

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410175

研究課題名(和文)カルボニル基のリン酸化反応を利用した核酸の生合成中間体の合成法の開発

研究課題名(英文) Development of a method for the synthesis of biosynthetic intermediates of nucleic acids via phosphorylation of carbonyl group

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：核酸の生合成中間体であるカルボニル基がリン酸化されたヌクレオチドや、そのリン酸部位を修飾した化学修飾体の合成法の開発に取り組み、独自に開発した酸性活性化剤CMMTを応用することで、スピラベルや蛍光色素を始めとする種々の官能基を持つリン酸基をイノシンのカルボニル基に導入する手法を確立した。更に、これらのリン酸エステルが生体内酵素に対する安定性について評価し、速やかに加水分解されることが分かったため、酵素耐性に優れたチオリン酸基をイノシンのカルボニル基に導入する手法の開発を試み、これを確立した。これらの化合物は、核酸の生合成経路を標的とする分子プローブや分子標的薬としての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a novel method for the synthesis of biosynthetic intermediates of nucleic acids and their chemically modified analogs. In order to achieve this goal, our original non-nucleophilic acidic activator, N-(cyanomethyl)dimethylammonium triflate (CMMT) was applied to the phosphorylation of carbonyl oxygen, finally enabling us to synthesize inosine 6-phosphate esters bearing various substituents, such as those for spin labeling and fluorescent labeling, on their phosphate groups. In addition, the stability of the inosine 6-phosphate esters toward cellular nucleases was examined to find that they were unstable and rapidly hydrolyzed in the presence of these enzymes. To solve this problem, we developed a method for the synthesis of inosine 6-thiophosphate esters, which were more stable toward these enzymes. The molecules developed in this study will be useful as molecular probes and therapeutic agents targeting the biosynthesis of nucleic acids.

研究分野：有機合成化学、生体関連化学

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

生物が有する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存在する。例えば、アデニロ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であるイノシン 6, 5'-二リン酸を中間体としてイノシンーリン酸 (IMP) からアデニロコハク酸を合成する^{1,2}。アデニロ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ーリン酸 (AMP) の前駆体である。このような酵素反応機構の解明は生物学的に極めて重要であると同時に、創薬の観点からも注目されている。カルボニル基がリン酸化された酵素反応中間体が化学合成によって入手できれば、速度論解析や 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。更に、酵素反応中間体の化学修飾アナログが化学合成できれば、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^{3,4}。しかしながら、このようなカルボニル基がリン酸化された酵素反応中間体は、酵素の活性部位で生成し瞬時に次の反応に消費されると考えられ、生体からの単離はほぼ不可能である。また、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、これらの酵素反応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。我々は、先行研究において、独自に見出した酸性活性化剤 CMMT^{5,6} を用いる改良ホスホロアミダイト法を開発し、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の合成に成功している⁷。しかしながら、リン酸ジエステル基に導入した置換基は単純なアルキル基やアリール基のみであり、より複雑な官能基の導入には至っていなかった。また、合成したカルボニル基上のリン酸ジエステルの性質も未解明であった。

2. 研究の目的

このような背景の下、本研究では、先行研究で開発した改良ホスホロアミダイト法によって、アデニロコハク酸の生合成中間体や、リン酸基に様々な官能基を有する生合成中間体アナログの合成を試みた。アデニロ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^{3,4}。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、アデニロ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。最後に、このような活性リン酸基の生物学的安定性等のデータが全く報告されていなかったため、合成した中間体アナログのカルボニル基上のリン酸基の酵素安定性について調査することを目的とした。

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、ホスホロアミダイト法などの既存の手法では極めて困難であった。これは、図 1 に示すイノシン 1 のリン酸化を例にすると、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、例えば 1*H*-テトラゾールを活性化剤とする反応、では瞬時に分解し、出発物に戻るからである。そのため、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った。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、即ち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^{5,6,8}。更に、この改良ホスホロアミダイト法を応用することで、単純な化合物に限られるものの、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の合成にも成功している⁷。本研究では、我々が独自に見出したこの新しいリン酸化反応を応用し、アデニロコハク酸の生合成中間体や、より複雑な官能基を有する中間体アナログの合成法を確立し、得られた化合物の安定性についてのデータを得ることを目指した。

