

1,3-ジアザフェノキサジン環を基本骨格にもつ8位酸化グアノシンを標的とした機能性認識分子の開発

淵, 靖史

<https://doi.org/10.15017/1807147>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（創薬科学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済



1,3-ジアザフェノキサジン環を基本骨格にもつ 8位酸化グアノシンを標的とした機能性認識分子の開発

生物有機合成化学分野 瀧 靖史

【序論】 生体が酸素を消費することによりエネルギーを産生する過程で、副次的に活性酸素種 (ROS) や活性窒素種 (RNOS) などの酸化ストレス物質が発生する。DNA 及び RNA 塩基の一種であるグアニンは酸化反応を受けやすく (Figure 1)、8-オキソグアノシン (8-oxoG) や 8-ニトログアノシン (8-nitroG) などの損傷塩基へと変換されて、遺伝子突然変異を誘発し疾患を発症するとされている。そのためこれら酸化損傷塩基は酸化ストレス負荷量を示す生体分子マーカーとして捉えられ、HPLC-ECD や LC-MS/MS、ELISA などの高度な検出法が開発されているが、有用な低分子プローブや特異的認識分子の報告例は無い。当研究室ではこれまでに酸化損傷塩基 8-oxoG を特異的に認識する 1,3-ジアザフェノキサジン誘導体 “8-oxoG-clamp” を開発し、低分子プローブとしての応用を検討している。本研究ではこの知見を基に、新たに 8-nitroG や 8-thioG を標的として、特異的に認識すると同時に共有結合捕捉する新規の機能性認識分子を開発した。さらに 8-オキソグアノシントリリン酸 (8-oxo-dGTP) を標的とした 1,3-ジアザフェノキサジン誘導体を開発し、これまで困難であった水中での特異的認識にも成功した。以上のように本研究では、1,3-ジアザフェノキサジン環構造を用い、それぞれの 8 位酸化グアノシン誘導体を標的とした新規の機能性認識分子について研究した成果を報告する。

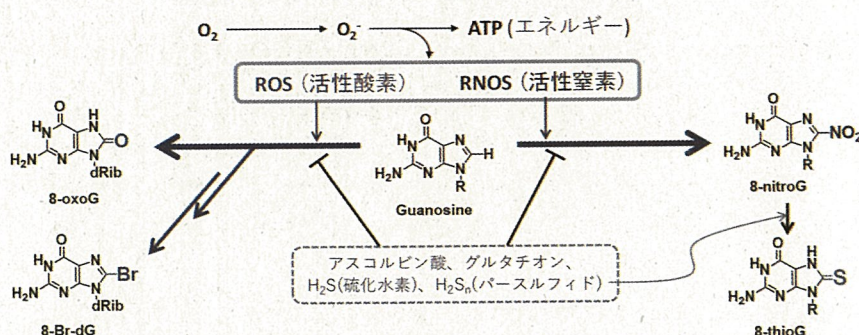


Figure 1 酸化ストレスと生体中ヌクレオシドの酸化損傷

【方法と結果】

① 8-nitroG を効率的に捕捉する“nitroG-Grasp”の開発¹: 活性窒素種によって生成する 8-nitro-cGMP は、シグナル伝達物質としての役割も担う 8 位酸化グアノシン体として注目されている。本研究ではこの 8-nitro-cGMP を共有結合捕捉する分子の開発を目指し、モデル分子として 8-nitroG を標的とした 1,3-ジアザフェノキサジン環骨格を有する誘導体を生設計し、“nitroG-Grasp”と命名した (Figure 2 左)。nitroG-Grasp は 8-nitroG を水素結合により認識し、末端のチオール基によって 8 位ニトロ基を置換し共有結合を形成する。8-nitroG の 7 位と水素結合するウレア基からチオール基までの炭素数として、2、3、4 の誘導体を生設計して検討することとした。実際の合成は、当研究室で確立された 8-oxoG-clamp より得られたアミン体と、カルボニルジイミダゾールを反応させた中間体に対して、トリチル保護したメルカプトアルキルアミンを付加させることで骨格を構築した。最後にトリチル基を TFA 処理することによって脱保護し、目的のチオール化合物を合成した。またコントロール化合物として、水素結合点を一箇所失ったカルバモイル型のプロピルリンカー誘導体 C3 (O) も合成し、8-nitroG に対する捕捉反応性を評価した。さらに認識部位が無い *N*-Cbz-メルカプトプロピルアミンも合成し、同様に評価した。

