

令和元年5月18日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15431

研究課題名(和文) エピジェネティック修飾シトシンを含むオリゴ核酸の実用的合成法の開発

研究課題名(英文) Practical synthesis of oligonucleotides containing epigenetic cytosines

研究代表者

伊藤 勇太 (Ito, Yuta)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：90783225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現の制御に関与していると考えられているエピジェネティック修飾シトシンのひとつである5-カルボキシシトシンを含むオリゴ核酸の簡便な合成法を確立した。本合成法では、5-トリフルオロメチルシトシンを含むオリゴ核酸をアルカリ水溶液で処理することにより、トリフルオロメチル基をカルボキシ基へと変換している。また本手法を応用し、1種類のオリゴ核酸から様々な修飾オリゴ核酸を合成することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティック修飾シトシンをオリゴ核酸へと導入するために必要なアミダイト体(原料)は非常に高価(5-カルボキシシトシンホスホロアミダイト：約13万円/250mg)であるため、これら原料を安価に供給する手法の開発が必要不可欠である。したがって、本手法は5-カルボキシシトシン導入オリゴ核酸を簡便かつ安価に合成する手法としてエピジェネティクス研究の発展に資するツールになると期待される。また、トリフルオロメチル基を様々な置換基へと変換できることから、オリゴ核酸合成後修飾法として機能性オリゴ核酸創出への展開も期待される。

研究成果の概要(英文)：A concise and practical synthesis of oligonucleotides containing 5-carboxycytosine, which is one of the epigenetic cytosine nucleosides and thought to be involved in regulating gene expression, was developed. The trifluoromethyl group was successfully converted into carboxylic acid by treatment of oligonucleotides containing 5-trifluoromethylcytosine with alkaline solution. Furthermore, this method can be applied to post-synthetic modification of oligonucleotides containing 5-trifluoromethylpyrimidine bases for the preparation of a variety of modified oligonucleotides.

研究分野：有機合成化学

キーワード：エピジェネティック修飾シトシン オリゴ核酸 5-トリフルオロメチルシトシン 5-カルボキシシトシン オリゴ核酸合成後修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスは、DNA の塩基配列に変化を起こすことなく後天的に遺伝子発現を制御する仕組みである。代表的なエピジェネティック修飾としてシトシン 5 位のメチル化による 5-メチルシトシン (mC) の生成が知られており、生命の恒常性を維持するうえで重要な役割を担っている。近年では Tet タンパク質の働きにより、mC が 5-ヒドロキシメチルシトシン (hmC) 5-ホルミルシトシン (fC) 5-カルボキシシトシン (caC) へと酸化され、mC の脱メチル化機構に関与していると考えられている [Ito, S. *et al. Science*, 2011, 333, 1300.]. このように、新たなエピジェネティック修飾シトシンの存在が明らかとなり、現在その機能の解明が精力的に行われている。特に、化学合成により核酸中の望みの位置に修飾シトシンを導入する手法は、エピジェネティック修飾が遺伝子発現に与える影響を精査するための有効な手段である。しかし、これらの原料となるホスホロアミダイト体が市販されているものの極めて高価であり (例: caC phosphoramidite 約 13 万円/250 mg)、現在のところ多くの研究者が容易に使用できる状況にない。したがって、短工程でエピジェネティック修飾シトシンを含むオリゴ核酸を合成できる新手法の開発はエピジェネティクス研究を進展させるための重要な課題といえる。

2. 研究の目的

エピジェネティック修飾シトシンをオリゴ核酸へと導入する実用的な手法の開発を目指す。そのために、簡便に合成できるエピジェネティック修飾シトシン前駆体となる化合物を見出す。

