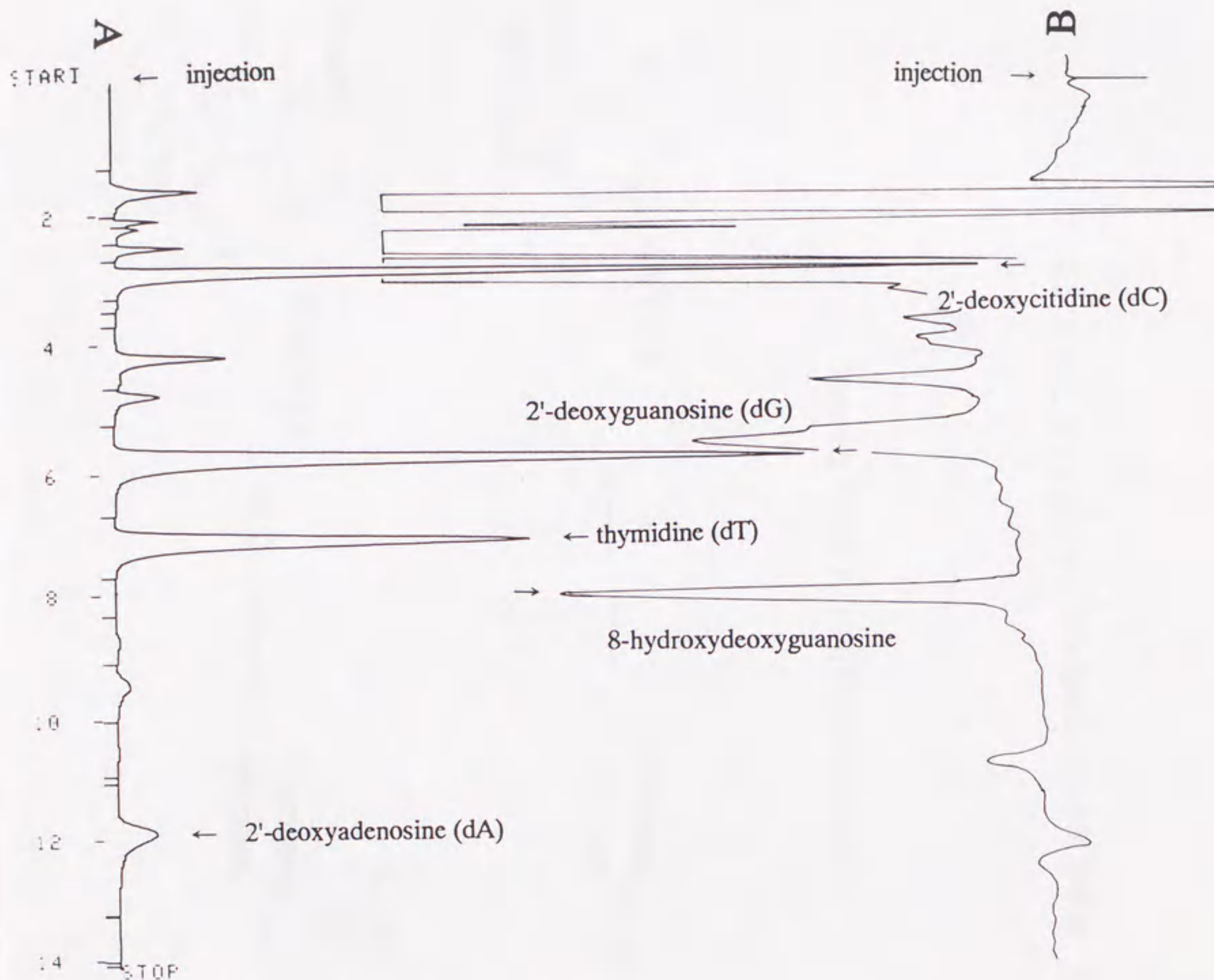


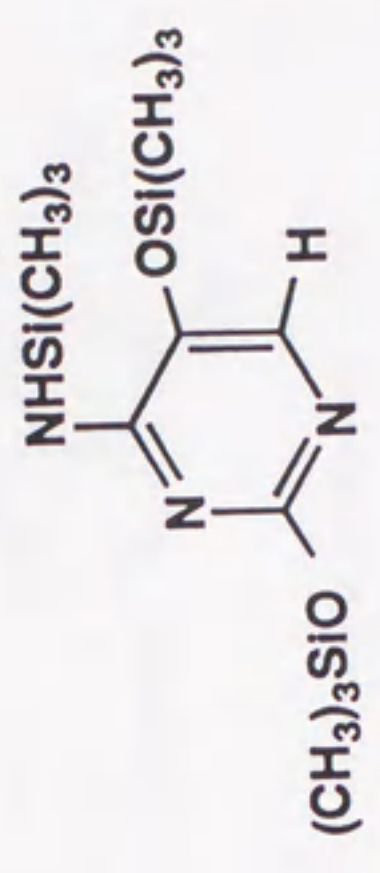
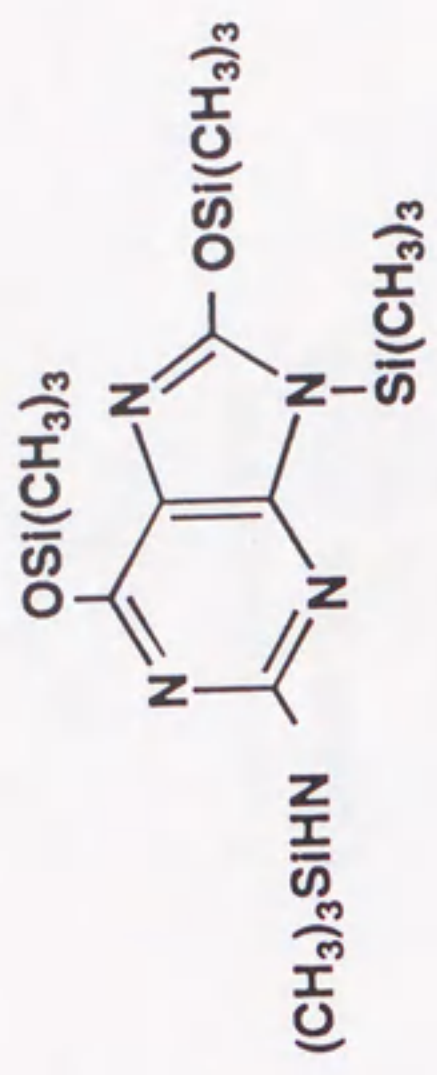
図2-1 HPLC-EC法によって8-OHdGが検出できる様子。

(A) UV 検出器 ($\lambda=290$ nm), (B) EC (5 nA full scale) 検出器のチャート。

サンプル; calf thymus DNA (100 μ g) を酵素でヌクレオシドに分解したものを 50 μ l 注入した。

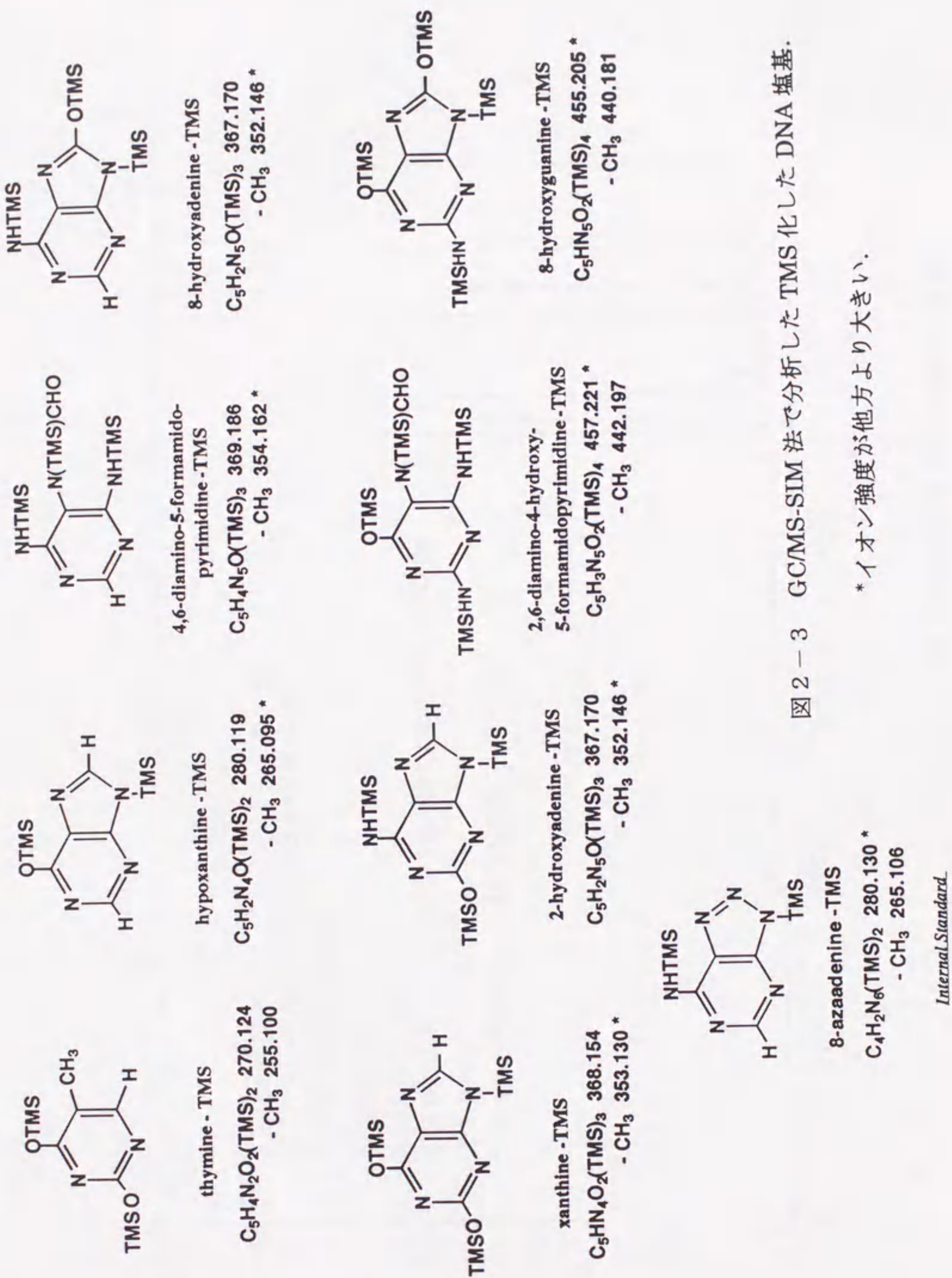
使用したカラム; ODS 15 cm, 移動層; 20 mM の酢酸ナトリウム/10 mM のクエン酸緩衝液, pH 4.3, 水/メタノール, 92/8. 流量; 1 ml/min.

8-OHdG は dT のあとに溶出してくる. calf thymus DNA 中の 8-OHdG の存在量は 10 万個の dG 当たり 6 個. EC で 8-OHdG が感度よく検出できる。



Trimethylsilylation of DNA bases

図 2-2 修飾塩基を GC で分離するため BSTFA で TMS 化する。



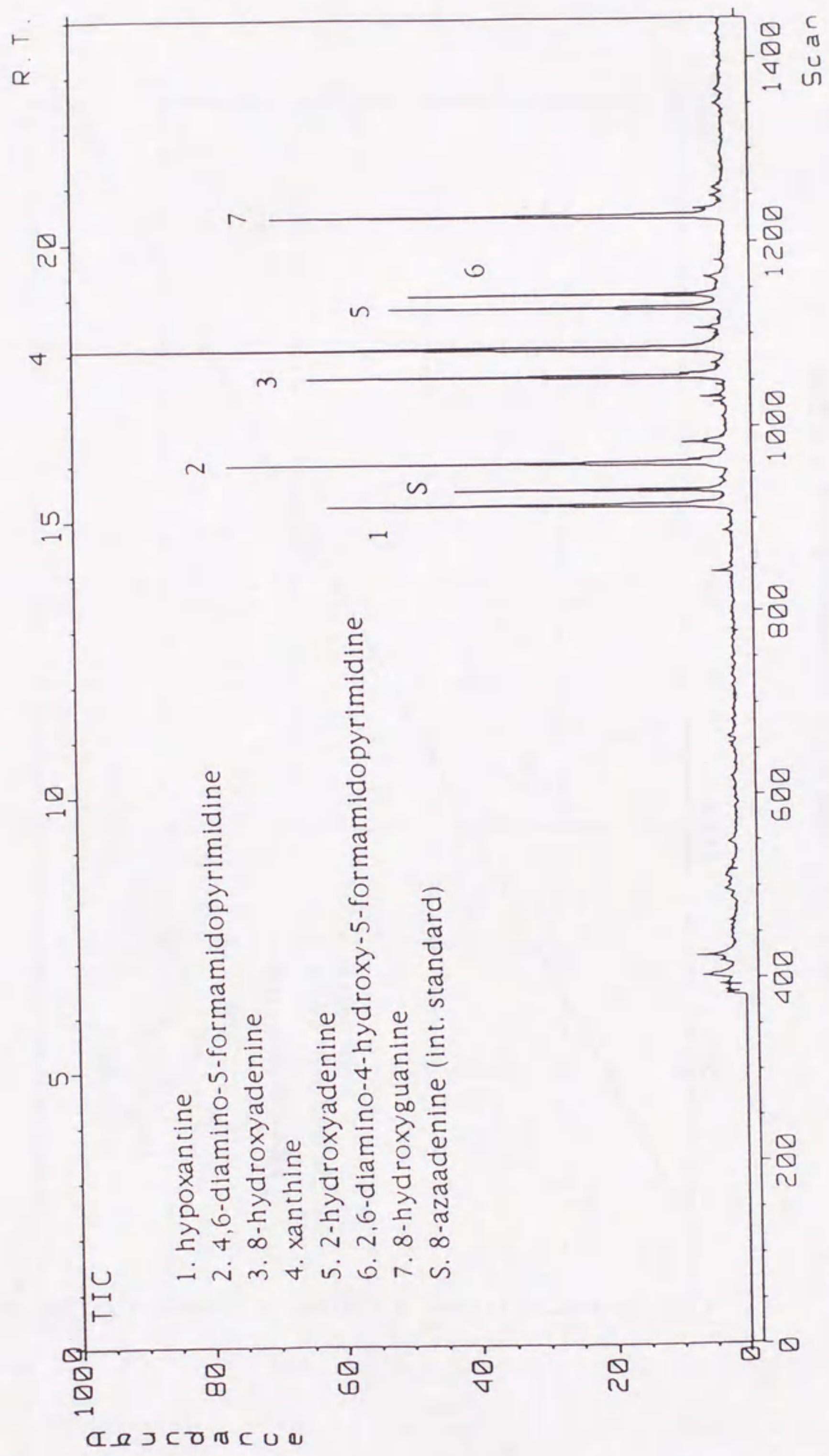


図2-4 TMS化したプリン修飾塩基がGCで分離できる様子.

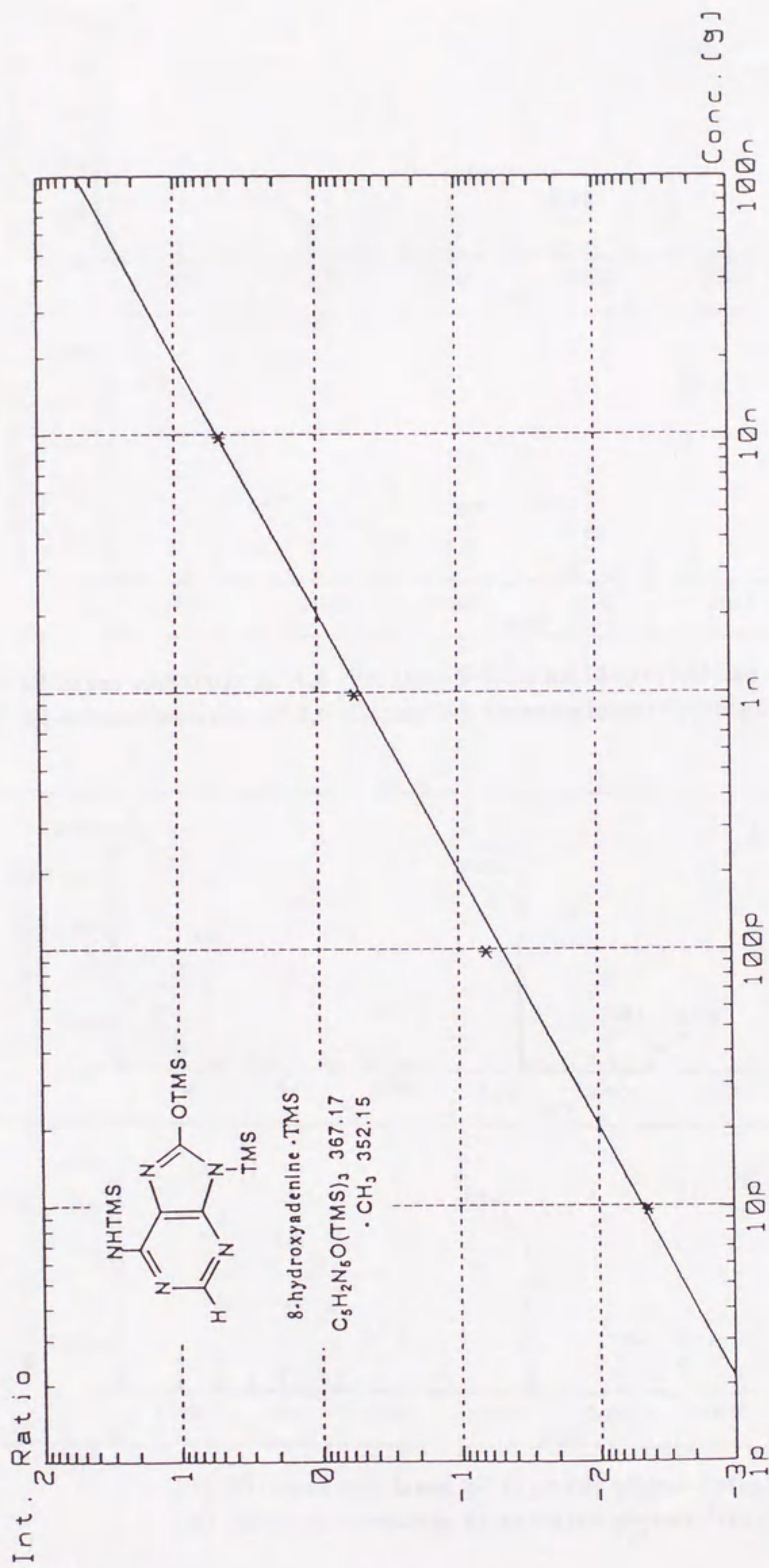
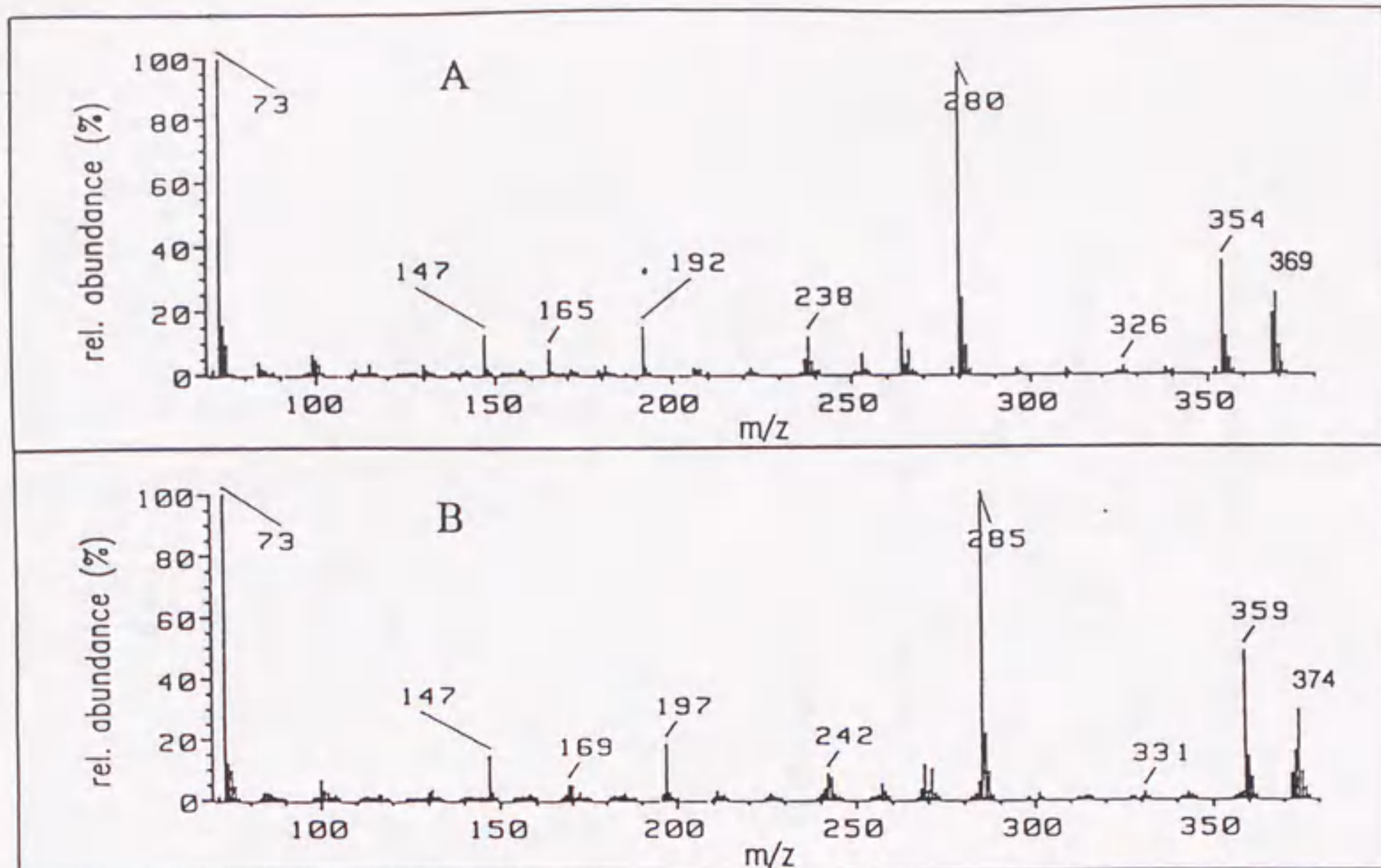
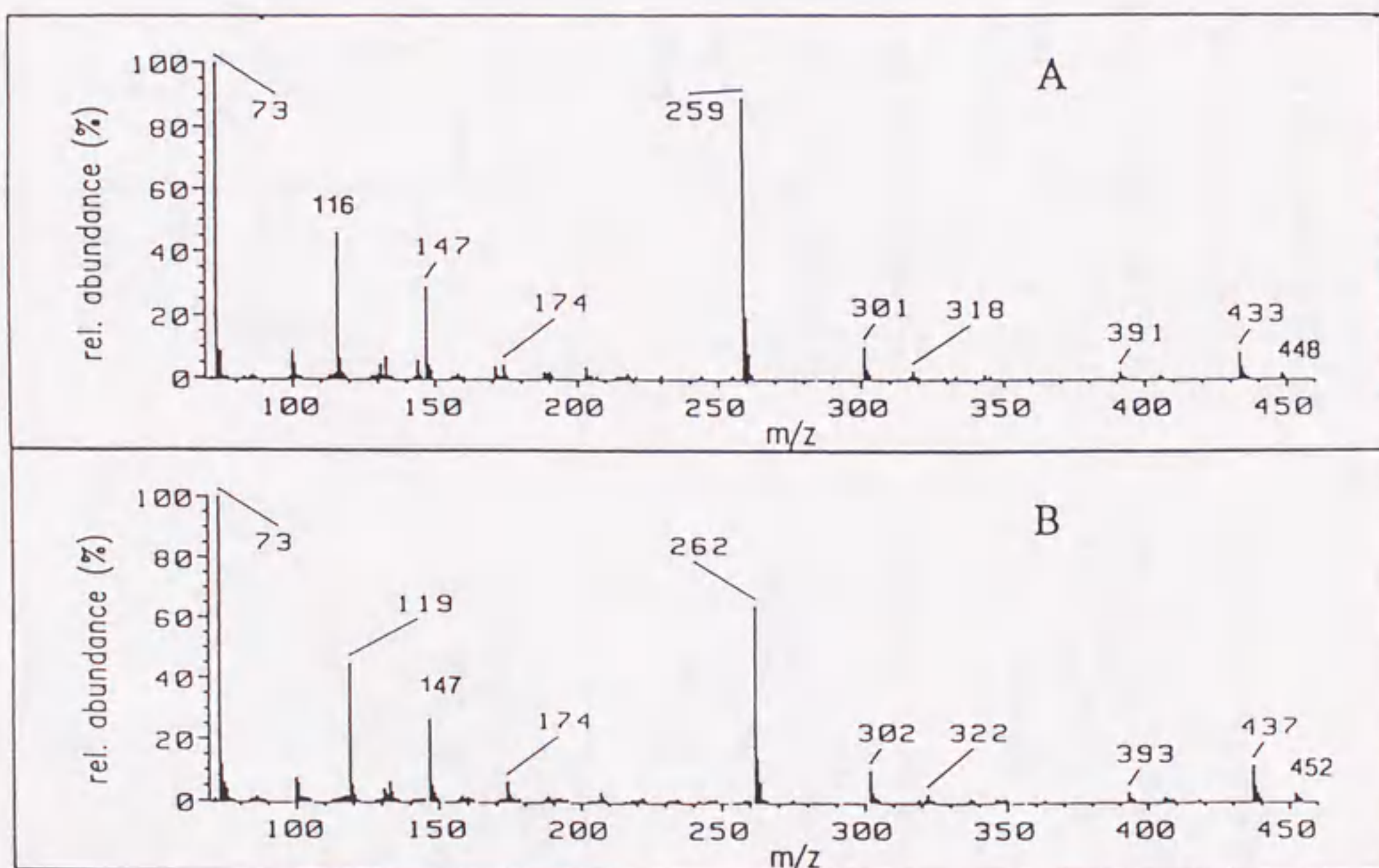


図 2-5 TMS 化した 8-hydroxyadenine の検量線.

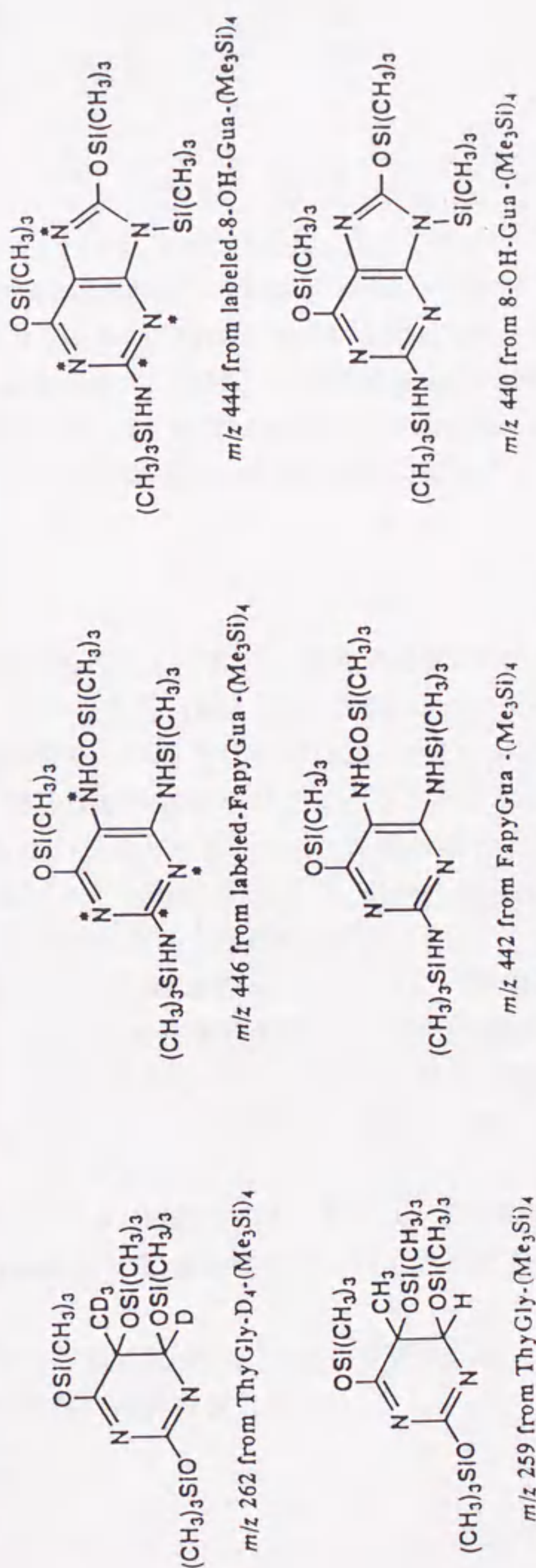
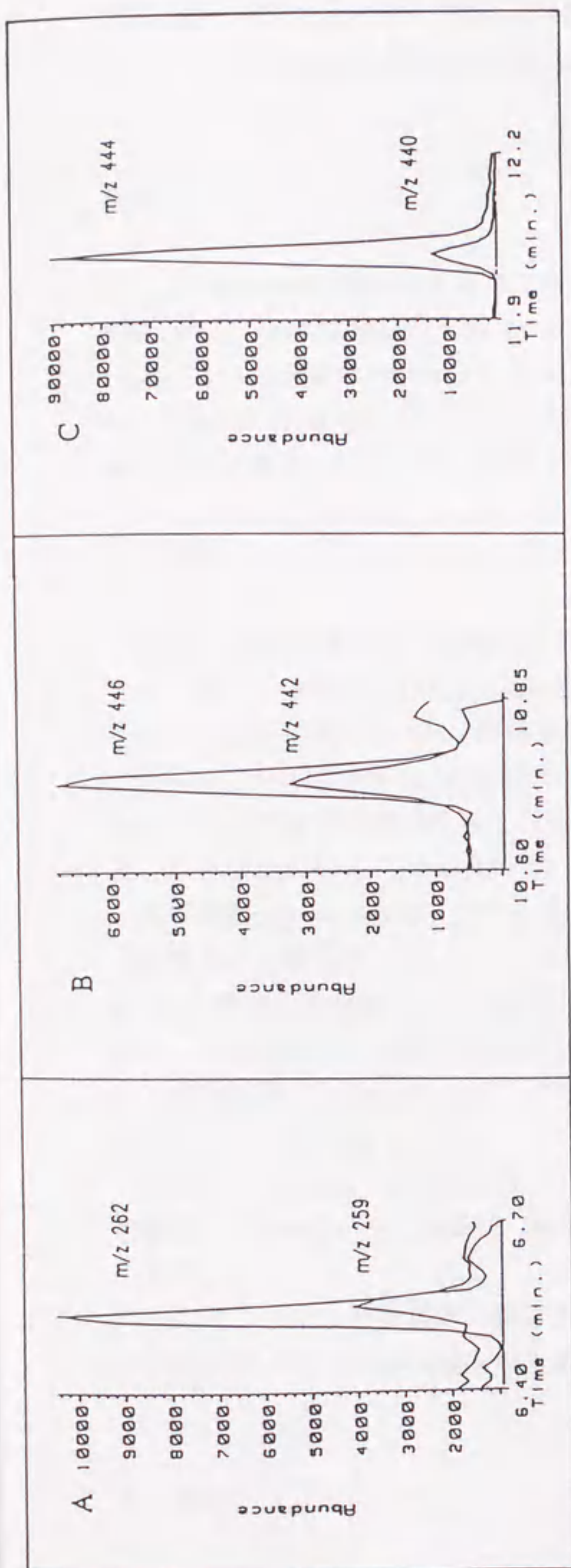


(A) EI-mass spectrum of 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine-(Me₃Si)₃
 (B) EI-mass spectrum of 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine-¹⁵N₃, ¹³C, ²H-(Me₃Si)₃



(A) EI-mass spectrum of thymine glycol-(Me₃Si)₄
 (B) EI-mass spectrum of thymine glycol-²H₄-(Me₃Si)₄

図2-6 TMS化した FapyAde と ThyGly と安定同位体で置換した内部標準の EI mass spectrum.



\dot{N} and \dot{C} mean ^{15}N and ^{13}C , respectively.

図 2 - 7 isotope dilution MS/MS 法で測定した ThyGly, FapyGua と 8-OH-Gua.

第3章 光フェントン試薬と DNA の光反応で生成する 8-hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG)に関する研究

Abstract

A significant formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) was observed in photoirradiation of Photo-Fenton Reagent (1) with calf thymus DNA in maximum yield of 1.1 %. The ten-fold enhancement of the formation of 8-OHdG compared to the control level was observed in photoirradiation of L5178Y cells with 1. The 8-OHdG formation well corresponds to the site specific DNA-cleaving activity of 1 upon photoirradiation.

