

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32702

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21451

研究課題名(和文) ケト基を糖部に有するケト糖型核酸の合成法の開発とケミカルバイオロジーへの展開

研究課題名(英文) Chemical synthesis of oligonucleotides having keto sugar and their application to chemical biology study

研究代表者

實吉 尚郎 (Saneyoshi, Hisao)

神奈川大学・工学部・助教

研究者番号：10564784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、糖部2'位がケト化されたケト糖型核酸の化学合成を通じ、未開拓な核酸機能の探索と生物学的機能の解明を目指すものである。糖部2'位にケト基を有する核酸の化学合成は、分枝糖ヌクレオシドを前駆体としてオリゴヌクレオチドに組み込み、ポスト変換反応により達成した。得られたケト糖型核酸は、DNA(デオキシリボース)、RNA(リボース)とも異なる熱安定性をしめした。導入されたケト基は、水溶液中での還元反応により水酸基へと変換可能であった。

研究成果の概要(英文)：This research aims to explore the unexplored nucleic acid functions and elucidate the biological functions through chemical synthesis of keto sugar type nucleic acid in which the sugar moiety is oxidized. Chemical synthesis of nucleic acids having a keto group at 2' position was accomplished by incorporating a branched sugar nucleoside as a key precursor. The keto sugar-type nucleic acid showed a different thermal stability compared to DNA (deoxyribose) and RNA (ribose). The introduced keto group could be converted to a hydroxyl group by a reduction reaction in an aqueous solution.

研究分野：生体関連化学

キーワード：酸化損傷 還元反応 細胞内化学反応 ケト基

## 1. 研究開始当初の背景

カルボニル基は、有機合成化学上有用な官能基であるだけでなく、核酸の酸化損傷における官能基としても知られている。8-オキソグアニンは、カルボニル基を含む酸化損傷塩基の一つである。カルボニル基の付加によって、核酸塩基の配向がアンチ型からシン型となり分子認識能が変化し変異を引き起こすことが知られている (*J. Biol. Chem.*, 1992, 267 (1), 166-72.)。さて、核酸 (DNA・RNA) は、糖部を巧みに使い分け、多様な機能 (遺伝情報の保存、伝達、制御など) を担っている。

本提案で注目したケト糖型核酸は、RNA 2'位水酸基をカルボニル基 (ケト基) で置き換えた誘導体である。ケト基は、様々な反応性を示すと考えられる。(例えば、水和されてジェミナルジオールになる、還元されて水酸基になる、アミノ基と反応してシッフ塩基を形成する、金属イオンと配位する、など) しかしながら、未だに自然界からそのような物質が単離された例はない。人工的な系において、ケト基が生成するという先行研究 (*Bioorg. Med. Chem.*, 2013, 21, 466-469.) があり酸化損傷の潜在性が示唆されていた。これらの理由から、ケト基を糖部に持つ核酸は、化学的にも生化学的にも興味深い素材である。しかし、糖部 2'位がケト化された核酸の化学合成法、つまり望みの配列に望みの数のケト糖ユニットを導入する手法が存在していなかった。言うまでもないが、それらの化学反応性などの物性データは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、ケト基を糖部に有するケト糖型核酸の合成法の開発とケミカルバイオロジーへの展開を目指すものである。

## 3. 研究の方法

- (1) 糖部 2'位がケト化されたヌクレオシドを含む核酸の化学合成法の検討を行った。
- (2) 合成した核酸の分子認識能と構造の検討を行った。
- (3) オリゴヌクレオチド糖部 2'位ケト基の化学反応性を検討した。

## 4. 研究成果

(1) ケト基を核酸糖部 2'位に導入するにあたり、ケト前駆体を含むオリゴヌクレオチドを合成後、前駆体をケト基へと変換するのが簡便と考えた (図 1)。ケト基を発生させる手法として、ジオールに対して過ヨウ素酸ナトリウムを作用させることで得られると考えた。この方法により、温和な条件でケト基を発生できる。

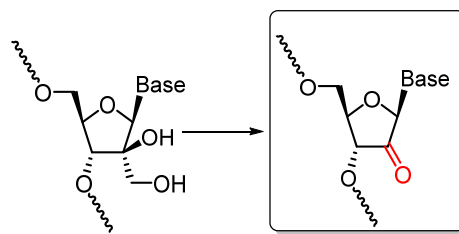


図 1

過去の文献 (*Chem. Pharm. Bull.*, 1985, 33(9), 3617-3622.) を参考にして、2'-分岐糖ヌクレオシドを合成することにした。市販のウリジンから、常法に従って 3' と 5' 水酸基を環状シリルエーテルで保護した後、2' 位水酸基をデスマーチン試薬によってケト基とした。ケト基に対して増炭反応を施し、数行程を経て分岐糖ヌクレオシドとした。その後、常法に従いホスホロアミダイトへと導いた。

次に、合成したホスホロアミダイトを用いて DNA 自動合成機によりオリゴヌクレオチドへ導入した。種々の配列に導入可能であり、複数個導入することが可能であった。この分岐糖を含むオリゴヌクレオチドは、DNA 合成工程、HPLC 精製に安定であった。構造は MALDI-TOF mass により、同定した。この合成ルートにより、ケト糖型オリゴヌクレオチドの前駆体を簡便に合成することが可能となった。次に、過ヨウ素酸ナトリウムを用いて、ケト基への変換を行った。反応は、水溶液中で速やかに進行し他の官能基にダメージを与えることなくケト基へと変換できることがわかった。変換反応終了後は、逆相カートリッジにより脱塩後、必要に応じて HPLC 精製を行うことにより目的のケト糖型オリゴヌクレオチドを高収率で得られるようになった。

(2) ケト基を含むオリゴヌクレオチドの分子認識・構造について検討した。DNA オリゴヌクレオチド中央部へデオキシウリジン (dU)、ウリジン (U)、ケト糖型ウラシル (ketou) を導入した 3 種類のオリゴヌクレオチドを用意し、熱変性実験を行った (図 2)。

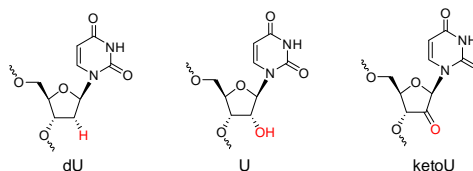


図 2

ケト糖型核酸は、コントロールであるデオキシリボース型 (dU)、リボース型 (U) のいずれとも異なる熱変性プロファイルを示した。

ケト糖型核酸の2重鎖融解温度は、3種類のオリゴヌクレオチドの中で最も低い値であった。塩基識別能を検討したところ、アデニンとグアニンを同程度の安定性で認識することがわかり、天然型糖部と比較して、識別能は失われたと考えられる。このようにたった一つのケト化により分子認識能が大きく変化することが判明した。この理由は、ケト化によって、2'位炭素がsp<sup>2</sup>炭素となりヌクレオシド糖部立体配座が変化したためと考えている。

上記のオリゴヌクレオチドを用いて、CD測定を行った。いずれの場合も、同様のCDスペクトルを与え、構造的に大きな違いが観測されなかった。ケト基の導入は、全体構造には大きな影響を与えないが、局所的に構造を変化させていると考えられる。

より詳細な構造情報を得るため、ケト基を含むオリゴヌクレオチドの結晶構造解析を行うことにした。代表的な配列であるディッカーソン型のオリゴヌクレオチド中央部にケト基を含むヌクレオシドと構造解析を容易にする5-プロモウラシルを導入した。様々な組み合わせの結晶化液を用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて結晶化を試みた。しかしながら、現在のところ良好な結晶を得るには至っていない。今後も、種々の条件で結晶化を継続していく予定である。

(3)次に、ケト基の化学反応性を利用したポストRNA合成を検討した。ケト基は、有機化学的に還元反応により水酸基へと変換できる。もし、細胞内でケト基が還元され水酸基へと変換されるならば酸化損傷の修復機構の提案になる。さらに、ケト基をマスクされた水酸基として活用することで還元反応をトリガーとした機能性RNAの創生が可能となる。

まず初めに、化学的な還元反応に応答性があるか検討した。水素化ホウ素ナトリウムを還元剤として、緩衝溶液中で反応させた。還元反応は、穏やかに進行し、新たに還元体と思われるシングルピークに収束した。この還元反応は、カルボニル炭素に対する反応経路

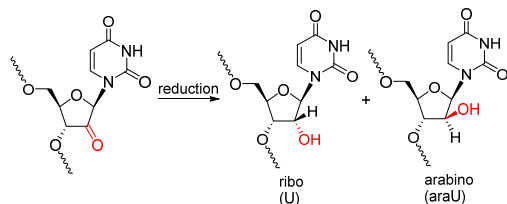


図3

により、2つの生成物を混合物として与えると考えられる。即ち、水酸基が上向きのアラビノ型と水酸基が下向きのリボ型の2つの生

成物となりえる(図3)。この評価は、HPLCの分離能では判別できなかった。

次に、得られた還元部位を含むオリゴヌクレオチドをヌクレアーゼとホスファターゼを用いて、ヌクレオシドまで分解し、ヌクレオシドの組成を調べた。その結果、リボ型が優勢に得られていることがわかった。立体選択性は、周辺の塩基配列や他の高次構造によって変動する可能性がある。今後検討を進めたい。

以上本研究では、ケト基を糖部に有するケト糖型核酸の合成法を開発した。ケト糖型核酸の分子認識能と核酸構造への影響を明らかにした。また、オリゴヌクレオチド糖部ケト基の還元反応により、水溶液中で天然のウリジン残基に変換する反応を開発できた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

Chemical synthesis of 2'-oxidized nucleic acids: Hisao Saneyoshi, Akira Ono. 日本化学会第98春季年会、千葉、2018年3月19日~23日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

實吉 尚郎 (Saneyoshi Hisao)  
神奈川大学・工学部・助教  
研究者番号：10564784

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )