

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 16 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550193

研究課題名(和文) 生体触媒とパラジウム触媒をシンクロさせた多様性核酸プローブの創製

研究課題名(英文) Synthesis of the variety nucleoside probes produced by synchronization of the biocatalyst and the palladium catalyst

研究代表者

幡野 明彦 (Hatano, Akihiko)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：10333163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：チミジンホスホリラーゼは、チミジンを過リン酸分解する酵素であるが、修飾ウラシルを共存させると塩基部位交換反応が実施できることを明らかにしてきた。本反応を活用して、細胞内RNAのプローブと成り得る蛍光色素修飾ヌクレオシドの合成を、パラジウム触媒と連動させることで実施を可能とした。チミジンホスホリラーゼの反応には、リン酸緩衝液にDMSOを加えると、疎水性基質であっても反応が進行することが分かった。ドッキングシミュレーションより、酵素の活性部位に固定化されたウラシルの5位が外を向いていることがわかり、リンカーを用いてポケット外部であれば大きな官能基である蛍光色素などでも合成できる事を示した。

研究成果の概要(英文)：Thymidine phosphorylase (TP) is a unique metabolic control enzyme, TP can be used to change the nucleobase moiety of thymidine to a modified uracil substituted at the C5 position. The cross-coupling reaction by palladium catalyst such as Sonogashira coupling is convenient tool for introducing a fluorescent group at C5 position of uracil. We reasoned that TP and Pd catalyzed cross-coupling reaction could be used to easily obtain many different nucleosides containing a fluorescent group. We attempted to perform the base-exchange reaction by a hydrophobic modified uracil in buffer containing a polar organic solvent such as DMSO with TP. The reaction conversion was drastically enhanced as the concentration of DMSO increased up to 40% (57% conversion for U4C compound). Docking simulations using MF myPresto showed that uracil moiety of the substrate bound to the active site of TP, the fluorescent moiety linked to the C5 position of the uracil located outside the surface of the enzyme.

研究分野：核酸化学

キーワード：核酸代謝酵素、チミジンホスホリラーゼ、塩基部位交換反応、RNAプローブ、蛍光色素、パラジウム触媒、
菌頭カップリング

1. 研究開始当初の背景

細胞内の RNA は、DNA からタンパク質へ遺伝情報を伝達する機能のみならず、タンパク質発現の制御まで行っていることが分かってきた。細胞内の RNA は、時間とともに量も存在場所も変化するため、RNA の働きを調べるためには、生きた細胞内の RNA を直接観察する手法が必要となる。

細胞内 RNA を直接観察する手法として、RNA と結合するタンパク質を用いる手法や、目的とした RNA と二重鎖形成する DNA や RNA を標識して追跡する手法がある。現在最もよく行われている手法は、後者の手法であり、RNA に蛍光色素を共有結合して観察している。様々な蛍光色素を導入できるメリットがあるものの、合成にはコストがかかり、配列内導入も非常に高価である。安価で短時間に蛍光色素を有した RNA を合成できれば、遺伝子診断や細胞イメージングに幅広く利用されて行くであろう。

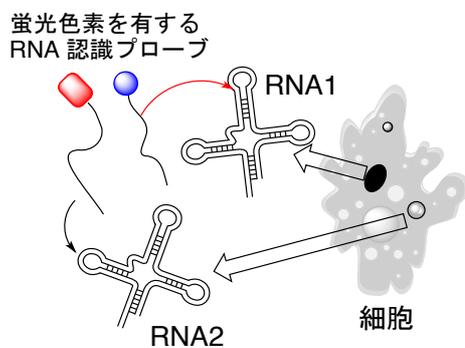


図1 細胞内 RNA と二重鎖形成する蛍光標識核酸プローブによるイメージング

これまで当研究室では、核酸代謝酵素を用いて様々な非天然ヌクレオシド合成を効率良く行えることを報告してきた。核酸代謝酵素であるチミジンホスホリラーゼは、リン酸緩衝液中でチミジンを基質として、デオキシリボース-1-リン酸と塩基部位を過リン酸分解する反応を触媒する。本反応時に疑似塩基を共存させておくと、塩基部位の交換反応が発生し、疑似塩基を塩基部位を持った非天然ヌクレオシドを2時間程度で合成できることがわかった。そこで、著者らは、蛍光色素