1. 緒言

DNA の酸化的損傷が、発癌や老化をはじめとして様々な障害の発生に深く関与していることは最近では広く認識されている¹⁻³⁾。DNA が活性酸素によって損傷を受けたときに生成する DNA 修飾塩基が数多く分離されている⁴⁾。中でも 8-OHdG は *in vitro*⁵⁾ および *in vivo*⁶⁾ の実験で、塩基置換の原因となっていることが明らかになり、その測定が比較的簡単に行えるということもあって多くの研究者の注目するところとなっている⁷⁾。8-OHdG はアスベストと過酸化水素⁸⁾、Bleomycin-Fe(II)⁹⁾、一重項酸素(singlet oxygen)¹⁰⁾ や γ 線照射などによって生成する¹¹⁾。

松郷らが合成した光フェントン試薬 (Photo-Fenton Reagent, 1) は、比較的長波長(UVA)の紫外線を吸収して光励起し、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルを発生するユニークな化合物である。 γ 線照射や、金属と過酸化水素の組み合わせでは、 $\cdot\text{OH}$ ラジカル以外に $\text{O}_2\cdot$ や一重項酸素 (singlet oxygen) なども生成するが、この試薬は、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルだけを発生することが特徴である。

興味深いことに、この化合物による DNA の光反応では、グアニンが2個連続する箇所 (-GG- site) が、特異的 (site specific) に損傷を受けていることが明らかになった¹²⁾。

そこでこのような特異的に損傷を受ける塩基部分に、どのような変化が起こっているのかを調べるため 8-OHdG の生成を指標に検討をおこなった。

2. 実験

光フェントン試薬, bis(hydroperoxide), (1) は参考文献 12 に記載した方法で松郷

が合成した。試薬(1)は、使用直前に 10%の acetonitrile を含む 5 mM の tris-HCl buffer (pH 7.4)に溶解させた。

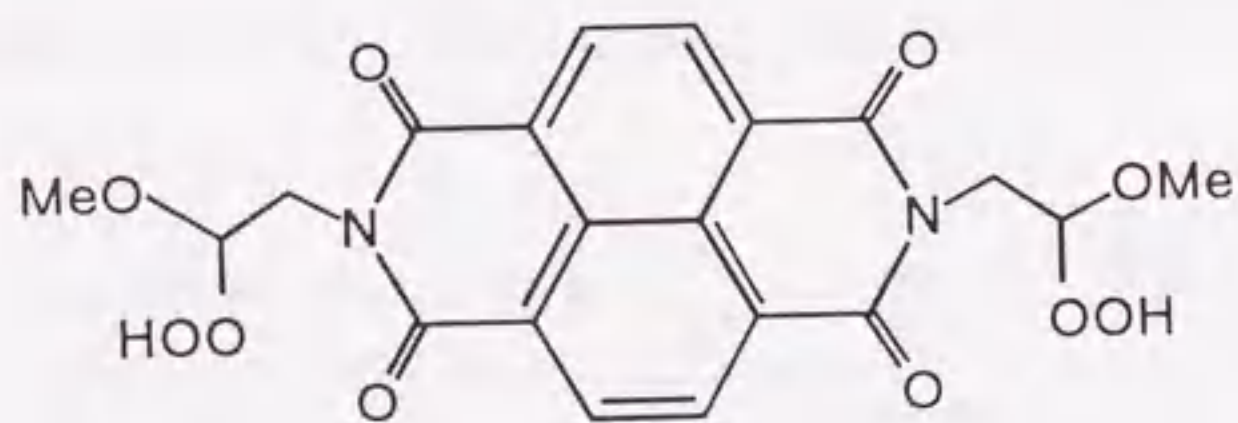
calf thymus DNA と L5178Y 細胞を用いた実験は以下の通り実施した。

L5178Y の培養には CO₂ インキュベーターを使用した。培養条件は、CO₂ の濃度 3.5%、温度 37 °C である。培養液には Fisher's medium を使用し、10%の horse serum と penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml)を加えて 0.45 µm のメンブレンフィルターで除菌した。細胞の生存率はトリパンブルーを用いて確認した。細胞は遠心して集め、5 mM の tris-HCl buffer (pH 7.4)に分散させた。光照射実験をおこなったときの細胞数は 2 x 10⁷ cells/ml である。

試薬 (1) を細胞に加え、氷で冷やししながら、フナコシ製のトランスイルミネーター(366 nm)で 10 cm の距離から 1 時間光照射した。光照射後の細胞の生存率は平均で 80%であった。

光照射した細胞を遠心して集め、ガラス製のホモゲナイザーに移して、DNA 抽出溶液 (10 mM Tris-HCl, 0.1 M EDTA, 0.5% SDS, pH 8.0) 10 ml を加え、数回軽くホモゲナイズした後、タンパク質分解酵素 (proteinase K)を 100 µg/ml になるように加え、50 °C で 3 時間加熱した。その後、フェノールでタンパク質の変性と抽出を行い、DNA を回収した¹³⁾。

抽出した DNA は 2 章に記述した方法によって nuclease P1 と alkaline phosphatase でヌクレオシドにまで分解して、HPLC-EC 法で DNA 中の 8-OHdG 量を測定した¹⁴⁾。



1

3. 結果と考察

光フェントン試薬 (1) が 366 nm の光照射で $\cdot\text{OH}$ ラジカルを発生するということは、すでに ESR スピントラップ法で確認されている^{12a)}。

細胞を試薬 (1) の存在下で光照射し、DNA を抽出し、HPLC-EC 法で DNA 中

の 8-OHdG 量を測定した。その結果を表 2-1 にまとめた。

表 2-1. L5178Y 細胞と光フェントン試薬(1)との光反応で生成した 8-OHdG

| Additive | Concentration/ μ M | 8-OHdG/ 10^5 dG |
|----------|------------------------|-------------------|
| none | --- | 0.7 |
| 1 | 2 | 1.2 |
| 1 | 5 | 1.7 |
| 1 | 10 | 3.4 |
| 1 | 20 | 5.4 |
| 1 | 50 | 7.1 |
| 1 | 100 | 6.9 |

8-OHdG 量は 1 が 50 μ M 以上では飽和してそれ以上増えなかった。

試薬 (1) で光照射した細胞で 8-OHdG の量は、未処理のコントロール細胞にくらべて最大で 10 倍にまで増加した。第 6 章の M10 細胞と L5178Y 細胞の放射線照射実験の章で改めてふれるが、8-OH-Gua は L5178Y 細胞のコバルト 60 γ 線照射で、400 Gy を照射したときに、未照射のコントロールにくらべて 1.6 倍の増加量であった (3.83/2.39, 8-OH-Gua/ 10^5 DNA bases)¹⁵⁾。増加率からみると試薬 (1) の光励起反応で細胞内 DNA に生成する 8-OH-Gua の量は、放射線照射の場合よりも大きい。光照射後の細胞の生存率が 80% ということ併せて考えると、試薬 (1) はその一部が細胞膜を通過して核 DNA へ到達し、DNA に結合して効率よく DNA に損傷を与えていると考えられる¹⁶⁾。

次に比較のため calf thymus DNA と試薬 (1) との反応で生成する 8-OHdG 量を測定した。先ほどの細胞の光照射と同様、calf thymus DNA (0.1 mg/ml) を含む水溶液に試薬 (1) を加えて氷で冷やしながらか 10 cm の高さからトランスイルミネーターで 366 nm の光照射を 1 時間おこなった。

照射後 DNA をエタノール沈殿と遠心で回収し、nuclease P1 と alkaline phosphatase 処理をおこない、8-OHdG 量を測定した。結果は表 2-2 に示したとおりである。

表 2-2. calf thymus DNA と光フェントン試薬 (1) の光反応で生成した 8-OHdG

| Additive | Concentration/ μM | 8-OHdG/ 10^5 dG |
|----------|------------------------------|-------------------|
| None | --- | 25 |
| 1 | 2 | 584 |
| 1 | 5 | 883 |
| 1 | 10 | 1150 |
| 1 | 20 | 822 |
| 1 | 50 | 807 |
| 1 | 100 | 492 |

8-OHdG の生成量は試薬 (1) の濃度が $10 \mu\text{M}$ のときに最大になった。このとき DNA のグアニン残基の約 1% が 8-OH-Gua に変化したことになる。試薬の濃度を $10 \mu\text{M}$ より増やしていくと 8-OHdG の生成量は減少していった。calf thymus DNA の試薬 (1) による光照射と、 γ 線照射での 8-OHdG 生成量を比較してみると、 γ 線照射では 40 Gy の照射で DNA 中のグアニンの 1% が 8-OH-Gua に変化すると報告されている¹⁷⁾。calf thymus DNA 水溶液の放射線照射では、8-OHdG の生成量は 100 Gy 付近まではほぼ直線的に増加するが¹⁷⁾、この実験では $10 \mu\text{M}$ の濃度を境にして、その後減少していった。

この現象を説明する機構として以下の 2 点が考えられる。

その第 1 点は、試薬 (1) は DNA のグアニンの連続する(-GG-)領域に結合して紫外線のエネルギーを吸収し、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルを位置特異的に発生する。 $\cdot\text{OH}$ ラジカルはグアニンと反応して 8-OH-Gua を生じるが、8-OH-Gua の生成量が増えてくると、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルと 8-OH-Gua の反応がおこり、8-OH-Gua の分解がおこるのではないだろうか。

一方 γ 線照射で $\cdot\text{OH}$ ラジカルは溶液中にほぼ均一に発生するため、DNA 中のグアニンだけでなくそれ以外の塩基も $\cdot\text{OH}$ ラジカルと反応する。このため 8-OH-Gua の生成量は 100 Gy 付近まではほぼ直線的に増加していくと考えられる。

最近、メチレンブルーによる光増感反応でグアニンからシトシンへの塩基置換 (G \rightarrow C トランスバージョン) がおこることが報告され注目をあつめている¹⁸⁾。活性酸素によっても G:C \rightarrow T:A の変異以外に、G:C \rightarrow C:G トランスバージョンがおこることが赤坂らによって報告されている¹⁹⁾。G:C \rightarrow T:A の変異には 8-OH-Gua の関与が考えられるが、G:C \rightarrow C:G トランスバージョンの原因となる化合物はまだわかっていないが、8-OH-Gua の分解産物が関与している可能性がある²⁰⁾と指摘された。現在フランスや我が国の研究グループによって、原因物質の探索が活発に研究されている。この光フェントン試薬でも 8-OH-Gua の分解がおこるとすれば、G:C \rightarrow C:G

トランスバージョンの原因物質の解明に役立つかもしれない。

第2点目の機構としては、DNAの二本鎖切断がおこったため、損傷を受けたDNAをエタノール沈殿で十分回収できなかったのではないかということである。

DNA鎖としては calf thymus DNA よりはるかに短いプラスミッドDNAを使った実験をおこなったことがある。プラスミッドDNA (supercoiled circular, ϕ X 174)中のsupercoiled circular (form I)の量は約85%だった。試薬(1)で処理するとform Iは減少し、濃度10 μ Mでは25%であった。さらに試薬の濃度を増やすとform Iは急速に減少した¹²⁾。DNAの二本鎖切断が、calf thymus DNAでもおこり、DNAが断片化して損傷を受けたDNAの一部を失ってしまった可能性もある。

表1-1の結果をみると、試薬(1)はその一部が細胞膜を通過して核に到達して、DNAに損傷を与えていた。試薬(1)がDNAのグアニンが連続する領域に特異的な酸化損傷を与えるということをあわせて考えると、この試薬を活用すれば放射線や発癌物質の生物影響を解明するうえで、有益な情報が得られるのではないかと考えている。

参考文献

- 1) Adelman, R., Saul, R. L. and Ames, B. N., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 2706 (1983).
- 2) Shigenaga, M. K., Park, J.-W., Cundy, K. C., Gimeno, C. J. and Ames, B. N., *Methods in Enzymol.*, **186**, 521 (1990).
- 3) 例えば DNA and Free Radicals, (Halliwell, B. and Aruoma, O. I., Eds.), Ellis Horwood Limited, London (1993).
- 4) Gajewski, E., Rao, G., Nackerdien, Z. and Dizdaroglu, M., *Biochemistry*, **29**, 7876 (1990).
- 5) Shibuya, S., Takeshita, M., and Grollman, A. P., *Nature*, **349**, 431 (1991).
- 6) Wood, M. L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E. and Essigman, J. M., *Biochemistry*, **29**, 7024 (1990).
- 7) Floyd, R. A., *Carcinogenesis*, **11**, 1447 (1990).
- 8) Kasai, H. and Nishimura, S., *Gann*, **75**, 841 (1984); Kasai, H., Crain, P. F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A. and Tanooka, H., *Carcinogenesis*, **7**, 1849 (1986).
- 9) Kohda, K., Kasai, H., Ogawa, T., Suzuki, T. and Kawazoe, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1028 (1989).
- 10) a) Floyd, R. A., West, M. S., Eneff, K. L. and Schneider, J. E., *Arch. Biochem. Biophys.*,

- 273, 106 (1989); b) Schneider, J. E., Price, S., Maitt, L., Gutteridge, J. M. C. and Floyd, R. A., *Nucleic Acids Res.*, **18**, 631 (1990); c) Devasagayam, T. P. A., Steenken, S., Obendorf, M. S. W., Schulz, W. A. and Sies, H., *Biochemistry*, **30**, 6283 (1991).
- 11) Kasai, H., Tanooka, H. and Nishimura, S., *Gann*, **75**, 1037 (1984); Dizdaroglu, M., *Biochemistry*, **24**, 4476 (1985).
- 12) a) Matsugo, S., Kawanishi, S., Yamamoto, K., Sugiyama, H., Matsuura, T. and Saito, I., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **30**, 1351 (1991); b) Saito, I., Takayama, M., Matsuura, T., Matsugo, S. and Kawanishi, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 883 (1990).
- 13) Marmur, J., *J. Mol. Biol.*, **3**, 208 (1961).
- 14) Yamamoto, F., Kasai, H., Togashi, Y., Takeichi, N., Hori, T. and Nishimura, S., *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 508 (1993).
- 15) Mori, T., Hori, Y. and Dizdaroglu, M., *Radiat. Res.*, **140**, 85 (1994).
- 16) The binding constant of **1** to calf thymus DNA as measured by equilibrium dialysis method was 1.50×10^4 . 12a)
- 17) Fischer-Nielsen, A., Jeding, I. B. and Loft, S., *Carcinogenesis*, **15**, 1609 (1994).
- 18) McBride, T. J., Schneider, J. E., Floyd, R. A. and Loeb, L. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6866 (1992).
- 19) Akasaka, S. and Yamamoto, K., *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 500 (1994).
- 20) Buchko, G. W., Wagner, J. R., Cadet, J., Raoul, S. and Weifeld, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1263**, 17 (1995).

第4章 リボフラビン添加の光励起反応で生成する DNA 塩基損傷の特徴に関する研究

Abstract

Calf thymus DNA was photoirradiated in the presence of riboflavin. Altered bases were detected and quantified by the GC/MS-SIM method after hydrolysis and derivatization of DNA. Seven types of modified purine bases were detected in control DNA. Among them, the yields of 8-OH-Gua and FapyGua increased significantly in DNA photoirradiated with riboflavin, whereas the yields of xanthine, 8-OH-Ade, 2-OH-Ade, FapyAde and hypoxanthine were not affected. A dose dependent increase in the formation of 8-OH-Gua was observed with increasing riboflavin concentration for 30 min irradiation. On the other hand, FapyGua reached plateau at 10 µg/ml of riboflavin for 30 min irradiation. Our results indicate that guanine moiety in DNA is the most susceptible to riboflavin mediated photosensitization.

1. 緒言

太陽光が発癌や突然変異を誘発することはよく知られている。それは細胞の DNA が変異を受けるため、その原因となる化合物と機構の解明が活発に研究されている。日光紫外線は DNA に損傷をあたえ、ピリミジンダイマーやピリミジン(6-4)ピリミドン付加体が生成する¹⁾。これらのピリミジン付加体は、DNA 合成酵素の進行を阻害することがわかっている。ヒト遺伝病の色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum) は、ピリミジンダイマーをはじめとして、日光によっておこる DNA の損傷を修復する機構 (ヌクレオチド除去修復機構) に異常があるため、皮膚癌が高頻度で発生すると考えられている。

紫外線照射で DNA 中に主としてピリミジンダイマーが生成するが²⁾、それ以外にわずかではあるが修飾塩基も生じていることが最近あきらかになった³⁾。また紫外線以外に、可視光でも細胞死などの傷害がおこることが知られている⁴⁾。DNA は 320 nm より長波長の光を吸収しないので、可視光による突然変異や細胞死には、光で励起する化合物 (photosensitizer) が関与していることが考えられる。

ところで photosensitizer が関与する酸化反応には、Type I と Type II 型があることがよく知られている。Type I 型の反応というのは、まず光励起した photosensitizer (励起三重項) が基質(substrate)から電子や水素を引き抜ぬき、フリーラジカルや

カチオンラジカルが生じる機構のことをいう。ケトンやキノンなどはこの Type I 型の反応をする。

一方 Type II 型は、光励起した photosensitizer と基底状態の酸素の間でエネルギー移動がおこり、一重項酸素が生じてこれが酸化反応をおこす。この場合、photosensitizer の励起三重項体は、水素引き抜きをほとんどしないのが特徴で、メチレンブルーやローズベンガルなどの色素はこの Type II 型の反応をする。

8-OH-Gua は DNA の複製の際に、かなりの割合でアデニンと対を形成し、G:C → T:A 変異の原因になっていることについてはこれまで述べてきた⁵⁻⁸⁾。8-OH-Gua のヌクレオシド体である 8-OHdG は、HPLC と電気化学検出器の組み合わせで比較的容易に検出できるため、DNA の酸化的損傷のマーカーとして活発に研究されている。

メチレンブルーを添加して可視光を照射すると DNA の酸化がおこり 8-OHdG が生成することが Floyd らによって報告されている⁹⁾。この反応を重水置換でおこなうと 8-OHdG の生成量が増大する。一重項酸素は重水溶媒中では寿命が長くなるので、反応性が上昇する。したがってこの反応系では一重項酸素が発生していると考えられている。またこの場合、DNA のグアニン残基が特異的に酸化を受け、8-OH-Gua 以外に FapyGua も生じていることが GC/MS 法で明らかになっている¹⁰⁾。

ところでリボフラビン (ビタミン B₂) は、細胞内に広く存在しているが、紫外線や可視光を吸収し photosensitizer としても働く。リボフラビンを添加して DNA を照射すると 8-OHdG が生成してくる。この反応系に重水を添加しても 8-OHdG の生成量は変化しないので、Type I 型の酸化反応がおこると考えられている^{11,12)}。8-OHdG が生成することはわかっているが、その他の DNA 修飾塩基についてはこれまで報告がない。

そこでリボフラビン添加の照射でおこる DNA 損傷の特徴を調べるために、第 2 章で述べた GC/MS による測定手法を用いて *in vitro* で DNA の可視光照射実験をおこない、生成物を調べた。

2. 実験

使用した試薬類

N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), hypoxanthine, xanthine, acetonitrile とギ酸 は Wako から, thymine- $\alpha, \alpha, \alpha, 6$ -²H₄ (Thyd₄) は Nacalai Tesque から, calf thymus DNA, 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyAde) と 8-azaadenine は Sigma

から、8-OH-Gua は Aldrich からそれぞれ購入した。

FapyGua¹³⁾, 8-hydroxyadenine (8-OH-Ade)¹⁴⁾, 2-hydroxyadenine (2-OH-Ade)¹⁵⁾ と 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)¹⁶⁾ は、それぞれ第2章で述べたように合成した。

DNA のリボフラビン添加による光照射

リボフラビンを含む calf thymus DNA 水溶液を 21 cm の高さから 150 W の白色ランプで照射した。白色ランプの熱と UV 光を遮断するため、DNA 水溶液と白色ランプの間に 3 リッターの水をビーカーに入れて挿入した。光照射後、DNA をエタノール沈殿で回収した。回収した DNA は、80 %のエタノールで数回洗浄して精製した。コントロール DNA は未照射の DNA を用いた。

酸加水分解とサンプルの TMS 化

約 200 μg の DNA をガラス管に入れて、8-azaadenine (2 nM) と Thyd₄ (20 nM) を内部標準として加えた。サンプルを凍結乾燥後、60 %のギ酸 0.5 ml を加えて脱気封管し、130 °C で 30 分加熱した。その後再度凍結乾燥し、スクリューキャップ付のバイアルビン (2 ml) で乾燥窒素を流しながら BSTFA/acetonitrile (4/1; v/v), 0.1 ml を加えて蓋をして、130 °C で 30 分間加熱して TMS 化した。

GC/MS 測定

誘導化したサンプルを GC/MS-selected-ion monitoring (GC/MS-SIM) 法で測定した。使用した機器は日本電子データムの JMA-DX-303 mass spectrometer である。GC 部分は Hewlett-Packard の 5890 gas chromatograph で、カラムは fused silica capillary column (Supelco; SPB-5, 12 m x 0.2 mm i.d., coated with crosslinked 5% phenylmethyl silicone, film thickness 0.33 μm) を使用した。サンプルの導入口 (injection port), GC/MS 連結部分と MS のイオン源は、いずれも 250 °C に設定した。

サンプル 1 μl をスプリットレスモード (splitless mode) で GC へ注入した。カラムの昇温条件は次のとおり。

初期温度は 125 °C で 2 分間保持した後、125 °C ~ 175 °C の間を、8 °C/min で昇温し、175 °C に 2 分間保持。175 °C ~ 220 °C は 30 °C/min で昇温、220 °C になったところで 1 分間保持。その後 220 °C ~ 280 °C は 40 °C/min で昇温して、最終温度 280 °C を 3 分間保持した。キャリアガスはヘリウムを使用した (column inlet pressure, 70 kPa)。

JEOL mass spectrometer の ionization current と electron multiplier はそれぞれ 100 μA

と 1.4 kV に設定した。チミンがカラムから出た後 (サンプル注入後約 3 分), electron multiplier を 1.9 kV に変更して MS の感度を上げた。マススペクトルは EI mode, 70 eV で得た。

DNA 修飾塩基の量は, それぞれの検量線から計算で求めた。またサンプル中の DNA の濃度はチミンと Thyd₄ の比から求めたことなど, 第 2 章で記述したとおりである¹⁷⁾。

3. 結果と考察

通常 DNA 中に生じる DNA 修飾塩基の量はわずかであり, その検出には困難がともなうが, GC/MS-SIM 法を応用することにより, 一回のサンプル注入で複数の化合物の同定と定量が可能になる¹⁸⁻²⁰⁾。リボフラビンを添加して可視光照射した calf thymus DNA を回収後, ギ酸で酸加水分解を行い, TMS 化の後 GC/MS-SIM 法で修飾塩基の測定をおこなった。

コントロールの DNA からプリン塩基由来の 7 種類の化合物 8-OH-Gua, FapyGua, xanthine, 8-OH-Ade, 2-OH-Ade, FapyAde と hypoxanthine を検出することができた。図 4-1 にそれを示す。

リボフラビンの濃度 5 µg/ml, 30 分の可視光照射で 8-OH-Gua と FapyGua だけがコントロールにくらべて有意に増加した。残りの 5 つの化合物は変化しなかった。それぞれの収率を表 4 にまとめた。緒言でふれたように DNA 水溶液^{10, 11)}や細胞²¹⁾に, リボフラビンを添加して光照射すると, 8-OH-Gua が生じることはすでにわかっているが, FapyGua の生成を確認したのはこれが最初である。

表4 リボフラビンを添加して光照射したときの修飾塩基の生成量

| Base | control ⁽¹⁾ | photoirradiated ⁽²⁾ |
|--------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| | (molecules/10 ⁵ DNA bases) | |
| 8-OH-Gua | 10.6 ± 1.4 | 68.0 ± 3.5* |
| FapyGua | 6.8 ± 0.5 | 40.3 ± 4.4* |
| xanthine | 27.8 ± 7.5 | 30.2 ± 2.8 |
| 8-OH-Ade | 3.2 ± 0.7 | 3.2 ± 1.3 |
| 2-OH-Ade | 1.2 ± 0.2 | 1.4 ± 0.4 |
| FapyAde | 1.8 ± 0.5 | 1.9 ± 1.2 |
| hypoxanthine | 38.6 ± 6.4 | 39.2 ± 1.4 |

(1): 光未照射.

(2): リボフラビン濃度, 5 µg/ml 30 分間照射.

値はいずれも 3 回測定した平均値.

*コントロールに比べて有意に増加した値 (p < 0.05).

次に 8-OH-Gua と FapyGua の生成の特徴を調べるため, 照射時間を 30 分に固定して, リボフラビンの濃度を 1.25~10 µg/ml に変化させ, それぞれの生成量をもとめた。8-OH-Gua と FapyGua の生成量は図 4-2 のとおりである。

8-OH-Gua はリボフラビンの濃度 10 µg/ml まで, ほぼ直線的に増加したが, FapyGua は 10 µg/ml で飽和した。

Ito らは calf thymus DNA をリボフラビン存在下, 365 nm の UV 照射をおこない hot piperidine で処理すると, 5'-GG-3'部分の 5'側のグアニンの位置で DNA の切断がおこることを報告している¹²⁾。DNA を hot piperidine で処理すると, DNA 塩基に損傷がある場合や, 塩基が脱落した箇所で DNA の糖鎖が切れることがわかっている²²⁾。前章の bis(hydroperoxide)化合物 (1)でも, 同様の位置で切断がおこった。これと同じ現象は, 光励起して酸化反応をおこす化合物, Ru(II) 錯体や naphthalimide 化合物で, 報告があいついでいることはたいへん興味深い²³⁻²⁵⁾。

今回の GC/MS-SIM 法を用いた修飾塩基の研究から, 8-OH-Gua と FapyGua の増加が確認されたが, 同じ化合物はメチレンブルーを使った光照射でも生じていることは本章の緒言で述べたとおりである。メチレンブルーでは一重項酸素が酸化反応を起こしている (Type II)。一方リボフラビンの光照射では, まずリボフラビンが光励起して励起三重項体が生じ, これが基質から電子を引き抜く (Type I)。グアニンは DNA 塩基のなかで最もイオン化ポテンシャルが低く, カチオンラジカルを生

成しやすい²⁶⁾。グアニンカチオンラジカルが生成し、引き続いて一電子酸化(one-electron oxidation)されると 8-OH-Gua が、また一電子還元(one-electron reduction)で FapyGua が生じる²⁷⁾。8-OH-Gua と FapyGua が生成することから、グアニンカチオンラジカルが反応中間体として生じていることが強く示唆される。

DNA の酸加水分解を脱気封管しておこなえば、プリン系の修飾塩基は artifact として生成しないことは、すでに予備実験で確かめているが、8-OH-Gua から FapyGua が生じることはないのかという疑問がしばしばだされることがある。反応機構からは考えにくいですが、念のため 8-OHdG を DNA と同様に、ガラス管中で脱気封管して 60% のギ酸 0.5 ml を加え 130 °C で 30 分間加熱処理した。凍結乾燥後、このサンプルを TMS 化して GC/MS-SIM 測定をおこなった。その結果、8-OH-Gua が化学量論的に生成し、FapyGua は生じなかった。

最近報告された GC/MS 法による DNA 修飾塩基の測定値を参照すると、未処理の calf thymus DNA 中のプリン修飾塩基の存在量は、表 4 に示した値とよく一致している^{28, 29)}。

さらに確認のため、第 3 章で使用した bis(hydroperoxide) (1) で処理した calf thymus DNA を 8-OHdG については HPLC-EC 法で、8-OH-Gua は GC/MS-SIM 法で測定したところ、値は両者で一致した³⁰⁾。このことから本実験で使用した HPLC-EC と GC/MS の両測定システムは、十分信頼できるといえる。従来おこなわれてきた研究で、両システムを同じ研究室で使って比較検討した例はほとんどない。

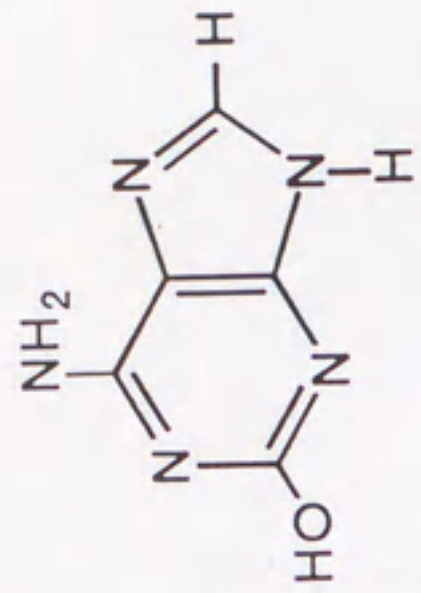
8-OH-Ade, 2-OH-Ade, FapyAde, xanthine と hypoxanthine についてはこの実験で変化しなかった。もしこの反応系で $\cdot\text{OH}$ ラジカルが生成していれば、8-OH-Gua と FapyGua 以外に、8-OH-Ade, 2-OH-Ade, FapyAde も生成するはずである。xanthine と hypoxanthine は、 $\text{NO}\cdot$ などの酸化窒素化合物が発生する場合に生成する³¹⁾。これらの化合物が生成していないことは、リボフラビンの光励起反応では $\cdot\text{OH}$ ラジカルも、 $\text{NO}\cdot$ も発生していないことを意味している。

以上要約すると、calf thymus DNA をリボフラビン存在下で可視光照射をおこないプリン系の修飾塩基を GC/MS-SIM 法で調べた。コントロール DNA 中に 8-OH-Gua, FapyGua, xanthine, 8-OH-Ade, 2-OH-Ade, FapyAde と hypoxanthine が含まれていることを確認した。リボフラビンを添加して可視光照射すると 8-OH-Gua と FapyGua だけが増加し、他は変化しなかった。これはリボフラビンを含む DNA の光照射で、DNA 中のグアニンが優先的に損傷を受けるというこれまでの実験事実とよく一致している。

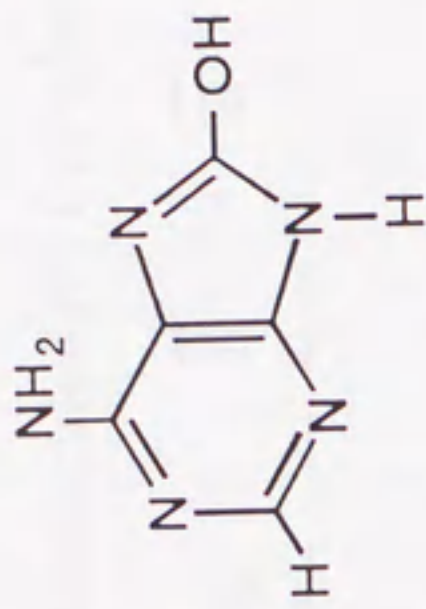
参考文献

- 1) Cadet, J., and Vigny, P. *in* Bioorganic Photochemistry (Morrison, H., Ed.) Vol. 1, pp. 1-272, J. Wiley & Sons, N. Y. (1990).
- 2) Kielbassa, C., Roza, L., and Epe, B., *Carcinogenesis*, **18**, 811 (1997).
- 3) Doetsch, P. W., Zastawny, T. H., Martin, A. M., and Dizdaroglu, M., *Biochemistry*, **34**, 737 (1995).
- 4) Bradley, M. O., and Sharkey, N. A., *Nature*, **266**, 724 (1977).
- 5) Shibutani, S., Takeshita, M., and Grollman, A. P., *Nature*, **349**, 431 (1991).
- 6) Wood, M. L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E., and Essigmann, J. M., *Biochemistry*, **29**, 7024 (1990).
- 7) Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S., and Loeb, L. A., *J. Biol. Chem.*, **267**, 166 (1992).
- 8) Moriya, M., Ou, C., Bodepudi, V., Johnson, F., Takeshita, M., and Grollman, A. P., *Mutat. Res.*, **254**, 281 (1991).
- 9) Floyd, R. A., West, M. S., Eneff, K. L., and Schneider, J. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **273**, 106 (1989).
- 10) Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J., and Dizdaroglu, M., *Biochemistry*, **31**, 106 (1992).
- 11) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Berger, M., and Cadet, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9692 (1992).
- 12) Ito, K., Inoue, S., Yamamoto, K., and Kawanishi, S., *J. Biol. Chem.*, **268**, 13221 (1993).
- 13) Cavalieri, L. F., and Bendich, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2587 (1950).
- 14) Fuciarelli, A. F., Wegher, B. J., Gajewski, E., Dizdaroglu M., and Blakely, W., *Radiat. Res.*, **119**, 219 (1989).
- 15) Bendich, A., Tinker J. F., and Brown, G. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3109 (1948).
- 16) Kasai, H., and Nishimura, S., *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2137 (1984).
- 17) Djuric, Z., Luongo, D. A., and Harpwe, D. A., *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 687 (1991).
- 18) Dizdaroglu, M., *Free Radic. Biol. Med.*, **10**, 225 (1991).
- 19) Mori, T., Hori, Y., and Dizdaroglu, M., *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**, 645 (1993).
- 20) Mori, T., and Dizdaroglu, M., *Radiat. Res.*, **140**, 85 (1994).
- 21) Yamamoto, F., Nishimura, S., and Kasai, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **187**, 809 (1992).
- 22) Maxam, A. M., and Gilbert, W., *Methods in Enzymol.*, **65**, 499 (1980).
- 23) Stemp, E. D. A., Arkin, M. R., and Barton, J. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 2921 (1997).
- 24) Saito, I., Takayama, M., Sugiyama, H., Nakatani, K., Tsuchida, A., and Yamamoto, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 6406 (1995).

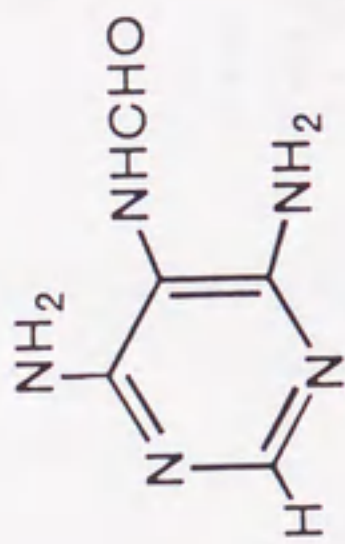
- 25) Sugiyama, H., and Saito, I., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7063 (1996).
- 26) Orlov, V. M., Smirnov, A. N., and Varshvsky, Y. M., *Tetrahedron Lett.*, **48**, 4377 (1976).
- 27) Steenken, S., *Chem. Rev.*, **89**, 503 (1989).
- 28) Spencer, J. P. E., Wong, J. Jenner, A., Aruoma, O. I., Cross, C. E., and Halliwell, B., *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 1152 (1996).
- 29) deRojas-Walker, T., Tamir, S., Ji, H., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R., *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 473 (1995).
- 30) Takeuchi, T., Matsugo, S., and Mori, T., *unpublished data*.
- 31) Wink, D. A., Kasprzak, K. S., Maragos, C. M., Elespuru, R. K., Misra, M., Dunams, T. M., Cebula, T. A., Koch, W. H., Andrews, A. W., Allen, J. S., and Keefer, L. K., *Science*, **254**, 1001 (1991).



