

## 100. 修復酵素阻害剤への展開を目指した核酸誘導体の創製

谷口 陽祐

九州大学 大学院薬学研究院 生物有機合成化学分野

Key words : 酸化損傷類似核酸, がん細胞, hMTH1, 修復酵素阻害剤, DNA 合成酵素

### 緒言

細胞内の核酸類 (DNA や RNA) は、生活のストレス、紫外線や放射線などにより絶えず損傷を受けている。これらの損傷は、修復酵素の働きにより修復されている。しかしながら、なんらかの理由で損傷と修復のバランスが崩れることで、遺伝子変異が誘導される。酸化損傷塩基の代表例として、8-オキソグアニン (8-oxo-G) があり、グアニン (G) の 8 位が活性酸素種によって酸化されて生じる。デオキシリボグアノシン三リン酸体 (dGTP) の酸化体である 8-オキソデオキシグアノシン三リン酸体 (8-oxo-dGTP) は、DNA 複製の過程で鋳型鎖のシチジン (dC) のみならずアデノシン (dA) に対して伸長鎖に取り込まれることから、トランスバージョン変異を誘導する。細胞にはこのような変異に対して防御機構が働いており、8-oxo-dGTP を一リン酸体である 8-oxo-dGMP に加水分解する hMTH1 という酵素が働いている。一度 8-oxo-dGMP になると 8-oxo-dGTP に戻ることなく、別の酵素による加水分解を受けて細胞外さらには体外に排出される。この修復酵素は、より酸化的環境下にあるがん細胞で過剰発現していることが報告されていたが、最近、hMTH1 選択的阻害剤が新規メカニズムによる抗がん剤になりうるという報告がなされた。しかしながら、他の研究により hMTH1 阻害剤ががんを根絶する革新的な証拠がないなど、様々な研究により解明すべき疑問点が多く残っているのが現状である。

これまでに、我々は 8-oxo-dG の構造を模倣した種々の核酸誘導体の合成を行いその機能を調べてきた<sup>1,2)</sup>。それらの中でも、塩基部分の 8 位にヨウ素を結合させたデアザグアノシン三リン酸誘導体 (8-I-deazadGTP) により、hMTH1 の活性部位にはまり込み 8-oxo-dGTP 加水分解反応を強力に競合阻害する人工核酸を見いだした<sup>3)</sup>。そこで、本研究において細胞への適用をするために、独自に開発した 8-I-deazadGTP のさらなる性質と、細胞導入に向けたモデル化合物の合成およびその性質を調べたので報告する。

### 方法、結果および考察

一般にデオキシヌクレオシドの三リン酸体 (dGTP, dATP, dCTP や TTP) は DNA 合成酵素である DNA ポリメラーゼと DNA をほどく酵素である DNA ヘリカーゼの作用によって、1 本鎖状態の鋳型 DNA 鎖に対して伸長鎖の中に取り込まれることで DNA の複製が起きる。我々が見いだしている hMTH1 の加水分解活性を阻害する人工核酸誘導体は、8-I-deazadGTP であり天然型と同様な三リン酸体構造を有している。この人工核酸分子が複製の段階で DNA に取り込まれると 8-oxo-dG と同様に遺伝子変異を誘導してしまうことが考えられる。そこで、DNA ポリメラーゼ (大腸菌由来のクレノウフラグメント (KF)、真核生物の DNA 複製に関与する DNA ポリメラーゼ  $\beta$ ) と鋳型 DNA 鎖、蛍光標識した伸長鎖を用いて一塩基伸長反応を行い、ゲルシフトアッセイにより解析により実際に酵素によって取り込まれるのか検討を行った。ゲルシフトアッセイでは、酵素により三リン酸体が伸長鎖に取り込まれると、移動度の遅いバンドとして観測された。そのバンドの蛍光強度を定量化することにより取り込み効率を算出することができた。その結果、これまでの報告通りに 8-oxo-dGTP は鋳型鎖の dC や dA に対して伸長鎖に取り込まれることが明らかになった<sup>4)</sup>。このことは、8-oxo-dGTP 存在は遺伝子複製の過程で変異毒性を有していることを再確認した。一方、我々の人工核酸である 8-I-deazadGTP やその他の 8 位修飾型 deazadGTP 誘導体は、鋳型鎖の dC に対する伸長鎖への取り込み効率はかなり割合で減少することが明らかとなった (Table 1)。

