

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659008

研究課題名(和文) 8-ニトロ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 the selective capture molecule for 8-nitroguanosine

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) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、水溶液中での8-ニトロGの認識を目指し、ニトロ基の脱離能に着目し認識分子にチオールを導入した分子を合成し、共有結合により強固に結合した錯体形成を検討した。フェノキサジン骨格にウレア型側鎖をもつ分子を基本に、水溶液中で8-ニトロGに対して高い錯体形成能を有する分子として、最も効果的な反応性をもつ炭素数3個のチオール体を決定した。水中で8-ニトロG 3', 5'-モノリン酸を特異的に捕捉するため、サイクレン分子を導入した認識分子を合成し、8-oxo-GTP認識をモデルとして検討した。その結果、糖鎖をもちクリック反応で結合したものが最も安定な錯体が形成できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we designed new thiol-containing recognition molecules for the covalent capture of 8-nitroguanosine based on the G-clamp skeleton by introducing thioalkylurea linker units of varying length (nitroG-grasp). The nitroG-grasp compound with C3 linker exhibited the most efficient guanylation even at low concentrations, supporting the selective complex formation for efficient reactivity for 8-nitro-G. The cyclen unit was attached to G-clamp molecule to recognize 8-oxoGTP, as a model compound of the cyclen-nitroG-grasp molecule. The Zn-complex of the cyclen-oxoG-clamp was able to discriminate 8-oxoGTP from GTP in aqueous media. The cyclen unit was also introduced to the nitroG-grasp molecule, which exhibited guanylation reaction for 8-nitroGMP without forming complex with zinc cation. In conclusion, this study has established the molecular basis for covalent capture of 8-nitroGTP and 8-nitroGMP.

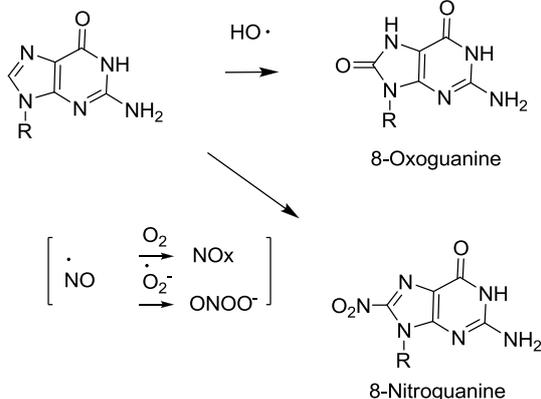
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：化学系薬学

キーワード：8-ニトログアノシン 酸化損傷塩基 8-オキソグアノシン 8-ニトログアノシンモノリン酸 検出

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て行われている[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

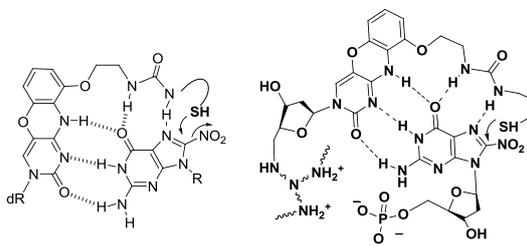
我々はすでにフェノキサジンの基本ユニットとする carbamate 型認識分子(1)を用いて水溶液中の 8-oxodG の検出法の開発に成

功した[6] (特許申請)。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。本研究ではこの知見を展開し、8-nitro-G(dG)に対する新しい蛍光性認識分子を開発する。さらに、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). [10] (a) Yermilov, V. *et al*, *Carcinogenesis* **16**, 2045-2050 (1995), (b) Ohshima, H. *et al*, *Mutat. Res.* **305**, 253-264 (1994). [11] [12] Gu, F. *et al*, *Biochemistry*, **41**, 7508-7518 (2002). [13] Ihara, H. *et al*, *Nitric Oxide* **25**, 169-175 (2011).

3. 研究の方法



チオール基を有する分子(1) カチオン部を加えた分子(2)による8-nitro-G 3',5'-モノリン酸の捕捉

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 の選択的蛍光分子を開発した。一方、urea 型分子は dG 選択的である[8]。興味深いことに、わずかに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-NO<sub>2</sub>-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-NO<sub>2</sub>-dG に対して高い錯体形成能を示し、さらにニトロ基の電子吸引力により 8-NO<sub>2</sub>-dG は dG に比べて極めて高い蛍光消光力を示し、蛍光による dG との区別が可能であることが分かった。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(1)を設計した。

一般的に水素結合錯体は水溶液中で生成しにくいですが、urea 型分子を用いて

MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1 溶液中で 8-NO<sub>2</sub>-dG との錯体形成を検討したところ、有効な蛍光消光が観測され、錯体形成が示唆された。そこで、urea 型チオール化合物(1)と 8-NO<sub>2</sub>-dG との反応を検討したところ、効率的な付加体形成が確認された。この反応は glutathione のチオールとの付加体形成[9]よりも極めて反応速度が速く、ほぼ定量的に進行することから、非共有結合錯体を基盤とする強固な捕捉の可能性は高いものと期待された。従って、本研究では 8-NO<sub>2</sub>-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(1)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(2)を開発し、細胞内における 8-NO<sub>2</sub>-GTP や 8-NO<sub>2</sub>-GMP の特異的な検出法の確立を目指す。