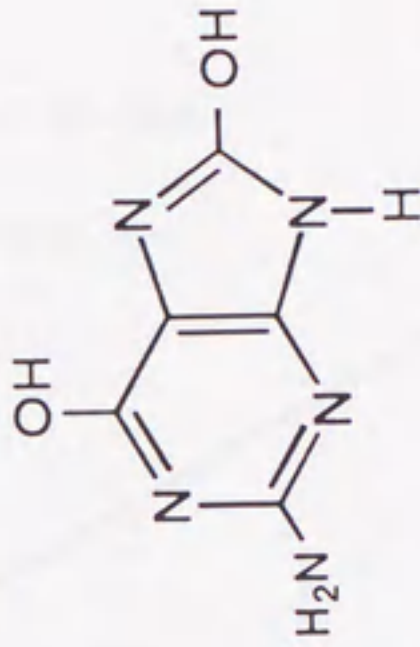
2-hydroxyadenine



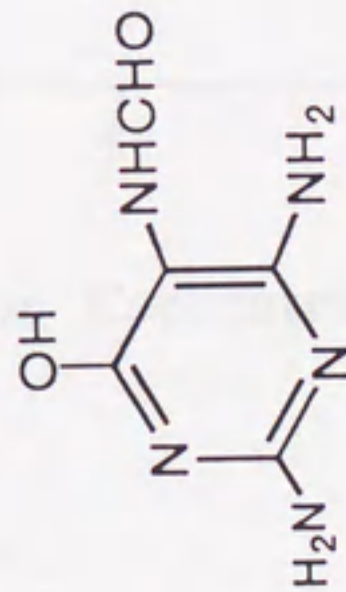
8-hydroxyadenine



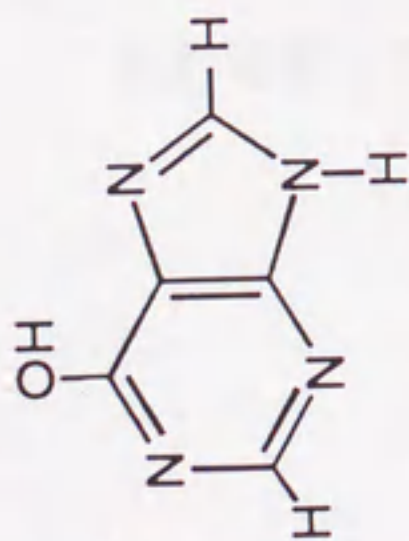
4,6-diamino-5-formamido-
pyrimidine



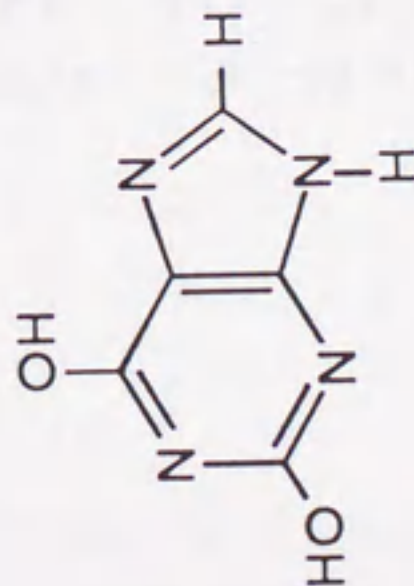
8-hydroxyguanine



2,6-diamino-4-hydroxy-
5-formamidopyrimidine



hypoxanthine



xanthine

図4-1 GC/MS-SIM法で検出したプリン系の修飾塩基.

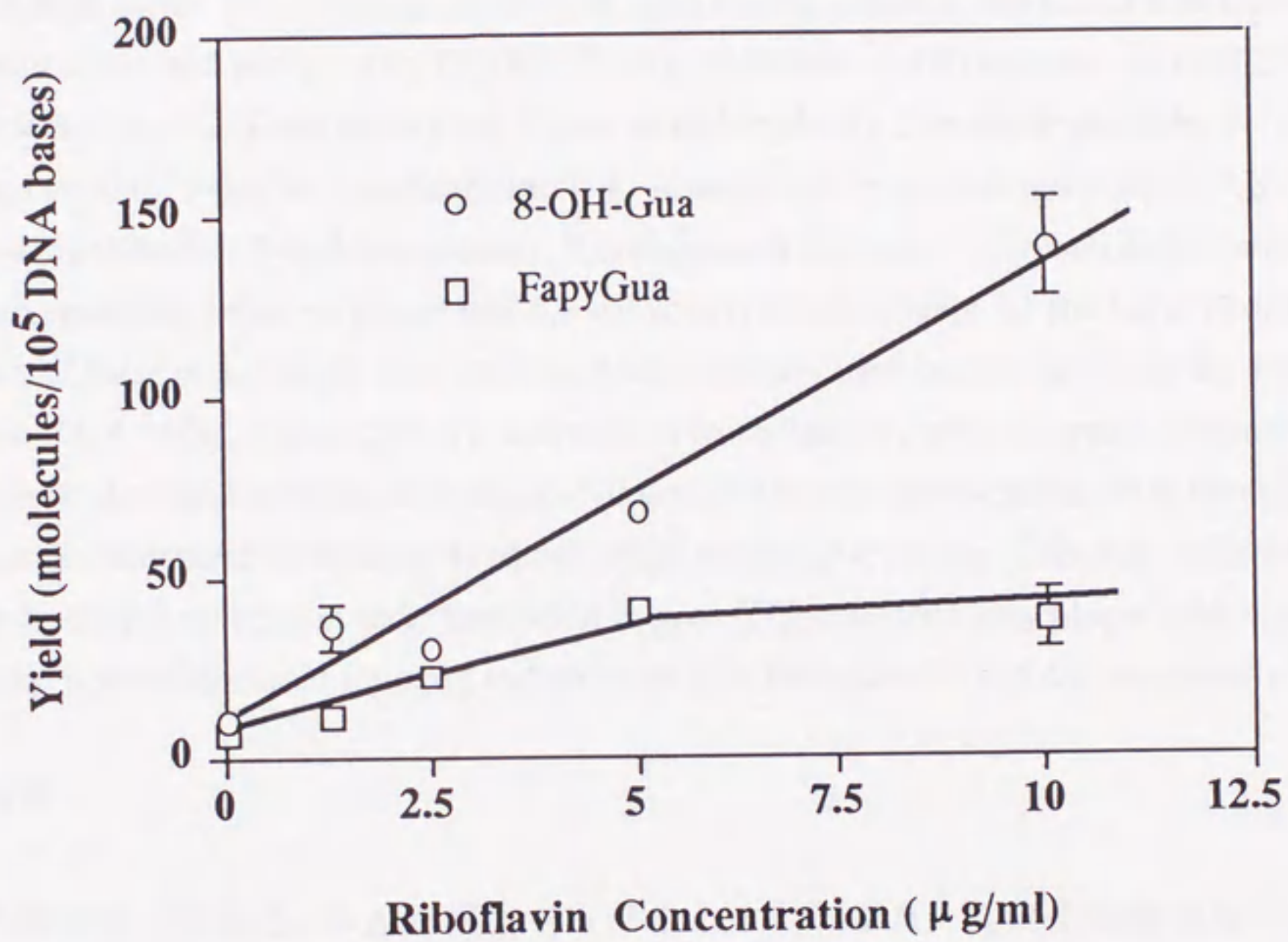


図4-2 リボフラビンの濃度を変えたときの8-OH-GuaとFapyGuaの生成量の変化。
照射時間：30分間；各点のデータは3回の平均値。

第5章 マウスの全身放射線照射で肝臓クロマチンに生成する DNA 塩基損傷に関する研究

Abstract

DNA base lesions in hepatic chromatin formed upon whole-body irradiation of mice were studied. After γ -irradiating (20-470 Gy) and killing animals, chromatin was isolated from their livers and analyzed by GC/MS. Five pyrimidine- and five purine-derived DNA lesions were identified and quantified. These were 5-hydroxy-5-methylhydantoin, 5-hydroxycytosine, 5-(hydroxymethyl)uracil, 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, 7,8-dihydro-8-oxoadenine, 2-hydroxyadenine, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, 8-hydroxyguanine, thymine glycol and 5,6-dihydroxyuracil. Except for the latter two, the amounts of these compounds were increased significantly over control levels in the dose range of 100-470 Gy. Above 200 Gy, a deviation from linearity was observed, although the yields were increased in most cases up to 470 Gy. The modified bases that were identified are typically produced by hydroxyl radical attack on the DNA bases. This may indicate a role for hydroxyl radicals in their formation in vivo. These lesions may play a role in the biological consequences of ionizing radiation such as mutagenesis and carcinogenesis.

1. 緒言

遺伝情報をつたえる DNA が損傷をうけると、突然変異、発癌や細胞死などの傷害がおこる¹⁾。放射線が細胞中の DNA に損傷を与えることはよく知られている。細胞中の巨大高分子 DNA が放射線によって受ける損傷には、直接的に受ける損傷と間接的に受ける損傷の二種類がある²⁾。

DNA が直接的に受ける損傷というのは、細胞中の DNA それ自身が放射線によってイオン化され、DNA 鎖上にプラスとマイナスのイオンが生成することがきっかけとなっておこる損傷のことをいう。この反応の素過程については理論的に、また極低温状態での吸収スペクトルや ESR 測定などを用いて、DNA に生じるイオンやラジカルなどの活性種が活発に研究されてきた。

一方 DNA が間接的に受ける損傷というのは、細胞に多量に含まれる水が放射線のエネルギーを吸収して、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルや水和電子 (e_{aq}^-) さらには水素ラジカル ($\cdot\text{H}$) など活性なフリーラジカルが生成し、これらが DNA と反応することによっておこる損傷のことをいう。細胞の DNA が放射線によって受ける直接的および間接的な損傷の割合は、約 1 対 4 程度と見積もられている。

$\cdot\text{OH}$ ラジカルや水和電子 (e_{aq}^-), 水素ラジカル ($\cdot\text{H}$) はきわめて活性が高く, DNA とすみやかに反応する。なかでも $\cdot\text{OH}$ ラジカルは DNA に酸化的損傷 (oxidative damage) をあたえるためその影響は生物にとって極めて深刻と考えられている。

$\cdot\text{OH}$ ラジカルは強力な酸化剤であり, 有機化合物とは, 付加または水素引き抜きなどの反応をする。DNA 分子にたいしては, おおまかに見積もって塩基の部分に約 80%, 糖鎖の部分に 20% の割合で反応すると考えられている。その結果, チミン, アデニン, シトシン, グアニンの DNA 塩基は様々な修飾(modification)を受ける。そして DNA 中に本来存在しない修飾塩基が生成し, それらは正常な塩基の機能を乱し, 遺伝情報を混乱させることになる。

放射線によって生じる DNA 損傷には, DNA 塩基や糖の modification, DNA の切断, DNA-タンパク質の結合, 塩基が脱離して生じる abasic site など多様である³⁻⁶⁾。これら放射線によって誘起される DNA の損傷を化学的に明らかにすることは, 放射線の生物影響を解明するうえで重要であり, 化学と生物学, 医学などとの境界領域の研究として意義がある。

放射線の生物影響を解明するために, 放射線照射した DNA 塩基の変化を化学的に同定し, 定量する試みがこれまでさまざまな手段をつかって数多くなされてきた^{4,6)}。しかし細胞中の DNA に実際にどのような化学変化がおるのかという点については, 葛西らの先駆的な研究以後ほとんどなされてこなかった⁷⁾。

本研究ではマウスを用いてコバルト 60 γ -線による全身放射線照射をおこない, 照射後すみやかに肝臓を摘出して, 肝細胞中に生じる DNA 塩基の修飾化合物を同定して定量することを試みた。

2. 実験

使用した試薬類

Isobarbituric acid (5-hydroxyuracil), 5-(hydroxymethyl)uracil (5-OHMeUra), 2-hydroxyadenine (2-OH-Ade) と 6-azathymine は Sigma から購入した。5-hydroxy-5-methylhydantoin (5-OH-5-MeHyd), isodialuric acid (5,6-dihydroxyuracil (5, 6-diOH-Ura)), 5-hydroxycytosine (5-OH-Cyt), 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyAde), 8-hydroxyadenine (8-OH-Ade), 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua), 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua) と, これらの化合物の一部を安定同位体で置換した 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine-1,3- $^{15}\text{N}_2$ -2- ^{13}C -(5-aminoformyl- ^{15}N , ^2H), 8-hydroxyadenine -1,3,7- $^{15}\text{N}_3$ -2,8- $^{13}\text{C}_2$, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine-1,3- $^{15}\text{N}_2$ -(5-amino- ^{15}N)-2- ^{13}C と 8-hydroxyguanine-1,3- $^{15}\text{N}_2$ -(2-amino- ^{15}N)-2- ^{13}C は Program

Resources, Inc./Dyncorp, National Cancer Institute-FCRD (Frederick, MD, USA) から購入した。thymine- $\alpha,\alpha,\alpha,6\text{-}^2\text{H}_4$ と cis-thymine glycol- $\alpha,\alpha,\alpha,6\text{-}^2\text{H}_4$ は Merck & Co. Inc./Isotopes より, ギ酸 は Mallinckrodt から購入した。thymine glycol (ThyGly) は Dr W. F. Blakely (The Armed Forces Radiobiology Research Institute, Bethesda, MD, USA) のご好意で提供していただいた。acetonitrile と 1% の trimethylsilylchlorosilane を含む *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) は Pierce Chemical Co. から購入した。

使用したマウスと照射条件

4週令の ICR マウスは Charles River Japan から購入した。マウスは 10 匹ごとに分けて大阪府立大学先端科学研究所 (大府大・先端研) の動物飼育実験施設で飼育・管理した。マウスの全身放射線照射には, 1 匹ずつプラスチック製の照射ケースに入れて固定し, 先端研のコバルト 60 γ -線照射施設で照射した。使用した線量は 20 Gy/min (Fricke 化学線量計で決定) であった。

1 回の照射にはマウスを 3 匹使用した。照射後すみやかにマウスを解剖し, 肝臓を摘出して, 除血した後に液体窒素で凍結した。照射後, 液体窒素で肝臓を凍結するまでに要した時間は平均 15 分であった。肝臓クロマチン (DNA) を抽出するまで臓器は $-80\text{ }^\circ\text{C}$ で凍結保存した。

肝臓クロマチンの抽出

1 g の肝細胞をガラス製のホモゲナイザーに移し, 0.1 mM の phenylmethanesulfonyl fluoride を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 10 ml でホモゲナイズした。この中には臓器の組織細胞が混在していたので, 100-mesh の白金製の網を用いて細胞を濾過した。同様の操作をもう一度くりかえした後, 肝細胞を 300 g, 5 分間遠心して集めた。クロマチンの抽出操作は次頁にしめす手順でおこなった⁸⁾。これらの操作はすべて氷温 ($4\text{ }^\circ\text{C}$) でおこない, 抽出した肝臓クロマチン中の DNA 量は 260 nm の吸光度から 1 OD = 50 μg DNA と評価した。

マウスの放射線照射と肝臓クロマチンの抽出は, 大阪府立大学・先端科学研究所でおこない。凍結乾燥したサンプルを National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA の Dizdaroglu 研究室へ送り, GC/MS による分析をおこなった。

Chromatin isolation

1: sucrose buffer containing

| | <u>g/liter</u> |
|-----------------------------------------------|----------------|
| 0.25 M sucrose | 85.6 |
| 3 mM CaCl ₂ | 0.441 |
| 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 | 6.06 |
| 0.1 mM PMSF (phenylmethanesulphonyl fluoride) | 0.0174 |
| 0.1 mM DTT (dithiothreitol) | 0.0154 |

2:

the buffer as above plus 1% (1 ml in 100 ml) Triton X-100 (mix well before use).

3:

| | <u>g/liter</u> |
|------------------------------------------|----------------|
| a) 50 mM Tris-HCl + 0.1 mM PMSF (pH 7.4) | 6.06 + 0.0174 |
| b) 10 mM Tris-HCl + 0.1 mM PMSF (pH 7.4) | 1.21 + 0.0174 |
| c) 5 mM Tris-HCl + 0.1 mM PMSF (pH 7.4) | 0.606 + 0.0174 |
| d) 1 mM Tris-HCl + 0.1 mM PMSF (pH 7.4) | 0.121 + 0.0174 |

4:

1 mM phosphate buffer (pH 7.4) treated with chelex (adjust the pH after chelex treatment).

Procedure: (keep all buffers at 4°C).

- 1) spin cells at 300 g for 5 min, then remove the medium.
- 2) add 10 ml of buffer 1 to 1×10^8 cells, homogenize by gentle shaking, and leave them on ice for 10 min.
- 3) spin the cells at 300 g for 10 min, then remove the buffer. Suspend the pellet in 10 ml of buffer 2 (containing Triton) (10 ml for 1×10^8 cells). Shake well, keep them on ice for 20 min (pellet = nuclei).
- 4) spin the nuclei at 1000 g for 10 min, then remove the buffer.
- 5) suspend the nuclei in cold buffer 1, shake well, and spin at 1000 g for 10 min. Repeat this step one time.
- 6) remove the buffer after spinning, and suspend the nuclei in 10 ml of buffer 3a, shake well, leave on ice for 15 min, and then spin at 1000g.
Repeat step 6 consecutively with buffers 3b, 3c, and 3d.
Chromatin is obtained as a white gel in 1 mM Tris-HCl (+0.1 mM PMSF) buffer. Homogenize the chromatin with a glass homogenizer.
- 7) dialyze chromatin against 1 mM phosphate buffer (pH 7.4) treated with chelex.

DNA の酸加水分解とサンプルのTMS化

試験管にクロマチン (DNA 量で約 100 μg) を小分けし, 2 nmol の thymine- $\alpha,\alpha,\alpha,6\text{-}^2\text{H}_4$, 0.5 nmol の 6-azathymine, cis-thymine glycol- $\alpha,\alpha,\alpha,6\text{-}^2\text{H}_4$, 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine-1,3- $^{15}\text{N}_2$ -2- ^{13}C -(5-aminoformyl- $^{15}\text{N},^2\text{H}$), 8-hydroxyadenine-1,3,7, $^{15}\text{N}_3$ -2,8- $^{13}\text{C}_2$, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine-1,3- $^{15}\text{N}_2$ -(5-amino- ^{15}N)-2- ^{13}C , 8-hydroxyguanine-1,3- $^{15}\text{N}_2$ -(2-amino- ^{15}N)-2- ^{13}C を内部標準として加えた。サンプルは凍結乾燥後, 0.5 ml のギ酸 (60%) を加えて脱気封管し, 140 $^\circ\text{C}$ で 30 分間加熱して糖-塩基の結合を切った⁹⁾。酸加水分解したサンプルを 4 ml のバイアル (Pierce Chemical Co. 製) に移し, 再度凍結乾燥した後, 乾燥窒素雰囲気下で BSTFA と acetonitrile (4/1, v/v) 100 μl を加え, キャップをした後, 130 $^\circ\text{C}$ で 30 分間加熱して TMS 化した。

GC/MS 測定

TMS 化したクロマチン・サンプルは GC/MS with selected-ion monitoring (GC/MS-SIM) 法で分析した⁸⁾。サンプルを GC に注入する際にはオートサンプラーを使用した。スプリット比は 1 対 40 に設定した。実際に GC カラムに導入した DNA の量は, 約 0.1 μg 程度である。ThyGly, FapyAde, 8-OH-Ade, FapyGua と 8-OH-Gua の定量にはそれぞれ安定同位体で置換した内部標準を用いた (isotope-dilution MS 法)¹⁰⁾。5-OH-5-MeHyd, 5-OH-Cyt, 5,6-diOH-Ura と 5-OHMeUra については, 安定同位体で置換した内部標準化合物が利用できなかったため, 6-azathymine を内部標準とした¹¹⁾。2-OH-Ade の定量には, 分子量や化合物の性質が 8-OH-Ade に似ているので, 8-hydroxyadenine-1,3,7- $^{15}\text{N}_3$ -2,8- $^{13}\text{C}_2$ を用いた。

thymine- $\alpha,\alpha,\alpha,6\text{-}^2\text{H}_4$ を DNA サンプルに加えて, その中のチミン量を求めることで, 測定したサンプルの DNA 量を推定したことは, これまで述べたとおりである¹²⁾。

3. 結果

本研究の目的は, マウスの全身放射線照射で, 肝臓細胞中のクロマチン (DNA) に, DNA 塩基の変化がみられるかどうかを調べることにある。マウスはそれぞれコバルト 60 γ -線を 20 - 470 Gy 照射した。照射したマウスから肝細胞を摘出し, クロマチンを抽出した。未照射のマウスからも, 同様に肝細胞を摘出しクロマチンを抽出しコントロールとした。クロマチンのサンプルは酸加水分解と TMS 化をおこ

なった後に GC/MS-SIM 法で、微量成分の DNA 修飾塩基を同定して、その量を定量した。

結果は、ピリミジンおよびプリン塩基ともにそれぞれ 5 種類、合計 10 種類の修飾塩基を、マウスのクロマチンから検出することができた。それらはピリミジン塩基では 5-OH-5-MeHyd, 5-OH-Cyt, 5-OHMeUra, 5,6-diOH-Ura, ThyGly と、プリン塩基では FapyAde, 8-OH-Ade, 2-OH-Ade, FapyGua と 8-OH-Gua であった。

表 5 には未照射のコントロール、および 20 Gy から 470 Gy を照射したマウス肝細胞中のこれら修飾塩基の測定値を示している。

なおこの中で 5,6-diOH-Ura は 5,6-diOHCyt が酸加水分解の操作中に脱アミノ化して生じたものである。また 2-OH-Ade については、動物細胞中の DNA で見つかった最初の例である。これらの検出した DNA 修飾塩基を図 5-1 に示す。

20 Gy および 50 Gy の照射では、未照射のコントロールと比較して有意の差はみられなかった。100 Gy 以上を照射したときに一部の修飾塩基が有意に増加した。100 Gy では 5-OH-5-MeHyd, 5-OHMeUra と 8-OH-Gua の 3 種類、200 Gy では 6 種類、そして 470 Gy では 5,6-diOH-Ura と ThyGly を除く 8 種類の修飾塩基が有意に増加した。470 Gy 以上を照射しても増加はみられず、生成量は saturate した（データは示していない）。このような傾向は培養細胞でもみられたことである。図 5-2 には 8-OH-Gua と 8-OH-Ade について、照射線量と生成量の関係を図示している。

4. 考察

今回の実験から、コバルト 60 γ -線で全身照射をおこなったマウスの肝細胞中のクロマチン (DNA) に、DNA 塩基の修飾が起こっていることを確認できた。

放射線照射によって修飾塩基が生成することは、培養細胞でも同様に確認されている。培養細胞でおこっていることとほぼ同様の結果を、動物を使った実験で確認できたということは、GC/MS の手法が DNA の塩基修飾を研究するうえで、極めて有効な手段であることを示すものである。

今回検出した修飾塩基は、 \cdot OH ラジカルが DNA 塩基と反応した結果生じたものである。このことは生体の DNA 損傷を考えると、 \cdot OH ラジカルの寄与が重要であることを示唆するものである。

岡田らは、酸素雰囲気下の細胞では放射線によっておこる細胞死の約 70% は間接的な作用であること。つまり細胞中の水が放射線によって解離し、その結果生じた活性種によって起こっていることを、ラジカルスカベンジャーを高濃度に添加し

た実験によって示した^{13,14)}。同様の結果は Chapman や Ward らによっても確認された^{15,16)}。

・OH ラジカルは、細胞を構成するさまざまな有機化合物と律速に近い反応速度ですみやかに反応する。・OH ラジカルが生成した場所から拡散する距離はせいぜい 10 nm 程度と考えられている¹⁷⁾。したがって生体中の DNA 塩基の修飾に関与する・OH ラジカルは、DNA のごく近傍で生成したものに限られることになる。つまり DNA のまわりに存在する水和層の領域に生成した・OH ラジカルが、DNA 分子と反応した結果生じたと考えられる¹⁶⁾。

細胞中にはグルタチオン (GSH) や L-アスコルビン酸などのラジカルスカベンジャーや、抗酸化剤としてはたらく多くの低分子化合物が存在している。これらは放射線による障害の発生を最小限にいくとめるはたらきをしている。しかし DNA の近傍で発生する・OH ラジカルは、これらのラジカルスカベンジャーと反応することなく DNA に損傷を与える。

この実験で検出できた修飾塩基の一部は、放射線の直接作用でも生成することが知られている¹⁸⁾。たとえば 5-OH-MeUra, ThyGly, FapyGua と 8-OH-Gua などは、それぞれの塩基のカチオンラジカルを中間体として生成するルートのあることが明らかになっている¹⁹⁻²²⁾。

ところで細胞には DNA の損傷を修復する機構がそなわっている²³⁾。今回の実験で検出した修飾塩基は、生体中では修復酵素によって修復される。生体中で修飾塩基が修復される様子を最初に観測した例として葛西らの研究は有名である。かれらはマウスを放射線照射し、肝細胞に生じた 8-OHdG を照射直後から 90 分間時間経過的に測定し、照射直後に増加した 8-OHdG が時間とともに減少していく様子を明らかにした⁷⁾。しかし彼らが使用した線量は、600 から 1730 Gy の範囲であり、本研究で使用した線量にくらべると相当多いといわざるを得ない。

今回のマウスを使った実験中に、細胞それ自身がもっている修復機構が働いた可能性がある。マウスの照射後、肝臓を摘出して液体窒素で凍結保存するまでに、約 15 分の時間がかかっている。これは実験操作のうえからさけることができない。測定の結果、100-200 Gy の照射ではじめて修飾塩基の一部がコントロールよりも増加したが、それ以下の線量では有意の差は認められなかった。20 および 50 Gy の照射では、修飾塩基の生成量とそれらが修復される速度との関係で、有意の差がみられなかったのかもしれない。培養細胞を放射線照射した場合には 40 Gy から有意の差がみられた。この実験では、照射からクロマチンの抽出までの操作をすべて氷温 (4°C) でおこなったので、修復酵素のはたらきが抑制されたためと思われる。

今回マウスの肝細胞中で検出された修飾塩基の照射線量と生成量の関係は、哺乳動物細胞の放射線照射でみられた傾向ときわめて似通っている⁹⁾。高線量の放射線を照射すると修飾塩基の生成量は、生成物/照射線量の直線性からずれて飽和した。その理由は、細胞中の酸素が消費されて、低酸素 (hypoxic) 状態になったためと考えられる。細胞から抽出したクロマチンを使った *in vitro* の照射実験から、今回検出した DNA 修飾塩基は、酸素が存在するとより多く生成することがわかっている⁸⁾。5, 6-dihydrothymine のように無酸素条件でのみ生成するような化合物は検出されなかった。

ところで未照射のマウスの肝細胞には、かなりの数の修飾塩基があることがわかった。このような DNA 塩基の修飾は、代謝の過程で起っていると考えられる²⁴⁾。

DNA 塩基の修飾は DNA の抽出課程でもおこることがある。8-OH-Gua は HPLC と電気化学検出器を組み合わせることによってそのヌクレオシド体(8-OHdG)を効率よく検出できるので、培養細胞や体細胞 DNA の酸化的損傷のマーカーとして、近年活発に研究されている²⁶⁾。HPLC-EC 法で測定したラット、マウス、ハムスターの肝細胞中の 8-OHdG 量は ≈ 0.15 から $2 \text{ molecule}/10^5 \text{ DNA bases}$ とそれぞれの報告値に幅がある²⁵⁾。たとえば Claycamp と Ho は大腸菌の 8-OHdG の background 値を最近報告しているが、それは $\approx 1.7 \text{ molecule}/10^5 \text{ DNA bases}$ であった²⁶⁾。この値は葛西らが *Salmonella typhimurium* について以前に報告した値⁷⁾よりも 5 倍程度大きい。HPLC-EC 法による 8-OHdG の測定値には約一桁の幅がある。

今回マウスの肝細胞で測定した 8-OH-Gua の値は $\approx 3.5 \text{ molecule}/10^5 \text{ DNA bases}$ であった。これは従来動物細胞で報告されてきた値よりやや高い。しかしラット肝臓クロマチンでは $\approx 2.5 \text{ molecules}/10^5 \text{ DNA bases}$ という値が報告されている²⁷⁾。この値は HPLC-EC 法で報告された値の上限に近い。

本実験では修飾塩基の定量には isotope-dilution MS 法を用いた。GC/MS 法で定量をおこなう場合、これは最良の方法といえる²⁸⁾。GC/MS 法では、DNA サンプルを化学処理する一連の操作が必要である。酸加水分解の過程で濃いギ酸を使用すると、一部の修飾塩基が分解するが、60%のギ酸では background 値が変化しないことをすでに確かめている⁹⁾。

HPLC-EC 法と GC/MS 法で 8-OH-Gua の測定値に若干の差がみられるが、それにはさまざまなファクターが考えられる。たとえば HPLC-EC 法では 8-OHdG を測定するために DNA を酵素で分解する一連の操作をおこなう。このとき DNA に損傷があると、DNA 分解酵素のはたらきが部分的に阻害される。そのため損傷部分がヌクレオシドにまで分解されず、結果として 8-OHdG の生成量を低く見積もってしまう可能性がある^{26, 29-31)}。また DNA を nuclease P1 で処理するとき、酵素の働き

を最大限にするため通常 pH 4 程度に調整するが、このとき 8-OHdG が DNA から脱離しやすくなることも報告されている^{32,33)}。

HPLC-EC 法の使用にあたって考慮しなくてはならないこれらさまざまなファクターについては、すでに文献に詳しく記されている^{25,26)}。

最後に考察をしめくくるにあたり、今回の研究で明らかになった点を以下に要約する。

第1点は、マウスの全身放射線照射で DNA 塩基のすべてが損傷をうけていることがわかったことである。これは *in vivo* でこのような事実を明らかにした最初の報告である。検出できた修飾塩基以外にも、実際にはさまざまな DNA の損傷が起こっているということに留意しなければならない。

第2点として、放射線照射で生じた DNA の塩基損傷は、放射線照射によっておこる突然変異や発癌の原因になっている可能性があるということである。

第3点として、これらの修飾塩基が生物学的にどのような意味をもつのかという研究は、まだ緒についたばかりである。したがって放射線によるピリミジンやプリン塩基の化学変化の研究は、重要な情報を提供することになるだろう。

参考文献

- 1) Breimer, L. H., *Molecular Carcinogenesis*, **3**, 188 (1990).
- 2) von Sonntag, C., *in The chemical basis of radiation biology*, pp. 94, Taylor & Francis, N.Y. (1987).
- 3) Oleinick, N. L., Chiu, S., Ramakrishnan, N. and Xue, L., *Br. J. Cancer*, **55** (Suppl. VIII), 135 (1987).
- 4) Téoule, R., *Int. J. Radiat. Biol.*, **51**, 573 (1987).
- 5) Steenken, S., *Chem. Rev.*, **89**, 503 (1989).
- 6) Dizdaroglu, M., *Mutat. Res.*, **275**, 331 (1992).
- 7) Kasai, H., Crain, P. F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A. and Tanooka, H., *Carcinogenesis*, **7**, 1849 (1986).
- 8) Gajewski, E., Rao, G., Nackerdien, Z. and Dizdaroglu, M., *Biochemistry*, **29**, 7876 (1990).
- 9) Nackerdien, Z., Olinski, R. and Dizdaroglu, M., 1992, *Free Radic. Res. Commun.*, **16**,

259 (1992) .

- 10) Dizdaroglu, M., *FEBS Lett.*, **315**, 1 (1993).
- 11) Fuciarelli, A. F., Wegher, B. J., Gajewski, E., Dizdaroglu, M. and Blakely, W. F., *Radiat. Res.*, **119**, 219 (1989).
- 12) Djuric, Z., Heilbrun, L. K., Reading, B. A., Boomer, A., Valeriote, F. A. and Martino, S., *J. Natl. Cancer Inst.*, **83**, 766 (1991).
- 13) Roots, R. and Okada, S., *Int. J. Radiat. Biol.*, **21**, 329 (1972).
- 14) Roots, R. and Okada, S., 1975, *Radiat. Res.*, **64**, 306 (1975).
- 15) Chapman, J. D., Reuvers, A. P., Borsa, J. and Greenstock, C. L., *Radiat. Res.*, **56**, 291 (1973).
- 16) Ward, J., in *The Early Effects of Radiation on DNA*, pp. 1-16 (Fielden, E. M. and O'Neill, P., Eds.), Springer-Verlag, Berlin (1991).
- 17) Ward, J., *Int. J. Radiat. Biol.*, **57**, 1141 (1990).
- 18) Cullis, P. M., Jones, G. D. D., Symons, M. C. R. and Lea, J. S., *Nature*, **330**, 773 (1987).
- 19) Deeble, D. J., Schuchmann, M. N., Steenken, S. and von Sonntag, C., *J. Phys. Chem.*, **94**, 8186 (1990).
- 20) Wagner, J. R., van Lier, J. E., Berger, M. and Cadet, J., *Methods in Enzymol.*, **186**, 502 (1990).
- 21) Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J. and Dizdaroglu, M., *Biochemistry*, **31**, 106 (1992).
- 22) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Berger, M. and Cadet, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9692 (1992).
- 23) Sancar, A. and Sancar, G. B., *Annual Rev. Biochem.*, **57**, 29 (1988).
- 24) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., 1990, *Methods in Enzymol.*, **186**, 1 (1990).
- 25) Halliwell, B. and Dizdaroglu, M., *Free Radic. Res. Commun.*, **16**, 75 (1992).
- 26) Claycamp, H. G. and Ho, K.-K., *Int. J. Radiat. Biol.*, **63**, 597 (1993).
- 27) Kasprzak, K. S., Diwan, B. A., Rice, J. M., Misra, M., Riggs, C. W., Olinski, R. and Dizdaroglu, M., *Chem. Res. Toxicol.*, **7**, 809 (1992).
- 28) Watson, J. T., *Methods in Enzymol.*, **193**, 86 (1990).
- 29) Dizdaroglu, M., Hermes, W., Schulte-frohlinde, D. and von Sonntag, C., *Int. J. Radiat. Biol.*, **33**, 563 (1978).
- 30) Maccubbin, A. E., Evans, M. S., Paul, C. R., Budzinski, E. E., Przybyszewski, J. and Box, H. C., *Radiat. Res.*, **126**, 21 (1991).
- 31) Maccubbin, A. E., Evans, M. S., Budzinski, E. E., Wallace, J. C. and Box, H. C., *Int. J. Radiat. Biol.*, **61**, 729 (1992).
- 32) Floyd, R. A., West, M. S., Eneff, K. L., Schneider, J. E., Wong, P. K., Tingey, D. T. and

Hogsett, W. E., *Anal. Biochem.*, **188**, 155 (1990).