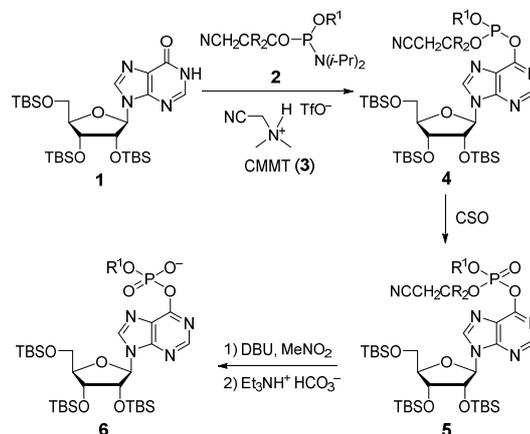


図 1. 活性化剤 CMMT (3) を用いるイノシンのカルボニル基のリン酸化

4. 研究成果

まず、図 2 に示す様に、適切に保護された IMP 7 とホスホロアミダイト 8 を合成し、CMMT 3 を活性化剤とするカルボニル基のリン酸ジエステル化を行い、化合物 10 を得た。次に、5'位のリン酸基の脱保護を行うことで、目的化合物であるイノシン 6, 5'-二リン酸の活性リン酸部位にフェニル基を有する酵素反応中間体アナログ 11 の合成に成功した。これまでの研究で行ったイノシンのカルボニル基のリン酸化⁷は、全て保護されたイノシンに対するものであり、IMP 誘導体に対するカルボニル基のリン酸化によるアデニロコハク酸の生合成中間体イノシン 6, 5'-二リン酸アナ

ログの合成はこれが初めての例となる。

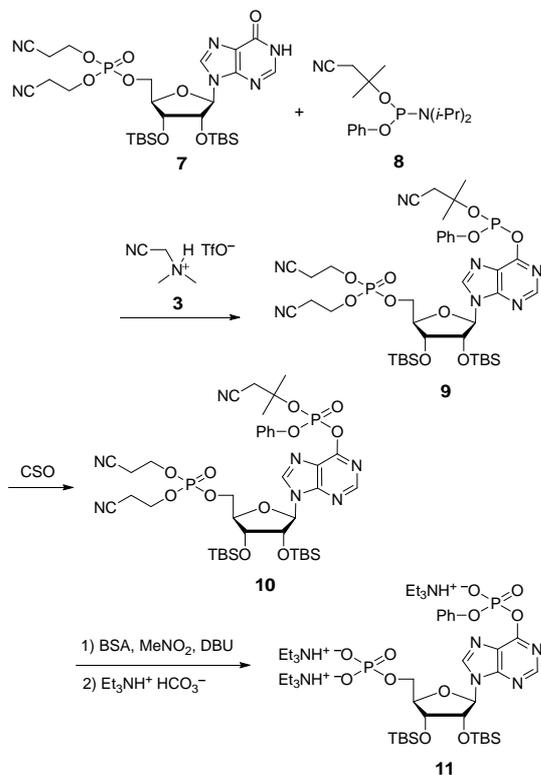


図 2. イノシン 5'-モノリン酸誘導体のカルボニル基のリン酸化

次に、*p*-ニトロフェニル基をリン酸部位に有するイノシン 6-リン酸誘導体 12 を同様の手法によって合成し、これを TBAF を反応させたところ、水酸基の脱保護と同時にリン原子上で核置換反応が起こり、イノシン 6-フルオロリン酸 13 が生成することを見出した (図 3)。このような化合物は、¹⁹F NMR によってアデニロコハク酸合成酵素の触媒機構を解析するプローブになることが期待される。また、フッ素原子は酸素原子と近いサイズであるため、IMP に対して同様のフルオロリン酸化を行うことで、アデニロコハク酸の生合成中間体に極めて類似したアナログ分子が得られることも期待される。

