

pH 3.5. As the result, the method of (4) was found to be the most suitable. The results of the comparison between ion chromatography and other methods on the determined concentrations of serum cations were as follows. The ion selective electrode method was inapplicable because of the interference from the co-existing substances. The values determined by the atomic absorption method seemed to be affected by the volume of serum protein and that of serum lipid, being eight to ten percent by than that by ion selective electrode method. Colorimetry resulted in an almost equal concentration as that by ion chromatography. Ion chromatography was found to be the most suitable

for the determination of the free type or the free plus bound type serum cations.

(Received January 31, 1984)

Keyword phrases

ion chromatography of serum cations; pretreatment of serum with ultrafiltration; comparison of methods for determining serum cations; determination of serum cations by ion selective electrode method; determination of serum cations by atomic absorption method; colorimetric determination of serum cations.

発がん性メチル化剤により生成したデオキシリボ核酸中の 1-及び 3-メチルアデニンと O^6 -メチルグアニンの高速液体 クロマトグラフィーによる定量

由岐 英剛[®], 今村 誠, 河崎 秀樹*

(1984 年 2 月 20 日受理)

陽イオン交換樹脂 Zipax SCX を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によりデオキシリボ核酸 (DNA) のメチル化により生成した 1-メチルアデニン, 3-メチルアデニン, O^6 -メチルグアニンの定量を行った. 移動相はリン酸水素カリウム水溶液を用い, それぞれの塩基を試料中の他の塩基誘導体, 及び多量に存在する主要塩基から分離する条件を検討した. 検出は紫外吸収 (254 nm) を用いた. DNA 試料は Chargaff のアプリン酸を生成する条件で加水分解し, 同時に透析を行い, 加水分解されたプリン塩基のみを含む透析外液を回収, 濃縮し, これを HPLC の試料とした. 試料としては発がん性メチル化剤であるメチルニトロソウレア (MNU), N -メチル- N' -ニトロソ- N -ニトログアニジン (MNNG) を *in vitro* で作用させた子牛胸腺 DNA, 又ラット腹こうに同様の発がん性メチル化剤であるジメチルニトロソアミン (DMN), MNU を投与し, その肝臓より抽出した DNA (*in vivo*) の分析を行ったところ, すべての試料で上記 3 種類のメチル化塩基が検出され, 多くのものについて定量が可能であった. これらのことは発がん性メチル化剤の DNA への反応様式を示唆する.

1 緒 言

デオキシリボ核酸 (DNA) はある種の例外を除いて, 4 種の主要塩基から成り立っているが, 発がん性メチル化剤を作用させると主要塩基の一部がメチル化され, 種類の修飾塩基が生成してくる. このように生成した多種の微量成分の分析には当初から種々のクロマトグラフィーが用いられてきたが, 高圧送液ポンプと陽イオン交換樹脂による核酸塩基誘導体の分離が Uziel らによって試

みられ¹⁾, 更に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の開発により, これを用いた核酸塩基類の分離が多数報告された²⁾. これらの分離例の大部分がイオン交換, あるいは逆相分配クロマトグラフィーを用い, 検出は紫外吸収によっている³⁾. 著者らは陽イオン交換樹脂の Zipax SCX を使った核酸修飾塩基の分離の基礎的条件を検討し⁴⁾, 更に種々の生物試料中の修飾塩基の定量例を報告してきた^{5)~7)}. この方法は定組成溶出を用い, 限られた目的塩基のみを定量するものであるが, 再現性, 定量性ともに良好な結果が得られている. 本報では 1-

* 東邦大学薬学部: 274 千葉県船橋市三山 2-2-1

メチルアデニン ($m^1\text{Ade}$), 3-メチルアデニン ($m^3\text{Ade}$), O^6 -メチルグアニン ($m^6\text{Gua}$) の定量法を確立し, *in vitro* 及び *in vivo* において発がん性メチル化剤の作用により DNA 中に生成したこれらの修飾塩基の定量を試みたので報告する。

2 実 験

2.1 装 置

高速液体クロマトグラフは島津 LC-2F を用い, 定流量で送液した。紫外吸収検出器は島津 UVD-2 を用い, 空気を対照にして測定した。記録計は島津 R-11, インジェクターはセプタム式により, ストップフローインジェクションとした。

