



Title	C5' 酸化損傷DNAの有機合成とその科学的性質
Author(s)	兒玉, 哲也
Citation	大阪大学低温センターだより. 2007, 138, p. 18-21
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/10429
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

C5 酸化損傷DNAの有機合成とその化学的性質

薬学研究科 兒玉 哲也 (内線8202)

1. はじめに

二重鎖DNAのマイナーグループに位置する糖部C4'/C5'位での水素引き抜き反応は、変異原性を示すC4'酸化-脱塩基部位 (C4'-AP site) を形成し、またDNA鎖切断を引き起こす^[1]。これは一部のマイナーグループに結合する抗腫瘍性抗生物質の活性発現機構と深く関与している。生物学的重要性や化学的興味から、DNA損傷 (修復) 機構解明に関する研究が活発になされてきた。そうした中でC5'酸化損傷の研究は少なく、5'位での水素引き抜き反応がDNA鎖切断を誘起し、主に2種類のアルデヒド化合物、チミン5'-アルデヒド (T-al) と1,4-ジオキソ-2-ホスホリルブタン (DOB) を生成すること以外は知られていない (図1)。我々はC5'酸化損傷部位を持つDNA断片の化学的合成に成功し、その化学的性質を検討した。

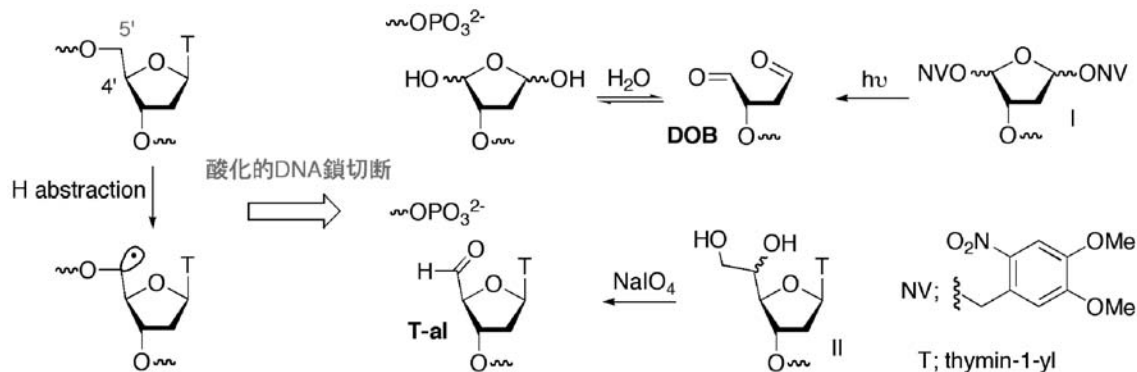


図1 C5'酸化損傷による5'-DNAフラグメントとその有機合成戦略。

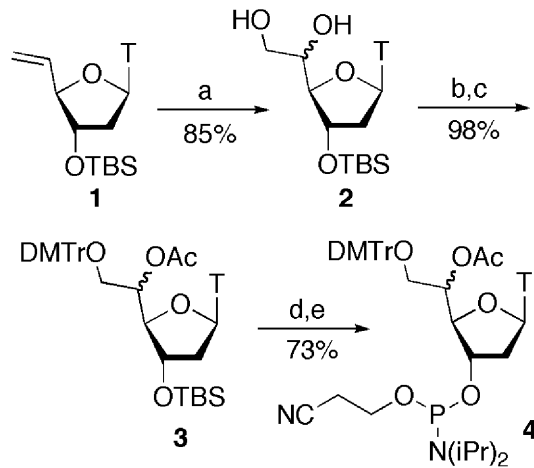
2. 5'-アルデヒドチミン (T-al) を持つDNAの合成

5'-アルデヒドヌクレオシドは典型的なDNA固相合成で用いられる塩基性条件下 (アンモニア水や炭酸カリウムメタノール) で不安定であるため、アルデヒド構造を持たないホスホロアミダイト4をポスト合成的にT-al前駆体として導入することとした。アルデヒド体T-alは、DNAの固相担体から切り出しと脱保護の後、IIをNaIO₄処理することで調整することができる (図1)。

ホスホロアミダイト4は、アルケン1のジオール化と各水酸基の保護を経ることで合成した (図2)。また、標準的なDNA固相合成法に従うことで、ホスホロアミダイト4をオリゴヌクレオチド5'-末端に導入することができた (縮合収率99%以上)。ピシナルジオールIIを持つオリゴヌクレオ

チドの生成は、アンモニア水による固相担体からの切り出しと保護基の除去の後、ESI-MSにより確認した。T-alを持つDNAを合成する最終行程は、ナノモルスケールのビシナルジオールIIを37 で1時間NaIO₄処理することで達成し、ESI-MSによりその構造を確認した(図3)。この際、目的のT-alを含むDNA以外に、T-alが脱離したDNA 5'-リン酸と測定溶媒中のメタノールが付加したメタノール付加体が観察されたが、T-alの脱離はエタノール沈殿時に進行していることを他の実験により明らかにしており、T-alがほぼ定量的に調整できることがわかった(data not shown)。

またT-alを持つDNAは、NaBH₄やNaOH処理によりそれぞれ5'-チミンDNAやT-alが脱離した5'-リン酸DNAを速やかに生成するが、中性溶液中ではアルデヒド検出試薬ARP(aldehyde reactive probe)を作用させてもほとんど検出できなかった。



Reagents: (a) AD mix- β ; (b) DMTrCl, pyridine; (c) Ac₂O, Et₃N, DMAP; (d) TBAF; (e) 2-cyanoethyl diisopropylchlorophosphoramidite, DIPEA.

図2 T-al前駆ホスホロアミダイト4の合成。

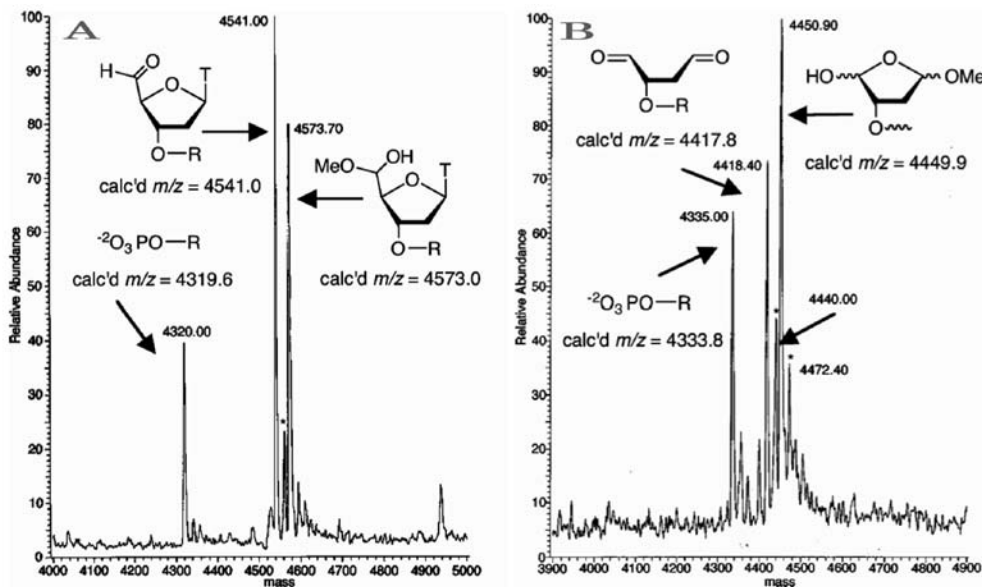
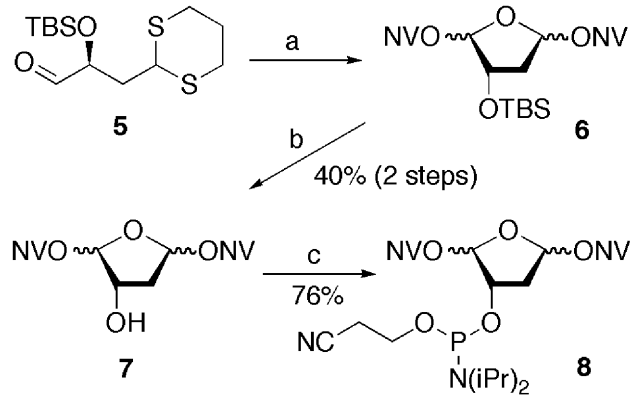


図3 C5酸化損傷DNAのESI-MS分析。A) T-al損傷DNA。R = CCG TTA TGA TGC AGT CT-3'。* = Na⁺ adduct。B) DOB損傷DNA。R = TCG TTA TGA TGC AGT CT-3'。* = Na⁺ adduct。

3. 1,4-ジオキソ-2-ホスホリルブタン (DOB) を持つDNAの合成

脱塩基部位 (AP site) は塩基性条件下で極めて不安定であるため、DOBを含むDNAの化学合成にはポスト合成が必須である。そこでDOBはビス(*o*-ニトロベンジルオキシ)テトラヒドロフラン体IとしてDNA中に導入することとした。この*o*-ニトロベンジル (NV) 化合物Iは光照射することでDOBへと変換可能である(図1)。

