

82. 光レドックス触媒を用いた DNA 酸化損傷の化学修飾

有地 法人

京都大学 大学院薬学研究科 創薬有機化学分野

Key words : 光レドックス触媒, ラジカル, 一電子酸化, DNA 酸化損傷, 8-オキシグアニン

緒言

一般的に DNA/RNA に含まれる核酸塩基は、アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T)、ウラシル (U) であるが、生体内の核酸には、それらの塩基が修飾や損傷を受けた非標準な構造を有するものが多数存在する。例えば、最も発生頻度が高い酸化損傷塩基である 8-oxo-G は、G が代謝過程で発生する活性酸素種 (ROS) と反応することで生成する (図 1)。8-oxo-G は複製時に変異を惹起し、細胞死や突然変異を誘発するため、生体にはこの損傷を元に戻す修復機構が備わっている。しかし、核やミトコンドリアに 8-oxo-G が蓄積すると、老化やがん、神経変性などの原因となる。

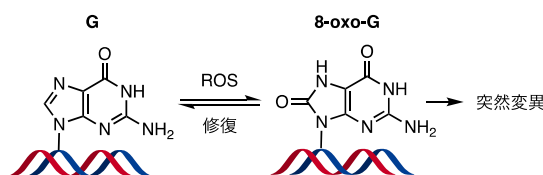


図 1. 主要な酸化損傷である 8-oxo-G

グアニン (G) が ROS と反応することで 8-oxo-G が生成する。

8-oxo-G の疾患との関連や生体内での役割を調べるために、これまでに様々な検出法が開発されている。例えば、細胞内の 8-oxo-G の発生量を調べるために、DNA をヌクレオシドレベルまで加水分解した試料を LC/MS で分析する手法がある [1]。またゲノム DNA 中での 8-oxo-G の発生位置を特定するシーケンシングとして、抗 8-oxo-G 抗体 [2] や、8-oxo-G 塩基と糖部位間のグリコシル結合を切断する DNA 修復酵素 [3] などを利用する手法が報告されている。しかし、抗体や DNA 修復酵素を利用したシーケンシングでは、8-oxo-G に対する基質特異性が低いことや、配列や二次構造などの周辺環境の影響を受けるという点に問題がある。これらの問題の解決策として筆者は、抗体・酵素のような巨大分子による 8-oxo-G の構造認識に頼るのではなく、8-oxo-G が持つ固有な反応性を目掛けた選択的修飾を利用することを考えた。8-oxo-G は他の核酸塩基に類似した官能基や環構造を持つが、標準的な核酸塩基の中で最も酸化されやすい G よりも、さらに低い酸化電位を持つことが知られている (G : +1.29 V, 8-oxo-G : +0.74 V vs NHE) [4]。この酸化されやすい化学的性質を利用することで、8-oxo-G の選択的な化学修飾が可能と考えた。

8-oxo-G の化学修飾の先行例として、Burrows らは筆者らと同じく 8-oxo-G の低い酸化電位に着目した反応を報告している (図 2a) [5]。具体的には、8-oxo-G の二電子酸化で生じる中間体 A へのアミンの求核攻撃と分子内アシル転位により、スピロ環へと変換する手法を報告している。ビオチンを有するアミンを反応剤として使用することで、8-oxo-G をビオチン標識することが可能である。続いてソニケーションによって DNA を断片化し、8-oxo-G を有する断片をプルダウンにより濃縮することで、シーケンシングへ応用している。しかし、反応

