

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

分担研究者： 高村 岳樹 神奈川工科大学工学部教授

## 研究要旨

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。昨年度と同様の方法で合成を試みているが、脱トリチル基後の反応の停止処理 ( Workup ) 方法によっては、トリチル基の再結合が観察された。より効率的な脱トリチル基の方法が望まれる他、脱ベンジル保護を先に行うほうが、アミノ基の塩基性が下がるため、脱離しやすいことが考えられるため、脱保護の方法による影響についても今後検討する必要がある。一方、ベンゾピレン ( BaP ) の付加体合成では、ピレノールから始める合成が適しており、ジオールエポキシサイドの合成までの方法論が明らかになった。既知文献とは、反応条件を異なることがあるため、さらに詳細に反応条件の検討を行っていく。また C8,N2 の付加体の他、O6 の付加体の代表である、O6 - グリコール酸 - dG の付加体の合成を進めた。ミツノブ反応による O6 位の付加体生成反応では、不純物との分離が困難であり、またアミダイトの 1 つ手前の合成ステップにおいても、不純物との分離が困難である結果となった。これにおいても、他の方法論が必要であるが、ベンゾトリアゾールを用いる不可体生成反応は進行しなかったため、他の方法を現在、検討中である。

## 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。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おこなった。また並行して、加熱食品の加熱時に生成する可能性のある発ガン性物質ベンゾピレンが dG に付加した dG-N2 付加体の別途合成方法の開発、さらに、O6 位にグリコール酸 (GA) 修飾した付加体 dG-O6-GA の合成を試みた (図 2)。これはグリシンが生体内でニトロソ化された場合に生成する付加体である。

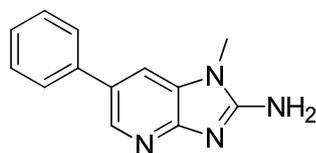


図 1 PhIP の化学構造

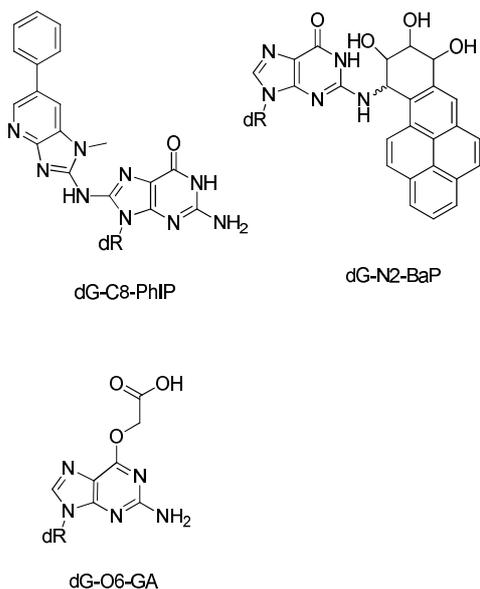


図 2 各種 dG 付加体の化学構造

## B. 研究方法

昨年度の同様の方法で、dG-C8-PhIP のアミダイトの合成を試みているが、合成の困難さも有

り、現時点ではオリゴヌクレオチドまで合成できていない。PhIP で修飾された dG-C8-PhIP のアミダイトまではあと少しの行程であるが、昨年度までの合成時と若干、反応性が異なることが明らかになっており、その原因について検討が必要である。またベンゾピレンの付加体については付加体反応の手前までの合成を行った。また GA 付加体については、定法により合成を進めた (図 3)。

