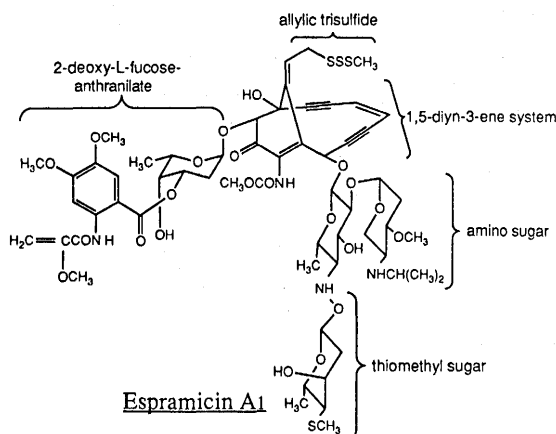


氏名 うえ 植 さわ 沢 よし 芳 ひろ 広  
 学位(専攻分野) 博士 (薬学)  
 学位記番号 薬博第320号  
 学位授与の日付 平成4年7月23日  
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
 研究科・専攻 薬学研究科薬学専攻  
 学位論文題目 抗腫瘍性抗生物質エスペラミシンの活性化とDNA切断作用に関する研究

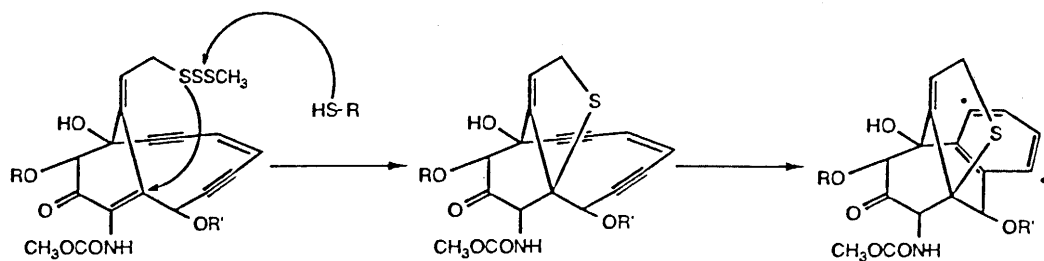
論文調査委員 (主査) 教授 杉浦幸雄 教授 富士 薫 教授 川寄敏祐

論文内容の要旨

エスペラミシン A<sub>1</sub> は1987年に発見された抗腫瘍性抗生物質であり、諸条件下でDNAを効率よく分解することから細胞内の核酸合成阻害を主作用としていいると考えられている。この化合物は下図に示すように、エンジン環、メチルトリスルフィド、イオウ含有糖などの新奇的な構造単位を持ち、その抗腫瘍活性はアドリマイシンの数千倍に達し、現在最強の抗腫瘍活性物質の一つとして注目を集めている。筆者はこの物質に対する三つの活性化条件を見出し、そのDNA切断作用について詳細に研究した。



エスペラミシン A<sub>1</sub> 分子内には容易に還元され得るメチルトリスルフィド基が存在することから、この抗生物質の活性化には還元性物質や還元酵素などの関与が推定される。実際、単離・精製したDNAとエスペラミシン抗生物質のin vitroでの反応は還元剤の添加によって顕著に促進された。種々の還元剤の作用を比較すると、特にチオール系物質が著しくエスペラミシン A<sub>1</sub> の活性を増強することが観察された。このときのDNA切断反応は、次のような機構に基づいて生成したエスペラミシンのベンゼンピラジカルがDNAのデオキシリボースを攻撃することに起因していると考えられる。



一方、攻撃された DNA 塩基の特異性を調べたところ 5'-TTT, 5'-CTC, 5'-TTC 等のオリゴピリミジン領域における T, C 塩基の優先性が確認された。また各塩基の攻撃頻度は T > C > A > G の順であった。エスペラミシン A<sub>1</sub> による DNA 切断反応は、ディスタマイシンなどの DNA マイナーグループ結合物質によって配列特異的に抑制された。この結果はエスペラミシンが DNA のマイナーグループ側で相互作用していることを示している。次にエスペラミシン A<sub>1</sub> からデオキシフコース-アントラニレート部位を除去したエスペラミシン C, 及び更にイオウ含有糖部を除去したエスペラミシン D をエスペラミシン A<sub>1</sub> と比較すると、低い切断活性 (各々 1/10 及び 1/1000) ながらほぼ同一の配列特異性を示した。除去された糖鎖部位は DNA との塩基配列非特異的な結合に関与しており、エンジンのバグマン環化反応を經由して炭素中心ラジカルを形成し得るエスペラミシンアグリコン部は DNA の切断反応の中心であると共に塩基配列認識にも関与している可能性が高い。

