

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： 重要な DNA アダクトの合成に関する研究

研究分担者：正田 卓司 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 主任研究官

#### 研究要旨

生命の設計図である DNA に化学物質が結合すると、その遺伝子の機能が破壊される。このような DNA アダクトが蓄積すると細胞の癌化につながると考えられる。そのため、DNA アダクトの生成機構、除去、修復機構を明らかにすることは極めて重要である。本研究では、安井らが開発した TATAM 法に必要な DNA アダクト含有オリゴ DNA を提供するために、DNA 合成に使用するホスホロアミダイト体の合成法を確立することを目的とする。本年度は 2 種類の DNA アダクトの合成を試みた。まずはヘテロサイクリックアミンなどの DNA アダクトのうち、高い発がん性を有する 2-aminofluorene 付加体 (dG-C8-AAF) の合成を試みた。しかしながら、8 位へのアセチル基導入が難航し、目的物を得ることができなかった。次に、食品中の焦げなどに含まれる MeIQx の付加体 (dG-C8-MeIQx) の合成を試みた。現在までに MeIQx の塩基への導入に成功しており、今後ホスホロアミダイト体の合成及びオリゴ DNA の合成を行う。

#### A. 研究目的

生物は常に多種多様な化学物質にさらされており、それら化学物質が生体分子と結合することで、その生体分子の正常な機能は破壊される。生命の設計図である DNA も化学物質と結合し、DNA アダクトを形成する。そのため、DNA アダクトの生成機構をはじめ、その除去機構、除去後の修復機構などの詳細を明らかにすることは極めて重要である。この分野での古典的な研究は個体あるいは細胞に化学物質を与え続けてがん化した細胞から DNA アダクトを検出、同定するといったものである。しかしながら、実際に生じた DNA アダクトが、細胞の発がん性に与えた影響について定量的に解析された例はほとんどなかった。一方、安井らが開発した TATAM 法<sup>1)</sup>は、DNA 損傷と発がん性を定量的に解析できる手法であり、DNA アダクトと発がん性の関係を詳細

に解明することが可能になると考えられる。そこで本研究では、TATAM 法に必要な DNA アダクト含有オリゴ DNA を供給するために、その DNA アダクトの合成および、そのホスホロアミダイト体の合成を行うこととした。

DNA アダクトのホスホロアミダイト体を合成するには、デオキシグアノシン (dG) を出発原料とし、その構造に含まれる窒素原子 (N) や酸素原子 (O) を適切に保護することが重要である。DNA アダクトにはグアニン塩基の 1 位、2 位、8 位に N があり、6 位に O がある (Figure 1)。一般的には、6 位 O をベンジル (Bn) 基で、2 位をジメトキシトリチル (DMTr) 基で保護した化合物を合成中間体として用い、ホスホロアミダイト体合成前に 6 位 Bn 基は脱保護するが、6 位 Bn 基の脱保護条件は化合物の構造や実験環境の影響を受けやすく、反応条件が一定しないなどの問

題があり，適宜反応条件の検討が必要となる．本研究では Figure 2 に示したアミノフルオレン付加体（dG-C8-AAF）および MeIQx 付加体（dG-C8-MeIQx）を選択し，それぞれの合成中間体についての反応条件検討を行った．

## B. 研究方法

### 1. 試薬と装置

試薬は和光純薬，東京化成，関東化学から購入し，特に精製せずにそのまま用いた．化合物の精製には中圧分取液体クロマトグラフ（EPCLC-W-Prep，山善）を用いた．

Microwave 照射装置には Initiater（Biotage）を用いた．

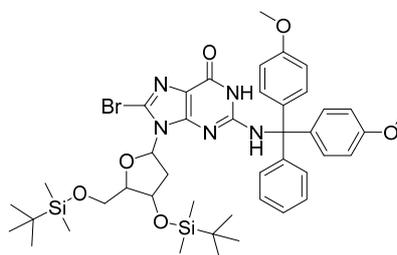
$^1\text{H}$  NMR スペクトルは Varian MERCURY VX 400 を用いて測定した．溶媒には  $\text{CDCl}_3$  または  $\text{DMSO-}d_6$  を用い，化学シフトは TMS を内部標準として用いた．

LCMS は島津 IT-TOFMS（LC 部分：システムコントローラ CBM-20A，ポンプ LC-20A，カラムオープン CTO-10AC，UV/フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M20A）を用いて測定した．カラムは CAPCELL PAK C18 MGII  $5\mu\text{m}$   $2.0 \times 35$  mm（SHISEIDO）を用いた．溶媒は A: 0.1%  $\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$ ，B: 0.1%  $\text{HCOOH}/\text{CH}_3\text{CN}$ （いずれも関東化学）を用いた．

### 2. 合成

#### 1) dG- $N^2$ -DMTr- $C^8$ -Br-3',5'-diTBDMS (**4**) の合成

2.23g の化合物 **3** を 20ml のピリジンに溶解し，20 ml のピリジンに溶解した 4.0 g の DMTrCl を添加した．室温下，終夜撹拌した．溶媒を減圧留去し，残渣を少量の dichloromethane に溶解し，シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した（2% methanol/dichloromethane）．2.5 g の化合物 **4**（白色固体）を得た（収率 73%）．

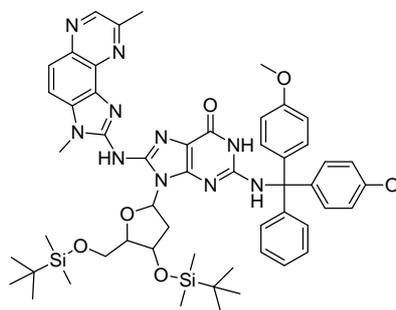


$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  10.87 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.39 – 7.28 (m, 2H), 7.27 – 7.21 (m, 1H), 7.20 – 7.14 (m, 2H), 7.11 – 6.99 (m, 4H), 6.92 – 6.80 (m, 4H), 5.71 (dd,  $J = 10.1, 5.1$  Hz, 1H), 3.96 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 3.72 (s, 6H), 3.57 (m, 1H), 3.29 (m, 1H), 3.07 (dd,  $J = 10.9, 8.7$  Hz, 1H), 2.35 (ddd,  $J = 13.1, 10.1, 5.3$  Hz, 1H), 1.32 (dd,  $J = 13.1, 5.1$  Hz, 1H), 0.85 (s, 9H), 0.84 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H), -0.03 (s, 3H), -0.05 (s, 3H).

