

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 室長

**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 IQ (3-methyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinolin-2-amine) の DNA アダクトの合成を試みた。平成 27 年度において見出した Microwave を使用した Buchwald-Hartig 反応によって、保護 8-Br-dG に IQ を導入したが、精製の段階において順相条件では純品を得ることができなかった。そこで粗生成物の保護基 (DMTr 基および TBDMS 基) の脱保護を行い、生成した IQ 付加体を逆相 HPLC にて精製したところ、高い純度の IQ 付加体を得ることができた。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、当所変異遺伝部安井らが開発した 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、出発原料である 2'-デオキシグアノシン (dG) 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。また、保護・脱保護の繰り返しによるステップ数の増加は、収率の低下にもつながるため、できるだけステップ数を短縮することが重要となる。私は平成27年度において、6位無保護のdGに対してBuchwald-Hartwig反応条件(Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, Xantphos, 炭酸セシウム)にTHFを溶媒としてさらにmicrowaveを用いることで2-aminofluorene(9*H*-fluoren-2-amine, Figure 2)やMeIQx(3,8-dimethyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoxalin-2-amine, Figure 2)を導入することが可能であることを示している。その結果、既存の合成スキームにくらべて2ステップ分の短縮が可能となった。そこで本研究では本手法の有効性を確認するため、IQ(3-methyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinolin-2-amine, Figure 2)の付加体合成(dG-C<sup>8</sup>-IQ)への検討を行った。

## 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)および逆相分取LCMS(島津社製 MS 検出器; prepLCMS-2010EV)を用いた。逆相系の溶媒としてはA: 0.2 M HCOONH<sub>4</sub>, B: CH<sub>3</sub>CNを用いた。

Microwave 照射装置には Initiator (Biotage) を用いた。

<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR スペクトルは ECZ600 (プロトン共鳴周波数 600MHz (JEOL)) を用いて測定した。溶媒には CDCl<sub>3</sub> または DMSO-*d*<sub>6</sub> を用い、化学シフトは TMS を内部標準として用いた。

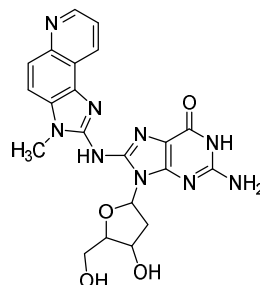
分析用 LCMS は島津 IT-TOFMS (LC 部分: システムコントローラ CBM-20A, ポンプ LC-20A, カラムオープン CTO-10AC, UV/フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M20A) を用いて測定した。カラムは CAPCELL PAK C18 MGII 5μm, 2.0 x 35 mm (SHISEIDO) を用いた。溶媒は A: 0.1%

HCOOH/H<sub>2</sub>O, B: 0.1% HCOOH/CH<sub>3</sub>CN (いずれも関東化学) を用いた。

### 2. 合成

#### 1) dG-C<sup>8</sup>-IQ (12) 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), IQ (22.1 mg, 0.1 mmol), xantphos (30.2 mg, 0.05 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (33.6 mg, 0.1 mmol), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (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。上記の反応を繰り返して得られた粗生成物(約 350mg)を 5 ml の 3% TCA/DCM に溶解し, 室温にて 4 時間撹拌した。ここにトリエチルアミン 150 ul を添加して中和し, 更に TEA · 3HF 600 ul を添加して終夜撹拌した。固体が析出してきたことを確認し, 溶媒を減圧留去した。固体を DMSO に溶解し, 逆相 HPLC にて該当画分を凍結乾燥した。白色固体を少量の水に溶解し, 析出してきたオレンジ色の固体を桐山ロートで一旦濾取し, 濾液を捨てた後にさらにメタノールでオレンジ固体を溶解し, この溶媒を減圧留去したところ, 白色固体とオレンジ固体の混ざりが得られた。ここに少量の水を注ぐと両固体は溶解したので, SepPak (5g) にロードし, 水で洗浄した後にメタノールで溶出した。着色したメタノール画分を減圧留去したところ白色固体は見られず, オレンジ固体が得られた。33 mg の化合物 12 (黄色固体) を得た。



<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.98 (s, 1H), 8.78 (m, 1H), 8.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.54 (dd,

$J = 8.4, 4.2$  Hz, 1H), 6.52 – 6.42 (m, 3H), 4.50 – 4.45 (m, 1H), 3.78 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.66 (m, 1H), 3.31 (m, 1H), 2.04 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  154.62, 153.83, 153.23, 149.73, 149.12, 148.31, 145.08, 131.18, 129.64, 128.99, 122.29, 121.34, 118.25, 113.72, 104.60, 90.58, 87.91, 82.45, 71.84, 62.86, 40.56, 40.44, 40.30, 40.17, 40.03, 39.89, 39.75, 39.61, 36.36, 29.12.