剤として求核性の高い脂肪族アミンを使用するため、ホルミル基を有する損傷塩基や、ヘミアミナール構造を有する無塩基部位とも反応していることが懸念されている [6]。

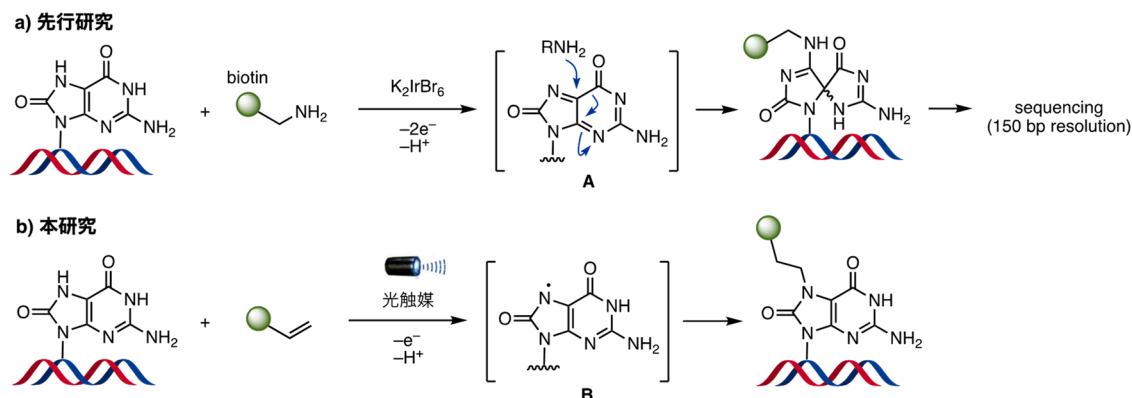


図 2. DNA 中の 8-oxo-G 選択的な化学修飾

- a) Burrows らによる先行研究。二電子酸化を利用している。
- b) 本研究。光レドックス触媒による一電子酸化を利用している。

本研究では、光レドックス触媒による一電子酸化で生じるラジカル中間体 **B** をアルケンで捕捉するアプローチでの修飾法を検討した (図 2b)。一電子酸化によるラジカル中間体 **B** の生成は、計算化学的に示唆されている [7]。種々検討の結果、ラジカルに対して高い反応性を示すアリル TEMPO 誘導体をアルケンとして利用した際に、目的物を LC/MS で検出することに成功した。

方法

1. モデル基質の合成

8-oxo-G を有するジヌクレオチドをモデル基質として設定し、既知化合物と市販のホスホロアミダイトを利用して合成した。

2. 反応条件の検討

上記の方法で合成したモデル基質を利用して、光反応の条件検討を行なった。具体的には、光触媒やアルケン、濃度、反応時間等のスクリーニングを行なった。光源としては、Kessil 社製の LED ランプ (Tuna blue) を使用した。反応物は LC/MS で分析した。

結果および考察

1. モデル基質の合成

まず、文献に従って既知化合物 **1** を合成した [8] (図 3)。化合物 **1** の 5'位ヒドロキシ基を DMT (4,4'-dimethoxytrityl) 基で一時的に保護し、3'位ヒドロキシ基を Lev (levulinoyl) 基で保護した後、酢酸水溶液で 5'位 DMT 基を除去することで **3** を合成した。その後、市販のチミジンホスホロアミダイト **4** とのカップリングとヨウ素酸化により、**5** を合成した。得られた **5** を酢酸水溶液で処理することで DMT 基を除去し、最後にアンモニア水を用いて残りの保護基を全て除去することで、モデル基質 **6** を得た。