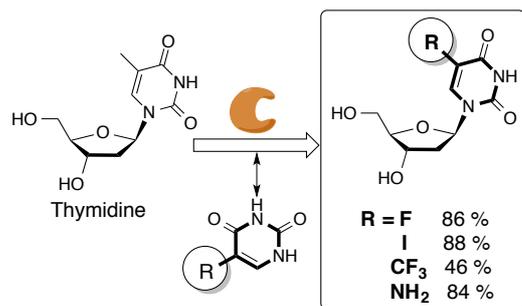


図2 チミジンホスホリラーゼを用いた非天然ヌクレオシドの効率的合成

を結合させた疑似塩基を用意すれば、チミジンホスホリラーゼを用いて蛍光色素を有した非天然ヌクレオシドに変換することができ、RNA/DNA 配列内に導入可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、核酸イメージングや遺伝子診断に必要な核酸プローブ分子（蛍光色素導入ヌクレオシド）を、パラジウム触媒と酵素触媒（チミジンホスホリラーゼ）を組み合わせることで、多品種を効率よく合成する手法を提案する。本手法では、ヌクレオシドのリボース部位を無保護のまま、立体選択的にラベル化塩基とリボースをカップリングすることを可能とする（図3）。

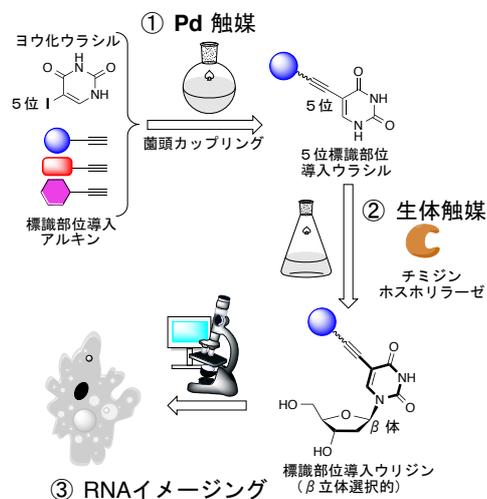


図3 本研究の概念図。2つの触媒を連続利用することで、低コストでRNAイメージング薬を作製する。

- ① 蛍光色素標識化ウラシルの合成: 菌頭反応による蛍光標識分子とヨウ化ウラシルのカップリング
- ② 蛍光色素標識化ウラシルのリボースへの導入: 核酸代謝酵素によるヌクレオシドへの立体選択的導入

3. 研究の方法

3-1 パラジウム触媒によるウラシルの5位への蛍光色素導入

ウラシルの5位に蛍光色素であるクマリン、ピレンを導入することを試みた。パラジウム触媒を用いた菌頭カップリングにより、ヨドウラシルと蛍光色素を結合させたアルキンをカップリングした。ウラシルと蛍光色素の距離効果を検討するために、アルキルスペーサーの長さをn=2, 4, 6 と異なる化合物を合成して基質とした。

3-2 蛍光色素修飾ウラシルを用いたチミジンホスホリラーゼによるヌクレオシドへの導入反応

考えられた。そこで、有機溶媒として水に溶解しやすいジメチルスルホキシド (DMSO) を添加し、反応を検討した。図5の横軸は DMSO の濃度であり、どの化合物でも 40% で極大を示し、有機溶媒を添加することで反応転換率が向上することが分かった (最大 57%)。DMSO を 40% まで添加してもチミジンホスホリラーゼは失活せず、脂溶性の基質である蛍光色素修飾ウラシルをヌクレオシドへ導入することに成功した。これらの反応をさらに拡張できれば、蛍光色素や機能性官能基導入デオキシウリジンが一段階、立体選択的に可能となり、遺伝子診断等に利用できるプローブ分子の調整が容易になると期待した。