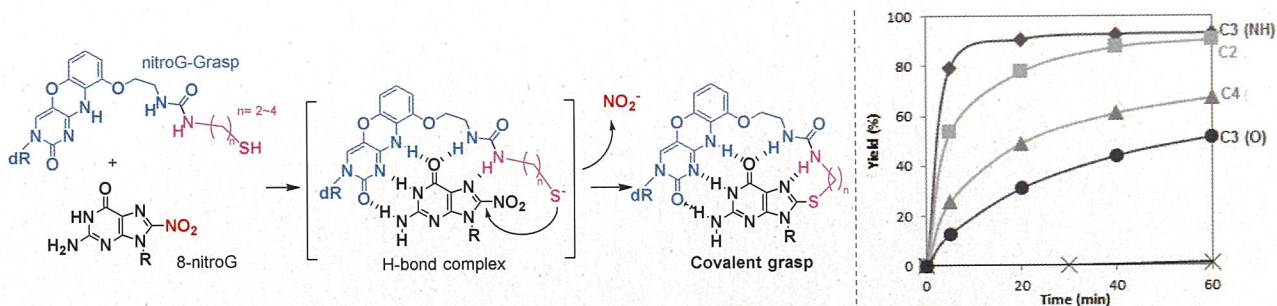


Figure 2 左) nitroG-Grasp による 8-nitroG 捕捉反応、右) nitroG-Grasp 誘導体の捕捉反応性比較

実際にアセトニトリル溶媒中、トリエチルアミン存在下で 8-nitroG との反応性を調べた結果、プロピルリンカーを有する誘導体 (C3-nitroG-Grasp) が最も反応性が高いことを見出した (Figure 2 右)。反応性は C3 > C2 > C4 > C3 (O) の順に低くなり、単純チオール化合物ではほぼ反応性を示さなかった。これらの結果より、水素結合認識によって効率的な捕捉反応性を実現していることが明らかとなった。また反応によって脱離生成する亜硝酸イオン (NO₂⁻) も Bratton-Marshall 試薬を用いて検出し、想定したような反応機構が立証された。この反応を UV-Vis 測定によって追跡し、詳細な速度論的パラメータ算出を行った。また単純化したリンカー部位について、チオールの pKa を量子化学計算によって算出した (Figure 3A)。これら結果の相関関係を調べたところ、興味深いことに反応の活性化エンタルピー値とチオール pKa が直線相関を示すことを見出した (Figure 3B)。またウレア基からチオールまでの原子数と活性化エントロピー値が直線相関を示すことも見出したが、C3 (O) 化合物については予想よりも低い値を示した (Figure 3C)。以上の結果を総括すると、nitroG-Grasp による 8-nitroG の捕捉反応性は、チオール pKa 及びリンカー部の自由度により制御されていることが示唆された。

