

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K13736

研究課題名(和文) 疾病研究に資するポリADP-リボース高精度化学合成法の構築

研究課題名(英文) Fine chemical synthesis of poly(ADP-ribose) for disease studies

## 研究代表者

岡本 晃充 (Okamoto, Akimitsu)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：60314233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画は、平成27年度のみ単年度研究であり、期間内に効率的なPAR化学合成工程を確立した。短期間なので、まずは直鎖状PARの合成に集中し、最適な反応条件を探索した。DNA固相合成法の一つであるホスホロアミダイト法に準拠して、PAR化学合成法を構築した。リボシルアデノシンは、連結予定部分の水酸基を弱い酸条件で加水分解可能なジメトキシトリチル基で保護し、その他の水酸基・アミノ基は担体からの切り出しの工程で同時に脱保護可能なベンゾイル基で保護した。他にも、スターターとしてのリボースとキャッピングとしてのアデノシンの保護体も用意した。PAR合成サイクルを経て、PAR二量体を得た。

研究成果の概要(英文)：This research project was carried out for a year in FY2015. In this year we established the efficient synthetic process of poly(ADP-ribose). Because of the short research term, we concentrated to the synthesis of a linear poly(ADP-ribose) and explored the best suited reaction conditions. Based on a phosphoramidite process, one of DNA solid support synthesis, we created a new chemical synthesis of poly(ADP-ribose). Ribosyladenosine was protected with a dimethoxytrityl group for a hydroxy group to be linked with another building block and benzoyl groups for the other hydroxy groups. In addition, a ribose unit for a starter and an adenosine unit for a capping were also prepared. We obtained a ADP-ribose dimer through a synthetic cycle.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ポリADP-リボース 化学合成 固相合成

### 1. 研究開始当初の背景

がんやコレラのような重篤な疾病を制御するタンパク質修飾として、ADP-リボシル化が知られている。ポリ ADP-リボース合成酵素 (PARP) により触媒されてタンパク質に ADP-リボース残基を重合するとポリ ADP-リボース (PAR) を生じる。タンパク質に大きな物性変化を与えて DNA 修復、遺伝子安定性の維持、細胞死および分化制御に強く作用する。

タンパク質の PAR の構造と機能について、細胞の発現レベルでは議論されているものの、分子レベルでの議論は断片的である。PAR を認識するタンパク質は、PARP および分解酵素 Parg や抗 PAR 抗体を除けばきわめて限られている。PAR が DNA 修復を誘起することから必ず PAR 認識タンパク質は存在するはずであるが、*in vitro* で実験することが容易でないためその単離は困難である。

正しく PAR の機能を理解するためには、正確な構造の PAR を用いる必要がある。しかし、酵素 PARP を用いて PAR を作製しようとする限り、様々な分岐や重合度を持つ PAR の混合物でしか得られず、1 種類の限定した構造の PAR を得ることはできない。任意の構造の PAR を純品で用意するには、合成化学的な工程を経る必要がある。

研究代表者は、化学合成を通して、ICON プローブや ECHO プローブのような DNA や RNA と反応する人工ヌクレオチドを含むイメージング人工核酸や電荷移動補助性人工核酸を連続導入した導電性人工核酸を創出した実績がある。したがって、修飾核酸の化学合成についてのノウハウが十分蓄積されている。このノウハウを、PAR の化学合成に活用する。

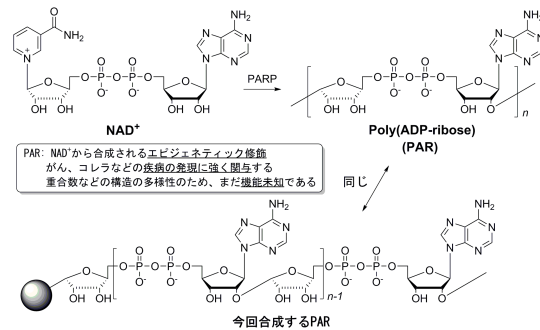
PAR の化学合成法が達成できれば、任意の単量体 ~ 90 量体の PAR を純品として得ることができる。この手法は、これまでの PAR の生物学的獲得法とは全く異なる斬新な方法であると言うだけでない。化学合成法が確立されれば、その生成物を用いて分子レベルでの PAR 研究の滞留が解消されると考えられ、正しく PAR 結合タンパクの機能評価を行うことができる。PAR および PARP の疾病への関与は、特に腫瘍、コレラ、百日咳に対して示唆されており、これらの疾病に対する分子メカニズムの解明に合成 PAR は役立つと思われる。