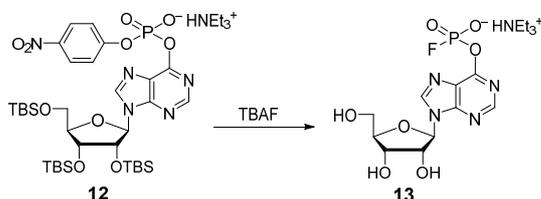
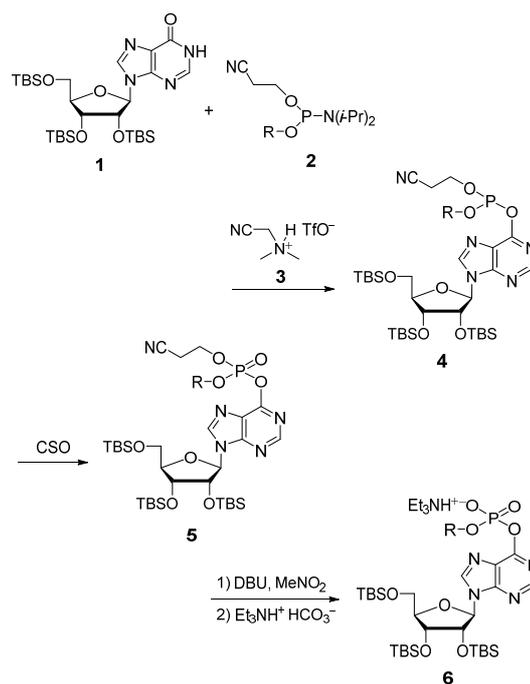


図 3. フルオロリン酸基の導入

上述の通り、我々は、先行研究において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の合成に成功しているが、リン酸ジエステル基に導入した置換基は単純なアルキル基やアリール基のみであり、より複雑

な官能基の導入には至っていなかった⁷。そこで、水酸基を保護したイノシン 1 に対し、スピラベルとして用いられる TEMPO や蛍光ラベルとして用いられるクマリンなどを置換基とするホスホロアミダイト 2 を反応させることで、これらの置換基を活性リン酸部位に有するイノシン 6-リン酸ジエステルの合成に成功した (表 1)。

表 1. 種々のリン酸ジエステル基の導入



entry	R	6	yield (%)
1	1-Ad	a	60
2	TEMPO-4-yl	b	65
3	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄	c	52
4	<i>p</i> -MeOC ₆ H ₄	d	24
5	coumarin-7-yl	e	35

これまでに合成したカルボニル基上のリン酸ジエステルの性質に関するデータは、我々が先行研究において行った水溶液中における pH 依存的な安定性に関するもの⁷のみであり、ほとんど未解明と言ってよい。このような分子を生体内で機能する分子プローブや医薬として用いるためには、生物学的安定性、特にリン酸ジエステル加水分解酵素に対する安定性の調査が必須である。そこで、化合物 14 に対し、代表的なリン酸ジエステル加水分解酵素であるホスホジエステラーゼ I とヌクレアーゼ P1 を作用させたところ、数分以内に迅速かつ完全に加水分解されることが分かった (図 4)。即ち、更なる化学修飾によってリン酸ジエステル加水分解酵素への安定性を確保することが重要であると判明した。

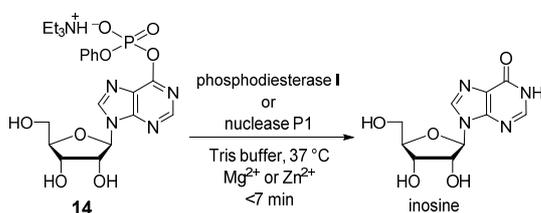


図 4. 酵素安定性の調査

上述の酵素安定性に関するデータを踏まえ、リン酸ジエステル加水分解酵素に対する安定性がより高いことが知られているチオリン酸基⁹の導入を試みた。保護イノシン **1** に対し、CMMT **3** の存在下クマリン由来のホスホロアミダイト **15** を反応させ、リン原子の硫化、脱保護を行うことで目的化合物 **18** の合成に成功した(図 5)。本反応では、硫化剤の選択が極めて重要であり、Beaucage reagent¹⁰ では目的化合物 **18** は全く得られないのに対し、より反応性が高い EDITH¹¹ を用いると収率良く **18** が得られることを見出した。