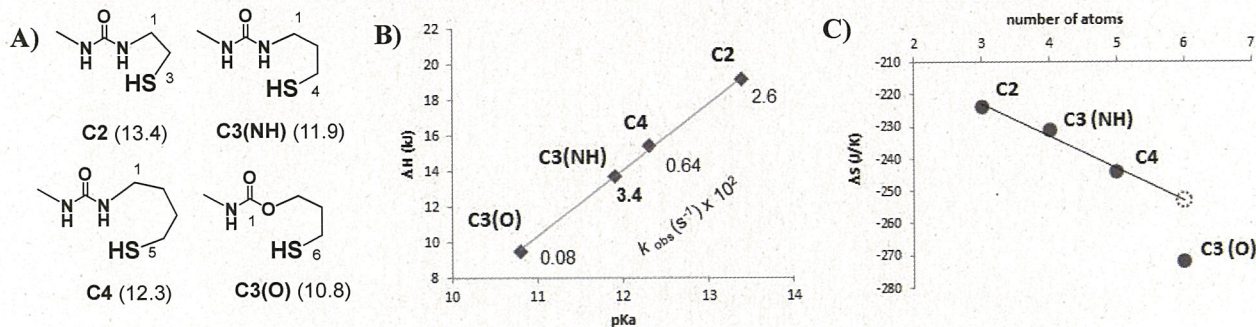


Figure 3 A) リンカーの構造と pKa 値、B) pKa 値と活性化エンタルピー値の相関、C) リンカー原子数と活性化エントロピー値の相関

② 反応性を向上させた nitroG-Grasp 誘導体の開発²: 上記 nitroG-Grasp の速度論的解析の結果を基に、さらに反応性を向上させることを目的として、C3-nitroG-Grasp を基本とした 3 つの誘導体 (Hydroxy, Dioxane, Benzyl) を新たに設計した (Figure 4 左)。それぞれの誘導体はリンカーのコンフォメーションを固定化し、チオールの pKa を低下させることを目的としている。新規 nitroG-Grasp 誘導体の合成は、上記同様にリンカー部のアミン体をそれぞれ合成し、1,3-ジアザフェノキサジン環部位のアミンと、カルボニルジイミダゾールを用いて縮合させることを計画した。まず Hydroxy 及び Dioxane リンカー部位は、*N*-グリシジルフタルイミドを共通の出発原料として合成した。Benzyl リンカー部位は 2-ニトロベンジルクロリドを出発原料として、*S*-トリチル保護したアニリン誘導体を合成した。その後、上記方法と同様にして目的の新規 nitroG-Grasp 誘導体を得ることに成功した。

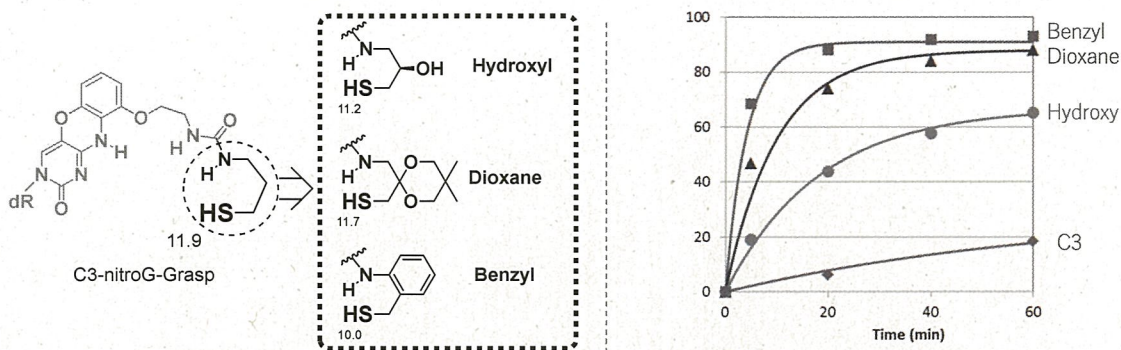


Figure 4 左) C3-nitroG-Grasp を基本にした新規誘導体の設計、右) 新規 nitroG-Grasp 誘導体の捕捉反応性比較

新規 nitroG-Grasp 誘導体を用いて、pH 7 の緩衝液とアセトニトリルを混合した条件で捕捉反応を行った結果、C3 リンカー体と比較して飛躍的に反応性を向上させることに成功した (Figure 4 右)。反応性は Benzyl > Dioxane > Hydroxy の順であることが示された。この反応条件でも、上記同様の速度論的解析を行った結果、計算した pK_a 値と活性化エンタルピー値が相関しないことを見出した。一方で活性化エントロピー値はリンカー部の自由度を反映していると推察された。活性化エンタルピー値について考察した結果、興味深いことに MD 計算によって算出したリンカー部の Log P 値 (脂溶性) と良い直線相関を示すことを見出された (Figure 5 左)。つまり疎水性相互作用によって反応中間体を安定化し、捕捉反応性を向上させていることが示唆された。

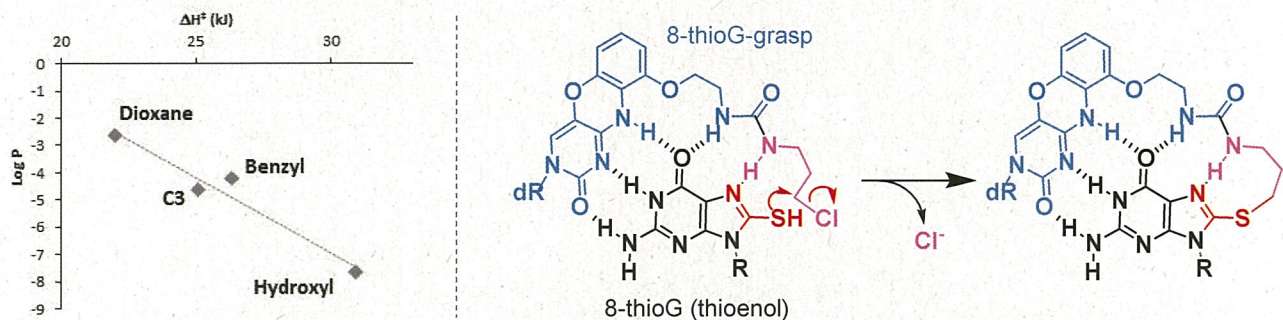


Figure 5 左) 活性化エンタルピー値と Log P 値の相関、右) 8-thioG-grasp の分子設計

③ 8-thioG を効率的に捕捉する“8-thioG-grasp”の開発³ : nitroG-Grasp のコンセプトを基に、脱離基としてクロロアルキルリンカーを導入した“8-thioG-grasp”誘導体设计了 (Figure 5 右)。塩基性条件下で 8-thioG からの求核置換反応によって共有結合捕捉することを見出し、ウレア型のプロピルリンカー体で高い反応性を示すことを明らかにした。

④ 水中で 8-oxo-dGTP を特異的に認識する“8-oxoGTP Receptor”の開発⁴ : 8-オキソ-2'-デオキシグアノシントリリン酸 (8-oxo-dGTP) は、ヌクレオチドプール中で活性酸素種によって dGTP が酸化されて生成する。本研究では 8-oxoG-clamp 誘導体の知見を基に、水中で 8-oxo-dGTP を特異的に認識する分子“8-oxoGTP Receptor”の開発に着手した。分子設計としては、塩基認識部位として 1,3-ジアザフェノキサジン環を用い、トリリン酸との相互作用部位としてサイクレン-亜鉛錯体を導入した誘導体设计了 (Figure 6 左)。さらにサイクレン部位と、ジアザフェノキサジン環を接合させるリンカー部分としては 2'-デオキシリボース骨格 (1)、トリアゾール環 (2)、エチル基 (3) を組み合わせた誘導体设计了し、末端には塩基部とのスタッキング相互作用を期待したベンジル (a)、ナフチルエチル (b)、ピレニルエチル基 (c) を導入することで、全て組み合わせて計 9 種の誘導体について調べることにした。