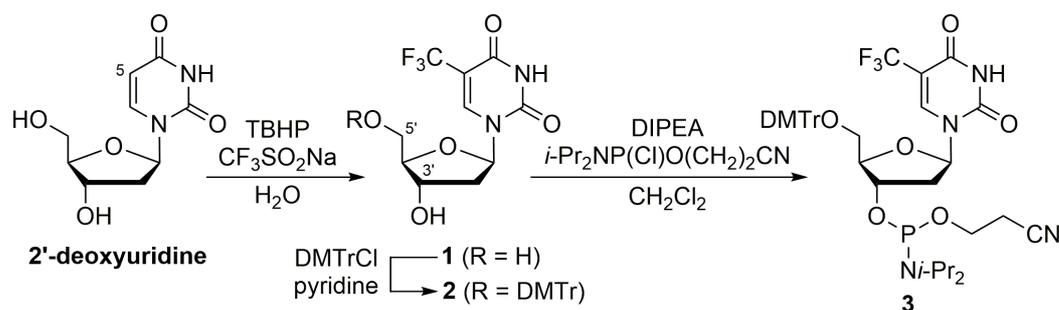
3. 研究の方法

エピジェネティック修飾シトシン前駆体として 5 位にフッ素化されたメチル基を有するシトシン塩基が活用できると考えた。例えば、トリフルオロメチル(CF<sub>3</sub>)基は一般的に安定な官能基であるが、2'-デオキシ-5-トリフルオロメチルウリジン(dU<sup>CF3</sup>)は水酸化ナトリウム水溶液中で加水分解され、2'-デオキシ-5-カルボキシウリジンへと変換されることが知られている [Nestler, H. J. and Garrett, E. R. *J. Pharm. Sci.*, 1968, 57, 1117.]. このような背景から私は、CF<sub>3</sub>基の特異な性質に着目し、オリゴ核酸へと導入した 2'-デオキシ-5-トリフルオロメチルシチジン(dC<sup>CF3</sup>)を加水分解することにより caC に変換できると考えた。また同様に、ジフルオロメチル基やモノフルオロメチル基を有するシトシンを fC や hmC へと誘導できると期待した。そこで、5 位にフッ素化されたメチル基を有する 2'-デオキシシチジンのホスホロアミダイト体を合成し、オリゴ核酸へと導入した後、エピジェネティック修飾シトシンへと変換できるか検討した。

4. 研究成果

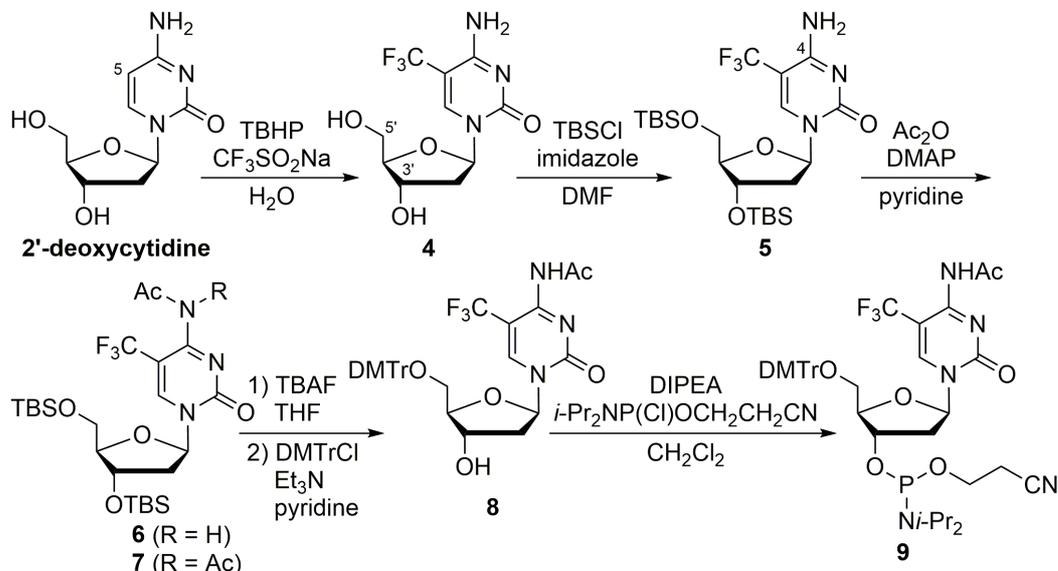
はじめに、5 位に CF<sub>3</sub> 基を有するピリミジン塩基をオリゴ核酸へと導入するため、ホスホロアミダイト体を合成した。なお、5 位に CF<sub>3</sub> 基を有するピリミジン塩基は医薬品や DNA プローブとして利用されているものの、これを導入したオリゴ核酸が二重鎖 DNA(dsDNA)との三重鎖形成に及ぼす影響については検討されていない。したがって、5-トリフルオロメチルピリミジン導入オリゴ核酸の熱安定性評価を行うため、dC<sup>CF3</sup> に加え、dU<sup>CF3</sup> のホスホロアミダイト体も合成することとした。

