

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18831

研究課題名(和文) 生体中核酸系シグナル分子を標的とする水中での特異的捕捉反応プローブの開発

研究課題名(英文) Development of capture probes for the signaling nucleotide molecules in cells

研究代表者

淵 靖史 (FUCHI, Yasufumi)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：40748795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では活性窒素種によって生成する8-nitro-cGMPや8-thio-cGMPなどの核酸系シグナル分子を共有結合捕捉する低分子化合物を開発し、検出プローブや創薬リードへ展開することを目指している。まず申請者らが開発したモデル分子nitroG-Graspと8-thioG-Graspの反応性を向上させるために、新規誘導体を合成した。新規nitroG-Graspは中性の水溶液中でも高い反応性を示した。また8-チオグアノシンの新しい反応性を見出した。水中でのリン酸認識部位としてサイクレン-亜鉛錯体を選択して評価したところ、酸化損傷塩基8-oxo-dGTP検出分子として有用であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have been developing the novel molecular probes for the 8-nitro-cGMP or the 8-thio-cGMP as signal molecules formed by the reactive nitrogen species in cells. These probes with covalent reactivity in a cell condition may be available for a detecting tool or a drug candidate. We synthesized the new nitroG-Grasp and 8-thioG-grasp to increase the reactivity. Indeed, the new nitroG-Grasp molecule exhibited high reactivity in the neutral aqueous condition. We found an interesting character of 8-thioguanosine when the capture reaction was performed using the novel 8-thioG-grasp. The model compounds with the cyclen-zinc complex were synthesized due to recognize the phosphates in the water. These fluorescence metal complexes exhibited as a molecular probe for 8-oxo-dGTP.

研究分野：核酸化学

キーワード：捕捉分子 分子認識 酸化損傷塩基

1. 研究開始当初の背景

生体は常に活性酸素種や活性窒素種などの酸化ストレスに曝されており、DNAやRNAが化学的に酸化修飾されることで多くの疾患が引き起こされる。活性窒素により生成した酸化損傷塩基 8-nitro-cGMP は生体中のチオール基と反応して付加体を形成する性質 (S-グアニル化反応) が見出され、毒性の生体分子ではなく細胞内シグナル伝達物質として機能する可能性が提唱されている。また 8-nitro-cGMP は内因性のパースルフィドが反応することで 8-thio-cGMP へ変換されて新たなシグナル伝達系を構成することも見出された。

2. 研究の目的

本研究では 8-nitro-cGMP や 8-thio-cGMP などの核酸系シグナル分子を、生理的条件下で共有結合捕捉する低分子化合物を開発し、検出プローブや創薬リードへ展開することを目的としている。申請者は既に 8-nitroG (8-ニトログアノシン) 又は 8-thioG (8-チオグアノシン) を効率的に共有結合捕捉するモデル分子を開発した。本研究ではこれら分子を基本的にリン酸基結合部位を導入するなどさらに発展させ、生体条件下での応用を目指した。

3. 研究の方法

本研究では 8-nitro-cGMP や 8-thio-cGMP を生理的条件下で効率的かつ特異的に認識・捕捉するプローブを開発することを計画した。まず申請者が開発したモデル分子 nitroG-Grasp 及び 8-thioG-Grasp の課題を解決するための具体的方策 (1) 又は (2) を計画した。さらに水中で機能させるために、cGMP のリン酸部位と静電相互作用によって結合するような官能基検索を行った (3)。

(1) nitroG-Grasp については中性水溶液中での反応性を大幅に向上させるため、コンフォメーションを固定化したスペーサーを設計・合成し、最適構造を決定した。

(2) 8-thioG-grasp については、中性条件下で進行させるための捕捉反応を新たに開発することを目指し、ラジカル反応や光誘起反応などを検討した。

(3) 水中でトリリン酸や環状モノリン酸体と結合する官能基として、サイクレン-亜鉛錯体を選択した。nitroG-Grasp や 8-thioG-grasp の塩基認識部位として用いている 1,3-ジアザフェノキサジン環に、サイクレン亜鉛錯体を導入した誘導体を合成して、水中での相互作用を蛍光スペクトルなどで評価した。