2.2 試 薬

アデニン, アデノシン-5'-モノリン酸, シチジン-5'-モノリン酸は興人, 5-ヒドロキシメチルウラシルは東京化成, $m^3\text{Ade}$ は Fluka 社の製品を使用した。 $m^6\text{Gua}$ は Balsiger による方法⁶⁾ で合成し, 紫外吸収スペクトル, 元素分析で確認したものを用いた。その他の核酸塩基標品はすべて Sigma 社の製品を用いた。子牛胸腺 DNA は Sigma 社 Type I を, ニシン精液 DNA は Sigma 社 Type III を用いた。ジメチルニトロソアミン (DMN) は東京化成, メチルニトロソウレア (MNU), *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (MNNG) は半井化学, *N*-アセチル-L-システインは Sigma 社の製品を使用した。塩酸は市販特級試薬を 6 M として蒸留して用いた。HPLC の移動相は半井化学製特級試薬を水に溶解して調製した。透析用セルロースチューブは Visking 社のサイズ 36/32 を用いた。その他の試薬はすべて市販特級試薬を用いた。水はすべて脱塩水を蒸留して用いた。

2.3 実験操作

2.3.1 検量線 標準液はそれぞれの塩基を 5 μl 当たり 2, 5, 10, 30, 50, 100 ng 含む水溶液を調製し, 5 μl ずつ注入した。感度は 4×10^{-3} a.u.f.s. で定量はピーク高さ法により絶対検量線を作成し行った。

2.3.2 DNA の加水分解 試料 DNA 30 mg を 30 ml の水に完全に溶解し, 0.1 M 塩酸を添加して pH を 1.6 に合わせた。この DNA を含む懸濁液全量を透析チューブに移し, pH 1.6 の塩酸水溶液 400 ml を透析外液として, 37°C で 26 時間加水分解と同時に透析した。透析終了後, 外液 400 ml を回収し, 37°C 以下で減圧留去し, 全量を 10 ml に調製した。これを直接 HPLC で分析した。

2.3.3 MNU, MNNG による DNA のメチル化 (*in vitro*) 子牛胸腺 DNA 60 mg を 0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 12 ml に溶解し, DNA 中のヌクレオ

チドに対して 1:0.1, 1:1, 1:10, 1:100 (モル比) に相当する MNU 量, 1.8, 18, 180 mg, 1.8 g を含む 1 ml エタノール溶液を加え, 37°C, 遮光下で反応させた。反応終了後, 2.5 M 酢酸ナトリウム溶液 12 ml を加えた後, 24 ml のエタノールで DNA を析出させ, ガラス棒で綿状の DNA を巻き取り, エタノール 30 ml で 2 回洗浄後, 0.25 M 酢酸ナトリウム溶液 30 ml に溶解した。更にエタノールで同様に再沈し, 真空デシケーター (塩化カルシウム) 中で乾燥した。この場合約 40 mg のメチル化 DNA が回収できた。MNNG の場合は反応液の pH を 7.5 とし, ヌクレオチドに対して 1:0.1, 1:1, 1:10 に相当する *N*-アセチル-L-システイン量 2.8, 28, 280 mg を加え, 更に MNNG 2.6, 26, 260 mg を 1 ml の *N,N*-ジメチルホルムアミド溶液として加え, 以下 MNU の場合と同様に処理した。

2.3.4 DMN, MNU 投与によるラット肝臓 DNA のメチル化 (*in vivo*) Wistar albino 雄性ラット (200 g) 5 匹を 1 組とし DMN をラット体重 kg 当たりそれぞれ 20, 50, 100, 250 mg に相当する量を 1 ml の生理食塩水溶液とし, 腹こう内に投与した。投与 5 時間後に肝臓を摘出し, ドライアイス凍結した後, Kirby 法により DNA を抽出した。MNU はクエン酸ナトリウム生理食塩水溶液として体重 kg 当たり 100 mg を投与して, DMN と同様に処理した。

