

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670004

研究課題名(和文) 生体内レドックス状態を反映する各種8位酸化グアノシンの選択的捕捉分子の開発

研究課題名(英文) Development of recognition molecules for 8-oxidized guanosine derivatives

研究代表者

佐々木 茂貴 (Sasaki, Shigeki)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10170672

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)：2'-Deoxyguanosine から生じる 8-oxo-dGや8-nitro-dGは代表的な損傷塩基であり、酸化ストレスや疾患リスクのマーカーである。一方ではROSやRNSにより8-thio-dGや8-halo-dGなどが生じる。本研究では、レドックス異常を反映する8位酸化グアノシン体の認識構造の違いを識別する分子の開発を目指した。その結果、水中8-oxo-dGを検出できるシリカゲルデバイスを開発した。また、水中で8-oxo-dGトリリン酸体を選択的に認識する人工レセプターの開発にせいこうした。さらに、8-ニトログアノシン、8-チオグアノシンと共有結合的に捕捉する分子の開発に成功した。

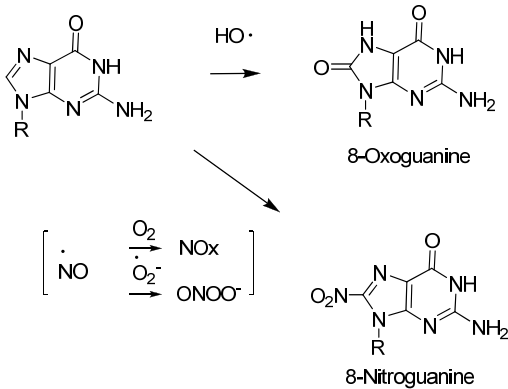
研究成果の概要(英文)：8-Oxidized guanosine derivatives such as 8-oxo-, 8-nitro-, 8-thio- or 8-halo-2'-deoxyguanosine are markers of redox stage of cells. In this study, we have attempted to develop new recognition molecules for these 8-oxidized guanosine derivatives. In an approach, silica gels were chemically modified with 8-oxo-G clamp and were shown to selectively detect 8-oxo-dG in water. Artificial receptor molecules for 8-oxo-dG triphosphate have been successfully developed by connecting the cyclen-zinc complex with the phenoxazine skeleton. In particular, the linker structure between the cyclen-zinc complex and the phenoxazine skeleton play an important role for selectivity for 8-oxo-dG triphosphate. Development of selective molecules for covalent capture of 8-nitro-2'-deoxyguanoine was also successful using the thiol-containing molecules named 8-nitroG grasp. The chloride leaving group was introduced to the same skeleton instead of the thiol group, and shown to covalently capture 8-thio-dG.

研究分野：化学系薬学

 キーワード：8-オキソグアノシン 8-オキソグアノシントリリン酸 8-ニトログアノシン 8-チオグアノシン
 共有結合的捕捉 認識分子 蛍光検出 酸化損傷塩基

1. 研究開始当初の背景

がんや糖尿病などの疾患には複数遺伝子の変異が含まれている。このような変異は後天的に誘起されるもので、環境や食物に含まれるアルキル化剤や呼吸に伴って発生する活性酸素種(ROS)などが核酸塩基と反応しアルキル化核酸や酸化核酸を生じることによって誘起される。これらの損傷核酸は修復システムによって効果的に修復されるが、修復されなかった部位が結果的に変異を誘起する[1]。近年、一酸化窒素(NO)が遺伝子に損傷を与えることが分かってきた[2]。NOはinducible NO synthase (iNOS)によって合成され、細胞内情報伝達や細胞保護剤として重要な役割を果たしている。一方、過剰産生されたNOは活性酸素種(ROS)や酸素と反応することによって活性窒素種(RNOS)に変化し、guanine塩基をニトロ化し8-nitro-d(dG)を生成する[3]。従って、NOは活性酸素と同様に内在性の発がん性物質として捉えられ、細胞が受けている発がんストレスの指標としての評価されている。また、8-nitro-G 3',5'-モノリン酸はタンパク質表面のチオール基と反応し、新しい細胞内情報伝達分子として機能するという興味深い仮説も提案されている[4]。現在、8-nitro-G(dG)の分析はモノマーや核酸を酵素加水分解したモノマーをHPLC-MSやGC-MS、抗体を用いたアフィニティーカラムによる濃縮操作などを組み合わせで行われている[5]。8-nitro-G(dG)の機能の解明には、さらに簡便で特異的な検出法や分析法などの研究ツールの開発が望まれている。