4. 研究成果

(1) 新規 nitroG-Grasp 誘導体の開発

申請者が開発した nitroG-Grasp による 8-nitroG の捕捉反応を速度論的に解析した結果、反応性がチオール pKa 及びリンカー部の自由度により制御されていることが示唆された。この結果を基に、さらに反応性を向上

させることを目的として、3種類の新規誘導体 (Hydroxy、Dioxane、Benzyl) を設計・合成した (Fig. 1 A)。それぞれの誘導体はリンカーのコンフォメーションを固定化し、チオールの pKa を下げることを目的とした。新規誘導体を用いて、pH 7 の緩衝液とアセトニトリルを混合した条件で捕捉反応を行った結果、C3 リンカー体と比較して飛躍的に反応性を向上させることに成功し、反応性は Benzyl > Dioxane > Hydroxy の順であることが示された (Fig. 1 B)。また速度論的解析を行った結果、活性化エンタルピー値がリンカー部の Log P 値 (脂溶性) と良い直線相関を示すことが見出され、疎水性相互作用による反応中間体の安定化と捕捉反応の効率化が示唆された (発表論文③)。

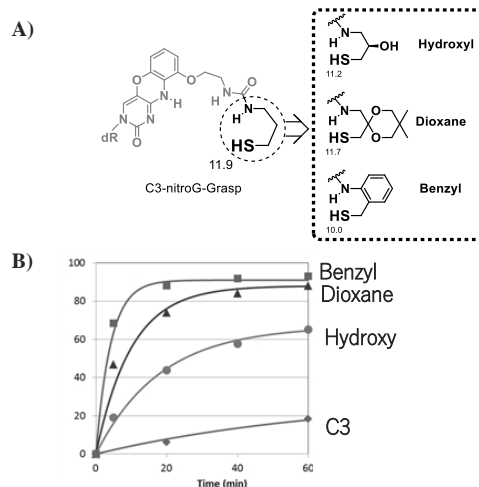


Fig. 1 A) 新規 nitroG-Grasp 誘導体の分子設計、B) 8-nitroG との反応性比較

(2) 8-thioG-grasp 誘導体の開発

nitroG-Grasp のコンセプトを基に、脱離基としてクロロアルキルリンカーを導入した“8-thioG-grasp”誘導体を設計・合成した (Fig. 2 A)。アセトニトリル中、塩基性条件下で 8-thioG からの求核置換反応によって共有結合捕捉することを見出し、ウレア型のプロピルリンカー体が最も高い反応性を示すことを明らかにした (発表論文②)。

次に 8-thioG-grasp の反応性を向上させることを目指して、8-thioG との反応性基としてのオレフィンを導入した 2 種類 (エンド型、エキソ型) の誘導体を設計・合成した (Fig. 2 B)。エンド型反応では、ラジカル的経路を予測して光照射下や様々な金属添加条件を検討したが、期待したような反応は進行しなかった。しかしながら 2 価銅を添加した条件では 8-thioG がグアノシンに変換される、興味深い反応を発見した。

一方でエキソ型反応では、反応性基としてアリルアルコールを導入した誘導体を合成し、8-thioG 捕捉を検討した。その結果、1 価の塩化銅を添加した条件において、8-thioG との付加体を形成する反応が見出された。しかしながら反応率が低く、また立体異性体も同時