アミダイト体 8 はジチアン誘導体 5 から誘導した (図 4)。ビス (*o*-ニトロベンジルオキシ) テトラヒドロフラン骨格は、過剰の NVOH 存在下に 5 を NBS 処理することで構築し、その構造は脱シリル体 7 の X 線結晶構造解析により確認した。NV 保護した DOB を持つオリゴヌクレオチド I は加熱条件下に安定でないため、室温でアンモニア水処理することで樹脂からの切り出しと脱保護を行った。最後に、精製した DNA I を Rayonet 光反応装置内で 20 分間光照射 (350nm) することで、DOB がほぼ定量的に生成することを確認した (図 3)。DOB はエタノール沈殿をはじめとしたあらゆる乾固条件で分解するため、その精製や塩交換等は低温下でのゲル濾過が適している。



Reagents: (a) 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl alcohol, NBS; (b) TBAF; (c) 2-cyanoethyl diisopropylchlorophosphoramidite, DIPEA.

図 4 DOB 前駆ホスホロアミダイト 8 の合成。

4 . T-al 損傷と DOB 損傷の化学的安定性

二重鎖 DNA 中に生じた各損傷部位の安定性を、37 のリン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で測定した。半量の T-al または DOB が分解して 5'-リン酸 DNA を生じる時間は、T-al で 100.7 時間 ($k = 1.84 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$)、DOB で 10.7 時間 ($k = 1.86 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) であり、二重鎖 DNA 中の DOB は他の脱塩基部位 (AP, L, C4-AP) に比べてかなり不安定であることが明らかとなった [2][3]。

また、T-al や DOB を含む二重鎖 DNA の T_m 値 (二重鎖 DNA の 50% が一本鎖に解離する温度) を測定し、

ニックの入った二重鎖 DNA ($X = T$) より T-al を持つ C5 酸化損傷二重鎖 DNA ($X = T\text{-al}$) が熱的に安定であることを明らかにした (表 1)。

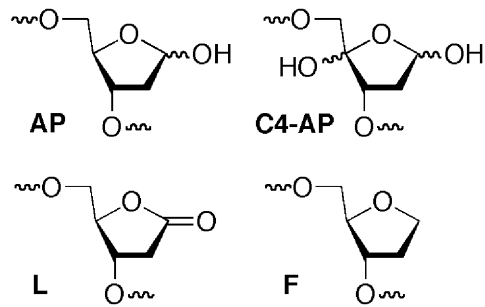


図 5 様々な脱塩基部位。

表 1 二重鎖DNA融解温度 (T_m 値) ^{a,b,c}.

	X	T_m (°C)
5'-TAA TGG CTA ACG CAGp XCC GTA ATG CAG TCT-3' 3'-ATT ACC GAT TGC GTC AGG CAT TAC GTC AGA-5' Ternary complexes	T	53.7 ± 0.2
	T-al	55.2 ± 0.1
	DOB	51.6 ± 0.1
	F	51.7 ± 0.4
	p	51.6 ± 0.2
XCC GTA ATG CAG TCT-3' 3'-ATT ACC GAT TGC GTC AGG CAT TAC GTC AGA-5' Duplexes	X	T_m (°C)
	T	52.9 ± 0.1
	T-al	53.5 ± 0.1
	DOB	52.7 ± 0.3
	F	52.8 ± 0.3
5'-TAA TGG CTA ACG CAGp 3'-ATT ACC GAT TGC GT C AGG CAT TAC GTC AGA-5'		52.2 ± 0.2
		50.8 ± 0.4

a Oligonucleotides, 2 mM, sodium phosphate (pH 7.2), 10 mM, NaCl, 100 mM.

b F = 1,2-dideoxyribose terminus (stable analogue of general AP-site).

c p = phosphate terminus.

DOBは潜在的DNAアルキル化剤であり、T-alの二重鎖DNA安定化効果はDNA修復酵素との相互作用に興味を駆立てる。C5 酸化損傷の生物学的研究は、今始まる^{[4][5]}。

参考文献

- [1] Balasubramanian, B.; Pogozelski, W. K.; Tullius, T. D. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1998, 95, 9738-9743.
- [2] Chen, J.; Stubbe. *J. Biochemistry* 2004, 43, 5278-5286.
- [3] Zheng, Y.; Sheppard. T. L. *Chem. Res. Toxicol.* 2004, 17, 197-207.
- [4] Kodama, T.; Greenberg, M. M. *J. Org. Chem.* 2005, 70, 9916-9924.
- [5] Dhar, S.; Kodama, T.; Greenberg, M. M. Submitted.