#### 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 が最も効率的反応を示した (図 1)。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 (表 1)。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 (Fuchi, Y.; Sasaki, S. *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 1760–1763)。

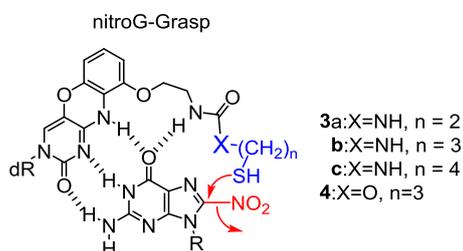


図 1. 各分子の反応性比較

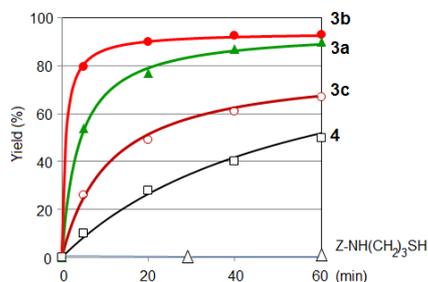
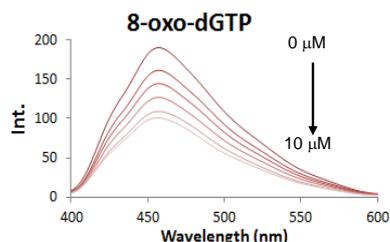
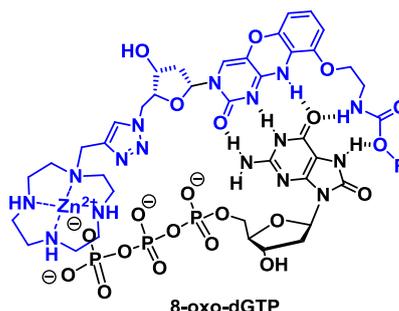


表 1. 反応の速度論パラメーター

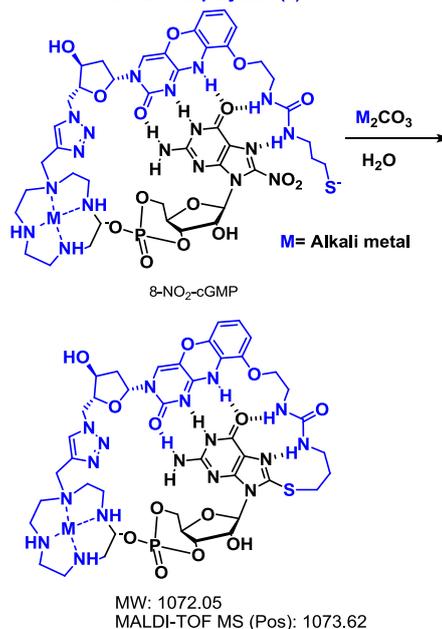
R-SH	$k$ (s <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$E_a$ (kJ/mol)	$\Delta G^\ddagger$ (kJ)	$\Delta H^\ddagger$ (kJ)	$\Delta S^\ddagger$ (J/K)
3a	0.0256	21.6	85.5	19.1	-224
3b	0.0336	16.2	81.8	13.7	-231
3c	0.0064	17.8	87.3	15.4	-244
4	0.0008	12.0	91.4	9.5	-272

この nitroG-Gasp 分子を水中で活用するために、リン酸捕捉ユニットの導入を計画した。8-nitroGTP および 8-nitroGMP に対する認識分子を開発するため、まず予備的検討として水中で 8-oxodTP と錯体形成が可能な分子の開発を検討することにした。G-Clamp 分子の糖部に cyclen をクリック反応を利用して導入し 5 を合成した。5 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。

8-oxoG-clamp-cyclen (5)



nitroG-Grasp-cyclen (6)



この結果をもとに、nitroG-grasp 分子に cyclen を導入した認識分子 (6) を合成した。種々

金属イオンとの共存下 nitroGMP とのグアニル化反応を検討したが、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れたものと考えられる。K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 共存下ではグアニル化反応が起こることが確認された。このグアニル化の効率は十分ではないため、さらにサイクリックモノリン酸捕捉のためのユニットを検索する必要がある。

以上本研究では、8-nitroguanosine 認識部位にチオール反応基を導入した nitroG-grasp 分子の開発に成功した。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。また本研究の過程でモデルとして合成した認識分子は水中で蛍光消光によって 8-oxoGTP を検出できる可能性を示した。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 1 件)

Fuchi Yasufumi and Sasaki Shigeki, Efficient Covalent Capture of 8-Nitroguanosine via a Multiple Hydrogen-Bonded. *Org. Lett.*, **16**(6), 1760-1763 (2014) [doi:10.1021/ol500452r](https://doi.org/10.1021/ol500452r)

[学会発表] (計 7 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[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 )

研究者番号：10170672