

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教授

研究要旨

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) 修飾オリゴヌクレオチドの合成を行った。PhIP の付加体はこれまでに デオキシグアノシン (dG) の C8 位に PhIP のアミノ基が結合したもののみが知られているため、その付加体を部位特異的に含むオリゴヌクレオチドの合成を試みた。一般的な付加体合成は 8-ブロモ-dG の誘導体を合成する必要があり、今回、この原料の大量合成に成功している。得られた化合物 1 は PhIP とアリルアミネーション反応によりカップリングさせた。その後、オリゴ合成に必要なアミダイトを得るまで各種脱保護、および大量合成に必要な精製法の開発とともに系を最適化した。アミダイトを得るまでの全収率は最適化した条件で dG から初めて 2 % 程度である。得られたアミダイトをオリゴ合成反応に用いるが、このとき脱保護にメルカプトエタノールなどの抗酸化試薬を加えることで、効率よく合成が進むことがわかった。得られた HPLC 精製後の PhIP 修飾オリゴヌクレオチドを MALDI-TOF・MS による分析を行ったところ、それぞれ m/z 7141, 6934 と理論値どおりであった。他の分子イオンピークは観察されないため、きわめて純度は高いと思われる。一方、修飾オリゴヌクレオチドをキャピラリー電気泳動で解析を行ったところ、2 種類のピークが観察されることがわかった。合成したオリゴが HPLC では単一ピークであるが、2 種類に分かれる例は過去に報告がなく、これは PhIP 付加体の特殊な例である。PhIP はグアニジン骨格部位の互変異性がよく知られており、代謝産物のグルクロン酸抱合においても、その互変異性が知られている。そのため、オリゴ内でも PhIP の互変異体が存在しているものと思われる。興味深いことに、この互変異体の存在割合はオリゴヌクレオチドによって異なっており、こうした異性体の存在が、ポリメラーゼの伸長反応にどのような影響を及ぼすかは興味深く、今後の検討課題である。

キーワード: バルキ-DNA 付加体, PhIP, オリゴ合成

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 *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。PhIP の環外アミノ基が酸化され、ヒドロキシルアミンに変化し、その後アセチル化された後、ニトレンウムイオンとなりこれが強い求電子性を持つことからグアニンの 8 位と共有結合し DNA 付加体を形成することが予想されている (図 2)。この付加体は 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おこなった。

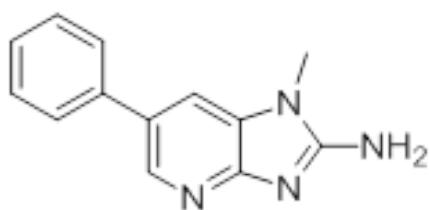


図 1 PhIP の化学構造

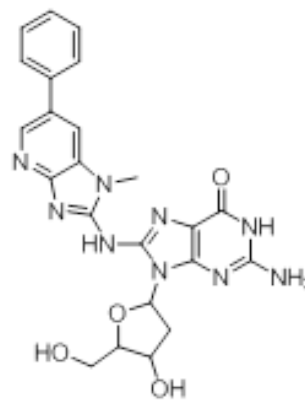


図 2 dG-C8-PhIP の化学構造

B . 研究方法

昨年度の方法ではオリゴヌクレオチドの合成を試みたが、目的とするオリゴヌクレオチドを合成することができなかったため、より慎重に各段階の合成方法の確認を行いながら PhIP の部位特異的修飾オリゴヌクレオチドの合成を行った。PhIP の dG-C8 の付加体を有するオリゴヌクレオチドの合成には、使用していたアミダイトおよび修飾オリゴヌクレオチドの合成を行う企業の変更を行った。

