

8位酸化グアノシンの特異的捕捉分子の開発

九州大学大学院 薬学研究院 創薬科学専攻

生物有機合成化学分野

佐々木 茂貴

1. 目的

DNAは生体内で様々な活性酸素種(ROS)や活性窒素種(RNS)およびアルキル化剤など活性化学種に曝され損傷を受けている。グアニンの酸化によって生成する 8-oxo-dG, FAPY, 8-nitro-dG, 8-thio-dGなどは癌などを誘起する強い遺伝子毒性をもたらすため、疾患リスク指標となっている。一方、ROSやRNSは有害な作用だけでなく、細胞内シグナル分子として様々な機能制御に関与していることが見出され注目を集めている[1]。中でも、ニトロ化ヌクレオチドである 8-nitro-3',5'-cyclic GMP (nitro-cGMP)は、タンパク質チオール基と反応してS-グアニル化することでシグナル伝達分子として機能するという興味深い仮説が提案されている[2]。さらにも、ガス状シグナル分子[3]として急速に研究が進んでいる硫化水素(H₂S)は 8-nitro-cGMPと反応し、8-thio-cGMPを生成することも見出されている。このようにRNS, H₂S, 8-nitro-cGMPおよび 8-thio-cGMPを含む代謝系はこれまで見出されていなかった新しいシグナル伝達系を形成している可能性が考えられている(図1)。このようなシグナル伝達系の解明は生体機能の詳細な理解に繋がり、魅力的な新しい創薬標的となる可能性を秘めている。従って、8-nitro-cGMPや 8-thio-cGMPなどの修飾核酸に対する特異的相互作用分子は生化学研究用の分子プローブとして有用であり、さらに創薬リードとしての発展可能性をもっている。そこで、本研究では 8-nitro-cGMPおよび 8-thio-cGMPに対する選択的な捕捉分子の開発を目指した。

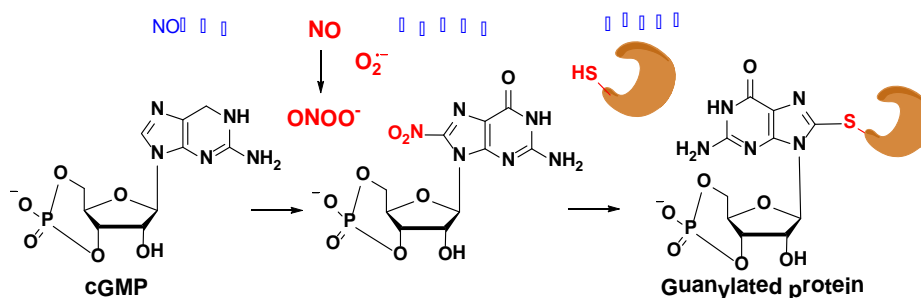


図1. 8-nitro-cGMPを含む新しいシグナル伝達系

2. 方法

分子設計 本研究では、最終的な目標として水溶液中で 8-nitro-cGMPおよび 8-thio-cGMP を認識し捕捉する分子プローブの開発を目指した。我々はすでにフェノキサジン系を基本ユニットとする認識分子(8-oxo-Gclamp)を用いて水溶液中の 8-oxo-dGの検出法の開発に成功した[4,5]。また、DNA中の 8-oxo-dG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[6]。これらの分子は塩基の Watson-Crick部位とHoogsteen部位の両方に相補的な多点水素結合を形成し安定な錯体を形成する特徴を有している。本研究では、8-oxoGclamp基本構造にチオールを有する分子(8-nitroG-grasp)を設計し、効率的なニトロ基置換反応(グアニル化)機能をもつ分子を設計した(図2)。8-NitroG-graspは錯体内で反応点どうしを接近させることによって効率的な置換反応を期待した。本研究では、水溶液中で 8-nitro-cGMPおよび 8-thio-cGMPを共有結合的に捕捉する分子の開発を目的に、反応機構の詳細を分析し、さらにnitroG-graspにcGMPのリン酸アニオン部分とイオン相互作用するカチオン部分の導入を検討した。

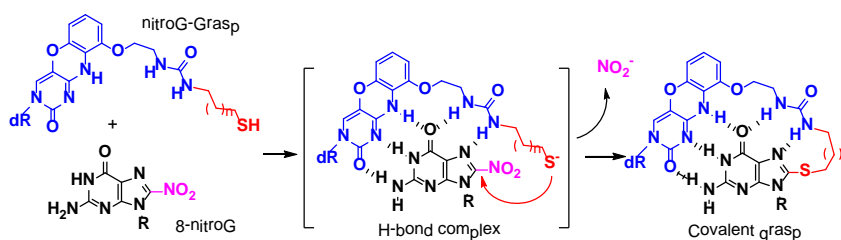
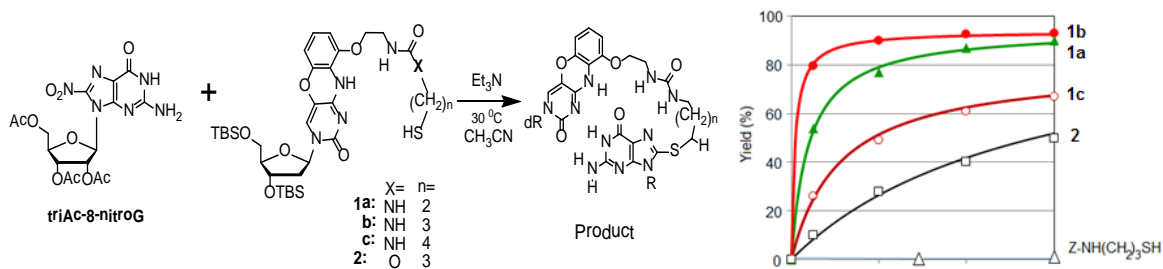


図2. 効率的グアニル化能をもつ認識分子(nitroG-grasp)の設計

3. 結果 研究成果 考察



Scheme 1. NitroG-grasp 分子と nitroG との反応式

図3. 付加体生成収率の経時変化

NitroG-grasp分子とnitroGとの反応を有機溶媒中(10 mM Et₃N in CH₃CN at 30 °C)で検討したところ、効率的nitroGとの付加体が形成することが分かった。アルキルリンカーの長さは反応効率に重要な影響を示し、炭素数3のウレア体(1b)が最も効率的な反応性を示した。比較として用いたカルバメート体では反応速度が低下し、nitroGに対する錯体形成能のないZNH(CH₂)₂SHは全く反応性を示さなかったことから、錯体形成の重要性が示されている。速度論的解析を行ったところ、非常に興味深いことに、活性化エンタルピー変化の最も小さな反応基は2のカルバメート構造であるものの、活性化エントロピー変化が極めて不利に作用し、反応速度が低下していることが明らかになった。一方、最も効率的な分子1bは活性化エンタルピー変化は2の次に小さく、活性化エントロピー変化は1aの次に有利であることから、結果的に最も効率的な反応性が示されたことが分かった。このような反応分析は、水中でのより効果的な反応分子の設計に有用な情報となった[7]。

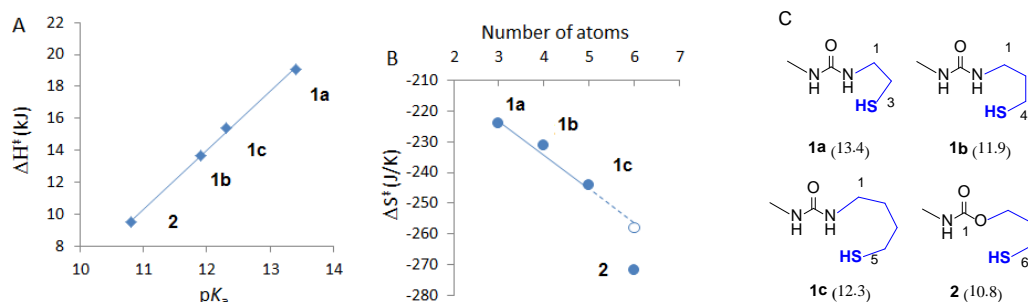


図4. 速度論的解析 (A)活性化エンタルピー変化と pK_a の相関、(B)活性化自由エネルギー変化とリンカーの長さとの相関、(C)チオール反応基の pK_a 計算値。