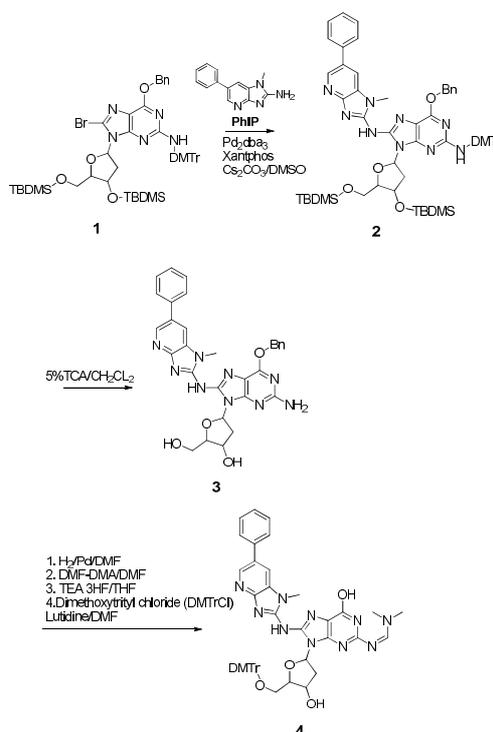


図 3 PhIP 修飾オリゴヌクレオチド合成のスキーム

(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 位のブロモ体(8-Br-dG)誘導体の合成からはじめた。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た。しかしながら

この反応が十分に進行せず，原料を回収することが多かったため今後，改良が必要であることがわかった。また保護を行った dG 誘導体は PhIP との Buchwald アミノ化反応をもちいて反応させた。得られた付加体誘導体を，トリクロロ酢酸を用いて脱保護を行ったが，反応が進行するもの，Workup 後にトリチル基が再結合して，目的とする化合物が得られていないことが多く見られた。トリチルカチオンの再結合は，生成したトリチルカチオンが十分に分解されていないために生じる現象であるが，これまでの Workup 方法では不十分であることが判明した。一方で，トリチル基が存在したままでも O6 位のベンジル基は Pd black 存在下，水素添加反応により，脱保護可能であることが判明したため，今後脱保護の方法論も含めて検討を行う予定である。現在，目的とするアミダイトの前段階の化合物まで合成が終了しているが，量的に不足しているため，大量に合成を進めている。

一方，ベンゾピレンの dG 付加体では，既報が存在しているため，それに従って合成を進めている。既存のピレンアルコール 5 を脱水する反応では，トルエンスルホン酸をもちいて脱水させ，2 重結合を生成させた。得られた化合物 6 を，ベンゼン溶媒中で I<sub>2</sub> と安息香酸銀を用いる Prévost 法によりトランス 1,2 グリコールを生成した。これにはいくつかの合成方法を検討したが，反応混合物を光から保護し，室温で約 1 日，攪拌させた後に 1 時間還流させる方法で合成を行うと収率（80%）よく目的化合物 7 が得られることがわかった。得られた化合物は DDQ を用いて酸化反応を行い，目的化合物 8 を得ることが出来た（図 4）。今後，脱保護の後にジオールエポキシサイドに変換し，付加体を合成する予定である。