### 2. 研究の目的

これまででは、PAR の作製のために、基質として NAD<sup>+</sup>、合成酵素として PARP が用いられてきた。NAD<sup>+</sup>の利用は、不安定であること、修飾に不寛容であることなどから限界がある。DNA 化学合成法を応用して PAR の化学合成法を開発することによって、任意のサイズ・構造を有する PAR を得ることができる。この手法は、これまでの PAR の生物学的入手法とは全く異なる斬新な方法である

と言うだけでなく、生物学的手法の問題点をすべて解決する。化学合成法が確立されれば、その生成物を用いて、上記に挙げられた分子レベルでの PAR 研究の滞留が解消されると考えられる。

本研究課題では、ポリ ADP-リボース (PAR) の化学合成工程を確立する。加えて、任意のサイズ・構造の合成 PAR に非天然修飾を付与し、これらを用いて、化学標識 PAR の創出や PAR 認識タンパク質の捕捉へ研究を展開する。正しく PAR の機能を理解するためには、正確な構造の PAR を用いる必要がある。しかし、酵素を用いて PAR を作製しようとする限り、様々な重合度を持つ PAR の混合物でしか得られず、1 種類の PAR を得ることはできない。任意の構造の PAR を純品で用意するには、合成化学的な工程を経る必要がある。生物学的合成単位にこだわらないチャレンジングな基質設計をし、PAR 合成への DNA 化学合成系の転用によって斬新な PAR 入手法を提案する。

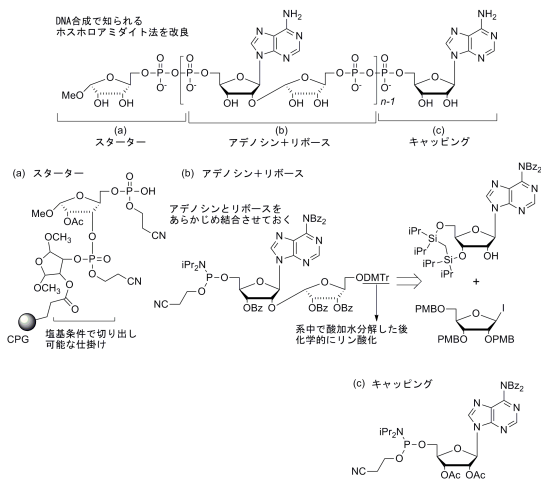


### 3. 研究の方法

まずは 1~30 残基からなる直鎖状 PAR および分岐 PAR の合成に集中し、今回提案する方法の有効性を確認する。本研究では、DNA 固相合成法の一つであるホスホロアミダイト法に準拠して、PAR 化学合成法を構築する。まず、用意するものは以下の通り。

- 反応容器：ポリプロピレン素材とし、上下に DNA 自動合成機の配管との接続口を有する。孔は、ビーズを通さないサイズのフィルターでふさぐ。
- 固相担体：粒径 50~200 μm、ポアサイズ 700~3,000 の Controlled Pore Glass (CPG) 「Universal Support」を用いる。表面は、ホスホロアミダイト法におけるアンモニア水で切り出し可能な化学修飾 (片方の水酸基がエステル保護された 1,2-ジオール) が施されている。この担体は反応容器内に封入される。
- 単量体：保護されたりボシルアデノシンを用意する。PAR のピロリン酸部分が単量体合成段階における反応条件や精製条件に脆弱な可能性があるため、本来の PAR の単量体である NAD<sup>+</sup> 単位を単量体とせず、ピロリン酸部位で順次結合を作っていく