参考文献[1] Lombard, D. B. *et al*, *Cell*, **120**, 497-512 (2005). [2](a) Masuda, M. *et al*, *Chemico-Biological Interactions* **139**, 187-197 (2002), (b) Yoshitake, J. *et al*, *J. Virol.* **2004**, 8709-8719. [3] Hiraku, Y. *et al*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* ISSN 0077-8923 (2010). [4] Akaike, T. *et al* *Nitric Oxide* **23** 166-174 (2010). [5] Sawa, T. *et al*, *Free Rad. Biol. & Med.* **40**, 711-720 (2006).

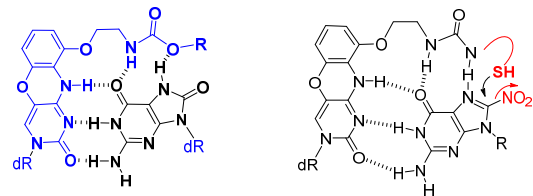
2. 研究の目的

我々はすでにフェノキサジンを基本ユニットとする carbamate 型認識分子(oxoG-clamp:1)を用いて水溶液中の8-oxodGの検出法の開発に成功した[6]。さらに、DNA

中の8-oxodGの配列特異的に検出できる蛍光性認識分子Adapを開発した[7]。これらの分子は塩基のWatson-Crick部位とHoogsteen部位の両方に認識部位をもつ特徴を有している。本研究ではこれらの知見を展開し、一つには水中で8-oxo-GTPを検出できるプローブ開発への展開、さらには、8-nitro-G(dG)に対する新しい蛍光性認識分子を開発する。8-nitro-G(dG)のニトロ基の高い脱離能に着目し、錯体内でニトロ基置換反応を行い共有結合を形成することにより強固に8-nitro-G(dG)を捕捉する開発し、生体サンプル中の8-nitro-G(dG)の高感化検出法の確立を目指す。

参考文献 [6] Nakagawa, O.; Ono, S.; Li, Z.; Tsujimoto, A.; Sasaki, S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4500-4503 (2007). [7] Taniguchi Y, Kawaguchi R, Sasaki S., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 7272-7275 (2011). [8] Li, Z.; Nakagawa, O.; Koga, Y.; Taniguchi, Y.; Sasaki, S. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 3992-3998 (2010). [9] Koga, Y.; Fuchi, Y.; Nakagawa, O.; Sasaki, S. *Tetrahedron* **67**, 6746-6752 (2011).

3. 研究の方法



8-Oxo-dG認識分子(1) チオール基を有する分子(2)

図1. OxoG-clamp (1) および nitroG-Grasp (2)の基本構造

これまで我々は phenoxazine を基本にした認識分子の中で、carbamate 型分子による8-oxo-dGの選択的蛍光分子(1)を開発した[6]。一方、urea 型分子はdG選択的である[8]。興味深いことに、わずか1個の水素結合の有無で8-oxo-dGとdGを効果的に区別される。8-NO₂-dGの水素結合様式はdGと同じであるため、urea 型分子での認識が可能である。予備的な検討で、urea 型分子は実際に8-NO₂-dGと安定な錯体を形成すること、さらにニトロ基の電子吸引力により8-NO₂-dGはdGに比べて極めて高い蛍光消光力を示すこと、蛍光によるdGとの区別が可能であること、などが分かった。そこでこの錯体構造を基盤として、チオール基など高い求核剤をurea基の末端に導入し、置換反応により共有結合を形成する分子(2)を設計した。本研究では8-NO₂-dGの捕捉反応を詳細に検討し、効率的なurea型チオール化合物(2)を開発する。最終的には、リン酸基を捕捉するユニットを導入した化合物を開発し、細胞内における8-NO₂-GTPや8-NO₂-GMPの特異的な検出法の確立を目指す。