Table 1. Steady-state kinetics parameters for incorporation reaction of Cl-, Br- and I-deazadGTP with KF(exo-) and Human DNA polymerase  $\beta$ <sup>a</sup>

polymerase X:dNTP	KF (exo-)			DNA polymerase $\beta$		
	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$k_{cat}/K_M$ (min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ×10 <sup>-2</sup> )	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$k_{cat}/K_M$ (min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ×10 <sup>-2</sup> )
dC:dGTP	11.37 ± 0.78	0.02 ± 0.009	51681	22.08 ± 1.42	51.89 ± 5.42	42.56
dA:dGTP	0.05 ± 0.001	8.34 ± 0.80	0.59	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>
dC:8-oxo-dGTP	0.67 ± 0.04	14.46 ± 0.23	4.61	0.02 ± 0.001	84.00 ± 24.11	0.03
dA:8-oxo-dGTP	2.83 ± 0.08	14.57 ± 2.15	19.39	1.48 ± 0.09	214.88 ± 50.51	0.69
dC:deazadGTP	8.89 ± 0.29	0.03 ± 0.003	32919	12.80 ± 0.57	41.61 ± 5.57	30.76
dA:deazadGTP	0.08 ± 0.02	7.88 ± 0.66	0.97	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>
dC:Cl-deazadGTP	0.24 ± 0.01	1.83 ± 0.21	12.84	0.02 ± 0.001	61.11 ± 18.81	0.02
dA:Cl-deazadGTP	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>
dC:Br-deazadGTP	0.07 ± 0.001	3.67 ± 0.54	1.92	0.004 ± 0.001	52.12 ± 7.16	0.01
dA:Br-deazadGTP	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>
dC:I-deazadGTP	3.25 ± 0.26	1.98 ± 0.42	163.99	0.09 ± 0.01	47.43 ± 9.61	0.18
dA:I-deazadGTP	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>

<sup>a</sup>) Average  $k_{cat}$ ,  $K_M$  and standard deviation were determined using three or more individual experiments. <sup>b</sup>) Single nucleotide incorporation reaction did not occur, therefore the parameters were not determined.

これは、8位の修飾による化合物のコンフォメーションの変化が考えられた。さらに鋳型鎖内の dA に対しては伸長鎖に全く取り込まれないことが明らかとなった。つまり、我々の化合物を細胞に導入しても DNA の複製の段階で、遺伝子変異を誘導することはほとんどないことを示しており、修復酵素を特異的に阻害できる可能性を明らかにした。そこで、電気化学的に細胞の中に化学物質を導入する方法の一つであるエレクトロポレーション法を用いて、8-I-deazadGTP の導入を行い、24 時間細胞を培養した後に細胞増殖阻害活性の評価を行った。その結果、コントロールとして導入した dGTP は、細胞死は確認できなかった。一方で、8-I-deazadGTP を導入した場合は、僅かではあるが細胞増殖阻害活性を確認することができた (Fig. 1) [4](#))。

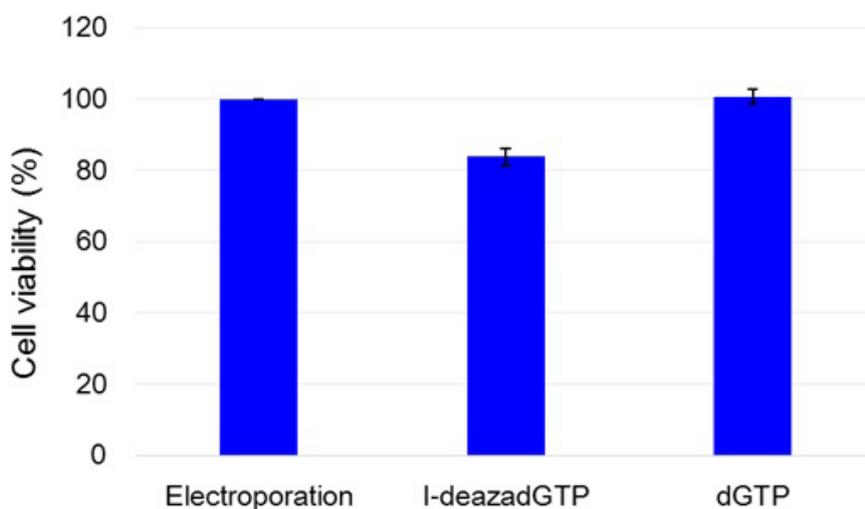


Fig. 1. Antiproliferative effect of I-deaza-dGTP

The HeLa cells were treated with dNTPs by electroporation, and cultured in D-MEM containing 10% FBS for 24 hr under 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The cell viability was determined by Cell-Titer 96® (n = 3).

さらに、マイナスの電荷を持ったリン酸基を有する三リン酸体は、そのままでは細胞内に取り込ませることができないため、三リン酸部分の末端部分の  $\gamma$  位を修飾することにより細胞内に取り込ませることにした。まず、モデル化合物である dGTP の修飾体を合成して、その安定性を調べることにした。dGTP の  $\gamma$  位のリン酸基をアミンとの反応によりアミド化し、合成した化合物を異なる pH の MES 緩衝液中で 40°C にて 5 時間インキュベーションし、そのサンプルを HPLC に導入することで安定性を調べた (Fig. 2)。保持時間が 7 分付近のピークが  $\gamma$  位リン酸基の化合物であり、pH6 の条件では 5 時間後も化合物が安定に存在しており、pH5 の条件では 4.5 分付近に新規ピークが確認された。このピークを単離して構造決定を行った結果、アミド体が加水分解されて元々の dGTP に戻っていることが単離後の質量分析により明らかとなり、HPLC チャートの dGTP とその修飾体のピーク面積比を算出することにより約 61% が加水分解されていることが示された。この反応を時間経過で追跡を行うと、1 時間後には約 14% が加水分解されていることも明らかとなった。細胞に取り込まれた際のリソソーム内は pH5 程度と報告があり、今回合成した化合物は細胞に取り込まれることによって活性本体と切り離されるという有用な情報を得ることができた。さらに酸性の条件下である pH4 では、ほとんどが dGTP の構造に戻っていた。このように、三リン酸部分の  $\gamma$  位リン酸基のアミド化を用いれば、種々のキャリアを結合させた誘導体の開発が可能になり、さらに細胞内に入ることによって分断されるという、非常に興味深い知見を得ることに成功した。