MS (ESI+)  $m/z = 898$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$

#### 2) dG- $N^2$ -DMTr- $C^8$ -MeIQx-3',5'-diTBDMS (**17**) の合成

十分に窒素置換した 3 ml の THF に化合物 **4**（44.3 mg，0.05 mmol），MeIQx（22.1 mg，0.1 mmol），xantphos（30.2 mg，0.05 mmol）， $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ （33.6 mg，0.1 mmol）， $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ （10.6 mg，0.01 mmol）を添加し，microwave 照射下，100 °C，6h 撹拌した．ろ過した反応液を減圧留去し，シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した．29.3 mg の化合物 **17**（黄色固体）を得た（収率 58%）．



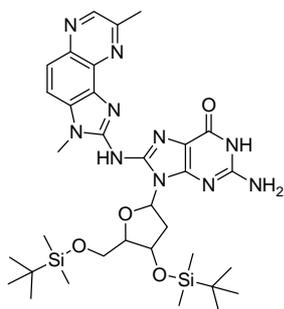
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  8.62 (s, 1H), 7.84 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.52 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.39 – 7.20 (m, 9H), 6.86 (d,  $J = 8.5$  Hz,

5H), 6.70 – 6.62 (m, 1H), 6.05 (s, 1H), 4.62 (s, 1H), 3.97 – 3.88 (m, 1H), 3.83 – 3.66 (m, 11H), 3.30 (s, 1H), 2.72 (s, 3H), 2.00 – 1.88 (br, 1H), 0.93 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), 0.12 (s, 6H), 0.01 (s, 3H), -0.02 (s, 3H).

MS (ESI+)  $m/z = 1009 [M + H]^+$

### 3) dG-C<sup>8</sup>-MeIQx-3',5'-diTBDMS (**18**) の合成

88.1 mg の化合物 17 を 3% TCA/dichloromethane に溶解し、室温して 1 時間攪拌した。さらに dichloromethane を加え、飽和ギ酸アンモニウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した。37.7 mg の化合物 18 (黄色固体) を得た (収率 61%)。



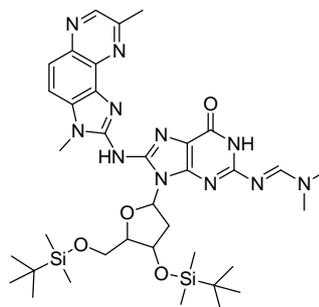
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.85 (br, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.90 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.59 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.69 – 6.60 (m, 3H), 4.64 – 4.58 (m, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.77 – 3.63 (m, 3H), 2.96 (s, 3H), 2.09 – 2.04 (m, 1H), 0.92 (s, 9H), 0.76 (s, 9H), 0.11 (s, 3H), 0.10 (s, 3H), -0.09 (s, 3H), -0.12 (s, 3H).

MS (ESI+)  $m/z = 707 [M + H]^+$

### 4) dG-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylene-C<sup>8</sup>-MeIQx-3',5'-diTBDMS (**13**) の合成

53.4 mg の化合物 18 を 1 ml の DMF に溶解し、さらに DMF-DMA 2ml を添加した。反応液を室温下 1.5 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣

を少量の dichloromethane に溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した。56.8 mg の化合物 13 (黄色固体) を得た (収率 98%)。



<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.48 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 7.97 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.90 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.67 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 4.68 (dt,  $J = 6.1, 3.0$  Hz, 1H), 3.88 – 3.78 (m, 2H, b5), 3.75 (s, 3H), 3.74 – 3.67 (m, 1H), 3.51 – 3.46 (m, 1H), 3.15 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 2.81 (s, 3H), 2.13 – 2.09 (m, 1H), 0.93 (s, 9H), 0.83 (s, 9H), 0.14 (s, 6H), -0.01 (s, 3H), -0.02 (s, 3H).

MS (ESI+)  $m/z = 762 [M + H]^+$

## C. 結果と考察

### 1. dG-C8-AAF の合成

dG-C8-AAF の合成ルートを Scheme 1 に示す。6 位の保護基は化合物の構造や実験環境によって適用可能な反応条件が異なること、グアニン塩基上の N は Buchwald-Hartwig 反応には不活性であることから (後述)、6 位保護基は省略可能であると考へた。具体的には dG を出発原料とし、8 位 Br 化、3',5'位 TBDMS 保護、2 位 DMTr 保護、次に Buchwald-Hartwig 法により、8 位 Br 基に 2-aminofluorene を導入した化合物 **5** を合成し、さらにその 8 位にアセチル基を導入 (**6**) し、2 位保護基の *i*PrPac 基へのかけかえ (**7**→**8**) を行った後にホスホロアミダイト体 (**11**) へ導く計画であった。しかしながら、8 位のアセチル基の導入に難航した。アセチル基の導入は文献<sup>2)</sup>を参考にし、ピリジン溶媒中、無水酢酸、トリエチルア

ミン, DMAP 触媒にて行った. 反応溶液を LCMS により分析した結果を Figure 3 に示す. 無水酢酸の当量数を 5 および 10 当量にて検討したところ, 生成物の MS ピークを確認したが, 反応は完結せず, ほとんどが原料回収となった. さらに, 反応時間を延長したところ, 20 時間では, 生成物が消失する結果となった (Figure 4). 8 位アセチル基の周囲は嵩高い構造に囲まれていることから, 試薬との反応性が低いことが考えられる. そこで 6 位に Bn 基を導入することで化合物の物性や N の反応性が変化することを期待し, 検討を行った. 6 位 Bn 保護体を既報にしたがって調整し, 無水酢酸を 5 当量用いて反応時間の検討を行ったが, 18 時間までは目的化合物の反応が進むことを確認したが, 42 時間ではその生成物の量が減少した (Figure 5). また, 一方で 2 位脱 DMTr 体や脱リボース体等の副生成物の生成が認められた. これは, 過剰に加えた無水酢酸から生じた酢酸の影響によるものだと考えられる. より詳細な検討を続けることで, 目的化合物が得られる可能性が示唆されたが, 反応が完了しないことや副生成物の生成, スケールアップが難しいこと考慮し, 本化合物の合成は断念することとした.

## 2. MeIQx 付加体の合成

ヘテロサイクリックアミン (Heterocyclic amine, HCA) 類は食品中の焦げに含まれる化学物質であり, これらが DNA アダクトを形成することが知られている (Figure 6)<sup>3)</sup>. IQ<sup>4)</sup> や PhIP<sup>5)</sup> の DNA アダクトおよびそのホスホロアミダイト体についてはすでに合成法が報告されていることから, これまでに報告例のない MeIQx に着目し, その DNA アダクトおよびホスホロアミダイト体を合成することとした. 本研究ではより効率良い合成法を検討するために各種保護基の検討を行った.