分子設計は、反応性ユニット部分、リン酸

認識部分、ヌクレオシド体捕捉、の3点のそれぞれについて行った。

反応基ユニット Phenoxazine 骨格に urea 型リンカーを結合することによって 8 位酸化グアノシン 7 位窒素への水素結合供与により安定な錯体を形成させ、共有結合的に捕捉するため、末端に反応基を導入した。8 位ニトロ基置換の目的ではプロパンチオール基が有効であることがすでに確認されている。反応性向上のため、コンフォメーション固定化やチオール pKa を念頭に分子設計を検討した。また、8 位チオール体に対する求電子反応基にはスルフォニル基などの脱離基の導入を検討した。蛍光消光団をスルフォニル基を介して導入し、8 位チオールによる脱離により消光作用の解消による蛍光強度増大を目指した。

リン酸基結合部位:リン酸 カチオン相互作用と疎水性相互作用を含む分子認識場が構築されると、水中でも水素結合による分子認識が可能になる。予備的検討で、2'-デオキシリボースの 5' 位にサレン垂鉛錯体 [7] を結合した oxo-dG clamp が 8-oxo-GTP と選択的錯体を形成できることを確認したため、水中での認識のためにさらに構造最適化を検討した。

シリカ表面への固定化:アセチレン結合 phenoxazine 体をシリカ表面上に固定化し、表面修飾シリカを合成し認識能を評価した。

4. 研究成果

本研究課題の基盤となる研究で 8-nitroG 捕捉分子として nitroG-Grasp と名付けた分子を開発し、有機溶媒中ではあるが効率的な 8-nitroG 捕捉反応の開発に成功し、メチレン 3 個のスペーサーを持つ C3-nitroG-Grasp (3b) が最も効率的な反応を示した (図 3)。この高い反応性についての化学的な根拠を解明するため、この捕捉反応を速度論的に詳細に解析した。その結果、反応性はチオールの pKa (エンタルピー項) およびエントロピーに依存していることが示された (発表論文 1)。

反応機構の解析に基づき、反応性向上のため

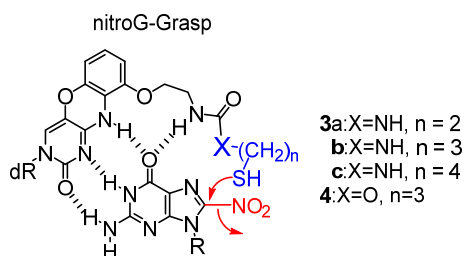


図 2 . nitroG-Grasp 分子構造

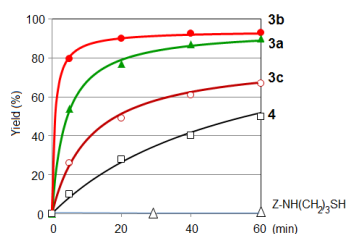


図 3 . 各分子の反応性比較

めにリンカー部分の構造を変えたものを合成し、反応性を調べた。その結果、新規の nitroG-Grasp (5, 6, 7) はいずれも 3b よりも高い反応性を示したが、特に 6 と 7 は水性溶媒中でも優れた反応性を示した (図 5) (発表論文 3)。

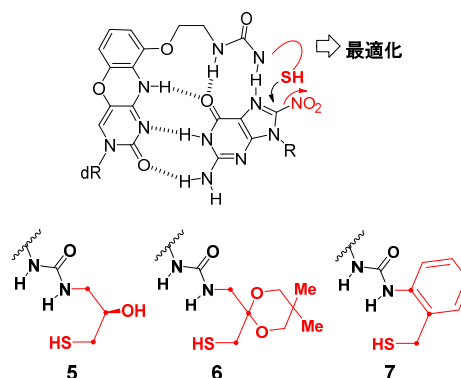


図 4 . nitroG-Grasp リンカーの最適化

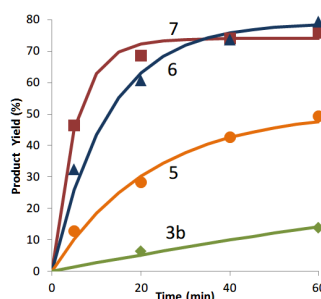


図 5 . 新規 nitroG-Grasp の反応性

錯体形成を経由する共有結合捕捉分子の設計概念を拡張し、8-チオグアノシン捕捉分子 (thioG-grasp, 8) を設計した。nitroG-grasp 分子と比較し、求核点の硫黄原子が基質に存在し、grasp 分子には脱離基があり、求核点と脱離点の関係が反対になっている。8 位硫黄

