

リジン反応性ケージド人工核酸の開発と標的生体分子の部位特異的修飾への応用

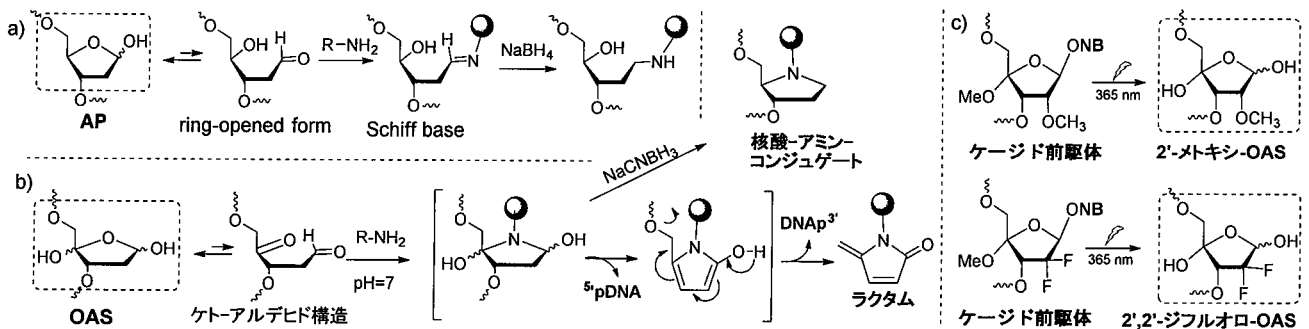
楊, 波

<https://hdl.handle.net/2324/1543945>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

【目的】カルボニル基を有する核酸はその反応性や水中における安定性から生体分子のコンジュゲート形成やラベリングに広く応用されている。その一例として核酸塩基欠損部位(AP)は平衡下、一部存在する開環型構造ではC1位アルデヒド構造を持ち、生体分子のアミノ基とSchiff baseを形成し、還元操作を経て安定なコンジュゲート体を形成する¹⁾(Scheme 1a)。一方、当研究室ではDNAの酸化損傷体の一つである4位酸化塩基欠損部位(OAS)が平衡下、一部存在する開環型構造においてケト-アルデヒド構造を持ち、中性条件下アミン分子と反応し高収率でラクタム体を形成することを見出した²⁾(Scheme 1b)。ラクタム体は5員環ヘミアミナル中間体を経由し、DNA鎖の脱離を伴い、生成すると考えられる。OASは塩基部が存在しないが、DNAと類似構造をとり相補鎖と二本鎖を形成できることから、DNAと相互作用する蛋白質の塩基性アミノ基をラクタム化できると予想した。DNAと相互作用する蛋白質のリジン残基はDNAの損傷塩基を除去する触媒作用や核酸のリン酸部との相互作用に関与するなど重要な働きを持つ。OASを有するODNは核酸と相互作用する蛋白質の中で、ODNの糖部C1位またはC4位に接近するリジン残基を効率的にラクタム化できると予想した。また、還元的条件下では、OASのC1, 4位ジカルボニル基の協同効果により、APのC1位アルデヒドに比べ、効率的に生体分子とコンジュゲートを形成できると予想した。更にOASの糖部C2位に以下の化学修飾を行い、OASの反応性及び安定性の向上を目指した。1) RNAタイプの塩基欠損部位はDNAタイプに比べてβ脱離が起こりにくいことから、2'-メトキシOASではOASより安定性の向上を目指した。2) フッ素の強力な電子吸引性を利用し、2',2'-ジフルオロOASではC1位アルデヒド反応性の向上を目指した(Scheme 1c)。これらの化合物の反応性を利用すれば、蛋白質のリジン残基を部位特異的修飾により、リジン残基の位置や機能を特定し、核酸-蛋白質相互作用に関する情報を得ることができ、さらに蛋白質の機能制御にも応用できる。本研究では光分解性保護基である*o*-Nitrobenzyloxy (NB)基を導入したケージド化合物を前駆体として光照射によりOAS及びその誘導体を合成し、反応性研究を行った。まず還元条件下において、ジカルボニル基を持つOAS及び2'-メトキシOASのアミン反応性をモノアルデヒド基をもつAPと比較した。また2'-メトキシOASを用い、還元的アミノ化によるリジン残基を有するペプチドとのコンジュゲート形成を行った。最後に大腸菌複製開始蛋白質であるDnaAのDNA結合配列にOASを導入したODNを用い、DnaA及びそのDNA結合部位であるDomain IVのリジン残基部位特異的修飾を検討した。

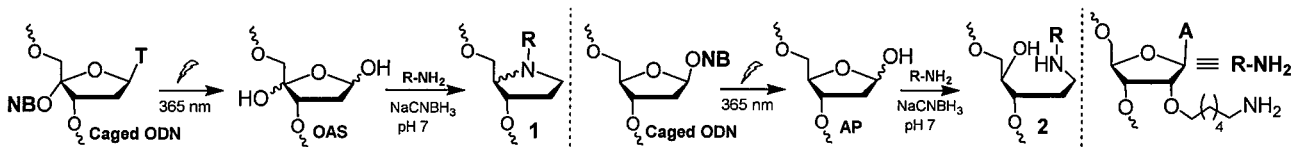
Scheme 1



【実験】 1) 反応性核酸と近接するアミン ODN との反応性評価

OAS または AP の Caged 前駆体 ODN とアミノヘキシル基を持つ相補鎖からなる 2 本鎖を 365 nm の光照射した後、OAS または AP への変換を HPLC で確認し、更に過剰量の NaCNBH_3 (10^3 eq.) を加え、pH 7 (10 mM) リン酸緩衝液中、25 度でインキュベートし、HPLC を用いて、反応解析を行った。OAS とアミノヘキシル基を持つ相補鎖との還元的アミノ化反応では原料ピークの消失を伴い、保持時間の長い二つの新規ピークを見られ、これを分取し、MALDI-TOFMS 測定の結果、Scheme 2 に示す 5 員環アミン構造を持つクロスリンク体 **1** であることが分かった。また還元的アミノ化においては、C4 位の立体制御ができないため、クロスリンク体 **1** はジアステレオマー混合物で、HPLC では二つのピークとして、分離することができた。AP とアミノヘキシル基を持つ相補鎖との還元的アミノ化反応では原料消失を伴い、保持時間の長い一本の新規ピークを見られ、これを分取し、MALDI-TOF-MS 測定の結果、Scheme 2 に示すクロスリンク体 **2** が得られた。

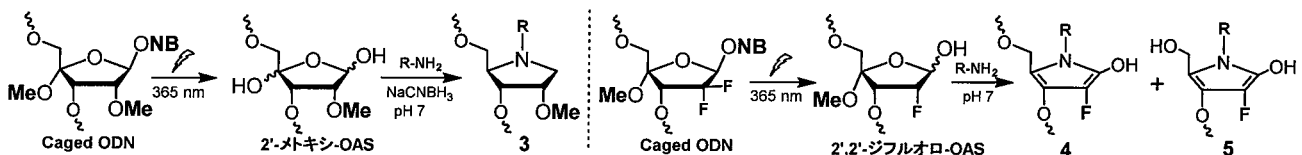
Scheme 2



2'-メトキシ OAS とアミノヘキシル基を持つ相補鎖との還元的アミノ化反応では、pH 7 (10 mM) リン酸緩衝液中、25 度でインキュベートし、原料ピークの消失を伴い、保持時間の長い二つの新規ピークを見られ、これを分取し、MALDI-TOFMS 測定の結果、Scheme 3 に示す 5 員環アミン構造を持つクロスリンク体 **3** であることが分かった。クロスリンク体 **3** もジアステレオマー混合物で、HPLC では二つのピークとして、分離することができた。

2',2'-ジフルオロ OAS とアミノヘキシル基を持つ相補鎖との反応では、試薬を必要とせず、pH 7、8 (50 mM) リン酸緩衝液中、37 度でインキュベートし、原料消失に伴い、保持時間の長い二本の新規ピークを見られ、これを分取し、MALDI-TOFMS 測定の結果、Scheme 3 に示すピロール構造を持つクロスリンク体 **4** 及び 3'-末端 ODN 脱離したクロスリンク **5** を得ることが出来た。

Scheme 3

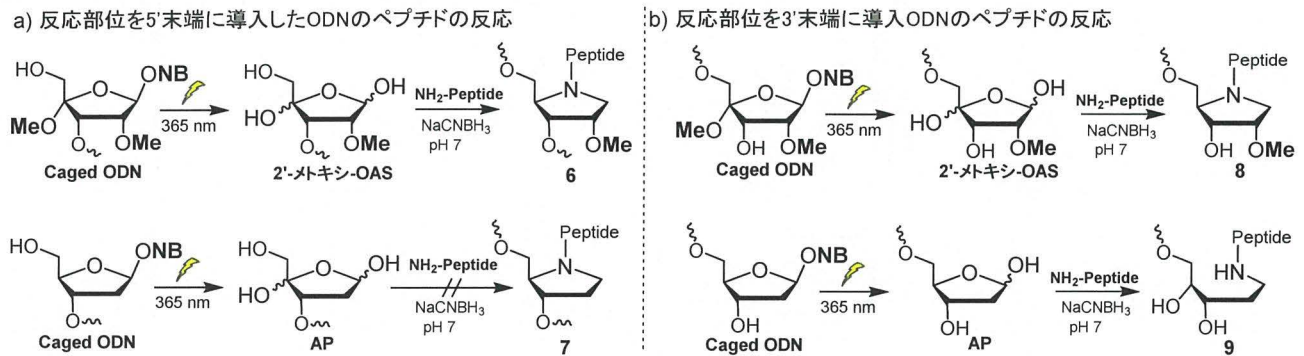


2) 3'-末端または 5'-末端に反応性部位を持つ反応性核酸とペプチドとのコンジュゲート形成

核酸医薬の臨床応用において細胞内へのデリバリーを改善するため、膜透過ペプチドとのコンジュゲート形成は有効な方法である。著者は 2'-メトキシ OAS 及び AP を 3'末端、また 5'末端に持つ ODN と核外移行シグナルペプチドとの還元的アミノ化によるコンジュゲート形成効率を比較した。ペプチドとの反応では、アミン側鎖をもつ相補鎖との反応のように近接効果がないため、過剰量なペプチドを用いることにした。反応性前駆体を 5'末端に持つ Caged ODN のリン酸緩衝液中、ペプチド (20 eq.) を加え、光照射により、2'-メトキシ OAS また AP を 5'末端に持つ ODN へ変換した後、37 度、インキュベートし、HPLC を用いて反応解析を行った (Scheme 4a)。2'-メトキシ OAS を 5'末端に持つ ODN とペプチドとの反応では、原料が消失し、Scheme 4 に示すコンジュゲート **6** を得ることが出来た。一方、AP を 5'末端に持つ ODN とペプチドとの反応では HPLC では新規ピークを確認できなかった。

反応性前駆体を3'末端に持つ Caged ODN のリン酸緩衝液中、ペプチド(20 eq.)を加え、光照射により、2'-メトキシ OAS また AP を5'末端に持つ ODN へ変換した後、37 度、インキュベートし、HPLC を用いて反応解析を行った(Scheme 4b)。2'-メトキシ OAS を3'末端に持つ ODN とペプチドとの反応では、原料が消失し、Scheme 4 に示すコンジュゲート **8** を高収率で得ることが出来た。AP を3'末端に持つ ODN はコンジュゲートと反応ではコンジュゲート **9** を低収率で得ることが出来た。