まず、dU<sup>CF3</sup> のホスホロアミダイト体を合成した (Scheme 1)。2'-デオキシウリジンに *tert*-ブチルヒドロペルオキシド(TBHP)とトリフルオロメチルスルフィン酸ナトリウムで処理すると、ウラシル塩基 5 位への CF<sub>3</sub> ラジカル付加反応が進行し、dU<sup>CF3</sup>1 が得られた。続いて、5'位水酸基のジメトキシトリチル化および3'位水酸基のホスホロアミダイト化を行うことにより dU<sup>CF3</sup> のホスホロアミダイト体 3 を得た。



Scheme 1. ホスホロアミダイト 3 の合成

次に、dC<sup>CF3</sup> のホスホロアミダイト体の合成を行った (Scheme 2)。まず、dU<sup>CF3</sup> の合成と同様に、2'-デオキシシチジンの 5 位を CF<sub>3</sub> 化し、dC<sup>CF3</sup>4 を得た。続いて、3'位と 5'位水酸基を TBS 化した後、4 位アミノ基を無水酢酸で処理してモノアセチル化体 6 とジアセチル化体 7 を得た。これらを TBAF で処理すると、TBS 基の脱保護と同時にジアセチル化体がモノアセチル化体へと変換された。最後に、適切な保護基を導入し、dC<sup>CF3</sup> のホスホロアミダイト体 9 を得た。合成したホスホロアミダイト体 3 と 9 は DNA 合成機を用いてオリゴ核酸へと導入することに成功した。一方、ジフルオロメチル化体やモノフルオロメチル化体の合成も検討したが、研究期間内にそれらのホスホロアミダイト体を得ることはできなかった。



Scheme 2. ホスホロアミダイト 9 の合成

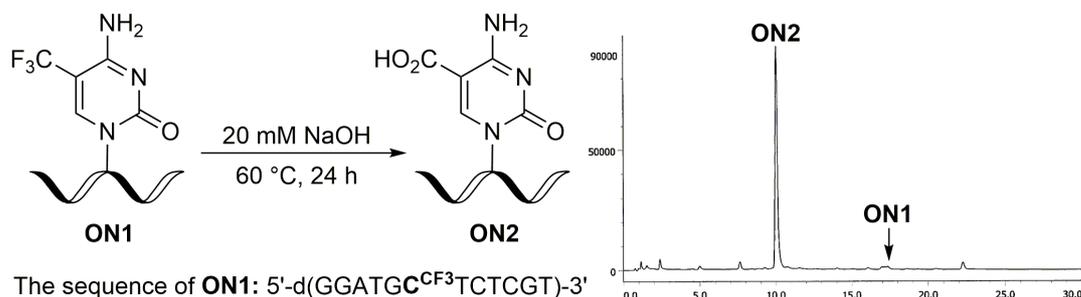
次に、得られた  $dU^{CF_3}$  や  $dC^{CF_3}$  導入オリゴ核酸(TFO)と dsDNA からなる三重鎖核酸の熱安定性を融解温度 ( $T_m$ ) 測定により評価した (Table 1)。その結果、 $dU^{CF_3}$  導入オリゴ核酸 **1c** の dsDNA (YZ = AT) に対する  $T_m$  値は 30 であり、2'-デオキシウリジン (dU) やチミジン (T) 導入オリゴ核酸 **1a** や **1b** と比較して 4-5 低かった。また、 $dC^{CF_3}$  導入オリゴ核酸 **1d** の dsDNA (YZ = GC) に対する  $T_m$  値は 18 であり、2'-デオキシシチジン (dC) や 2'-デオキシ-5-メチルシチジン ( $dC^m$ ) 導入オリゴ核酸 **1e** や **1f** と比較して 11-13 も低いことが明らかとなった。 $dC^{CF_3}$  の  $T_m$  値が大きく低下した理由を考察するため、プロトン化された  $dC^{CF_3}$  の pKa を測定したところ、その値は約 2.6 であり、 $dC(4.4)$  や  $dC^m(4.5)$  と比較して低いことが明らかになった。この結果から、中性条件下では  $dC^{CF_3}$  の 3 位窒素原子のプロトン化が起こらず、水素結合を形成できないため  $T_m$  値が大きく低下したと予想される。さらに、T や C は CG 塩基対とも三重鎖を形成できることから、TF0**1a-f** と dsDNA (YZ = CG) との三重鎖形成能も評価した。その結果、TF0**1c** ( $dU^{CF_3}$ ) は **1a** (dU) や **1b** (T) と比較して  $T_m$  値が 3-4 低下するものの、TF0**1f** ( $dC^{CF_3}$ ) の  $T_m$  値は 17 と **1d** (dC) や **1e** ( $dC^m$ ) と同程度であることが明らかになった。また、 $dC^{CF_3}$ -CG と  $dC^{CF_3}$ -GC の三重鎖形成能に差がないことから、 $dC^{CF_3}$  は選択的に CG 塩基対を認識する核酸塩基として利用できる可能性を示した。

