

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340038

研究課題名(和文) DNA損傷を簡易に検出する新規蛍光プローブの合成と環境および生体試料への応用

研究課題名(英文) synthesis of fluorescence probes to detect genotoxicants and its biological application

研究代表者

高村 岳樹 (Takeji, Takamura)

神奈川工科大学・工学部・教授

研究者番号：50342910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝毒性物質を簡便に検出する目的で、蛍光物質であるBODIPY誘導体をデオキシグアノシンに隣接させた化合物の合成を行い、その評価を行った。熱的に安定なプローブとしてアシクロビル-BODIPY-FL修飾体、さらに8-oxo-dGの生成を検出する目的で、B-F結合をB-OMe結合へ置換したBODIPY誘導体を合成した。これらプローブの活性酸素に対する蛍光強度の増減について検討を行った。その結果、いずれのプローブも目標とする性質を有していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In order to detect genotoxic compounds in a rapid manner, new fluorescence probes were synthesized. One probe has a property with heat resistant. The Acyclovir moiety is one of the synthetic candidate because the alkoxymethyl moiety at N9 position of guanine is thought to be torrent for the depurinaion condition at elevated temperature. BODIPY-FL was able to be attached to OH group of Acyclovir that had been protected with DMTr at N2 positon. Obtained probe was found to enhance its fluoescence activity when alkylating reagents was treated. The second synthesized probe contained 8-pheny-BODIPY, of which F atom was substituted to OMe group. This probe was attached to deoxyguanosine as a general manner. Treatment of the Fenton reagent to this BODIPY derivative decrease its fluoescence activity as expected. Therefore, a probe to detect 8-oxo-dG formation was pursued. In other probes, oligonucleotide containing BODIPY modified dC is now undertaken to detect DNA strand breaks

研究分野：環境変異原

キーワード：環境変異原 遺伝毒性物質 酸化損傷 DNA付加体 蛍光プローブ 簡易検出法

1. 研究開始当初の背景

環境中に数多く存在している遺伝子損傷性の物質は発がん要因になるのみでなく、近年では、胎児の低体重の出生との関連性も疑われている。このようなヒト健康に重篤な悪影響を生じる可能性のある遺伝子損傷性物質には、未同定のものが存在していることが指摘されており、そのため環境中の新規な遺伝子損傷性物質の構造とその生体影響を明らかにする事はヒト健康影響を鑑みる上で極めて重要である。新規遺伝子損傷物質の検索には **UMU 試験** (遺伝毒性の検出) や **Ames 試験** (変異原性の検出) などのバイオアッセイが必要不可欠であるが、これらのバイオアッセイは前培養を含め、試験時間を要する欠点があり、新規化合物を環境中から単離・同定する際の律速段階となっている。またこれらのバイオアッセイには、試験方法の技術の習得や施設及び菌の管理の問題など、専門分野外の研究者等にとってはいくつかの困難な点がある。そこで、バイオアッセイに頼らずに、より簡便に DNA 損傷性物質を検出する系を提供する事ができれば、環境モニタリングに適用できるだけでなく、新規環境汚染物質の同定にも威力を発揮する事が期待されるため、極めて意義が大きい。この DNA 損傷性物質の検索を可能とする新規蛍光プローブの候補となる化合物 (**BODIPY-FL-dG**) を開発している (図 1)。このプローブはデオキシグアノシンと蛍光物質 **BODIPY-FL** で構成されている。このプローブは **dG** からの電荷移動により、通常の状態では **BODIPY** 自身の蛍光が減弱しているが (90%以上)、**dG** 部位に脱プリン、一部の酸化的損傷、アルキル化などの損傷が生じると強い蛍光が復活する事をこれまでに明らかにしてきた。特に、酸化損傷のうちヒダントインを生成する損傷や、発がん性物質として知られているベンゾピレン (**BaP**) の代謝産物 (+S9 mix の条件) に対しても、蛍光強度の