### 1) N2 無保護合成の検討

Rizzo らのグループ<sup>4)</sup>は 3',5'位に環状のシリル

系保護基を導入し, 2 位のアミノ基を無保護の状態に 8 位にアミノ基を導入することに成功している (Figure 7). すなわち, 2 位のアミノ基は反応性が極めて低く, Buchwald-Hartwig 反応の条件では反応しないことを示唆している. そこで本研究では Scheme 2 に示す合計 7 ステップの合成ルートを計画した. そこで, 化合物 **3** から **12** を合成する際に, 2 当量 MeIQx, 0.1 当量 Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, 1 当量 xantphos, 2 当量 Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 溶媒 DMF を用いて microwave にて 100 , 12 時間で反応させたところ, 約 50% 程度反応が進むことを確認した (Figure 8). この反応液を後処理し, 順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製作業を行ったところ, 原料と生成物の溶出位置が重なり, 生成物を単離することができなかった (data not shown). そこで 2 位アミノ基 (N2) を DMTr で保護した化合物 (Scheme 2, 化合物 **4**) を用いて反応を行ったところ, 原料と生成物の溶出位置は大きく異なったことから, 今後の合成では N2 は保護した状態で進めることとした (Scheme 3).

### 2) MeIQx 付加体の合成

合成ルートを Scheme 3 に示す. DMTr 基の導入と脱保護のため, Scheme 2 に比べて 2 ステップ長くなった. 化合物 **3** に対し, ピリジン溶液中にて DMTrCl を反応させ **4** を収率 73% で合成した. 次に Buchwald-Hartwig 反応にて **17** を得た. 反応条件を検討した結果を Table 1 に示す. 溶媒として 1,4-dioxane を用いた場合, 反応が 50% 程度しか反応が進行しなかった. そこで溶媒を THF に変更したところ, 反応効率および収率の向上が認められた. 反応効率には化合物の溶媒への溶解性が大きく影響するのだと考えられる. 次に TCA により脱 DMTr し **18** を 61% の収率で得た. さらに DMF-DMA により **13** を 98% の収率で得た.

## D. 結論

本研究では, オリゴ DNA を供給するために, DNA アダクトのホスホロアミダイト体を合成す

ることを目的として研究を行った。当初計画していた dG-C8-AAF は、8 位アセチル基の導入に難航した。8 位は周囲を嵩高い構造に囲まれており、アセチル基は容易に加水分解されると考えられる。したがって、試薬中、反応溶液中に含まれる水分子を厳密に取り除く等の処理が必要であると考えられる。残念ながら dG-C8-AAF の最終生成物を得ることはできなかったが、その検討過程において、6 位保護基が必要ないことを明らかにすることができた。6 位は Bn 基で保護することが一般的であるが、その脱保護条件は一定ではなく、化合物の構造に応じて様々な条件を検討する必要があった。6 位保護基を省略することで、全体の収量向上につながることを期待される。

MeIQx 付加体に関しては、N2 の無保護反応についても検討した。反応は 50%程度進行（反応時間 12 時間）したが、精製時、原料と生成物の溶出位置が一致していたことから、生成物の単離には至らなかった。反応進行率が 100%になる条件を見出すかあるいは原料と生成物の溶出位置が異なる化合物の場合はそのような問題は生じないと考えられる。MeIQx 以外の付加体を合成する際に再度検討したい。

MeIQx を基質とした Buchwald-Hartwig 反応について検討し、反応溶媒に THF が適していることを明らかとした。その条件を用いて MeIQx 付加体の合成に成功した。今後、ホスホロアミダイト体の合成を進め、オリゴ DNA の合成を行う予定である。

## E. 参考文献

- 1) Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T, Honma M: Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. *DNA Repair (Amst)*, **15**, 11-20 (2014).
- 2) Gillet LC, Scharer OD: Preparation of C8-amine and acetylamine adducts of

2'-deoxyguanosine suitably protected for DNA synthesis. *Org Lett*, **4**, 4205-4208 (2002).

- 3) Turesky RJ, Le Marchand L: Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in molecular epidemiology studies: lessons learned from aromatic amines. *Chem Res Toxicol*, **24**, 1169-1214 (2011).
- 4) Elmquist CE, Stover JS, Wang Z, Rizzo CJ: Site-specific synthesis and properties of oligonucleotides containing C8-deoxyguanosine adducts of the dietary mutagen IQ. *J Am Chem Soc*, **126**, 11189-11201 (2004).
- 5) Takamura-Enya T, Ishikawa S, Mochizuki M, Wakabayashi K: Chemical synthesis of 2'-deoxyguanosine-C8 adducts with heterocyclic amines: an application to synthesis of oligonucleotides site-specifically adducted with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Chem Res Toxicol*, **19**, 770-778 (2006).

