

分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための新戦略法に関する研究

分担研究課題名：重要なDNAアダクトの合成と、ターゲットベクターへの導入に関する研究

研究分担者： 高村 岳樹 神奈川工科大学工学部 分子生物学研究室 教授

研究要旨

PhIPのデオキシグアノシン(dG)-C8付加体を得るため、簡便な方法論の構築を行った。付加体合成の原料となる臭素化dG誘導体は、シリル保護dGを酢酸溶媒中プロモスクシンイミドを加える事で効率よく生成物が得られることが明らかとなった。また得られた化合物はO⁶位にベンジル基(Bn)の保護基，N²位にジメトキシトリチル基(DMTr)を入れることで、付加体の化学合成にふさわしい保護8-Br-dGとした。PhIPとの反応は、Pd触媒，Xantphos，炭酸セシウムを用い、さらにDMSOを溶媒として150 °Cで反応させ、保護基のついたdG-C8-PhIPの付加体を40～60%の収率で得ることができた。得られた化合物はさらに、ジクロロメタン溶媒中5%トリクロロ酢酸を処理して、DMTr基を脱保護し、さらに、Pd blackを用いて水素添加によりベンジル基を脱保護した。環外のアミノ基はさらにDMF-DMAでアミジン保護を行った。得られた化合物はさらに、triethylamine-trihydrogenfluorideで処理し、シリル基を外した。得られた化合物は、デオキシリボースの5'位の水酸基にジメトキシトリチル基を導入するが、それには2,6ルチジン / DMF混合溶媒中、DIPEA存在下でトリチルクロライドを60℃に加熱処理することで得られた。最終的にアミダイト体はN,N-tetraisopropyl phosphorodiamidateをジイソプロピルアミノテトラゾリト存在下、ジクロロメタン中で行った。得られたアミダイトとはオリゴ合成に供与したが、残存するphosphorodiamidateの影響のため現時点では合成品を得ることはできなかった。

A . 研究目的

食品中の変異原物質はDNAを損傷し、変異を誘発することが知られているが、変異誘発機構については、十分に理解されている状態ではない。変異誘発機構の解明には、損傷塩基を含んだ短鎖オリゴヌクレオチドである、部位特異的修飾オリゴヌクレオチドを用いたin vitro の系による損傷乗り越え修復 (TLS) の研究がなされてきており、多くの知見が蓄積されている。

一方で、in vivo TLSの例としてはバクテリアを用いる系やヒト細胞株を用いる系など様々であるが、系によっては、異なるTLSの結果を与えることがわかっている。そのため、いくつかのin vivoの系を組み合わせることにより、得られる情報を相互に比較し、動物個体に変異原物質を投与した際の変異データから得られる知見を担保することが重要である。

ヒトが暴露する可能性のある変異・発がん性物質は様々であるが、上述のように既存の動物個体データを活用できるものは多くない。焼肉などの加熱食品中に含まれるがん原性ヘテロサイクリックアミンの一つである2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP 図1)は、Ames試験などバクテリアを用いる変異原性試験では、比較的低い変異原性を示すが、ラットに対し大腸がんや乳がんを誘発することが知られている。またAPC遺伝子に変異を誘発することが明らかとなっている。PhIPのTLS試験ではAPC遺伝子に部位特異的にPhIP修飾を施したものをを用いたin vitroの系が知られているが、in vivo TLSのデータは存在しない。そこで、in vivo TLSに向けたPhIP修飾オリゴヌクレオチドの合成を試みた。

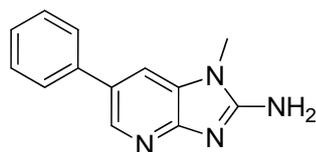


図1 PhIPの化学構造

B. 研究方法

PhIPの部位特異的修飾オリゴヌクレオチドを合成する目的で、まず、対象となるPhIP付加体について検討した。PhIPの付加体については、2種類の存在が知られているが、その化学構造が明らかになっているのは一般的なデオキシグアノシン(dG)の8位の修飾体(dG-C8付加体)のみである。そこで、PhIPのdG-C8の付加体を有するオリゴヌクレオチドの合成を行うこととした。

合成には図3のスキームに従い、合成を進めた。

(倫理面への配慮)

ヒトおよび動物を用いない実験であるため、必要な倫理審査はない。廃液などの観点から、不必要な量の溶媒の使用をしないなど、環境に影響を与える部分で注意をしながら実験を行った。

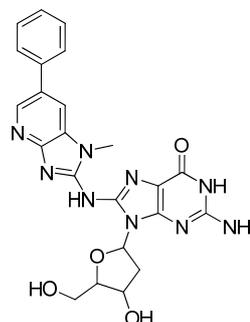


図2 dG-C8-PhIPの化学構造

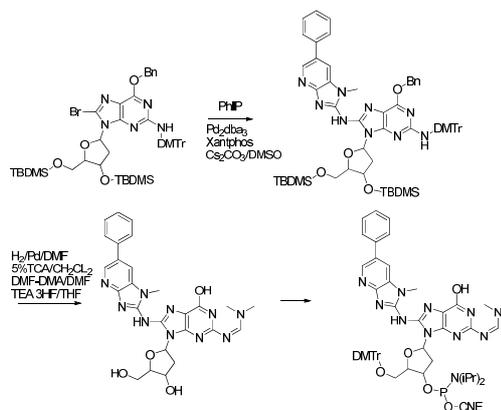


図3 dG-C8-PhIPの合成スキーム

C. 研究結果

一般的なdGのC8の付加体合成ではdGの8位のプロモ体(8-Br-dG)が必要である。これまでに8位のプロモ体の合成は、dGを臭素またはN-ブロモスクシンイミド(NBS)で合成するものが一般的だった。しかしな