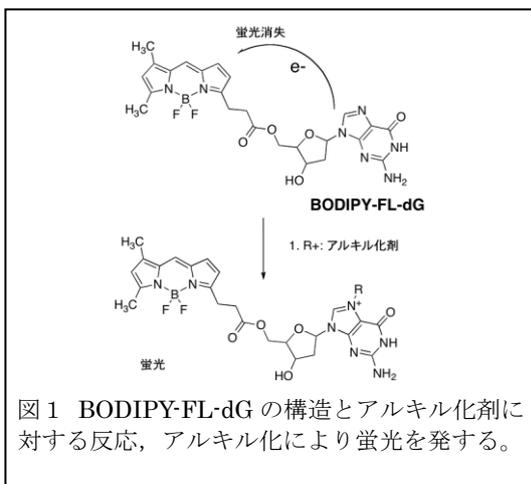


図 1 **BODIPY-FL-dG** の構造とアルキル化剤に対する反応、アルキル化により蛍光を発する。

上昇を明らかとしてきた。特に **BaP** では先の **Ames** 法と同じ濃度範囲で検出が可能であり、変異原性試験の代替法として用いる事が可

能である事を示している。一方で、この第 1 世代のプローブは、(a) 熱に対して弱い、(b) メジャーなグアニンの酸化損傷である **8-oxo-dG** の検出ができない、(c) 染色体の構造異常を誘導するような DNA 鎖の切断を検出することができない、といった欠点が存在する。そこで本研究では、剛直で使いやすい様々な DNA 損傷の検出が可能となるいくつかの蛍光プローブを合成し評価する。

2. 研究の目的

環境中の遺伝子損傷性物質の検索を行う目的で、新規の「DNA 塩基損傷性物質の検索を行う蛍光プローブ」および「DNA 鎖切断物質を解析する蛍光プローブ」を合成し、その評価を行う事を目的とする。このプローブは蛍光物質である **BODIPY** が DNA の塩基であるデオキシグアノシンに隣接すると消光する性質を利用し、DNA 塩基損傷性物質の検索蛍光プローブでは熱的に安定で塩基部位が損傷を受けると蛍光発光または消光するプローブを、DNA 鎖切断物質検索蛍光プローブでは DNA 鎖の切断が生じる事により、蛍光を発するプローブを合成し、これら蛍光プローブを用いて遺伝子損傷性物質で評価を行うとともに、実環境試料での有効性を示す事を目的としている。遺伝子損傷の検出はこれまでバイオアッセイのみで行われてきたため、この系の有効性を示すことにより既存の生物試験方法の代替法としての利用を最終的な目標とする。

3. 研究の方法

研究の計画はいくつかに分けて行った。

I. 剛直な構造の塩基損傷検出プローブの合成
グリンドール誘導体などの弱い変異原性物質は、加熱によりその反応性を上げ、**BODIPY-FL-dG** で蛍光検出することができる。しかしながら同時にバックグラウンドの上昇も観察される。このバックグラウンドの上昇は、熱による脱プリン反応の進行に起因している。そこでグリコシド結合を有さず、核酸塩基に近い構造を有する化合物 **BODIPY-FL-Acyclovir** の合成を行う (図 2)。この化合物は、適切に保護を行ったアシクロビル誘導体と **BODIPY-FL** とのエステル結合により合成を行う。