## F. 健康危機情報

特になし。

## G. 研究発表

- 1) 特になし

## H. 学会発表

- 1) 特になし

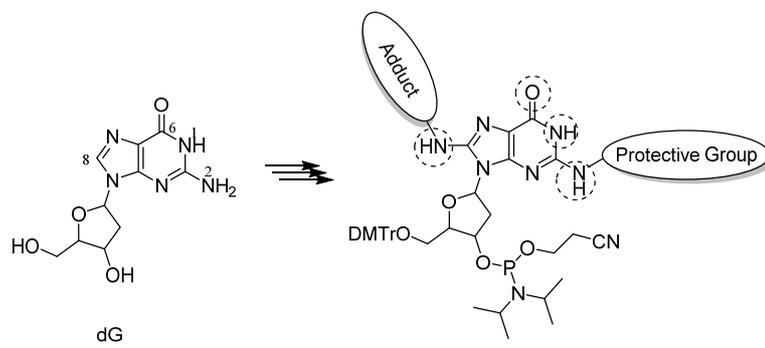


Figure 1 dG および ,ホスホロアミダイト体の構造

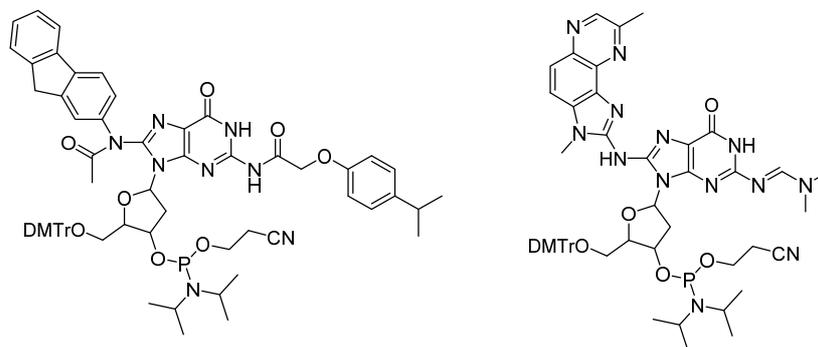
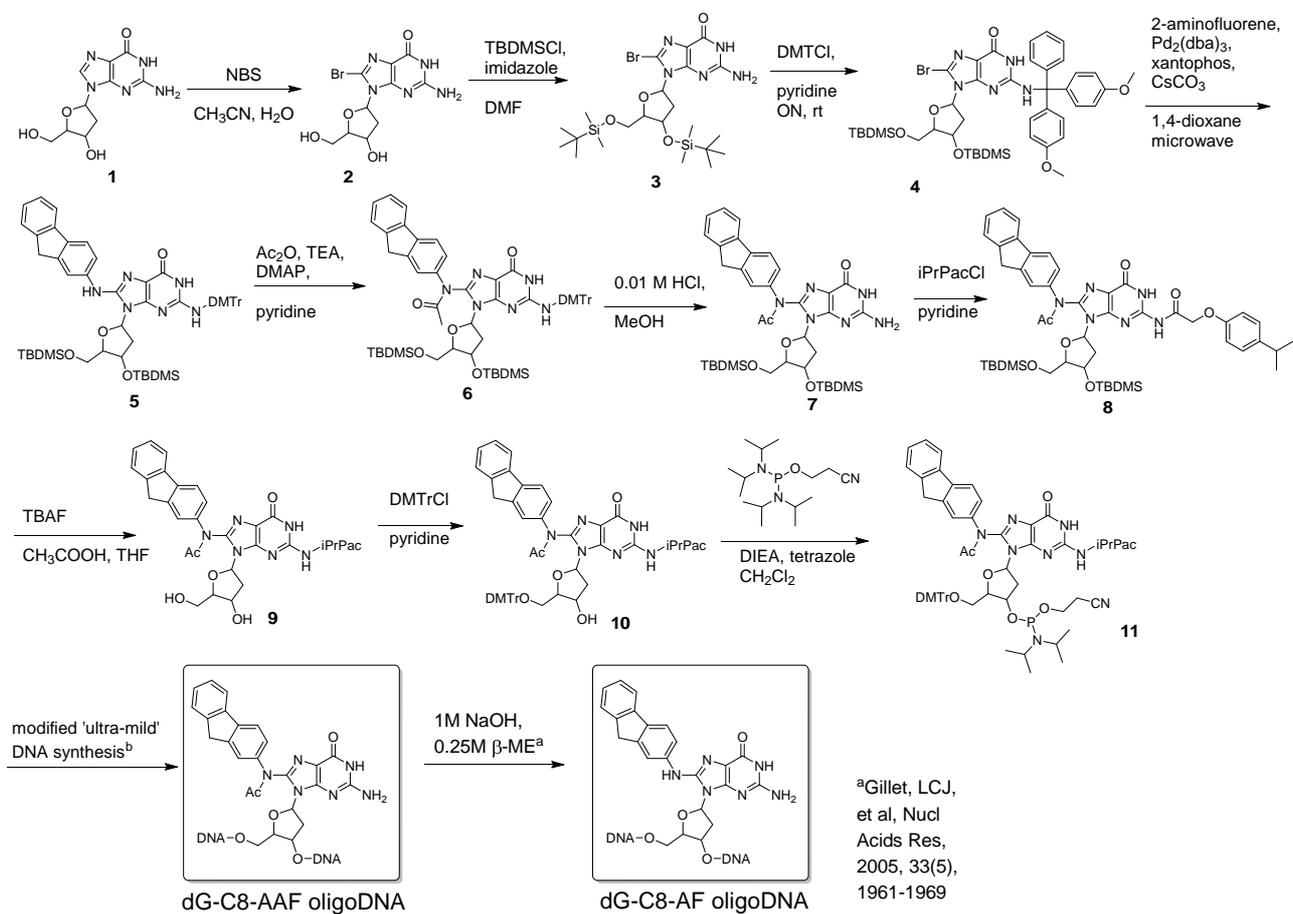