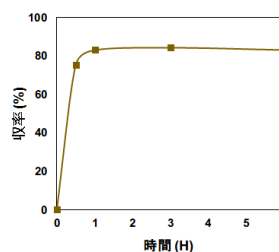
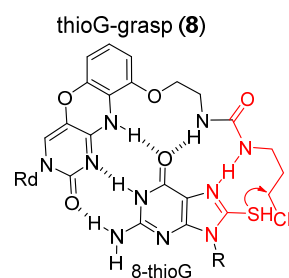


図 6 . ThioG-Grasp と 8-thio-dG の反応性錯体の構造と経時変化

置換体は中性条件下ではチオカルボニル体で存在していると考えられた。しかし塩基性条件下の反応では、図6に示すようなウレア型リンカー-thioG-grasp分子の方が、カルバメート型より反応性が高く、反応活性種はチオエノール型であることが示唆された。また、チオウレアリンカーの炭素鎖はプロピル基が最も高い反応性を示した(発表論文2)。

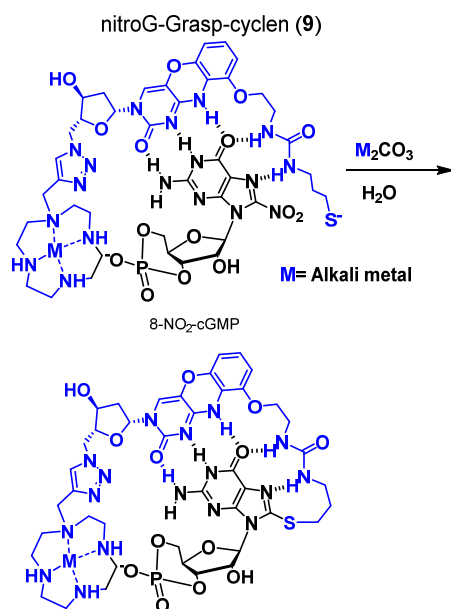


図7. Nitro-cGMP の水中での捕捉

生体内では環状リン酸エステル体である nitroGMP がシグナル伝達分子として作用している。そこで、nitroGMP を共有結合的に捕捉する分子として、**3b** 分子を基本に cyclen を導入した認識分子 (**9**) を合成した。種々金属イオンとの共存下を検討したところ、 K_2CO_3 共存下ではグアニル化反応が起こるが、亜鉛イオンとの錯体ではまったく反応が起きなかった。恐らくチオールと亜鉛イオンが強く結合し、リン酸基との相互作用が阻害さ

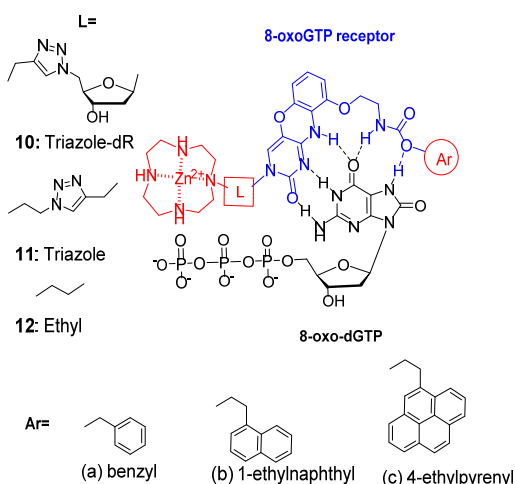


図8. 8-Oxo-GTP レセプター分子

れたものと考えられる。また、さらにサイクリックモノリン酸との錯体形成が効率的でなかったことが考えられるため、モノリン酸ユニットの検索が必要であることが示された。

水中でのリン酸体認識に相応しい構造を検索するため、標的を 8-nitroGTP として水中で検出できる認識分子の開発を検討した。cyclen - 亜鉛錯体はトリリン酸との錯体形成が報告されているので、oxoG-Clamp 分子の糖部に cyclen をクリック反応を利用して導入し **10** を合成した(図8)。**10** と亜鉛イオンとの錯体は、水中で 8-oxoGTP を捕捉し、蛍光が消光することが分かった。この蛍光消光は GTP ではほとんど観測されず、選択的な検出が可能なが示された。構造最適化を行ったところリンカー部位(L)はエチル基、芳香環(Ar)はベンジルが最適で(図7, **12a**)、GTP では消光しない条件下、8-oxoGTP との錯体形成では効果的に消光することが分かった(図9)(論文準備中)。