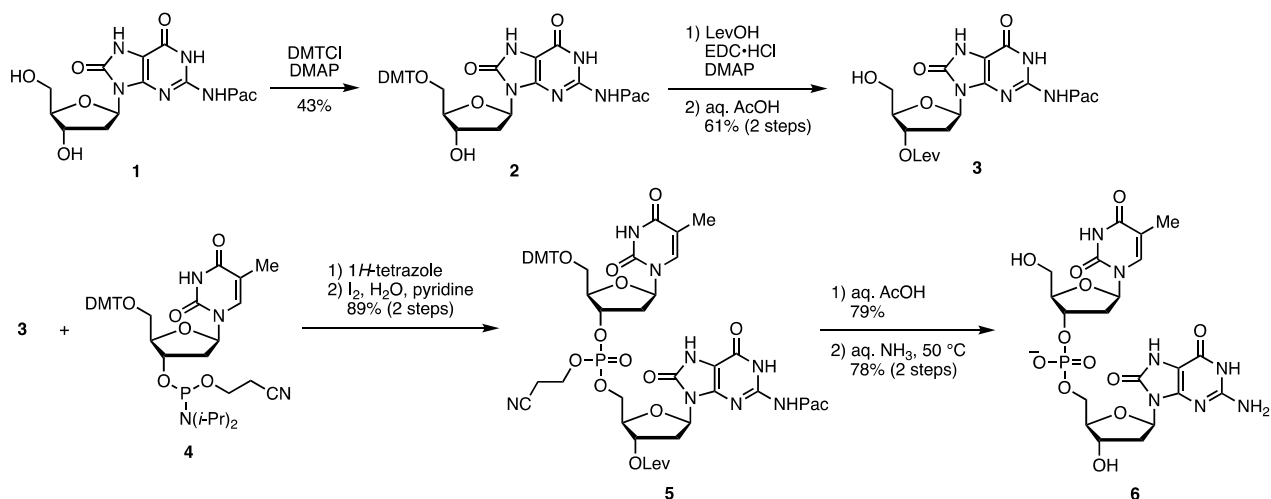


図 3. モデル基質の合成
既知化合物 **1** を利用して合成した。

2. 反応条件の検討

まず、光触媒を利用した 8-oxo-G の化学修飾の作業仮説を示す (図 4)。光触媒 (PC) への可視光照射により、励起状態の光触媒 (PC*) を生成する。PC* による 8-oxo-G の一電子酸化により、光触媒のラジカルアニオン種 (PC^{•-}) と 8-oxo-G のラジカルカチオンが生じる。8-oxo-G のラジカルカチオンの 7 位イミノプロトンは高い酸性度 ($pK_a=0.23$) を示すため、速やかに脱プロトン化が進行し、窒素ラジカル **B** が生成することが計算化学的に示唆されている [7]。このラジカル **B** がアルケンへ付加することで、炭素ラジカル **C** が生じる。ラジカル **C** はチオールからの水素原子移動 (HAT) を受けて、生成物へと変換される。同時に、副生するチールラジカルは PC^{•-} との一電子移動により、PC が再生する。また使用するアルケンによっては、チオールを添加しなくとも、ラジカル **C** は PC^{•-} による一電子還元とプロトン化により、生成物へと変換され得る。アルケンの末端にビオチンを導入しておくことで、8-oxo-G を有する DNA 鎖の濃縮・シーケンシングへ応用できると期待した。

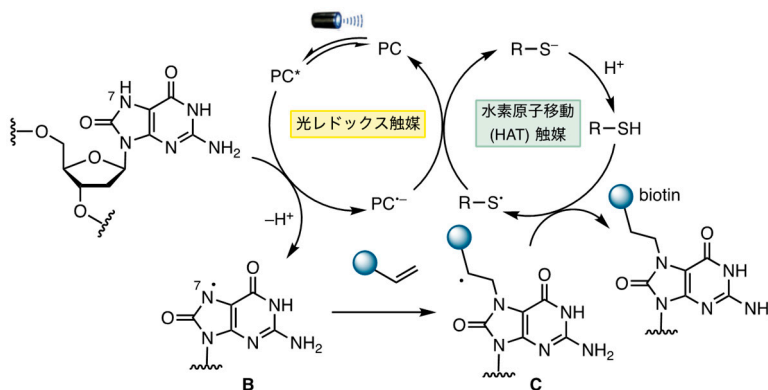


図 4. 光レドックス触媒を利用した 8-oxo-G の化学修飾の作業仮説
ラジカル **C** から生成物への変換は、PC^{•-} からの一電子還元とプロトン化というチオールからの HAT を必要としない経路も考えられる。

上記の作業仮説のもと、モデル化合物 **6** に対して、光触媒やアルケン、チオール、バッファー、濃度、反応時間等の条件検討を行なった (図 5)。しかしながら、目的物であるアルケン付加体 **7** の生成は、ほとんど確認さ

れなかった。主要な生成物としては、スピロ環 **8** やヒダントイン **9** と想定される化合物が観測された。これらの生成については、Burrows らの先行研究に基づき、以下のような反応機構が考えられる [5, 9]。想定中間体であるラジカル **B** がさらなる一電子酸化と脱プロトン化を受けることで、**D** が生成する。この中間体 **D** が水の付加を受けることで生成する中間体 **E** は不安定な化学種であり、アシル転位によりスピロ環 **8** へ、あるいは加水分解と脱炭酸によりヒダントイン **9** へと変換される。すなわち、想定中間体 **B** は生成しているものの、**B** のアルケンへの付加が遅いため、過剰な酸化を経由した副反応が進行していることが示唆された。

