

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790108

研究課題名(和文) 核酸の生合成経路を標的とする酵素応答性抗がん剤及び蛍光プローブの創製

研究課題名(英文) Development of enzyme-responsive anticancer agents and fluorescent probes targeting the biosynthesis of nucleotides

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) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核酸の生合成経路に見られるカルボニル基がリン酸化されたイノシンの化学修飾アナログの合成法の開発を試み、近年我々が独自に開発した求核性が極めて小さい酸性活性化剤CMMTを応用することで、種々の官能基を持つリン酸ジエステルをイノシンのカルボニル酸素原子上に導入する手法の開発に世界で初めて成功した。更に、この様なイノシン6-リン酸誘導体の水溶液中での安定性について評価したところ、pH 7付近ではほとんど加水分解されないことを見出した。この様な酵素反応中間体アナログは、核酸の生合成経路を標的とする生物学的、創薬化学的研究への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a novel method to synthesize chemically modified analogs of inosine 6-phosphates, which are observed in the biosynthesis of nucleotides. For this purpose, we applied a non-nucleophilic acidic activator, N-(cyanomethyl)dimethylammonium triflate (CMMT), that we developed recently, to the phosphorylation of carbonyl oxygen by the phosphoramidite method, which enabled us to synthesize inosine 6-phosphate diesters bearing various substituents on the phosphate. Furthermore, we evaluated the stability of the inosine 6-phosphate diesters to find that they were stable in neutral aqueous solutions. These molecules will be useful for biological and pharmaceutical studies of the biosynthesis of nucleotides.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

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 イノシン 蛍光標識化

## 1. 研究開始当初の背景

核酸の生合成経路には、カルボニル基がリン酸化によって活性化され、アミノ基などに変換される反応が複数存在する。例えば、アデニコハク酸合成酵素は、カルボニル基がリン酸化された化合物 ( $O^6$ -phosphoryl-IMP) を中間体としてイノシンリン酸 (IMP) からアデニコハク酸を合成する。アデニコハク酸はアデノシン三リン酸 (ATP) や DNA、RNA 等の生合成に欠かせないアデノシンリン酸 (AMP) の前駆体である。また、シチジン三リン酸 (CTP) 合成酵素は、ウリジン三リン酸 (UTP) のウラシル 4 位カルボニル基がリン酸化された  $O^4$ -phosphoryl-UTP を中間体として CTP を合成する。CTP は核酸やリン脂質の生合成に必須であり、生物の生存には欠かせない。これらの酵素は代謝系の根幹を担うため、その反応機構の解明は学術的に極めて重要である。加えて、これらの酵素はがん細胞における活性が正常細胞と比較して高いことが知られており、その作用機序の解明と強力な阻害剤の開発は、新しい抗がん剤の開発につながると期待されている。また、出血熱ウイルスや、マラリア原虫、アフリカ睡眠病を引き起こす寄生虫など、種々の病原性ウイルスや寄生虫による感染症治療薬の開発への展開も期待されている<sup>1,2</sup>。これらの酵素反応の活性中間体である核酸塩基のカルボニル基がリン酸化されたヌクレオチドは、酵素反応機構の解明や阻害剤の開発の鍵を握ると考えられる。これらの活性中間体が入手できれば、酵素反応の速度論解析、酵素-中間体相互作用の解析、X線結晶構造解析などによる酵素反応機構の解明が可能になると期待されるためである。加えて、活性中間体の化学修飾アナログが化学合成によって入手できれば、同様に酵素反応機構の解明に役立つだけでなく、酵素の阻害剤などとしての応用も期待される。しかしながら、これらの活性中間体は、酵素の活性部位で生成し瞬時に次の反応に用いられるため、生体からの単離はほぼ不可能である。加えて、核酸塩基のカルボニル基のリン酸化反応は確立されておらず、これらの活性中間体やその化学修飾アナログの化学合成による入手も困難であった。

## 2. 研究の目的

このような背景の元、本研究では、まずこれまで確立されていなかった核酸塩基カルボニル基のリン酸化反応の開発を行った。更に、上述の核酸塩基カルボニル基がリン酸化された酵素反応中間体やその化学修飾アナログの合成法の開発を最終目的とし、アデニコハク酸生合成中間体であるカルボニル基がリン酸化されたイノシンリン酸、及びそのリン酸部位に化学修飾を施したアナログを最初の合成標的とする検討を行った。アデニコハク酸の生合成経路は、抗がん剤や抗マラリア薬開発の標的として特に注目を集めているためである。この生合成中間体の活性リン酸部

