

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05929

研究課題名(和文) グアノシンーリン酸合成酵素の反応機構解明と同酵素に応答して機能する分子の開発

研究課題名(英文) A study on the biosynthesis of guanosine monophosphate and the development of functional molecules targeting guanosine monophosphate synthetase

研究代表者

岡 夏央 (Oka, Natsuhisa)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：50401229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：2位カルボニル基以外が適切に保護されたキサントシンに対し、独自に開発した酸性活性化剤CMMTによって活性化したホスホロアミダイトを反応させ、酸化/硫化、及びリン酸部位の脱保護をワンポットで行うことで、キサントシンの2位カルボニル基のリン酸化/チオリン酸化を初めて達成した。更に、得られた化合物を脱保護し、2位カルボニル基がリン酸化されたキサントシンの単離に初めて成功した。この新しいリン酸化反応は、グアノシンーリン酸の生合成経路を標的とする分子プローブや分子標的薬の合成への応用が期待される。加えて、7-デアザグアニン誘導体の6位カルボニル基の位置選択的ジフェニルカルバモイル化反応の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した手法は、キサントシンの2位カルボニル基の初のリン酸化反応であり、グアノシンーリン酸の生合成中間体であるAMP-XMPの化学合成に欠かせない。また、本反応はAMP-XMPそのものだけでなく、その化学修飾アナログの合成にも応用できる。このような化学修飾アナログは、グアノシンーリン酸の生合成経路を標的とする分子プローブや分子標的薬の合成への応用が期待される。以上のことから、本研究の成果は、これまで直接的な研究が難しかったグアノシンーリン酸の生合成中間体の性質や機能により詳細に迫るきっかけとなると同時に、この生合成経路を標的とする医薬品開発への道を拓くものであり、極めて意義深いと言える。

研究成果の概要(英文)：Appropriately protected xanthosine derivatives were reacted with phosphoramidites activated by N-(cyanomethyl)dimethylammonium triflate (CMMT) developed by us. Subsequent oxidation/sulfurization and deprotection of the resultant phosphate esters afforded 2-O-phosphoryl/thiophosphorylxanthosine derivatives. The products were also fully deprotected by TBAF to afford xanthosine 2-phosphates. This new phosphorylation reaction should be useful for the development of molecular probes and therapeutic agents targeting the biosynthesis of guanosine monophosphate. Furthermore, a regioselective protection of 7-deazaguanine derivatives was achieved by using diphenylcarbamoyl chloride and DMAP. The appropriately protected 7-deazaguanine derivatives thus obtained were applied to the synthesis of 7-deazaxanthosine derivatives which should be useful for the synthesis of 7-deazaxanthosine derivatives.

研究分野：生体関連化学

キーワード：核酸の生合成 カルボニル基のリン酸化 ヌクレオチド 酵素応答性分子 キサントシン 7-デアザグアニン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核酸の生合成経路には、核酸塩基のカルボニル基をリン酸化やアデノシンーリン酸化 (AMP化) で活性化し、アミノ基などに変換する酵素が複数存在する。例えば、アデニロコハク酸 (AdS) 合成酵素は、イノシンーリン酸 (IMP) のカルボニル基をリン酸化して **1** とし、AdS を合成する (図 1 左)¹。一方、グアノシンーリン酸 (GMP) 合成酵素は、キサントシンーリン酸 (XMP) のカルボニル基を AMP 化して AMP-XMP **2** とし、GMP へ導く (図 1 右)²。これらの活性中間体は、酵素活性部位で生成後、直ちに次の反応に消費されることから、その観察や単離は極めて困難であり、その性質等に関する研究はほとんど行われていない。このような分子を化学合成によって供給できる様なになれば、核酸の生合成に関する研究の促進が期待される。また、化学合成はこの様な生体分子そのものだけでなく、その化学修飾体の供給も可能である。このような化学修飾体は、核酸の生合成経路を標的とする分子プローブや医薬品等としての利用が期待される。

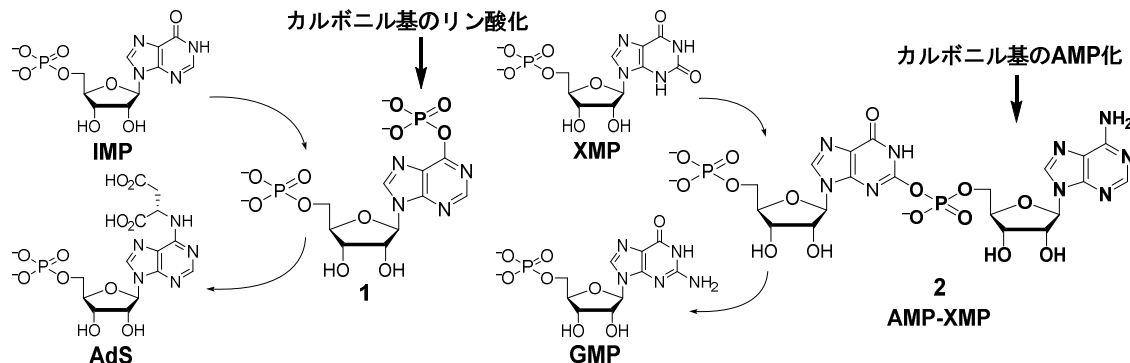


図 1. カルボニル基のリン酸化・AMP化を経る AdS・GMP の生合成経路

2. 研究の目的

本研究は、これまでに報告例が無かったキサントシンの 2 位カルボニル基のリン酸化反応の開発を目的とした。このような反応は、前述の AMP-XMP **2** の化学合成には欠かせない。また、このような化学反応を開発できれば、AMP-XMP そのものに限らず、その化学修飾アナログの合成も可能となる。例えば、AMP を AMP 系抗がん剤や蛍光性 AMP³ に置き換えた AMP-XMP アナログは、GMP 合成酵素の発現量が上昇しているがん細胞への選択性に優れた抗がん剤や蛍光プローブになると期待される (図 2)。

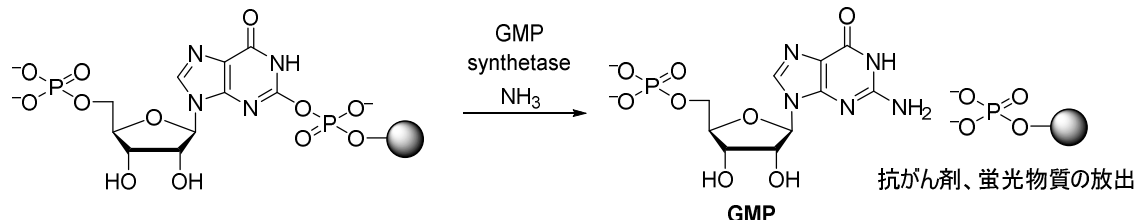


図 2. GMP 合成酵素に反応して抗がん剤や蛍光物質を放出する AMP-XMP アナログ

3. 研究の方法

核酸塩基のカルボニル基のリン酸化は、核酸合成の副反応として知られていたものの、反応を効率的に進行させ、目的物を収率良く単離する方法は確立されていなかった。一般に、リン酸化は 1*H*-テトラゾールなどの酸性活性化剤の存在下、ホスホロアミダイトを反応させて亜リン酸トリエステル化した後、酸化、脱保護を経ることによって行われるが、カルボニル基上の亜リン酸トリエステル中間体は極めて不安定であり、1*H*-テトラゾールなどの求核性の試薬によって容易に分解することが一因である。このため、極めて穏和な条件で進行する新しいリン酸化反応の開発が必要であった。我々は、先行研究において、光学活性なリン酸化試薬の光学純度を全く損なわずに (=リン原子に全く求核攻撃せずに) リン酸化を促進する新しい活性化剤を開発し、光学的に純粋なリン原子修飾核酸の合成を達成した^{4,5}。更に、開発した酸性活性化剤の一つである *N*-cyanomethyl dimethyl ammonium triflate (CMMT) を用いるイノシン 3 の 6 位カルボニル基のリン酸化

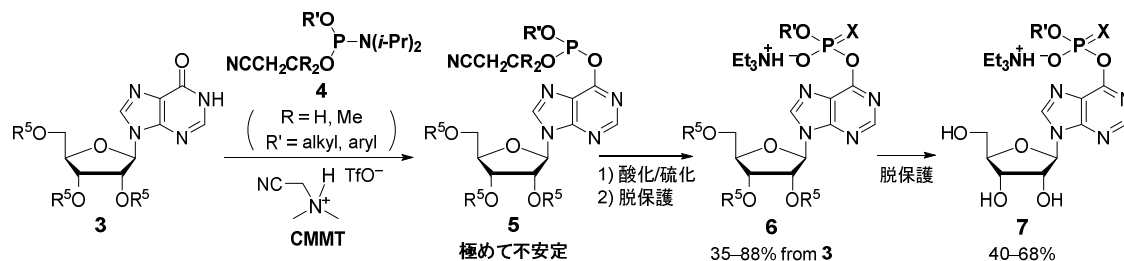


図 3. 活性化剤 CMMT を用いるイノシンのカルボニル基のリン酸化 (X = O, S)

化について検討したところ、亜リン酸トリエステル中間体 5 の分解が抑制され、カルボニル基がリン酸ジエステル化された 7 が収率良く得られることを見出した⁶。本研究では、これらの研究成果を基に、キサントシン 2 位カルボニル基の初のリン酸化反応の開発を目指した。即ち、図 4 に示す様に、2 位カルボニル基以外を適切に保護したキサントシン 8 に対し、活性化剤 CMMT によって活性化したホスホロアミダイトを反応させて亜リン酸トリエステル中間体 9 を合成する。9 は極めて不安定であるため、単離せずに酸化または硫化した後、脱保護することで、2 位カルボニル基がリン酸化 / チオリン酸化されたキサントシン 11 を得る。

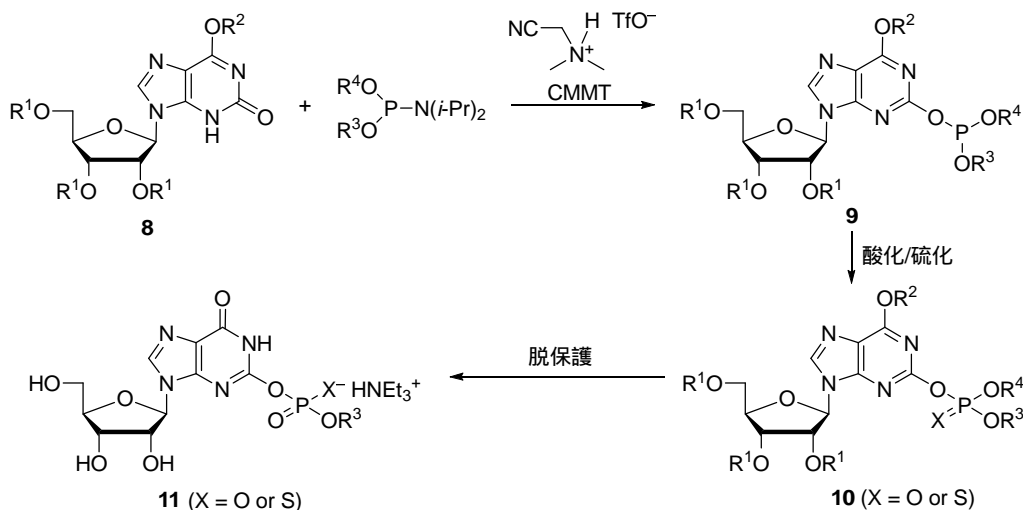


図 4. キサントシン 2 位カルボニル基のリン酸化 / チオリン酸化

4. 研究成果

キサントシンは 2 位と 6 位にカルボニル基を有する。2 位リン酸化の検討には水酸基と 6 位カルボニル基の保護が必要となるが、2 位カルボニル基の存在下 6 位を選択的に保護するのは困難であると考え、グアノシンを出発物質とする合成戦略を立てた。まず、水酸基をトリイソプロピルシリル (TIPS) 基や *tert*-ブチルジメチルシリル (TBS) 基で保護し、6 位カルボニル基を 2-(4-ニトロフェニル)エチル (NPE) 基で保護したグアノシン誘導体 12、13 を合成し、その 2 位アミノ基のジアゾ化-加水分解反応によるカルボニル基への変換反応について検討した。その結果、水-酢酸-アセトン混合溶媒中、0 °C で亜硝酸ナトリウムを反応させる条件下で、リン酸ジエステル化の基質となるキサントシン誘導体 16、17 の合成に成功した。この際、水の代わりに酢酸が付加した副生成物である 14、15 が確認されたが、塩基性条件下で加水分解することにより 16、17 に変換可能であることも見出している (図 5)。

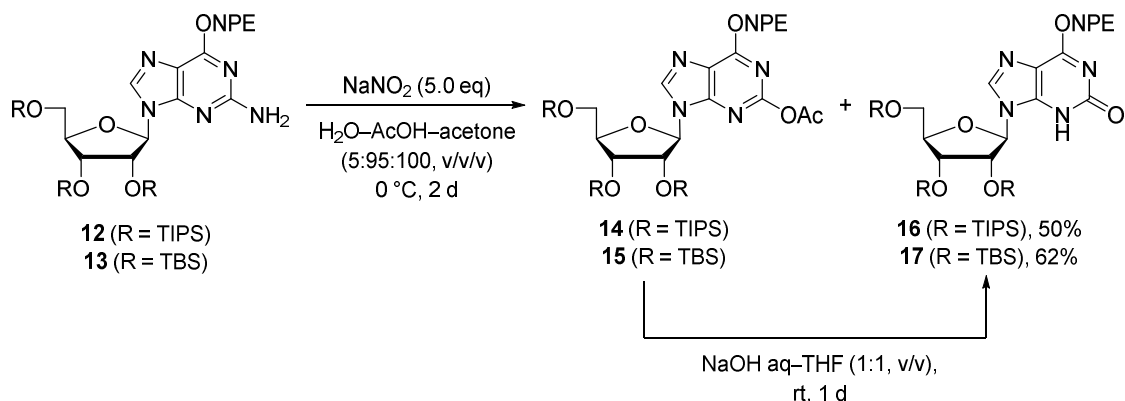
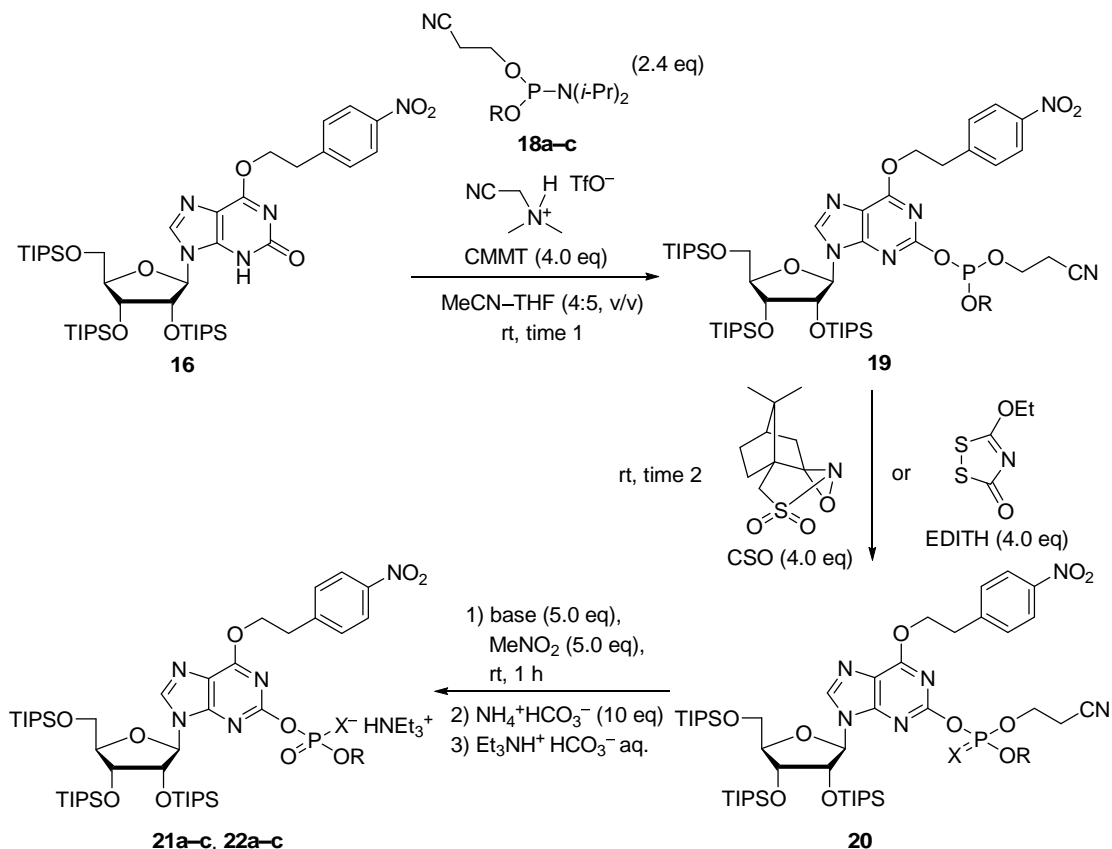


図 5. 適切に保護されたキサントシン 16, 17 の合成

得られた 16 を用い、2 位カルボニル基のリン酸化の反応条件について検討した (表 1)。当研究室で開発したイノシンの 6 位カルボニル基のリン酸化の反応条件に従い、16 の 2 位カルボニル基に対し、CMMT を活性化剤としてホスホロアミダイト 18a (R = Ph) を反応させる亜リン酸化、酸化剤 (10-camphorsulfonyl)oxaziridine (CSO) による酸化、DBU によるシアノエチル基の除去、イオン交換を行い、21a を合成した。亜リン酸化、酸化の反応時間、シアノエチル基を除去する塩基の検討を行った結果、CSO による酸化時間を延ばすことで収率を大幅に改善することに成功した (entry 5)。また、リン酸上の置換基がイソプロピル、2-シアノエチル基である 21b, c もほぼ同様の収率での単離に成功した (entry 6, 7)。加えて、酸化剤 CSO の代わりに硫化剤 3-ethoxy-1,2,4-dithiazoline-5-one (EDITH) を用いることで、中間体のリン原子を硫化し、カルボニル基がチオリン酸化された化合物 22 の合成を試みた。18a, b (R = Ph, *i*-Pr) を用いた際にはチオリ

ン酸化された **22a,b** が確認されたが、不純物との分離が困難で単離には至らなかった (entry 8, 9)。一方、**18c** (R = 2-cyanoethyl) を用いた場合、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって不純物を完全に除去することができ、チオリン酸化された目的物 **22c** を収率 53% で得ることができた (entry 10)。

表 1. キサントシン誘導体 **16** の 2 位カルボニル基のリン酸化 / チオリン酸化の検討



entry	18	R	time 1	CSO/EDITH	time 2	base	X	21/22	yield (%)
1	a	Ph	1 h	CSO	1 h	DBU	O	21a	38
2	a	Ph	3 h	CSO	1 h	DBU	O	21a	39
3	a	Ph	12 h	CSO	1 h	DBU	O	21a	43
4	a	Ph	1 h	CSO	1 h	DBN	O	21a	43
5	a	Ph	1 h	CSO	overnight	DBU	O	21a	70
6	b	<i>i</i> -Pr	1 h	CSO	overnight	DBU	O	21b	69
7	c	cyanoethyl	1 h	CSO	overnight	DBU	O	21c	73
8	a	Ph	1 h	EDITH	overnight	DBU	S	22a	–
9	b	<i>i</i> -Pr	1 h	EDITH	overnight	DBU	S	22b	–
10	c	cyanoethyl	1 h	EDITH	overnight	DBU	S	22c	53

リン酸化物 **21a-c**, **22c** をテトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) で処理することによって、1 段階での水酸基と 6 位カルボニル基の脱保護を試みた (表 2)。その結果、Ph 基、*i*-Pr 基をもつリン酸ジエステル化されたキサントシン **23a,b** は、低収率であったものの単離精製に成功した (entry 1, 2)。低収率であった原因として、反応中にリン酸ジエステルの加水分解が進行し、キサントシンへと分解されたことが挙げられる。実際に、HPLC 精製によって目的物と共にキサントシンが回収された。一方で、**23a,b** は中性条件下水溶液中で安定に取り扱えることも分かった。これに対し、CE 基をもつリン酸ジエステル化されたキサントシン **23c**、チオリン酸ジエステル化されたキサントシン **24c** は得られず、加水分解生成物であるキサントシンのみが確認された (entry 3, 4)。

以上の様に、2 位カルボニル基以外を適切に保護したキサントシンに対し、CMMT を活性化剤とする亜リン酸トリエステル化、CSO/EDITH を酸化剤 / 硫化剤とする酸化 / 硫化、及びリン酸部位の脱保護をワンポットで行うことで、キサントシン 2 位カルボニル基のリン酸化 / チオリン酸化に初めて成功した。また、得られた化合物の 6 位カルボニル基、水酸基の脱保護を TBAF によって行い、低収率ではあるものの、2 位がリン酸ジエステル化されたキサントシンの単離に成功した。現在は、この反応を用いた AMP-XMP 及びその化学修飾体の合成に取り組んでいる。

次に、蛍光性核酸塩基をキサントシンの代わりに有する AMP-XMP アナログの合成に着手した。この様な非天然型核酸塩基を有するヌクレオシドの合成はグリコシル化によって行うのが

表 2. リン酸化物 **21a-c**, **22c** の水酸基、6 位カルボニル基の脱保護の検討

21a-c, 22c				23a-c, 24c		
entry	21/22	R	X	time	23/24	yield (%)
1	21a	Ph	O	2 h	23a	31
2	21b	<i>i</i> -Pr	O	1 h	23b	24
3	21c	cyanoethyl	O	1 h	23c	–
4	22c	cyanoethyl	S	1 h	24c	–

一般的であり、そのためには蛍光性核酸塩基の 6 位カルボニル基の選択的保護と立体選択的グリコシル化が必要となる。そこで、6 位カルボニル基の選択的保護について検討し、ジフェニルカルバモイルクロリド (DPC-Cl) と DMAP を用いると 7-デアザグアニン誘導体 **25** の 6 位選択的な保護が収率良く進行することを見出した (図 6)。即ち、DMAP を塩基として用いると 6 位のみ DPC 化された **26** が 65–88% の収率で得られ、**27** はまったく生成しなかった。一方、従来法であるピリジン中ジイソプロピルエチルアミンを塩基とする方法では 9 位も DPC 化された **27** が生成した。加えて、DMAP と DPC-Cl から生じる活性中間体 DPC-DMAP を単離し、その単結晶 X 線構造解析で構造決定した⁷。この高い位置選択性は、DPC-DMAP の安定性が高いため、9 位には反応せず比較的反応性が高い 6 位にのみ反応したからと考えられる。最後に、DPC 化された 7-デアザグアニン **25c** の塩化糖 **28** を用いるグリコシル化によって、高い β 選択性で 7-デアザグアノシン誘導体 **29** の合成に成功した (図 7)。

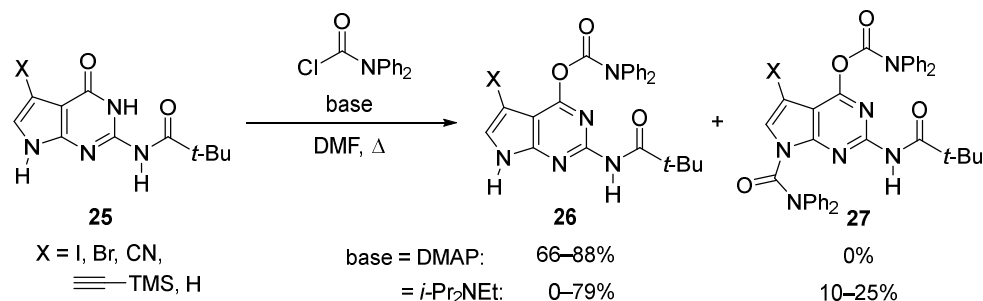


図 6. 7-デアザグアニン誘導体 **25** の 6 位選択的 DPC 化

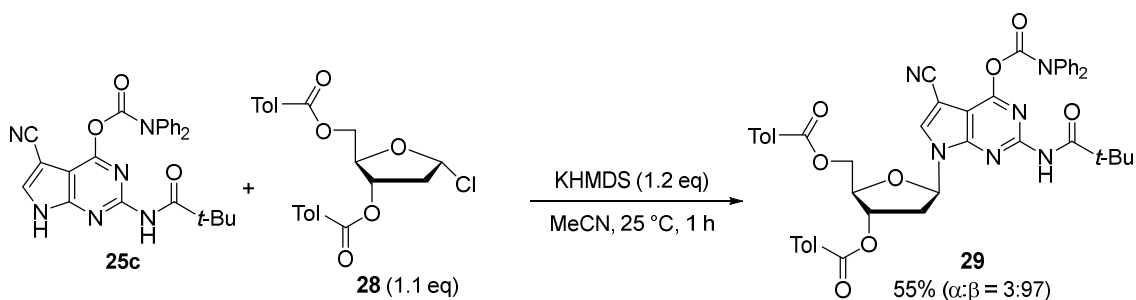


図 7. 7-デアザグアニン誘導体 **25c** のグリコシル化によるヌクレオシド **29** の合成

参考文献

- (a) Iancu, C. V. *et al. J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26779-26787. (b) Eaazhisai, K. *et al. J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 1251-1264.
- (a) Ballut, L. *et al. Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8930. (b) Duckworth, B. P. *et al. Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 766-796.
- (a) Wierzchowski, J. *et al. Mol. BioSyst.* **2014**, *10*, 2756-2774. (b) Baszczyński, O. *et al. Med. Res. Rev.* **2013**, *33*, 1304-1344.
- Oka, N.; Yamamoto, M.; Sato, T.; Wada, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16031-16037.
- (a) Oka, N.; Wada, T. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5829-5843. (b) 岡 夏央・和田 猛 有機合成化学協会誌 **2016**, *74*, 31-44.
- Oka, N.; Morita, Y.; Itakura, Y.; Ando, K. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11503-11505.
- Oka, N.; Nakano, K.; Fukuta, A.; Ando, K. *Tetrahedron Lett.* **2020**, in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokogawa, T.; Nomura, Y.; Yasuda, A.; Ogino, H.; Hiura, K.; Nakada, S.; Oka, N.; Ando, K.; Kawamura, T.; Hirata, A.; Hori, H.; Ohno, S.	4. 巻 15
2. 論文標題 Identification of a radical SAM enzyme involved in the synthesis of archaeosine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat.Chem. Biol.	6. 最初と最後の頁 1148-1155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41589-019-0390-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oka, N.; Fukuta, A.; Ando, K.	4. 巻 74
2. 論文標題 A practical synthesis of archaeosine and its base	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 5709-5714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） Oka, N.; Fukuta, A.; Ando, K.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oka, N.; Nakano, K.; Fukuta, A.; Ando, K.	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Regioselective O6-diphenylcarbamoylation of 7-deazaguanine derivatives via a stable intermediate 1-(diphenylcarbamoyl)-4-(dimethylamino)pyridinium chloride	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron Lett.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tetlet.2020.152085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 平林 洋紀・岡 夏央・安藤 香織
2. 発表標題 キサントシンの2位カルボニル基のリン酸化反応の開発
3. 学会等名 2019年度有機合成化学北陸セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Natsuhisa Oka
2. 発表標題 Stereoselective furanosylation reactions for the synthesis of oligosaccharides and nucleosides
3. 学会等名 The 8th International Conference of The Indonesian Chemical Society (ICICS) 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koki Nakano, Natsuhisa Oka, Akane Fukuta, Ayumi Mori, Kaori Ando
2. 発表標題 Synthesis of 7-deazaguanosine derivatives via glycosylation
3. 学会等名 The 4th International Symposium on Process Chemistry (ISPC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野 宏紀・岡 夏央・福田 茜・安藤 香織
2. 発表標題 7-デアザグアノシン誘導体の合成法の開発
3. 学会等名 第49回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平林 洋紀・岡 夏央・安藤 香織
2. 発表標題 キサントシンの2位カルボニル基のリン酸化反応の開発
3. 学会等名 第49回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Natsuhisa Oka, Kouki Nakano, Akane Fukuta, Ayumi Mori, Kaori Ando
2. 発表標題 Synthesis of 7-deazaguanosine derivatives
3. 学会等名 The 45th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Natsuhisa Oka
2. 発表標題 Stereocontrolled Synthesis of P-Chiral Oligonucleotides
3. 学会等名 International Symposium on Pure & Applied Chemistry 2017 (ISPAC 2017) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡 夏央
2. 発表標題 Stereoselective synthesis of β -ribofuranosides
3. 学会等名 2017分子化学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神藤 優花・岡 夏央・安藤 香織
2. 発表標題 ストレプトマイセス属細菌由来 β -リボフラノシドの合成研究
3. 学会等名 第48回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木 康佑・岡 夏央・安藤 香織
2. 発表標題 キラル酸活性化剤を用いるジヌクレオシドホスホロチオエートの立体選択的合成
3. 学会等名 第48回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Natsuhisa Oka, Akane Fukuta, Kaori Ando
2. 発表標題 Synthesis of 7-deazaguanine and 7-deazaguanosine derivatives
3. 学会等名 The 44th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 シクロペンテン誘導体及びシクロペンテン誘導体の製造方法	発明者 岡 夏央、安藤 香織	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-199474	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

岐阜大学 工学部 化学・生命工学科 安藤研究室 ホームページ https://www1.gifu-u.ac.jp/~ando_ap/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考