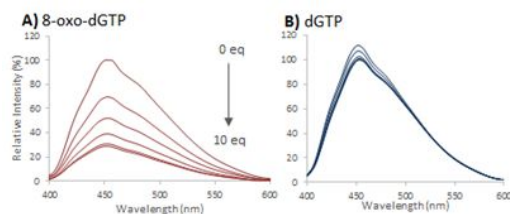


図9. 8-Oxo-GTP レセプター分子(**12a**)による 8-oxo-GTP 選択的な蛍光消光

次に、水中でのヌクレオシド状態の 8-オキソグアノシンを認識するための oxoG-clamp 修飾シリカゲルを合成した。シリカ上のアミノ基を直接アジド基に変換し、フェノキサジン環にアセチレン基を導入した分子をクリック反応によりカップリングさせシリカゲル **13** を合成した。同様にシリカゲル表面のアミノ基を 4-アジドブタン酸でアミド化し、引き続きクリック反応でフェノキサジン環を導入した(**14**)(図10)。修飾シリカは蛍光性であり、水中の 2'-デオキシグアノシンと錯体形成し、消光することが確認された(図11)。この消光によって定量も可能であるため、現在詳細を検討中である。またこのシリカを充填剤とすることで HPLC カラムを作成したところ、他のヌクレオシドと完全に分離することに成功した(図12)(論文準備中)。

以上本研究では、フェノキサジン環の基本構造にチオール反応基を導入した分子を合成し、8-ニトログアノシン特異的な捕捉分子 nitroG-grasp の開発に成功した。さらにリン酸認識構造を導入した分子を合成し、水中で 8-nitroGMP を捕捉する分子の基礎を確立した。分子設計概念を拡張し、8-チオグアノシンを特異的に捕捉する thioG-grasp 分子の開発にも成功した。水中で 8-ニトログアノシ

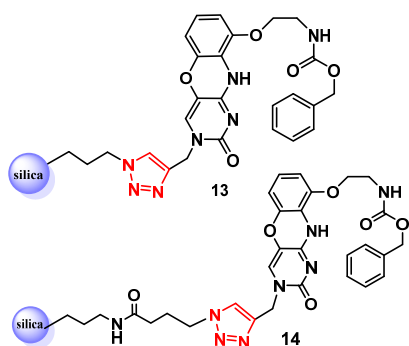


図 10 . 8-Oxo-GTP レセプター分子

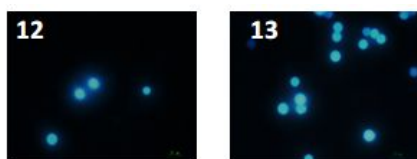


図 11. 蛍光分子修飾シリカゲル

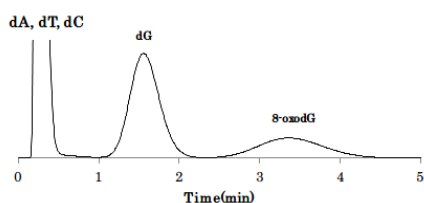


図 12. 修飾シリカゲルによる 8-oxo-dG の効率的分離

ンや 8-オキソグアノシンリン酸体を捕捉する基本構造を決めるために合成した oxoG-clamp と cyclen-亜鉛錯体の結合体は水中で選択的な蛍光消光を示し、構造最適化により水中で効果的に 8-oxoGTP を検出できる分子の開発に成功した。さらに、oxoG-clamp で化学修飾したシリカゲルにより水中の 8-オキソ 2'-デオキシグアノシンの選択的な捕捉に成功した。このように本研究は当初の計画通りに進行し、新しい検出法の基盤となる機能性分子の開発に成功した。

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 3 件)(査読あり)

1. Fuchi Y. and Sasaki S., Efficient Covalent Capture of 8-Nitroguanosine via a Multiple Hydrogen-Bonded. *Org. Lett.*, **16**(6), 1760-1763 (2014). doi:10.1021/ol500452r
2. Fuchi Y., Obayashi H. and Sasaki S. Development of New 1,3-Diazaphenoxazine Derivatives (ThioG-Grasp) to Covalently Capture 8-Thioguanosine, *Molecules.*, **20**(1), 1078-1087 (2015). doi:

10.3390/molecules20011078.

