

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：出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 部長
研究協力者：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 MeIQx (3,8-dimethyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoxalin-2-amine) および IQ (3-methyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinolin-2-amine) の DNA アダクトの合成における Buchwald-Hartig 反応のリガンドや溶媒、反応時間等を検討するとともに、さらにステップ数を削減するべく、2 位無保護における反応条件を検討した。

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¹⁾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。本研究では平成 27 年度において、6 位無保護の dG に対して Buchwald-Hartwig 反応条件 (Pd₂(dba)₃, 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た。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。平成 28 年度は、IQ (3-methyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinolin-2-amine, Figure 2) の付加体合成 (dG-C⁸-IQ) への検討を行った。本年度は上記の反応のリガンドや溶媒、反応時間等を検討するとともに、さらにステップ数を削減するべく、2 位無保護における反応条件を検討した。

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 HCOONH₄, B: CH₃CN を用いた。

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

¹H NMR, ¹³C 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 CDCl₃ または DMSO-*d*₆ 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/H₂O, B: 0.1% HCOOH/CH₃CN (いずれも関東化学) を用いた。

2. 合成

1) dG-C⁸-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), Cs₂CO₃ (33.6 mg, 0.1 mmol), Pd₂(dba)₃ (10.6 mg, 0.01 mmol) を添加し、microwave 照射下、100 °C, 6h 撹拌した。上記反応条件をもとに、溶媒 (DMSO, DMF, toluene 等), リガンド (JohnPhos, SPhos, XPhos, DavePhos 等, figure 3), 塩基 (t-BuOK, NaPO₄ 等), 触媒, 反応時間, 量比等を検討した。

C. 結果と考察

1. dG-C⁸-IQ 付加体の合成

ヘテロサイクリックアミン (Heterocyclic amine, HCA, Figure 2) 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。初年度で検討した MeIQx 付加体 (dG-C⁸-MeIQx) 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、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 MeIQx を導入することが可能であることがわかった。そこで次年度は導入するヘテロサイクリックアミンを IQ に変更したところ、目的化合物が生成していることを確認できたが、リガンド由来の不純物が含まれており、単離にはいたらなかった。そこで精製に関する各種検討を行い、最終的に 3'位, 5'位を脱保護し、逆相 HPLC による精製を行い、3'位, 5'位無保護の化合物を得ることとなった。そこで本年度は、反応条件の最適化を目指し、6 位無保護 IQ 付加体合成時における Buchwald-Hartwig 反応の

溶媒 (DMSO, DMF, toluene 等), リガンド (JohnPhos, SPhos, XPhos, DavePhos 等 figure 3), 塩基 (t-BuOK, NaPO₄ 等), 触媒 (Pd₂(dba)₃, Pdacac 等), 反応時間, 量比, microwave のありなし等を検討した。しかしながら, いずれの条件も, 反応が集結しない (目的化合物と原料が混在する), リガンドが残存する (順相クロマトグラフィーで最初のフラクションから最終フラクションまでリガンドが出続ける) 等により, 結果として, 初期に見出した条件 (十分に窒素置換した THF, microwave 照射下, 2 等量のアミン, 20-30mol% の Pd₂(dba)₃, 塩基として 2 等量の Cs₂CO₃, リガンドとして 1 等量の Xantophos) の組み合わせを上回る条件を見出すことができなかった。Buchwald-Hartwig 反応は芳香族ハロゲン化物とアミンをパラジウム触媒と塩基の存在下で結合させ, 芳香族アミンを生成する, いわゆるクロスカップリング反応である。今回用いたヘテロサイクリックアミン類は比較的高い構造を有しており, そのため, 触媒やリガンドの構造的特徴の影響を受けやすいと考えられる。Xantophos は 2 つのベンゼン環それぞれに, パラジウム触媒に配位するリン原子があり, 二座でパラジウムに配位するのが特徴である。一方で検討に用いたリガンドはリン原子を一つ有するものあったことから, 今回の化合物のようにヘテロサイクリックアミン類には二座配位が可能なりガンドが有利であることが考えられる。二座配位型のリガンドとしては DPEphos, Homoxantphos, Phosxantphos, Sixantphos, Thixantphos, N-xantphos など³⁾ (Figure 4) があり, これらのリガンドを検討することで, リガンドの構造と反応性についての関係性が明らかになると考えられる。

また, さらに合成ルートの短縮化を目指し, 2, 6 位無保護 (化合物 3) による Buchwald-Hartwig 反応を検討した (scheme 2)。この場合, 合計ステップ数が 7 ステップとなり, 一般的な合成ルートより 4 ステップ分短くなるため, 合成工程の短

