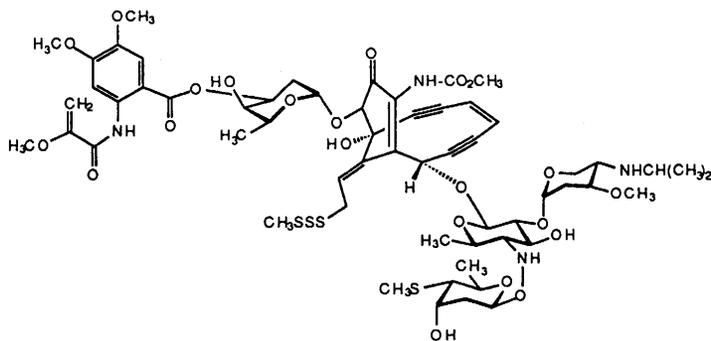


氏 名 うえ すぎ もと なり
 学位(専攻分野) 博 士 (薬 学)
 学位記番号 薬 博 第 353 号
 学位授与の日付 平成 7 年 3 月 23 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 研究科・専攻 薬学研究科薬学専攻
 学位論文題目 制癌抗生物質エスペラミシン A₁ およびエルサミシン A による
 DNA 塩基認識と鎖切断反応に関する研究

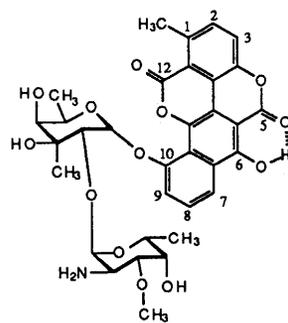
(主 査)
 論文調査委員 教授 杉浦幸雄 教授 横山 陽 教授 中川照眞

論 文 内 容 の 要 旨

エスペラミシン A₁ とエルサミシン A は DNA と結合するように自然によってデザインされた制癌抗生物質である。これらの天然低分子化合物による DNA 塩基認識の起源や DNA 相互作用の基本様式などが解明できれば、DNA-蛋白質相互作用といったさらに複雑な系を理解する上で基礎的な知見を提供すると期待される。また、エスペラミシン A₁ およびエルサミシン A は DNA に結合する能力に加えて DNA 鎖を酸化的に切断する能力も持っており、結合と反応を同時進行させるという点で一種の「酵素モデル」となり得る。さらに、現在エスペラミシン A₁ およびエルサミシン A は臨床実験に入っており、研究材料としてとりあげることは癌化学療法的基础的研究面からも有益と考えられる。以上の理由から筆者は、これら二つの制癌抗生物質と DNA との相互作用を様々な手段を用いて検討し、以下の新知見を得た。



エスペラミシン A₁



エルサミシン A

第一章 制癌抗生物質エスペラミシン A₁ による塩基配列認識の起源

エスペラミシン A₁ は DNA のオリゴプリン/オリゴピリミジン領域を認識して切断する。この塩基配

列認識の起源を探るため、様々な合成 DNA オリゴマーと各種薬物誘導体との反応産物を解析し、塩基配列特異性と薬物の構造との相関を詳細に調べた。その結果、オリゴプリン/オリゴピリミジン認識にはエンジン部分と三糖部分の両方が必須であることが見いだされた。DNA 切断効率に対する無機塩の影響などによると、その必須部分は DNA のマイナーグループと疎水結合していると考えられ、ある特定部位の相互作用よりも全体の立体空間的な相補性が特異的結合に重要であることが理解された。さらに、エスペラミシン結合時の宿主 DNA の円偏光二色性スペクトルの解析などから、エスペラミシン結合によって DNA から水和分子が遊離し、DNA 側に構造変化が生じることが示唆された。分子動力学計算によると、特異性を決定しているエスペラミシンの必須部分の構造は硬く、相補的な疎水結合に必要な構造変化を DNA 側に強いることが理解された。この見解と一致して、様々なヘリックスの自由度を持つ DNA オリゴマーをエスペラミシン A₁ の基質として用いたところ、自由度の大きな DNA ほどエスペラミシン A₁ は強く切断した。以上の結果から、硬くて疎水的なエスペラミシンの必須部分は DNA の構造変化しやすい部分を読むことで塩基配列特異性を発揮していると推定された。事実、オリゴプリン/オリゴピリミジン配列は構造変化が容易な配列と考えられており、本研究で得られた知見とよく対応している。