Figure 2 本研究で合成を試みた DNA のアダクト(ホスホロアミダイト体)の構造



Scheme 1 dG-C8-AAF の合成ルート

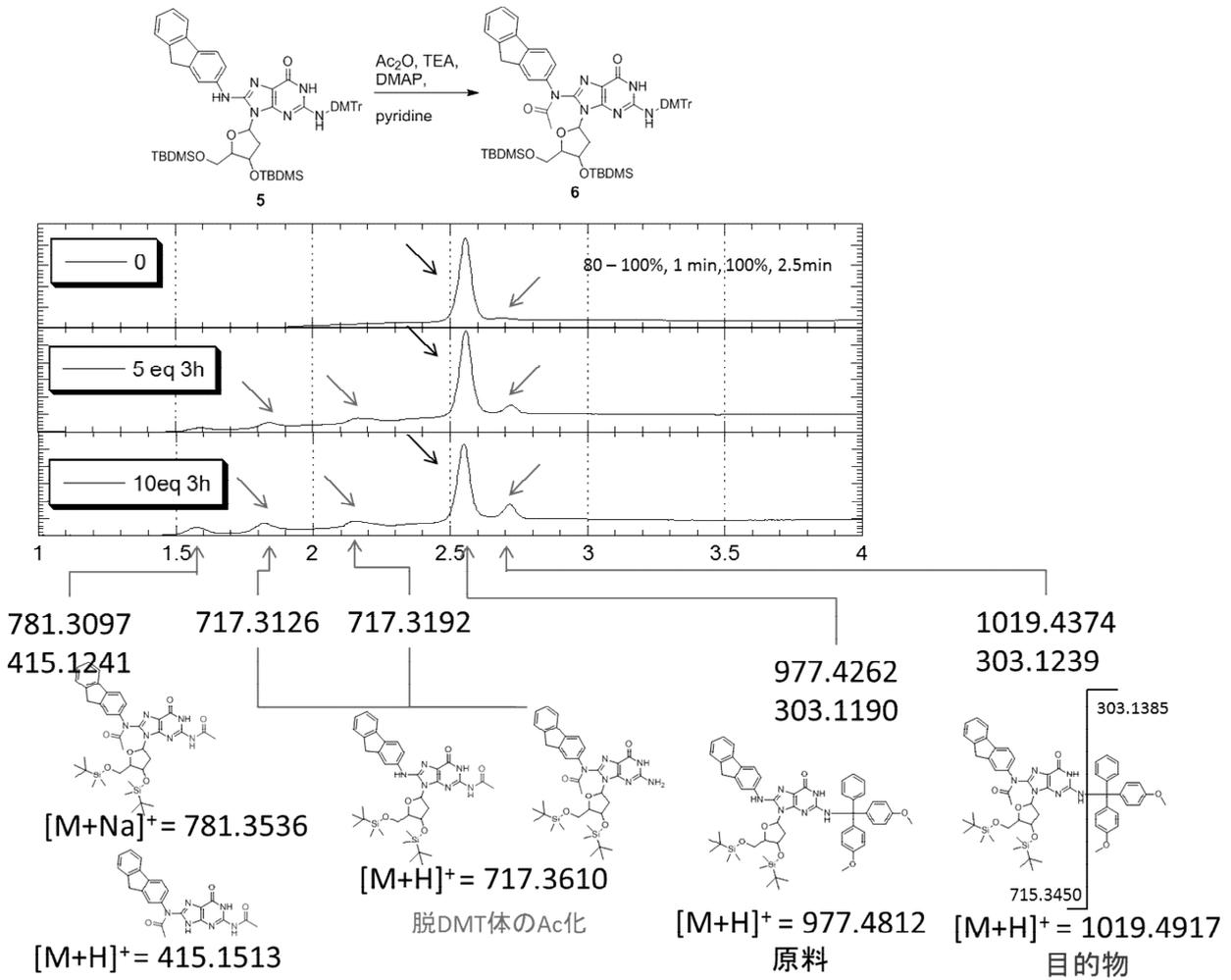


Figure 3. dG-C8-AAF 合成における 8 位 Ac 化の試薬濃度の検討. 反応スキームを上段に示した. 中段は UV 254 nm のクロマトグラムを示した. 検出された MS ピークから推定される化合物の構造式を下段に示した.

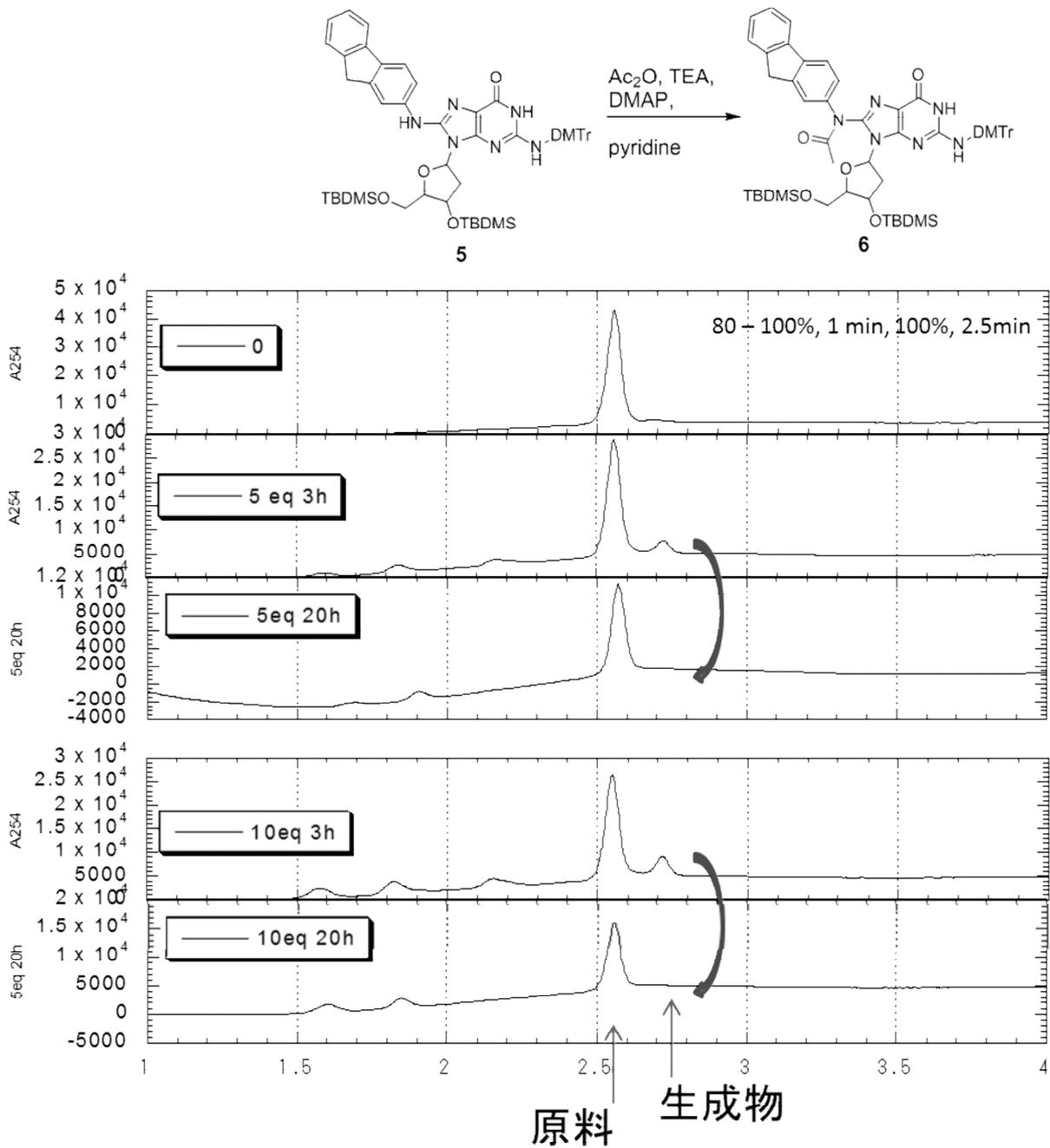


Figure 4. dG-C8-AAF 合成における 8 位 Ac 化の反応時間および試薬濃度検討. 反応スキームを上段に示した. 中段はピリジン 5eq での反応時間検討結果, 下段は 10eq での検討結果であり, それぞれ UV 254 nm のクロマトグラムを示した. MS から生成物および原料の保持時間を特定した.