縮が見込まれた。しかしながら様々なリガンドにて検討したところ, LCMS および TLC で反応生成物が確認できたものもあったが, 十分な収率で目的化合物を得ることができなかった。

Microwave の影響については, どちらについても microwave を用いるほうが反応性の向上が認められた。一般的な SN₂ 反応で, 同様の傾向が見出されており⁴⁾, Buchwald-Hartwig 反応においても microwave が有用であることがわかった。今後, 反応時間や照射パワーの検討などを行い, より最適な反応条件を見出すことで, 反応収率の向上を目指す必要がある。

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 8 位に対する Buchwald-Hartwig 反応に着目し, その反応条件の検討を行った。

MeIQx と IQ は一部構造が異なることから (MeIQx; 8 位 CH₃, 9 位 N; IQ; 8 位 H, 9 位 C), その物性 (溶媒への溶解性等) が異なることが考えられ, その DNA 付加体も実際に溶媒への溶解性が異なっており, 同一の精製条件を用いることができなかった。本年度は, 6 位無保護での IQ 付加体合成時における Buchwald-Hartwig 反応の溶媒 (DMSO, DMF, toluene 等), リガンド (JohnPhos, SPhos, XPhos, DavePhos 等), 塩基 (t-BuOK, NaPO₄ 等), 触媒, 反応時間, 量比等を検討した。しかしながら, 初期の反応条件を凌駕するほどの効率的な反応条件を見出すことができなかった。また, 反応工程の短縮を目指し, 2 位無保護による Buchwald-Hartwig 反応を検討した。様々なリガンドにて検討したところ, LCMS および TLC で反応生成物が確認できたものもあったが, 十分な収率で目的化合物を得ることができなかった。Buchwald-Hartwig 反応のリガンドは現在でも様々な構造の化合物が開発

されており，今回の検討でもすべてを網羅したものであるのではない．今後も継続的に検討を行い，より最適な反応条件を見出すことが必要である．

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 acetylamino adducts of 2'-deoxyguanosine suitably protected for DNA synthesis. *Org Lett*, **4**, 4205-4208 (2002).
- 3) Birkholz MN, Freixa Z, van Leeuwen PWNM: Bite angle effects of diphosphines in C-C and C-X bond forming cross coupling reactions. *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 1099-1118 (2009).
- 4) Gedye R, Smith F, Westaway K, Ali H, Baldisera L, Laberge L, Rousell J: The use of microwave oven for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **27**, 279-282 (1986).