3. Fuchi Y., Sasaki S., New NitroG-Grasp Molecules with Enhanced Capture Reactivity for 8-Nitroguanosine in the Aqueous Media, *Chem. Pharm. Bull.* **63**(11) 913-919 (2015). doi: 10.1248/cpb.c15-00550

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 淵靖史、佐々木茂貴, 水素結合錯体形成を介した 8 - ニトログアノシンに対する共有結合捕捉分子の開発, 2014 年 6 月 7 日第 24 回万有福岡シンポジウム、九州大学(福岡).
2. 淵靖史、佐々木茂貴, 水素結合錯体形成を介した効率的な 8 - ニトログアノシン捕捉反応分子の開発, 2014 年 6 月 11-13 日、日本ケミカルバイオロジー学会第 9 回年会、大阪大学(大阪).
3. 渡部卓磨、淵靖史、佐々木茂貴, 8-oxo-dG 認識分子の認識能の向上および水中での検出デバイスへの展開, 6 月 28 日、第 51 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場(北九州市).
4. 渡部卓磨、淵靖史、佐々木茂貴, 水中の 8-oxo-2'-deoxyguanosine の検出のための認識分子の開発, 2014 年 9 月 11-13 日、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、岡山大学(岡山).
5. 淵靖史、大林秀都、佐々木茂貴, 生体内シグナル伝達に關与する 8 位酸化グアノシン選択的捕捉モデル分子の開発, 2014 年 11 月 26-28 日、第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム、神戸国際会議場(神戸市).
6. 大林秀都、淵靖史、佐々木茂貴, 8-thioG を特異的に捕捉する低分子プローブの開発, 2014 年 12 月 6-7 日、第 31 回日本薬学会九州支部大会、第一薬科大学(福岡).
7. 渡部卓磨、淵靖史、佐々木茂貴, 水中での 8-oxoguanosine の検出デバイスの開発, 2014 年 12 月 6-7 日、第 31 回日本薬学会九州支部大会、第一薬科大学.
8. 大林秀都、淵靖史、佐々木茂貴, 共有結合的捕捉能をもつ 8-thioguanosine 認識分子の開発, 2015 年 3 月 25-28 日、日本薬学会第 135 回年会、神戸学院大学(神戸).
9. 淵靖史、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, 2015 年 6 月 10-12 日、日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会、東北大学(仙台).
10. 大林秀都、淵靖史、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, 2015 年 6 月 27 日、第 52 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場(北九州市).

11. Yasufumi Fuchi, Shigeki Sasaki, Development of 1,3-diazaphenoxazine derivatives (nitroG-Grasp) for selective capture of 8-nitroguanosine, 2015年9月23-25日、第42回国際核酸化学シンポジウム、I-messae Hall(姫路).
12. 淵靖史、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, 2015年10月26-27日、第41回反応と合成の進歩シンポジウム、近畿大学(大阪).
13. 福田高志、淵靖史、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, 2015年11月28-29日、第32回日本薬学会九州支部大会、九州保健福祉大学(延岡).
14. Yasufumi Fuchi, Shigeki Sasaki, Efficient covalent capture of 8-nitroguanosine via a multiple hydrogenbonded complex, 12月15-20日、PACIFICHEM2015、Hawaii (USA).
15. 淵靖史、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, 2016年3月26-29日、日本薬学会第136回年会、パシフィコ横浜(横浜).
16. 渡部卓磨、淵靖史、佐々木茂貴、水中の8-oxodG特異的な検出デバイスの開発, 2016年3月26-29日、日本薬学会第136回年会、パシフィコ横浜(横浜).

〔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://bioorg.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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