3 結果及び考察

3.1 移動相の検討

核酸塩基類の陽イオン交換樹脂への保持は核酸塩基のアミノ基がプロトン化を受け陽イオンとなることによっている。グアニン (Gua), アデニン (Ade), シトシン (Cyt) の pK_a はそれぞれ 3.3, 4.1, 4.4 であり, この順に溶出される。又分子内へのメチル基の導入による pK_a や樹脂に対する親和性の変化などが保持時間に影響を与える。一方, 移動相の pH と保持時間との関係は著者らによって示されたように⁴⁾, pH が上昇するとプロトン化の度合いが減少し, 保持時間は短くなる。又移動相の塩濃度と保持時間の関係は, 塩濃度すなわち塩基以外の陽イオン濃度の上昇に伴って塩基の保持時間は短くなる。核酸中の塩基を定量しようとする場合, 多量に存在する主要塩基により妨害される可能性が高く, 従ってこれらの修飾塩基を一斉分析するよりも個別の塩基に最適な条件を検討することが好ましい。 $m^6\text{Gua}$ の場合, 移動相 0.06 M リン酸水素カリウム, pH 4.85 で Fig. 1 (a) に示したように十分な分離が得られた。この条件では Table 1 に示したように

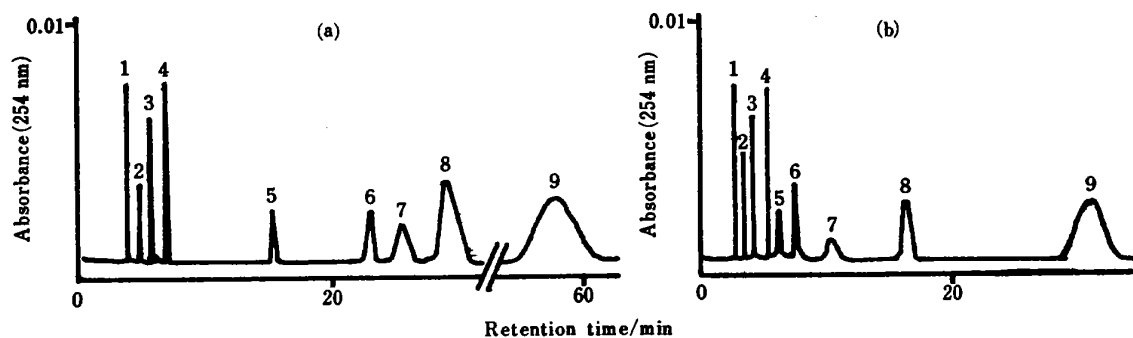


Fig. 1 Separation of methylated bases by high performance liquid chromatography

Conditions—Column: Zipax SCX (1 m×2.1 mm I. D.), Flow rate: 0.4 ml/min, Pressure: 35 kg/cm², Temperature: Ambient, Sensitivity: 0.01 a. u. f. s., Mobile phase: (a) 0.06 M KH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH 4.85), (b) 0.1 M KH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH 5.50), Detector: UV 254 nm, Sample size: 5 µl (10~100 ng each base); Peaks—1: Guanine, 2: 1-Methylguanine, 3: 7-Methylguanine, 4: Adenine, 5: O⁶-Methylguanine, 6: N⁶-Methyladenine, 7: 2-Methyladenine, 8: 1-Methyladenine, 9: 3-Methyladenine

Table 1 Retention times of nucleic acid bases

Base	Retention time/min		Base	Retention time/min	
	(I)	(II)		(I)	(II)
Guanine	0.77	0.27	Uracil	0	0
1-Methylguanine	1.13	1.27	5-Hydroxymethyl-uracil	0	0
O ⁶ -Methylguanine	12.33	2.23	Uridine-5'-monophosphate	0	0
7-Methylguanine	1.97	0.50	Cytosine	6.47	1.67
Guanosine-5'-monophosphate	0	0	3-Methylcytosine	25.03	20.55
Adenine	3.28	0.75	5-Methylcytosine	22.45	6.25
1-Methyladenine	23.38	13.60	5-Hydroxymethyl-cytosine	1.87	0.57
2-Methyladenine	22.18	5.88	Cytidine-5'-monophosphate	0	0
3-Methyladenine	55.40	26.58	Xanthine	0	0
N ⁶ -Methyladenine	21.18	4.20	Hypoxanthine	0	0
N ⁶ , N ⁶ -Dimethyladenine	100	23.48	1-Methyl-hypoxanthine	0	0
Thymine	0	0			
Thymidine-5'-monophosphate	0	0			