Table 1. TF0**1a-f** と dsDNA からなる三重鎖核酸の  $T_m$  値 ( )<sup>a)</sup>

TFO (X)	YZ		TFO (X)	YZ	
	AT	CG		GC	CG
<b>1a</b> (dU)	34	20	<b>1d</b> (dC)	29	18
<b>1b</b> (T)	35	19	<b>1e</b> ( $dC^m$ )	31	18
<b>1c</b> ( $dU^{CF_3}$ )	30	16	<b>1f</b> ( $dC^{CF_3}$ )	18	17

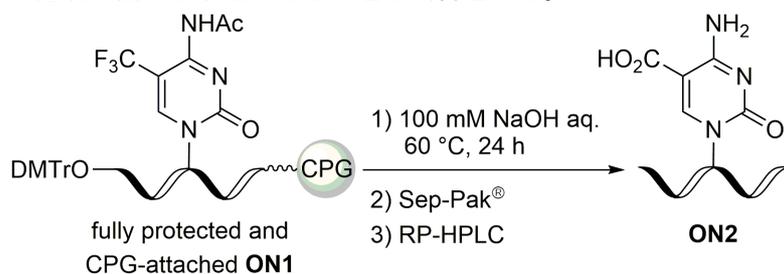
a) Conditions: 10 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 50 mM  $MgCl_2$  and 1.89  $\mu M$  of TF0**1a-f** and hairpin dsDNA. The sequence of TFOs is 5'-d(TTTTCTXTCTCTCT)-3'. The sequence of dsDNA is 5'-d(GGCAAAAGAYAGAGACGC-C18 spacer-GCGTCTCTCTZTCTTTTGGCC)-3'. C indicates 2'-deoxy-5-methylcytidine.

次に、 $dC^{CF_3}$  導入オリゴ核酸の合成後修飾を検討した。反応には Scheme 3 に示す 4 種類の DNA 塩基と  $dC^{CF_3}$  を含むオリゴ核酸 **ON1** を用いた。**ON1** を 20 mM の水酸化ナトリウム水溶液を用いて 60、24 時間処理したところ、期待通り  $CF_3$  基の加水分解が進行し、エピジェネティック修飾シトシンである caC を有するオリゴ核酸 **ON2** を得ることに成功した。



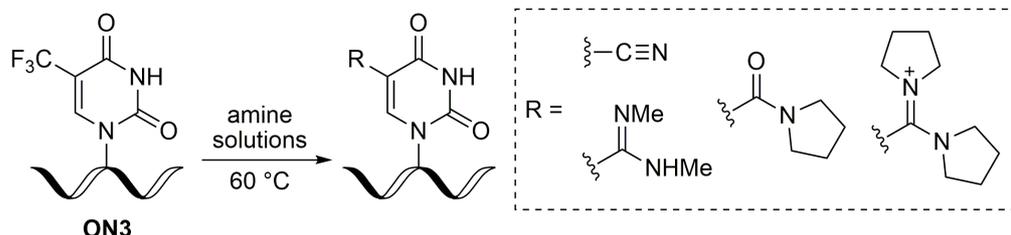
Scheme 3.  $dC^{CF_3}$  導入オリゴ核酸から caC 導入オリゴ核酸への変換