引き続き、リン酸アニオン捕捉を目的にカチオン部としてサイクレン骨格を利用することとし、8-oxoG-clamp 基本骨格に導入した(3)および8-nitroG-grasp分子(1b)に導入した4を合成して、水中での8-oxo-dGおよび8-nitro-cGMPの捕捉を検討した。まず、Zn²⁺-サイクレン結合8-oxoG-clampによる水中での認識は8-oxo-GTPに対しては比較的低濃度で消光し、GTPに対してはほとんど消光しなかったことから、選択的な検出法への展開が可能であることが示された(図5)。

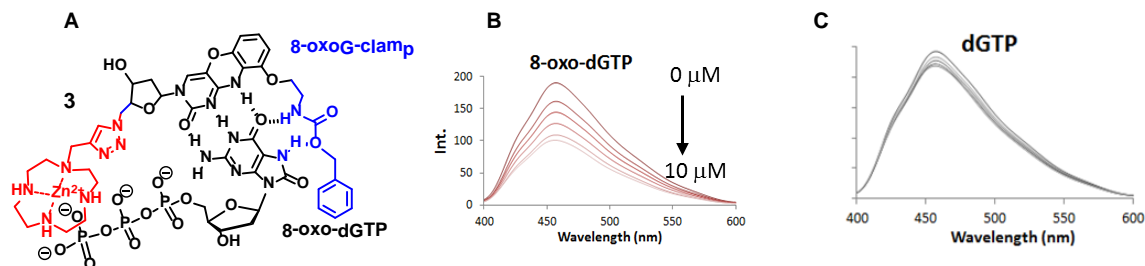


図5. (A)サイクレン導入8-oxoG-clampと8-oxo-dGTPとの錯体設計, (B)8-oxo-dGTPによる蛍光消光, (C)dGTPによる消光。

サイクレン結合 8-nitroG-grasp(4)と 8-nitro-cGMP の水中での反応を検討したところ、有機溶媒中の反応性よりも低下したものの、付加体の形成を確認することができた(図6)。8-Oxo-GTP に対する消光現象によってサイクレン部分と効果的に錯体形成するリン酸基を調べたところ、 Zn^{2+} -サイクレン錯体はトリリン酸と選択的に錯体形成し、cGMP との錯体形成能は小さかった。一方、 Zn^{2+} -サイクレン錯体を結合した 8-nitroG-grasp 分子は 8-nitro-cGMP との反応性は全く示さず、 Zn^{2+} との錯体を形成していないサイクレンを含む 8-nitroG-grasp 分子(4)が反応性を示した。恐らく、チオール反応基と Zn^{2+} が分子内で結合を形成し、チオール基の反応性が失われたものと考えられる。 Zn^{2+} との錯体を形成していないサイクレンはリン酸イオンとの錯体形成能が小さいため、近接効果が十分に得られなかったものと考えられる。