次に有機溶媒の種類による効果を検討した。結果を図6に示した。水と混和する極性溶媒であり、酵素の失活が少ないとの報告があるものを選択した。テトラヒドロフラン (THF) とメタノールではほとんど反応しないことが分かった。DMSO が最も反応効率が高く、DMF がそれに続いた。反応効率が最も高いのは DMSO 濃度が 40% であり、50% 以上の有機溶媒濃度では、酵素の失活が観察された。

チミジンホスホリラーゼの X 線結晶構造解析図をもとに、今回合成した蛍光色素修飾ウラシルのドッキングシミュレーションを行い、アルキル鎖長による基質との適合性を検討した。Simulated Tempering

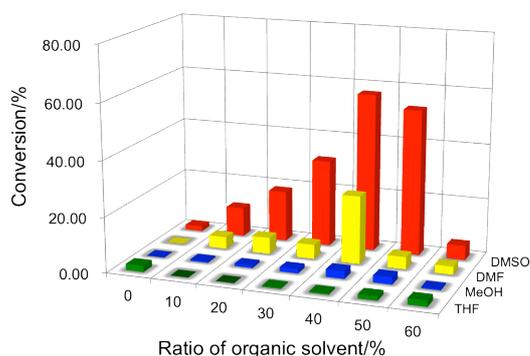


図6 チミジンホスホリラーゼを用いた塩基部位交換反応における有機溶媒の種類による反応転換率に及ぼす影響。

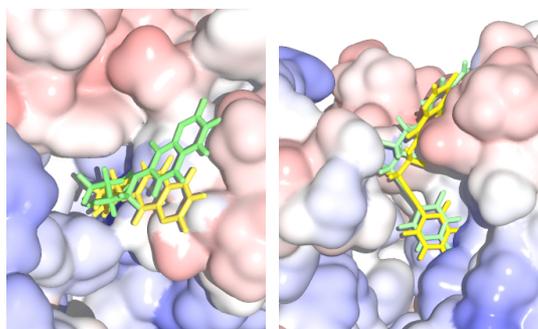


図7 チミジンホスホリラーゼと U2C (Yellow), U4C (Green) とのドッキングシミュレーション。見えやすくするために、チミジンホスホリラーゼの前面にある2つのアミノ酸を除去してある。

/Force-biased McMD 法による自動収束によるタンパク質と基質のドッキング手法である MyPresto にて実験を行った。結果を図7に示した。黄色は C2U であり、アルキルリンカーが短い基質、緑は C4U であり、アルキルリンカーが 4 であり、もっとも反応効率が高かった基質の検討結果である。C2U では、クマリン部分がより酵素内部である活性部位に接近しているため、立体障害が発生していると考えられた。

以上、本研究では、蛍光色素修飾ヌクレオシドを短時間で効率良く合成する手法を検討した。パラジウム触媒とチミジンホスホリラーゼを組み合わせることで、蛍光色素をヌクレオシドに簡単迅速に導入できることが分かった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① A. Hatano, M.Okada, K. Dezaki, S. Hirai, Improved synthesis of mercapto C-nucleoside possessing p-phenyl thiol as base using a lithiated coupling reaction, *Tetrahedron*, **2015**, *70*, 1095-1100.doi:10.1016/j.tet.2014.12.085
- ② A. Hatano, M. Kurosu, S. Yonaha, M. Okada, S. Uehara, One-pot approach to functional nucleosides possessing fluorescent group using nucleobase-exchange reaction by thymidine phosphorylase, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2013**, *11*, 6900-6905. DOI:10.1039/C3OB41605D
- ③ A. Hatano, M. Okada, G. Kawai, Solution structure of S-DNA formed by covalent base pairing involving a disulfide bond, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2012**, *10*, 7327-7333. DOI:10.1039/C2OB25346A.