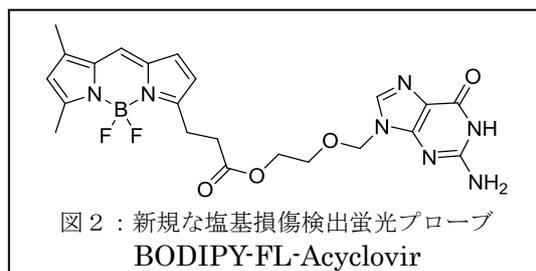


図 2 : 新規な塩基損傷検出蛍光プローブ **BODIPY-FL-Acyclovir**

II, 8-oxo-dG を検出できる新規 DNA 損傷検出 蛍光—消光プローブの開発

BODIPY のグアニン塩基による消光は、光によって励起された蛍光物質 BODIPY (F*) と核酸塩基の酸化電位で簡易的に決定されることが知られている。一電子励起された BODIPY-FL の還元電位は 1.59V であり、これは dG の酸化電位 (1.49V) より大きい。そのため、蛍光消光が観察される。一方、8-oxo-dG は dG より酸化電位が低く、その値はおおよそ 1.1V である。そのため、BODIPY-FL-dG では、dG 部位が酸化され 8-oxo-dG が生成するとより消光作用が強くなる。すなわち BODIPY-FL を用いた場合では、dG および 8-oxo-dG のいずれも消光作用を有するが、例えば、BODIPY 部位を図 3 中の BODIPY-1 または BODIPY-2 のようにすることにより、F* の還元電位を下げ、dG のままでは強い蛍光性物質であるが、8-oxo-dG が生成することにより、その蛍光が消失する蛍光プローブとすることができる。新しく合成された 8-oxo-dG 検出用プローブをもちいることにより、8-oxo-dG を生成するような環境中の活性化化合物の検出や、細胞内での 8-oxo-dG の検出にこの系を用いることが可能であり、このプローブを用いた細胞内検出や環境モニタリングをおこなう BODIPY 誘導体として 8-Phenyl-BODIPY-OMe 誘導体の合成 (図 3: 化合物 2) を進める。BODIPY の 8 位に結合しているフェニル基の para 位にカルボキシエチル基を導入し、最終的には上述の BODIPY-FL-Acyclovir に相当する化合物の合成を行う。

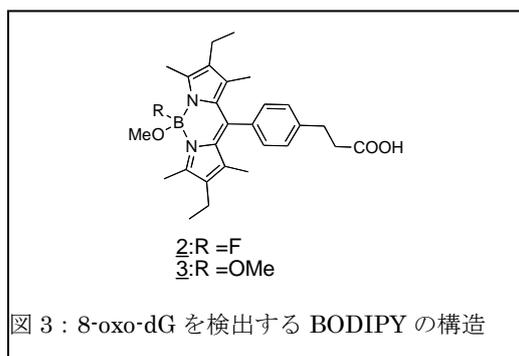


図 3 : 8-oxo-dG を検出する BODIPY の構造

III. DNA 鎖切断検出蛍光プローブの合成

DNA 鎖の切断を簡便に検出するバイオアッセイ法は存在しないため、この系の開発の意義は大きい。オリゴ DNA の 5' 末端を BODIPY により修飾し、二重鎖を形成させると、対となる DNA 鎖のグアニンが BODIPY 近傍に配置されるとその蛍光が減弱することが実験的に確かめられている。そこで、二重鎖のオリゴ DNA を用意し、グアニンの対となる塩基に「BODIPY で修飾されたシチジン塩基」を

配置することにより、二重鎖の場合は蛍光が消光しているが、DNA 鎖の切断が生じると、切断部のヌクレオチド鎖が短くなり、T_m 値が減少するため、この T_m 値の変化を観察することで、DNA 切断を検出することが可能である。そのため、BODIPY で修飾した dC のアミダイトを合成し、それを用いて BODIPY 修飾オリゴヌクレオチドを合成し、DNA 切断プローブとしての評価を行う。BODIPY 修飾デオキシシチジンを合成し、さらにこれをアミダイト化し、オリゴ合成とする。BODIPY 修飾デオキシシチジンの保護基として、ベンゾイル基を選択し、定法に従って合成を進めていく。

4. 研究成果

I. 剛直な構造の塩基損傷検出プローブの合成

この合成はオリジナルの BODIPY-dG がデオキシリボース部位を持つのにに対し、デオキシリボースをアルコキシメチル部位に置換した化合物を合成することにより、熱的な安定性を有するプローブを合成することを目的とした。またデオキシリボース部位は細胞内でグリコシラーゼによって切断される可能性があるため、より細胞内で安定性のある化合物を得るためである。目的とする化合物は既知化合物である Acyclovir に BODIPY-FL をエステル結合で結合させた化合物であるため、Acyclovir の保護から行うこととした。

合成は、デオキシグアノシンと構造が類似しているアシクロビルを選択し、BODIPY-dG と同様の化学構造の化合物の合成を進めた (図 2)。

デオキシグアノシンと同様に、まずプリン塩基の環外のアミノ基にフェノキシアセチル基を導入することから行った。アルキル末端基の水酸基をまずシリル保護を行い、さらに、フェノキシアセチル基の導入を試みた。しかしながらフェノキシアセチルクロライドや、同様の酸無水物を反応させたが、収率は極めて低く、直接的に合成することは困難であることが分かった。これはアミノ基の電子密度が低く、求核性が乏しいことに由来する。一般的に、グアニンの O⁶ 位を保護することにより、アミノ基の求核性が高まることが知られているので、O⁶ 位を一時的にシリル基で