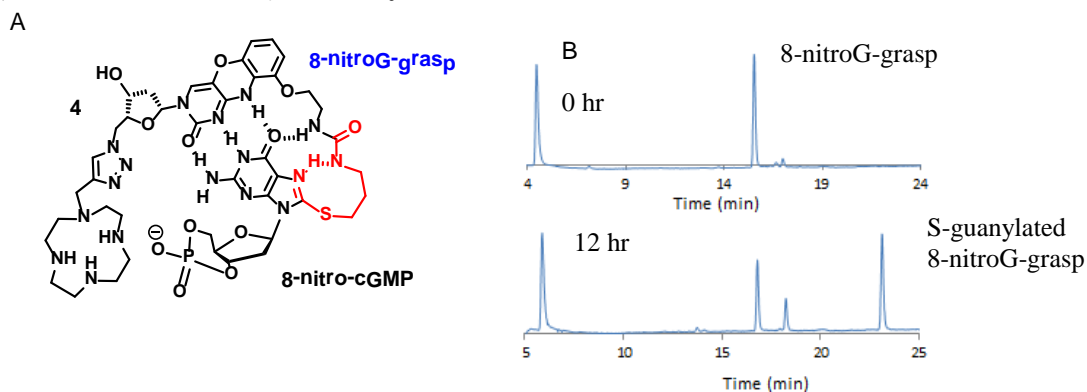


図 6. (A)サイクレン導入 8-nitroG-grasp と 8-nitro-dGMP との付加体構造、(B) 反応の HPLC 追跡。

4. まとめ

8-Nitro-Gはこれまで遺伝子毒性の観点から注目されてきたが、細胞内の活性酸素種(ROS)および活性窒素種(RNOS)の代謝活性を反映する新しい細胞内シグナル伝達分子としての役割が見いだされ新たな関心を引き起こしている。特に8-nitro-cGMPはタンパク質のチオール基の修飾による信号伝達機構が考えられており、ケミカルバイオロジーの観点から興味深い検出対象である。本研究ではこれまで開発が検討されてこなかった8-nitro-cGMPの検出を最終的な目標に、有機溶媒中での基礎検討から始め、水中での捕捉分子の開発を検討した。その結果、チオール反応基を持ち、ニトログアノシン認識部位をもつ 8-nitroG-grasp 分子が効率よくニトロ基を置換し共有結合的に捕捉できることを見出した。8-nitroG-grasp のチオール反応基は pK_a が低い方がアニオンになりやすく高い反応性が期待されるが、錯体形成による近接効果はチオール反応基と認識部位を連結するリンカーの柔軟性に影響を受けることが示された。本研究ではウレア基によりプロピルリンカーにより連結されたものが最も効率的な捕捉反応を実現した。水中での 8-nitro-cGMP 捕捉のため本研究ではサイクレンユニットを用いたところ、捕捉可能性を確認することができたが、低濃度の 8-nitro-cGMP 検出に用いるにはさらに効果的な環状モノリン酸認識ユニットを用いる必要があることが示唆された。さらに効果的に 8-nitro-cGMP を捕捉し検出する分子の開発を目指し、現在、チオール反応性を高めるリンカー構造と、環状モノリン酸錯体形成ユニットの決定を検討中である。

5. 発表論文、参考文献

- [1] 谷口監修、赤池、鈴木、内田編集「活性酸素シグナルと酸化ストレス」実験医学, Vol 27 (15) (2009).
- [2] T. Sawa, *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 727-735 (2007).
- [3] A review, M. Kajimura, *et al.*, *Antioxidants & Redox Signaling*, **13**, 157-192 (2010).
- [4] (a) Nakagawa, O.; Ono, S.; Li, Z.; Tsujimoto, A.; Sasaki, S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4500-4503 (2007). (b) Li, Z.; Nakagawa, O.; Koga, Y.; Taniguchi, Y.; Sasaki, S. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 3992-3998 (2010). (c) Koga, Y.; Fuchi, Y.; Nakagawa, O.; Sasaki, S. Optimization of fluorescence property of the 8-oxodgclamp derivative for better selectivity for 8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Tetrahedron* **67**, 6746-6752 (2011).
- [5] 「水性検体中の 8 - オキソ - 2' - デオキシグアノシンを高感度で定量検出する方法」(PCT/JP2012/57750).
- [6] Taniguchi Y, Kawaguchi R, Sasaki S., Adenosine-1,3-diazaphenoxazine derivative for selective base pair formation with 8-oxo-2'-deoxyguanosine in DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 7272-7275 (2011).
- [7] Fuchi, Y. and Sasaki, S. submitted.