

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 理 学 )	氏名	謝 明 章
学位授与の要件	学位規則第 4 条第① 2 項該当		
論文題目			
Genetic and Biochemical Studies on the Cytotoxicity of Aldehydes (アルデヒドの細胞毒性に関する遺伝学的ならびに生化学的研究)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	井出 博	
審査委員	教 授	山本 卓	
審査委員	教 授	坂本 敦	
〔論文審査の要旨〕			
<p>アルデヒド化合物は、生物に対し遺伝毒性および細胞毒性を示すことが知られている。アルデヒドは反応性の高い親電子性化合物であり、生体分子に含まれるアミノ基やチオール基と反応し付加体（損傷）を形成し、その分子の機能を不活性化することにより、遺伝毒性や細胞毒性を示すと考えられる。突然変異や染色体異常などの遺伝毒性は、遺伝情報を担う DNA の損傷に由来することは明らかであり、DNA 損傷として、塩基のアルデヒド付加体、DNA-タンパク質クロスリンク (DPC)、DNA 二本鎖切断 (DSB)、DNA 鎖間架橋 (ICL) が報告されている。一方、細胞毒性の原因としては、DNA、タンパク質、他の生体分子の損傷などが考えられるが、その分子機構は明らかにされていない。本研究では、DNA 損傷依存のおよび DNA 損傷非依存のアルデヒドの細胞毒性誘発機構を検討した。</p> <p>本研究では、まず、ヒト MRC5-SV 細胞および Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を単純アルデヒド[formaldehyde (FA)], 飽和アルデヒド[acetaldehyde (AA), propionaldehyde (PA), butyraldehyde (BA)], 短鎖<math>\alpha,\beta</math>-不飽和アルデヒド[acrolein (ACR), crotonaldehyde (CRA), <i>trans</i>-2-pentenal (PTE), malondialdehyde (MDA)], 長鎖<math>\alpha,\beta</math>-不飽和アルデヒド[4-hydroxynonenal (HNE), 2,4-decadienal (DDE)]で処理し、10%生存率を与える濃度 (LD<sub>10</sub>) を求め、これを細胞毒性の尺度とした。LD<sub>10</sub> は、長鎖<math>\alpha,\beta</math>-不飽和アルデヒド&lt;短鎖<math>\alpha,\beta</math>-不飽和アルデヒド・単純アルデヒド&lt;飽和アルデヒドの順に増加し、長鎖<math>\alpha,\beta</math>-不飽和アルデヒドと飽和アルデヒドでは約 3000 倍の差があった。</p> <p>DNA 損傷依存の細胞毒性については、一連の DNA 修復欠損 CHO 細胞のアルデヒドに対する感受性を検討し、相同組換え修復 (HRR) およびヌクレオチド除去修復因子 XPF 欠損細胞が感受性となることを示した。HRR および XPF 欠損細胞は、単純アルデヒドおよび飽和アルデヒドに対し高感受性を示したが、短鎖<math>\alpha,\beta</math>-不飽和アルデヒドに対する感受性は弱く、長鎖<math>\alpha,\beta</math>-不飽和アルデヒドには感受性を示さなかった。この結果から、単純アルデヒドおよび飽和アルデヒドの細胞毒性には DNA 損傷が関わるのに対し、短鎖<math>\alpha,\beta</math>-不飽和アルデヒドではその関与が弱く、長鎖<math>\alpha,\beta</math>-不飽和アルデヒドの細胞毒性には DNA 損傷は関与しないことが明らかとなった。</p> <p>細胞毒性の原因となる DNA 損傷を明らかにするために、アルデヒド処理により生じた DPC, DSB, ICL 損傷を調べた。飽和アルデヒドを除くアルデヒドでは DPC 生成が認めら</p>			

れたが、DPC 生成量とアルデヒドの細胞毒性の間には有意な相関は認められなかった。また、アルデヒド処理直後には DSB 生成は起こらなかった。ICL については検出法が確立されていないことから、ICL 修復が欠損したヒトファンコニー貧血 (FANC) 細胞のアルデヒド感受性を調べた。FANC 細胞は、単純アルデヒドおよび飽和アルデヒドに対し高感受性を示したが、短鎖 $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒドに対する感受性は弱く、長鎖 $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒドには感受性を示さなかった。この結果は、修復欠損 CHO 細胞のアルデヒド感受性とよく一致し、アルデヒドが誘発する主要な致死損傷として ICL が強く示唆された。

次に、DNA 損傷非依存的な細胞毒性について検討した。アルデヒドは、ペプチドやタンパク質と反応し付加体を形成する。これらの付加体形成は、ペプチドやタンパク質の機能を阻害し細胞毒性につながる。本研究では、CHO 細胞を LD<sub>10</sub> 濃度のアルデヒドで処理し、glutathione (GSH) の細胞内全濃度と thioredoxin [細胞質型 Trx1, ミトコンドリア型 Trx2] の酸化還元状態に対する影響を調べた。GSH 濃度は、アルデヒド処理により未処理の 38-72% に減少した。GSH 生合成阻害剤である buthionine sulphoximine を用いた比較実験では、同レベルの GSH 濃度低下で、細胞生存率が 70% に低下したことから、アルデヒドによる GSH 濃度低下は、細胞毒性誘発の共通メカニズムであることが示された。Trx1 については、短鎖 $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒド (ACR, CRA, PTE) でチオール基の酸化 (77-100%) が起こった。Trx 還元酵素阻害剤である auranofin を用いた比較実験では、同レベルの Trx1 酸化で、細胞生存率が 37% に低下したことから、Trx1 の酸化は、ACR, CRA, PTE の細胞毒性誘発の原因となることが示された。一方、いずれのアルデヒドでも、Trx2 の酸化は起こらなかった。また、ミトコンドリア膜電位や細胞内 ATP レベルも変化しなかった。

本研究は、アルデヒドの細胞毒性誘発機構に、DNA 損傷依存的な機構と DNA 損傷非依存的な機構があることを明らかにした。さらに、DNA 損傷依存的な機構は、単純アルデヒドおよび飽和アルデヒドの細胞毒性誘発に重要であることを示した。一方、DNA 損傷非依存的な機構としては、GSH 濃度減少や Trx1 の酸化があり、長鎖および短鎖 $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒドの細胞毒性誘発に重要であることを示唆した。これらの成果は、アルデヒドの細胞毒性誘発機構解明にとどまらず、アルデヒドが関与する様々な疾病の発病機構解明にも貢献すると考えられる。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士 (理学) の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

Aldehydes with high and low toxicities inactivate cells by damaging distinct cellular targets.

Ming-Zhang Xie, Mahmoud I. Shoukamy, Amir M. H. Salem, Shunya Oba, Mizuki Goda, Toshiaki Nakano, and Hiroshi Ide

Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 786, 41–51 (2016)

参考論文

Depletion of RUVBL2 in human cells confers moderate sensitivity to anticancer agents.

Mayumi Miyamoto-Matsubara, Yi Han, Koji Ono, Ming-Zhang Xie, Amir M. H. Salem, Mahmoud I. Shoukamy, Toshiaki Nakano, and Hiroshi Ide

Journal of Cancer Science and Therapy, 6, 440–445 (2014)