

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26560434

研究課題名(和文) 遺伝暗号拡張に必要な究極的第三の人工塩基対の開発

研究課題名(英文) Development of the ultimate third nucleobase required for expansion of the genetic code

研究代表者

関根 光雄 (Sekine, Mitsuo)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：40111679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で提案した新しい人工塩基Wをもつ新規デオキシヌクレオシドdWの合成を検討した。まず、塩基W部位の合成について、2-アミノマロン酸ジエチルエステルとアンモニアを反応させたところ、対応するジアミドが得られた。この生成物に、トリエチルオルソホルメートとギ酸の存在下イソプロパノールと加熱還流したところdW合成の鍵中間体である4-カルバモイル-5-ヒドロキシイミダゾールを高収率で得ることができた。最終目的物であるdWを合成するため、このヒドロキシル基がトリイソプロピルシリルで保護されたもと3',5'-位が保護されたデオキシリボース誘導体の光延反応を現在検討している。

研究成果の概要(英文)：In this study, the synthesis of dW, which was proposed as a new deoxynucleoside having a new synthetic nucleobase, was carried out. The reaction of diethyl 2-aminomalonate with ammonia gave the corresponding diamide for the synthesis of the nucleobase W. When the product was treated with triethyl orthoformate in isopropanol in the presence of formic acid, the key intermediate of 4-carbamoyl-5-hydroxyimidazole could be obtained in a high yield. For the synthesis of the final desired product, the Mitsunobu reaction using the O-triisopropylsilylated species of the imidazole derivative and 3',5'-O-protected deoxyribose derivative is now studied.

研究分野：核酸有機化学

キーワード：新規塩基対 DNAポリメラーゼ 人工塩基 トリリン酸化 遺伝暗号拡張 光延反応

1. 研究開始当初の背景

人工塩基対の開発は、1990年に当時 Florida 大の S. Benner が A-T と G-C に対して新しい塩基対 Z-P を発表した (*Nature* 1990, 343, 33-37)。これは構造的に A-T と G-C と良く似ているが、DNA ポリメラーゼによる取り込み効率が思ったよりも高くなく、今日に至るまで実用化まで達していない。米国 Scripps 研の F. Romesberg や Stanford 大の E. Kool らは、シェイプフィッティングと呼ばれる形状認識に基づく新しいタイプの塩基対を数多く報告してきた。しかし、そのいずれもが基礎研究にとどまり優れたものがない。一方、我が国では、理研の平尾一郎研究グループが通常の水素結合とシェイプフィッティングの両方を利用した新しい塩基対 x-y と s-y を開発している (*Nat. Method* 2006, 3, 729)。現時点では、平尾グループが一步リードしている。

我々の研究グループでは、水素結合からなる人工塩基対について、1990年に S. Benner によって発表された Z-P 以外全く報告がなく、もっと優れたものは本当はないのか疑問を抱き、あらゆる可能性について量子化学的手法により徹底的に調べることにした。その結果、人工塩基対として Z-W (W の構造はイミダゾールの 4 位と 5 位に $-C(=O)-N=C(NH_2)-O-$ が環状構造として連結したもの) 極めて有望であることに気がついた。この人工塩基対は、世界中の研究者が見逃していたものであり、本研究では、この人工塩基対の開発を実施するものである。

本研究は、提案する人工塩基対がこれまでシェイプフィッティングを含めた分子設計に依存せざるを得なかった状況に対して、研究の方向性をより自然な水素結合のみによる分子設計に回帰させたところが、いわば“温故知新”的なところがある。その意味では、人工塩基対の原理も方法論も大変昔から存在していたものであるが、最も正統な研究戦略に舵をきり直したといえる。また、W のような人工塩基を含む DNA はその構造上アンモニア処理で分解が予想されるため、通常の DNA 合成法では合成が難しい。しかし、我々が極く最近開発した塩基部無保護法と呼ばれる新合成手法を用いれば、全合成過程でアンモニア処理が必要でないため、この問題を解決できることに気がついた。逆論すると、W 塩基を含む DNA オリゴマーは我々の合成手法を活用しないかぎり達成できないものであり、世界にさきがけてこの合成ができる優位な立場にある。

2. 研究の目的

DNA は A-T および G-C 塩基対から成る二本鎖高分子体である。この 2 種類の塩基対は、すべての生命体で普遍的なものである。近年、第三番目となる人工塩基対の開発が国内外