エスペラミシンの更なる活性化系の検討の結果、紫外線照射によっても DNA 切断が引き起こされることが見出された。この場合 DNA 切断の強さは大過剰のチオール系還元剤を用いた活性化系に匹敵した。エスペラミシン A<sub>1</sub> は紫外線前照射によってその活性を消失することから、活性発現の機構は不可逆的に進行していくものと考えられる。DNA 切断の塩基配列特異性に関しては還元系と紫外線系との間に明確な相違は見られなかった。これらの結果は紫外線系においても還元系に類似した反応が進行していることを暗示している。実際、エスペラミシンの紫外線照射による炭素中心ラジカル形成が ESR 測定によって確認された。エンジン環が芳香環化したエスペラミシン Z は紫外線照射による DNA 切断活性を示さなかった。またエスペラミシン C には紫外線誘起 DNA 切断活性が観察されないことから、デオキシフコース-アントラニレート部位は紫外線の受容部位としての役割が示唆される。

更に、還元系及び紫外線系を厳密に排除した反応系においても、エスペラミシンは 50℃ の加温条件下で DNA を切断することがわかった。この加熱によって誘起される DNA 切断活性は pH に依存し塩基性側で増強された。またエスペラミシン A<sub>1</sub> 分子内のトリスルフィド及びデオキシフコースは熱活性化に本質的には関与していないことがエスペラミシン類縁体を用いた実験により明らかにされた。一方、攻撃塩基特異性はチオール系還元剤の添加あるいは紫外線照射による活性化系とは異なり各塩基にはほぼ均等な切断が観察された。このような実験事実に基づく可能な熱活性化機構として、(A)直接的なエンジンの熱環化反応、あるいは(B)エスペラミシン分子内官能基である H<sub>3</sub>OCONH-のトリガーとしての作用が提案される。

以上述べたように、エスペラミシン抗生物質は *in vitro* においてチオール系還元剤の添加、紫外線照射、及び熱処理の三つの活性化系で効率よく DNA を切断することがわかった。エスペラミシン A<sub>1</sub> 分子中に含まれる糖部分は DNA に対する親和性に関与しており、アグリコン部分は DNA 切断反応の中心であると共に塩基配列認識にも関与している可能性がある。また還元系のトリガーと考えられるメチルトリスルフィド部分は熱活性化系では直接関与していないと推定される。一方紫外線活性化系において、デオキシフコース部分は光受容部位として作用している。このようにエスペラミシン分子はそれぞれ固有の役割を担っている種々の原子団から成り立っており、これらの知見は今後のドラッグデザインに対して有益な知見を提供すると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

1987年に発見された抗腫瘍性抗生物質エスペラミシンは、その分子内にエンジイン環、メチルトリスルフィド、硫黄含有糖など新奇な構造単位をもち、またアドリマイシンの数千倍にも達する抗腫瘍活性を示すことから、現在最強の抗腫瘍活性物質の一つとして国際的に注目を集めている。本抗生物質は細胞系での DNA 合成を顕著に抑制し、また細胞内・試験管中で DNA を効果的に切断することから、その生物活性発現のための第一次標的は DNA 分子であると考えられる。それ故、本研究ではエスペラミシンの作用機作を分子レベルで解明するため、エスペラミシンによる DNA 切断反応を分子生物学的手法や物理化学的手法を駆使して検討し、本抗生物質に対する三つの活性化条件を見出すと共に、その DNA 切断特性についても貴重な知見を得た。

メチルトリスルフィド基の存在から推定されるように、エスペラミシンによる DNA 切断は還元剤、特にチオール化合物の存在下、著しく促進された。この DNA 切断反応は、メチルトリスルフィド基の還元によって生じるチオレートアニオンのミカエル付加と、引き続いて起こる1,5-ジイン-3-エン部位の転位反応の結果生じる1,4-デヒドロベンゼンピラジカルの DNA デオキシリボースの攻撃に起因していると考えられる。攻撃された DNA 塩基は 5'-TTT や 5'-TTC などのオリゴピリミジン領域におけるチミンとシトシン塩基が優先的であり、各塩基の攻撃頻度は T > C > A > G の順であった。

さらに著者は、エスペラミシンが紫外線照射あるいは加温 (50度) 条件下で DNA を効果的に切断を引起すことを見出した。DNA 切断の塩基配列特異性に関しては、還元系と紫外線系との間に相違はなかったが、熱活性化系では各塩基にほぼ均等な切断が観察された。また、種々のエスペラミシン誘導体を用いて DNA 切断活性や切断塩基特異性などについて追究した結果、エスペラミシン分子中の糖鎖部位は DNA との親和性を増強する役割をはたしており、そしてベンゼンピラジカルを発生するエンジイン部は DNA 切断反応の中心であると共に塩基配列認識にも関与していることが明らかになった。さらに、デオキシフコース-アントラニレート部位は紫外線の受容部位として重要な役割をになっていることもわかった。

以上のように本研究はエスペラミシンの DNA 切断作用における三つの活性化系を発見し、その構造-活性相関に関しても有用な知見を提供したもので、審査に当たった富士教授、川崎教授そして私は博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと認めた。

さらに平成4年5月13日論文内容とそれに関連した事項につき試問を行った結果優秀と認定した。