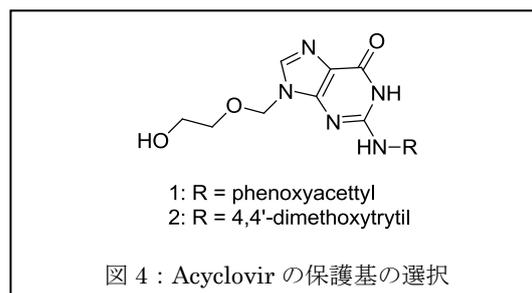
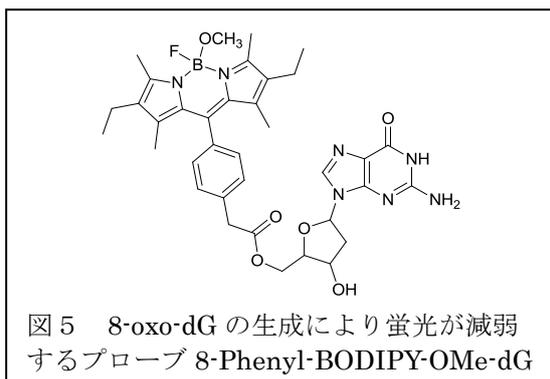


図 4 : Acyclovir の保護基の選択

保護を行い、反応させる方法を試みた。アシクロビルをピリジンに溶解させ、その TMSCl を 3 等量加えた。さらにフェノキシ酢酸無水物を 1.2 等量添加し、さらに温和なアルカリ処理を行うことで、目的とする N^2 -phenoxyacetylacyclovir を合成することが出来た。得られたアシクロビル誘導体はジクロロメタン中、DCC 共存下、BODIPY-FL と反応させた。しかしながら、反応の進行を確認することが出来なかった。同様の方法でデオキシグアノシン誘導体との反応は容易に進行したが、アシクロビル誘導体では反応が進行しないことは、両者の溶媒への溶解性の違いによるもの推察された。すなわち、 N^2 -phenoxyacetylacyclovir はジクロロメタンへの溶解性が悪く、反応が進まなかったと考えられる。同様の溶解性の悪さによる反応への影響は他の保護基を用いたデオキシグアノシン誘導体を用いた反応でも確認されている。そこで、溶媒への溶解性を高める目的で、別の保護基を用いた反応を試みることにした。ジクロロメタンへの溶解性を高めるために、より脂溶性の高い保護基を導入するか、 O^6 位をベンジルなどの保護基で保護する等が考えられるが、合成ステップが多くなることにより、目的の化合物を得る量が減少することを恐れて、前者の選択を行った。すなわち、水酸基を TBDMS で保護したアシクロビルの N^2 位のアミノ基をジメトキシトリチル基で保護を行うこととした (図 4)。ピリジン溶媒を用い、ジメトキシクロライドを 3 等量用いることでアミノ基のトリチル保護を行うことが出来た。この化合物は PAC 保護に比して、非常にジクロロメタンなどのハロゲン有機溶剤に易溶であった。得られた化合物をもちいて、先と同様に BODIPY-FL と DCC 共存下反応を試みたところ、スムーズに反応が進行し、目的の化合物を得ることが出来た。得られた BODIPY-Acyclovir 誘導体に、メタンスルホン酸やエピクロロヒドリンなどの N^7 位を攻撃するアルキル化剤を処理することにより、強い蛍光発光を観察することが出来た。これは、 N^7 位に修飾が起きるだけで蛍光が復活するという当初の予測通りであることが分かった。

また実際に細胞 (CHL/IU) を用いて、BODIPY-Acyclovir および変異原性物質である MNNG で処理したところ、BODIPY-dG



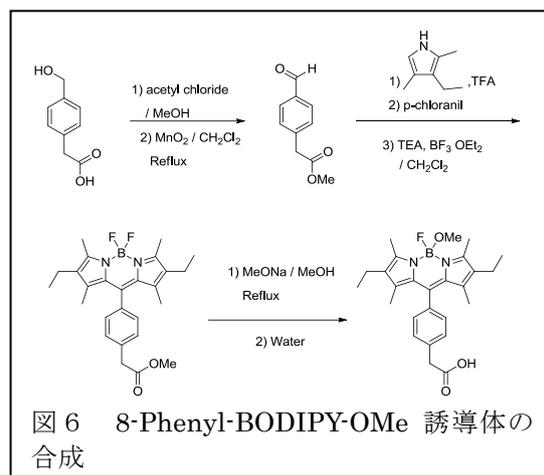
より高感度に DNA 損傷を検出することが可能であった。

II. 8-oxo-dG を検出できる新規 DNA 損傷検出蛍光—消光プローブの開発

8-oxo-dG などの酸化損傷を受けると蛍光が減弱するプローブの合成を行った。目的とする化合物は図 5 に示した。この合成はベンジルアルコール誘導体を二酸化マンガンにて酸化させ、さらにピロール誘導体と反応させて BODIPY 誘導体とし、B-F 結合のひとつを MeO-に置換して得た (図 6)。

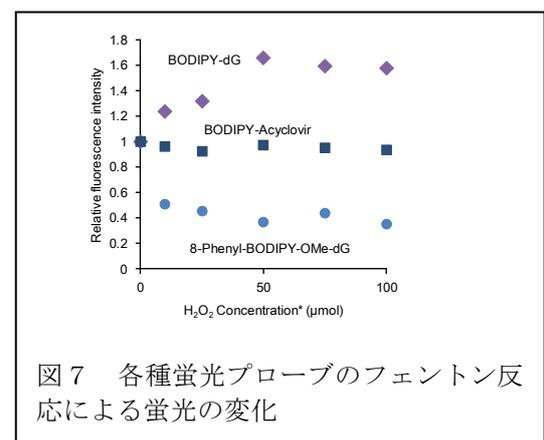
8-Phenyl-BODIPY-OMe-カルボン酸誘導体は、3'-TBDMS-N²-phenoxyacetyl-dG とカップリング後、目的の化合物 8-Phenyl-BODIPY-OMe-dG を得た。得られた化合物に対してフェントン試薬をもちいた酸化損傷の検出を試みた。

その結果、8-Phenyl-BODIPY-OMe-dG はフェントン試薬の過酸化水素濃度が上昇するにつれて蛍光が減弱することが明らかとなった (図 7)。詳細なメカニズム解析を今後行う必要がある。



III. DNA 鎖切断検出蛍光プローブの合成

DNA 鎖の切断は、放射線や活性酸素等の様々な因子によって生じる事が知られているが、その検出方法はこれまでに知られていない。



そこで本研究では DNA 鎖の切断の検出系の作成を行う事とした。

この検出系の概念図を図 8 に示した。dG の塩基対として BODIPY 修飾デオキシシチジン (dC) を配置する事により、DNA 鎖が 2 重鎖となっている時は蛍光が減弱しているが、二重鎖切断が生じると DNA の Tm 値が減少し、常温付近で DNA は単鎖となり蛍光が復活するため、蛍光が復活することを期待している。

合成の容易さから目標とするデオキシシチジンの 5 位に phenyl 基を介した BODIPY 修飾 dC を最終的な化合物とした (図 9)。そこでまず、dC の 5 位に 8-phenyl-BODIPY を結合させた化合物の合成に着手した。これは BODIPY のメソ位にフェニル基が結合した化合物は一般に量子収率が高い性質を有するためである。この際、BODIPY-dC 誘導体 5 を得るために、あらかじめ 8-(4'-phenylboronic acid)-BODIPY を合成し、それを 5-iodo-dC 誘導体とクロスカップリングさせる方法で効率よく合成を行えることがわかった。オリゴ合成においてアミダイト体を得るために、この化合物 5 を多量に合成する必要があり、そのために大量合成に着手したが、その際にいくつかの困難な点が生じた。まず、カップリング時に必要な、8-(4'-phenylboronic acid)-BODIPY 6 は溶解性の低さから、通常の方法で大量に合成することに向かず、精製過程が困難であったため、この化合物の前駆体とも言える 8-(4'-phenylpinacolboronate)-BODIPY を代替化合物として用いることとした。ピナコール誘導体の BODIPY ボロン酸はジクロロメタン中、ジメチルピロール溶液にトリフルオロ酢酸を添加することで効率よく 81% の収率で得ることができた。通常、ピナコールエステル体もボロン酸と同様に、Suzuki カップリングを行うことが知られているが、ピナコールエステルの場合、24 時間経過後も目的とする化合物を得ることができなかった。そこで、ピナコールエステルの加水分解を行い、ボロン酸としてから、Suzuki カップリングを行うこととした。ピナコール体の