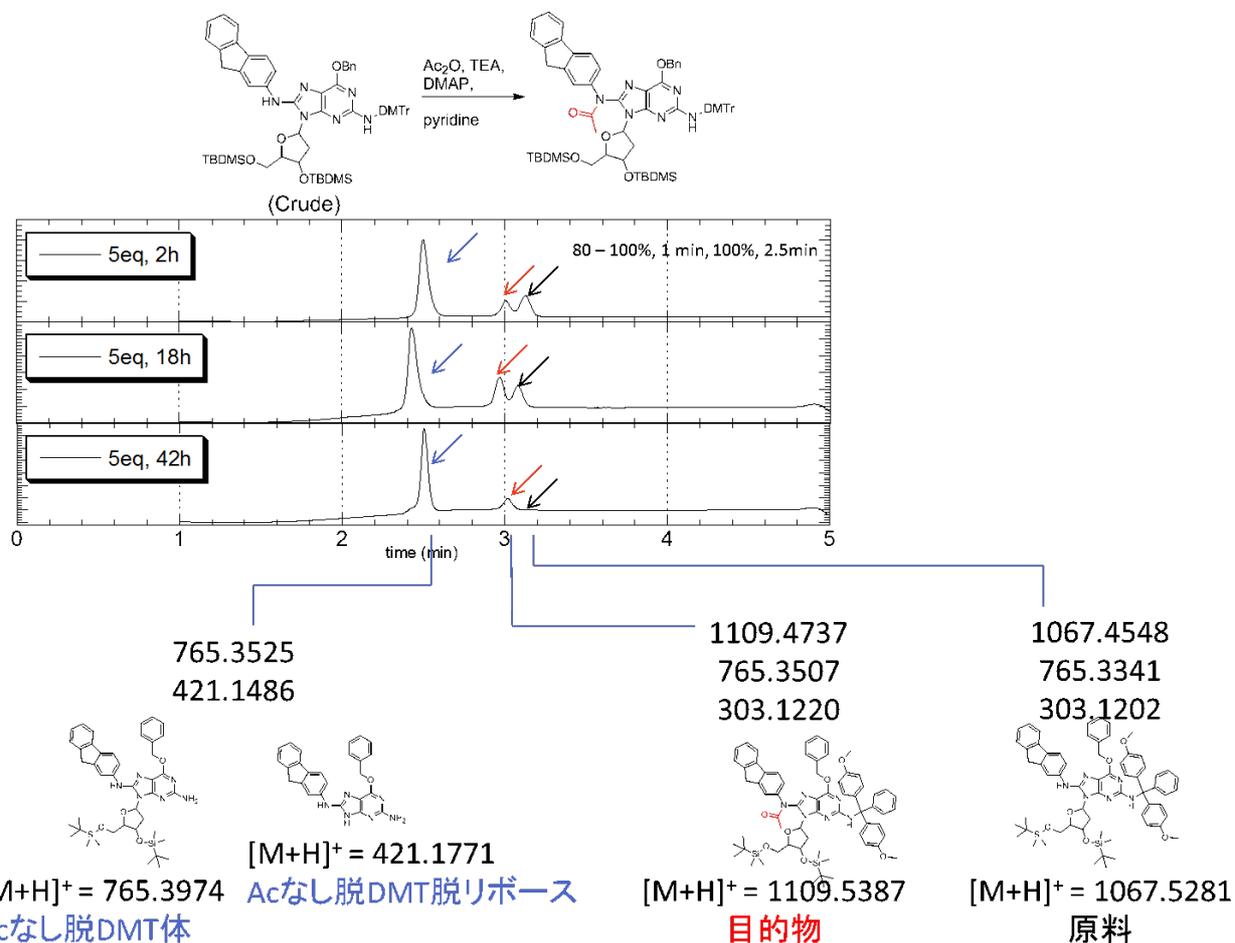


Figure 5 dG-C8-AAF 合成における 8 位 Ac 化の反応時間および試薬濃度検討 . 原料として 6 位が Bn 保護された化合物を用いた . 反応スキームを上段に示した . 中段はピリジン 5eq での反応時間検討結果 . 検出された MS ピークから推定される化合物の構造式を下段に示した .