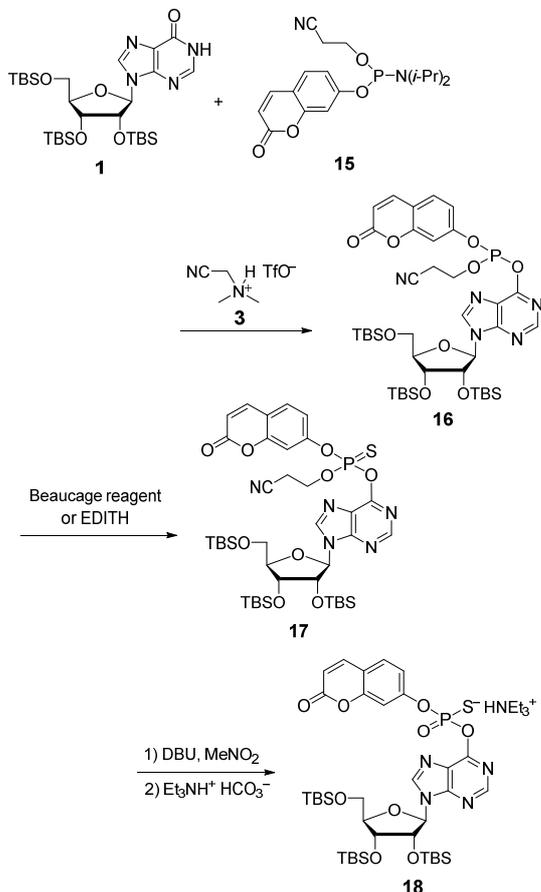


図 5. イノシンのカルボニル基のチオリン酸化

参考文献

- 1) Eaazhisai, K.; Jayalakshmi, R.; Gayathri, P.; Anand, R. P.; Sumathy, K.; Balaram, H.; Murthy, M. R. N. *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 1251–1264.
- 2) Iancu, C. V.; Zhou, Y.; Borza, T.; Fromm, H. J.; Honzatko, R. B. *Biochemistry* **2006**, *45*,

11703–11711.

- 3) Siehl, D. L.; Subramanian, M. V.; Walters, E. W.; Lee, S.-F.; Anderson, R. J.; Toschi, A. G. *Plant Physiol.* **1996**, *110*, 753–758.
- 4) Poland, B. W.; Bruns, C.; Fromm, H. J.; Honzatko, R. B. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 15200–15205.
- 5) Oka, N.; Wada, T.; Saigo, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8307–8317.
- 6) Oka, N.; Yamamoto, M.; Sato, T.; Wada, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16031–16037.
- 7) Oka, N.; Morita, Y.; Itakura, Y.; Ando, K. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11503–11505.
- 8) Oka, N.; Wada, T. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5829–5843.
- 9) Eckstein, F. *Nucl. Acid Ther.* **2014**, *24*, 374–387.
- 10) Iyer, R. P.; Egan, W.; Regan, J. B.; Beaucage, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1253–1254.
- 11) (a) Xu, Q.; Musier-Forsyth, K.; Hammer, R. P.; Barany, G. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1602–1607. (b) Xu, Q.; Barany G.; Hammer, R. P.; Musier-Forsyth, K. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3643–3644. (c) Ma, M. Y.-X.; Dignam, J. C.; Fong, G. W.; Li, L.; Gray, S. H.; Jacob-Samuel, B.; George, S. T. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3590–3593.

