

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

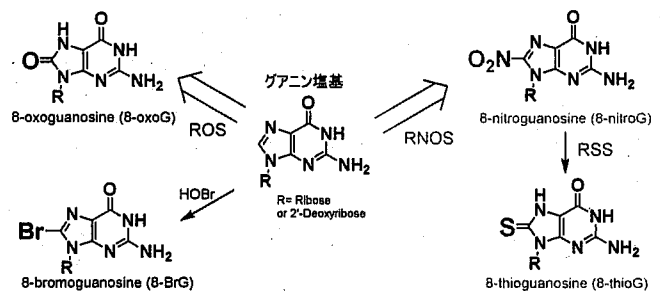
(様式 9-3)

氏名	瀧 靖史			
論文名	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			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	佐々木 茂貴
	副査	九州大学	教授	王子田 彰夫
	副査	九州大学	准教授	唐澤 悟
	副査	九州大学	准教授	麻生 真理子
	副査	九州大学	准教授	谷口 陽祐

論文審査の結果の要旨

DNA 及び RNA 塩基のグアニンは酸化反応を受けやすく、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に繋がるとされている (Fig. 1)。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 や ELISA などの機器的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 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、低分子プローブへの応用を検討している。本研究では 1,3-ジアザフェノキサジン環構造を用いて、新たに 8-nitroG や 8-thioG を標的として、共有結合捕捉する新規機能性分子の開発、さらに 8-オキソグアノシントリリン酸 (8-oxo-dGTP) を標的とした特異的認識分子の開発が検討された。

1. 8-nitroG を効率的に捕捉する “nitroG-Grasp” の開発：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 “nitroG-Grasp” と命名した 1,3-ジアザフェノキサジン環誘導体が設計された (Fig. 2A)。ア



セトニトリル中、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) が最も反応性が高いことを見出された。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。以上の結果より、水素結合認識によって効率的な捕捉反応性を示すことが明らかとなった。この反応を速度論的に解析した結果、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。

2. 反応性を向上させた nitroG-Grasp 誘導体の開発：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) が新たに設計された (Fig. 2B)。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 を下げることを目的としている。新規誘導体を用いて、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、反応性は Benzyl > Dioxane > Hydroxy の順であることが示された。速度論的解析を行った結果、活性化エンタルピー値がリンカー部の Log P 値 (脂溶性) と良い直線相関を示すことが見出され、疎水性相互作用による反応中間体の安定化と捕捉反応の効率化が示唆された。

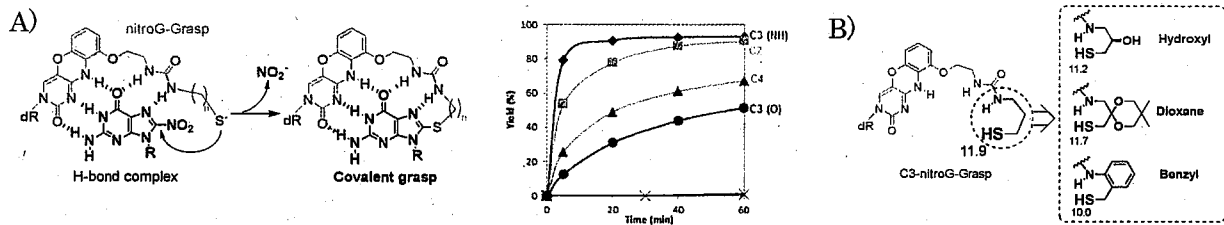


Figure 2. A) nitroG-Grasp の分子設計と反応性比較、B) 反応性を向上させた nitroG-Grasp 誘導体

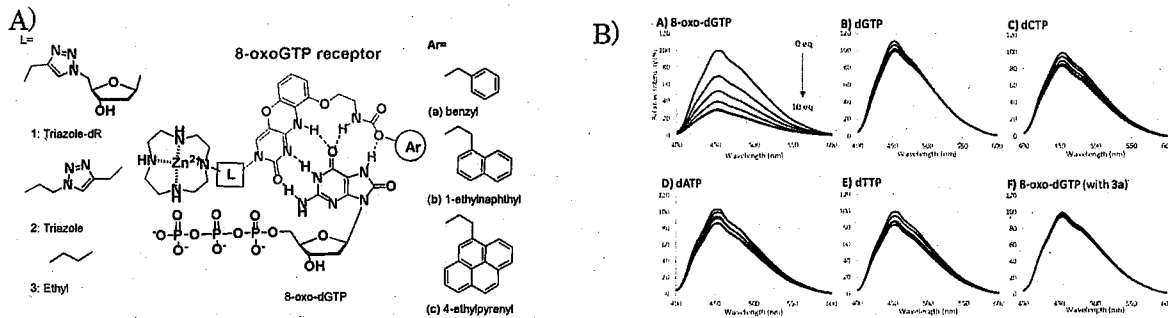


Figure 3. A) 8-oxoGTP Receptor の分子設計、B) 蛍光スペクトルによるヌクレオシドトリリン酸認識能評価

3. 水中で 8-oxo-dGTP を特異的に認識する“8-oxoGTP Receptor”の開発：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”が設計された。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 (Zn²⁺) 錯体を導入した誘導体を設計した (Fig. 3A)。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 3 種類設計し、末端には塩基部とのスタッキング相互作用を期待して 3 種類の芳香環を導入することで、全て組み合わせて計 9 種の誘導体について調べた。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結果、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 (Fig. 3B)。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、エチルリンカー体が最も結合能が高いことが示された。さらに HeLa 細胞溶解液中で評価した結果、8-oxo-dGTP に対して選択的な蛍光強度の減少を示し、細胞実験のような夾雑系にも応用可能であることが示唆された。

以上、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、画期的な機能性認識分子である。さらなる展開により、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。従って、本研究は 8 位酸化グアノシン体を標的とする新しい創薬基礎を確立したものであり、博士 (創薬科学) の学位に値すると認める。