(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。

C . 研究結果

昨年度までの結果を参考に、dG の 8 位のプロモ体(8-Br-dG)誘導体の合成からはじめた (図 3)。シリル基で保護をしたデオキシグアノシンを NBS / 酢酸の系でプロモ化し、得られた誘導体の O6 位をベンジル保護をおこない、さらに N2 位をトリチル保護を行った。得られた dG 誘導体は PhIP との Buchwald アミノ化反応をもちい、xanthophos 存在下、Pd(0)および塩基として炭酸セシウムをもちいて、カップリングさせた。PhIP の有機溶媒への溶解性の問題から DMSO を溶媒として用い、反応温度は 150 で 1 時間でおこなっ

た。得られた付加体誘導体は NMR により構造を確認した後、Pd black 存在下、水素添加反応により、ベンジル位の脱保護をおこない、さらにトリチル基は 3% トリクロロ酢酸処理により脱保護した。各段階を HPLC で反応の進行を確認した。その後 DMF-DMA による、アミジン保護は 1 時間で反応が完結し、またシリル保護はトリエチルアミン・フッ化水素により脱離させた。得られた付加体誘導体はオリゴヌクレオチド合成に必要な 5' 位のトリチル化反応を行った。これは 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 80 に加温処理することで得られた。このとき、ジトリチル体の生成はほとんどないことを確認した。最終的にアミダイト体はジクロロメタン溶媒中、ジイソプロピルアミノテトラゾリトを加え、N,N-tetraisopropyl phosphorodiamidate を滴下して反応を行った。得られたアミダイトはジクロロメタン / シクロヘキサン / トリエチルアミンを 0.5 : 0.5 : 0.005 の割合で混合した溶媒でカラムを行うことで、残存アミダイトのない目的化合物を得ることができた。なお、用いたアミダイトはアルドリッチ社から TCI へと変更を行っている。

得られたアミダイトは日本遺伝子研究所にて、オリゴヌクレオチドの合成を行った。オリゴヌクレオチドの合成には、脱保護中の修飾塩基の損傷を恐れて、0.25 mol/L の 2-メルカプトエタノール / アンモニア水溶液にて脱保護を行うこととした。

アミダイト約 40mg から約 5 nmol の修飾オリゴヌクレオチドを合成することができた。得られた HPLC 精製後の PhIP 修飾オリゴヌクレオチドを MALDI-TOF・MS による分析を行ったところ、それぞれ m/z 7141, 6934 と理論値どおりであった。他の分子イオンピークは観察されないため、きわめて純度は高いと思われる (図 4)。

一方、オリゴヌクレオチドをキャピラリー電気泳動に供して純度を確かめたところ、2 種類のピークが観察されることがわかった。合成したオリゴが HPLC では単一ピークであるが、2 種類に分

かれる例は過去に報告がなく、これは PhIP 付加体の特殊な例である。

PhIP はグアニジン骨格部位の互変異性がよく知られており、代謝産物のグルクロン酸抱合においても、その互変異性が知られている。そのため、オリゴ内でも PhIP の図に示すような互変異体が存在しているものと思われる (図 5)。興味深いことに、この互変異体の存在割合はオリゴヌクレオチドによって異なっており、オリゴ 1 では互変異化合物の両者はほぼ同量存在しているがオリゴ 2 ではどちらかの異性体が他より 2~3 倍程度多くなっている。こうした異性体の存在が、ポリメラーゼの伸長反応にどのような影響を及ぼすかは興味深く、今後の検討課題である。

D. 考察

昨年度から続いてオリゴヌクレオチドの合成を行った。カラム分離の方法および試薬メーカー、合成メーカーを変更することで目的とするオリゴヌクレオチドを得ることができた。現在さらにオリゴヌクレオチドを合成中である。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) 高村 岳樹, 村上 湖都美, 小笠原 楓, 益谷 美都子 ポリ (ADP - リボース) 加水分解産物を用いた新規な DNA 損傷活性測定法の開発 日本環境変異原学会第 45 回大会(2016, つくば)
 - 2) 森 みずき, 伊藤 早紀, 長谷川 一貴, 佐藤 匠, 高村 岳樹 エチジウムプロマイド類縁体の変異原性及び構造活性相関 日本環境変異原学会第 45 回大会(2016, つくば)
 - 3)