で活発におこなわれている。新しい塩基対が開発されると、アミノ酸をコードするトリヌクレオチドの数が $6^3 (= 216)$ に大幅に拡張される。そのため、非天然アミノ酸を、人工塩基を含むトリヌクレオチドにコードさせることによって、多種多様な新規タンパク質を創りだすことができる。しかし、現在世界の研究者が凌ぎを削って競争しているが、まだ理想的なものはない。そこで、本研究では、合理的設計に基づき、DNA 複製反応で正確に機能する“究極の人工塩基対”を開発することを目的とするものである。

本研究は、従来誰も気がつかなかった人工塩基対を開発するものであり、基本的には A-T と G-C と同じように完全に水素結合のみを用いるものであり、また片方の人工塩基には DNA ポリメラーゼ反応に必須のカルボニル基が天然型塩基と全く同じ形式で存在している。シェイプフィッティング利用する場合には、形状認識だけであるため、塩基対形成のための安定化エネルギーに乏しく、酵素反応で天然型ほどの読み取りの精度を得ることはできないが、我々の新規人工塩基対はこの問題を本質的に改善することができると期待される。すなわち、Z-W 塩基対は電子的な構造が G-C に良く似ているため、DNA 複製反応で、相補的な人工塩基同士がお互い選択的に塩基対を形成できるようになると予測している。このような正確な鎖伸張反応が可能になれば、この研究分野は一挙に注目を浴び、計り知れない波及効果が期待される。

3. 研究の方法

提案する新規人工塩基対 Z-W は、片側の Z は S. Benner がすでに合成法を報告している。人工塩基 W を導入したデオキシヌクレオシド (dW) については、様々な有機化学的アプローチを駆使してその合成を達成する。人工塩基を導入した DNA オリゴマーを作るためには、dW の 3'-ホスホロアミダイト誘導体を合成する。最後に、このホスホロアミダイト誘導体の合成を行い、これらを用いて DNA 自動合成機で、人工塩基 W を含む DNA オリゴマーを我々が独自で開発した塩基部無保護法によって合成することを目指すものである。一方、人工塩基 W を含むデオキシヌクレオシドの 5'-トリホスフェート体も同時に合成する。これらの合成法は、極く一般的な合成法を用いることで容易に達成できる。人工塩基を含む DNA オリゴマーが合成できたら、相補的な人工塩基をもつデオキシヌクレオシドの 5'-トリホスフェートが DNA ポリメラーゼによって正確に認識され相補鎖が伸長できる最適条件を見いだすため徹底的に検討する。

4. 研究成果

dW をもつ新規デオキシヌクレオシドの合成: まず、Z と W の人工塩基をもつデオキシ

ヌクレオシド(dZとdW)の合成を検討した。dZは、S. Bennerらの合成法によって合成する予定であるので、この研究の目的を達成するため、まずdWの合成について詳細に検討した。類似の化合物の合成が記載されている文献(S. K. Ihmaid *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.* 2012, 57, 85-101)を参照して市販されているイミダゾール誘導体から出発する5段階の工程による合成法に基づいて当初合成を検討した。しかし、環状化反応にいろいろ問題が生じたので、以下の改良法について順次検討を重ねることとした。

すなわち、本研究で提案した新しい人工塩基W部位の合成について、まず、より構造が簡単な環外のアミノ基がないものを合成することにした。この人工塩基もdWと比べて新規な人工塩基対を組めると思われたため先にこの誘導体の合成を検討した。そこで、2-アミノマロン酸ジエチルエステルとアンモニアを反応させたところ、対応するジアミドが55%の収率で得られた。この生成物に、トリエチルオルソホルメートとギ酸の存在下イソプロパノールと加熱還流したところdWのでアミノ体合成の重要鍵中間体である4-カルバモイル-5-ヒドロキシイミダゾールを93%という高収率で得ることができた。

しかし、この化合物は塩酸塩として得られたため、次の反応の際、溶媒に対して溶解度が著しく低く、なかなか反応を円滑に行うことが困難であることが判明した。そこで、この塩酸塩を遊離の化合物に変換することを検討した。その結果、この塩酸塩を一旦DMSOに加熱して溶解したのち、ピリジンを加えることで、遊離の化合物が析出してくるを見いだした。

次に、アミノ基がないWの合成のため、得られた遊離の化合物に対して、4位と5位の官能基間の環化反応を検討したが、結局環化体は得ることができなかった。その代わりに、アミド基がN-ホルミル化されたものが主に得られた。この化合物をさらに環化させることも種々検討したが目的物は得られなかった。