Retention time is expressed as adjusted retention time (t_R'). Mobile phase: (I) 0.06 M KH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH 4.85), (II) 0.10 M KH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH 5.50)

m^6 Gua に重なるピークは無かった。又この pH で陽イオンとならないウラシル, チミン, キサンチンなど, 又負に荷電しているヌクレオチド類は保持されなかった。又この条件では m^6 Gua はそれに対して 100 倍モル量の主要塩基を含む試料においても十分な分離が得られた。次に m^1 Ade 及び m^3 Ade の分離条件の検討を行った。 m^1 Ade の pK_a は 7.2 であるため pH 5.0 以下の範囲は条件として適さなかった。そこで pH 5.0 以上について検討したところ, 0.1 M, pH 5.50 において m^1 Ade, m^3 Ade が Fig. 1 (b) に示したように 40 分以内によく分離された。又 Ade : Gua : m^1 Ade : m^3 Ade = 100 : 100 : 1 : 1 (モル比) の試料も完全に分離された。HPLC の条件は Fig. 1 に示した。この条件における m^1 Ade, m^3 Ade, m^6 Gua の検量線はそれぞれ 2~50 ng, 5~100

ng, 2~100 ng の範囲で良好な直線性を示した (それぞれ $r=0.994, 0.999, 0.999$)。又クロマトグラムの再現性は相対標準偏差で示すと, 保持時間はそれぞれ 0.78, 0.75, 0.66%, ピーク高さはそれぞれ 0.77, 1.79, 0.95% となり定量に十分な再現性が得られた。

3.2 DNA の加水分解と試料調製

DNA の加水分解は塩酸, 過塩素酸, ギ酸などの酸加水分解が用いられるが, m^6 Gua は他のプリン塩基に比べ, 酸に不安定であるため, 強酸による加水分解はできない。本実験では既に著者らによって核酸中の N⁶-methyladenine, m^7 Gua の定量に用いられた⁶⁾⁷⁾, Tamm らによる⁸⁾, pH 1.6 塩酸, 37°C, 26 時間のアプリン酸を生成する条件による酸加水分解を試みた。この条件下ではプリン塩基は定量的に DNA 鎖から脱離し, 同時に透析を行うことにより DNA 鎖からプリン塩基のみの脱離した高分子量のアプリン酸は透析内液に残り, プリン塩基は透析外液に回収される。この透析を含む DNA の加水分解による試料調製操作の全行程の回収率を測定したところ, m^1 Ade, m^3 Ade, m^6 Gua はそれぞれ 96.4, 96.6, 95.8% ($n=5$) と, 3 種の塩基の間に大差はなく, m^6 Gua は透析加水分解, 濃縮の段階でも安定であることが分かった。以上より決定した DNA 試料の分析操作は 2.3.2 に示した。

3.3 発がん性メチル化剤を *in vitro* で作用させた DNA 中の修飾塩基の定量

発がん性メチル化剤として MNU, MNNG を用いた。本実験は, Lawley ら¹⁰⁾ による ¹⁴C を用いた条件を参考にし, 2.3.2 に示したように市販子牛胸腺 DNA をメチル化剤で処理し, その前後での DNA 試料の分析

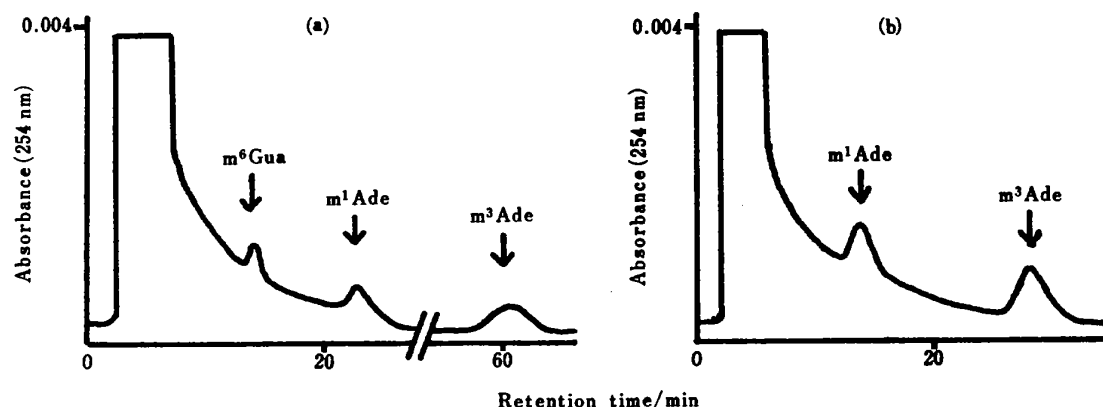


Fig. 2 Chromatograms of methylated purine bases from methylnitrosourea (MNU) treated deoxyribonucleic acid (DNA)

