

P-005 (O-1)

A Novel Method for the Detection of DNA-Protein Crosslinks Based on Fluorescent Labeling

Toshiaki Nakano, Mahmoud Shoukamy,
Makiko Ohshima, Miyamoto-Matsubara Mayumi,
Hiroshi Ide

Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate
School of Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima
739-8526

DNA-damaging agents from endogenous and environmental sources induce DNA-protein crosslinks (DPC), where proteins are covalently trapped on DNA. For the elucidation of the biological effect of DPCs, it is crucial to monitor the induction and intracellular dynamics of DPCs. Alkaline elution, nitrocellulose filter binding, SDS-K precipitation, and comet assays have been used for the detection of DPCs. However, they are all indirect detection methods of DPCs based on the measurement of DNA and not crosslinked proteins. In the present study, we have developed a novel direct DPC detection method, where crosslinked proteins were specifically labeled with FITC and assayed for fluorescence. Cells were treated with various aldehydes, typical DPC-inducing agents, and genomic DNA was isolated. The induction and removal of DPCs in cells as well as their *in vitro* stability were monitored by the FITC-labeling method. These data will be presented in the meeting.

蛍光標識を用いたDNA-タンパク質クロスリンク損傷の新規検出法

中野 敏彰, Mahmoud Shoukamy, 大瀧 麻妃子,
宮本 (松原) 真由美, 井出 博

広島大・院理・数理分子生命

内因性および環境中のDNA損傷因子は、DNAとタンパク質が不可逆的に結合したDNA-タンパク質クロスリンク (DPC) 損傷を誘発する。DPCの生物影響を明らかにするためには、ゲノムにおけるDPCの生成量と動態を明らかにする必要がある。DPC定量法としては、アルカリ溶出法、ニトロセルロース膜結合法、SDS-K沈殿法、およびコメット法などが用いられているが、これらの方法はいずれも、タンパク質と共有結合したDNA量に基づきDPCを間接的に検出するものである。本研究では、クロスリンクタンパク質の直接検出に基づく新規なDPC定量法を開発した。典型的なDPC誘発剤である種々のアルデヒド化合物でMRC5細胞を処理し、塩化セシウム密度勾配超遠心法でゲノムDNAを精製した。クロスリンクタンパク質をFITCで標識し、蛍光測定によりDPCを定量した。その結果、生理的に意味のあるアルデヒド処理濃度 (10%細胞生存率) で十分なシグナルが得られることが分かった。この方法で調べたDPCの生成量、動態、安定性、修復の影響、および、FITC標識を用いたDPC検出法の高感度化について報告する。

P-006

A comprehensive analysis of DNA adducts in lungs of mice exposed to nanomaterials using nanoLC-QToF MS

Kousuke Ishino¹, Tatsuya Kato^{1,2},
Tomonari Matsuda³, Yukari Totsuka¹,
Hitoshi Nakagama¹

¹Natl. Cancer Ctr. Res. Inst., ²Grad. Sch. of Nutr. & Environ.
Sci., Univ. of Shizuoka, ³Res. Ctr. for Environ. Qual. Manag.,
Kyoto Univ.

Nanomaterials are widely utilized for cosmetics and industrial products, and are considered for applications in medicine, whereas the assessment of genotoxicity and safety of nanomaterials is of concern to human health. We found induction of DNA damage and mutation in lungs of mice exposed to nanomaterials, including magnetite (MGT) and multi-wall carbon nanotube (MWCNT). However, the mechanisms involved in nanomaterial-induced genotoxicity are not fully understood. To elucidate the mechanisms of genotoxicity caused by nanomaterials, we carried out comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome) of DNA samples derived from lungs of mice intratracheally exposed to nanomaterials. Based on the LC-MS/MS data, many spots suggesting DNA adducts were found, and several spots were commonly observed during MGT- and MWCNT-treated mice, but not detected in the vehicle control. Thus, it is suggested that these spots would be characteristic adducts for nanomaterial exposure. The structural determination of these spots is now under investigation.

ナノマテリアルによりマウス肺に誘発されるDNA付加体の網羅的解析

石野 孔祐¹、加藤 竜也^{1,2}、松田 知成³、
戸塚 ゆかり¹、中釜 斉¹

¹国立がん研究センター研究所、²静岡県立大院生活健康、
³京都大学流域圏総合環境質研究センター

ナノマテリアルは化粧品や工業製品に広く利用されており、医療への応用についても検討されている。一方で、ナノマテリアルの安全性が懸念されている。これまでに、マウスにマグネタイト (MGT) やカーボンナノチューブ (MWCNT) などのナノマテリアルを経気道曝露すると、肺でDNA損傷や突然変異が誘発されることが見出されている。しかしながら、そのメカニズムについてはまだよくわかっていない。本研究では、ナノマテリアルによる遺伝毒性誘発メカニズムについて検討するため、ナノマテリアルを経気道の曝露したマウス肺のDNA付加体を網羅的に解析した (DNAアダクトーム解析)。曝露群において、DNA付加体とみられる多数のスポットが検出され、それらのスポットはコントロール群には見られなかった。そのうちの複数のスポットはMGT及びMWCNT投与群に共通して観察されたことから、それらのスポットはナノマテリアル曝露によって肺に生じる特徴的なDNA付加体であることが推測された。今後は、これらDNA付加体の構造解析について検討を行う予定である。