## Aminoimidazoarene Heterocyclic Aromatic Amines

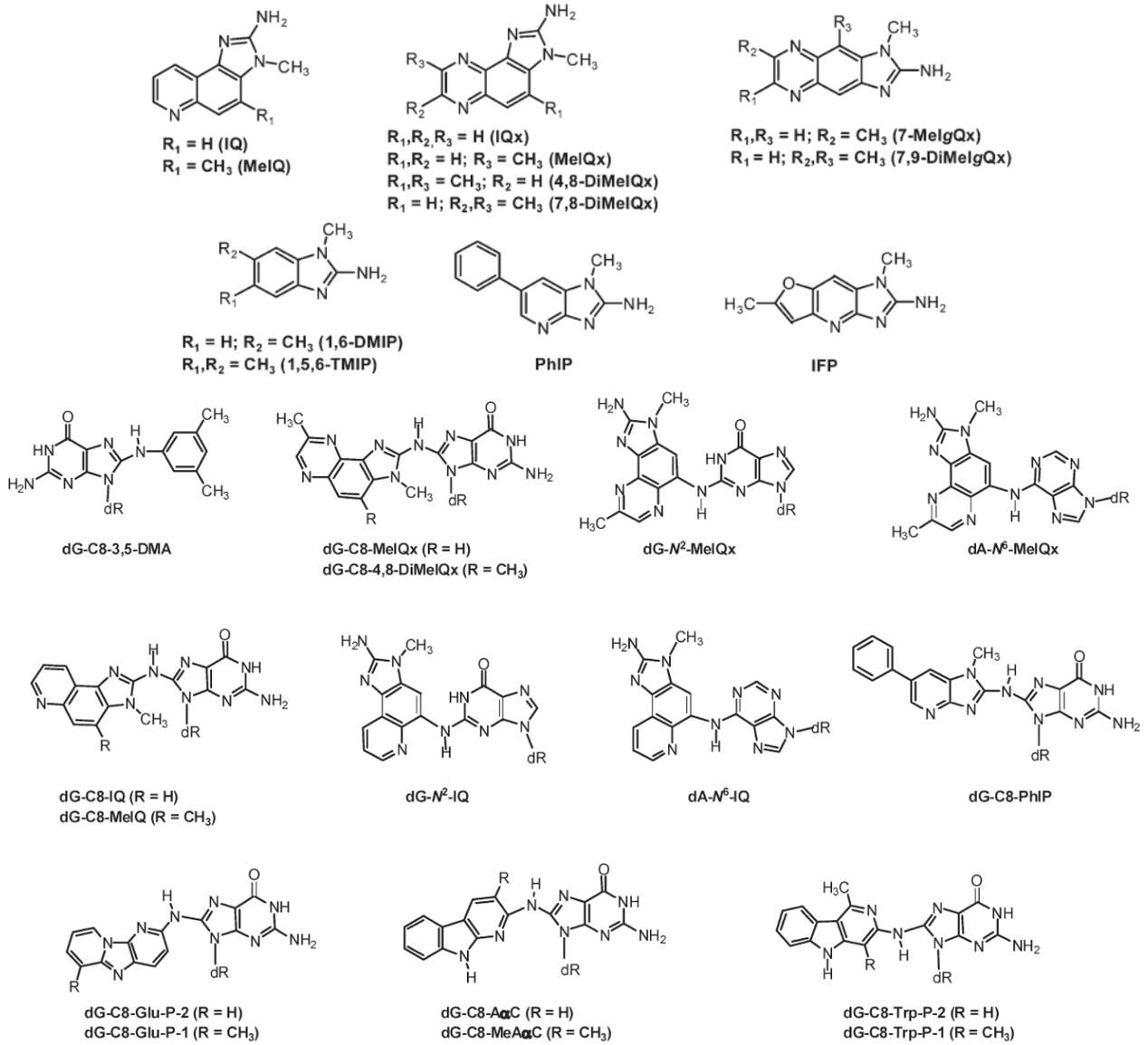


Figure 6 食品に含まれるヘテロサイクリックアロマトミックアミンの構造と, DNA アダクトの構造.

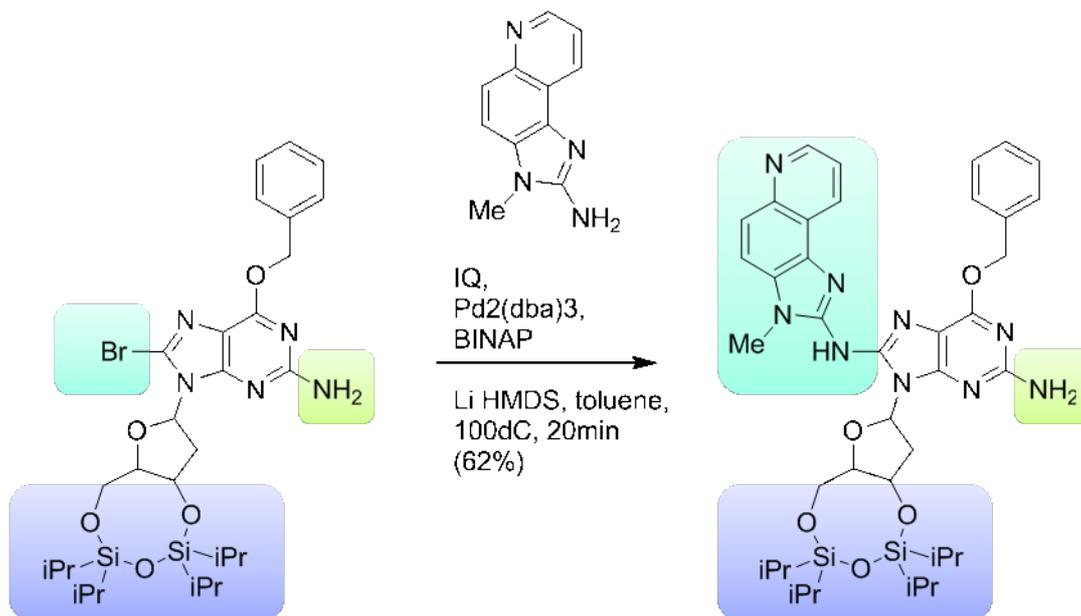
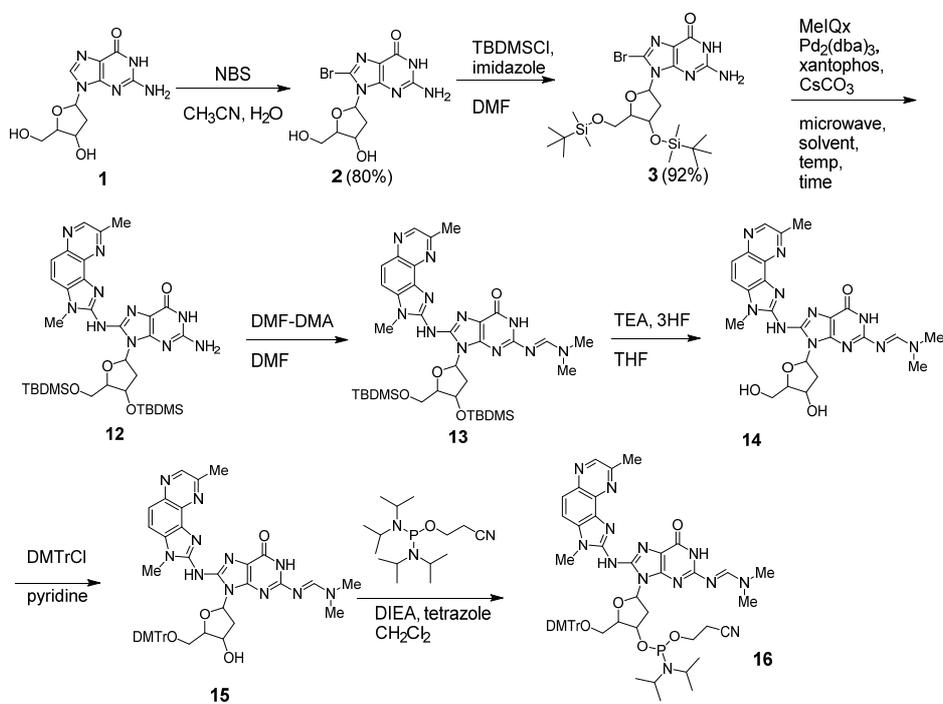


Figure 7 2位無保護条件下における Buckwald-Hartwig 反応



Scheme 2 dG-C8-MeIQx アダクトの合成スキーム .