H. 知的所有権の取得状況

なし

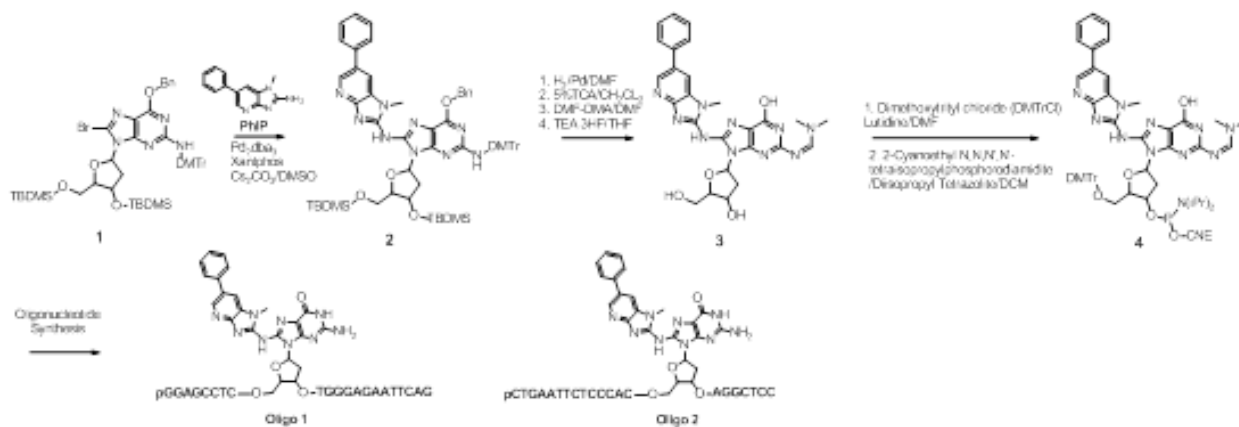


図3 PhIP 修飾オリゴヌクレオチド合成のスキーム

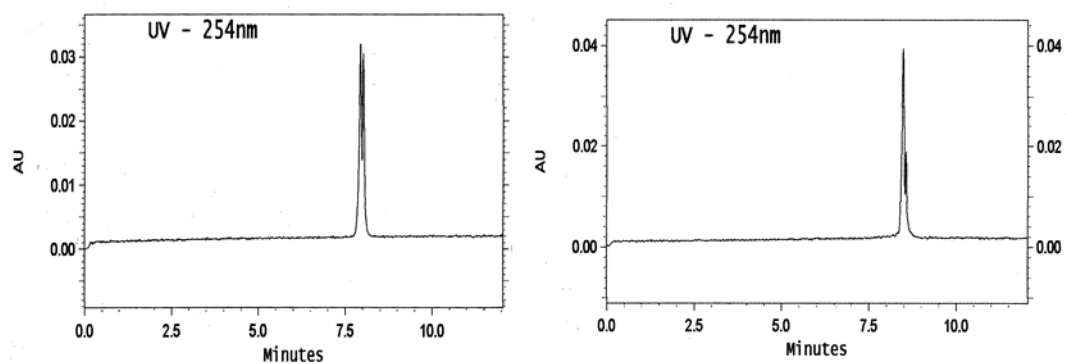


図4 キャピラリー電気泳動によるオリゴヌクレオチドの解析
(上)オリゴ1の結果 (下)オリゴ2の結果

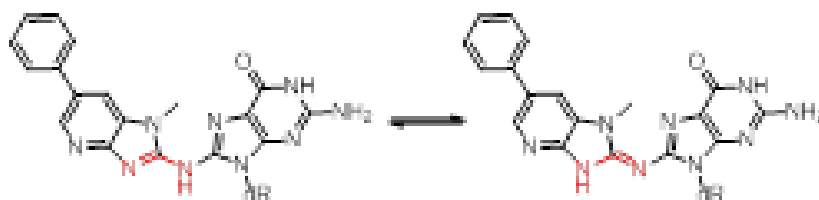


図5 PhIP の互変異性