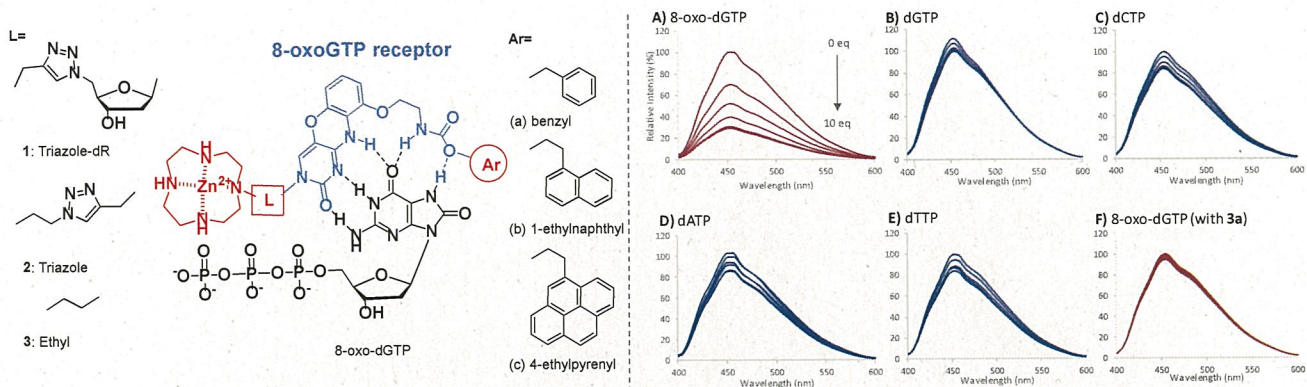


Figure 6 左) 8-oxoGTP Receptor 誘導体の分子設計、右) **3a-Zn** を用いた水中での蛍光滴定実験結果

合成した 8-oxoGTP Receptor 誘導体を用い水中でヌクレオチド認識能を蛍光スペクトルによって評価した。その結果、亜鉛錯体が 8-oxo-dGTP に対して特異的に蛍光消光することが観測された (Figure 6 右)。Zn²⁺と錯形成させていないサイクレン体に対しては全く蛍光応答を示さなかったことから、サイクレン-亜鉛錯体がリン酸アニオンを認識していることが示唆された。またリンカー部位によって認識能に差があることが示され、エチルリンカー体 (**3a-Zn**) が最も選択的かつ効率的に蛍光消光することを見出した。また滴定実験より 8-oxo-dGTP に対する結合定数を算出した結果、**3a-Zn** > **2a-Zn** > **1a-Zn** の順になることも見出された。一方でナフチル及びピレニル誘導体 (**1-3b,c**) では 8-oxo-dGTP 以外に対する非選択的な蛍光消光が観測された。以上の結果を基に MD 計算によって **3a-Zn** と 8-oxo-dGTP の認識錯体構造を予測した結果、トリリン酸が亜鉛錯体部位と結合し、8-oxoG 塩基部が 1,3-ジアザフェノキサジン環と Cbz 基のベンゼン環に挟まれたような構造が示された (Figure 7 左)。さらに **3a-Zn** の HeLa 細胞への取り込み実験を行ったところ、培養液中に添加することで細胞中のリソソームへ取り込まれることが蛍光顕微鏡にて確認された。さらに HeLa 細胞溶解液中での、8-oxoGTP Receptor 分子の蛍光応答をプレートリーダーによって評価した。その結果 8-oxo-dGTP に対して選択的に蛍光強度が減少し、またその減少効率は **3a-Zn** が最も高いことが示された (Figure 7 右)。

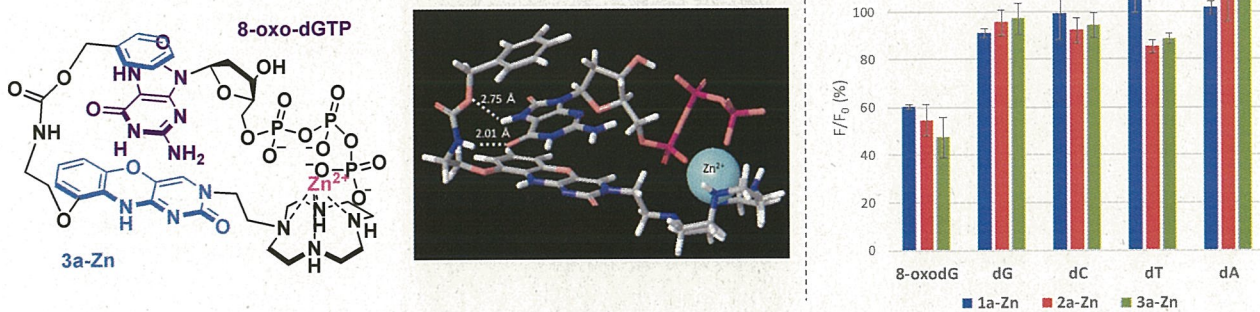


Figure 7 左) **3a-Zn** と 8-oxo-dGTP の予想認識錯体構造、右) 細胞溶解液中での蛍光認識能評価

【結論】本研究で開発した 8 位酸化グアノシンを標的とする 1,3-ジアザフェノキサジン誘導体は、どれも画期的な新規の機能性認識分子である。本研究で開発した分子をさらに発展させることで、生体中 8 位酸化グアノシン体の詳細な機能解明など分子生物学の分野だけでなく、創薬化学的な意味でも大きく貢献できると期待される。

【発表論文】 1) Y. Fuchi and S. Sasaki, *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 1760-1763. 2) Y. Fuchi and S. Sasaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **2015**, *63*, 913-919. 3) Y. Fuchi, H. Obayashi, S. Sasaki, *Molecules.*, **2015**, *20*, 1078-1087. 4) Y. Fuchi, T. Fukuda, S. Sasaki, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 7949-7955.