さらに、本手法は CPG に担持された未精製のオリゴ核酸にも適用可能であった (Scheme 4)。すなわち、未精製の ON1 を 100 mM の水酸化ナトリウム水溶液で 60 °C、24 時間処理することにより、CPG 担体からの切り出し、脱保護、CF<sub>3</sub> 基の変換を一挙に行った。その後、Sep-Pac® を用いてジメトキシトリチル基の脱保護を含む前処理をした後、逆相 HPLC を用いて生成を行うことで ON2 を得ることに成功した。このように、本手法は簡便にオリゴ核酸へと導入できる dC<sup>CF<sub>3</sub></sup> を固相担体からの切り出す条件で caC へと効率的に変換できるため、エピジェネティクス研究の発展に資する手法になることが期待される。



Scheme 4. 未精製の dC<sup>CF<sub>3</sub></sup> 導入オリゴ核酸を用いた合成後修飾

また、求核剤としてアミン類を用いることによりオリゴ核酸中のピリミジン塩基 5 位の CF<sub>3</sub> 基を様々なカルボン酸誘導体へと変換できることを見出した。例えば、dU<sup>CF<sub>3</sub></sup> 導入オリゴ核酸をアンモニア、メチルアミンおよびピロリジンで処理すると、それぞれ CF<sub>3</sub> 基がニトリル、アミジン、アミド(アミジニウム)へと変換された (Scheme 5)。また、dC<sup>CF<sub>3</sub></sup> 導入オリゴ核酸をメチルアミンと反応させるとアミド体を得られ、dU<sup>CF<sub>3</sub></sup> とは反応性が異なることを見出した。以上のように、本手法はオリゴ核酸中のピリミジン塩基の 5 位に様々なカルボン酸誘導体を導入できることから、オリゴ核酸合成後修飾法として様々な修飾オリゴ核酸の合成に利用できると期待される。



The sequence of **ON3**: 5'-d(GGATGU<sup>CF<sub>3</sub></sup>TCTCGT)-3'

Scheme 5. dU<sup>CF<sub>3</sub></sup> 導入オリゴ核酸の合成後修飾

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ito, Y.; Matsuo, M.; Yamamoto, K.; Yamashita, W.; Osawa, T.; Hari, Y. Post-synthetic modification of oligonucleotides containing 5-trifluoromethylpyrimidine bases. *Tetrahedron* **2018**, *74*(47), 6854-6860. (査読有) DOI: 10.1016/j.tet.2018.10.006

Ito, Y.; Matsuo, M.; Osawa, T.; Hari, Y. Triplex- and duplex-forming abilities of oligonucleotides containing 2'-deoxy-5-trifluoromethyluridine and 2'-deoxy-5-trifluoromethylcytidine. *Chem. Pharm. Bull.* **2017**, *65*(10), 982-988. (査読有) DOI: 10.1248/cpb.c17-00530

〔学会発表〕(計 4 件)

伊藤勇太, 松尾美咲, 山本一輝, 山下若菜, 大澤昂志, 張 功幸 オリゴ核酸合成後修飾を利用したピリミジン塩基 5 位へのカルボン酸等価体導入法, 日本薬学会第 139 年会, 2019 年

Yuta Ito, Misaki Matsuo, Kazuki Yamamoto, Wakana Yamashita, Takashi Osawa, Yoshiyuki Hari Post-synthetic conversion of 5-trifluoromethylpyrimidine bases within oligonucleotides, The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2018 年

松尾美咲, 伊藤勇太, 大澤昂志, 張 功幸 5-トリフルオロメチルピリミジン塩基を含むオリゴ核酸の直接的化学変換法, 第 1 回 日本核酸化学会 中四国地区セミナー, 2018 年

松尾美咲, 伊藤勇太, 大澤昂志, 張 功幸 5-トリフルオロチミジン含有オリゴ核酸の直接的化学変換法, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年

〔その他〕

ホームページ:

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab06/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。