

# DNA 付加体定量分析のための全自動前処理システムの構築

[研究代表者] 村上博哉 (工学部応用化学科)

[共同研究者] 本水昌二 (M&G ケマテックスジャパン)

## 研究成果の概要

生体内における DNA は、様々な化学物質に日常的に晒されており、損傷を受けている。それらの損傷により生成する DNA 付加体は、がん化のファーストステップとなると考えられており、それらに関する定量が報告されている。DNA 付加体は、高性能な修復機構が生体内では存在していることから、その残存量は極微量であり、数億の配列中にわずかに数個程度でしか残存しない。そのため、それら DNA 付加体を定量するには非常に高感度な定量分析手法の利用が必要不可欠である。その定量手法としては、近年では液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化-質量分析法(LC-ESI-MS/MS)が用いられている。

LC-ESI-MS/MS を用いた DNA 付加体の定量分析では、上述の通り大過剰の未損傷体中に存在する DNA 付加体の定量が必要不可欠であるため適切な前処理が必要不可欠となる。その前処理手法としては、固相抽出法が用いられている。本研究では、DNA 付加体の高度な前処理を達成するために、固相抽出用の吸着分離剤の開発を行なった。その吸着分離剤としては、分離モードとして極性化合物の分離において近年用いられている親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)が利用可能なものの開発を行なった。HILIC での分離では、固定相表面に形成される水和層を利用した分配モードに加え、それら水和層を形成する極性官能基も二次効果相互作用として分離に影響を与えることが知られている。本研究では、DNA 付加体との相互作用も期待し、親水性基剤樹脂に対してアデニンを修飾した樹脂を合成し、核酸関連化合物を用いてその捕捉特性について評価を行なった。その結果、基剤樹脂のエポキシ基をジオール型とした樹脂 (アデニン未修飾) では大きな捕捉特性が確認出来なかったその一方で、アデニンを修飾することによって、核酸関連化合物の捕捉特性の発現を確認した。

**研究分野:** 分離分析、前処理

**キーワード:** DNA 付加体、がん、吸着分離剤、固相抽出

## 1. 研究開始当初の背景

生体内における DNA は、様々な化学物質により日常的に損傷を受けている。それらの損傷では、化学物質が付加した様々な DNA 付加体が生成している。そのような DNA 付加体の生成は恒常的に発生しているが、生体中ではそれら損傷に対する高度な修復機構が存在しており、多くのものは修復される。しかしその一部が修復されずに残存し、その DNA 付加体ががん化などの原因になると考えられている。そのため、DNA 付加体は以前より注目されている。

これまでに DNA 付加体の定量分析に関して数多くの研究報告がある。DNA 付加体の定量分析では、上述の通り、高度な修復機構が存在することから、その存在量

は微量であり、DNA 付加体の種類にもよるが、数億の塩基配列中にわずかに数個程度でしか残存していない。そのため、DNA 付加体の定量分析手法は非常に高い感度が要求される。その手法としては、以前は  $^{32}\text{P}$  を用いた放射標識法が用いられていたが、放射性物質を利用することから、代替法の確立が求められていた。その代替法として、近年では、液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化-タンデム型質量分析法(LC-ESI-MS/MS)が、その感度面の劇的な向上により、用いられるようになっていく。

LC-ESI-MS/MS を用いた DNA 付加体の定量分析では、上述の通り、大過剰に存在する未損傷体の中から極微量に共存する DNA 付加体を抽出する必要がある。その手

法としては、固相抽出法が用いられており、我々も DNA 付加体の前処理に最適化された固相抽出法を開発し、報告している。しかし、DNA 付加体の固相抽出を用いた前処理のさらなる高性能化が求められていた。

## 2. 研究の目的

かかる背景のもと本研究では、DNA 付加体の定量分析において用いられている逆相とは異なる分離モードの吸着分離剤の開発を目指し研究を行うことにした。親水性相互作用クロマトグラフィー(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)は、近年高極性化合物の分離に用いられている分離モードの一つである。HILIC での分離は、固定相表面に形成される水和層と移動相との間での順相分配により達成すると言われている。さらに固定相表面における水和層形成に寄与する極性官能基などに由来する二次効果相互作用も分離に影響する。本研究では、DNA 付加体などの捕捉にも有効であると考えられる HILIC 型の固相抽出用吸着分離剤の開発を目的とし、研究を行なった。

## 3. 研究の方法

### (1) HILIC 樹脂の合成

基剤樹脂として、エポキシ基を有する glycidyl methacrylate (GMA)を用い、架橋剤として ethylene glycol dimethacrylate (EGDM)もしくは、glycerol dimethacrylate (GDMA)を用いた親水性の基剤樹脂をそれぞれ合成した。得られた基剤樹脂に対して、極性官能基を付加するためにエポキシ基を介してアデニンを修飾した樹脂をそれぞれの基剤樹脂に関して合成した(Adenine-EGDM, Adenine-GDMA)。また比較として、アデニンを未修飾でジオール型とした基剤樹脂も合成し、捕捉特性の評価を行なった。