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

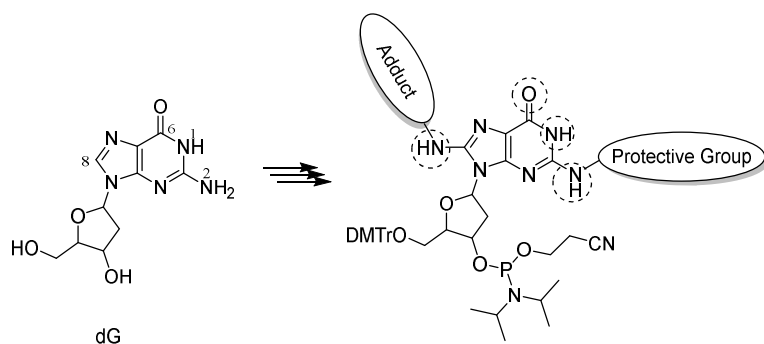


Figure 1 dG (2'-deoxyguanosine) および , ホスホロアミダイト体の構造

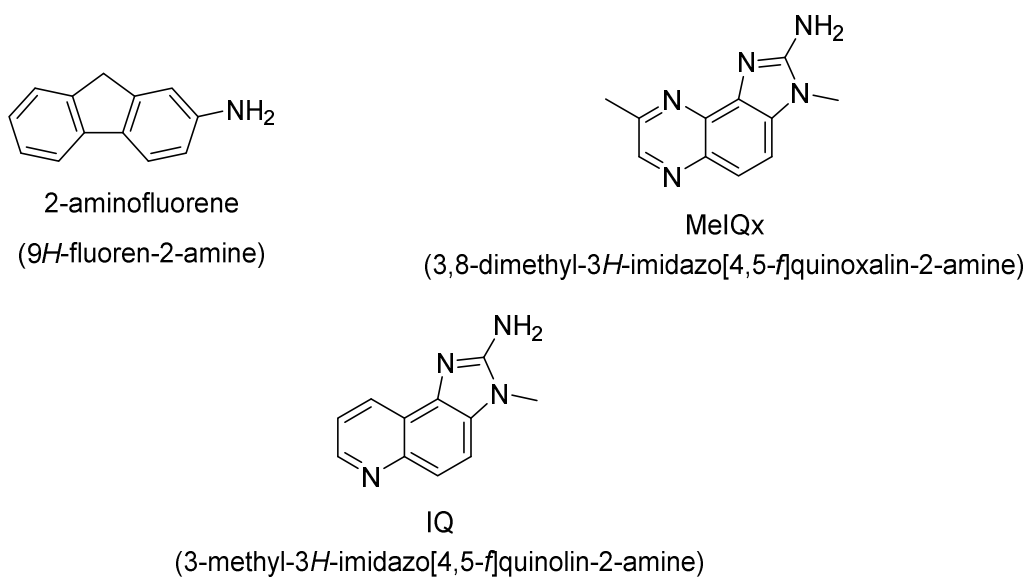


Figure 2 本研究で取り上げたヘテロサイクリックアミンの構造

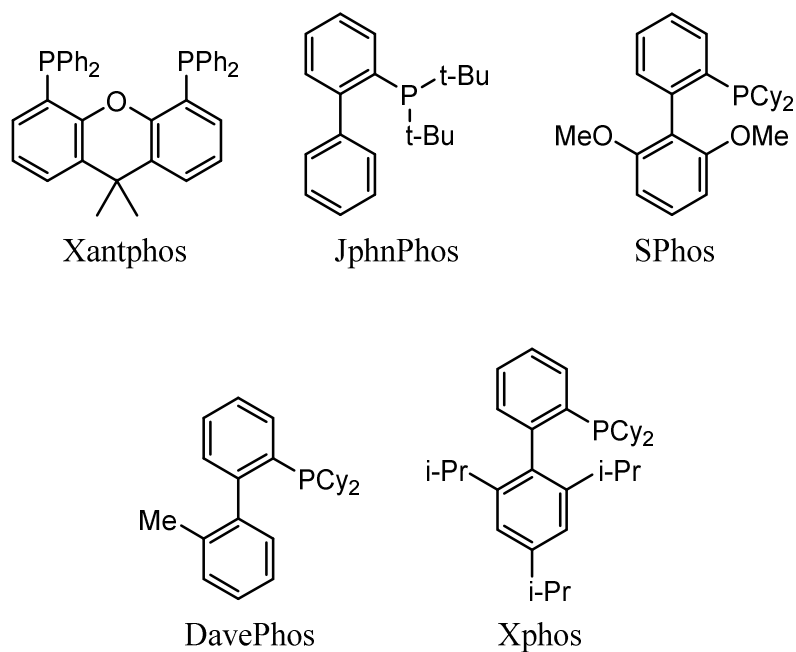
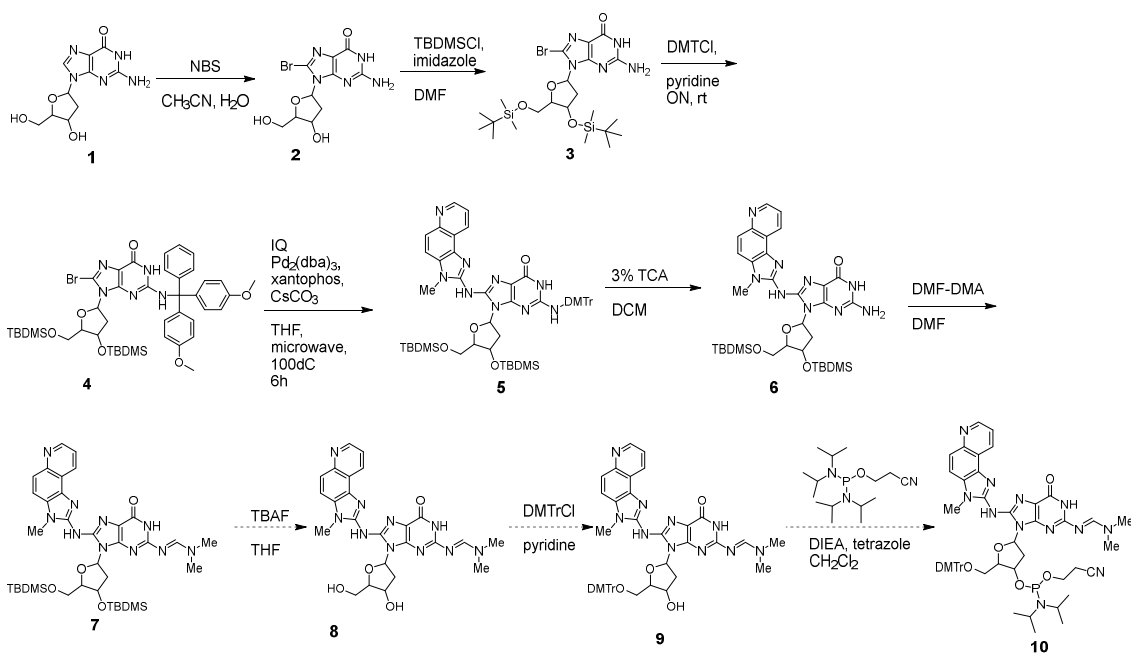
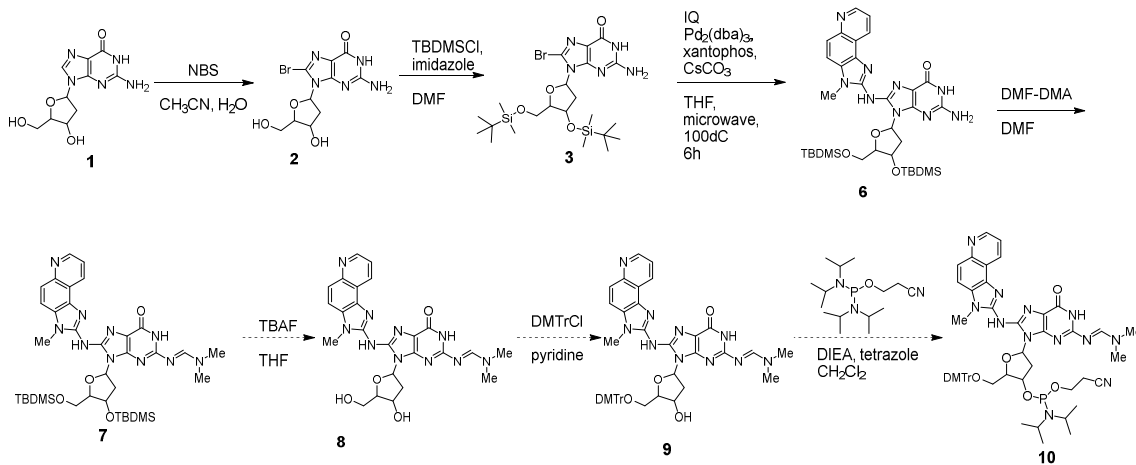