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. Synthesis of 2-pyridylthiophosphinic acids and 2-pyridylthiophosphonate monoesters via nucleophilic aromatic substitution. Oka, N.; Ori, K.; Ando, K. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2017**, *192*, 454–463. 査読有 DOI: 10.1080/10426507.2016.1248763
2. Stereocontrolled solid-phase synthesis of PO/PS chimeric oligodeoxyribonucleotides on an automated synthesizer using an oxazaphospholidine–phosphoramidite method. Nukaga, Y.; Oka, N.; Wada, T. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 2753–2762. 査読有 DOI: 10.1021/acs.joc.5b02793
3. リン原子修飾オリゴ核酸の立体選択的合成 岡 夏央・和田 猛 有機合成化学協会誌 **2016**, *74*, 31–44. 査読有 DOI: 10.5059/yukigoseikyokaisi.74.31
4. Enhancement of affinity of 2'-O-Me-oligonucleotides for complementary RNA by incorporating a stereoregulated boranophosphate backbone. Nukaga, Y.; Takemura, T.; Iwamoto, N.; Oka, N.; Wada, T. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 2392–2395. 査読有 DOI: 10.1039/C4RA11335G
5. α -Selective ribofuranosylation of alcohols with ribofuranosyl iodides and

- triphenylphosphine oxide. Oka, N.; Kajino, R.; Takeuchi, K.; Nagakawa, H.; Ando, K. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 7656–7664. 査読有 DOI: 10.1021/jo500632h
6. 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**, *79*, 3465–3472. 査読有 DOI: 10.1021/jo500185b

〔学会発表〕(計 27 件)

1. 岡 夏央 Fluorescent labeling of tRNA using tRNA guanine transglycosylase 2016 分子化学研究会 2016.11.26–11.24 鳥取大学
2. 福田 茜・岡 夏央・清水 陽介・安藤 香織・能村 友一朗・中村 浩史・大野 敏・横川 隆志 7-デアザグアニン誘導体の合成法の開発と応用 第47回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2016.11.5–11.6 豊橋技術科学大学
3. Natsuhisa Oka, Yuta Itakura, Yasuhiro Morita, Kaori Ando, Synthesis of inosine 6-phosphate derivatives via phosphorylation of carbonyl oxygen. The 43rd International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2016), 2016.9.27–9.29, Kumamoto University.
4. 岡 夏央・森井 鴻介・梶野 麟・安藤 香織 -リボフラノシドの高立体選択的合成 第 35 回日本糖質学会年会 2016.9.1–9.3 高知市文化プラザ かるぼーと
5. 岡 夏央 キラルブレンステッド酸を用いる不斉ホスホロアミダイト法の開発 新学術領域「有機分子触媒」第 6 回公開シンポジウム 2016.1.22–1.23 大阪科学技術センター(依頼講演)
6. Natsuhisa Oka, Rin Kajino, Kaori Ando, -Selective ribofuranosylation using ribofuranosyl iodides as glycosyl donors. *Pacificchem* 2015, 2015.12.15–12.20, Honolulu, Hawaii, USA.
7. Natsuhisa Oka, Takahiro Oshima, Kensuke Ori, Tomoki Sakai, Naoki Seo, Kaori Ando, Asymmetric synthesis of phosphite triesters using chiral Brønsted acid catalysts. *Pacificchem* 2015, 2015.12.15–12.20, Honolulu, Hawaii, USA.
8. 馬場 直紀・岡 夏央・大島 嵩弘・安藤 香織 キラルブレンステッド酸を用いる亜リン酸トリエステルの不斉合成法の開発 第 42 回有機典型元素化学討論会 2015.12.3–12.5 名古屋大学野依記念学術交流館
9. 板倉 佑太・岡 夏央・森田 康裕・安藤 香織 *o*⁶-ホスホリルイノシン誘導体の合成法の開発 第46回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2015.11.7–11.8 三重大学工学部
10. 瀬尾 直幹・岡 夏央・小里 建喬・酒井 智紀・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 第46回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2015.11.7–11.8 三重大学工学部
11. Natsuhisa Oka, Akane Fukuta, Yousuke Shimizu, Kaori Ando, Yuichiro Nomura, Satoshi Ohno, Takashi Yokogawa, The 42th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2015), 2015.9.23–9.25, I-messae hall, Himeji.
12. 岡 夏央・梶野 麟・安藤 香織 -リボフラノシドの高立体選択的合成法の開発 第 33 回日本糖質学会年会 2015.7.13–7.15 東京大学安田講堂・工学部・山上会館
13. Natsuhisa Oka, Kensuke Ori, Takahiro Ohshima, Tomoki Sakai, Kaori Ando, Asymmetric synthesis of phosphite triesters using chiral Brønsted acids. The 39th Naito Conference, 2015.7.6–7.9, シャトラーゼガトーキングダム 札幌
14. 大島 嵩弘・岡 夏央・安藤 香織 キラルブレンステッド酸を用いる亜リン酸トリエステルの不斉合成法の開発 日本化学会第 95 春季大会 2015.3.26–3.29 日本大学船橋キャンパス
15. 小里 建喬・岡 夏央・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 95 春季大会 2015.3.26–3.29 日本大学船橋キャンパス
16. 梶野 麟・岡 夏央・安藤 香織 -リボフラノシドの高立体選択的合成法の開発 日本化学会第 95 春季大会 2015.3.26–3.29 日本大学船橋キャンパス
17. 大島 嵩弘・岡 夏央・安藤 香織 キラルブレンステッド酸を用いる亜リン酸トリエステルの不斉合成法の開発 第45回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2014.11.29–11.30 中部大学春日井キャンパス
18. 小里 建喬・岡 夏央・酒井 智紀・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法の開発 第45回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2014.11.29–11.30 中部大学春日井キャンパス
19. 梶野 麟・岡 夏央・安藤 香織 -リボフラノシドの高立体選択的合成法の開発 第45回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2014.11.29–11.30 中部大学春日井キャンパス
20. 板倉 佑太・岡 夏央・森田 康裕・安藤 香織 カルボニル基がリン酸化されたイノシン誘導体の合成法の開発 第45回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2014.11.29–11.30 中部大学春日井キャンパス