Scheme 4



3) 反応性核酸による DnaA 蛋白質のリジン基部位特異的修飾反応

DNA 鎖のリン酸部に接近するリジン残基を持つ DNA 結合性蛋白質として大腸菌複製開始蛋白質である DnaA を選び、蛋白質のリジン部位特異的修飾反応を行った(Scheme 5)。DnaA の DNA 結合配列に Caged 前駆体を含む ODN duplex を光照射した後、OAS を含む ODN duplex へ変換し、20 mM HEPES 緩衝液中(pH 7.6)、DnaA と複合体を形成した後、25 度で、終夜インキュベートし、反応液を SDS-PAGE を用いて解析を行った。還元剤非存在下では DnaA のラクタム修飾成績体と見られる移動度の早い新規バンドを与えた。還元剤存在下では、DNA-DnaA コンジュゲートと見られる移動度の遅いバンドを見られた。より詳細な反応解析を行うため、DnaA の DNA 結合部位である Domain IV (Figure 1a) との反応を行ったところ、OAS を含む ODN は還元的条件下では移動度の低いコンジュゲートバンドが見られた(Figure 1b, Lane 3)。2'-メトキシ OAS を含む ODN は、OAS に比べ、コンジュゲート生成効率が劣るもの、大部分は Domain IV とコンジュゲートを形成した (Figure 1b, Lane 4)。AP を含む ODN は Domain IV とのコンジュゲートのバンドを見られなかった(Figure 1b, Lane 5)。更に、OAS ODN と Domain IV とのコンジュゲートを酵素による加水分解を行い、得られた核酸-ペプチドフラグメントを MALDI-TOF MS により測定し、Domain IV のリジン 43 残基が修飾されことを示唆された(Figure 1c)。

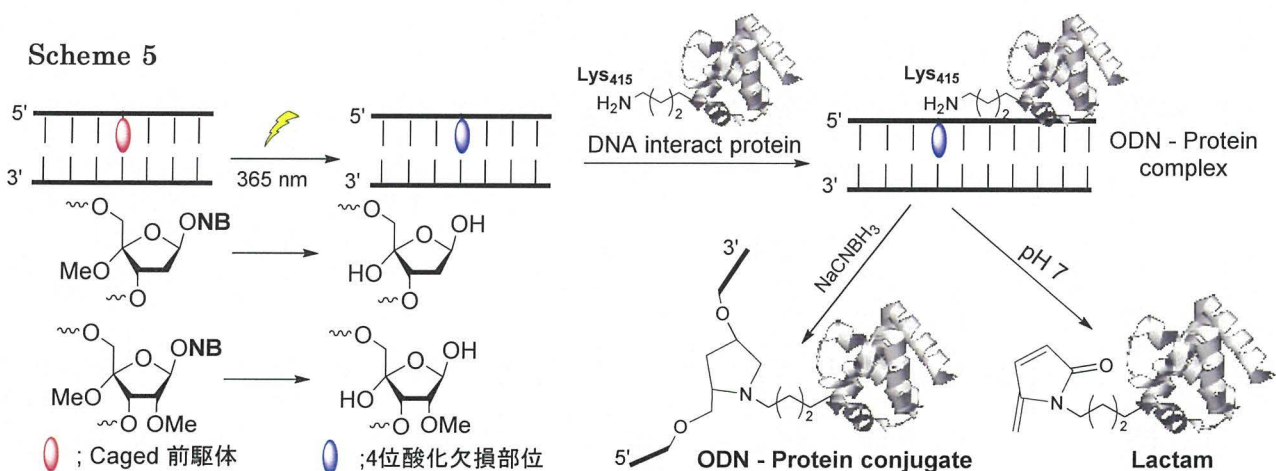
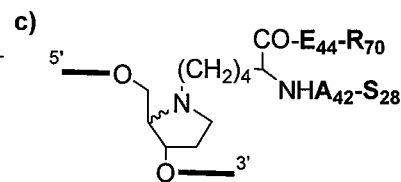
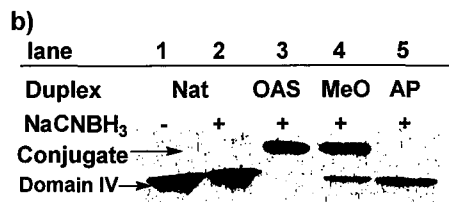


Figure 1 a)