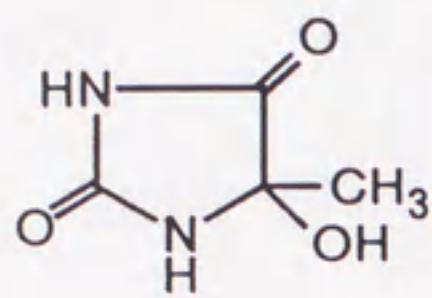
33) Frenkel, K., Zhong, Z., Wei, H., Karkoszka, J., Patel, U., Rashid, K., Georgescu, M. and Solomon, J. J., *Anal. Biochem.*, **196**, 126 (1991).

表 5 マウスの全身放射線照射で肝臓のクロマチンに生成する修飾塩基の量 (単位: molecules/10⁵ DNA bases).

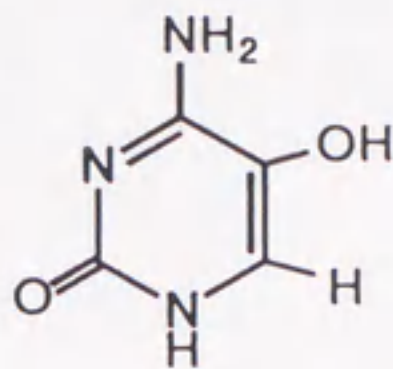
| Base | Radiation dose (Gy) | | | | | |
|--------------|---------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| | control | 20 | 50 | 100 | 200 | 470 |
| 5-OH-5-MeHyd | 6.07±0.13 | 6.30±0.41 | 6.26±0.25 | 7.12±0.32* | 8.27±0.35* | 11.4±1.49* |
| 5-OH-Cyt | 0.83±0.12 | 0.99±0.16 | 0.80±0.08 | 0.99±0.25 | 1.43±0.14* | 1.37±0.15* |
| 5-OHMeUra | 0.70±0.22 | 0.89±0.31 | 0.99±0.17 | 1.14±0.10* | 1.53±0.16* | 1.34±0.14* |
| 5,6-diOH-Ura | 1.34±0.16 | 1.69±0.38 | 1.40±0.41 | 1.72±0.60 | 1.34±0.28 | 1.65±0.76 |
| ThyGly | 8.17±0.48 | 9.32±1.33 | 6.46±0.10 | 7.92±2.39 | 7.28±0.14 | 9.44±0.70 |
| FapyAde | 15.6±1.75 | 13.6±0.76 | 14.1±2.38 | 13.6±0.48 | 18.9±1.08 | 27.6±2.51* |
| 8-OH-Ade | 1.56±0.14 | 1.37±0.38 | 1.37±0.16 | 1.88±0.18 | 2.61±0.16* | 3.24±0.07* |
| 2-OH-Ade | 5.69±0.99 | 5.09±0.86 | 5.37±0.41 | 6.01±0.57 | 7.44±2.19 | 10.9±0.70* |
| FapyGua | 10.9±0.38 | 9.22±0.80 | 11.1±2.32 | 9.38±1.56 | 16.2±1.49* | 22.2±1.72* |
| 8-OH-Gua | 3.69±0.38 | 4.07±0.64 | 3.59±0.32 | 5.09±0.54* | 7.16±0.29* | 7.17±0.73* |

それぞれの値は3匹のマウスの平均値.

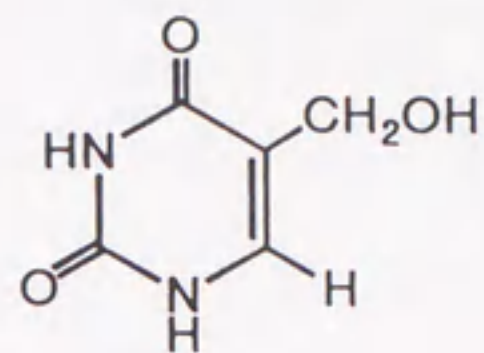
* 未照射のコントロールマウスに比べて統計的に有意に増加した値 ($p \leq 0.05$).



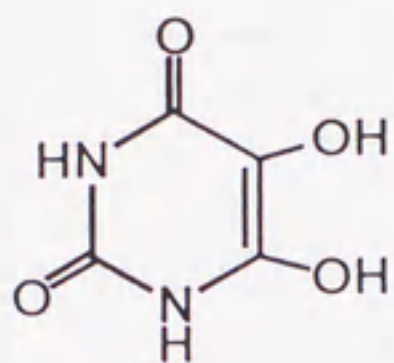
5-hydroxy-5-methyl-
hydantoin



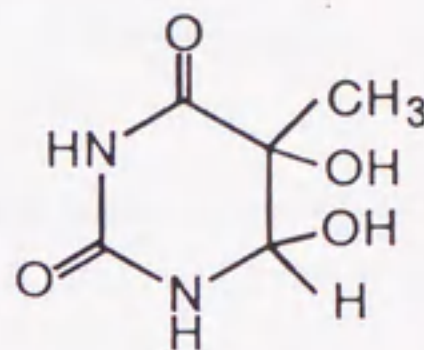
5-hydroxycytosine



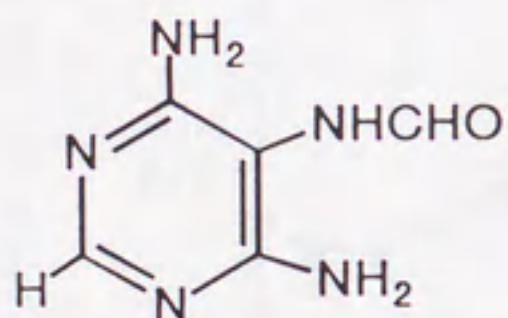
5-(hydroxymethyl)-
uracil



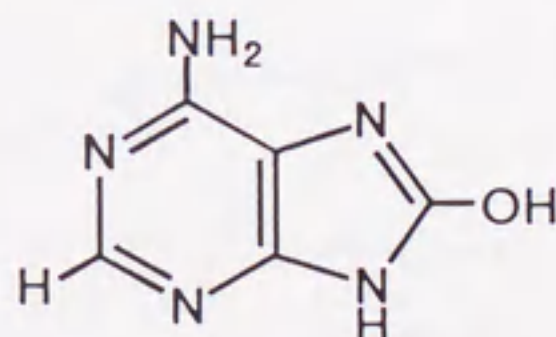
5,6-dihydroxyuracil



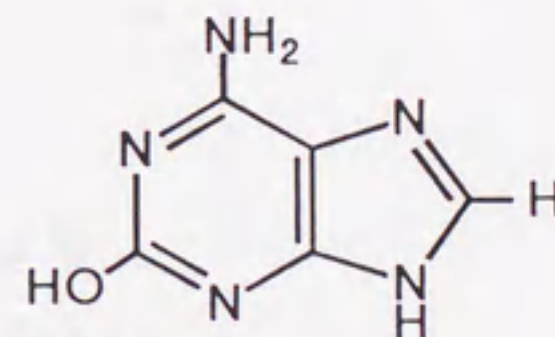
thymine glycol



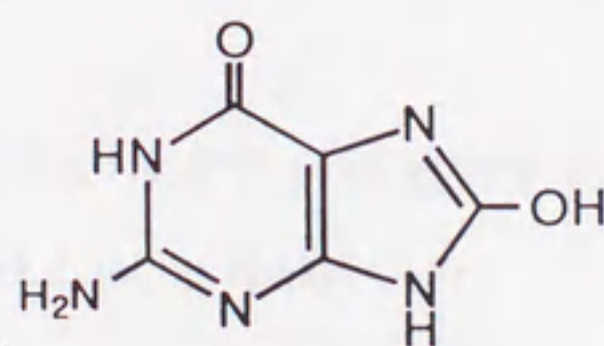
4,6-diamino-5-formamido-
pyrimidine



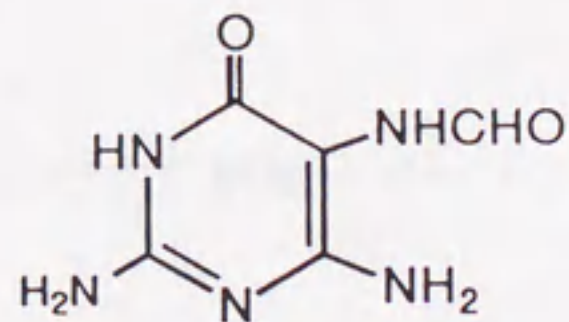
8-hydroxyadenine



2-hydroxyadenine



8-hydroxyguanine



2,6-diamino-4-hydroxy-
5-formamidopyrimidine

図5-1 マウスの肝臓クロマチン中に検出したDNA修飾塩基

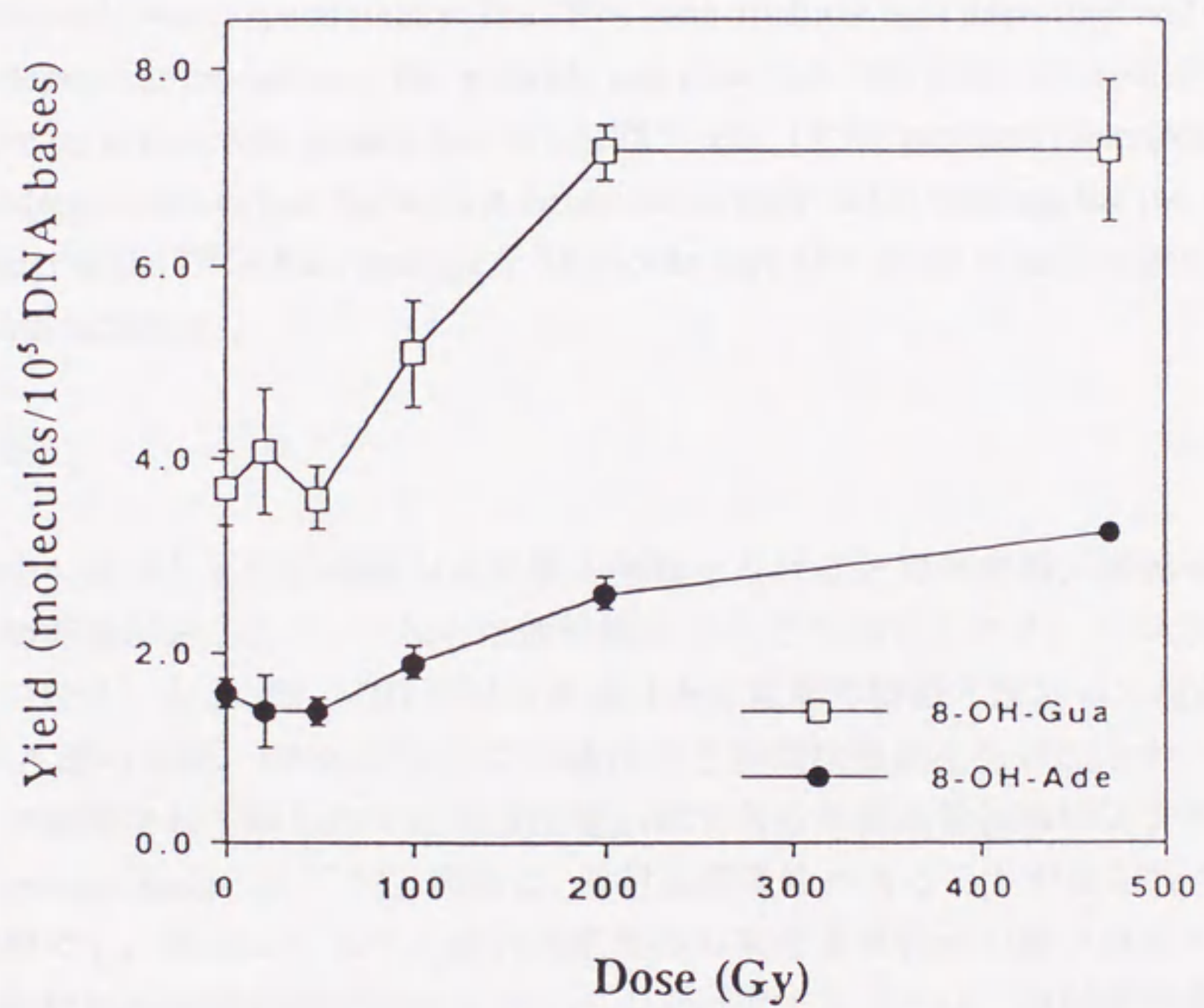


図5-2 マウスの全身放射線照射をおこなったときに肝臓クロマチン中に生成する8-OH-Guaと8-OH-Ade.

それぞれの値は、3匹のマウスの平均値.

第6章 L5178Y由来の放射線感受性株(M10)の放射線照射におけるDNA塩基損傷の特徴に関する研究

Abstract

DNA base damage in radiation-sensitive mutant M10 cells and parent mouse lymphoma L5178Y cells was studied. Cells were exposed to ionizing radiation in the dose range of 48 to 400 Gy. Chromatin was isolated from cells and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. Ten DNA base products were identified and quantified. A dose-dependent formation of the products was observed. The yields of products in M10 cells were up to threefold greater than in L5178Y cells. Of the products measured, formamidopyrimidines had the highest difference in their yields between the two cell lines. The greater initial DNA base damage in M10 cells may play a role in their hypersensitivity to ionizing radiation.

1. 緒言

前章でも述べたように細胞が放射線の照射をうけると突然変異、発癌や細胞死などの生物影響がおこる¹⁾。これらは放射線によって生成するフリーラジカルが原因となっている。なかでも $\cdot\text{OH}$ ラジカルは、DNA塩基や糖鎖と反応して塩基の修飾や、DNA鎖の切断、DNA-タンパクの結合など多様な損傷を引き起こす²⁻⁴⁾。

ヒトの難病として知られている劣性遺伝病である末梢血管拡張性アタキシア(ataxia telangiectasia, 以下AT)細胞は、放射線感受性であることが知られている^{5,6)}。培養細胞でも、親株にくらべて放射線感受性の突然変異株が分離されている。このような放射線感受性の原因を分子のレベルで研究することは、放射線治療がどのようにして効果を発揮しているのかということや、放射線による癌の発生原因の究明、さらにはDNA損傷の修復機構の研究に関連して意義がある⁷⁾。

M10細胞は1979年に、科学技術庁所属の放射線医学総合研究所の佐藤弘毅らによってマウスの白血病細胞L5178Yから分離・確立された放射線感受性の突然変異細胞である⁸⁾。この細胞はヒトAT細胞によく似た放射線感受性を示すことから染色体異常(chromosomal aberration)、DNA二本鎖切断の修復(repairability of DNA strand break)、突然変異発生の頻度(mutation frequency)やDNA合成能の回復(recovery of DNA synthesis)などを指標として、親株との比較研究が行われた⁹⁻¹²⁾。M10は放射線以外にもmethyl methanesulfonate (MMS)、bleomycin、4-nitroquinoline-1-oxideな

ど DNA に損傷をあたえる化合物に対しても感受性を示すが、紫外線に対しては感受性を示さないという特徴がある。これまでのところ M10 と L5178Y の二つの細胞株について、放射線照射で DNA 修飾塩基の生成に差があるかどうかを比較検討した報告はない。放射線による DNA の損傷は、糖鎖より塩基の部分に集中することを考慮すれば¹³⁾、両細胞の DNA 塩基損傷に差があるかどうかを調べることは意義がある。

本研究の目的は放射線照射で、両細胞株の DNA 修飾塩基の生成に差があるかどうかを分子レベルで調べることである。

2. 実験

使用した試薬類

細胞培養に用いた Fisher's メディウム (medium)、ウマ血清 (horse serum)、penicillin/streptomycin 混合溶液、7.5% の sodium bicarbonate 溶液と、グルタチオンの測定に用いた 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)、glutathione reductase、 β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) は Sigma から購入した。

DNA 修飾塩基の同定と定量に用いた標準化合物と、内部標準に用いた安定同位体で置換した DNA 修飾塩基は、前章で記述したとおり Program Resources, Inc./Dyncorp, National Cancer Institute-FCRD (Frederick, MD, USA) から購入した。thymine- $\alpha, \alpha, \alpha, 6$ - $^2\text{H}_4$ は Merck & Co. Inc./Isotopes より、ギ酸 は Mallinckrodt から acetonitrile と 1% の trimethylsilylchlorosilane を含む *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) は Pierce Chemical Co. からそれぞれ購入したことなども前章のとおりである。

細胞培養と細胞内グルタチオンの測定

マウス白血病由来の細胞 (L5178Y) と、その放射線感受性突然変異株 (M10) は、それぞれ大阪府立大学先端科学研究所の堀靖治博士と放射線医学総合研究所の佐藤弘毅博士のご好意によって提供していただいた。

細胞の培養には CO_2 インキュベーターを使用した。培養条件は、 CO_2 の濃度 3.5%、温度 37°C である。培養液には Fisher's medium を使用し、10% の horse serum と penicillin (50 U/ml)、streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えて dual membrane filter (0.8 $\mu\text{m}/0.45 \mu\text{m}$) で除菌した。細胞の生存率はトリパンプルーを用いて確認した。細胞中のグルタチオン (GSH) は Tietze の方法で求めた¹⁴⁾。

細胞の放射線照射とクロマチンの抽出

細胞は培養開始後 2~3 日でもっとも条件よく成長する。細胞数が $5 \sim 8 \times 10^5$ cells/ml まで増えたところで遠心して集め (300 g, 5 分間), 10% の horse serum を含む 40 ml の cold Fisher's medium に分散させた。この時点の細胞数は 5×10^6 cells/ml である。細胞を含む溶液を照射用のガラス容器に移した後に, medium 中の余分の CO_2 を除くために空気を 10 分間バブリングした。照射はコバルト 60 の γ 線を使用し (dose rate, 79 Gy/min), 細胞を含むガラス容器を氷で冷やしながらかつた。照射線量は 48~400 Gy (Fricke 化学線量計で測定)¹⁵⁾ でおこなった。細胞は照射後すみやかに液体窒素で凍結し, クロマチンを抽出するまで -70°C で保存した。照射直後の細胞の生存率をトリパンブルーで確かめた。クロマチンの抽出は前章で記載したとおりである¹⁶⁾。

サンプルの酸加水分解と TMS 化

約 100 μg の DNA を含むクロマチンサンプルに前章同様, 安定同位体で置換した修飾塩基 (FapyGua, 8-OH-Gua, FapyAde, 8-OH-Ade, 5-OH-5-MeHyd) と 6-azathymine および thymine- $\alpha, \alpha, \alpha, 6\text{-}^2\text{H}_4$ を加えて凍結乾燥を行い, 酸加水分解と TMS 化を行った¹⁷⁾。

Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS)

TMS 化したサンプルは前章同様に GC/MS with selected-ion monitoring 法で分析した^{16,17)}。FapyGua, 8-OH-Gua, FapyAde, 8-OH-Ade, 5-OH-5-MeHyd については安定同位体で一部置換したマーカを内部標準にして定量した (isotope-dilution mass spectrometry 法)¹⁸⁾。5-OH-Ura, 5-OH-Cyt, 5-OHMeUra と 5,6-diOH-Ura については安定同位体で置換したマーカが使用できなかったため 6-asathymine を内部標準に用いた^{17,19)}。また前章で述べたように 2-OH-Ade の定量には 8-hydroxyadenine-1,3,7- $^{15}\text{N}_3$ -2,8- $^{13}\text{C}_2$ を用いた。サンプル中の DNA の量を求めるために thymine- $\alpha, \alpha, \alpha, 6\text{-}^2\text{H}_4$ を使用したことも前章のとおりである²⁰⁾。

3. 結果

放射線感受性の M10 細胞とその親株 L5178Y を, 同時にコバルト 60 で γ 線照射した。照射した両方の細胞からクロマチンを抽出した。またコントロールとして未照射の細胞からも同様にクロマチンを抽出した。

実験の部分でのべたように酸加水分解とTMS化の後、GC/MS-selected-ion monitoring 法で修飾塩基の定量を行った。その結果、DNA 塩基に由来する 10 の修飾塩基を同定して定量することができた。それらは FapyGua, 8-OH-Gua, FapyAde, 8-OH-Ade, 2-OH-Ade, 5-OH-Cyt, 5-OH-Ura, 5-OHMeUra, 5,6-diOH-Ura と 5-OH-5-MeHyd であった。それらの構造式を図 6-1 に示す。

未照射のコントロール細胞と、両細胞の照射にともなう修飾塩基の生成量を表 6 にまとめた。また一例として FapyGua と 8-OH-Gua の照射線量と生成量の関係を図 6-2 に示した。

10 成分のコントロール値については M10 と L5178Y で差がなかった (表 6)。中でも FapyGua は両細胞とも、いずれの照射線量でも最も生成量が大きかった。8-OH-Ade と 5-OH-Cyt は、両細胞とも 48 Gy の照射から有意に増加した。M10 では 48 Gy で先の 3 種類に加えて FapyAde と 5,6-diOH-Ura がコントロールに比べて有意に増加した。400 Gy の照射では、検出した 10 の修飾塩基のすべてが、両細胞とも未照射のコントロール値よりも有意に増加した。

両細胞ともにコントロールよりも有意に増加した修飾塩基の生成量の特徴を見ると、5-OH-Cyt は 48 Gy の照射時点から、また FapyGua については 100 Gy の時点で、放射線感受性の M10 細胞のほうが親株の L5178Y よりも多く生成した。8-OH-Gua, FapyAde, 8-OH-Ade, 2-OH-Ade, 5-OH-Ura と 5-OHMeUra は、200 及び 400 Gy 照射で、M10 のほうが L5178Y よりも多く生成した。

5,6-diOH-Ura と 5-OH-5-MeHyd については、両細胞間で生成量に有意の差はみられなかった。

照射前の細胞の生存率 (viability) は、両細胞ともに 98 % であった。L5178Y については 48 - 400 Gy の照射で viability は変化しなかったが、M10 では $\approx 80\%$ とやや低下した。

細胞中の GSH 量は L5178Y と M10 でそれぞれ 59 ± 7 と 32 ± 8 nmol/mg of protein であった。この値は以前に Nakazawa らが報告した値とよく一致している²¹⁾。

4. 考察

この研究は細胞の放射線照射で、DNA 修飾塩基が放射線感受性の M10 細胞において、その親株 L5178Y よりも多く生成することを示したはじめての研究である。

最大照射線量 400 Gy で、両細胞とも FapyGua の生成量が最も多かった。未照射のコントロール値と比較すると、それぞれ 4 倍 (M10) と 2.6 倍 (L5178Y) の増加であった。FapyGua はヒト培養細胞 (K562) の放射線照射でも一番多く生成した¹⁷⁾。

前章のマウスの全身放射線照射でも同様であった²²⁾。

M10 細胞中の GSH 量は、親株の L5178Y よりも少なかった。これはすでに報告されていることと同じ結果であったが²¹⁾、GSH 量が少ないということだけで放射線照射にともなう DNA 塩基の損傷が、M10 で多いということの説明にはならない。GSH は細胞の DNA の近傍には存在しないからである²³⁻²⁵⁾。

今回検出・定量できた DNA の修飾塩基は、前章でも述べたように DNA と・OH ラジカルの反応で生成したのもである^{2,3)}。そしてこの反応に寄与する・OH ラジカルは DNA のごく近傍で発生したものに限られる。反応性に富む・OH ラジカルが、細胞中で拡散する距離はせいぜい 10 nm 程度と考えられているからである^{25,26)}。GSH や他の・OH ラジカルスカベンジャーでも、核 DNA のごく近傍で発生する・OH ラジカルをスカベンジすることはできない²⁷⁾。したがって M10 と L5178Y で細胞中の GSH 量に差があるからといって、それだけで突然変異株の DNA が放射線照射でより多くの損傷を受けるといった説明にはならないのである。

今回の実験では、48 Gy を照射したときにはじめて DNA 修飾塩基の一部がコントロールにくらべて有意に増加した。しかしこの線量は、M10 と L5178Y の放射線に対する生存率の差が明確にあらわれはじめる線量 (1 Gy) をはるかに上回る量である。半致死線量 (D_{01}) は M10 と L5178Y でそれぞれ 0.3 および 1 Gy である⁸⁾。しかしここで求めている生存曲線というのは、放射線照射から十数日後に細胞の集まりであるコロニーがいくつできるかということを経験として、放射線に対する細胞の感受性を評価する手法である。この研究では、照射線量が多いと単純にいうことはできない。たとえば L5178Y と M10 を使って、DNA の一本鎖および二本鎖切断の修復能を調べた研究では、この実験とよく似た範囲の線量を使用している。また哺乳動物由来の放射線感受性細胞とその親株について、DNA 鎖切断の修復を研究した報告も、この研究とよく似た範囲の線量を使用している^{11,12,28-31)}。

放射線照射に伴って、低分子の DNA 塩基化合物が細胞中に数多く生成することを指摘する論文は多い³⁾。こういう研究に使用された線量は 140 から 3000 Gy である。損傷を受けたチミン塩基の除去修復を調べた研究では、500 から 2500 Gy 照射されている³²⁻³⁴⁾。つまり放射線照射にともなう生じる化学変化を追跡した研究の中では、ここで使用した線量はむしろ低い部類にはいる。

ところで放射線照射で一番多く生成する化合物は FapyGua であった。400 Gy を照射したとき M10 細胞中に生成する FapyGua の量は $\approx 1 \text{ molecule}/10^4 \text{ DNA bases}$ である。DNA 鎖切断の修復を調べた研究が、ほぼ同じ線量範囲で行われていることを考慮すると、核 DNA の形態は、ここで使用した放射線の照射線量ではほとんど

変化していないと考えられる。

くりかえすが、細胞を放射線照射し、その細胞がどの程度コロニーを形成するかということで、放射線感受性を評価する放射線生物学の手法からすれば、確かにこの実験ではかなり高い線量を使用していることになる。しかしこのDNA修復塩基の研究は、DNA二本鎖切断の修復能が誘導されることを調べた研究とともに、十分に生物学的な意味のある情報を提供していると考えている。子宮頸癌由来の放射線感受性細胞でDNA二本鎖切断が多く生成するという結果も得られている³⁰⁾。しかしその一方で、放射線感受性細胞とその親株の間でDNA二本鎖切断に差が見られなかったという報告もある^{12, 35-40)}。これまでの研究では、放射線感受性は、DNA二本鎖切断を修復する能力の差に起因していると考えられてきた^{7, 12, 29-31, 35-39)}。

放射線感受性細胞では、DNA二本鎖切断の修復速度がその親株や放射線耐性細胞に比べて遅いことがわかっている。同時に今回の研究から、もしかすると放射線感受性細胞はDNA塩基損傷の修復能力も低いのかもしれないという考えかたも成り立つ⁴¹⁾。つまりM10はその親株であるL5178Yに比べて、DNA塩基の損傷を修復する機能が劣るのかもしれない。

しかしなぜM10では親株のL5178YにくらべてDNA修飾塩基が多く生成するのかということや、これがM10の放射線感受性とどのような関係があるのかなどについては、今後さらに解明されなくてはならない。

参考文献

- 1) Painter, R. B., *In Radiation Biology in Cancer Research* (Meyn, R. E. and Withers, H. R., Eds.), pp. 59, Raven Press, N.Y. (1980).
- 2) Téoule, R., *Int. J. Radiat. Biol.* **51**, 573 (1987).
- 3) Dizdaroglu, M., *Mutat. Res.* **275**, 331 (1992).
- 4) Oleinick, N. L., Chiu, S., Ramakrishnan, N. and Xue, L., *Br. J. Cancer* **55** (Suppl. VIII), 135-140 (1987).
- 5) Taylor, A. M. R., Harnden, D. G., Artlett, D. G., Harcourt, C. F., Lehmann, S. A., Stevens, A. R. and Bridges, B. A., *Nature* **258**, 427 (1975).
- 6) Setlow, R. B., *Nature* **271**, 713 (1978).
- 7) McMillan, T. J. and Peacock, J. H., *Int. J. Radiat. Biol.* **65**, 49 (1994).
- 8) Sato, K. and Hieda, N., *Radiat. Res.* **78**, 167 (1979).
- 9) Takahashi, E., Tsuji, H., Shiomi, T., Sato, K. and Tobari, I., *Mutat. Res.* **106**, 225 (1982).
- 10) Shiomi, T., Hieda-Shiomi, N., Sato, K., Tsuji, H., Takahashi, E. and Tobari, I., *Mutat.*

Res. **83**, 107 (1981).

- 11) K. Sato and H. Hama-Inaba, *Mutat. Res.* **140**, 159 (1984).
- 12) Eguchi-Kasai, K., Kosaka, T., Sato, K. and Kaneko, I., *Int. J. Radiat. Biol.* **59**, 97 (1991).
- 13) von Sonntag, C., *The Chemical Basis of Radiation Biology*, pp. 94, Taylor & Francis, N. Y., 1987.
- 14) Tietze, F., *Anal. Biochem.* **27**, 502 (1969).
- 15) Fricke, J. and Hart, E. J., *In Radiation Dosimetry* (Attix, F. H. and Roesch, W. C., Eds.), Vol. 2, 2nd ed., pp. 167, Academic Press, N. Y., 1986.
- 16) Gajewski, E., Rao, G., Nackerdien, Z. and Dizdaroglu, M., *Biochemistry* **29**, 7876 (1990).
- 17) Nackerdien, Z., Olinski, R. and Dizdaroglu, M., *Free Radic. Res. Commun.* **16**, 259 (1992).
- 18) Dizdaroglu, M., *FEBS Lett.* **315**, 1 (1993).
- 19) Fuciarelli, A. F., Wegher, B. J., Gajewski, E., Dizdaroglu, M. and Blakely, W.F., *Radiat. Res.* **119**, 219 (1989).
- 20) Djuric, Z., Heilbrun, L. K., Reading, B. A., Boomer, A., Valeriote, F. A. and Martino, S., *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 766 (1991).
- 21) Nakazawa, T., Yukawa, O., Nagatsuka, S., Matsudaira, H. and Sato, K., *Int. J. Radiat. Biol.* **42**, 581 (1982).
- 22) Mori, T., Hori, Y. and Dizdaroglu, M., *Int. J. Radiat. Biol.* **64**, 645 (1993).
- 23) Ward, J. F., *Int. J. Radiat. Biol.* **57**, 1141 (1990).
- 24) Smoluk, G. D., Fahey, R. C. and Ward, J. F., *Radiat. Res.* **114**, 3 (1988).
- 25) Zeng, S., Newton, G. L., Gonick, G., Fahey, R. C. and Ward, J. F., *Radiat. Res.* **114**, 11 (1988).
- 26) Ward, J. F., Blakely, W. F. and Joner, E. I., *Radiat. Res.* **103**, 383 (1985).
- 27) von Sonntag, C. and Schuchmann, H-P., *Methods Enzymol.* **233**, 47 (1994).
- 28) Hama-Inaba, H., Hieda-Shiomi, N. and Sato, K., *Mutat. Res.* **120**, 161 (1983).
- 29) Evans, H. H., Ricanati, M. and Horng, M-F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7562 (1987).
- 30) Kelland, L. R., Edwards, S. M. and Steel, G. G., *Radiat. Res.* **116**, 526 (1988).
- 31) Warters, R. L., Lyons, B. W., Chen, D. J. and Sato, K., *Mutat. Res.* **293**, 91 (1993).
- 32) Hariharan, P. V. and Cerutti, P. A., *J. Mol. Biol.* **66**, 65 (1972).
- 33) Mattern, M. R., Hariharan, P. V. and Cerutti, P. A., *Biochim. Biophys. Acta* **395**, 48 (1975).
- 34) Patil, M. S., Locher, S. E. and Hariharan, P. V., *Int. J. Radiat. Biol.* **48**, 691 (1985).

- 35) Kemp, L. M., Sedgwick, S. G. and Jeggo, P. A., *Mutat. Res.* **132**, 189 (1984).
- 36) Giaccia, A., Weinstein, R., Hu, J. and Stamato, T. D., *Somat. Cell Genet.* **11**, 485 (1985).
- 37) Weibezahn, K. F., Lohrer, H. and Herrlich, P., *Mutat. Res.* **145**, 177 (1985).
- 38) Wlodek, D. and Hittelman, W. N., *Radiat. Res.* **112**, 146 (1987).
- 39) Schwartz, J. L., Rotmensch, J., Giovanazzi, S., Cohen, M. B. and Weichselbaum, R. R., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **15**, 907 (1988).
- 40) Iliakis, G., Okayasu, R. and Seaner, R., *Int. J. Radiat. Biol.* **54**, 55 (1988).
- 41) Ward, J. F., *In The Early Effects of Radiation on DNA* (Fielden, E. M. and O'Neill, P., Eds.), pp. 1, Springer-Verlag, Berlin, 1991.