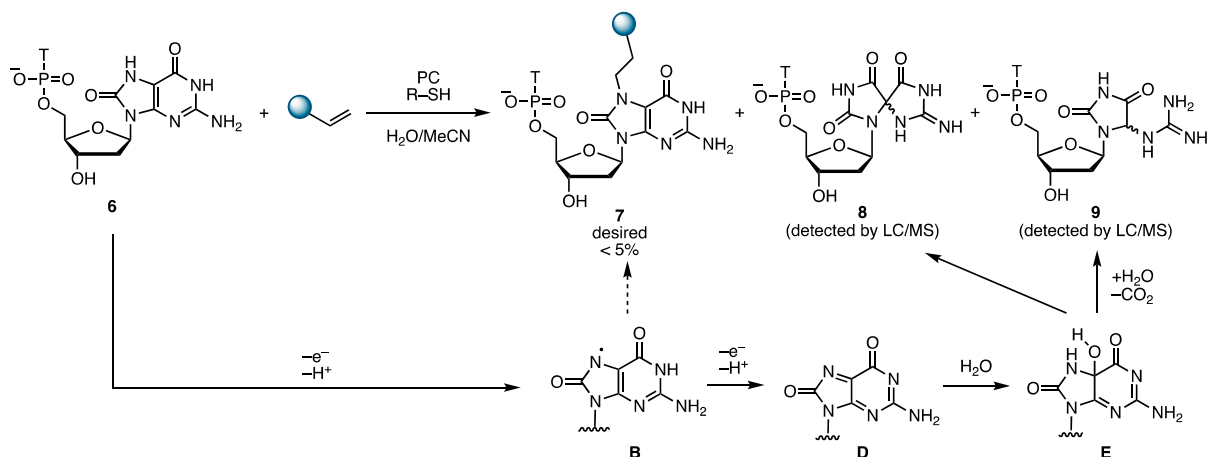


図 5. モデル化合物を用いた 8-oxo-G の化学修飾の条件検討

チオールの存在下・非存在下の両条件にて、光触媒やアルケンを種々検討した。

ラジカル中間体 **B** のアルケンへの付加が遅いことが示唆されたので、次にラジカルに対して高い反応性を示すことが知られているアリル TEMPO をアルケンとして検討した (図 6) [10]。アリル TEMPO はラジカルに対して S_H2' 型の反応性を示すが、安定ラジカルである TEMPO の放出を駆動力とするその置換反応は極めて速いと考えられる。モデル化合物として既知化合物であるシクロヘキシル基を有するアリル TEMPO **10** を合成し、光反応の反応条件を種々検討した。その結果、光触媒として $[\text{Ir}[\text{dF}(\text{Me})\text{ppy}]_2(\text{dtbpy})]\text{PF}_6$ を用いた際に、付加体 **11** の生成を LC/MS で観測することができた (収率 < 26%)。ただし、目的物に相当する MS ピークがいくつか検出されていることから、化合物 **11** に加えて、二重結合の位置異性体や O-アリル化体などが副生している可能性がある。