¹MVTIDNIQKT¹¹VAEYYKIKVA²¹DLLSKR
³¹RSRS³¹VARPRQMAMA⁴¹LA K ELTNHSL
⁵¹PEIGDAFGGR⁶¹DHTTVLHACR⁷¹KIEQ
⁸¹LREESH⁸¹DIKEDFSNLIRTLSS



【結果】 1) 反応性核酸と近接するアミン ODN との反応性評価

OAS を含む ODN はアミノヘキシル基を持つ相補鎖との還元的アミノ化で 73% の収率でクロスリンク **1** を与えた。一方、AP を含む ODN は 71% の収率でクロスリンク **2** を与えたが、OAS を含む ODN より、10 倍程度反応が遅かった。2'-メトキシ OAS は OAS より安定でβ-脱離が起こらず、83% の高収率でクロスリンク **3** を与え、反応は OAS と同程度の速度で進行した。これらの結果からジカルボニル基を有する OAS 及び 2'-メトキシ OAS はモノカルボニル基を有する AP より反応速度が速いことが明らかとなった³⁾。一方、2',2'-ジフルオロ OAS は試薬を必要とせず、クロスリンク **4, 5** を其々 55%, 43% の高収率で生成した⁴⁾。

2) 3'-末端または 5'-末端に反応性部位を持つ反応性核酸とペプチドとのコンジュゲート形成

2'-メトキシ OAS 及び AP を 3'末端、また 5'末端に持つ ODN とペプチドとの還元的アミノ化において、2'-メトキシ OAS を導入した ODN のうち、5'末端に導入したものでは 70% で、3'末端に導入したものでは 90% という高い収率でコンジュゲートを形成した。一方、AP を 5'末端に持つ ODN はペプチドとの反応はまったく進行せず、また 3'末端に持つ ODN の反応ではコンジュゲート収率は 10% と低かった。これらの結果からアミン側鎖を持つ相補鎖との反応のように近接効果がない場合でも、ジカルボニル基を有する 2'-メトキシ OAS はモノカルボニル基を有する AP より反応性が高いことが分かった。また反応部位を ODN の 3'末端に持つ場合は、5'末端に持つ場合より、反応性が高いという興味深い知見を得た³⁾。

3) 反応性核酸による DnaA 蛋白質のリジン基部位特異的修飾反応

OAS を含む ODN は DnaA との反応において、高収率でラクタム修飾成績体を与えた。また還元条件下では核酸-蛋白質コンジュゲートを高収率で与えた。更に DnaA の DNA 結合部位である Domain IV との反応を行ったところ、OAS を含む ODN は 2'-メトキシ OAS 及び AP 含む ODN より還元的条件下で Domain IV とのコンジュゲートの形成効率が高い。得られたコンジュゲートを酵素による加水分解で生成したフラグメントを解析した結果、Domain IV のリジン 43 残基が部位特異的に修飾されることを示唆された。MacroModel を用いた計算では OAS の開環型構造では自由度が大きく、その C1 位アルデヒドの方が AP の C1 アルデヒドよりリジン 43 に接近した可能性が示唆された³⁾。

【考察】本研究は、ジカルボニル基を有する OAS 及びその誘導体はモノカルボニル基を有する AP より、アミン側鎖を持つ相補鎖やリジン残基を持つペプチドと効率よくコンジュゲートを形成し、また OAS を核酸の特定の配列に導入することにより、核酸と相互作用する蛋白質のリジン残基の部位特異的修飾に応用可能であることを明らかにした。OAS の高いアミン反応性は開環型構造におけるジカルボニル基の協同効果によるものと考えられる。

【引用文献】 1) M. Manoharan, L. K. Andrade, P. D. Cook, *Org. Lett.*, **1999**, *1*, 311–314. 2) M. Aso, M. Kondo, H. Suemune, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9023–9033. 3) B. Yang, A. Jinnouchi, K. Usui, T. Katayama, M. Fujii, H. Suemune, M. Aso, *Bioconjugate Chemistry*, **2015**, in press. 4) B. Yang, A. Jinnouchi, H. Suemune, M. Aso, *Organic Letters*, **2012**, *14*, 5852–5855.