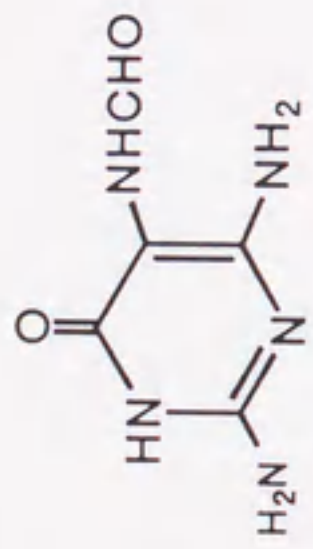
表 6 M10 と L5178Y 細胞の放射線照射で生成する修飾塩基の量 (単位: molecules/10⁵ DNA bases).

| Product | Cell line | Radiation dose (Gy) | | | | |
|--------------|-----------|---------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| | | control | 48 | 98 | 197 | 394 |
| FapyGua | M10 | 3.64±0.13 | 5.78±0.69* | 9.64±0.35*† | 12.18±0.72*† | 14.76±0.85*† |
| | L5178Y | 2.89±0.25 | 5.97±0.50* | 6.88±0.06* | 7.07±0.09* | 7.47±0.47* |
| 8-OH-Gua | M10 | 2.25±0.80 | 2.95±0.35 | 3.64±0.38* | 4.58±0.41*† | 5.15±0.09*† |
| | L5178Y | 2.39±0.22 | 2.83±0.16 | 3.49±0.28* | 3.67±0.19* | 3.83±0.13* |
| FapyAde | M10 | 6.34±0.16 | 7.44±0.11* | 7.79±0.97 | 9.33±0.31*† | 12.53±0.31*† |
| | L5178Y | 6.50±0.72 | 6.69±0.19 | 6.37±0.25 | 7.32±0.35* | 8.13±0.31* |
| 8-OH-Ade | M10 | 0.57±0.06 | 0.91±0.06* | 1.32±0.03* | 1.48±0.03*† | 1.88±0.22*† |
| | L5178Y | 0.47±0.05 | 0.88±0.06* | 0.94±0.10* | 0.91±0.02* | 0.95±0.06* |
| 2-OH-Ade | M10 | 2.36±0.41 | 2.67±0.13 | 3.99±0.06* | 5.06±0.28*† | 6.28±0.94*† |
| | L5178Y | 2.29±0.35 | 2.61±0.04 | 2.98±0.41 | 3.52±0.22* | 4.18±0.19* |
| 5-OH-Cyt | M10 | 2.07±0.16 | 3.17±0.03*† | 3.05±0.22*† | 3.30±0.04*† | 4.90±0.04*† |
| | L5178Y | 2.01±0.04 | 2.36±0.19* | 2.26±0.06* | 2.72±0.17* | 3.33±0.10* |
| 5-OH-Ura | M10 | 3.61±0.13 | 3.49±0.09 | 3.71±0.75 | 6.15±0.57*† | 8.35±1.07*† |
| | L5178Y | 3.60±0.28 | 3.50±0.11 | 3.89±0.16 | 4.36±0.28 | 5.65±0.57* |
| 5-OHMe-Ura | M10 | 1.41±0.05 | 1.57±0.35 | 2.45±0.25* | 2.54±0.16*† | 3.52±0.31*† |
| | L5178Y | 1.44±0.19 | 1.48±0.19 | 1.41±0.35 | 1.73±0.05* | 1.82±0.04* |
| 5,6-diOH-Ura | M10 | 0.97±0.04 | 1.60±0.01* | 1.61±0.47 | 1.70±0.11* | 2.04±0.16* |
| | L5178Y | 0.98±0.09 | 0.94±0.04 | 1.10±0.03 | 1.41±0.12* | 1.70±0.22* |
| 5-OH-5-MeHyd | M10 | 2.43±0.35 | 3.17±0.17 | 2.98±0.31 | 3.11±0.25 | 4.71±0.50* |
| | L5178Y | 2.64±0.28 | 4.36±2.14 | 3.42±0.38 | 3.39±0.79 | 3.93±0.01* |

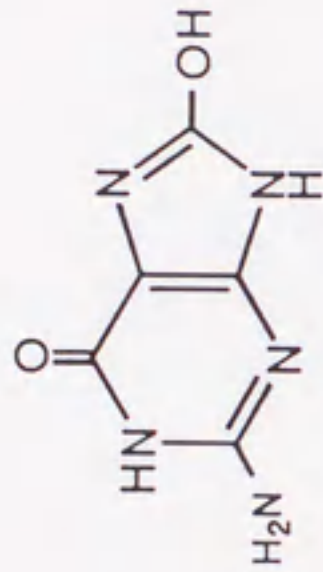
それぞれの値は3回の測定の平均値.

* 未照射のコントロール DNA に比べて統計上有意に増加した値 ($p \leq 0.05$).

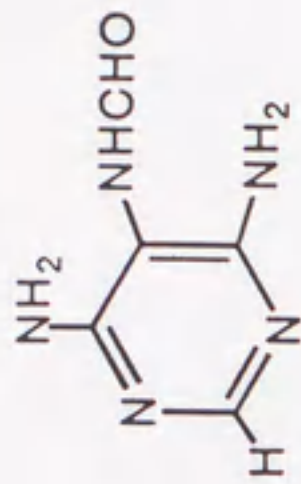
† L5178Y の値より統計上有意に増加した値 ($p \leq 0.05$).



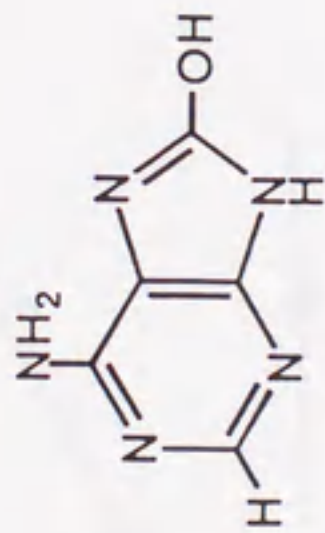
2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
(FapyGua)



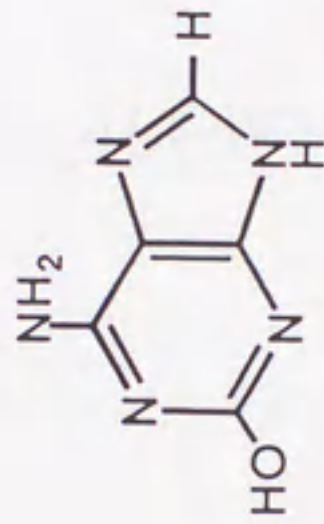
8-hydroxyguanine
(8-OH-Gua)



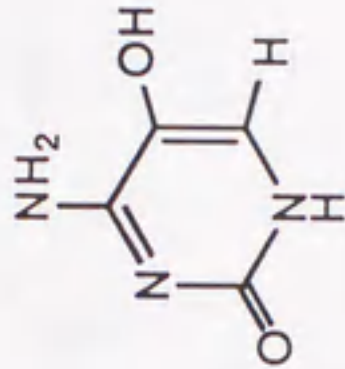
4,6-diamino-5-formamido-
pyrimidine
(FapyAde)



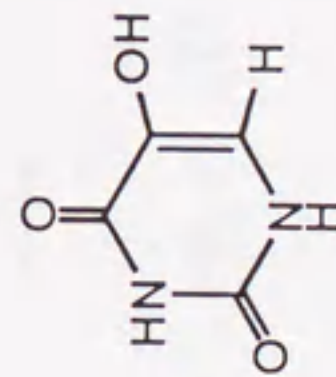
8-hydroxyadenine
(8-OH-Ade)



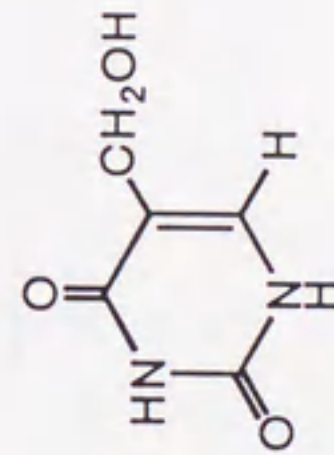
2-hydroxyadenine
(2-OH-Ade)



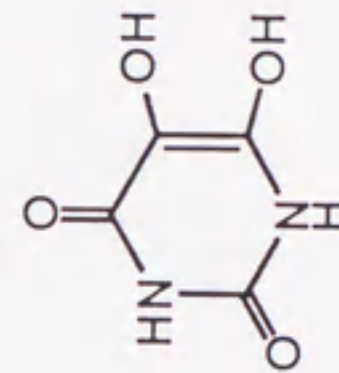
5-hydroxycytosine
(5-OH-Cyt)



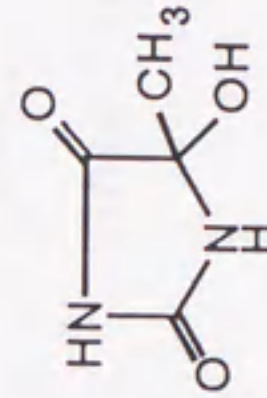
5-hydroxyuracil
(5-OH-Ura)



5-(hydroxymethyl)-
uracil
(5-OHMe-Ura)



5,6-dihydroxyuracil
(5,6-diOH-Ura)



5-hydroxy-5-methyl-
hydantoin
(5-OH-5-MeHyd)

図6-1 M10 と L5178Y の放射線照射で測定した DNA 修飾塩基.

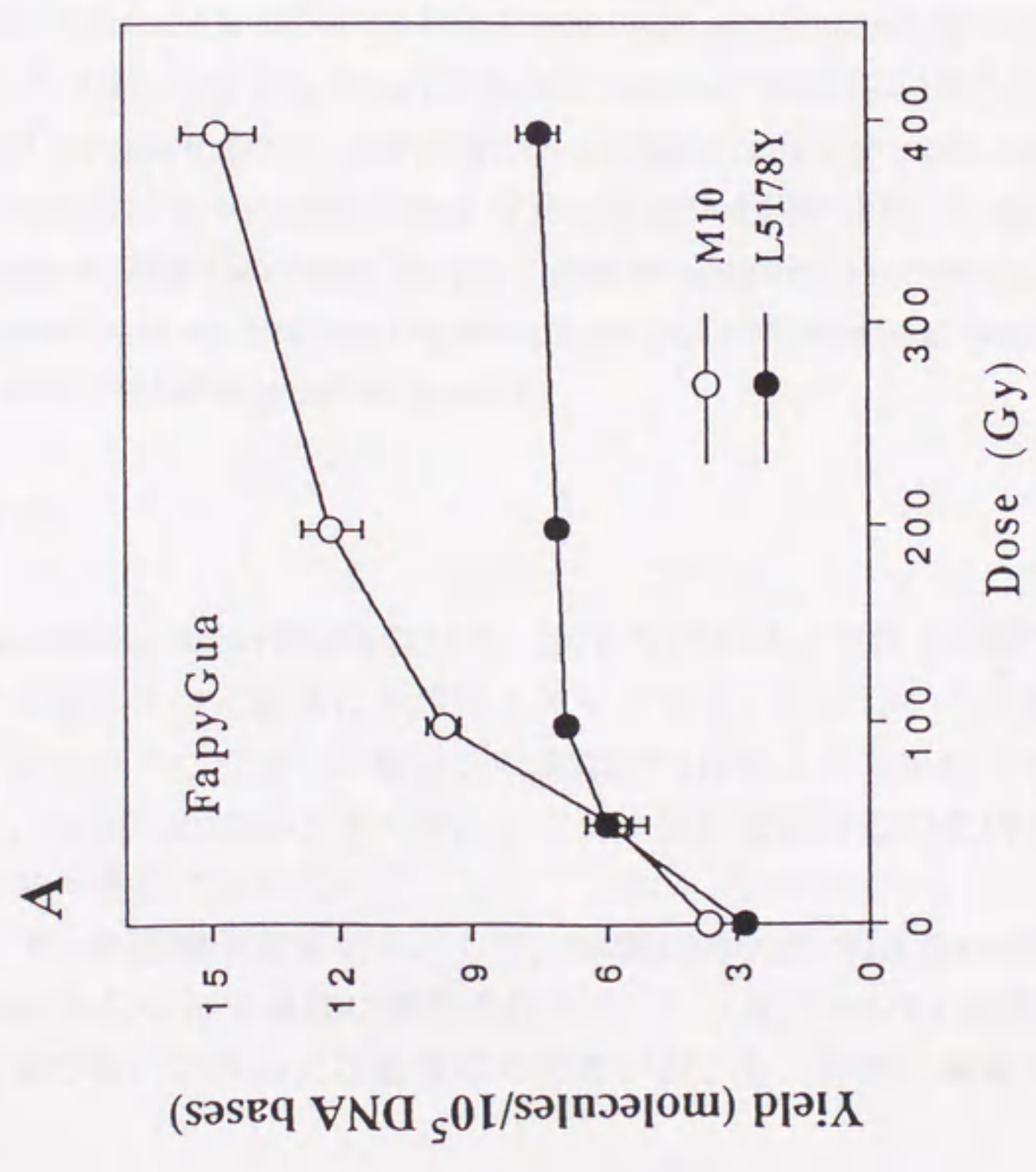
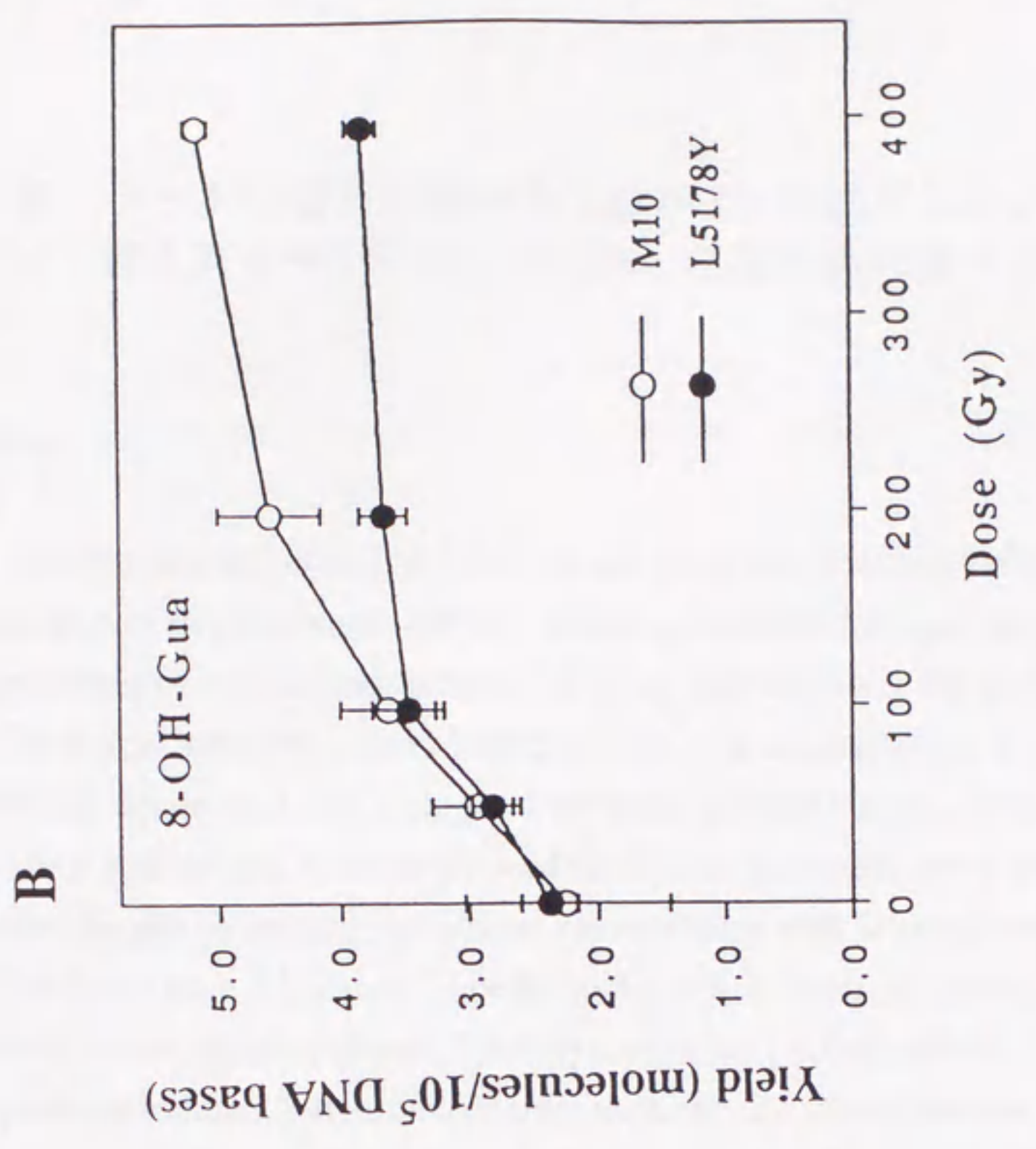


図6-2 M10とL5178Yの放射線照射で生成したFapyGua(A)と8-OH-Gua(B)の線量と生成量の関係。

第7章 ラットに腎癌を誘発する鉄-NTAを投与したときに腎クロマチンに生じるDNA塩基損傷に関する研究

Abstract

Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) causes renal proximal tubular necrosis, a consequence of iron ion-mediated free-radical-associated damage, that finally leads to a high incidence of renal adenocarcinoma in male rats and mice. We have investigated the levels of typical hydroxyl radical-induced DNA base modifications in renal chromatin of male Wistar rats treated with a single or repeated administrations of Fe-NTA. Five pyrimidine-derived and 5 purine-derived modified DNA bases were identified and quantified by gas chromatography/mass spectrometry with selected-ion monitoring. The modified bases were 5-hydroxy-5-methylhydantoin, 5-(hydroxymethyl)uracil, 5-hydroxycytosine, thymine glycol, 5,6-dihydroxyuracil, 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, 8-hydroxyadenine, xanthine, 2-hydroxyadenine and 8-hydroxyguanine. The amounts of most of these compounds were significantly increased over control levels in renal chromatin of Fe-NTA-treated rats as measured 3 and 24 hr after treatment. Elevated levels of modified bases were accompanied by proximal tubular necrosis. On the 19th day, however, accumulation of modified DNA bases was not observed. Morphologically, scattered karyomegalic cells were seen in the proximal tubules, but necrosis was rarely found. Some of the identified DNA base lesions are known to be promutagenic, although others have not been investigated. Presence of modified DNA bases concomitant with necrosis and regeneration of the renal proximal tubules may be a critical step in Fe-NTA-induced carcinogenesis.

1. 緒言

Nitrilotriacetic acid ($N(CH_2CO_2H)_3$, 以下 NTA) は, 中性水溶液中で鉄をはじめ数種類の金属イオンと容易に水溶性のキレートコンプレックスを形成する。米国, カナダ, ヨーロッパではリン酸を含む洗剤の代用品として家庭や病院で広く使われているが, もともとはボイラー中にミネラル分が蓄積するのを防ぐ目的で工業用に使われたのが最初である¹⁾。

鉄イオンの過剰摂取モデルとして, 非経口的に鉄-NTA (Fe-NTA)を使用する方法が, Awaiらによって最初に開発された²⁾。その後, Fe-NTAを腹腔内に投与すると, 腎近位尿細管に急性および亜急性の壊死がおこり, 時間の経過とともに雄ラットや

マウスに 60 - 92 % という高い頻度で腎癌が発生することがわかった³⁻⁶⁾。

この Fe-NTA 投与によっておこる腎臓発癌には、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルによる DNA の損傷が深く関与していると思われる。これまで *in vitro* で過酸化水素や L-システインや L-アスコルビン酸の存在下で、Fe-NTA による DNA 塩基損傷^{7,8)}や DNA 一本鎖および二本鎖切断の研究が、ヒト由来の細胞や calf thymus DNA, supercoiled plasmid DNA などを使っておこなわれてきた^{7,9)} また Umemura たちは Fe-NTA を Wistar ラットに投与後 24 時間で、腎臓細胞の DNA に 8-OHdG が増加することを報告している¹⁰⁾。抽出したクロマチンを Fe-NTA と過酸化水素で処理すると、DNA 塩基の修飾がおこることも報告されている¹¹⁾。

今回われわれは雄の Wistar ラットを使用し、Fe-NTA 投与による、腎臓クロマチンの DNA 塩基の修飾を研究した。研究には GC/MS-SIM 法を用いて、腎臓クロマチン中の DNA 損傷がはたして $\cdot\text{OH}$ ラジカルによるものかどうか、また Fe-NTA 投与後に DNA の損傷がどのように推移するのか検討した。

2. 実験

動物実験

体重 175~200 g, 6 週令の雄の Wistar ラット(Charles River, Kingston, NY)を、室温 22 - 24 °C, 12 hr dark/12 hr light で飼育した。実験には合計 29 匹のラットを使用した。5 匹はコントロールとし、残り 24 匹を 3 匹ずつ 8 グループに分けてそれぞれ次の投与実験をおこなった。8 グループは、3 時間グループ [NTA, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, Fe-NTA をそれぞれ一回投与]、24 時間グループ [NTA, Fe-NTA をそれぞれ一回投与]、19 日間グループ [control と NTA, Fe-NTA をそれぞれ連続投与] である。

Fe-NTA の投与と細胞の観察

Fe-NTA 水溶液は使用直前に調整した⁶⁾。 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ は Mallinckrodt から、nitrilotriacetic acid は Sigma から購入した。Fe-NTA は 15 mg Fe/kg 量を投与した。 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ および NTA については、Fe-NTA に換算して 15 mg Fe/kg に相当する量を投与した。Fe-NTA の 15 mg Fe/kg はこれが投与実験に使用できるほぼ限界の量である。 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ および NTA の毒性は Fe-NTA にくらべてはるかに低い。投与後 19 日目の状態をみる場合は以下のとおりの連続投与をおこなった。

5 mg/Fe/kg x 3 days, 10 mg/Fe/kg x 3 days, 1-day break; 10 mg/Fe/kg x 5 days, 2-day break; 10 mg/Fe/kg x 4 days 以上合計 18 日間。この 1 日後に屠殺した。ラットはいずれも頭部を切断し、すみやかに両腎臓を摘出した。一方の臓器は液体窒素で凍結

し、クロマチンの抽出まで -80°C で保存した。他方はホルマリン固定して顕微鏡で組織観察をおこなった。

クロマチンの抽出

約 500 mg の凍結腎臓器を Polytron ホモゲナイザー, Model PT 10/35 (Brinkman, NY) に移し, 0.25 M sucrose, 50 mM Tris-HCl, 3 mM CaCl_2 , 0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride と 0.1 mM dithiothreitol を含む 9 ml の buffer 水溶液 (pH 7.4) を加えてホモゲナイズした。100-mesh のナイロン網で細胞組織の残渣を取り除き, 1,000 g で 10 分間遠心した。沈殿した細胞核に, 再度同じ buffer を加え, 700 g で遠心して回収。もう一度同じ buffer で洗い, 1% のトリトン X-100 を含む buffer で洗い, 最後に 1,000 g で 10 分間遠心して細胞核を回収した。

クロマチンの抽出はすでに記載したとおりの方法でおこなった¹²⁾。クロマチンは 0.2 mM EDTA を含む 1 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に溶解して 1 mM のリン酸 buffer (pH 7.4) で透析した。クロマチン中の RNA 量は 5% 以下であった。また DNA/protein 比 (A258/A280) は 1.3~1.7 であった。

酸加水分解と TMS 化

100 μg の DNA を含むクロマチンに前章同様 6-azathymine, xanthine-1,3- $^{15}\text{N}_2$ (Sigma), thymine- $\alpha, \alpha, \alpha, 6\text{-}^2\text{H}_4$, cis-thymine glycol- $\alpha, \alpha, \alpha, 6\text{-}^2\text{H}_4$ (Merck, St. Louis, MO), 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine-1,3- $^{15}\text{N}_2$ -2- ^{13}C -(5-aminoformyl- $^{15}\text{N}, ^2\text{H}$), 8-hydroxyadenine-1,3,7- $^{15}\text{N}_3$ -2,8- $^{13}\text{C}_2$, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine-1,3- $^{15}\text{N}_2$ -(5-amino- ^{15}N)-2- ^{13}C , 8-hydroxyguanine-1,3- $^{15}\text{N}_2$ -(2-amino- ^{15}N)-2- ^{13}C , dialuric acid-1,3- $^{15}\text{N}_2$ -2,4- $^{13}\text{C}_2$ (Program Resources/Dyncorp, National Cancer Institute-FCRD, Frederick, MD) を内部標準として加え凍結乾燥の後, 60% のギ酸 0.5 ml で酸加水分解した¹³⁾。サンプルは再度凍結乾燥して, TMS 化した。細部については第 5 章の実験の項に記載したとおりである。

GC/MS 測定

TMS 誘導化したサンプルは GC/MS-SIM 法で分析した^{12,13)}。thymine glycol (ThyGly), FapyAde, 8-OH-Ade, xanthine および 8-OH-Gua は安定同位体で置換したマーカーを使って定量した¹⁴⁾。5-OH-5-MeHyd, 5-OHMeUra, 5-OH-Cyt and 5,6-diOH-Ura については 5 章と同様に, 6-azathymine を内部標準として使用した。また 2-OH-Ade

の定量に安定同位体で置換した 8-OH-Ade を使ったことなども 5 章と同様である。サンプル中の DNA は thymine- $\alpha, \alpha, \alpha, 6\text{-}^2\text{H}_4$ を用いて決めた¹⁵⁾。

測定値の統計学的評価

得られた測定結果については t-test で統計学的な評価をおこなった。

3. 結果

この研究の目的は Fe-NTA 投与にともなって、標的細胞の腎クロマチンに DNA 修飾がおこるかどうかを検討することである。これまでの研究では、Fe-NTA 処理をしたラットから腎臓を取りだし、抽出した DNA 中の 8-OHdG 量が、無処理のコントロールよりも増加することが報告されている¹⁰⁾。しかしこのように、ただ一種類の変化した修飾塩基を調べるというのでは、DNA 損傷の実体を正しく把握したことにはならない。

GC/MS-SIM 法を用いることによりピリミジンおよびプリン塩基が変化した 10 種類の修飾塩基を同定し、それぞれの生成量を測定することができた。これら 10 種類の化合物は図 7-1 に、また Fe-NTA 投与によるそれらの変化については図 7-2 にそれぞれ図示した。

この 10 種類の化合物はコントロール群でも検出することができた。これら以外に 5-hydroxyhydantoin, 5-hydroxyuracil, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine についても調べたが、大きな妨害ピークに隠れてしまい測定することができなかった。この妨害ピークは細胞組織に由来すると思われるが、はっきりしたことはわからない。

検出できた修飾塩基のうち、5-OH-Cyt は cytosine glycol が脱水して生じたものと思われる¹⁶⁾。また 5,6-diOH-Ura は 5,6-diOH-Cyt が脱アミノ化したか、isodialuric acid がエノール化したものと思われる。5,6-diOH-Cyt と isodialuric acid はいずれもシトシンと $\cdot\text{OH}$ ラジカルとの反応で生じたものである^{14,16)}。

Fe-NTA 投与後 3 時間で、7 種類の化合物がコントロールよりも有意に増加した。増加率は 1.7~5.6 倍であった。最も増加率の大きかったのは 8-OH-Ade と 8-OH-Gua (それぞれ \approx 3.7 と 5.6 倍)であった(図 7-2i, j)。FapyAde の増加率は最も小さく 1.7 倍であった。2-OH-Ade と xanthine は変化しているがコントロールにくらべて有意の差はみられなかった。また 5-OHMeUra は変化しなかった。

Fe-NTA 投与後 24 時間では 5-OH-5-Me-Hyd, 5-OH-Cyt, 5,6-diOH-Ura, 8-OH-Ade と 8-OH-Gua がコントロールに比べて有意に増加していた(図 7-2a, b, d, i, j)。増加率は

≈1.9 から 3.4 倍であった。この時点で最も増加率の大きかったのは 5,6-diOH-Ura (図 7-2d) であった。

Fe(NO₃)₃ と NTA の投与では ThyGly だけが Fe(NO₃)₃ 投与 3 時間後に有意に増加したが (図 7-2c), それ以外の修飾塩基は 3 時間および 24 時間後でも変化しなかった。19 日後のサンプルでは, コントロールより増加した修飾塩基はなかった。

顕微鏡による細胞観察では, Fe(NO₃)₃ および NTA 投与群では変化はみられなかった。Fe-NTA 投与 3 時間で, 腎近位尿細管にわずかな形態の変化が観察。24 時間では壊死がはっきりと確認。腎糸球体そのものが消失している様子も観察された。この様子については他の文献に詳しく記載されているので, ここではこれ以上ふれない³⁾。

Fe-NTA 連続投与 19 日後のラットの体重は 210.0 ± 6.3g であった。非投与のコントロール群の 320.5 ± 3.4 g に対して有意に減少していた (means ± SEM, p < 0.01)。一方, 腎臓は Fe-NTA 投与群の方がコントロールに比べて有意に増大していた [1.44 ± 0.14 vs. 0.77 ± 0.01 g (means + SEM, p < 0.01)]。このときの腎細胞の顕微鏡による観察では, 壊死は見られなかったが, 巨大な異型核 (karyomegalic) を持つ腎近位尿細管細胞が出現していた。

4. 考察

Fe-NTA を雄ラットに投与した結果, 腎クロマチン (DNA) の 4 つの塩基すべてが, 投与後 24 時間以内に変化していることが明らかになった。今回検出したプリンおよびピリミジン由来の修飾塩基はいずれも ·OH ラジカルと DNA 塩基の反応で生成することがわかっているものばかりである¹¹⁾。同じような結果は電離放射線照射や過酸化水素による細胞処理でも得られている¹⁷⁾。

Fe-NTA 投与にともない, 腎クロマチンでこのような DNA 塩基損傷がおこるということは, ·OH ラジカルが傷害の発生に深く関与していることを示唆している。哺乳動物の細胞からクロマチンを抽出して Fe-NTA/H₂O₂ 処理をしたときも, この動物実験で検出したのと同様の, DNA 塩基の修飾がおこること。その反応は ·OH ラジカルのスカベンジャーを添加すると抑制されることから, ·OH ラジカルが関与していることは明らかである^{8,11)}。この *in vitro* 実験では Fe-NTA 単独では DNA の損傷は起こらず, 過酸化水素を加えてはじめて, DNA 塩基の修飾がおこる。

Inoue らは Fe-NTA が過酸化水素を効率的に触媒して, ·OH ラジカルが発生することを明らかにしている⁷⁾。また Fe-NTA は L-アスコルビン酸や L-システインなどの還元剤が共存すると DNA 鎖切断を引き起こす⁹⁾。この反応は過酸化水素を分解

するカタラーゼを添加すると抑制されることから、反応には過酸化水素が関与していることが示唆される。つまり Fe-NTA による DNA 損傷には、過酸化水素の存在が不可欠ということになる。

生体中では低分子量の鉄キレート化合物は、腎糸球体(glomeruli)から尿細管を経て尿中へ排出される。ラットやマウスへの Fe-NTA 投与実験で、腎近位尿細管の管口部分で L-システインが存在すると脂質の過酸化 (lipid peroxidation) が起きる^{6,18)}。Fe-NTA の投与で生成する $\cdot\text{OH}$ ラジカルは、その高い反応性から、発生部位に特異的に酸化反応を引き起こすことが予想される^{19,20)}。これまでからも指摘してきたように、生体内で発生した $\cdot\text{OH}$ ラジカルは、その近傍の DNA と反応して DNA 塩基を修飾する。

今回の結果は、Fe-NTA をラットに投与したときに、腎臓で 8-OHdG のレベルが上昇することを報告した Umemura らの結果と、よく一致している¹⁰⁾。しかし今回の研究では 8-OH-Gua だけでなく、これ以外の修飾塩基についても調べた。また Fe-NTA の一回投与に加えて、連続投与したときの結果 (投与後 19 日目) についても調べたところが特徴点である。結果の項でも記したように、10 種類の修飾塩基を検出し定量した。Fe-NTA を動物に投与したときに、標的細胞の腎臓で 8-OH-Gua 量が増加することはすでに報告があるが、8-OH-Gua を除く残りの 9 種類の化合物が腎クロマチン中に生成することを調べたのはこの研究が最初である。

測定できた DNA 修飾塩基の中で 8-OH-Gua は、Fe-NTA 後 3 時間でコントロールにくらべて 5.6 倍上昇した。一方 Umemura らは同じ時間帯で約 2 倍の上昇を報告している¹⁰⁾。この差はこれまでも指摘したように、DNA サンプルの調整の違いによるものと考えられる。再度簡単に要約すれば、HPLC-EC 法では DNA を、この方法ではクロマチンを抽出している。よく知られているように、DNA の抽出の過程で DNA とタンパクが結合している部分は失われてしまう。このような箇所は、DNA が損傷を受けている部分に多い²¹⁾。そのため修飾塩基の一部を失うことになるので、クロマチンを抽出する方が DNA 塩基の変化を見るには適していると考えられる。

修飾塩基の定量には isotope-dilution mass spectrometry 法²²⁾を使用した。この方法は 8-OH-Gua を含む微量の化合物の定量に大きな威力を発揮することを改めて示した。

今回の研究で明らかになったことは、標的臓器である腎臓細胞の形態学的な変化に先立って、Fe-NTA 投与後 3 時間で DNA 修飾塩基の生成量が最大になったということである。顕微鏡による観察で、細胞の変化が顕著になった 24 時間後には、これらの修飾塩基は減少していた。この DNA 修飾塩基の時間経過にともなう変化

は、lipid peroxidation がおこる様子とよく似ている²³⁾。lipid peroxidation の結果生じる化合物は、生体内の DNA 塩基損傷の発生に深く関係するといわれている^{7,24)}。Fe-NTA 投与後 24 時間で lipid peroxidation に由来する化合物 (thiobarbituric-acid-reactive substances) は、コントロールのレベルへ戻るが²³⁾、DNA 修飾塩基のほうは、一部の化合物がコントロールにくらべて高いレベルにあった。Fe-NTA 以外では、Fe(NO₃)₃ 投与後 3 時間で ThyGly だけがコントロールにくらべて有意に増加した。どうしてこのような現象がみられたのか、その理由についてはよくわからない。

Fe-NTA 連続投与実験をおこなった 19 日目には、腎近位尿細管細胞細胞の中に、巨大な異型核細胞が観察されたにもかかわらず、修飾塩基の量はコントロールのレベルに戻っていた。この巨大異型核細胞は発癌物質の N-(4'-fluoro-4-biphenyl)acetamide 投与によって発生した腎癌のなかでも観察されている²⁵⁾。もっともこの巨大異型核細胞が、悪性の癌細胞に変化していくのかどうかということはまだはっきりとはわかっていない。

この時点で細胞の壊死がみられなくなったということは、損傷を受けた DNA が修復されたのか、もしくは腎近位尿細管細胞が Fe-NTA 投与による酸化ストレスに順応したことなどが考えられる。巨大な異型核細胞が出現した投与後 19 日目には、本来 DNA 修飾塩基は高いレベルにあるはずだが、実際にはそうならなかった。この異型核細胞は腎臓細胞の 1% 程度であった。そのため GC/MS-SIM 法でも検出することができなかつたのかもしれない。

フリーラジカルの発生が DNA 損傷を引き起こし、発癌に重要な役割をはたしているということを疑う余地はない。DNA の損傷には多くのパターンがあるが、その一部は発癌に結びつく性質を持つことがわかっている。しかしその大部分は、細胞中でどのような役割をはたしているのかまだ十分にはわかっていない²⁶⁾。

Fe-NTA 非投与のコントロールラットの DNA に、修飾塩基が含まれていることがわかったが、この系統のラットの腎癌の発生率は低いことから、この程度の存在量では生物学的にみて意味があるとはいえない²⁷⁾。しかし Fe-NTA 投与に伴って上昇する DNA 修飾塩基は、腎癌の発生に重要な役割をはたしているのかもしれない。

今回測定した DNA 修飾塩基の中で、8-OH-Gua は G:C → T:A トランスバージョンの原因になっていることが知られている。この G:C → T:A トランスバージョンがラズ原癌遺伝子の特定の部分でおこると (12 番目のコドン, GGT → GTT) 原癌遺伝子の活性化につながり、腎癌の発生につながることを、ラットへのニッケル投与の実験で報告されている²⁸⁾。

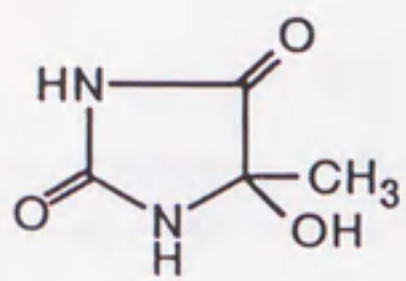
今回の実験でみられたように、DNA 修飾塩基の生成量が増えることに伴って、標的細胞の壊死や異型化が観察されたということは、損傷を受けた DNA が修復さ

れる前に、細胞分裂に入り、突然変異が固定化されることによって、長期的には細胞の癌化につながっていくという発癌モデルを支持する結果となっている。Fe-NTA 投与による腎癌の発生原因については、DNA 塩基の損傷、異型核細胞の出現と原癌遺伝子の活性化という相互のプロセスのつながりについて、引き続きその解明が求められているところである。

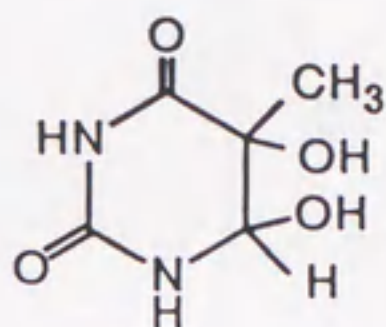
参考文献

- 1) Anderson, R.L., Bishop, W. H. and Campbell, R. L., *Crit. Rev. Toxicol.*, **15**, 1 (1985).
- 2) Awai, M., Narasaki, M., Yamanoi, Y. and Seno, S., *Am. J. Pathol.*, **95**, 663 (1979).
- 3) Hamazaki, S., Okada, S., Ebina, Y., Fujioka, M. and Midorikawa, O., *Am. J. Pathol.*, **123**, 343 (1986).
- 4) Ebina, Y., Okada, S., Hamazaki, S., Ogino, F., Li, J.-L. and Midorikawa, O., *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**, 107 (1986).
- 5) Li, J.-L., Okada, S., Hamazaki, S., Ebina, Y. and Midorikawa, O., *Cancer Res.*, **47**, 1867-1869 (1987).
- 6) Toyokuni, S., Okada, S., Hamazaki, S., Minamiyama, Y., Yamada, Y., Liang, P., Fukunaga, Y. and Midorikawa, O., *Cancer Res.*, **50**, 5574 (1990).
- 7) Inoue, S. and Kawanishi, S., *Cancer Res.*, **47**, 6522 (1987).
- 8) Aruoma, O. I., Halliwell, B., Gajewski, E. and Dizdaroglu, M., *J. Biol. Chem.*, **264**, 20509 (1989).
- 9) Toyokuni, S. and Sagripanti, J.-L., *Carcinogenesis*, **14**, 223 (1993).
- 10) Umemura, T., Sai, K., Takagi, A., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y., *Carcinogenesis*, **11**, 345 (1990).
- 11) Dizdaroglu, M., *Free Radic. Biol. Med.*, **10**, 225 (1991).
- 12) Gajewski, E., Rao, G., Nackerdien, Z. and Dizdaroglu, M., *Biochemistry*, **29**, 7876 (1990).
- 13) Nackerdien, Z., Olinski, R. and Dizdaroglu, M., *Free Radic. Res. Commun.*, **16**, 259 (1992).
- 14) Dizdaroglu, M., *FEBS Lett.*, **315**, 1 (1993).
- 15) Djuric, Z., Heilbrun, L.K., Reading, B.A., Boomer, A., Valeriote, F.A. and Martino, S., *J. Natl. Cancer Inst.*, **83**, 766 (1991).
- 16) Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B. and Gajewski, E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **285**, 3 17 (1991).
- 17) Dizdaroglu, M., *Mutation Res.*, **275**, 331 (1992).

