

論文内容要旨

報告番号	甲 栄 第 256 号	氏名	額 恵理香
題 目	Metal-catalyzed oxidation of 2-alkenals generates genotoxic 4-oxo-2-alkenals during lipid peroxidation (脂質過酸化反応において金属触媒による2-アルケナールの酸化は、遺伝毒性を有する4-オキシ-2-アルケナールを生成する)		
<p>生体膜を構成するリノール酸やアラキドン酸 (AA) などの多価不飽和脂肪酸は、脂質過酸化反応により、アルデヒド類などの反応性の高い分解産物を生成する。これら分解産物は核酸塩基と反応することによって、DNA あるいは RNA 付加体を生成し、DNA の複製や遺伝子発現に影響を与えることが示唆されているが、付加体構造や生成経路、疾病との関係について不明な点が多い。そこで本研究では、生体膜を構成する脂肪酸の中でも二重結合が多く、多様な分解産物が生成すると考えられる AA に着目し、AA 酸化物と 2'-deoxyguanosine (dG) との反応により生成する付加体について、LC-MS/MS を用いて網羅的な解析を行い、新規付加体の同定および生成経路の解明を行うこととした。</p> <p>AA と dG を Fe²⁺-アスコルビン酸による酸化条件下で 3 日間反応させた後、付加体の解析を行った。LC-MS/MS 解析では、既知のアルデヒド-dG 付加体で最小の分子量である 1,N²-etheno-dG (edG) の m/z 292 から m/z 508 までの分子イオンピークについて、デオキシリボースが脱離したフラグメント (-116) をそれぞれ設定し、付加体を選択的・網羅的に解析した。その結果、15 種類の既知の付加体を含む 101 種類の付加体ピークが検出された。未同定の付加体のうち数種類は、その分子量から、AA のメチル基末端に由来する炭素数 (C) 8 のアルデヒド類が付加体生成に関わると予想された。そこで、C8 の 2-octenal と dG を反応させたところ、m/z 390 の付加体が主に生成し、網羅解析から得られた未同定の付加体ピークと一致した。そこで、この付加体を単離・精製した後、NMR 解析を行ったところ、得られたスペクトルは、C9 のアルデヒドである 4-oxo-2-nonenal から生成する既知の付加体 7-(2-oxo-heptyl)-edG と類似していた。よって、2-octenal と dG との反応中に 4-oxo-2-octenal (OOE) が生じ、7-(2-oxo-hexyl)-edG (OOE-dG) が生成したものと予想された。そこで、合成した OOE と dG を反応させたところ、同定した OOE-dG と一致する付加体ピークが検出されたことから、2-octenal は反応中に OOE へと酸化されることが明らかとなった。また同様に、C5 から C7 の 2-alkenal 類と dG との反応から、それぞれの炭素数に一致する 7-(2-oxo-alkyl)-etheno 型付加体が生成することが明らかとなった。さらに、仔ウシ胸腺 DNA (ctDNA) と 2-octenal を反応させ、安定同位体希釈法により OOE-dG 量を評価した。その結果、未処理の ctDNA 中には 10⁶ dG あたり約 0.2 分子の OOE-dG が存在し、2-octenal 処理により約 11.9 分子へと増加したことから、高分子 DNA 中においても、2-octenal の酸化を介した付加体生成が示された。脂質過酸化反応は、生体内の金属イオンにより促進することが知られているため、次に、OOE-dG 生成における金属イオンの影響を検討した。Cu²⁺あるいは Fe²⁺/EDTA 存在下で、2-octenal を dG あるいは ctDNA と反応させたところ、OOE-dG 量が顕著に増加した。一方、OOE と dG との反応から生成する OOE-dG 量は、金属イオンにより変化しなかったことから、付加反応に対する金属イオンの影響は低いことが示唆された。そこで、セミカルバジド誘導体化法により OOE の検出を試みたところ、金属イオンの存在下において、2-octenal から OOE が生成することが明らかとなった。また、AA 酸化物から 2-octenal が生成することも確認された。以上より、AA 酸化により生成する 2-octenal は、金属触媒により OOE へと酸化された後、dG と反応し、OOE-dG 付加体を生成することが明らかとなった。</p> <p>本研究により、AA 酸化物に由来する新規付加体 OOE-dG が同定された。また、脂質過酸化反応により生成する 2-alkenal 類が、金属触媒によって核酸塩基との反応性が高い 4-oxo-2-alkenal 類へと酸化された後、dG 付加体を生成するという新たな付加体生成経路が明らかとなった。</p>			