位に蛍光色素や抗がん剤、抗マラリア薬を化学的に結合した分子が開発できれば、アデニコハク酸合成酵素による脱リン酸化にตอบสนองし活性が発現する新しい酵素応答性蛍光プローブや分子標的薬としての応用が期待される。

## 3. 研究の方法

本研究の目的化合物の合成に必要な核酸塩基のカルボニル基のリン酸化は、既存の手法では極めて困難であり、現在までに達成された例は無い。これは、図 1 に示すイノシン 1 のリン酸化を例にとると、ホスファイト中間体 4 が求核剤に対して極めて不安定であり、既存のリン酸化の条件では瞬時に分解するからである。このことから、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る。一方、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 (CMPT, 3) を開発し、光学的に純粋なリン原子修飾オリゴ核酸の合成を達成している<sup>3</sup>。本研究では、我々が独自に開発したこの新しいリン酸化反応を核酸塩基カルボニル基のリン酸化に応用し、イノシンの核酸塩基カルボニル基のリン酸化反応の確立を目指した。

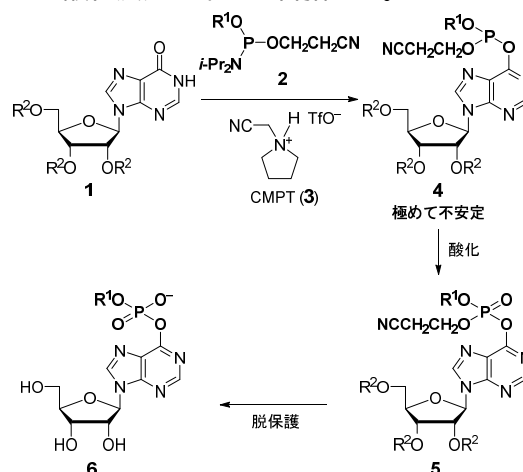


図 1. 活性化剤 CMPT (3) を用いる核酸塩基のカルボニル基のリン酸化

## 4. 研究成果

まず始めに、水酸基を保護したイノシン 1 に対し、CMPT 3 の存在下 bis(2-cyanoethyl) N,N-diisopropylphosphoramidite を反応させた (図 2)。生じたホスファイト中間体 7 を系中で CSO<sup>4</sup> によって酸化してホスフェイト中間体 8 とした後、DBU と MeNO<sub>2</sub> によって処理したところ、イノシンのカルボニル基がリン酸ジエステル化された化合物 9 が良好な収率で得られた。これは、核酸塩基のカルボニル基がリン酸ジエステル化された化合物の初めての単離例である。なお、MeNO<sub>2</sub> は系中で生じるアクリロニトリルの捕捉剤として必要であり、添加しない場合アクリロニトリルのヒポキサンチンへの付加が見られた。また、この反応で活性化剤として求核性の

1*H*-tetrazole を用いたところ、化合物 **9** の単離収率は 35% に低下した。このことから、当初の仮説通り、求核性が小さい活性化剤が核酸塩基カルボニル基のリン酸化の鍵であることが分かる。更に、酸化剤も求核性が小さい CSO を用いる必要があり、求核性の *t*-BuOOH を用いると化合物 **7** が完全に分解して最終生成物 **9** は得られなかった。

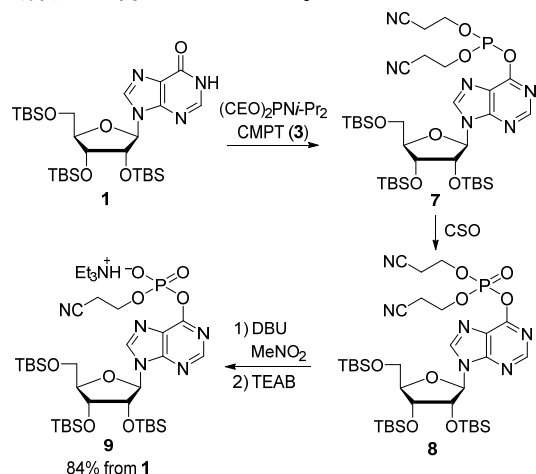
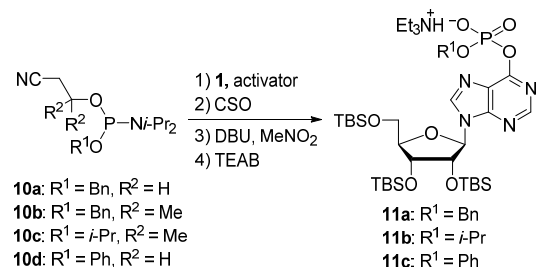


図 2. 活性化剤 CMPT (**3**) を用いる核酸塩基のカルボニル基のリン酸化

以上の検討によって、イノシンの核酸塩基カルボニル基を効率良くリン酸ジエステル化する反応条件を見出したため、次にリン酸ジエステル部位に様々な置換基を導入する手法の開発を試みた。置換基として第一級アルキル基 (Bn)、第二級アルキル基 (*i*-Pr)、アリール基 (Ph) をモデルとして選択し、表 1 に示すホスホロアミダイト **10a-d** を合成した。まず、ホスホロアミダイト **10a** を活性化剤 CMPT **3** を用いてイノシン **1** と反応させ、酸化、脱保護を経て目的化合物 **11a** を合成したところ、リン酸部位に Bn 基ではなく 2-cyanoethyl 基が残った化合物 **9** との混合物が得られた (entry 1)。これは、反応の進行に従ってホスホロアミダイトから脱離した *i*-Pr<sub>2</sub>NH による脱アルキル化であると考えられたため、活性化剤として CMPT より酸性度が少し高い CMMT<sup>5</sup> を用い、反応系中における *i*-Pr<sub>2</sub>NH の求核性を弱めることによって、この脱アルキル化が抑制されないかと考えた。実際に、CMMT を用いて同様の反応を行ったところ、副生成物 **9** の生成は 1% にまで抑制された (entry 2)。また、CMMT はより活性が高いことから反応の加速も見られた。更に、2-cyanoethyl 基より迅速に除去される 1,1-dimethyl-2-cyanoethyl 基<sup>6</sup> を用いたところ、副生成物 **9** の生成は完全に抑制され、目的化合物 **11a** が良好な収率で単離された (entry 3)。同様の CMMT と 1,1-dimethyl-2-cyanoethyl 基を用いる手法によって、リン酸部位に *i*-Pr 基を持つ化合物 **11b** も良好な収率で合成できた (entry 4)。なお、リン酸部位に Ph 基を持つ化合物 **11c** は、前述の脱アルキル化の心配が無いいため、2-cyanoethyl 基を保護基とすること

が可能であった (entry 5)。加えて、リン酸部位にエチニル基や TokyoGreen 蛍光色素<sup>7</sup> を持つ化合物 **11d,e** (図 3) の合成にも成功した。化合物 **11d** のエチニル基は、Huisgen 環化付加による様々な誘導化への応用が期待される。また、化合物 **11e** は、アデニロコハク酸合成酵素に反応する蛍光プローブへの応用が期待される。

表 1. イノシン 6-リン酸誘導体 **11a-c** の合成



entry	<b>10</b>	activator	time for step 1	product(s)
1	<b>10a</b>	CMPT	1 h	<b>11a</b> , 45% <b>9</b> , 18%
2	<b>10a</b>	CMMT	15 min	<b>11a</b> , 72% <b>9</b> , 1%
3	<b>10b</b>	CMMT	15 min	<b>11a</b> , 87%
4	<b>10c</b>	CMMT	15 min	<b>11b</b> , 82%
5	<b>10d</b>	CMMT	15 min	<b>11c</b> , 88%

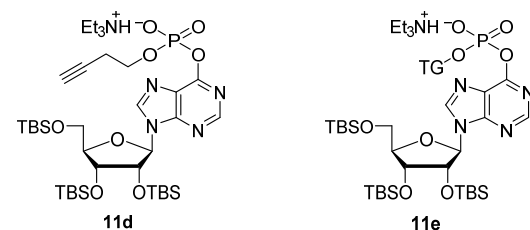


図 3. イノシン 6-リン酸誘導体 **11d-e**. TG = TokyoGreen fluorescent probe

最後に、水酸基の脱保護によるイノシン 6-リン酸 **12a-c** の合成を試みた (図 4)。化合物 **11a-c** を TBAF 処理し、逆相 HPLC によって精製したところ、中程度の収率ながら目的化合物 **12a-c** の単離に成功した。更に、これらの化合物の水溶液中での安定性を評価すべく、化合物 **12c** をモデルとした実験を行った。即ち、pH 4.4、6.8、8.7 の水溶液中、37 °C でインキュベーションしたところ、pH 4.4 では徐々に加水分解され、3 時間で 28% がイノシンへと変化した。pH 6.8、8.7 では 3 時間後もまったく加水分解は観察されなかった。このことから、カルボニル基がリン酸ジエステル化されたイノシンは中性に近い pH の水溶液中では比較的安定であり、酵素反応機構に関する解析や酵素阻害剤の開発に向けた研究への応用が可能であると言える<sup>8</sup>。

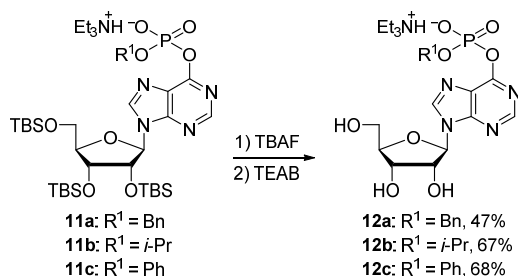


図 4. イノシン 6-リン酸 **11a-c** の脱保護

#### 参考文献

- Chang, Y.-F.; Carman, G. M. *Prog. Lipid Res.* **2008**, *47*, 333–339.
- Honzatko, R. B.; Fromm, H. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *370*, 1–8.
- Oka, N.; Wada, T. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5829–5843.
- Wada, T.; Mochizuki, A.; Sato, Y.; Sekine, M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7123–7126.
- Oka, N.; Wada, T.; Saigo, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8307–8317.
- (a) Marugg, J. E.; Dreef, C. E.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1984**, *103*, 97–98. (b) Sekine, M.; Tsuruoka, S.; Imura, S.; Wada, T. *Nat. Prod. Lett.* **1994**, *5*, 41–46.
- Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4888–4894.
- Oka, N.; Morita, Y.; Itakura, Y.; Ando, K. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11503–11505.

#### 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 10 件)

- Solid-phase synthesis of *P*-boronated oligonucleotides by the *H*-boranophosphonate method. Uehara, S.; Hiura, S.; Higashida, R.; Oka, N.; Wada, T. *J. Org. Chem.* **2014**, in press. 査読有 DOI:10.1021/jo500185b
- Synthesis of inosine 6-phosphate diesters via phosphitylation of the carbonyl oxygen. Oka, N.; Morita, Y.; Itakura, Y.; Ando, K. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11503–11505. 査読有 10.1039/C3CC46617E
- Glycosylation of alcohols using glycosyl boranophosphates as glycosyl donors. Tatsumi, S.; Matsumura, F.; Oka, N.; Wada, T. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3731–3734. 査読有 10.1016/j.tetlet.2013.04.032
- Stereocontrolled synthesis of dinucleoside phosphorothioates using a fluororous tag. Oka, N.; Murakami, R.; Kondo, T.; Wada, T. *J. Fluorine Chem.* **2013**, *150*, 85–91. 査読有 10.1016/j.jfluchem.2013.03.013
- Purification and comparison of native and recombinant tRNA-guanine transglycosylases

from *Methanosarcina acetivorans*. Nomura, Y.; Onda, Y.; Ohno, S.; Taniguchi, H.; Ando, K.; Oka, N.; Nishikawa, K.; Yokogawa, T. *Protein Expr. Purif.* **2013**, *88*, 13–19. 査読有 10.1016/j.pep.2012.11.009

- Stereocontrolled solid-phase synthesis of phosphorothioate oligoribonucleotides using 2'-*O*-(2-cyanoethoxymethyl)-nucleoside 3'-*O*-oxazaphospholidine monomers. Nukaga, Y.; Yamada, K.; Ogata, T.; Oka, N.; Wada, T. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7913–7922. 査読有 DOI:10.1021/jo301052v
- Synthesis of nucleoside 5'-boranophosphorothioate derivatives using an *H*-boranophosphonate monoester as a precursor. Oka, N.; Takayama, Y.; Ando, K.; Wada, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4571–4574. 査読有 10.1016/j.bmcl.2012.05.093
- Stereocontrolled synthesis of oligodeoxyribonucleoside boranophosphates by an oxazaphospholidine approach using acid-labile *N*-protecting groups. Iwamoto, N.; Oka, N.; Wada, T. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4361–4364. 査読有 10.1016/j.tetlet.2012.06.015
- Synthesis of 2-pyridylphosphinate and thiophosphinate derivatives by nucleophilic aromatic substitution of *N*-methoxypyridinium tosylates. Oka, N.; Ito, K.; Tomita, F.; Ando, K. *Chem. Lett.* **2012**, *41*, 1630–1632. 査読有 10.1246/cl.2012.1630
- Recent progress in the synthesis of glycosyl phosphate derivatives Oka, N.; Sato, K.; Wada, T. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2012**, *24*, 152–168. 査読有 10.4052/tigg.24.152