MS (ESI+)  $m/z = 463$  [M + H]<sup>+</sup>

## C. 結果と考察

### 1. dG- $C^8$ -IQ 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。前年度で検討した MeIQ<sub>x</sub> 付加体 (dG- $C^8$ -MeIQ<sub>x</sub>) の合成ルートを Scheme 1 に示す。一般的な dG 付加体合成ルートは、6 位の O を Bn で保護するが、前年度、特にキーとなる反応である Buchwald-Hartwig 反応について、6 位 O が無保護の状態である化合物 4 を用いて条件検討を行ったところ、溶媒を THF とし、microwave を用いることで MeIQ<sub>x</sub> を導入することが可能であることがわかった。そこで本年度は導入するヘテロサイクリックアミンを IQ に変更して、条件検討を行った。まず、化合物 4 に対して IQ 2 当量、xantphos 1 当量、炭酸セシウム 2 当量、Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> 0.2 当量、溶媒を THF とし、microwave 照射下、100 °C、6 時間で反応を行ったところ、目的化合物 5 が生成していることを LCMS にて確認した。原料 4 が数%残っていることが確認されたが、反応時間を延長しても変化がなかったため、反応は終了したと判断した。不溶な触媒を濾過し、溶媒を減圧留去し順相クロマトグラフィーにて精製を行った。TLC で確認できたスポットを含む画分を集め、その溶媒を留去し、得られた固体の構造を NMR にて確認したところ、大量の不純物が含まれており、生成物 5 のシグナ

ルを確認することが困難であった。この不純物は xantphos の酸化体や触媒由来の dba などであると考えられる。少量を逆相 LCMS に供したところ、目的化合物 5 の分子量が確認されたため、複数回の精製作業で純度を高めることができると考えたが、改善されなかった。そこで、逆相条件での精製を検討したが、化合物の疎水性が高く、溶解する溶媒が見当たらなかった。そこで、化合物の脱保護を行い、水溶性を高めてから逆相 HPLC にて精製することを考えた。そこで合成ルートの再検討を行った。新たな合成ルートを Scheme 2 に示す。当初予定していた合成ルート (Scheme 1) では、順相カラムによる精製を前提としていたため、各ステップで得られる化合物の疎水性は高い。そのため 3', 5' 位を TBDMS で保護した化合物 6 を DMF-DMA で処理して化合物 7 を得た後に 3', 5' 位を脱保護して化合物 8 を得た。化合物 6, 7 は水溶性官能基である OH 基が保護されているため、親水性が低い。そのため、順相カラムによる精製が容易であった。一方、逆相 HPLC による精製は、化合物の親水性が高いほうが望ましい。そのため 3', 5' 位を脱保護して OH 基が露出した化合物 12 を経由して化合物 8 を得ることとした。化合物 12 は比較的親水性が高いため、逆相 HPLC による精製が容易になると考えた。

予備的検討により、DMTr 基をトリクロロ酢酸 (TCA) で処理した後に、トリエチルアミン (TEA) で一旦中和し、そのままフッ化物を添加することで脱シリル化することが可能であった。そこで Buchwald-Hartwig 反応を複数回繰り返して得た粗生成物 5 約 300mg をまとめて反応にかけ、化合物 12 の粗生成物を得た。逆相 HPLC で精製するために化合物 12 を溶解する溶媒を検討したところ、水、アセトニトリル、メタノール等では沈殿が生じたため不適切であり、DMSO が最適であることがわかった。また逆相 HPLC での精製は通常は HCOOH や TFA を 0.1% を含む酸性条件 (pH2.5 程度) の溶媒を用いるが、化合物が酸に

対して不安定である可能性を考え、0.2M HCOONH<sub>4</sub> を用いて中性条件による精製を行った。化合物 12 の分子量を指標に得られた画分を凍結乾燥したところ、白色固体が大量に析出したことから、HCOONH<sub>4</sub> が揮発せずに析出したと考えられた。そこで、少量の水を添加したところ白色固体は溶解し、オレンジ色の固体が析出した。このオレンジ色個体を桐山ルートで濾取し、少量の水で洗浄しようとしたところ、一部固体が溶解した。以上の状況から、化合物は塩析により析出しており、この濾液にはギ酸アンモニウムが含まれていると考えられたので、この濾液を捨てた後に大量の水およびメタノールでオレンジ色固体を溶解し、溶液を減圧留去後、再度少量の水に溶解し、SepPak C18 cartridge にロードし、大量の水で洗浄後、メタノールで抽出した。メタノールを減圧留去したところ、オレンジ色の固体(30mg)を得た。これを NMR にて構造を確認したところ、化合物 12 であることを確認した。

#### 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最終目標として、そのキーとなる反応である Buchwald-Hartwig 反応に着目し、その反応条件の検討を行った。前年度は MeIQ<sub>x</sub> を用い、本年度は IQ を用いて検討したところ、IQ の場合、順相条件での精製作業で目的化合物を単離することができなかった。反応系中には xantphos やその酸化体、触媒に含まれる dba などが含まれており、それらを取り除くことが出来なかったとかがえられる。そこで合成ルートを再考し、逆相 HPLC を使って化合物を単離することとしたところ、約 30mg の化合物を得ることに成功した。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).