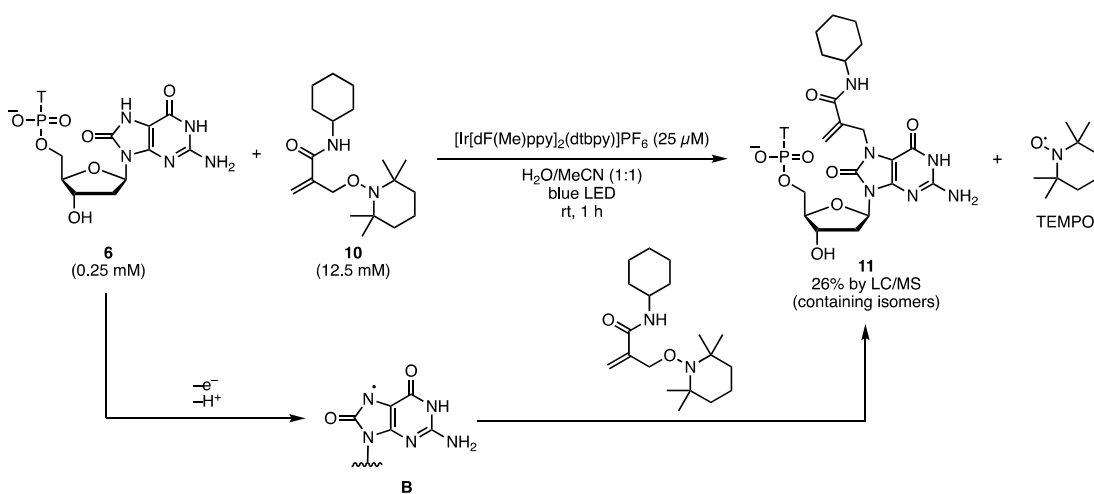


図 6. アリル TEMPO を用いた 8-oxo-G の化学修飾

安定ラジカルである TEMPO の放出を駆動力とするラジカル置換反応を利用した。

共同研究者・謝辞

本研究は、京都大学大学院薬学研究科創薬有機化学分野の大野浩章教授のご指導のもと、井貫晋輔准教授、呉舒涵氏のご協力を賜りながら実施いたしました。この場をお借りして、厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Cadet J, Douki T, Ravanat JL. Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA. *Mutat Res.* 2011 Jun 3;711(1-2):3-12. Epub 2011 Feb 15. PMID: 21329709 DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.02.004
- 2) Yoshihara M, Jiang L, Akatsuka S, Suyama M, Toyokuni S. Genome-wide profiling of 8-oxoguanine reveals its association with spatial positioning in nucleus. *DNA Res.* 2014 Dec;21(6):603-12. Epub 2014 Jul 9. PMID: 25008760 DOI: 10.1093/dnares/dsu023
- 3) Wu J, McKeague M, Sturla SJ. Nucleotide-Resolution Genome-Wide Mapping of Oxidative DNA Damage by Click-Code-Seq. *J Am Chem Soc.* 2018 Aug 8;140(31):9783-9787. Epub 2018 Jul 26. PMID: 29944356 DOI: 10.1021/jacs.8b03715
- 4) Steenken S, Jovanovic SV. How Easily Oxidizable Is DNA? One-Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution. *J Am Chem Soc.* 1997 Jan 22;119(3):617-618. DOI: 10.1021/ja962255b
- 5) Ding Y, Fleming AM, Burrows CJ. Sequencing the Mouse Genome for the Oxidatively Modified Base 8-Oxo-7,8-dihydroguanine by OG-Seq. *J Am Chem Soc.* 2017 Feb 22;139(7):2569-2572. Epub 2017 Feb 13. PMID: 28150947 DOI: 10.1021/jacs.6b12604
- 6) Poetsch AR. The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020 Jan 7;18:207-219. PMID: 31993111 DOI: 10.1016/j.csbj.2019.12.013
- 7) Wei S, Zhang Z, Liu S, Wang Y. Theoretical insight into 7,8-dihydrogen-8-oxoguanine radical cation deprotonation. *New J Chem.* 2021 Jul 07;45(25):11202-11212. DOI: 10.1039/D1NJ01653A
- 8) Bourdat AG, Gasparutto D, Cadet J. Synthesis and enzymatic processing of oligodeoxynucleotides containing tandem base damage. *Nucleic Acids Res.* 1999 Feb 15;27(4):1015-24. PMID: 9927734 DOI: 10.1093/nar/27.4.1015
- 9) Luo W, Muller JG, Rachlin EM, Burrows CJ. Characterization of spiroiminodihydantoin as a product of one-electron oxidation of 8-Oxo-7,8-dihydroguanosine. *Org Lett.* 2000 Mar 9;2(5):613-6. PMID: 10814391 DOI: 10.1021/ol9913643
- 10) Williams PJH, Boustead GA, Heard DE, Seakins PW, Rickard AR, Chechik V. New Approach to the Detection of Short-Lived Radical Intermediates. *J Am Chem Soc.* 2022 Sep 7;144(35):15969-15976. Epub 2022 Aug 24. PMID: 36001076 DOI: 10.1021/jacs.2c03618