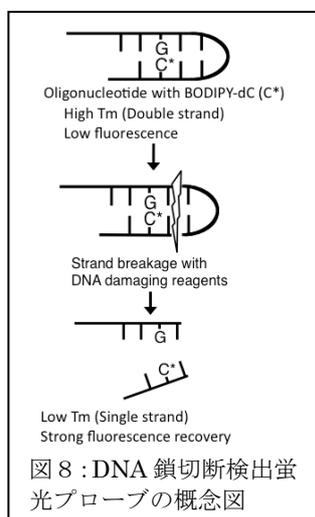


図 8 : DNA 鎖切断検出蛍光プローブの概念図

脱エステルは通常、希釈塩酸で行うことができるが、この常法では目的物を得ることができなかった。そのためジエタノールアミンでトランスエステル化させ、脱保護を行うことで目的とする化合物を約 40% の収率で得ることができた。この方法に

より、比較的少量の化合物 5 を調整することが可能となった。得られた化合物は、さらにアミノ基を保護した後、オリゴ合成に用いられるフォスフォルアミダイト体への変換を行う必要がある。アミノ基の保護はジクロロメタン中、トリエチルアミン共存下、無水酢酸を処理する事により、定量的にアセチル化が進行することを昨年度報告したが、このアセチル基は非常に脱離しやすいことがわかった。アセチル体を単離後、約 3 日間、室温に放置後に約 50% のアセチル基の脱離が観察された。この理由は明らかではないが、アセチル基は比較的弱い保護基であり、シチジン塩基のイミノ体の異性体が、通常よりより生じやすい可能性がある。そこでより強固な (しかしオリゴ合成に使用出来る) 保護基が必要であることがわかった。アセチル保護を最初に検討を行ったが、ジメチルアセタールは BODIPY 環そのものを攻撃することがわかり、この反応には不向きであった。そのため、アミノ基の保護として、ベンゾイル基を用いることとした。この反応は塩基存在下、無水安息香酸との反応により目的化合物を得ることが可能であるが、別法として、ベンゾトリアゾール誘導体の存在下安息香酸を作用させることでも合成が可能であることがわかった。更に後者の方法では目的化合物の、3'および 5'の水酸基を特別に保護していない状態でも効率よくアミノ基のみと反応する事がわかった。このことは新たな知見であり、今後、同様の反応について詳細に検討を行う予定である。得られたベンゾイル体はトリエチルアミン・トリヒドロジェンフルオリドでシリル基の脱保護を行った。得られた化合物は更に、ピリジン溶媒中 4,4'-dimethoxytrityl chloride で処理を行い 5'-トリチル体を得ることができた。得られ