がら、これらの方法は水を反応溶媒として用いるため、反応の進行に伴い生成する酸の影響で、脱プリンをする副反応が起こる可能性があり、反応の制御には困難が伴う。そこで、まずdGの水酸基を一般的なシリル基であるTBDMs基で保護した後、臭素化することを試みた。その結果、シリル保護dGの臭素化は酢酸溶媒中、等量のNBSを加える事で、効率よく生成物が得られることが明らかとなった。生成物の精製は酢酸エチルによる溶媒抽出、および炭酸ナトリウムによる中和の処理で、脱プリン体を得ることなく反応物を得ることが可能となった。得られた化合物はO⁶位にベンジル基(Bn)の保護器、さらに、N²位にジメトキシトリチル基(DMTTr)を入れることで、付加体の化学合成にふさわしい、保護8-Br-dGとなる。先行研究により、他のdG-C8付加体ではO⁶位のベンジル保護は必要なく、ジオキサン溶媒で150 °Cの反応温度で進行することが知られている。そのため、同様の系を本PhIPのdG-C8付加体の合成に用いてみた。しかしながら、PhIPの溶媒に対する低い溶解性により、反応はほとんど進行しないことがわかった。そのため、過去文献と同様に、dG-C8付加体の合成をすすめることとした。O⁶位をベンジルアルコールで Mitsunobu 反応を用いて保護し、さらにN²位のアミノ基を4,4'-dimethoxytrityl基で保護した後、PhIPとの反応は、Pd触媒存在下、フォスフィンリガンドをとしてXantphosを用い、炭酸セシウムを塩基とし、さらにDMSOを溶媒として150 °Cで反応させた。原料の消失を確認後、目的とする保護基のついたdG-C8-PhIPの付加体を40~60%の収率で得ることができた。得られた化合物はさらに、ジクロ

ロメタン溶媒中5%トリクロロ酢酸を処理して、DMTr基を脱保護し、さらに、Pd blackを用いて水素添加によりベンジル基を脱保護した。得られた化合物はオリゴヌクレオチド合成にふさわしいようにアミダイト化する必要が有るため、環外のアミノ基はDMF-DMAでアミジン保護を行った。既報ではDMF中で処理することにより、沈殿が得られるためそれをろ過することで目的物を得ているが、DMF溶媒を完全に留去することにより、より高い収率で目的物が得られることがわかった。得られた化合物はさらに、triethylamine-trihydrogenfluoride (TEA·3HF)で処理し、シリル基を外した。得られた化合物は、デオキシリボースの5'位の水酸基にジメトキシトリチル基を導入するが、それには2,6ルチジン/DMF混合溶媒中、DIPEA存在下でトリチルクロライドを60 に加温処理することで得られた。最終的にアミダイト体は*N,N*-tetraisopropyl phosphorodiamidateをジイソプロピルアミノテトラゾリト存在下、ジクロロメタン中に行った。得られたアミダイトとはオリゴ合成に供与したが、残存するphosphorodiamidateの影響のため合成品を得ることができなかった。

D. 考察

既報の方法に改良を加える事で、より簡便に目的化合物を合成することを試みた。原料となるdG修飾体はシリル保護をしたdGを臭素化する新たな方法論を見出した。しかしながら、他は既報通りの方法論が現時点では最適であった。無保護の核酸塩基をダイレクトに修飾することが可能となれば、より効率的な合成が可能となるが、こ

れについては引き続き検討する。いっぽう得られたアミダイトは一定量の原料の混入が確認されており、これはオリゴ合成の妨害成分となりうる、より、効率的な精製法の確立が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1: Misaki K, Takamura-Enya T, Ogawa H, Takamori K, Yanagida M. Tumour-promoting activity of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated or nitrated derivatives. *Mutagenesis*. 2016;31(2):205-13.

2: Takamura-Enya T, Tokutake M. Novel speciation analysis of copper in river water: observation of soluble anionic copper-ligand complexes *Limnology*. 2016 17, 117-125

2. 学会発表

1: 高村岳樹、環境汚染物質による DNA 損傷の新たな検出法の開発、日本環境変異原学会第 44 回大会 (福岡 2015)

2: 益谷美都子、Rafiqul Islam、藤森浩彰、佐々木由香、小泉史明、井上謙吾、松野研司、石川吉伸、高村岳樹、大川原正
がん治療の分子標的候補としての PARG の検討 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (2015 神戸)

3: 高村 岳樹、小笠原楓、益谷 美都子
DNA 損傷マーカーとしてのリボシルアデノシンの検出、日本薬学会第 136 年会 (2

016 横浜)

4: 橋本亜紀子、高村岳樹、ソラレン結合型水溶性フラレンの合成と *in vitro* における評価 日本化学会 第 96 春季年会 (2016 京都)

5: 山中岳寛、高村岳樹、デオキシグアノシンの酸化損傷を検出する蛍光-消光プローブの合成と評価 (2016 京都)

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし