

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月17日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550158

研究課題名（和文） ユニークなスピンラベルドックス特性を持つラジカル直結型核酸の開発

研究課題名（英文） Development of Novel Spin-labeled Nucleic Acids with Unique Spin and Redox Properties

研究代表者

麻生 真理子（ASO MARIKO）

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：30201891

研究成果の概要（和文）：核酸の機能発現に関わる核酸構造の正確な検出を目指し *N-tert*-ブチルアミノキシル基を塩基部に直結したスピンラベル化核酸を合成し、ESR スペクトルを精査した。アデニン誘導体（A*）を導入した二本鎖 DNA の ESR スペクトルは、A*の両隣及び相補鎖中の対合する塩基の影響を受けることが分かった。また A*を導入した Z 型 DNA の ESR スペクトルは構造中での塩基部の低い運動性を示唆した。更に、ラジカル部分で相補鎖塩基と水素結合形成が期待できる新規 C-ヌクレオシドの合成を行った。

研究成果の概要（英文）：Spin-labeled nucleic acids, which have *N-tert*-butylaminoxyl group at nucleobase, were synthesized and investigated with respect to how they can monitor the structure of nucleic acids. Adjacent and opposing nucleobases affected EPR spectra of deuplex ODN containing adenine derivative, A*. EPR spectra of B- and Z-form DNA containing A* were investigated. Synthetic studies of spin-labeled C-nucleoside were also carried out with the aim of development of a novel probe which forms base pair with adenine at aminoxy group.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学、生体関連化学

キーワード：スピンラベル、核酸、安定ラジカル、ESR、運動性

1. 研究開始当初の背景

核酸の構造変化は蛋白質との相互作用を

制御し、DNA 複製、転写、翻訳等核酸の機能発現に影響を及ぼす。核酸の構造変化を反映

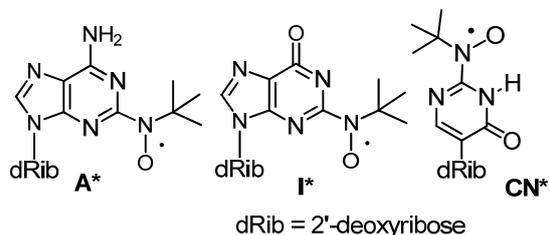
する塩基部の動きを正確に検出できれば核酸の構造と機能との関係を理解できる。スピンラベル化核酸は核酸に安定ラジカルを導入したもので、ESR を用いて検出した安定ラジカルの動きから核酸分子の運動性や構造を推測するものである。高感度で対電子を持つ分子のみを検出できるため、高分子量の生体分子への応用に適している。また ESR はナノ秒単位の核酸塩基の動きの検出に適しているなどの利点を持つ。従来のスピンラベル化核酸の多くはピリミジン塩基にリンカーを介して安定ラジカルを導入したもので、リンカー部の自由度のため、ESR により検出する安定ラジカルの動きが核酸の動きと相関しないという問題点があった。そこでリンカー部の動きを除去し、塩基の動きを正確にモニター可能な新規スピンラベル化核酸の創出は核酸機能研究に大きく貢献できると期待された。

2. 研究の目的

塩基部の動きを検出する有用なプローブの創出をめざし、安定ラジカルが塩基部に直結したスピンラベル化核酸の設計を行なった (図 1)。ラジカル直結型核酸は 1) 塩基部の動きが安定ラジカルに連動し、ESR 法により塩基部の動きの正確なモニターが期待できる。2) 安定ラジカルの対電子は塩基部に非局在化し、対電子が N-O 結合に局在する TEMPO 等環状アミノキシルとは、異なる電子的性質、及びスピン特性を持つ。3) アミノキシル基は還元、酸化によりヒドロキシルアミノ基と相互変換可能であり塩基部に共役したレドックス活性なプローブとして DNA 鎖内電子移動を制御する可能性があるという特徴をもつ。本研究ではこれらのスピンレドックス特性を利用し、(1)核酸塩基部の動きを正確に検出するスピンラベル化核酸の開発を行う。①報告例の少ないスピンラベ

ル化プリン (**A***、**I***) 及び、②相補鎖内の向かい合う塩基とラジカル部が直接水素結合可能な新規スピンラベル化ヌクレオシド (**CN***) の創出を行う。新規スピンラベル化プリンはプリン塩基に富む配列が持つ構造的、機能的特性を ESR を用いて明らかにするためのプローブとして期待する。また (2) DNA 鎖内電子移動を利用した核酸構造、機能研究のためのレドックス活性を持つ核酸の開発を行う。

図1. ラジカル直結型ヌクレオシド



3. 研究の方法

(1) スピンラベル化核酸を用いた DNA 構造の検出 ① 2-*N-tert*-ブチルアミノキシルアデノシン **A***、2-*N-tert*-ブチルアミノキシルイノシン **I***を導入した ODN を合成し、**A***、**I***の対合する位置に異なる塩基をもつ相補鎖と二本鎖を形成した。融解温度 (T_m 値) から示唆される二本鎖の安定性と ESR を用いて評価した **A***の運動性との相関を調べた。

② **A***を G 等価体として 5' -(dCG)₉-3' に導入した。異なる塩濃度で B 型、Z 型構造を形成し ESR スペクトルと構造の相関を調べた。

③ アデノシンとラジカル部で直接水素結合可能と思われる **CN***を合成研究を行った。これを導入した ODN のスピンラベル化核酸としての機能を評価する。

(2) **A***とそのヒドロキシルアミン体 (**A-NOH**) との相互変換というレドックス特性を核酸構造研究に利用するため、**A-NOH** を導入した ODN への光照射による **A***への酸化及び **A-NOH** と 2-アミノプリン (**amp**) を導入した ODN への光照射による **A***から **amp**への電子移動

を介した A* への酸化を検討した。一本鎖、二本鎖での酸化の効率を比較した。

4. 研究成果

(1) ① A* を導入した 15-mer ODN、5'-CGC-TGA-XA*X-AGT-CGC-3' を用いて、ESR による A* の運動性評価を行った (表 1)。A* の両側 (X) がピリミジン、プリン の 8 種の ODN に対し、Pu-Y-Pu、Py-Y-Py (Y = A, C, G, T) の相補鎖を用いて二本鎖を形成した。スピンラベル化核酸の ESR スペクトルでの中央ピークと低磁場側ピークの高さ比 (h_x/h_0 値) が小さいほど安定ラジカルの自由度が小さいという報告を参考にし、融解温度 (T_m 値) と h_x/h_0 値との相関を調べ、二本鎖中での A* の運動性評価が可能か調べた。Py-A*-Py 配列では T_m 値の差は小さいが、Y が C 又は G の時 T_m 値が高く、A の時 T_m 値が低い傾向がみられた。T-A*-T 配列、C-A*-C 配列では T_m 値が高い Y = C が小さな h_x/h_0 値を示し T_m 値が高い配列では A* の自由度が小さく、 h_x/h_0 値は小さいと関連付けることができた。C-A*-T 配列、T-A*-C 配列では Y = C が大きな h_x/h_0 値を示し、 T_m 値との関連付けはできなかった。Pu-A*-Pu 配列のうち、A-A*-A、A-A*-G 配列では Y が T、C、A は同程度の T_m 値を示し G は T_m 値が低かった。T、C では h_x/h_0 が大きく、A、G では小さかったことから、A* はかさ高くないピリミジンに対合する時自由度が大きく、かさ高いプリンに対合する時自由度が小さいと説明できた。G-A*-A、G-A*-G 配列は Y が C 又は G、A、T の順に T_m 値が高かった。 T_m 値の大きな C 又は G では h_x/h_0 が小さく、A、T の順に h_x/h_0 が大きくなった。以上の結果から、Pu-A*-Pu 配列では A* が組み込まれた配列内での両隣の塩基との立体的相互作用、相補鎖中の対合する塩基との相互作用の両方が A* の自由度に影響を与えることが示唆された。今回用いた全配列中 A-A*-A、A-A*-G 配列を除いて、C 又は

G が高い T_m 値を示したことから、現在特定はできていないが A* との相互作用が存在する可能性がある。

表 1. 5'-PyA*Py/3'-PuXPu、5'-PuA*Pu/3'-PyXPy の T_m 値と h^+/h^0 値

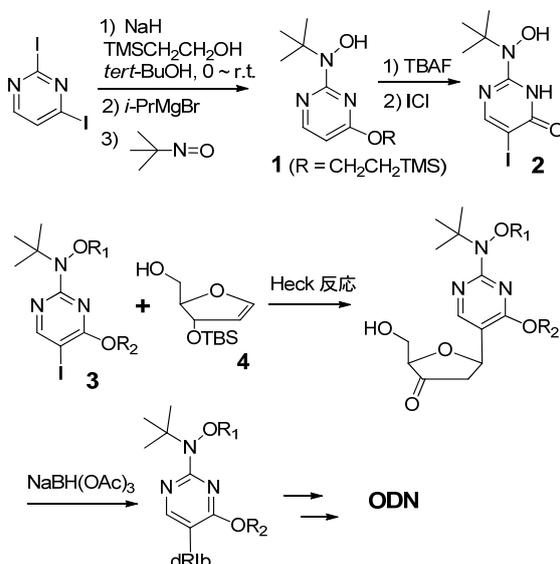
5'-PyA*Py			5'-PuA*Pu		
5'-TA*T/3'-AXA			5'-AA*A/3'-TXT		
X	$T_m(^{\circ}\text{C})$	h^+/h^0	X	$T_m(^{\circ}\text{C})$	h^+/h^0
C	54	0.77	T	50	0.97
G	53	0.77	C	50	0.98
T	53	0.78	A	50	0.94
A	51	0.86	G	48	0.89
5'-CA*C/3'-GXG			5'-AA*G/3'-TXC		
X	$T_m(^{\circ}\text{C})$	h^+/h^0	X	$T_m(^{\circ}\text{C})$	h^+/h^0
C	58	0.89	T	52	0.99
G	58	0.90	C	52	0.99
T	55	0.90	A	52	0.94
A	54	0.90	G	50	0.93
5'-CA*T/3'-GXA			5'-GA*G/3'-CXC		
X	$T_m(^{\circ}\text{C})$	h^+/h^0	X	$T_m(^{\circ}\text{C})$	h^+/h^0
C	61	0.98	G	63	0.85
G	59	0.92	C	60	0.90
T	59	0.91	A	56	0.91
A	58	0.94	T	54	0.93
5'-TA*C/3'-AXG			5'-GA*A/3'-CXT		
X	$T_m(^{\circ}\text{C})$	h^+/h^0	X	$T_m(^{\circ}\text{C})$	h^+/h^0
G	55	0.95	C	60	0.91
T	54	0.94	G	55	0.90
C	54	0.97	A	54	0.93
A	52	0.91	T	52	0.98

② 5'-(CG)₉-3' の中央と 5' 側に 4 個ずれた位置に A* を導入した。これらの ODN は低 NaCl 濃度で B 型、高 NaCl 濃度で Z 型構造をとることが CD スペクトルにより確認

できた。Z型構造の ESR スペクトルはいずれも h_x/h_0 値が小さく、低い運動性を示した。Z型構造はB型に比べリジッドな構造をとることが知られており、ESR スペクトルと構造との間に相関があると考えられる。

③相補鎖中の向かい合うアデニンとトラジカル部が直接水素結合可能な 2-*N-tert*-ブチルアミノキシルピリミジンC-ヌクレオシド、 CN^* の合成を試みた(図2)。

図2



2,4-ジヨウドピリミジンから *N-tert*-ブチルヒドロキシルアミノ基を導入した 1 を合成し、更にヨウ素体 2 へと変換した。化合物 2 に適当な保護基を導入し、得られる 3 とグリカール 4 との Heck 反応により C-ヌクレオシドの合成を試みた。保護基としてジフェニルカルバモイル基 ($R_1, R_2 = -CONPh_2$) を用いた場合、Heck 反応及びそれに引き続く還元が立体選択的に進行し、保護基を持つC-ヌクレオシドの合成に成功した。更にホスホロアミダイト体への変換後 ODN への組みこみに成功した。得られた ODN の塩基性条件での脱保護により CN^* を導入した ODN の生成が MALDI-TOFMASS では

示唆されたが、脱保護の効率が低く、保護基の検討が必要である。

(2) A^* とそのヒドロキシルアミン体 (A^{NOH})との相互変換というレドックス特性を核酸構造研究に利用するため、 A^{NOH} を導入した ODN への光照射による A^* への酸化及び A^{NOH} と 2-アミノプリン (A^{AmP})を導入した ODN への光照射による A^* から A^{AmP} への電子移動を介した A^* への酸化を検討した。 A^{NOH} のみを導入した ODN 5 (5' -ATA-CGG-CAA-AAA-AAA^{NOH}-GCT-CGT-3'), A^{NOH} と 2-アミノプリンを異なる間隔で導入した ODN 6 (5' -ATA-CGG-CAA-AAA-^{AmP}AAA^{NOH}-GCT-CGT-3'), 及び 7 (5' -ATA-CGG-CAA-^{AmP}AAA^{NOH}-GCT-CGT-3') を合成し、一本鎖、 A^* と対合する位置に T と導入した相補鎖との二本鎖に 320 nm の光を照射した。一本鎖ではどの ODN も同程度の効率で A^{NOH} から A^* への酸化が進行した。一方二本鎖では 5 ではほとんど酸化は進行しなかったが、6 では効率よく進行した。また 7 では酸化は進行したが、効率は 6 より低かった。これらの結果から二本鎖では 2-アミノプリンが光励起され電子受容体として機能し、 A^{NOH} からの電子移動が進行し A^* が生成したことが示唆された。2-アミノプリンと A^{NOH} 間の距離が短い方が酸化効率が高いという結果が得られた。

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 1 件)

Y. Higuchi, M. Aso, R. Harada, N. Koga, H. Suemune, Evaluation of mobility of 2-*N-tert*-butylaminoxyladenosine incorporated into oligodeoxynucleotide, *Nucleic Acids Symposium Series*, 査読無, 53, 2009, 185-186.

[学会発表] (計 8 件)

①樋口祥隆、麻生真理子、原田涼子、古賀登、末宗 洋、スピン直結型新規スピンラベル化核酸の合成とESRによる運動性評価、第35回反応と合成の進歩シンポジウム、2009年11月17日、金沢。

②樋口祥隆、麻生真理子、原田涼子、古賀登、末宗 洋、スピンラベル化核酸の運動性評価-配列依存性の検討-、日本薬学会第130年会、2010年3月29日、岡山。

③佐藤光、樋口祥隆、麻生真理子、末宗 洋、新規スピンラベル化ピリミジン C-ヌクレオシド誘導体の合成と機能研究、日本薬学会第131年会、2011年3月31日、静岡。

[その他]

ホームページ等

<http://sekkei.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

麻生 真理子 (ASO MARIKO)

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：30201891

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：