第二章 制癌抗生物質エルサミシン A によるグアニン認識と DNA 鎖切断

エルサミシン A は鉄と還元剤の存在下でグアニンの 3' 側のヌクレオチドを特異的に切断する。物理化学的実験によると、エルサミシン A の 6 位フェノールは生理的 pH で解離しておりフェノレートとして存在している。このフェノレートアニオンとラクトン環のカルボニル基を介してエルサミシン A が鉄イオンと 1 : 1 錯体を形成することを ESR スペクトルなどを用いて示した。この高スピン鉄錯体の鉄 (II) が鉄 (III) に酸化する際、酸素が活性化されてヒドロキシルラジカルが発生することも、スピン捕捉剤を用いた ESR 法によって示した。本錯体が DNA のグアニン塩基に結合していれば、ヒドロキシルラジカルは近傍にあるデオキシリボース骨格から水素原子を引き抜いて、グアニンの 3' 側で DNA を切断することが予想される。DNA の切断産物を追究したところ、水素原子引き抜きはデオキシリボースの 4' 位で起こっていると考えられた。

他方、エルサミシン A から糖鎖を除いた場合でもグアニン特異性は保持されており、特異性はクロモフォア部分に起因すると推定された。合成 DNA を用いた実験などから、エルサミシン A は DNA のマイナーグループに結合し、マイナーグループに突き出しているグアニンの 2 位アミノ基がグアニン認識に重要であることが明らかとなった。金属の配位はグアニン特異性に影響しなかったため、金属配位部位の反対側に存在する 12 位のカルボニル酸素とグアニンの 2 位アミノ基が水素結合していると予想された。さらに、DNA 鎖切断反応におけるエルサミシン A 分子中のアミノ糖鎖の役割についても考察した。

本研究は、DNA を標的とする制癌抗生物質エスペラミシン A₁ およびエルサミシン A の作用機序の分子レベルでの理解に役立つばかりでなく、一般に生物活性分子による DNA 塩基認識や DNA 鎖切断反応に関しても有用な基礎的知見を提供していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

制癌抗生物質エスペラミシン A₁ とエルサミシン A による DNA 塩基認識の起源や DNA 相互作用の基

本様式などが解明できれば、DNA-蛋白質相互作用といったさらに複雑な系を理解する上で有用な基礎的知見を提供することが期待される。また、エスペラミシン A₁ およびエルサミシン A は DNA に結合する能力に加えて DNA 鎖を酸化的に切断する能力をもっており、結合と反応を同時進行させるという点で一種の「酵素モデル」ともなり得る。そこで、これら二つの制癌抗生物質と DNA との相互作用を種々の手段を駆使して、以下のような新知見を得た。

エスペラミシン A₁ による DNA のオリゴプリン / オリゴピリミジン塩基領域の優先的認識には、本薬物のエンジン部分と三糖部分の両方が必須であることが見い出された。DNA 切断効率に対する無機塩の効果から、この必須部分は DNA のマイナーグループと疎水結合していると考えられ、ある特定部位の相互作用というよりも全体の立体空間的な相補性が重要であると考えられた。エスペラミシン結合時のホスト DNA の円偏光二色性スペクトルの解析によって、エスペラミシンが結合すると DNA から水和分子が遊離し、DNA 側に大きく構造変化が生じることが判明した。さらに、様々なヘリックスの自由度をもつ DNA オリゴマーをエスペラミシン A₁ の基質として使用したところ、自由度の大きな DNA ほど本薬物は強く切断した。この結果、硬くて疎水的なエスペラミシンの必須部分は DNA の構造変化しやすい領域を読むことで塩基配列特異性を発揮していると推定された。

エルサミシン A による DNA 切断には、鉄イオンと還元剤が要求されるが、電子スピン共鳴スペクトルの測定から、エルサミシン A は鉄イオンと 1 : 1 錯体を形成すること、そして高スピン鉄錯体の鉄 (II) が鉄 (III) への酸化時に酸素が活性化されてヒドロキシルラジカルを発生することがわかった。DNA 切断産物の解析から、エルサミシン A-鉄錯体はデオキシリボースの 4' 位の水素を引き抜いていることが明らかになった。さらに、エルサミシン A によるグアニンの 3' 側のヌクレオチド特異的切断には、DNA のマイナーグループに突き出ているグアニンの 2 位アミノ基とエルサミシン分子の 12 位のカルボニル酸素との水素結合が重大に関与していることが解明された。

本研究成果は、DNA を標的とする制癌抗生物質エスペラミシン A₁ およびエルサミシン A の作用機序の分子レベルでの理解に役立つばかりでなく、一般に生物活性分子による DNA 塩基認識や DNA 鎖切断反応に関しても有益な基礎的知見を提供していると考えられ、審査に当たった横山教授、中川教授そして私は、本論文が博士 (薬学) の論文として価値あるものと認めた。更に、平成 7 年 2 月 16 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。