工程を選択する。リボシルアデノシンは、連結予定部分の水酸基を弱い酸条件で加水分解可能なジメトキシトリチル基で保護し、その他の水酸基・アミノ基は固相担体からの切り出しと同時にアンモニア水で脱保護可能なベンゾイル基で保護する。他にも、スターターとしてのリボースとターミネーターとしてのアデノシンの保護体も用意する。分岐した PAR を作成するために、異なる保護基で保護された 2 つのリボシル基 (ジメトキシトリチル基とアリル基) がアデノシンに結合した分子も合成される。



#### 4. 研究成果

上記の反応容器及び固相担体を用意した。また、3種類の単量体、リボシルアデノシン、スターリーボースおよびターミネーターアデノシンを作成した。なお、リボシルアデノシンは、リボシルユニットとアデノシルユニットを各々保護し、1'位がヨウ化トリメチルシリルによってヨウ素化されたリボシルユニットと保護アデノシルユニットを縮合することによって 選択的に得ることができた。

合成されたリボシルアデノシン、スターリーボースおよびターミネーターアデノシンを用いて固相合成を試みた。試みられた反応手順は以下の通り。

i. 固相担体「Universal Support」へ、3'位からホスホロアミダイトリンカーを伸長したスターリーボースを縮合させた。縮合剤として、ベンジルチオテトラゾールを使用した。この縮合剤は、従来のテトラゾールに比べて、反応が選択的、高効率に進行することができた。

一定時間の反応の後、洗浄した。その後、mCPBA酸化を用いてリン(III)をリン酸エステルへ変換した。

ii. リボース末端のジメトキシトリチル基を酸加水分解によって除去した後、ホスホロアミダイトを加えて縮合させた。縮合剤として、ベンジルチオテトラゾールを使用

した。生成物を mCPBA 酸化しリン酸エステル末端へ変換した。

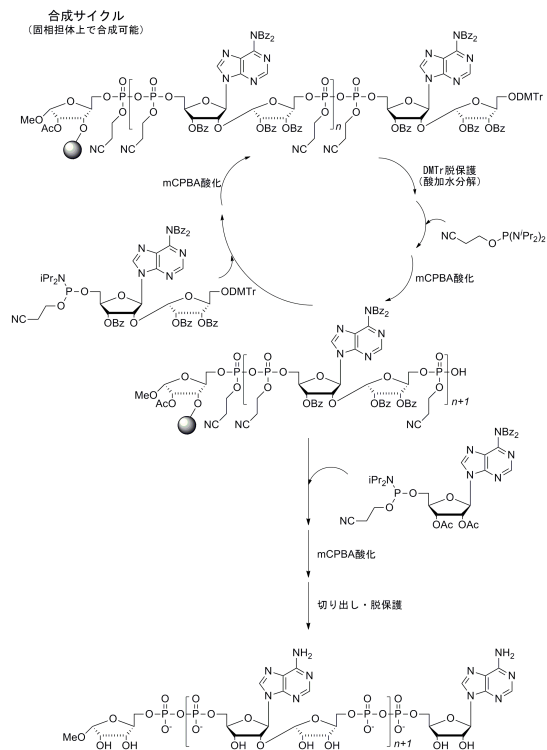
iii. アデノシン 5' 末端にホスホロアミダイト基を有するリボシルアデノシン誘導体を加えて縮合させた。縮合剤として、ベンジルチオテトラゾールを使用した。

iv. 生成物を mCPBA 酸化し、ピロリン酸へ変換した。

v. 最後の ii. の反応の後、ターミネーターとしての 5' 末端にホスホロアミダイト基を有するアデノシン誘導体を加えて縮合させた。縮合剤として、ベンジルチオテトラゾールを使用した。

vi. 最後にアンモニア水溶液を用いて、固相担体から化学合成 PAR を切り出すと同時に、すべての保護基を除去した。

現在、上記手順により、2 量体まで作成することができている。



#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

林 恭平、岡本 晃充、「ポリ ADP リボースの化学合成」、日本化学会第 96 春季年会、京都、2016 年 3 月 24 日 ~ 27 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

岡本 晃充 (OKAMOTO, Akimitsu)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号： 6 0 3 1 4 2 3 3