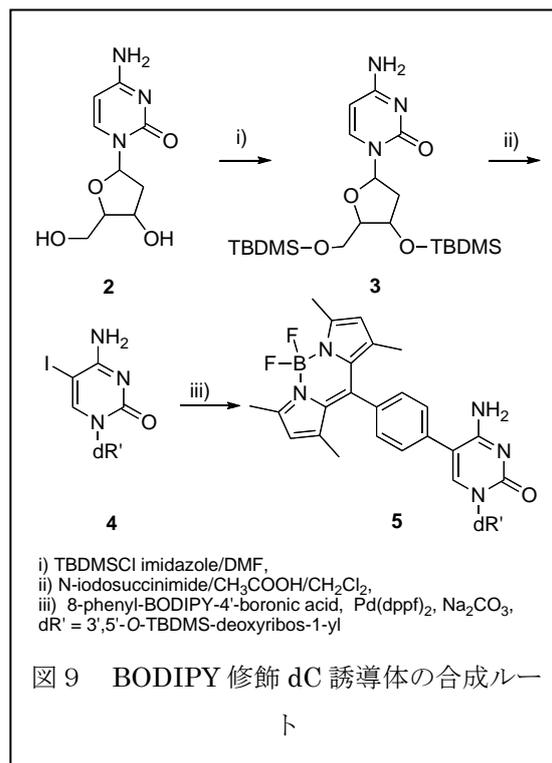


図 9 BODIPY 修飾 dC 誘導体の合成ルート

たトリチル体はアミダイトへの変換を行い、今後、オリゴ合成へと使用する。

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 6 件)

1: Misaki K, Takamura-Enya T, Ogawa H, Takamori K, Yanagida M. Tumour-promoting activity of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated or nitrated derivatives. *Mutagenesis*. 2016;31(2):205-13.

2: Take M, Matsumoto M, Takeuchi T, Haresaku M, Kondo H, Senoh H, Umeda Y, Takamura-Enya T, Fukushima S. Inhalation exposure to 1,2-dichloropropane: Distribution of blood and tissue concentrations of 1,2-dichloropropane in rats during and after exposure. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2014;49(12):1341-8.

3: Take M, Takeuchi T, Haresaku M, Matsumoto M, Nagano K, Yamamoto S, Takamura-Enya T, Fukushima S. Estimation of chloroform inhalation dose by other routes based on the relationship of area under the blood concentration-time curve (AUC)-inhalation dose to chloroform distribution in the blood of rats. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2014;49(3):253-61.

4: Kawanishi M, Kanno T, Nishida H, Takamura-Enya T, Yagi T. Translesion DNA synthesis across various DNA adducts produced by 3-nitrobenzanthrone in *Escherichia coli*. *Mutat Res*. 2013 Jun 14;754(1-2):32-8.

5: Kawanishi M, Fujikawa Y, Ishii H, Nishida H, Higashigaki Y, Kanno T, Matsuda T, Takamura-Enya T, Yagi T. Adduct formation and repair, and translesion DNA synthesis across the adducts in human cells exposed to 3-nitrobenzanthrone. *Mutat Res*. 2013 May 15;753(2):93-100.

6: Hidaka H, Tsukamoto T, Oyama T, Mitsutsuka Y, Takamura T, Serpone N. Photoassisted defluorination of fluorinated substrates and pharmaceuticals by a wide bandgap metal oxide in aqueous media. *Photochem Photobiol Sci*. 2013;12(5):751-9.

[学会発表] (計 7 件)

1: 高村 岳樹、荻野 真宏、三崎 健太郎、多環芳香族炭化水素の変異原性と構造の活性相関 日本環境変異原学会第 43 回大会 (東京 2014)

2: 金山尚裕、藤川芳宏、川西優喜、高村岳樹、八木孝司、フレームシフト型および塩基置換型突然変異を検出する部位特異的修飾・プラスミドの作製とヒト細胞における TLS 解析 日本環境変異原学会第 43 回大会 (東京 2014)

3: 高村岳樹、徳武学、河川水中の銅イオンの形態分析 日本化学会第 95 春季年会 (千葉 2015)

4: 高村岳樹、環境汚染物質による DNA 損傷の新たな検出法の開発、日本環境変異原学会第 44 回大会 (福岡 2015)

5: 高村 岳樹、小笠原楓、益谷 美都子 DNA 損傷マーカーとしてのリボシルアデノシンの検出、日本薬学会第 136 年会 (2016 横浜)

6: 橋本亜紀子、高村岳樹、ソラレン結合型水溶性フラレンの合成と *in vitro* における評価 日本化学会 第 96 春季年会 (2016 京都)

7: 山中岳寛、高村岳樹、デオキシグアノシンの酸化損傷を検出する蛍光-消光プローブの合成と評価 (2016 京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高村 岳樹 (Takeji Takamura)
神奈川工科大学・工学部・教授
研究者番号：50342910