[学会発表] (計 1 2 件)

- ① Enzymatic synthesis of nucleosides with the introduction of a stable isotope into the base moiety, Nanae Terado, Fujii Emi, Kenji Fukuda and Akihiko Hatano, *Active Enzyme Molecule*, Dec. 17-19, Toyama, 2014, p 93-94.
- ② 寺戸 那奈恵, 藤井 映美, 福田 健治, 幡野 明彦, 安定同位体を有したヌクレオシドの酵素合成, 第 95 回日本化学会春季年会, 2015 年 3 月 27 日, 日本大学船橋.
- ③ 寺戸 那奈恵, 藤井 映美, 福田 健治, 幡野 明彦, 核酸代謝酵素を用いた塩基部

位に安定同位体を含むリボヌクレオシドの合成, 第4回CSJ化学フェスタ2014, 2014年10月14日(火)~16日(木), タワーホール船堀.

- ④ 寺戸 那奈恵, 藤井 映美, 福田 健治, 幡野 明彦, 安定同位体を有したヌクレオシドの酵素合成, 第8回バイオ関連化学シンポジウム, 2014年9月11日(木)、12日(金)、13日(土), 岡山大学津島キャンパス.
- ⑤ 核酸代謝酵素の基質拡張のためのドッキングシミュレーション, 幡野明彦、黒須優幸、須永裕太、出崎健太郎、藤井映美, 第17回生体触媒化学シンポジウム, 2013年12月21日, 岡山理科大学
- ⑥ 核酸代謝酵素の塩基部位交換反応を利用した蛍光色導入ヌクレオシド合成, 川端耕平, 相川未来, 藤井絵美, 黒須博幸, 幡野明彦, 日本化学会秋季事業化学フェスタ2013, 2013年10月21日, タワーホール船堀
- ⑦ レドックス応答核酸による酸化ストレスセンサー, 平井誠太郎, 梅澤初実, 幡野明彦, 日本化学会秋季事業化学フェスタ2013, 2013年10月21日, タワーホール船堀
- ⑧ 蛍光色素を有した非天然ヌクレオシドの酵素合成, 幡野明彦, 黒須優幸, 川端耕平, 相川未来, 平井誠太郎, 第7回バイオ関連化学シンポジウム, 名古屋大学, 2013年9月27日
- ⑨ レドックス応答核酸による酸化ストレスセンサー, 相川未来, 平井誠太郎, 幡野明彦, 生体機能関連化学部会若手の会 第23回サマースクール, 2013年7月27日, 八王子.
- ⑩ 蛍光色素導入塩基を有する非天然ヌクレオシドの酵素合成, 梅澤初実, 藤井映美, 川端 耕平, 黒須優幸, 幡野明彦, 生体機能関連化学部会若手の会 第23回サマースクール, 2013年7月27日, 八王子.
- ⑪ Structure of the S-DNA involving Disulfide-Linked Base Pair in Solution, Akihiko Hatano, Munehiro Okada, Gota Kawai, the 39th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC 2012), Nagoya Univ. (Nagoya, Japan), November 15, 2012, p136-137.
- ⑫ 蛍光プローブ含有ヌクレオシドを合成可能にする分子フラスコとしてのチミジンホスホリラーゼ, 須永裕太, 黒須優幸, 出

崎健太郎, 与那覇奨, 幡野明彦, 2012年11月26日, 第16回生体触媒化学シンポジウム in 富山.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①

名称:ヌクレオシド化合物の製造方法

発明者:福田健治, 幡野明彦

権利者:大陽日酸株式会社

種類:特願 2014-037519

番号:2014-037519

出願年月日:平成26年2月27日

国内外の別:国内

②

名称:ヌクレオシド化合物の製造方法および組成物

発明者:福田健治, 幡野明彦

権利者:大陽日酸株式会社

種類:特願 2014-037518

番号:2014-037519

出願年月日:平成26年2月27日

国内外の別:国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.sic.shibaura-it.ac.jp/~a-hatano/a-hatano/a-hatano.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

幡野 明彦 (HATANO, Akihiko)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号:10333163