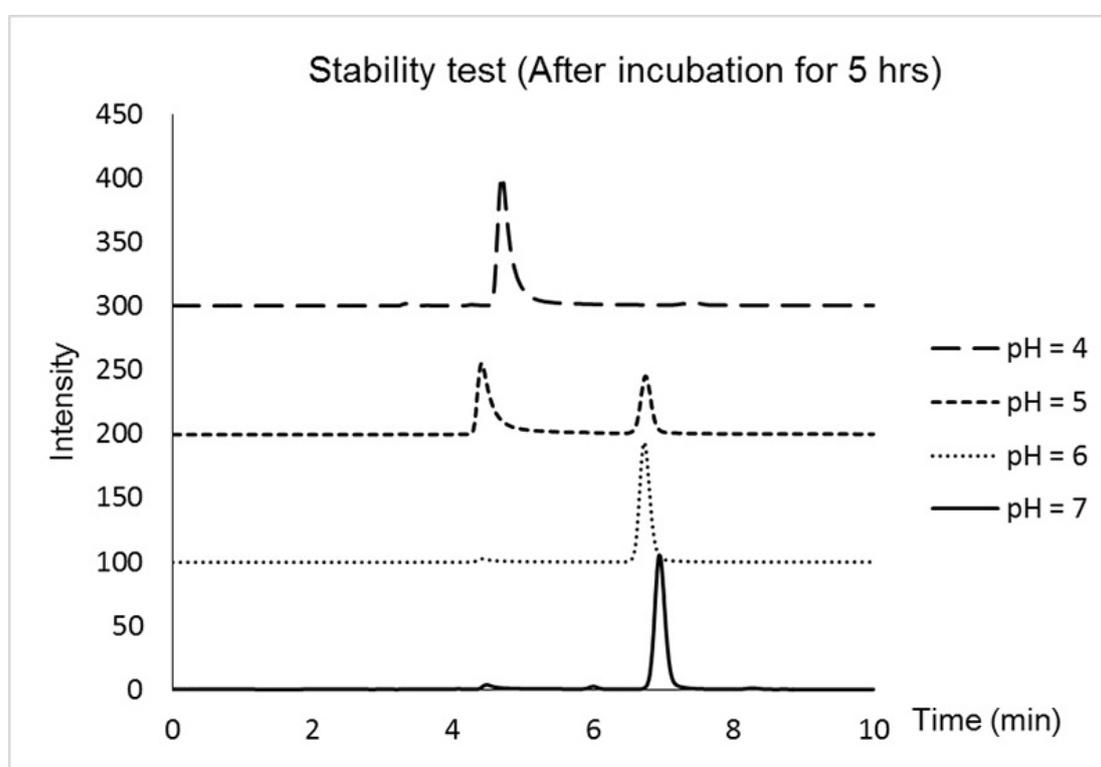


Fig. 2. Stability test of modified dGTP analogue

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、国立大学法人九州大学大学院薬学研究院生物有機合成化学分野の佐々木茂貴教授、尹貽貞博士および重松慶治である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

### 文献

- 1) Yizhen Y, Taniguchi Y, Sasaki S. Synthesis of 8-halogenated-7-deaza-2'-deoxyguanosine as an 8-oxo-2'-deoxyguanosine analogue and evaluation of its base pairing properties. *Tetrahedron*. 2014;70(11):2040-47. doi: 10.1016/j.tet.2014.01.047. PubMed

- 2) Yin Y, Sasaki S, Taniguchi Y. Recognition and excision properties of 8-halogenated-7-deaza-2'-deoxyguanosine as 8-oxo-2'-deoxyguanosine analogues and Fpg and hOGG1 inhibitors. *ChemBioChem*. 2016;16(8):1190-98. doi: 10.1002/cbic.201402690. PubMed PMID: 25900576
- 3) Yin Y, Sasaki S, Taniguchi Y. Inhibitory Effect of 8-Halogenated 7-Deaza-2'-deoxyguanosine Triphosphates on Human 8-Oxo-2'-deoxyguanosine Triphosphatase, hMTH1, Activities. *ChemBioChem*. 2016;17(7):566-69. doi/10.1002/cbic.201500589. PubMed PMID: 26879218
- 4) Yin Y, Sasaki S, Taniguchi Y. Effects of 8-halo-7-deaza-2'-deoxyguanosine triphosphate on DNA synthesis by DNA polymerases and cell proliferation. *Bioorg. Med. Chem*. 2016;24(16):3856-61. doi: 10.1016/j.bmc.2016.06.030. PubMed PMID: 27372838