[学会発表](計 18 件)

- 酒井 智紀・岡 夏央・小里 建喬・安藤 香織 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 日本化学会第 94 春季大会 2014.3.30 名古屋大学
- 清水 陽介・岡 夏央・安藤 香織・大野 敏・横川 隆志 7-エチニル-7-デアザグアニンの合成法の開発 日本化学会第 94 春季大会 2014.3.30 名古屋大学
- 梶野 麟・岡 夏央・安藤 香織 ヨウ化糖をグリコシルドナーとする -リボフラノシドの合成 日本化学会第 94 春季大会 2014.3.28 名古屋大学
- 岡 夏央 キラルリン(III)原子の不斉制御による リン原子修飾オリゴ核酸の立体選択的合成(招待講演)日本薬学会第 134 年会 2014.3.28 熊本大学黒髪キャンパス
- 岡 夏央 リン原子修飾オリゴ核酸の立体選択的合成法の開発(依頼講演)合同シンポジウム - 日本プロセス化学会

- 2013 ウィンターシンポジウム・新学術領域「有機分子触媒による未来型分子変換」第3回公開シンポジウム - 2013.11.29 仙台市民会館
6. Natsuhisa Oka, Yasuhiro Morita, Yuta Itakura, Kaori Ando Synthesis of O6-phosphoryl inosine derivatives by phosphitylation of carbonyl oxygen The 40th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2013) 2013.11.14 Kanagawa University
  7. 岡 夏央 リン原子修飾オリゴ核酸の立体選択的合成法の開発(依頼講演)第44回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2013.11.3 静岡大学浜松キャンパス
  8. 梶野 麟・岡 夏央・竹内 薫・永川 晴奈・安藤 香織 ヨウ化糖を用いるアルコールの選択的リボフラノシル化反応の開発 第43回複素環化学討論会 2013.10.17 長良川国際会議場
  9. 岡 夏央・梶野 麟・竹内 薫・永川 晴奈・安藤 香織 ヨウ化糖をグリコシルドナーとする選択的リボフラノシル化反応の開発 第7回バイオ関連化学シンポジウム 2013.9.28 名古屋大学
  10. Natsuhisa Oka, Kaoru Takeuchi, Haruna Nagakawa, Rin Kajino, Kaori Ando  $\alpha$ -Selective ribofuranosylation of alcohols using a ribofuranosyl iodide as a glycosyl donor Nagoya Symposium 2013 2013.5.23 Nagoya University
  11. 岡 夏央 創薬を指向したホウ素修飾核酸および選択的リボフラノシドの効率的合成法の開発 Biotech 2013 2013.5.10 東京ビッグサイト
  12. 森田 康裕・岡 夏央・安藤 香織 O<sup>6</sup>-ホスホリルイノシン誘導体の合成法の開発 日本化学会第93春季大会 2013.3.24 立命館大学びわこ・くさつキャンパス
  13. 伊藤 光佑・岡 夏央・安藤 香織 2-ピリジルホスフィン酸誘導体の合成法の開発とルイス塩基触媒としての応用 日本化学会第93春季大会 2013.3.23 立命館大学びわこ・くさつキャンパス
  14. 竹内 薫・岡 夏央・永川 晴奈・安藤 香織 ヨウ化糖を用いる選択的リボフラノシル化反応の開発 日本化学会第93春季大会 2013.3.23 立命館大学びわこ・くさつキャンパス
  15. Natsuhisa Oka, Yuji Takayama, Kaori Ando, Takeshi Wada Synthesis of Nucleoside 5'-(P-Borano)phosphate Derivatives Using Nucleoside 5'-H-Boranophosphonates as Precursors The 39th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2012) 2012.11.16 Nagoya University
  16. 伊藤 光佑・岡 夏央・安藤 香織 2-ピリ

ジルホスフィン酸誘導体の合成法の開発 第43回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2012.11.11 名古屋工業大学

17. 竹内 薫・岡 夏央・永川 晴奈・安藤 香織 ヨウ化糖を用いる選択的リボフラノシル化反応の開発 第43回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2012.11.10 名古屋工業大学
18. 森田 康裕・岡 夏央・安藤 香織 O<sup>6</sup>-ホスホリルイノシン誘導体の合成法の開発 第43回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2012.11.10 名古屋工業大学

〔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

[http://www1.gifu-u.ac.jp/~ando\\_ap/](http://www1.gifu-u.ac.jp/~ando_ap/)

## 6. 研究組織

### (1) 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