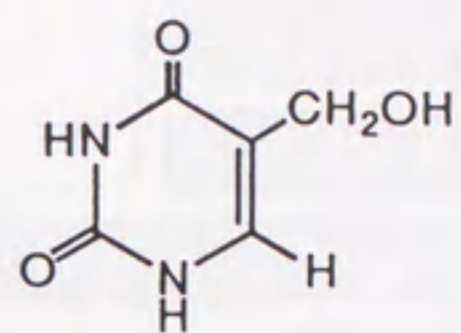
- 18) Okada, S., Minamiyama, Y., Hamazaki, S., Toyokuni, S. and Sotomatsu, A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **301**, 138 (1993).
- 19) Ward, J. F., Blakely, W. F. and Joner, E. I., *Radiat. Res.*, **103**, 383 (1985).
- 20) Goldstein, S. and Czapski, G., *Free Radic. Biol. Med.*, **2**, 3 (1986).
- 21) Mee, L.K. and Adelstein, S. J., *Int. J. Radiat. Biol.*, **36**, 359 (1979).
- 22) Watson, J. T., *In* Introduction to mass spectrometry, pp. 59, Raven, N. Y. (1985).
- 23) Okada, S., Fukunaga, Y., Hamazaki, S., Yamada, Y. and Toyokuni, S., *Acta pathol. japon.*, **41**, 221 (1991).
- 24) Park, J.-W. and Floyd, R.A., *Free Radic. Biol. Med.*, **12**, 245 (1992).
- 25) Dees, J. H., Heatfield, B.M., Reuber, M.D. and Trump, B.F., *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 1537 (1980).
- 26) Breimer, L.H., *Mol. Carcinogen.*, **3**, 188 (1990).
- 27) Dominick, M.A., Robertson, D.G., Bleavins, M.R., Sigler, R.E., Bobrowski, W.F. and Gough, A.W., *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **111**, 375 (1991).
- 28) Higinbotham, K.G., Rice, J.M., Diwan, B.A., Kasprzak, K.S., Reed, C.D. and Perantoni. A.O., *Cancer Res.*, **52**, 4747 (1992).



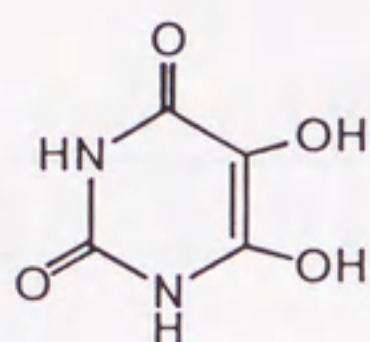
5-hydroxy-5-methyl-
hydantoin



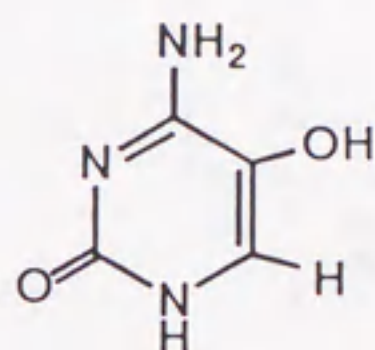
thymine glycol



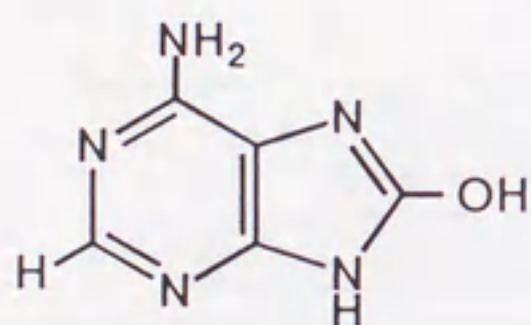
5-(hydroxymethyl)-
uracil



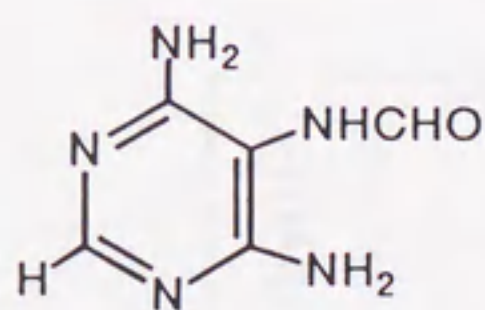
5,6-dihydroxyuracil



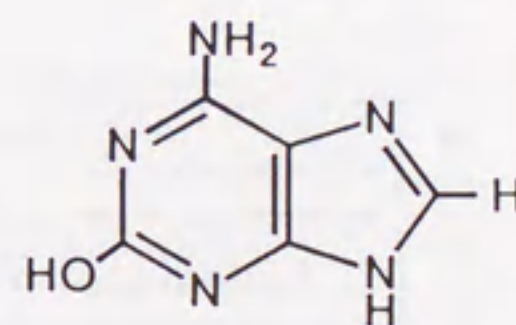
5-hydroxycytosine



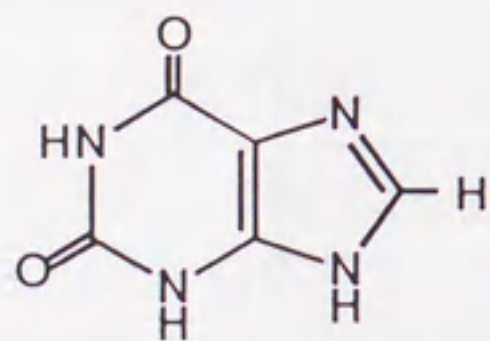
8-hydroxyadenine



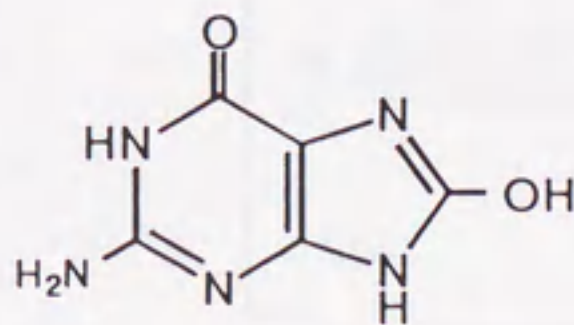
4,6-diamino-5-formamido-
pyrimidine



2-hydroxyadenine

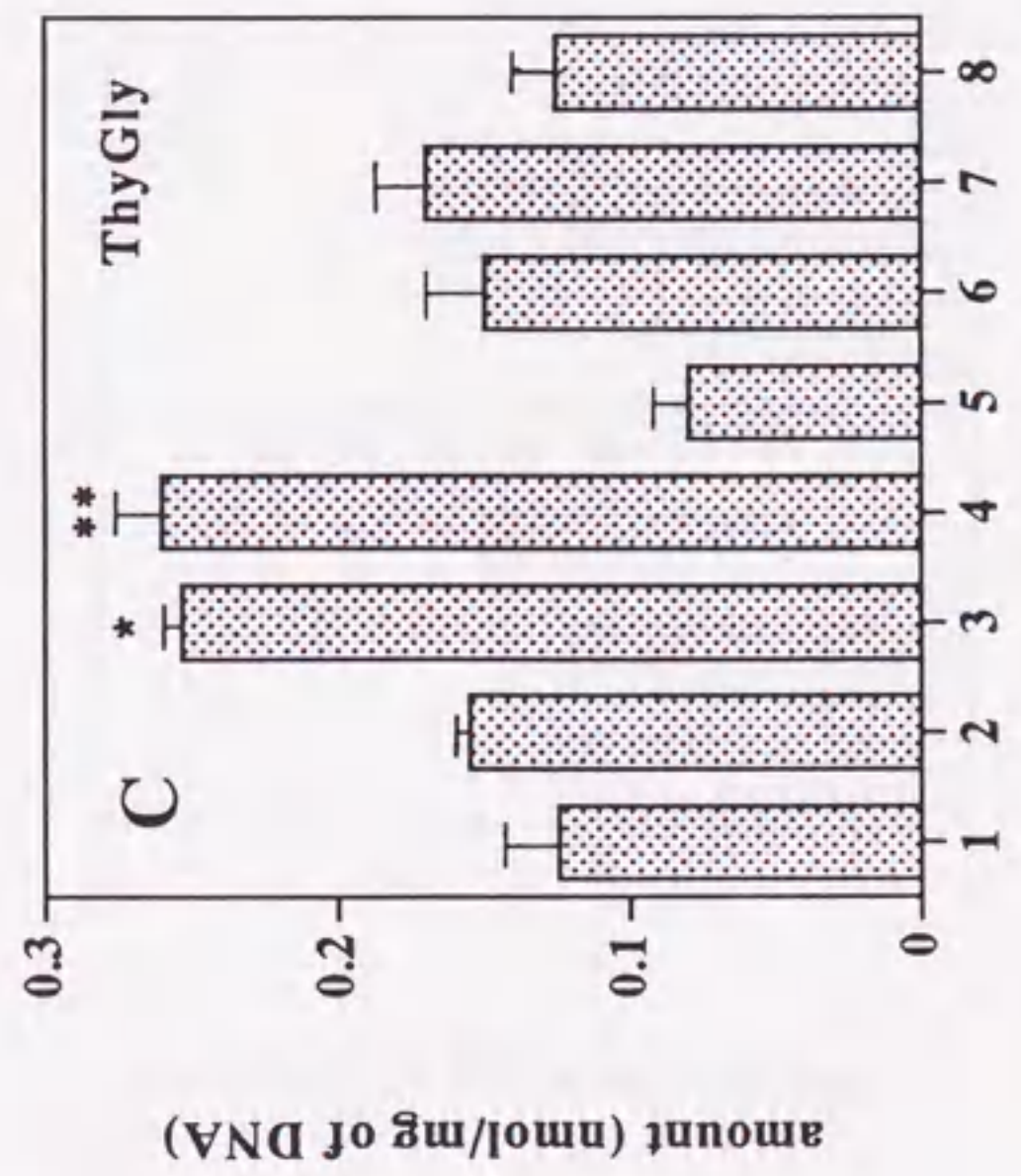
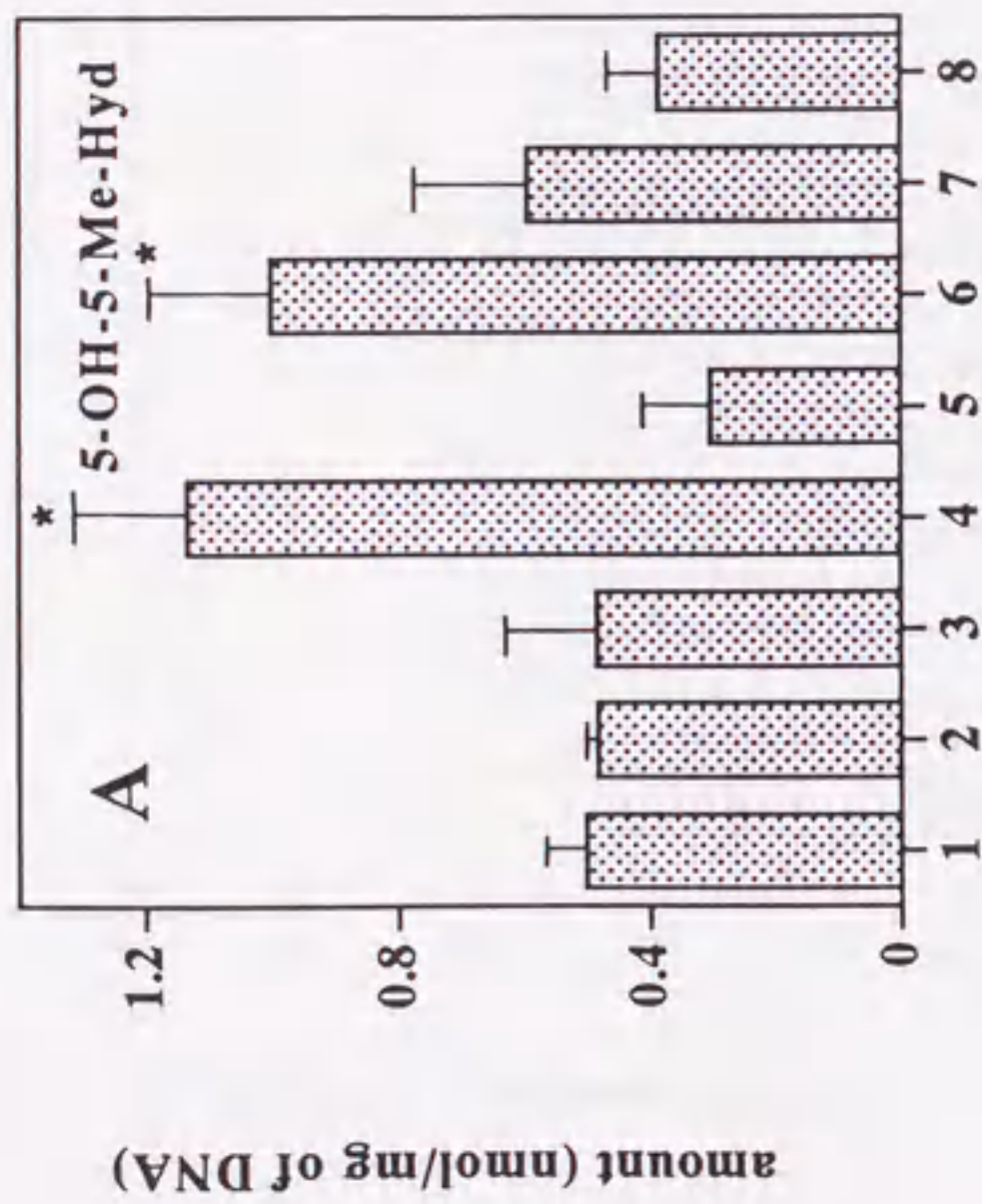
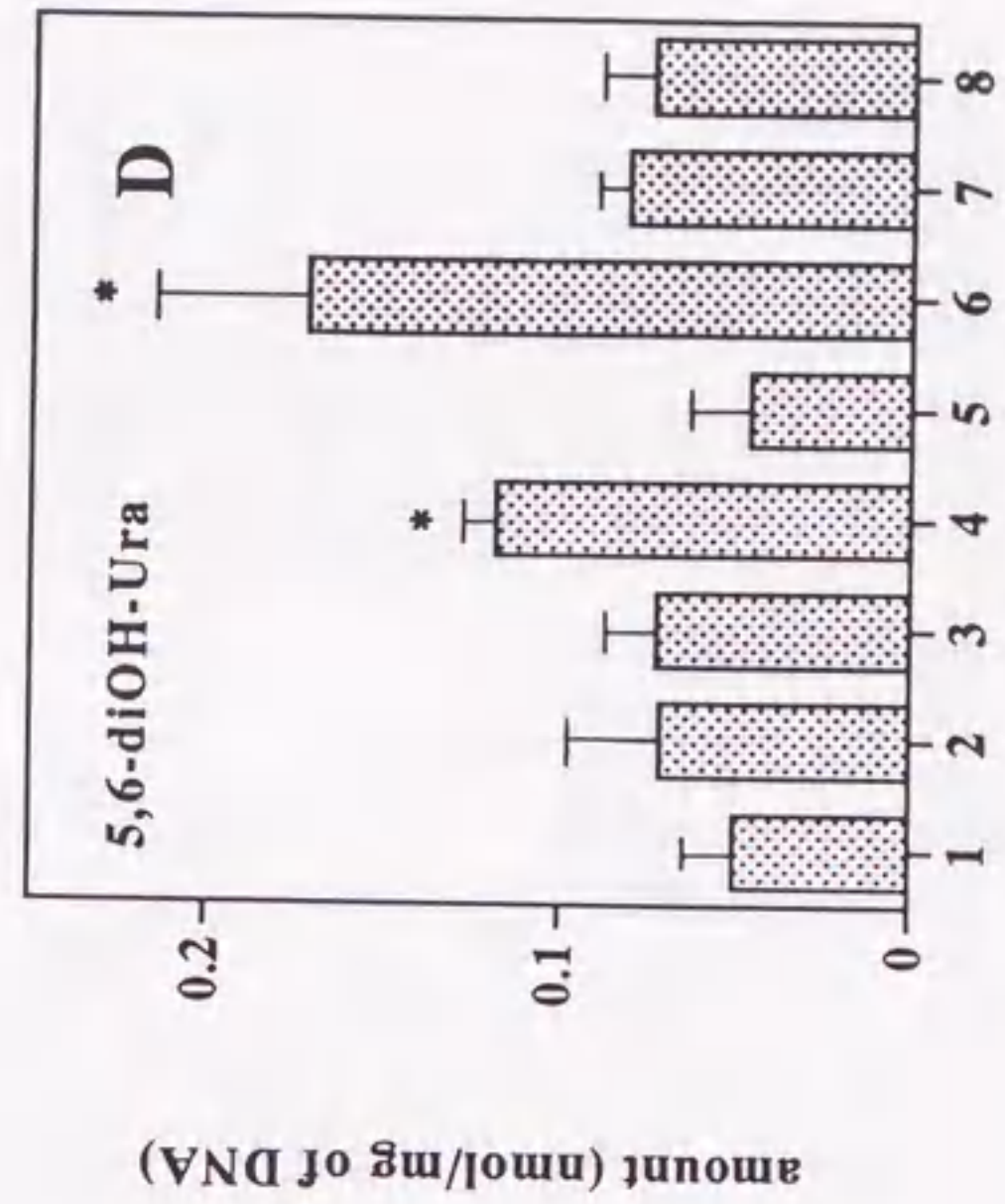
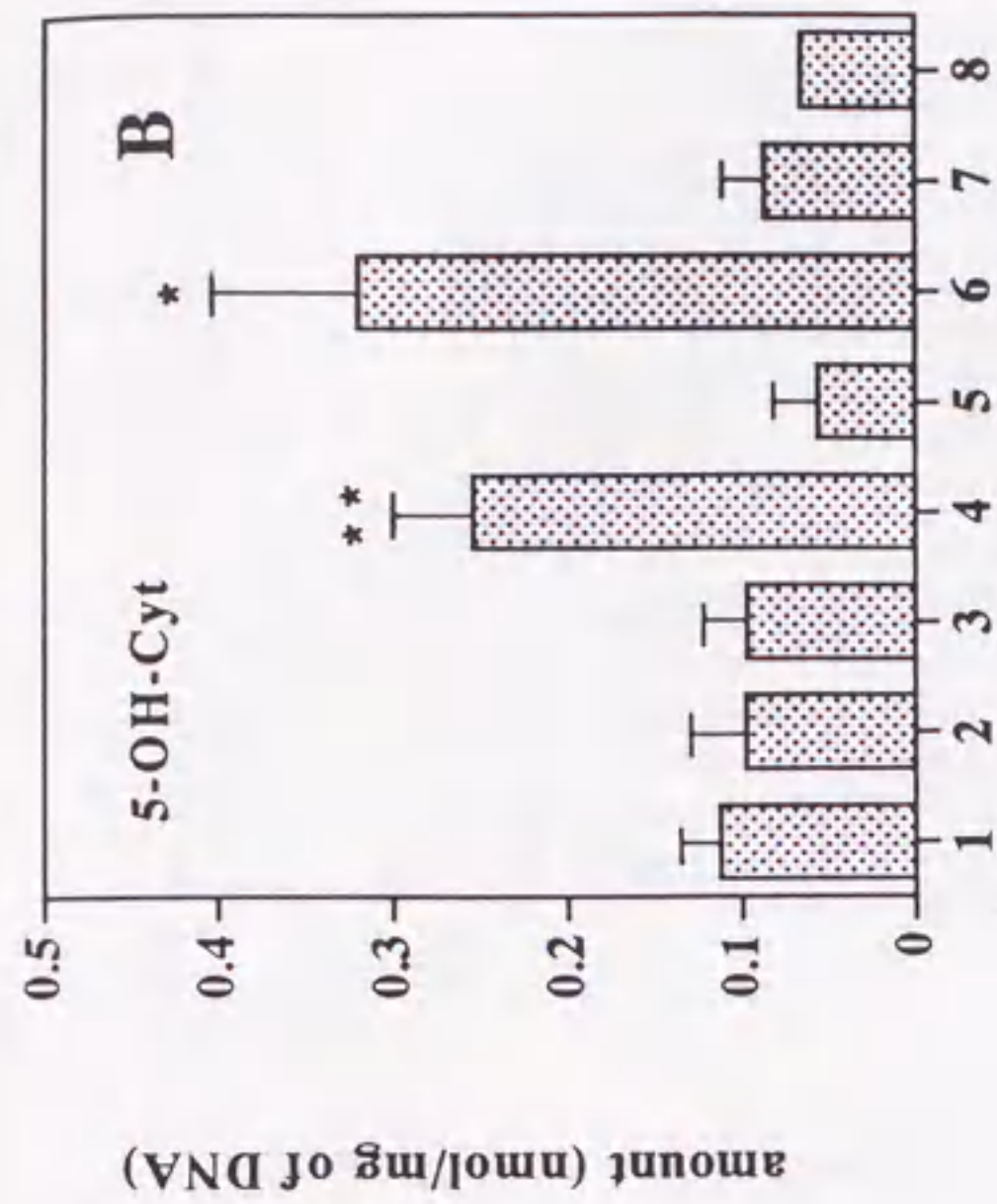


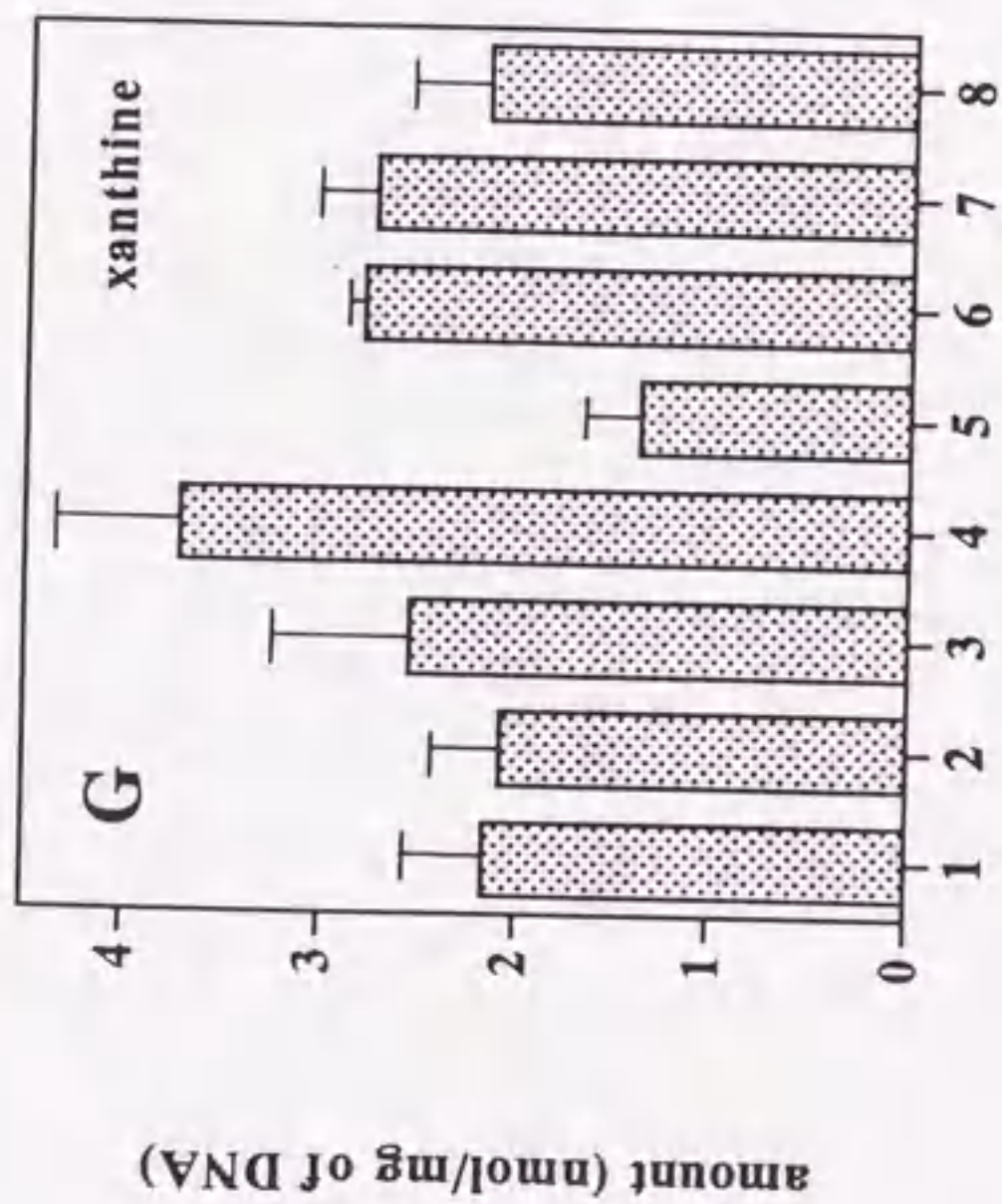
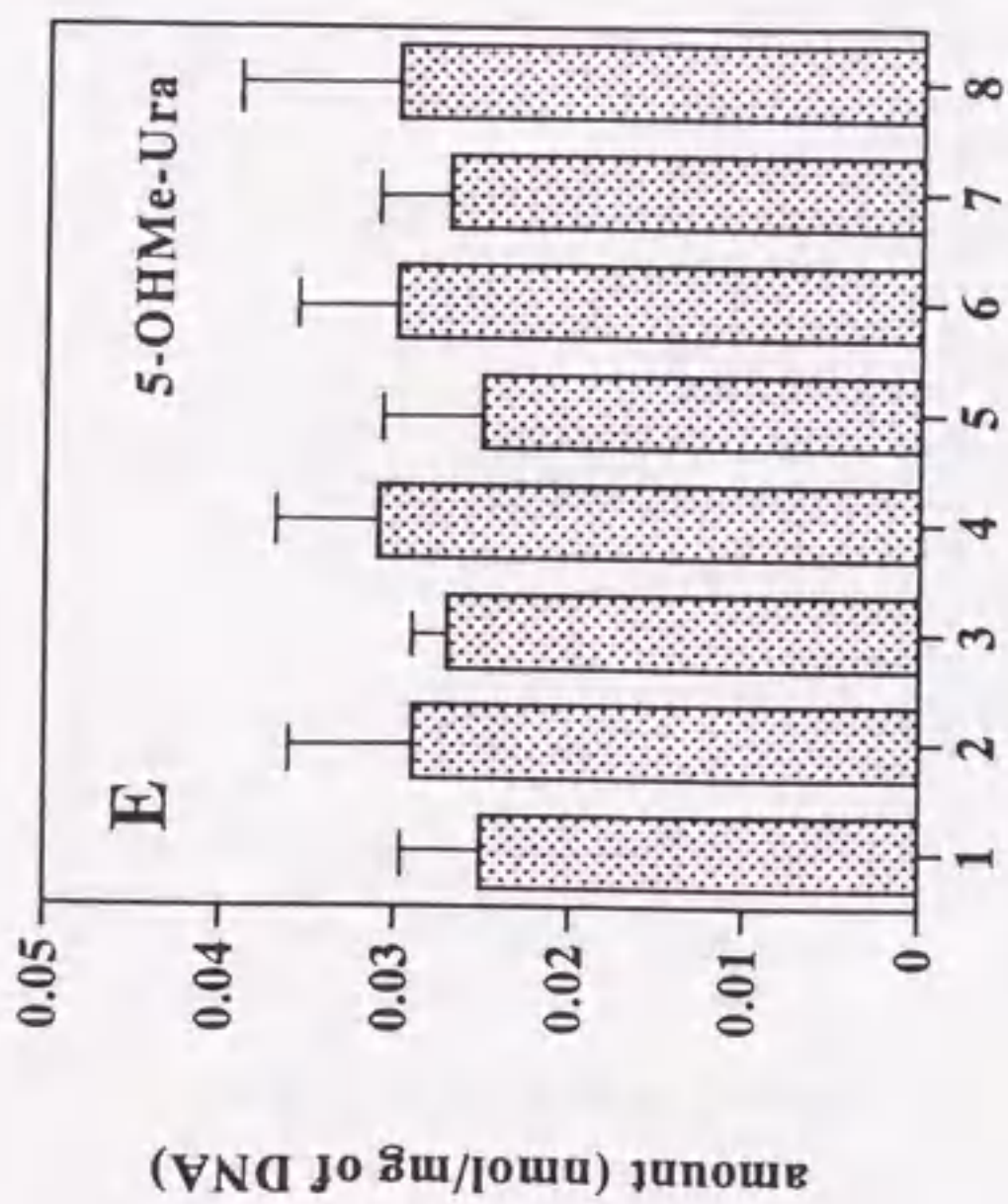
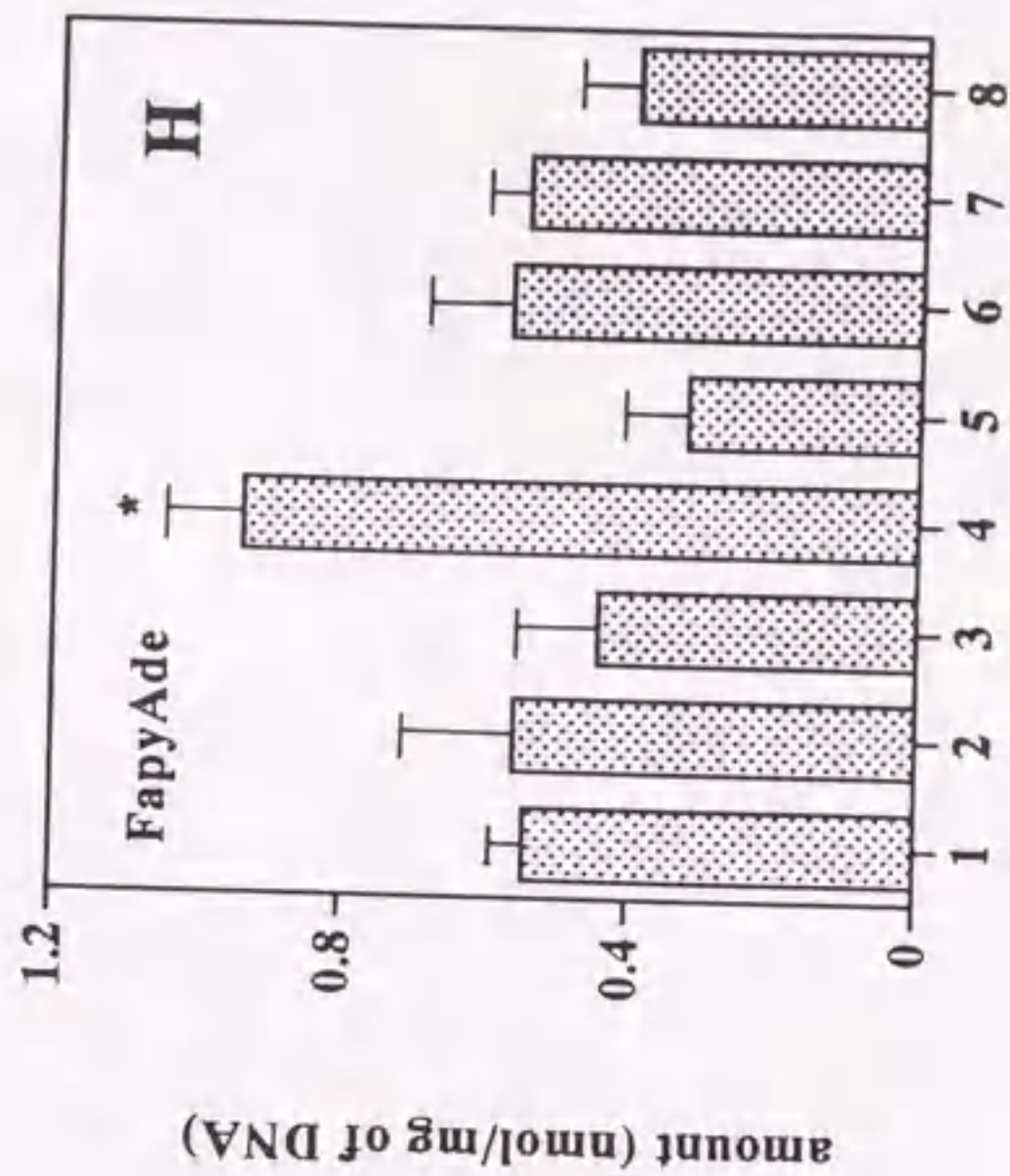
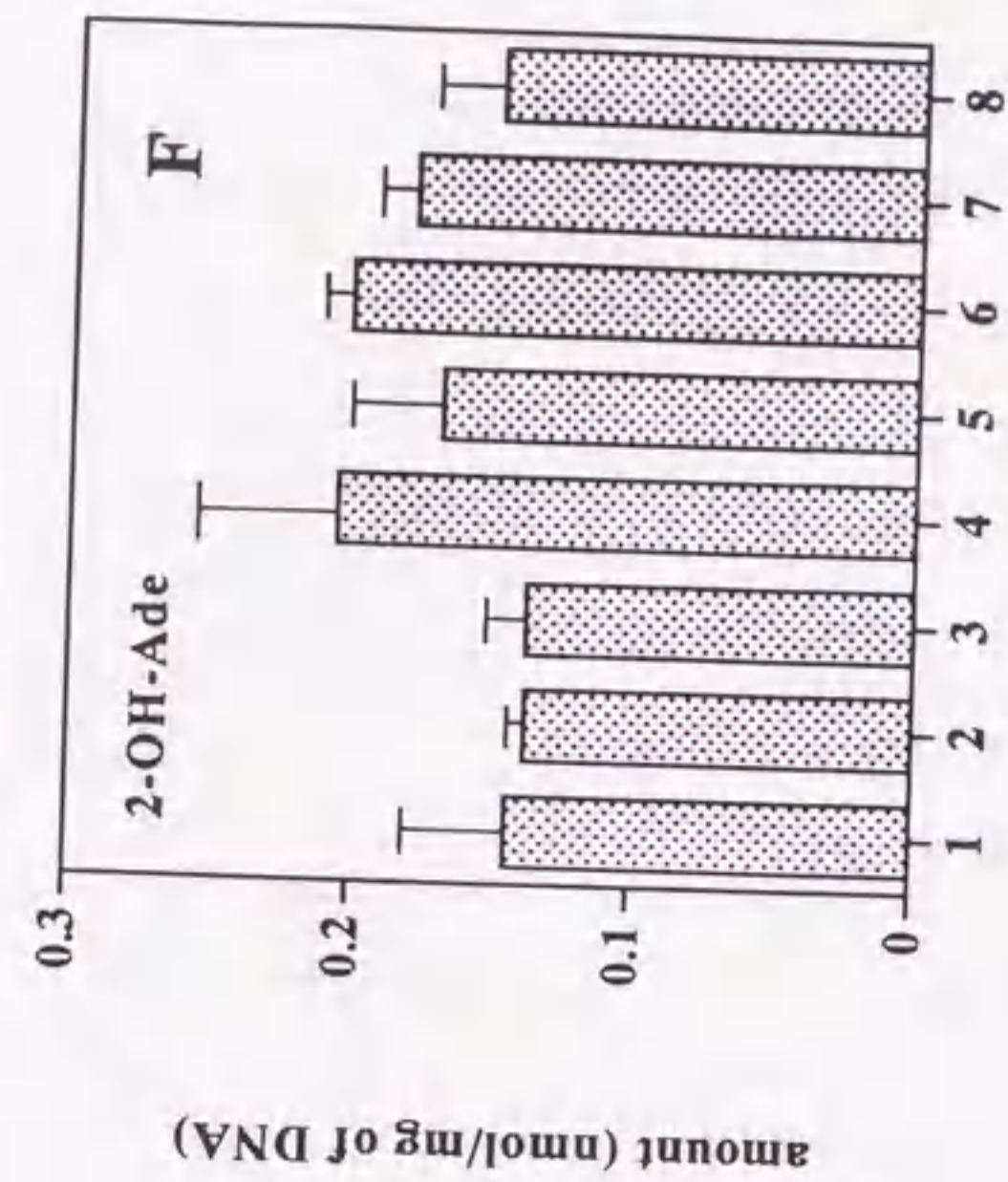
xanthine