報告番号	甲 栄 第 256 号	氏名	額 惠理香
審査委員	主査 宮本 賢一 副査 首藤 恵泉 副査 中尾 玲子		
題目	Metal-catalyzed oxidation of 2-alkenals generates genotoxic 4-oxo-2-alkenals during lipid peroxidation (脂質過酸化反応において金属触媒による2-アルケナールの酸化は、遺伝毒性を有する4-オキソ-2-アルケナールを生成する)		
著者	Erika Nuka, Susumu Tomono, Akari Ishisaka, Yoji Kato, Noriyuki Miyoshi, Yoshichika Kawai		
	平成28年10月発行 <i>Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry</i> 第80巻第10号2007-2013ページに発表済		
要旨	<p>生体膜を構成する多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸は、脂質過酸化反応により反応性の高いアルデヒド類を生成し、核酸塩基と反応することによって付加体を生成することが知られている。本研究では、アラキドン酸酸化物と 2'-deoxyguanosine (dG) との反応により生成する付加体について、液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて網羅的な解析を行い、新規付加体の同定および生成経路の解明を行うこととした。</p> <p>アラキドン酸と dG を Fe^{2+}/アスコルビン酸による酸化条件下で反応させ、LC-MS/MS により付加体を選択的かつ網羅的に解析した結果、15 種類の既知の付加体と 86 種類の未同定の付加体が検出された。このうち、m/z 390 にて検出された主要な未同定付加体に着目して解析を進めたところ、アラキドン酸のメチル基末端側を含む炭素数 8 のアルデヒド類が付加体生成に関わると予想された。そこで、炭素数 8 のアルデヒド 2-octenal と dG を反応させたところ、本付加体が主要生成物として検出され、NMR 解析の結果、炭素数 9 の 4-oxo-2-nonenal から生成する既知の付加体 7-(2-oxo-heptyl)-etheno-dG と類似のスペクトルが得られた。そこで、合成した炭素数 8 の 4-oxo-2-octenal (OOE) と dG を反応させた結果、本付加体と一致するピークが得られたことから、2-octenal は反応中に OOE へと酸化され、新規付加体である 7-(2-oxo-hexyl)-etheno-dG (OOE-dG) を生成することが明らかとなった。また同様に、炭素数 5 から 7 の 2-alkenal 類と dG との反応から、それぞれの炭素数に一致する 7-(2-oxo-alkyl)-etheno 型付加体が生成することが示された。さらに、安定同位体希釈法により仔ウシ胸腺 DNA 中の OOE-dG 量を評価したところ、未処理の場合においても 10^6 dG あたり約 0.2 分子の付加体が存在し、2-octenal 処理により約 11.9 分子へと増加した。よって、高分子 DNA 中においても、2-octenal の酸化を介した付加体生成が示された。次に、2-octenal から OOE への酸化反応について、金属イオンの関与を検討した。Cu^{2+}あるいは Fe^{2+}/EDTA 存在下で、2-octenal を dG あるいは仔ウシ胸腺 DNA と反応させたところ、OOE-dG 量が顕著に増加した。また、セミカルバジド誘導体化法によりアルデヒドの検出を試みたところ、アラキドン酸酸化物から 2-octenal の生成が確認され、金属イオンの存在下における 2-octenal から OOE への酸化も確認された。以上の結果より、アラキドン酸酸化により生成する 2-octenal は、金属触媒により核酸塩基との反応性が高い OOE へと酸化され、OOE-dG 付加体を生成することが明らかとなった。</p> <p>以上、本研究は、脂質過酸化反応における、金属触媒による 2-alkenal 類から 4-oxo-2-alkenal 類への酸化を介した新たな DNA 修飾反応機構を明らかにしたものであり、酸化ストレスに起因する生体傷害に対する予防法の開発へと繋がることから、博士 (栄養学) の学位授与に値するものと判定した。</p>		