そこで、方針を変更して、棟部位にあらかじめ人工塩基を先に導入する新しい戦略を練った。すなわち、そのグリコシド化に必要な原料として4-カルバモイル-5-ヒドロキシイミダゾールの5位の水酸基を一旦保護したものと、適切に保護された1位が遊離のデオキシリボース誘導体との脱水縮合反応を検討した。

そこで、当初の目的物である環外アミノ基がないdW誘導体を合成するため、このヒドロキシル基をはじめt-ブチルジメチルシリル基で保護した誘導体の合成を検討した。そ

の結果、0-TBDMS体は得られたがシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離の最中にかなり分解してしまうことがわかり、このシリル基の代わりにより安定なトリイソプロピルシリル基で保護することにした。その結果、トリイソプロピルシリル化されたものが良好な収率で得ることができた。

この生成物と3',5'-位がtBDMS基で保護されたデオキシリボース誘導体の光延反応を現在検討している。この反応の基礎となるモデル反応についてもかなりデータを蓄積できた。

現在は、この段階まで研究を進展させることができたが、今後は、提案する新規人工塩基がDNAポリメラーゼの基質として正確に認識されるか、この研究に必要な新規人工塩基を導入したDNAオリゴマーと新規人工塩基を含むデオキシヌクレオシドの5'-トリリン酸を合成する。前者は、我々が独自に開発した塩基部無保護法(*J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 12710-12721)でおこなうことにしている。後者は、新規塩基を導入したデオキシヌクレオシドを合成し、その5'-リン酸化反応を用いて合成をする。W塩基を導入したデオキシヌクレオシド誘導体は、新規な構造であるので、特に合成上工夫を凝らして、最も効率よい合成法を検討する。さらに、2種類の人工塩基がお互いにDNAに組み込まれたときDNAポリメラーゼの基質として認識されるか検討する。

これらの検討の前に、DNAポリメラーゼの読み取りの予備的なモデル反応として、2'-チオウリジンの5'-トリホスフェートや2'-O-(N-メチルカルバモイル)ウリジンの5'-トリホスフェートを用いて、この基質認識解析のための反応システムを確立することができたので、今後はここで得られた知見を最大限活用して、新たな人工塩基Wの酵素認識について詳細に検討を行っていく予定である。

以上述べた環外にアミノ基がないものもあるものを含め、これらの人工塩基をDNAやRNAに導入するため、当初の計画に従って、我々の開発した塩基部無保護法により実施する予定でもある。

さらに、来年度以降は、この研究は理研の平尾一郎研究室と共同研究として、より一層研究を進展する方針である。

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0件)

[学会発表](計8件)

Mitsuo Sekine, Synthesis and Properties of Base or Sugar Modified RNA Derivatives, XVIth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components SCNAC 2014, Cesky Krumlov, Czech Republic, June, 11, 2014 (Invited Lecture)

Mitsuo Sekine, New Approach to the Synthesis of Modified Oligonucleotides. Contemporary Snapshot of Nucleic Acids Mini-symposium Dedicated to honour Professor Collin B. Reese for his contributions in the area of nucleic acids research. Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland, August 24, 2014 (Invited Lecture)

Mitsuo Sekine, Studies of Modified Oligonucleotides Directed toward Nucleic Acid Drugs. Mini-Symposium on Frontiers of Nucleic Acid Therapeutics. Lodz, Poland, September 1, 2014 (Invited Lecture)

関根光雄、有機化学的アプローチによるアンチセンス研究の展開、核酸医薬の過去、現在、未来、アンチセンス DNA/RNA 研究会、お茶の水・東京ガーデンパレス 3 階会議室、平成 27 年 9 月 7 日

Mitsuo Sekine, Studies on modified oligonucleotides capable of precise recognition and strong binding affinity for target nucleic acids, The 41th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry 2014, 福岡・北九州市国際会議場ホール (Plenary Lecture)

徳川宗史, 金子和平, 金森功史, 正木慶昭, 関根光雄, 清尾康志, 光延反応を用いた N-グリコシド化によるヌクレオシド合成法の検討(東工大院生命理工)、日本化学会、千葉・日本大学理工学部 J6 会場、平成 27 年 3 月 28 日

関根光雄、遺伝子制御機能をもつ人工核酸の合成研究、日本化学会、千葉・日本大学理工学部 14 号館 S5 会場、平成 27 年 3 月 29 日(招待講演)

関根光雄、核酸医薬を指向した修飾オリゴヌクレオチドの創成、日本薬学会、神戸・神戸学院大学 B 号館 J 会場、平成 2

7 年 3 月 29 日(招待講演)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.skn.bio.titech.ac.jp>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
関根光雄 (SEKINE Mitsuo)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：40111679

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号