21. Natsuhisa Oka, Kensuke Ori, Takahiro Ohshima, Tomoki Sakai, Kaori Ando, Asymmetric synthesis of phosphite triesters using chiral Brønsted acids. 新学術領域「有機分子触媒」第2回国際会議(兼)第7回有機触媒シンポジウム 2014.11.21-11.22, 東京大学・伊藤国際学術研究センター「伊藤謝恩ホール」
22. Natsuhisa Oka, Yousuke Shimizu, Akane Fukuta, Kaori Ando, Yuichiro Nomura, Satoshi Ohno, Takashi Yokogawa, Synthesis of 7-ethynyl-7-deazaguanine and its application. The 41th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2014), 2014.11.5-11.7, 北九州国際会議場
23. 岡 夏央・板倉 佑太・森田 康裕・安藤 香織 カルボニル基のリン酸化反応を用いる核酸の生合成中間体アナログの合成 第44回複素環化学討論会 2014.9.10-9.12 札幌市民ホール
24. 岡 夏央・梶野 麟・竹内 薫・永川 晴奈・安藤 香織 ヨウ化糖を用いる -リボフラノシドの合成 第33回日本糖質学会年会 2014.8.10-8.12 名古屋大学
25. Natsuhisa Oka, Stereocontrolled synthesis of *P*-chiral oligonucleotide analogs. 1st Joint International Seminar of Faculty of Science and Technology (Universiti Kebangsaan Malaysia) and Faculty of Engineering (Gifu University) 2014, 2014.7.31-8.1, Gifu University (依頼講演)
26. 岡 夏央・酒井 智紀・小里 建喬・大島 嵩弘・安藤 香織 ビナフチルリン酸塩を用いる不斉ホスホロアミダイト法の開発 新学術領域「有機分子触媒」第4回公開シンポジウム(分子活性化-有機分子触媒合同シンポジウム) 2014.6.20-6.21 北海道大学学術交流会館
27. 岡 夏央 キラルプレンステッド酸触媒を用いる不斉ホスホロアミダイト法の開発 新学術領域「有機分子触媒」第5回公開シンポジウム(兼)第8回有機触媒シンポジウム 2015.5.10-5.11 沖縄県市町村自治会館・自治会館ホール(依頼講演)

〔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/

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