8-hydroxyguanine

図 7-1 ラットの腎クロマチン中で検出したDNA修飾塩基.





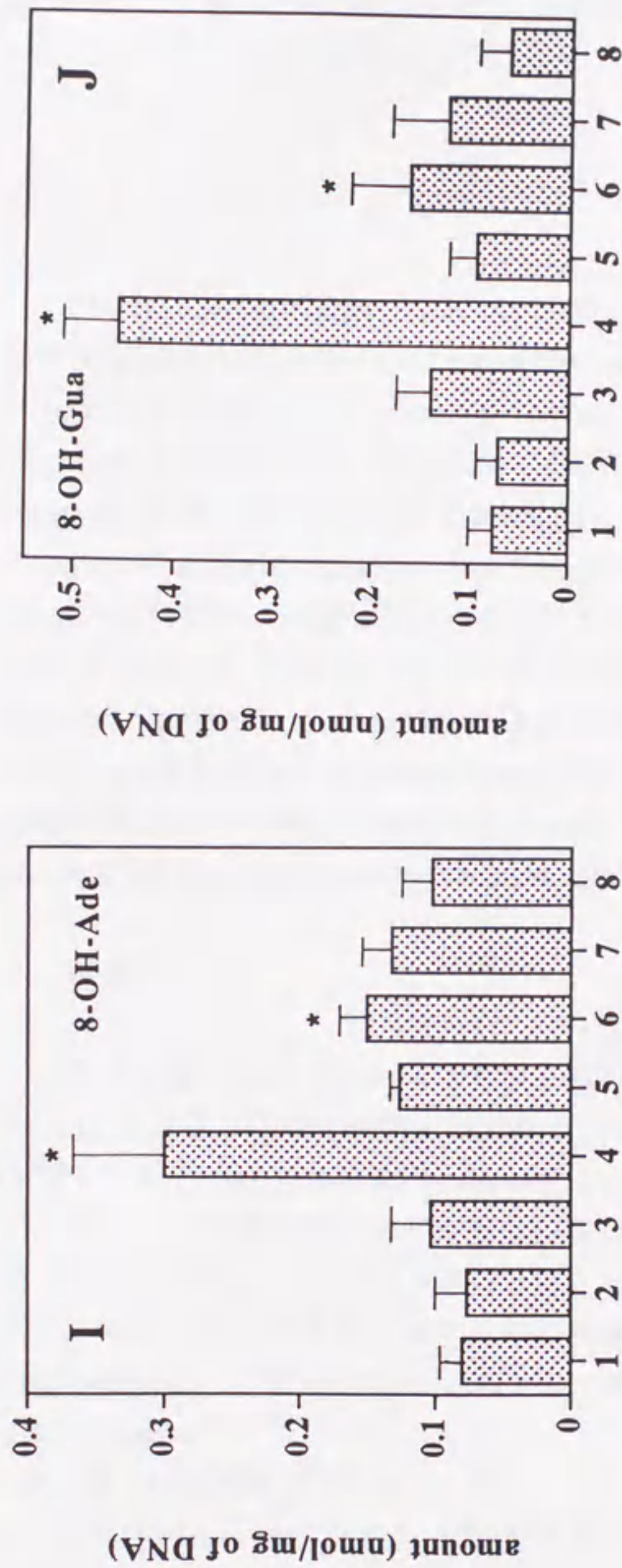


図 7-2 ラットの腎クロマチン中のDNA修飾塩基の変化。

ここであらわした単位, 1 nmol of a modified DNA base/mg of DNA bases は, ≈ 32 modified bases/ 10^5 DNA bases.

1. コントロール; 2. NTA 投与 3 時間後; 3. $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 投与 3 時間後; 4. Fe-NTA 投与 3 時間後;

5. NTA 投与 2 4 時間後; 6. Fe-NTA 投与 2 4 時間後; 7. NTA 連続投与 19 日目; 8. Fe-NTA 連続投与 19 日目.

* 統計上有意の増加($p \leq 0.05$), ** 統計上有意の増加($p \leq 0.01$).

第8章 ラットへの鉄-NTAを投与で腎クロマチンに生じるチミン-チロシン結合の研究

Abstract

Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) induces renal proximal tubular damage associated with lipid peroxidation and oxidative DNA base modifications that finally leads to a high incidence of renal adenocarcinoma in rodents. In the present study, we report on the *in vivo* formation of DNA-protein cross-links (DPCs) involving thymine and tyrosine in the renal chromatin of Wistar rats treated with single or repeated *i. p.* administration of Fe-NTA. Analyses of chromatin samples by gas chromatography/mass spectrometry revealed a significant increase in the amount of 3-[(1,3-dihydro-2,4-dioxypyrimidin-5-yl)-methyl]-L-tyrosine (Thy-Tyr cross-link) 24 and 48 hr after the administration of Fe-NTA. At 19th day of Fe-NTA treatment, the amount of Thy-Tyr cross-link decreased to the control level, indicating the presence of cellular repair activity. Thy-Tyr cross-link may play a role in the genetic alteration of this renal carcinogenesis model, since mitoses for regeneration of renal proximal tubules were closely associated with the increase in DPCs.

1. 緒言

前章でも述べたように、ニトリロ三酢酸 (NTA) は鉄とキレート錯体を形成し Fe-NTA となる。この Fe-NTA は非経口的に摂取した場合、発癌性を示す。Fe-NTA を雄ラットやマウスの腹腔内へ投与すると、数時間以内に腎近位尿細管に変性、壊死がおこり、非常に高い確率で腎癌が発生する¹⁻⁴⁾。この腎癌の発生には活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) である $\cdot\text{OH}$ ラジカルに関与が考えられる。今日では、ROS は突然変異や、発癌に深く関係していることが知られている⁵⁾。Fe-NTA の投与実験は、ROS が発癌にどのように関与しているのかを解明する上で最適のモデルとなっている。

Fe-NTA は過酸化水素と L-システインや L-アスコルビン酸の共存下、抽出クロマチンや DNA に損傷を与え、DNA 塩基の修飾や^{6,7)}や DNA の切断^{8,9)}などがおこる。また前章で示したように、Fe-NTA のラットへの投与で、腎クロマチンに DNA 修飾塩基が生じることを確認した¹⁰⁾。検出した修飾塩基はいずれも $\cdot\text{OH}$ ラジカルとの反応で生じたものであった^{11,12)}。

$\cdot\text{OH}$ ラジカルは、DNA 塩基の修飾に加えて、DNA-タンパクの結合 (DPCs) も生じる¹³⁾。抽出したクロマチンを Fe-NTA と過酸化水素で処理すると DPCs が生じる

ことから¹⁴⁾、前章で調べた DNA 塩基の修飾と併せて、Wistar ラットへの Fe-NTA 投与で、腎クロマチン中で DPCs がどのように変化をするのか調べた。

2. 実験

動物実験

6 週令の雄の Wistar ラット (体重 125~150 g) の飼育については前章と同様である。ラットは一回投与グループとして、投与後 3 時間 (Fe(III), NTA, Fe-NTA), 6 時間 (NTA, Fe-NTA), 24 時間 (control, Fe(III), NTA, Fe-NTA), および 48 時間 (Fe-NTA) とした。連続投与実験として 19 日経過群 (control, NTA, Fe-NTA) の変化を調べた。24 時間グループは非投与のコントロールを含めてそれぞれ 6 匹, 他は 3 匹ずつ合計 51 匹のラットを使用した。

Fe-NTA 投与実験と顕微鏡観察およびクロマチンの抽出

Fe(NO₃)₃·9H₂O は Wako から nitrilotriacetic acid は Nacalai Tesque から購入した。Fe-NTA の調整やラットへの投与, 腎臓の摘出, 臓器からのクロマチンの抽出などは前章と同様である。

3-[(1,3-dihydro-2,4-dioxypyrimidin-5-yl)-methyl]-L-tyrosine-²H₅ の合成

thymine- $\alpha, \alpha, \alpha, 6$ -²H₄ と tyrosine-3,3'-²H₂ (1 mM each; Cambridge Isotope Laboratories から購入) を含む水溶液を N₂O ガスで飽和し (30 分間バブリング), ⁶⁰Co γ 線で 1 kGy (dose rate 70 Gy/min) を照射した。サンプルは凍結乾燥し, HPLC で 3-[(1,3-dihydro-2,4-dioxypyrimidin-5-yl)-methyl]-L-tyrosine-²H₅ (Thy-Tyr cross-link-²H₅) を分取した¹⁵⁾。TMS 化した Thy-Tyr cross-link-²H₅ のマススペクトルから, 重水素が 5 個入っていることを確認した。Thy-Tyr cross-link-²H₅ のマススペクトルは Thy-Tyr cross-link 化合物に特徴的なパターンを示した。

酸加水分解, TMS 化と GC/MS 測定

ガラス製の試験管にクロマチンサンプルと, 既知量の Thy-Tyr cross-link-²H₅ を内部標準として加え凍結乾燥後, 6 M の HCl (Sigma) を 0.5 ml 加えて試験管を脱気封管した後, 110 °C で 6 時間加熱して酸加水分解した。加水分解物を再度凍結乾燥後, 0.1 ml の BSTFA/acetonitrile (4:1, v/v) で, 乾燥窒素雰囲気下, 130 °C で 30 分

間加熱してTMS化した。

TMS化したサンプルはこれまでと同様 GC/MS-SIM 法で分析した。サンプル 4 μ l をスプリットモードで、オートサンプラーを使い GC 部分へ注入した。実際にカラムへ導入されたサンプルは DNA 量にして約 1 μ g である。

測定値の統計学的評価

測定値の統計学的評価は unpaired t-test 法でおこなった。

3. 結果

今回の実験の目的は、ラットに Fe-NTA と、対照として NTA, Fe(NO₃)₃ を投与し、腎臓からクロマチンを抽出して、非投与のコントロールとくらべて DNA-タンパクのクロスリンク(DPCs)の変化を GC/MS-SIM 法で調べることである。GC/MS 法を応用すると、種々の DPCs を検出することができる^{15,16)}。

チミン-チロシン 2 量体 (Thy-Tyr cross-link) を、コントロールと Fe-NTA 投与ラットの双方から検出することができた。Thy-Tyr cross-link 以外の 2 量体 (Thy-Gly, Thy-Ala, Thy-Val, Thy-Leu, Thy-Ile, Thy-Thr and Cyt-Tyr) は検出することができなかった。これらの生成量が微量のためと考えられる。

Thy-Tyr cross-link は安定同位体で置換した標準化合物を内部標準として、GC/MS で正確に同定してその生成量を定量することができた。

図 8-1 には、ラットの腎クロマチン中の Thy-Tyr cross-link の生成量を図示した。非投与ラットの腎クロマチン中に含まれる Thy-Tyr cross-link のコントロール値は、ヒト培養細胞で測定した値とよく似ていた¹⁷⁾。

Fe-NTA を腹腔内に投与して、24 時間および 48 時間後に Thy-Tyr cross-link の量はコントロールにくらべて有意に増加した。Fe-NTA 投与後 3 時間、6 時間、また連続投与 19 日目ではコントロールとの差はみられなかった。NTA 単独や Fe(NO₃)₃ の投与では、Thy-Tyr cross-link 量は変化しなかった。

図 8-2 には、Fe-NTA 投与にともない腎クロマチン中の Thy-Tyr cross-link が時間とともに変化する様子を示した。この図からも明らかのように、Thy-Tyr cross-link は Fe-NTA 投与後 24 時間で最大になり、その後徐々に減少し、19 日目ではコントロールと有意の差はなくなった。

腎臓細胞の形態学的な変化については前章に記載したのと同じであり、今回の実

験でも、Fe-NTA 投与後 3 時間ないし 6 時間後に、腎近位尿細管にわずかな形態の変化がみられ、24 時間では壊死がはっきりと確認され、腎糸球体そのものが消失している様子も観察された。19 日目に巨大細胞が見られたことなど前章とまったく同じであった。一方 NTA 単独や Fe(NO₃)₃ の投与群には、顕微鏡による観察でも、腎臓細胞は変化していなかった。

4. 考察

今回の実験から、ラットの腹腔内 Fe-NTA 投与 48 時間以内に、腎クロマチン中に Thy-Tyr cross-link が生成してくることが明らかになった。*in vitro* 実験では、Fe-NTA と H₂O₂ を含む ·OH ラジカル発生系で、クロマチン中に Thy-Tyr cross-link が生成することがわかっている¹⁴⁾。ヒト由来の培養細胞 (K562) の放射線照射や過酸化水素処理でも Thy-Tyr cross-link が生じることが確認されている¹⁷⁾。

これまでの研究から、Thy-Tyr cross-link の生成に、·OH ラジカルが関与していることは明らかである。Fe-NTA 投与実験で腎クロマチンに Thy-Tyr cross-link が生じるということは、DNA 塩基の修飾と同様、傷害の発生に·OH ラジカルが深く関与しているという仮説を支持するものである。同時に Fe-NTA 単独ではこのような DNA 損傷^{7,9)}や Thy-Tyr cross-link の生成¹⁴⁾はおこらず、過酸化水素が存在してはじめて傷害が発生するという事に留意しなくてはならない。

Fe-NTA と L-アスコルビン酸、または L-システインとの組み合わせでも、過酸化水素がなければ DNA の損傷はおこらない⁹⁾。Fe-NTA 投与でおこる DNA 損傷には、過酸化水素が深く関与している。

投与された Fe-NTA が腎臓に障害を与える機構については次のように考えられる。Fe-NTA は腎糸球体で濾過され、近位尿細管へ出てくるが、この部分にはアルブミンがなく、還元剤として働くシステインが多量に存在している。この環境で 3 価の鉄が 2 価に還元され、過酸化水素と反応して ·OH ラジカルが発生し(Fenton 反応)、DNA の損傷や脂質の過酸化がおこると考えられる¹⁸⁾。

クロマチン中で Thy-Tyr cross-link が生成する機構は、·OH ラジカルとの反応で生成したチミンラジカル (Thy radical) がチロシン (Tyr) へ付加するか、Thy radical とチロシンラジカル (Tyr radical) のカップリングがおこると考えられる¹⁹⁾。

Fe-NTA のラットへの投与で、これと同様の反応が腎臓内で起こり、腎クロマチン中に Thy-Tyr cross-link が生成すると思われる。·OH ラジカルは、その高い反応性から、細胞内では発生した部位近くの分子に付加したり、酸化的損傷を与える²⁰⁾。つまりクロマチン中のチミンとチロシンのごく近傍で発生した ·OH ラジカルによ

って Thy-Tyr cross-link が生じるということである。これはチミンとチロシンがクロマチンの中で、双方が近くに存在しなくてはならないということの意味する。

チロシンはクロマチンを構成するアミノ酸の一種であり、ヌクレオソームのヒストンの H2B と H3 でヒストン-DNA 相互作用に重要な役割をはたしている²¹⁾。またチロシンは nuclear matrix 蛋白と DNA の相互作用に寄与していて、こういう部分に放射線照射による DPCs が形成されやすいという報告がある²²⁾。確かなことはわからないが、このような分子間相互作用が、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルによる Thy-Tyr cross-link の生成に一役かっているのではないかと考えられる。図 8-3 にはクロマチン中でチミンとチロシンが結合する様子を図示した。

Fe-NTA 投与による Thy-Tyr cross-link の増加は、投与後 24 時間で最大となった。一方、脂質の過酸化や DNA 修飾塩基 (5-hydroxy-5-methylhydantoin, thymine glycol, 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, 8-hydroxyadenine および 8-hydroxyguanine) の生成は、Fe-NTA 投与後 3 時間で最大になる^{10,23)}。5-hydroxycytosine と 5,6-dihydroxyuracil は 24 時間後で最大となった。ラットへの Fe-NTA 投与 *in vivo* 発癌モデル実験で DNA 損傷がおこる機構は、放射線照射のように照射量にしたがって損傷が蓄積していくような実験に比べると、きわめて複雑だといわざるを得ない²⁴⁾。

Fe-NTA 投与実験では、脂質の過酸化で生成する化合物も、ある程度 DNA 塩基の修飾や DPCs の生成に寄与していると考えられる。脂質の過酸化は、発癌に至るさまざまな過程で重要な役割をはたしている²⁵⁾。この脂質の過酸化は、生体中で DNA 損傷の原因になっているのかもしれない。脂質過酸化の結果生じる化合物、特に反応性に富むカルボニル化合物は、突然変異を引き起こす可能性が示唆されているからである²⁵⁾。しかしこの実験で検出した Thy-Tyr cross-link と、前章の DNA 修飾塩基の生成に脂質の過酸化が影響しているのかどうかは明らかでない。

ところで Thy-Tyr cross-link は Fe-NTA 投与後 24 時間でピークになり、その後減少して 19 日目にはコントロールのレベルに戻っていた。これは細胞に DPCs を修復する機構があるということの意味する。しかし実際には DPCs の修復を研究した報告はそれほど多くはない^{13,26)}。前章でも述べたように、Fe-NTA の連続投与 19 日目には、細胞の壊死はみられなくなり、腎近位尿細管に巨大異型核細胞が出現してくるのが観察された。壊死がみられなくなったということは、DNA の修復機構が働きだして、細胞が Fe-NTA による酸化ストレスに順応するようになったことを意味している。

Fe-NTA 投与でおこる DNA 修飾塩基の生成も、19 日目にはコントロールレベルに戻ることを前章で明らかにした¹⁰⁾。Thy-Tyr cross-link の生成が生物にどのような影響をあたえるのかわかっていない。しかしクロマチン蛋白は、遺伝子の立体構造

を確保するだけでなく、遺伝子の発現にも重要な役割をはたしている^{27, 28)}。DPCsの生成は遺伝子の機能を損ない、DNAの複製の際に遺伝情報の一部を失うことにつながると考えるのは当然のことである。その結果、例えば癌抑制遺伝子(p53など)の機能喪失がおこるかもしれない。豊國らはFe-NTA投与の結果、腎臓に腺癌が発生したラットでは、変異したp53が過剰発現しているケースがあることを見いだしている。いずれにしてもFe-NTAの投与でラットの腎クロマチンに生成するThy-Tyr cross-linkがどのような働きをしているのかについては、今後さらに研究を続ける必要がある。

GC/MS-SIM法をFe-NTA投与でラットに腎癌を発生するモデル動物実験に応用して、標的細胞の腎クロマチン中にThy-Tyr cross-linkが生成していることを明らかにすることができた。GC/MS-SIM法は化合物の構造まで含めて微量な成分を定量することができる。Thy-Tyr cross-linkを調べたこの研究でもその有効性が確かめられた。

参考文献

- 1) Hamazaki, S., Okada, S., Ebina, Y. and Midorikawa, O., *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **77**, 267 (1985).
- 2) Ebina, Y., Okada, S., Hamazaki, S., Ogino, F., Li, J.-L. and Midorikawa, O., *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**, 107 (1986).
- 3) Li, J.-L., Okada, S., Hamazaki, S., Ebina, Y. and Midorikawa, O., *Cancer Res.*, **47**, 1867 (1987).
- 4) Toyokuni, S., Okada, S., Hamazaki, S., Minamiyama, Y., Yamada, Y., Liang, P., Fukunaga, Y. and Midorikawa, O., *Cancer Res.*, **50**, 5574 (1990).
- 5) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., *Free radicals in biology and medicine*, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford (1989).
- 6) Aruoma, O. I., Halliwell, B., Gajewski, E. and Dizdaroglu, M., *J. Biol. Chem.*, **264**, 20509 (1989).
- 7) Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B. and Gajewski, E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **286**, 317 (1991).
- 8) Inoue, S. and Kawanishi, S., *Cancer Res.*, **47**, 6522 (1987).
- 9) Toyokuni, S. and Sagripanti, J.-L., *Carcinogenesis*, **14**, 223 (1993).
- 10) Toyokuni, S., Mori, T. and Dizdaroglu, M., *Int. J. Cancer*, **57**, 123 (1994).
- 11) Téoule, R., *Int. J. Radiat. Biol.*, **51**, 573 (1987).

- 12) Dizdaroglu, M., *Mutat. Res.*, **275**, 331-342 (1992).
- 13) Oleinick, N.L., Chiu, S., Ramakrishnan, N. and Xue, L., *Brit. J. Cancer*, **55** (Suppl. VIII), 135 (1987).
- 14) Nackerdien, Z., Rao, G., Cacciuttolo, M. A., Gajewski, E. and Dizdaroglu, M., *Biochemistry*, **30**, 4873 (1991).
- 15) Margolis, S. A., Coxon, B., Gajewski, E. and Dizdaroglu, M., *Biochemistry*, **27**, 6353 (1988).
- 16) Gajewski, E., Fuciarelli, A. F. and Dizdaroglu, M., *Int. J. Radiat. Biol.*, **54**, 445 (1988).
- 17) Olinski, R., Nackerdien, Z. and Dizdaroglu, M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**, 139 (1992).
- 18) Okada, S., Minamiyama, Y., Hamazaki, S., Toyokuni, S. and Sotomatsu, A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **301**, 138 (1993).
- 19) Dizdaroglu, M., Gajewski, E., Reddy, P. and Margolis, S. A., *Biochemistry*, **28**, 3625 (1989).
- 20) Chevion, M., *Free Radic. Biol. Med.*, **5**, 27 (1988).
- 21) Zweidler, A., *Biochemistry*, **31**, 9205-9211 (1992).
- 22) Chiu, S.-M., Friedman, L.R., Sokany, N. M., Xue, L. and Oleinick, N.L., *Radiat. Res.*, **107**, 24 (1986).
- 23) Toyokuni, S., Uchida, K., Okamoto, K., Hattori-Nakakuki, Y., Hiai, H. and Stadtman, E. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **91**, 2616-2620 (1994).
- 24) Chiu, S.-M., Xue, L.-Y., Friedman, L.R. and Oleinick, L. N., *Cancer Res.*, **49**, 910 (1989).
- 25) Cheeseman, K. H., *In DNA and free radicals*, (Halliwell, B. and Aruoma, O.I., Eds.), pp. 109, Ellis Horwood, N. Y. (1993).
- 26) Sugiyama, M., Patierno, S. R., Cantoni, O. and Costa, M., *Mol. Pharmacol.*, **29**, 606 (1989).
- 27) Grunstein, M., *Trends Genet.*, **12**, 395 (1990).
- 28) Felsenfeld, G., *Nature*, **335**, 219 (1992).

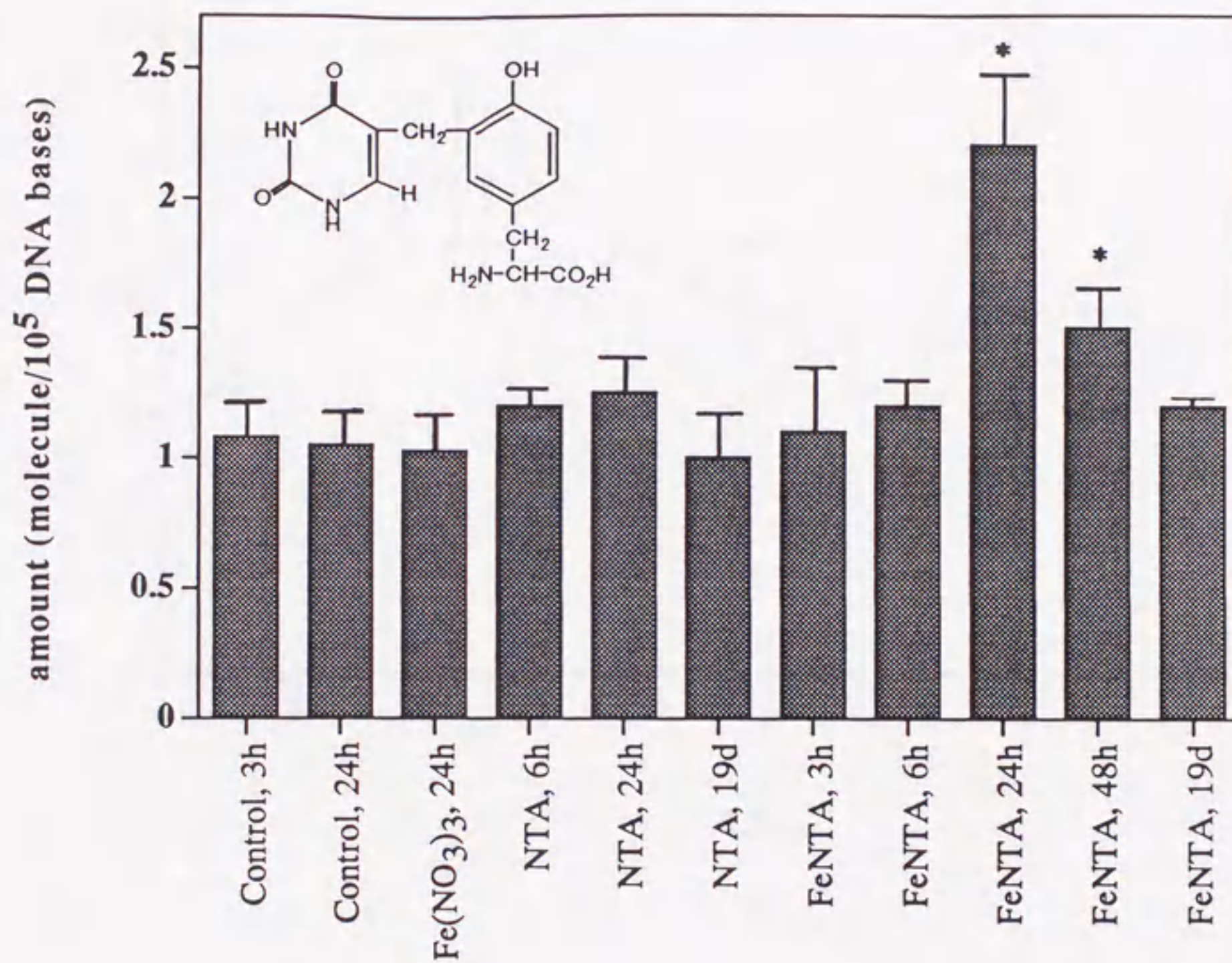


図 8-1 ラット腎クロマチン中の Thy-Tyr cross link.

* コントロールにくらべて有意に増加($p \leq 0.05$).