### (2) 合成した樹脂の固相抽出を用いた捕捉特性評価

合成を行なった樹脂に関して、核酸関連化合物等を標品として、固相抽出法を用いてそれらの化合物の捕捉特性について評価を行なった。固相抽出としては、コンディショニングとしては、アセトニトリル及び水を通液後、HILIC モードでの検討であるため、95%アセトニトリル水溶液を通液した。その後 95%アセトニトリル水溶液にて調製した試料を通液し、その捕捉特性について検討

した。

## 4. 研究成果

### (1) 合成したアデニン修飾樹脂の物性評価

基剤樹脂にアデニンを反応させた樹脂に関して元素分析を行なった結果、Adenine-EGDM および Adenine-GDMA それぞれの樹脂で窒素が含有されていることが明らかとなり、アデニンが修飾されたことが明らかとなった。

### (2) それぞれの樹脂の捕捉特性評価

まず基剤樹脂自身の捕捉特性評価を行うために、ジオール型としたそれぞれの基剤樹脂について捕捉特性の評価を行なった。その結果、核酸関連化合物に関してはそれほど明確な捕捉を確認することはできなかった。

そこで、アデニンを修飾した樹脂である Adenine-EGDM および Adenine-GDMA についてその捕捉特性について評価を行なった。その結果、ジオール型である基剤樹脂の時とは異なり、核酸関連化合物への捕捉特性を確認することができた。これらはアデニンの修飾により水和層が形成されたことに加えて、アデニンによる水素結合なども効果的に働いているものであると推測される。さらにそれらの捕捉特性は架橋剤である EGDM および GDMA により異なることも明らかとなった。

## 5. 本研究に関する発表

### 【投稿】

(1) 作田成久, 藤井亮甫, 大野慎介, 村上博哉, 林 則夫, 酒井忠雄, 手嶋紀雄, “環境水中の全窒素の定量分析法におけるダウンサイジング化と自動化”, 分析化学, 印刷中.

(2) Hiroya Murakami, Takuya Aoyanagi, Yuta Miki, Hiroki Tomita, Yukihiro Esaka, Yoshinori Inoue, Norio Teshima, “Effects of hydrophilic monomers on sorptive properties of divinylbenzene-based reversed phase sorbents”, *Talanta*, 185, 427-432, 2018.

(3) Yukihiro Esaka, Kenji Hisato, Takuhei Yamamoto, Hiroya Murakami, Bunji Uno, “Evaluation of type A endonucleases for quantitative analysis of DNA damages due to exposure to acetaldehyde using capillary

electrophoresis” , Anal. Sci., 34, 901-906, 2018.

(4) 岩政衣美, 三木雄太, 井上嘉則, 江坂幸宏, 村上博哉, 手嶋紀雄, “DNA 付加体の網羅的分析を目指した HILIC 分離条件の検討” , 分析化学, 67, 479-484, 2018.

(5) 三木雄太, 村上博哉, 尾宮美保, 江坂幸宏, 井上嘉則, 手嶋紀雄, “アデニンを修飾した新奇吸着分離剤の核酸関連化合物に対する固相抽出特性” , 分析化学, 67, 445-451, 2018

【口頭発表】

(1) 村上博哉, 井上嘉則, 手嶋紀雄, “前処理技術向上のための固相抽出法の高機能化と流れ分析への展開” , 第 78 回分析化学討論会, 山口大学常盤キャンパス, 2018 年.

(2) 村上博哉, “DNA 損傷体定量法の高感度化および前処理手法の高性能化に関する研究” , 第 37 回分析化学中部夏期セミナー (中部支部・近畿支部合同夏期セミナー) 福井大学文京キャンパス (福井市) , 2018 年.

(3) 村上博哉, 岩政衣美, 杉山拓也, 三木雄太, 井上嘉則, 江坂幸宏, 手嶋紀雄, “網羅的 DNA 付加体定量分析を目指した HILIC 分離系の開発” , 日本分析化学会第 67 年会, 東北大学川内北キャンパス, 2018 年.

(4) 江坂幸宏, 村上博哉, 久戸賢治, 國嶋咲希, 吉元亜希子, 石濱 泰, 手嶋紀雄, 宇野文二, “DNA 塩基損傷の定量的分析手法の構築” , 日本分析化学会第 67 年会, 東北大学川内北キャンパス (仙台市) , 2018 年 9 月 12~14 日 (発表日 9 月 12 日) .

(5) 三木雄太, 村上博哉, 尾宮美保, 杉山拓也, 江坂幸宏, 井上嘉則, 手嶋紀雄, HILIC 型固相抽出用吸着分離剤の開発” , 第 55 回フローインジェクション分析講演会, 芝浦工業大学豊洲キャンパス, 2018 年.

(6) Hiroya Murakami, “Development of various sorbents having different separation mode for hydrophilic compounds” , International Symposia on Research towards Green Innovation 2018, The Empress International Convention Center, Chiang Mai, Thailand, 2018 年.