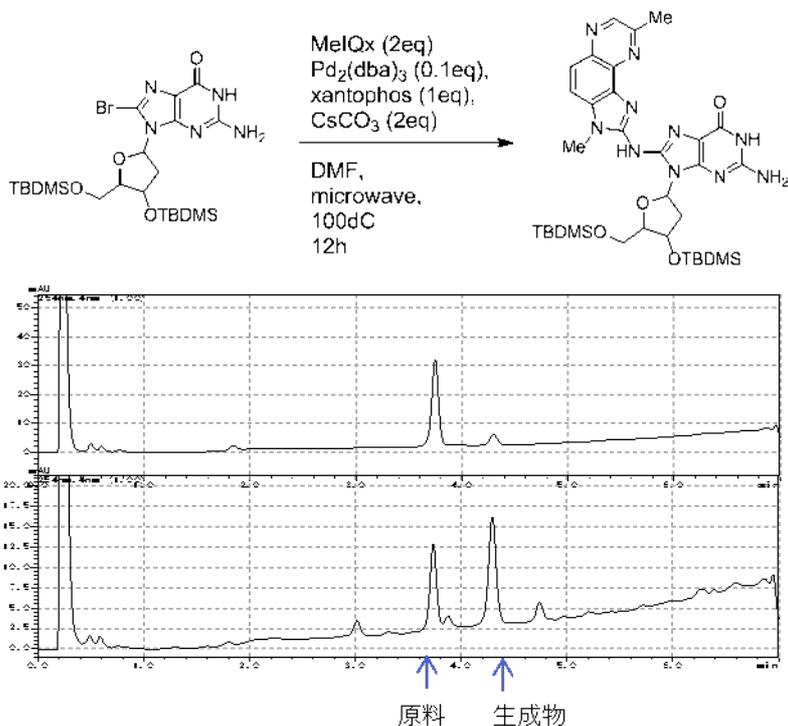
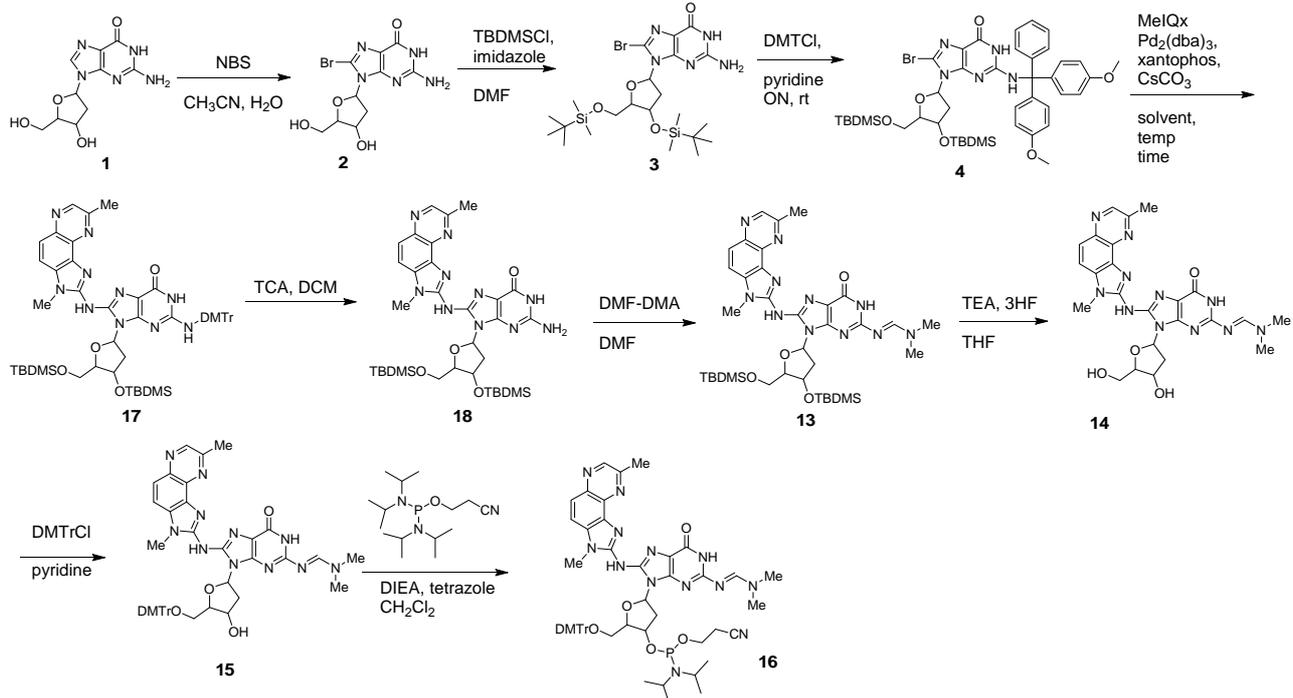


Figure 8 化合物 12 の合成, 反応液を LCMS により分析した. UV 254 nm のクロマトグラムを示す. MS から生成物および原料の保持時間を特定した.



Scheme 3 dG-C8-MeIQx アダクトの合成スキーム(改)

Table 1 MeIQx を基質とした Buchwald-Hartwig 反応の結果

| Entry    | Scale     | Condition   | Yield                 |
|----------|-----------|---|-----------------------|
| <b>1</b> | 0.1 mmol  | MeIQx (2 eq), xantphos (1 eq), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2eq), Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (0.14 eq), dioxane (3 ml), microwave, 100dC, 15h | 22%<br>(50% complete) |
| <b>2</b> | 0.1 mmol  | MeIQx (2 eq), xantphos (1 eq), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2eq), Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (0.14 eq), dioxane (3 ml), microwave, 130dC, 15h | 28%<br>(50% complete) |
| <b>3</b> | 0.05 mmol | MeIQx (2 eq), xantphos (1 eq), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2eq), Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (0.1 eq), dioxane (3 ml), microwave, 100dC, 12h  | 42%<br>(50% complete) |
| <b>4</b> | 0.1 mmol  | MeIQx (2 eq), xantphos (2 eq), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2eq), Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (0.2 eq), dioxane (3 ml), microwave, 100dC, 15h  | dcomp                 |
| <b>5</b> | 0.05 mmol | MeIQx (2 eq), xantphos (1 eq), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2eq), Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (0.12 eq), THF (3 ml), microwave, 100dC, 12h     | 32%                   |
| <b>6</b> | 0.05 mmol | MeIQx (2 eq), xantphos (1 eq), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2eq), Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (0.2 eq), THF (3 ml), microwave, 100dC, 6h       | 58%                   |
| <b>7</b> | 0.1 mmol  | MeIQx (2 eq), xantphos (1 eq), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2eq), Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (0.2 eq), THF (5 ml), microwave, 100dC, 6h       | 63%                   |