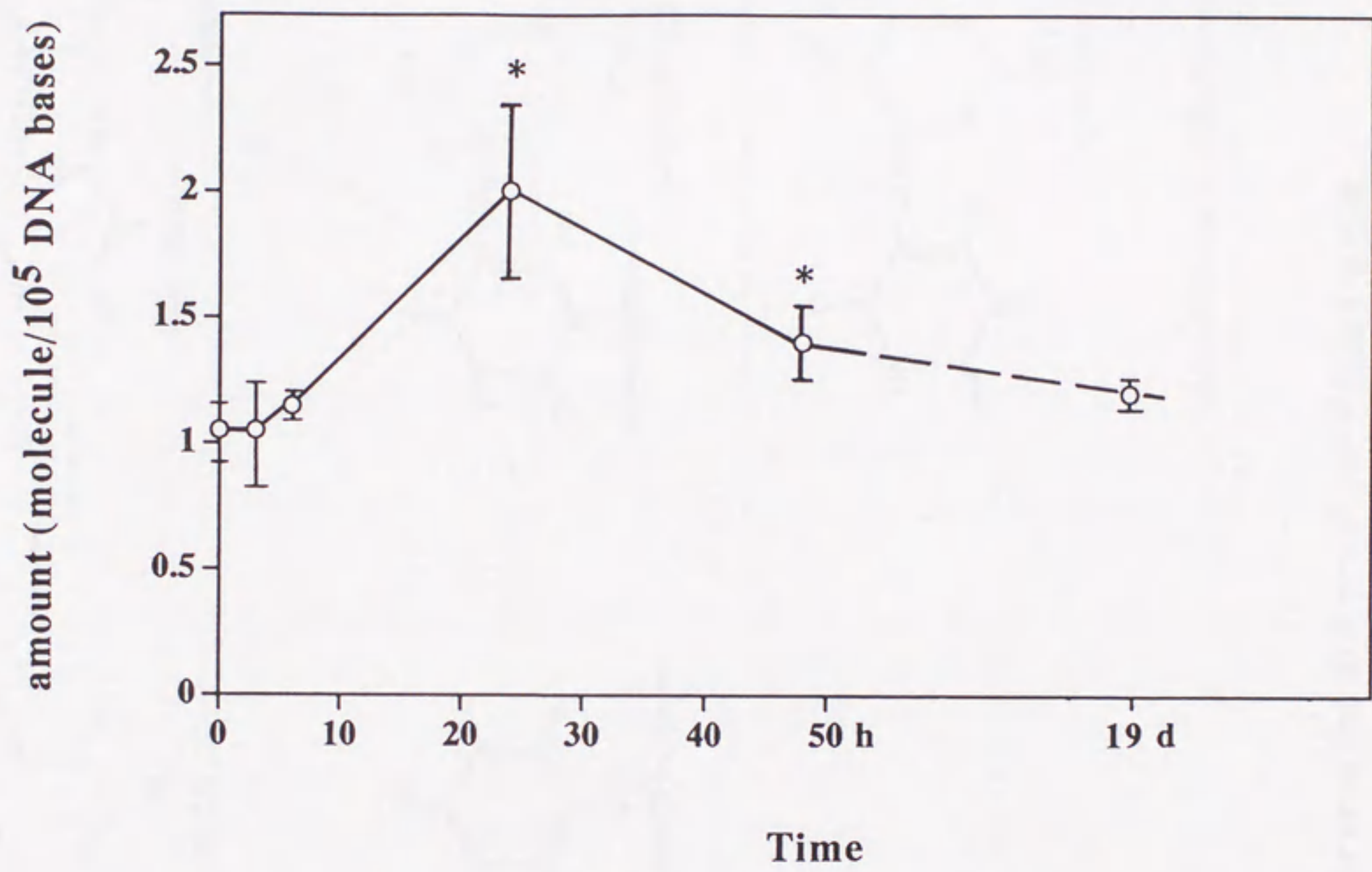


図 8-2 鉄-NTA 投与後，腎クロマチン中の Thy-Tyr cross link の時間変化.

* コントロールにくらべて有意に増加($p \leq 0.05$).

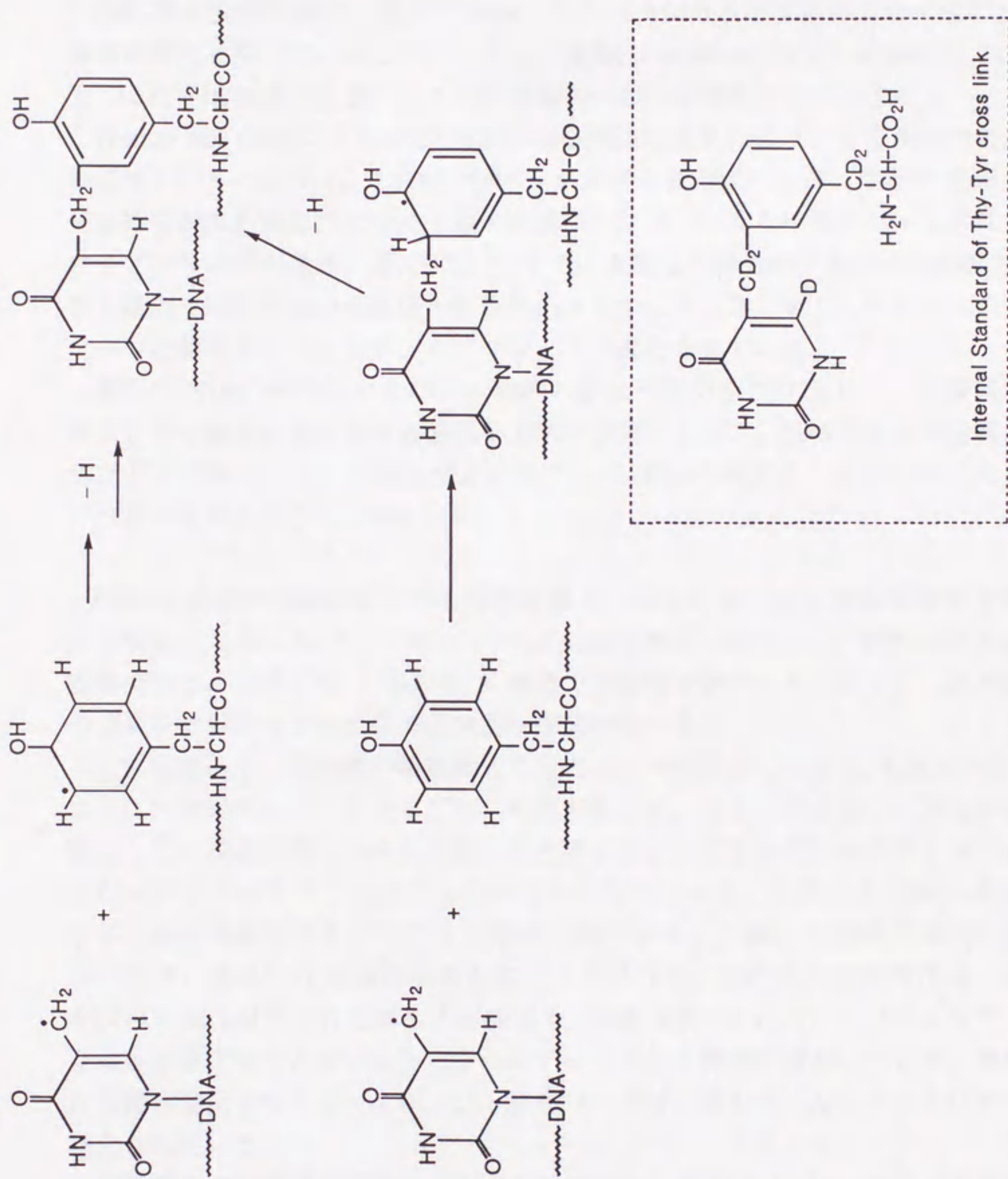


図 8-3 Thy-Tyr cross link がクロマチン中で生成する機構.

第9章 結論

1. 総括

放射線の生物影響は、遺伝子DNAとフリーラジカルの反応によって生じるDNA損傷が原因となっていることに注目し、実際に *in vitro* および *in vivo* で、DNAに生じる化学的な変化を調べることを目的に、この研究をすすめてきた。

Watson and CrickによるDNA double helix構造の発見以後¹⁾、分子生物学の進展はめざましいものがある。DNA→RNA→タンパク質合成へと続く生物の情報発現の基本的な流れが明らかになり、個々の遺伝子にどのような情報がコードされているのかという研究が急速に進んでいる。すでに大腸菌や酵母の全遺伝子が解析された。また最近では枯草菌の全遺伝子構造があきらかになった。そして現在ヒトの遺伝子すべてを読むというヒトゲノムプロジェクトが進められている。

遺伝子DNAの解明がすすむと、目的の遺伝子部分を切り出して、大腸菌などへ導入しその機能を発現させる遺伝子工学の技術によって、品種の改良や医薬品の製造などが可能になる。今後21世紀にむかってDNAの研究は、現代社会に大きなインパクトを与えることは疑いない。

DNAは細胞の情報発現に中心的な位置をしめている。また遺伝情報を子孫に伝える役割をになっている。そのためDNAはRNAにくらべると、熱的にはきわめて安定である。しかし第3章以下8章までの研究で述べてきたように、放射線照射やフリーラジカルとの反応で化学的な修飾を受ける。

正常な遺伝子が放射線や発癌物質などによって損傷を受けると、発癌や突然変異、さらには細胞死といったさまざまな障害がおこる。たとえば停止した細胞が増殖を開始して、細胞分裂して停止状態へもどるまでには、それぞれのステップでさまざまなシグナルを受けていることが明らかになっている。このときDNAに損傷があり不正常的な修飾塩基を含んだまま増殖が開始すると、誤った情報がDNAに固定され、ひどい場合にはDNAの崩壊を招くことになる。そのため細胞内には、不正常的なDNAを見つけてそれを修復する機構や、細胞周期のそれぞれのステップで、DNA合成が正常にすすんでいるかどうかをチェックする機構が備わっている。発癌はこれら修復遺伝子やチェックポイント機能が、正常に働かなくなったときにすすむと考えられている。

発癌遺伝子の探索が活発におこなわれた結果、最初にラス(ras)遺伝子で見つかった変異はおどろくべきものであった。癌化した細胞のras遺伝子では、12番目のコドンGGC(glycineをコード)がGTC(valine)に変わっていた。数千の塩基の中で、たった1カ所の塩基が置換しているだけで、ras遺伝子がつくるタンパク質の性質が

変わり、正常に機能しなくなるのである。同様の結果はその後、さまざまな原癌遺伝子や癌抑制遺伝子(p53)などでみつがっている²⁾。このような塩基の変化は、ランダムにおこっているのではなく、ある特定の領域に集中してみられるのも特徴だが、なぜそのようなことがおこるのかははっきりしたことはわかっていない。

このような塩基の置換がおこるということは、不正常的な塩基がDNA中に生じていることを原因ではないかと考えられる。放射線照射や、過酸化水素と金属イオンの反応で生成する $\cdot\text{OH}$ ラジカルなどのフリーラジカルは、DNAと容易に反応する。この結果おこるDNAの酸化的な損傷が原因となって、正常なタンパク質を作ることができなくなり、まちがった情報が発現したりする。そしてコントロールのきかない暴走状態にはいった細胞が癌細胞である。したがって、これらフリーラジカルとDNAの反応でおこる塩基の変化を、化学的に明らかにしていくことは、これまで述べてきたように、放射線の生物影響や発癌物質の作用を解明するうえで重要な研究課題である。

2. 本研究で得られた成果と展望

本研究では以上のような観点から、DNAの化学的な変化を調べようとした。しかし不正常的な修飾塩基は、DNAの中ではごくわずかにしか生成しない。そのため、DNA中の微量の化合物を分析する手段として HPLC-EC と GC/MS 法を用いる測定システムを構築し、*in vitro* および *in vivo* で DNA塩基にどのような化学変化が生じるのかを調べる実験をおこない、DNA修飾塩基の分析をおこなった。

その結果については、第3章以下第8章までの各章で明らかにしてきたが、ここで総括的にその結果をまとめる。

まず第3章では、光フェントン試薬 (I) と DNA の光反応を研究した。

この試薬は、UVA領域の光を吸収して励起し、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルを発生することがわかっている。またDNA中のグアニンが連続する領域(-GG- site)が特異的に変異をうけることも明らかになっている³⁾。

そこでマウスの白血病由来細胞 (L5178Y) にこの試薬を添加して、366 nm のUV照射をおこない、HPLC-EC法で8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)の生成を調べたところ、8-OHdGの生成を確認することができた。またその生成量からして、コバルト60 γ 線照射に匹敵する損傷をDNAに与えることがわかった。このことから光フェントン試薬 (I)は、その一部が細胞膜を通過して核に到達していること。核に到達した試薬はDNAにバインドして、位置特異的 (site specific) に $\cdot\text{OH}$ ラジカルを発生し、DNAに酸化的損傷を与えていることを明らかにすることができた。

また calf thymus DNA との反応では、細胞を使った場合よりも 8-OHdG は、はるかに多く生成することがわかった。しかし試薬の濃度を増やすと 8-OHdG の生成量は飽和して、さらに試薬の濃度を増やすと減少していった。これは calf thymus DNA が断片化して、エタノール沈殿で回収できなかったのか、8-OHdG がさらに $\cdot\text{OH}$ ラジカルと反応して分解していったことなどが原因と考えている⁴⁾。

第4章では、リボフラビンを添加して calf thymus DNA に可視光を照射したときの DNA 損傷の特徴を研究した。

従来の研究では、リボフラビンを添加して細胞や DNA を光照射すると、8-OHdG が生成することが確認されている。しかし 8-OH-Gua 以外の修飾塩基についてはこれまで報告がなかった。そこで HPLC-EC 法より、多くの化合物を検出できる GC/MS 法を用いて、比較的 analysis の容易なプリン系の塩基について測定をおこなった。

プリン塩基由来の7種類の化合物 8-OH-Gua, FapyGua, xanthine, 8-OH-Ade, 2-OH-Ade, FapyAde と hypoxanthine を測定したところ、コントロール DNA からこれらを検出できることがわかった。

リボフラビンを添加して可視光を照射すると、7種類の化合物の中で 8-OH-Gua と FapyGua だけが生成してくることがわかった。その他は変化しなかった。8-OH-Gua の生成量は照射時間とリボフラビンの濃度に比例して増加したが、FapyGua は飽和したことが特徴点であった。

リボフラビンを添加して光照射すると、第3章の光フェントン試薬を使用した場合と同様に、グアニンが連続する-GG-領域が損傷を受けるということを Ito らが報告している⁵⁾。GC/MS 法で調べた結果、グアニン由来の修飾塩基だけが増加して、アデニン由来の修飾塩基は変化しなかった。この結果は Ito らの報告と一致する。リボフラビンは光励起して DNA から電子を引き抜く Type I 型の酸化反応をする⁶⁾。DNA 塩基の中でイオン化ポテンシャルの最も低いグアニンが⁷⁾、リボフラビン励起三重項から電子を引き抜かれて酸化される可能性が高いことを、GC/MS 法を応用した生成物分析から明らかにすることができた⁸⁾。

第5章以下は、米国 NIST の Dizdaroglu 研究室でおこなった *in vivo* での DNA 損傷の研究である。Dizdaroglu 博士は DNA 損傷の研究にいち早く GC/MS 法を応用して、かずかずの先駆的な成果をあげてきた。最近では安定同位体で置換した DNA 修飾塩基の標準サンプルを数多く所有し、isotope dilution GC/MS 法をおこなっている⁹⁾。この手法を用いると、DNA を構成する複雑な成分の中から目的の化合物を正確に同定し、定量することができる。特にこの方法は、細胞の DNA 損傷を研究する際に

大きな威力を発揮する。

そこで *in vivo* で生じるDNA塩基損傷の研究として、マウスや細胞の γ 線照射をおこない、クロマチンを抽出してDNAの分析をおこなった。

またラットに腎癌を誘発する発癌物質である鉄-NTAを投与して、標的臓器である腎臓クロマチンのDNAにどのような化学変化がおこるのか研究した。

まず第5章の研究では、大阪府立大学先端科学研究所のコバルト60 γ 線照射施設でマウスを全身放射線照射し、肝臓からクロマチンを抽出し、NISTで分析をおこなった。

GC/MS法ではDNAを酸加水分解して糖-塩基のグリコシド結合を切り、塩基をTMS化して分析する。そのため、RNAがDNAの中に混じっていると、検出した修飾塩基がDNAに由来するのか、それともRNAに生じたものかの判別がつかない。そのためDNAを抽出したときにはRNAaseで酵素処理し、RNAを分解することが必要になる。しかしその処理の過程で修飾塩基の一部が失われることがある。

しかし核クロマチンを抽出すれば、RNAのDNAサンプルへの混入は低く押さえることができるのでRNAase処理は必要ない。また抽出処理過程のすべてを氷温でおこなうので、修復酵素の働きを抑えることができる。また抽出操作はフェノールなど、DNAを酸化する可能性のある試薬を使わずに、濃厚ショ糖溶液で細胞を膨潤させ、遠心によって核を回収するという操作だけである。このことから、DNAの回収率こそ少なくなるものの、マイルドな条件でDNAを取り出すことができる。またDNAと核タンパクを同時に回収することで、DNAとタンパク質結合体の分析も可能になる。

マウスの放射線照射の研究で、肝臓のクロマチンDNAから、ピリミジンおよびプリン由来の10種類のDNA修飾塩基を検出することができた。これらはすべて $\cdot\text{OH}$ ラジカルとの反応で生成したものであった。またDNA中の4塩基のすべてが変化していた。

100 Gyを照射したときに、修飾塩基が増加する様子をはっきりと観察できた。また470 Gy以上の放射線照射で生成量は飽和した。増加した修飾塩基の中では、FapyAdeとFapyGuaの増加量が最も大きかった。

この研究で、放射線照射にともなっておこる、細胞中のDNA塩基損傷の実体が、はじめて明らかになったといえる。またDNAの修復機構が働いている様子なども観測することができた¹⁰⁾。

第6章ではマウス白血病細胞(L5179Y)から分離された放射線感受性突然変異株(M10)の、放射線照射で生じるDNA修飾塩基の特徴を研究した。

細胞を氷温に保ち、NISTのコバルト 60 γ 線照射装置で両細胞を同時に照射し、クロマチンを抽出して修飾塩基の分析をおこなった。この場合も10種類の修飾塩基を検出することができた。

特徴的なことは、放射線感受性のM10細胞の方が、親株にくらべて修飾塩基の生成量が多いということがわかったことであつた。10種類の修飾塩基の中ではFapyGuaの生成量が最大であつた。これは前章のマウスの全身放射線照射でもみられたことと共通している。生成が確認できた修飾塩基はすべて $\cdot\text{OH}$ ラジカルとの反応で生成したものであつた。放射線照射にともなつて放射線感受性株でDNAがより多く生成するということは、放射線感受性との関連性が十分に考えられるが、現時点でその理由はわからない。

いずれにしてもこの研究は、放射線感受性の突然変異株とその親株との間で、放射線によるDNA損傷に差があることを化学的な手法で見つけることができた最初の報告である¹¹⁾。

第7章ではラットに腎癌を誘発する発癌物質、鉄-NTAを投与したときに標的臓器の腎クロマチンに生じるDNA修飾塩基を、時間経過的に追跡した。

生体内では、鉄イオンはトランスフェリンと結びついて貯蔵される。そのため細胞内には、通常フリーの鉄イオンは存在しない。しかし鉄-NTAをラットの腹腔に投与すると、数時間程度ではあるが血中に鉄イオンが存在する。実験的に鉄-NTAをラットの腹腔に投与すると、投与部分とは異なる腎臓に癌が生じることを、現岡山大学医学部の岡田茂博士らがはじめて見いだした¹²⁾。

そこで鉄-NTAをラットの腹腔に投与して、腎臓からクロマチンを抽出して、DNA修飾塩基が時間経過的にどのように変化するか調べた。コントロールの腎クロマチンで10種類の修飾塩基を測定できることがわかつた。これらは鉄-NTAを投与後、3時間で最大になり、24時間では、一部はコントロールにくらべて有意に増加していたが、全体としては減少した。投与後3時間で、8-OH-Guaは最大の増加をした。鉄-NTAの連続投与(19日間)や、配位子であるNTAや、鉄イオンの投与では、DNA塩基に変化は見られなかつた。

一方、顕微鏡による病理学的な観察では、3時間で腎近位尿細管にわずかな形態変化が観察され、24時間では壊死がはっきりとみられるようになっていた。さらに連続投与19日目では、巨大な異型核をもつた細胞が出現していた。

この研究で、標的臓器の腎臓細胞にみられる形態変化に先だつて、DNA塩基の修飾が起こっていること。検出できた修飾塩基は、すべて $\cdot\text{OH}$ ラジカルとの反応で生じたものであつた。このことから鉄-NTAを投与することによっておこる腎癌

には、DNAの酸化的損傷が重要な役割をはたしていると考えた¹³⁾。

第8章では第7章と同様に、ラットに鉄-NTAを投与したときに腎クロマチンに生じるDNAとタンパク質の結合(DNA protein cross-link)を研究した。

細胞内でDNAとタンパク質の結合が生成する量はきわめてわずかであり、化学的に同定してそれを定量することは、DNA塩基の修飾を研究するよりはるかに難しいのが現状である。本研究では、安定同位体で置換したチミン-チロシン2量体(Thy-Tyr cross-link)を合成し、これを内部標準に用いることでGC/MS法による微量分析が可能となった。

ラットに鉄-NTAを投与する動物実験は、第7章と同様の方法でおこない、腎臓からクロマチンを抽出した。なおこの動物実験は京都大学医学部病理学教室で実施し、クロマチンの分析はNISTでおこなった。

Thy-Tyr cross-linkは鉄-NTA投与後24および48時間で、コントロールにくらべて有意に増加した。一方、3時間後と6時間後、および連続投与19日目ではコントロールと差はなかった。Thy-Tyr cross-linkは、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルとチミンの反応で生じたチミンラジカルがチロシンに付加するか、チミンとチロシンラジカルがカップリングして生じる。Thy-Tyr cross-linkの生成が確認できたことは、DNAの近傍で発生した $\cdot\text{OH}$ ラジカルがDNAを攻撃することによって、DNAの酸化的な損傷がおこっていることの反映である。

鉄-NTA投与後24時間で、Thy-Tyr cross-linkの生成量は最大になり、その後減少していった。DNA-タンパクの結合は、DNA塩基の修飾とは少し時間的に遅れてあらわれることがわかった。また24時間から48時間後へと時間が経過するにつれて、その生成量が減少することから、細胞はThy-Tyr cross-linkを修復する機構を持っていると考えた。しかしDNA-タンパクの結合を修復する機構についてはまだよくわかっていない。

GC/MS法を応用することによって、ラットに鉄-NTA投与すると、標的臓器の腎クロマチンにDNA-タンパク質の結合が生じることを明らかにすることができた。またThy-Tyr cross-linkが、時間の経過とともに減少していく様子を追跡することができた。DNA修飾塩基の生成とあわせて、Thy-Tyr cross-linkが生じることは、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルの関与が、腎癌の発生に重要であることを示唆している¹⁴⁾。

以上総括的に本研究で得られた成果と、その意義をまとめた。HPLC-ECやGC/MS法を応用して、放射線や細胞内のフリーラジカルによるDNAの酸化的損傷の研究をすすめてきた。そしてここで得られた成果は、細胞内でのDNA損傷のさまざま

な様子を明らかにするものであった。これらは従来の分析手法では、検出することができなかったものばかりである。この研究をとおしてDNAの酸化的損傷の実体解明にわずかばかりの貢献ができたと考えている。

DNAが、放射線やフリーラジカルで損傷を受けるということは、生物にとってきわめて深刻な問題である。今後その生物学的な影響が、分子レベルでさらに解明されるよう願っている。

参考文献

- 1) Watson, J. D. and Crick, F. H. C., *Nature*, **171**, 737 (1953).
- 2) Gleenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M. and Harris, C. C., *Cancer Res.*, **54**, 4855 (1994).
- 3) Matsugo, S., Kawanishi, S., Yamamoto, K., Sugiyama, H., Matsuura, T. and Saito, I., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **30**, 1351 (1991).
- 4) S. Matsugo, S. Kumaki, C. Shimazaki, T. Mori and I. Saito, *Chem. Lett.*, 453-456 (1993).
- 5) Ito, K., Inoue, S., Yamamoto, K., and Kawanishi, S., *J. Biol. Chem.*, **268**, 13221 (1993).
- 6) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Berger, M., and Cadet, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9692 (1992).
- 7) Orlov, V. M., Smirnov, A. N., and Varshvsky, Y. M., *Tetrahedron Lett.*, **48**, 4377 (1976).
- 8) Mori, T., Tano, K., Takimoto, K. and Utsumi, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **242**, 98 (1998).
- 9) Dizdaroglu, M., *FEBS Lett.*, **315**, 1 (1993).
- 10) Mori, T., Hori, Y. and Dizdaroglu, M., *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**, 645-650 (1993).
- 11) Mori, T. and Dizdaroglu, M., *Radiat. Res.*, **140**, 85-90 (1994).
- 12) 岡田 茂, 翠川 修, *内科宝函*, **29**, 458 (1982).
- 13) Toyokuni, S., Mori, T. and Dizdaroglu, M., *Int. J. Cancer*, **57**, 123-128 (1994).
- 14) Toyokuni, S., Mori, T., Hiai, H. and Dizdaroglu, M., *Int. J. Cancer*, **62**, 309-313 (1995).

謝辞

この研究の推進にあたって、かつての NBS, 現 National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899-0001 の Miral Dizdaroglu 博士には、研究資金の援助もふくめて大変お世話になった。また放射線医学総合研究所の佐藤弘毅博士からは M10 細胞を、大阪府立大学先端科学研究所の堀靖治博士には L5178Y 細胞を提供していただいた。ここに記して感謝申し上げる。

この研究をすすめるきっかけになったのは、1990年4月に当時の大阪府立放射線中央研究所が廃止となって、大阪府立大学の附属研究所に移管されたことであった。これを機会に放射線の生物影響を化学の立場から明らかにできるような研究に取り組みたいと考えて、それまであまり研究されていなかったグアニンを対象をしぼり、まず HPLC-EC システムで 8-OHdG を測定しようと取り組みはじめた。

今でこそ 8-OHdG の測定は簡単にできるようになったが、当時は測定システムを確立することから始まって、困難の連続だった。その際いろいろ教えていただき、国立がんセンター研究所で測定の便宜をはかっていただいた、現産業医科大学の葛西宏博士に心から感謝申し上げます。大阪大学医学部の竹内亨博士には、国立がんセンター研究所でお会いしてから現在にいたるまで、DNA の抽出や実験でお世話になっている。また共同研究者の富山大学工学部の松郷誠一博士、京都大学医学部の豊国伸哉博士、京都大学原子炉実験所の田野恵三博士、山口大学農学部の滝本晃一博士には、この間のご協力に心から感謝を申し上げます。大阪府立大学先端科学研究所のみなさんには、研究の推進でいろいろとご協力を願った。ご迷惑をおかけしたこともあったと思うがお許し願いたい。

名古屋大学大学院人間情報学研究科の吉川研一先生には、この研究論文をまとめるきっかけを与えていただき、あたたかいご指導をいただいた。

最後になったが、私の両親と家族には、私の慣れない海外赴任の際にいろいろと迷惑をかけ、また心の支えにもなってくれた。その他お名前をあげなかったが、多くの友人、知人、研究者仲間のみなさんに激励していただいた。これらの方々の援助なくしては、この研究をここまで進めることはできなかった。深く感謝する次第です。

出版目録

- T. Mori, K. Tano, K. Takimoto and H. Utsumi, Formation of 8-hydroxyguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine in DNA by riboflavin mediated photosensitization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **242**, 98-101 (1998).
- S. Toyokuni, T. Mori, H. Hiai and M. Dizdaroglu, Treatment of Wistar rats with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate, causes DNA-protein cross-linking between thymine and tyrosine in their renal chromatin, *Int. J. Cancer*, **62**, 309-313 (1995).
- S. Toyokuni, T. Mori and M. Dizdaroglu, DNA base modifications in renal chromatin of Wistar rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate, *Int. J. Cancer*, **57**, 123-128 (1994).
- T. Mori and M. Dizdaroglu, Ionizing radiation causes greater DNA base damage in radiation-sensitive mutant M10 cells than in parent mouse lymphoma L5178Y cells, *Radiat. Res.*, **140**, 85-90 (1994).
- T. Mori, Y. Hori and M. Dizdaroglu, DNA base damage generated in vivo in hepatic chromatin of mice upon whole body γ -irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**, 645-650 (1993).
- S. Matsugo, S. Kumaki, C. Shimazaki, T. Mori and I. Saito, Significant formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in photoirradiation of photo-fenton reagent with calf thymus DNA and L5178Y cells, *Chem. Lett.*, 453-456 (1993).
- S. Matsugo, T. Miyahara, K. Yamaguchi, T. Mori and I. Saito, DNA strand scission and cell-killing activity of hydroperoxynaphthalimide derivatives upon photoirradiation, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, **23**, 109-110 (1991).

その他の出版目録 (参考)

(居住環境放射能の調査研究)

森 利明、堀 靖治、武田 篤彦、屋内ラドン濃度を求める上での問題点 (生活様式等)、放医研環境セミナーシリーズ No.15、生活環境におけるラドン濃度とそのリスク、小林定善、完倉孝子編集、pp.211-217、実業公報社、1987年。

Toshiaki Mori, Yasuharu Hori, Atsuhiko Takada, Tamiko Iwasaki, Masahumi Uchiyama, Kenzo Fujimoto, Takako Kankura and Sadayoshi Kobayashi, Measurement of indoor radon concentrations in Osaka, Nara, Wakayama and Hyogo with passive dosimeter, *Ann. Rep. Osaka Pref. Radiat. Res. Inst.*, **29**, 63-67 (1989).

森 利明、堀 靖治、武田 篤彦、居住環境ラドン濃度測定調査結果の概要、大阪府立放射線中央研究所 (1988年12月)。

(パルスラジオリシス法による放射線化学反応の研究)

H. Horii, S. Fujita, T. Mori and S. Taniguchi, Pulse radiolysis of aqueous solutions of substituted phosphonium ions, *Radiat. Phys. Chem.*, **19**, 231-236 (1982).

H. Horii, S. Fujita, T. Mori and S. Taniguchi, Formation of benzyl radicals by pulse radiolysis of benzyltriphenylphosphonium chloride in aqueous solutions, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 3099-3100 (1979).

S. Fujita, H. Horii, T. Mori and S. Taniguchi, Studies of emission species observed on pulse radiolysis of mercuric halides in aqueous systems, *J. Phys. Chem.*, **82**, 1693-1696 (1978).

S. Fujita, H. Horii, T. Mori and S. Taniguchi, New radioluminescence effects of aqueous HgI₂ solutions after high energy electron irradiation, *J. Chem. Phys.*, **66**, 355-356 (1977).

H. Horii, S. Fujita, T. Mori and S. Taniguchi, Pulse radiolysis of aqueous solutions of tetraphenylphosphonium ions, *Int. J. Radiat. Chem.*, **8**, 521-525 (1976).

S. Fujita, H. Horii, T. Mori and S. Taniguchi, Pulse radiolysis of HgBr₂ in aqueous solutions, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **49**, 1250-1253 (1976).

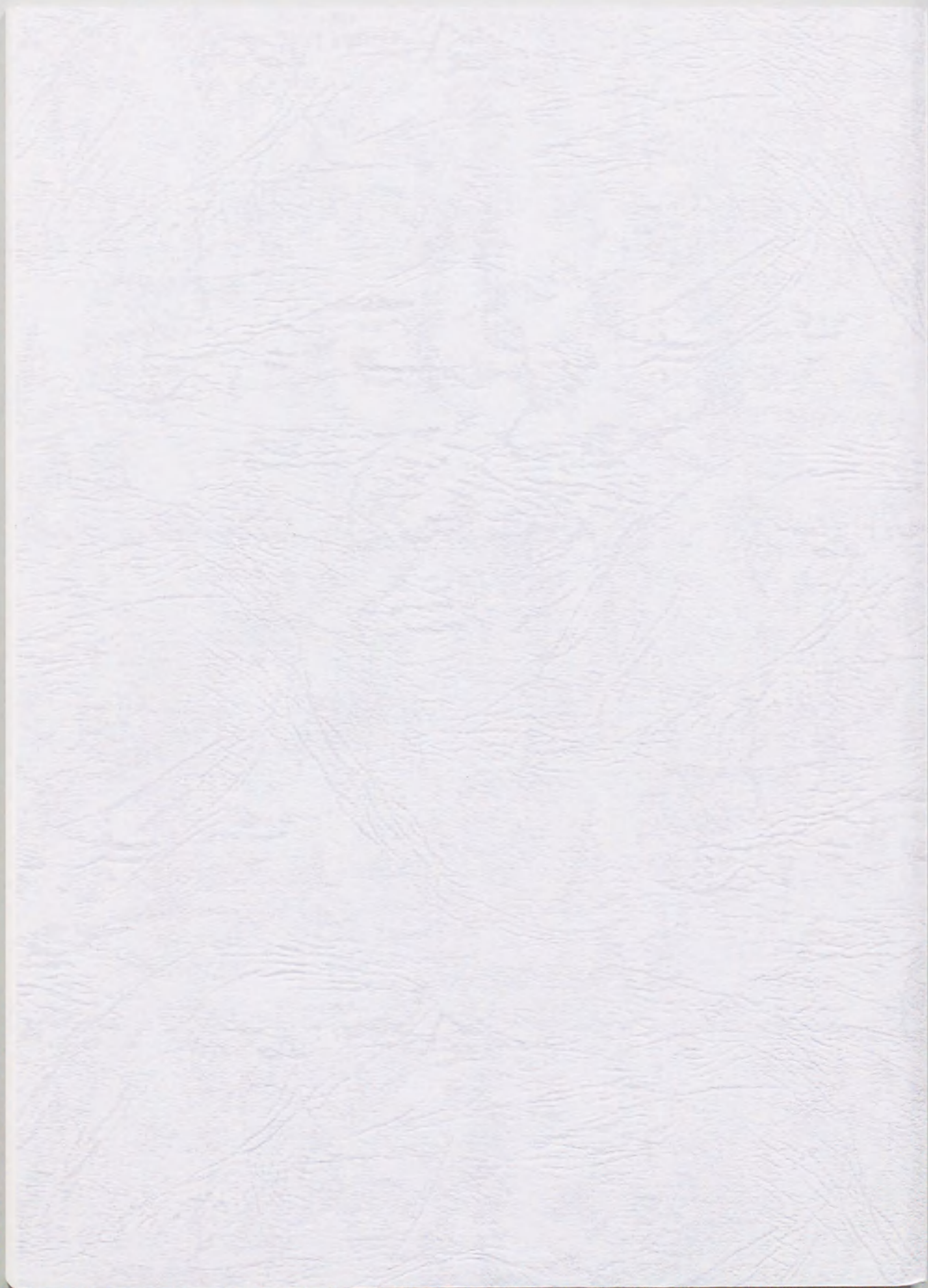
S. Fujita, H. Horii, T. Mori and S. Taniguchi, An initial intermediate on pulsed electron irradiation of aqueous solutions of mercuric iodide, *Chem. Lett.*, 865-868 (1976).

S. Fujita, H. Horii, T. Mori and S. Taniguchi, Pulse radiolysis of $\text{Hg}(\text{CN})_2$ in aqueous solutions, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **48**, 3067-3072 (1975).

S. Fujita, H. Horii, T. Mori and S. Taniguchi, Pulse radiolysis of mercuric oxide in neutral aqueous solutions, *J. Phys. Chem.*, **79**, 960-964 (1975).

(カチオン重合の研究)

T. Masuda, T. Mori and T. Higashimura, Structure and reactivity in cationic polymerization of butadiene derivatives. III. 2-phenylbutadiene, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **12**, 2065-2072 (1974).



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