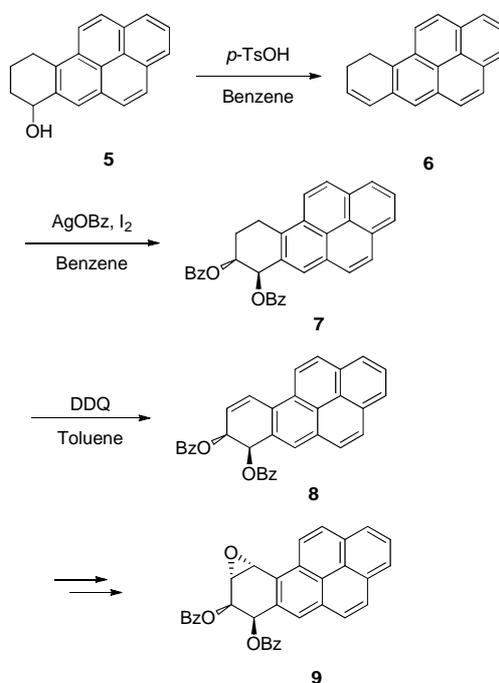


図 4 DDQ を用いたベンゾピレンの dG 付加体の合成

また dG-O6-GA の合成は，グリコール酸メチルとシリル保護した dG をミツノブ反応より合成して得るルートで行った(図 5)。しかしながら，目的化合物と，使用している Triphenylphosphine 由来の反応複製生物の分離が極めて困難であり，カラム数回後にも，目的物質を単離することが困難であった。次の脱シリル反応により，目的とする化合物を得ることが出来た。得られた化合物は N2 位のアミノ基をアミジン保護をし，さらにオリゴヌクレオチドで用いられる通常のトリチル保護を行った。目的とする化合物は得ることが可能であったが，HPLC で確認したところ，不純物と混ざった化合物であり，これは通常のカラム精製では単離できないことがわかった。そのため，まず dG の benzotriazole 誘導体を bis(dimethylamino)methylene]-1H-benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate と DBU を用いて生成させ，さらに methyl glyoxylate と反応させる方法を試みたが，目的とする化合物は得ることが出来なかった。そのため，今後，別の方法にて目的とする化合物を得る予定である。

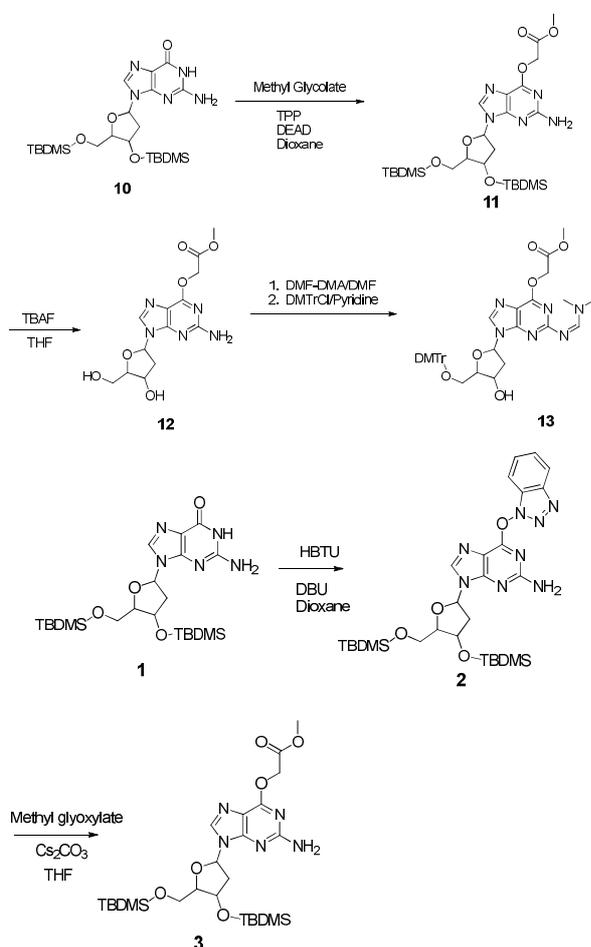


図5 *O*<sup>6</sup>-グリコール酸-dG付加体の別途合成スキーム

#### D. 考察

昨年度から引き続き、修飾オリゴヌクレオチドの合成を行っているが、反応性の相違から、目的とするものまでまだ合成が終了していない。引き続き効率な方法論の検討をおこなう。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Hashimoto, Akiko; Yamanaka, Takehiro; Takamura-Enya, Takeji, (2017) Synthesis of novel fluorescently labeled water-soluble fullerenes and their application to its cellular uptake and distribution properties Journal of Nanoparticle Research, 19: 402
2. Kazuo Someya, Hiroko Nakatsukasa, Minako Ito, Taisuke Kondo, Kenn-ichi Tateda, Takashi Akanuma, Ikuko Koya, Tsukasa Sanosaka, Jun Kohyama, Yu-ichi Tsukada, Takeji Takamura-Enya, Akihiko Yoshimura, (2017) Improvement of Foxp3 stability through CNS2 demethylation by TET enzyme induction and activation International Immunology, 29: 365-375

##### 学会発表

1. ナノダイヤモンド-臭化エチジウム複合体の細胞毒性評価, 森みずき・高村 岳樹 日本化学会 第98春季年会 (2018, 船橋)
2. 蛍光フラーレンの合成と評価. 01.口頭A講演. 橋本 亜紀子・山中 岳寛・高村 岳樹 日本化学会 第98春季年会 (2018, 船橋)

#### G. 知的所有権の取得状況

なし