Mobile phase : (a) 0.06 M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 4.85), (b) 0.1 M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 5.50)

を行った。試料のクロマトグラムは Fig. 2 に示したように m^1Ade 、 m^3Ade 、 m^6Gua の位置にピークが確認され、更に標品との混合検体においても単一のピークを与えた。又処理前の DNA にはこの3種のメチル化塩基の位置にはピークは出現しなかった。Table 2 に示したそれぞれのモル比でメチル化処理を各3回行い、各試料の3種のメチル化塩基の定量を行った。MNNG も同様に Lawley¹¹⁾ の方法に従ってメチル化処理を行い、分析を行ったところ MNU と同様に3種のメチル化塩基は定量された。結果は Table 2 に示した。これらの数値は同時に既報⁷⁾の条件で Ade, Gua を HPLC で定量し、それぞれの主要塩基に対する百分率で示した。この結果より m^3Ade は m^7Gua に次いで多く生成するという従来からのラジオアイソトープを用い

た報告¹²⁾と一致した結果が得られ、全体的にメチル化剤の量が増すと生成量が増加し、3種のメチル化塩基では生成量は $\text{m}^3\text{Ade} > \text{m}^6\text{Gua} > \text{m}^1\text{Ade}$ の順となった。

3.4 発がん性メチル化剤を *in vivo* で作用させた DNA 中の修飾塩基の定量

発がん性メチル化剤は DMN と MNU を用いた。これらが腹こう内に投与された場合、DMN は酵素的に、MNU は化学的に分解し、メチル化作用を表す。これらのラットへの投与例は多数報告されているが DMN は Pegg ら¹³⁾の方法、MNU は Margison ら¹⁴⁾の方法を参考として投与を行った。投与後、肝臓を摘出し、Kirby¹⁵⁾のPAS-フェノール法により DNA の抽出を行い、3.3 と同様に分析した。メチル化塩基の生成量が *in vitro* の場合に比べて少ないため、透析外液からの濃縮率を増したが、Fig. 2 と同様なクロマトグラムが得られ、3種のメチル化塩基の生成が確認された。又 DNA 試料の Ade, Gua の量比は 1.34 (Gua/Ade) とラット肝臓 DNA についての報告値と一致した。投与量は Table 3 に示したそれぞれの量について各2回ずつメチル化を行い分析した。DMN の場合 *in vitro* の場合と同様に投与量の増加とともにメチル化塩基生成量が増加する傾向を示した。MNU は各塩基は検出されたが微量で定量できないものもあり、DMN のほうがメチル化塩基の生成量が多いという従来からのラジオアイソトープを用いた実験による報告と一致した結果が得られた。又 m^1Ade の生成量は少なかったが m^3Ade と m^6Gua 量には、さほどの差は無かった。又その外、アゾ色素系の発がん物質の 3'-メチル-N,N-ジメチルアミノアゾベンゼンを含む飼料の摂取によりがん化したラット肝臓の DNA,

Table 2 Determination of methylated bases in DNA produced by reaction with various concentrations of MNU, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) *in vitro*

Methylating agents		Amount, mol %		
		O ⁶ -Methyl-guanine (m^6Gua)	1-Methyl-adenine (m^1Ade)	3-Methyl-adenine (m^3Ade)
MNU	0.1 : 1	0.05	detected	0.11
	1 : 1	0.54	0.03	0.63
	10 : 1	1.7	0.06	2.7
	100 : 1	2.8	0.40	6.6
MNNG	0.1 : 1	0.04	detected	0.06
	1 : 1	0.50	0.02	0.32
	10 : 1	0.34	0.36	0.66

The amount is expressed in mol % of parent major base. Detected— m^1Ade : Under 0.005 % of adenine, m^3Ade : Under 0.01 % of adenine, m^6Gua : Under 0.01 % of guanine; Detection limit— m^1Ade : 2.5×10^{-3} % of adenine, m^3Ade : 5×10^{-3} % of adenine, m^6Gua : 5×10^{-3} % of guanine