#### 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

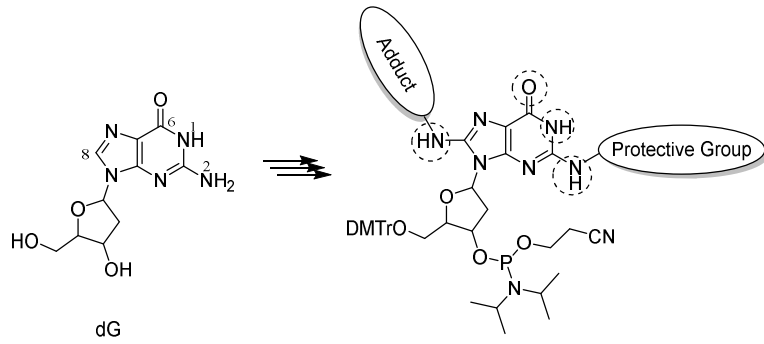


Figure 1 dG (2'-deoxyguanosine) および , ホスホロアミダイト体の構造

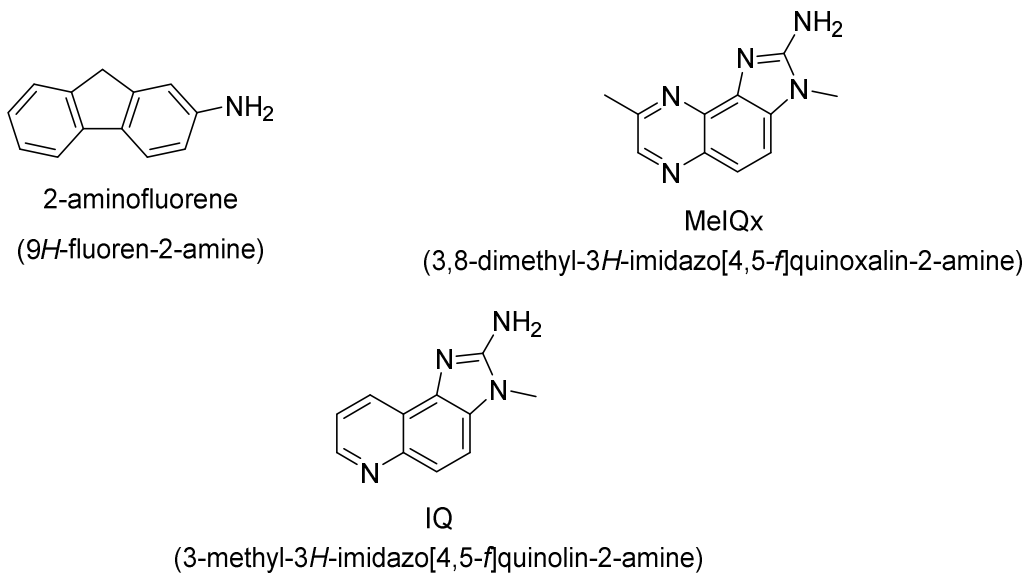
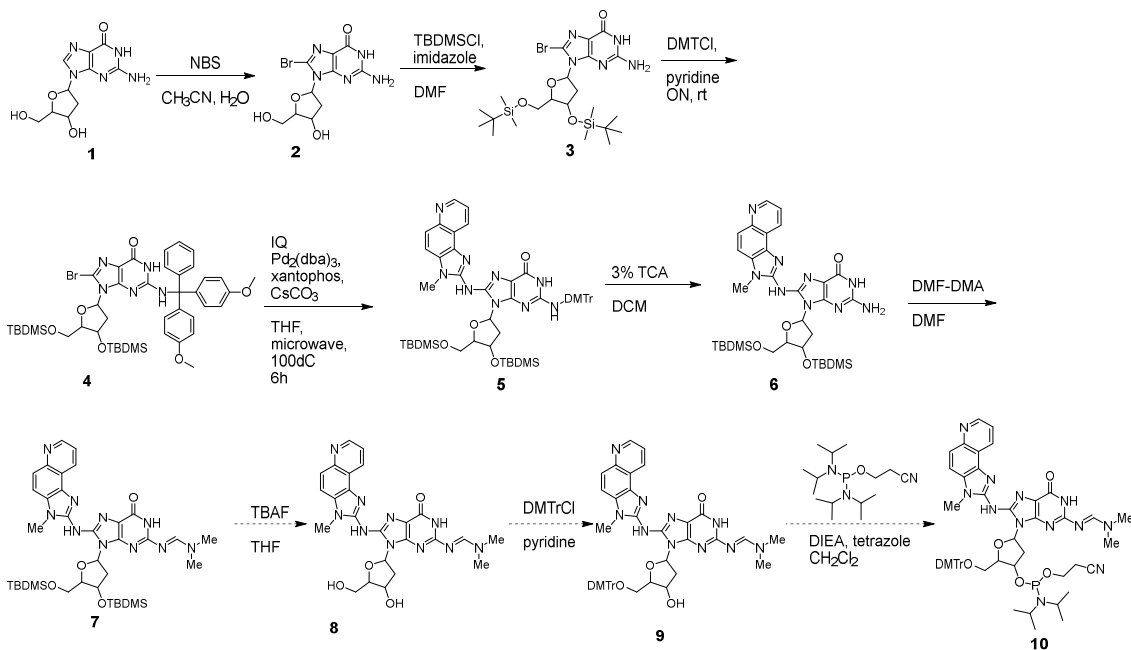
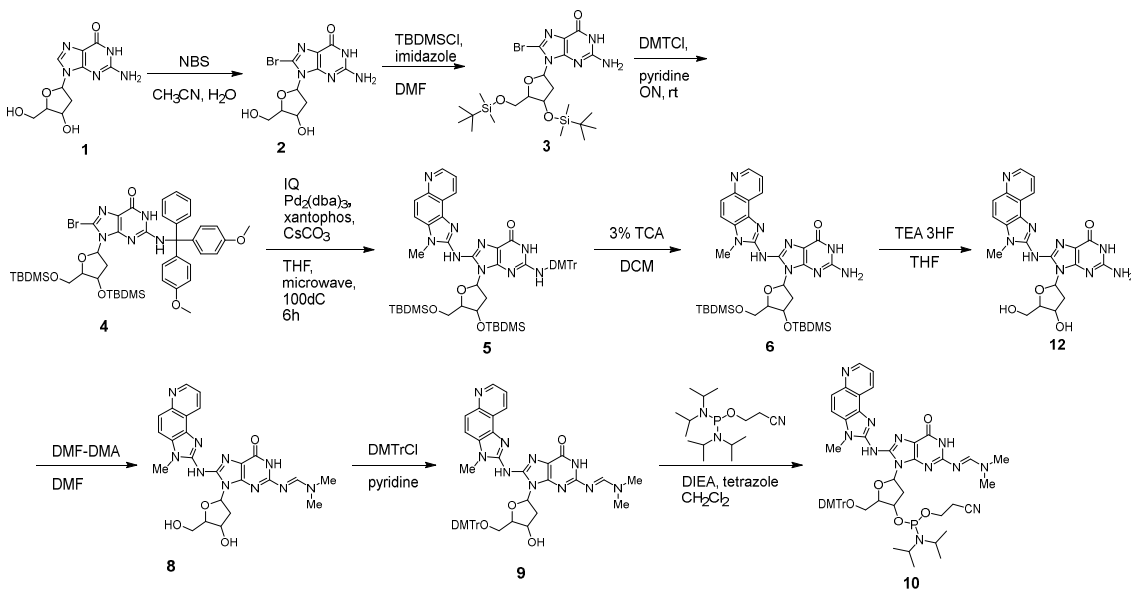


Figure 2 本研究で取り上げたヘテロサイクリックアミンの構造

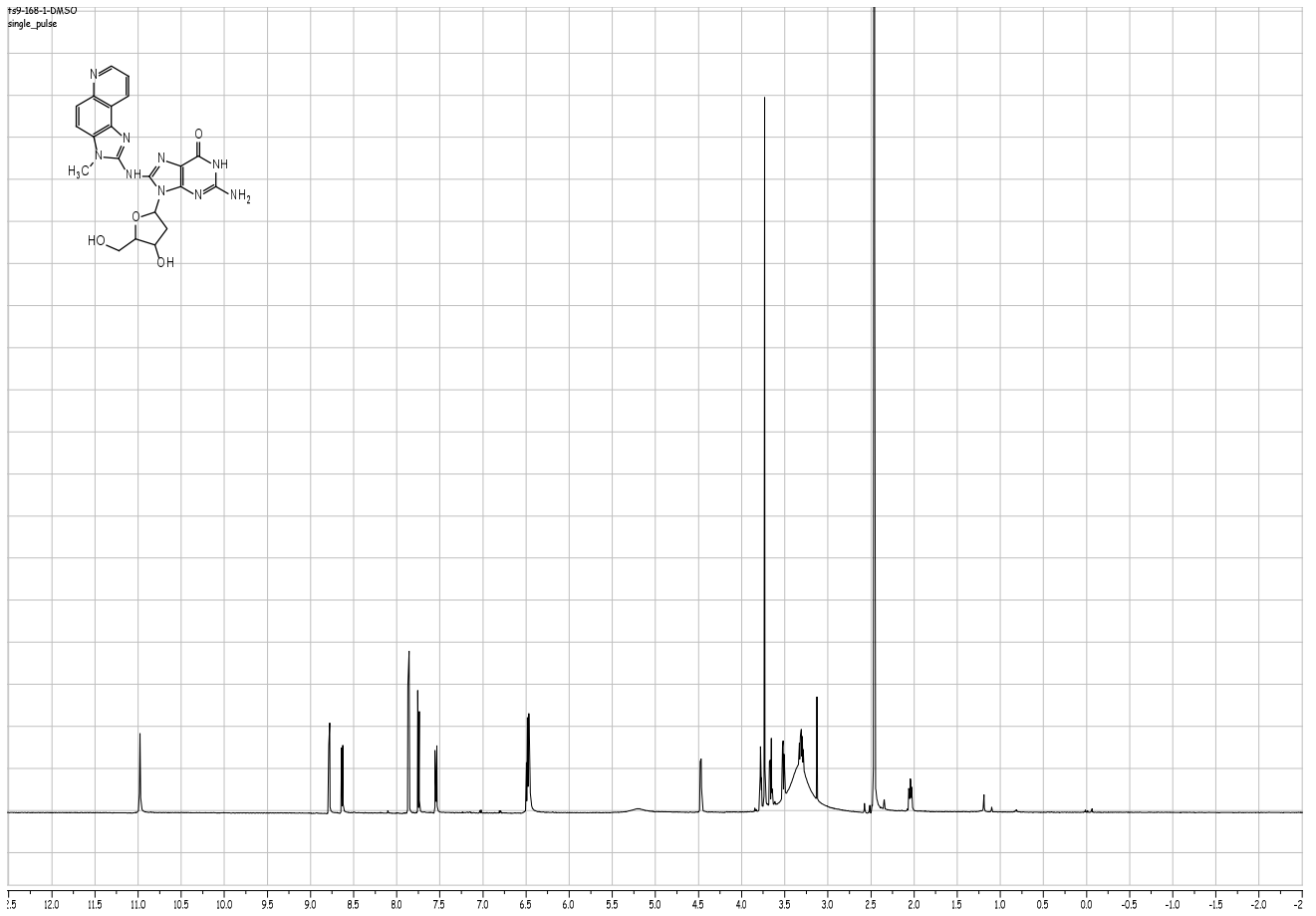
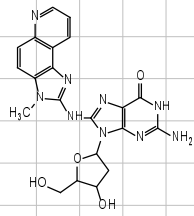


Scheme 1 dG-C8-MeIQx アダクトの合成スキーム.



Scheme 1 dG-C8-AAF の合成ルート

F99-166-1-DMSO  
single\_pulse



F99-166-1-DMSO  
single\_pulse decoupled gated NOE