に多数生成してくることから、今後改善していくことで画期的な反応分子になることが十分に期待された。

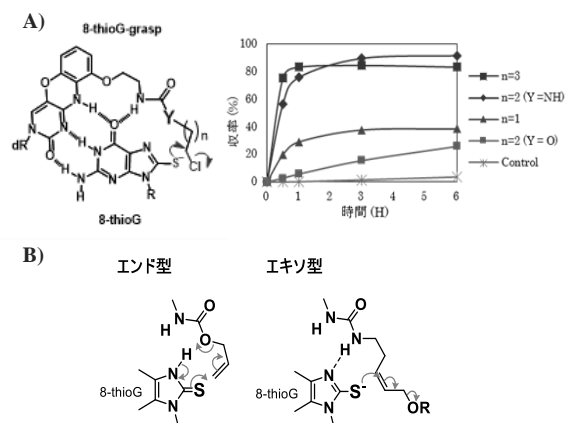


Fig. 2 A) 8-thioG-grasp の設計と反応性比較、**B)** 新規 8-thioG-grasp 誘導体

(3) 水中で 8-oxo-dGTP を特異的に認識する“8-oxoGTP Receptor”の開発
8-オキソ-2'-デオキシグアノシントリン酸 (8-oxo-dGTP) は、ヌクレオチドプール中で活性酸素種によって dGTP が酸化されて生成する。本研究では 8-oxoG-clamp 誘導体の知見を基に、水中で 8-oxo-dGTP を特異的に認識する分子“8-oxoGTP Receptor”を設計した。塩基認識部位として 1,3-ジアザフェノキサジン環を用い、トリリン酸との相互作用部位としてサイクレン-亜鉛 (Zn^{2+}) 錯体を導入した誘導体を設計した (Fig. 3 A)。さらにサイクレン部位と、ジアザフェノキサジン環を接合させるリンカー部分として 3 種類設計し、末端には塩基部とのスタッキング相互作用を期待して 3 種類の芳香環を導入することで、全て組み合わせると計 9 種の誘導体について調べた。合成した 8-oxoGTP Receptor 誘導体を用い水中でヌクレオチド認識能を蛍光スペクトルによって評価した結果、8-oxo-dGTP に対して特異的に蛍光消光することが観測された (Fig. 3 B)。またリンカー部位によって認識能に差があることが示され、エチルリンカー体が最も選択的かつ効率的に蛍光消光することを見出した。また滴定実験より 8-oxo-dGTP に対する結合定数を算出した結果、エチルリンカー体が最も結合能が高いことが示された。さらに HeLa 細胞溶解液中で評価した結果、8-oxo-dGTP に対して選択的な蛍光強度の減少を示し、細胞実験のような夾雑系にも応用可能であることが示唆された (発表論文 ①)。

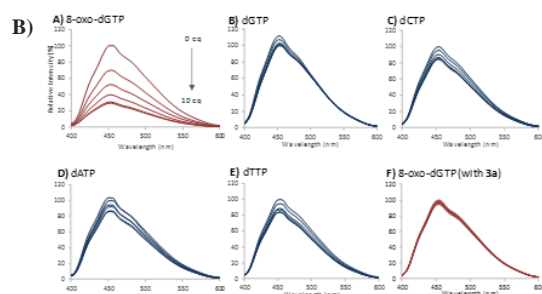
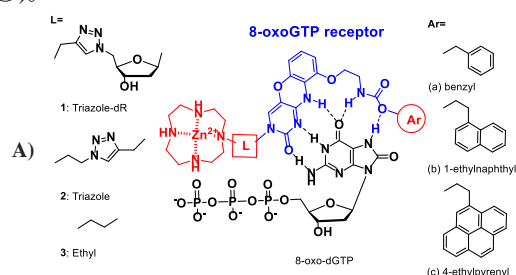


Fig. 2 B) 8-oxoGTP Receptor 誘導体の設計、**B)** 蛍光スペクトル評価

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① **Fuchi, Y., Fukuda, T. and Sasaki, S.** “Synthetic Receptor Molecules for Selective Fluorescent Detection of 8-oxo-dGTP in Aqueous Media” *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 7949-7955.
DOI: 10.1039/C6OB01485B
- ② **Fuchi, Y., Obayashi, H. and Sasaki, S.** “Development of New 1,3-Diazaphenoxazine Derivatives (ThioG-Grasp) to Covalently Capture 8-Thioguanosine” *Molecules.*, **2015**, *20*, 1078-1087.
DOI: 10.3390/molecules20011078
- ③ **Fuchi, Y. and Sasaki, S.** “New NitroG-Grasp Molecules with Enhanced Capture Reactivity for 8-Nitroguanosine in the Aqueous Media” *Chem. Pharm. Bull.*, **2015**, *63*, 913-919.
DOI: <http://doi.org/10.1248/cpb.c15-00550>

[学会発表] (計 13 件)

- ① ○福田高志、湊靖史、佐々木茂貴「長寿命蛍光による 8-oxo-dGTP 検出を目指したランタノイド錯体の開発」、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 27 日、仙台
- ② ○福田高志、湊靖史、佐々木茂貴「長寿命蛍光による 8-oxo-dGTP 検出を目指したランタノイド錯体の開発」、第 33 回日本薬学会九州支部大会、2016 年 12 月 3 日、鹿児島
- ③ ○湊靖史、福田高志、佐々木茂貴「水中での 8-oxoGTP 検出を目的としたジアザフェノキサジン-サイクレン亜鉛錯体の創製」、第 46 回複素環化学討論会、2016 年 9 月 28 日、金沢
- ④ ○福田高志、湊靖史、佐々木茂貴「長寿命蛍光による 8-oxodGTP 検出を目指した 1,3-ジアザフェノキサジン-ランタノイド錯体の合成と機能評価」、第 46 回複素環化学討論会、2016 年 9 月 27 日、金沢
- ⑤ ○福田高志、湊靖史、佐々木茂貴「8-oxodGTP を特異的に認識する蛍光性

- ランタノイド分子の開発」、第 53 回化学
関連支部合同九州大会、2016 年 7 月 2
日、北九州
- ⑥ ○瀧靖史、佐々木茂貴「酸化損傷ヌクレ
オシド 8-oxodGTP の特異的検出を目指
した亜鉛錯体分子の開発」、日本ケミカ
ルバイオロジー学会 第 11 回年会、2016
年 6 月 17 日、京都
- ⑦ ○瀧靖史、福田高志、佐々木茂貴「細胞
中検出を目指した 8-oxoGTP 特異的認
識分子の開発」、日本薬学会第 136 年会、
2016 年 3 月 27 日、横浜
- ⑧ ○Yasufumi Fuchi, Shigeki Sasaki.
“Efficient covalent capture of
8-nitroguanosine via a multiple
hydrogenbonded complex.” Pacificchem
2015、 2015 年 12 月 19 日、Hawaii
- ⑨ ○福田高志、瀧靖史、佐々木茂貴
「8-oxodGTP を特異的に認識する蛍光性
ランタノイド錯体分子の合成と評価」、
第 32 回日本薬学会九州支部大会、2015
年 11 月 28 日、延岡
- ⑩ ○瀧靖史、大林秀都、佐々木茂貴「ジア
ザフェノキサジン環を基本骨格とする 8
位酸化グアノシン捕捉分子の開発」、第
41 回反応と合成の進歩シンポジウム、
2015 年 10 月 26 日、東大阪
- ⑪ ○Yasufumi Fuchi, Shigeki Sasaki.
“Development of 1,3-diazaphenoxazine
derivatives (nitroG-Grasp) for selective
capture of 8-nitroguanosine.” 第 42 回国際
核酸化学シンポジウム、2015 年 9 月 23
日、姫路
- ⑫ ○大林秀都、瀧靖史、佐々木茂貴「水素
結合錯体形成を介した効率的な 8-チオ
グアノシン捕捉反応分子の開発」、第 52
回化学関連支部合同九州大会、2015 年 6
月 27 日、北九州
- ⑬ ○瀧靖史、大林秀都、佐々木茂貴「選択
的 8 位酸化グアノシン捕捉モデル分子
“Grasp”誘導体の開発」、日本ケミカルバ
イオロジー学会第 10 回年会、2015 年 6
月 12 日、仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院薬学研究院 生物有機合成
化学分野

<http://bioorg.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧 靖史 (FUCHI, Yasufumi)

九州大学大学院薬学研究院・助教

研究者番号：40748795

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

佐々木 茂貴 (SASAKI, Shigeki)

九州大学大学院薬学研究院・教授

研究者番号：10170672

(4) 研究協力者

大林 秀都 (OBAYASHI, Hideto)

福田 高志 (FUKUDA, Takashi)