Figure 3 本研究で検討したリガンドの構造



Scheme 1 dG-C8-MeIQ_x アダクトの合成スキーム(6位無保護). 合計9ステップ



Scheme 2 2位および6位無保護における合成スキーム（合計7ステップ）

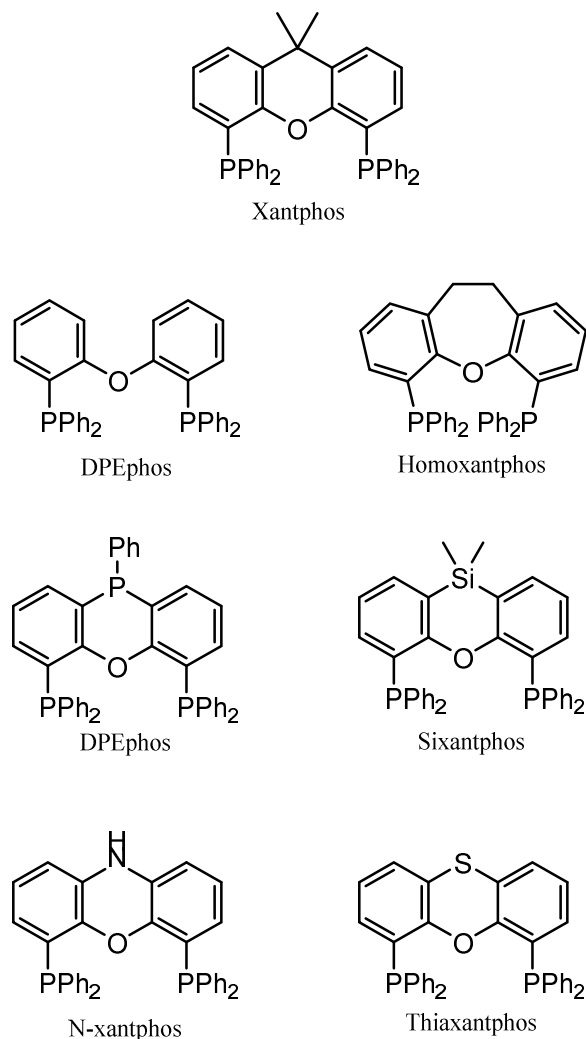


Figure 4 xantphos 型リガンド