Table 3 Methylated base content in DNA

DNA origin		Content, %		
		m^6 Gua	m^1 Ade	m^3 Ade
DMN treated rat liver	250 mg/kg	0.09	0.02	0.05
		0.13	0.02	0.09
	100 mg/kg	0.12	0.02	0.04
		0.07	0.02	0.03
	50 mg/kg	0.07	0.01	0.07
		0.05	detected	0.05
	20 mg/kg	detected	0.007	0.01
		detected	detected	detected
MNU treated rat liver	100 mg/kg	0.01	detected	0.02
		detected	detected	detected
3'-DAB treated rat liver tumor		(-)	(-)	(-)
Ehrlich solid tumor		(-)	(-)	(-)
Normal rat liver		(-)	(-)	(-)
Calf thymus		(-)	(-)	(-)
Salmon testes		(-)	(-)	(-)

(-): Not detected

マウス Ehrlich 固型がんのDNA, 正常ラット肝臓DNA, 子牛胸腺DNA, サケ精巣DNA についての分析を行ったがすべてメチル化塩基は検出されなかった。

文 献

- 1) M. Uziel, C. H. Koh, W. E. Chon : *Anal. Biochem.*, **25**, 77 (1968).
- 2) C. Horvath : *Method Biochem. Anal.*, **21**, 79 (1973).
- 3) 由岐英剛: “最新高速液体クロマトグラフィー応用編”, 南原利夫, 池川信夫編著, p. 249 (1983), (廣川書店).
- 4) 由岐英剛: ぶんせき, **1977**, 27.
- 5) H. Yuki, H. Kawasaki, T. Kobayashi, A. Yamaji : *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2827 (1977).
- 6) H. Yuki, H. Kawasaki, A. Imayuki, T. Yajima : *J. Chromatogr.*, **168**, 489 (1979).
- 7) H. Yuki, T. Yajima, H. Kawasaki, A. Yamaji : *Anal. Biochem.*, **97**, 203 (1979).
- 8) R. W. Balsiger, J. A. Montgomery : *J. Chem. Soc.*, **25**, 1573 (1960).
- 9) C. Tamm, M. E. Hodes, E. Chargaff : *J. Biol. Chem.*, **195**, 49 (1952).
- 10) P. D. Lawley, D. J. Orr : *Biochem. J.*, **135**, 193 (1973).
- 11) P. D. Lawley : *Biochem. J.*, **116**, 693 (1970).

- 12) V. M. Craddock : *Biochem. J.*, **111**, 615 (1969).
- 13) A. E. Pegg, G. Hui : *Biochem. J.*, **173**, 739 (1978).
- 14) P. Kleihues, G. P. Margison : *J. Nat. Cancer Institute*, **53**, 1839 (1974).
- 15) K. S. Kirby : *Biochem. J.*, **66**, 495 (1957).

☆

High performance liquid chromatographic determination of 1- and 3-methyladenines and O⁶-methylguanine in deoxyribonucleic acid formed by carcinogenic methylating agents. Hidetaka YUKI, Makoto IMAMURA, and Hideki KAWASAKI (School of Pharmaceutical Science, Toho University, 2-2-1, Miyama, Funabashi-shi, Chiba, 274)

A high performance liquid chromatographic determination of 1- and 3-methyladenines and O⁶-methylguanine in nucleic acid was developed. Thirty milligrams of methylated DNA was dissolved in 30 ml of water and pH of the solution was adjusted to 1.6 with 0.1 M hydrochloric acid. The solution was dialyzed against 400 ml of pH 1.6 hydrochloric acid at 37 °C for 26 h. The solution was evaporated under reduced pressure to 10 ml, and 5 µl of the concentrate was injected onto a high performance liquid chromatograph. The method was applied for the determination of the DNA bases produced by methylation with methylnitrosourea (MNU) or N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (*in vitro*) and of methylated bases in liver DNA of rats treated with dimethylnitrosamine or MNU (*in vivo*). Each methylated base was successfully detected and determined in all these samples. The lower limits of detection of the three methylated bases were 2.5×10^{-3} , 5×10^{-3} , and 5×10^{-3} % of the parent major bases, adenine or guanine, respectively. The recoveries of the three methylated bases were 96.4, 96.6, and 95.8 %, respectively. These results suggest the mode of reaction of carcinogenic methylating agents on DNA.

(Received February 20, 1984)

Keyword phrases

high performance liquid chromatography; determination of methylated bases in nucleic acid; carcinogenic methylating agent; 1-, and 3-methyladenines and O⁶-methylguanine.