

氏 名 くさ か べ てつ や 日下部 哲也
 学位(専攻分野) 博士 (薬学)
 学位記番号 論薬博第610号
 学位授与の日付 平成11年5月24日
 学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
 学位論文題目 エンジン型抗癌抗生物質ダイナミシンAによるDNA認識と鎖切断反応に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 杉浦幸雄 教授 富岡 清 教授 川崎敏祐

論文内容の要旨

DNAを標的とする抗癌抗生物質は数多く存在し、化学構造も多岐にわたるが、その多くはDNAと相互作用して、転写や複製を阻害することによって癌細胞を殺傷するものである。1980年代後半に初めて明らかにされたエンジン型抗癌抗生物質は、新奇な化学構造と強力な抗癌活性を有するため、構造解明に端を発し世界中で精力的に研究が進められてきた。とくに注目を集めているのがDNA結合能に加えて鎖切断能を有する点で、その強いDNA鎖切断能が高い抗癌活性に深くかかわっていると考えられている。著者は、エンジン型抗癌抗生物質のうちダイナミシンAに着目し、そのDNA認識と鎖切断反応について以下の新知見を得た。

第一章 アルカリ性条件下におけるダイナミシンAの活性化とDNA鎖切断

ダイナミシンAは*Micromonospora chersina*から単離された新規抗癌抗生物質で、エンジン10員環とアンスラキノン環を併せもつ1種のハイブリッド型化合物として特徴づけられる。本薬物は還元剤の添加、あるいは可視光線の照射により活性化され、強いDNA鎖切断を引き起こす。これらの反応条件下におけるダイナミシンAの活性化はアンスラキノン環の還元が引き金となるが、アルカリ性条件下においては還元剤の添加、あるいは可視光線の照射を必要とせず、効率的に活性化されDNA鎖を切断することを見出した。

一方、ダイナミシンAのアルカリ性条件下における反応生成物は、HPLC分析によりダイナミシンNと同定され、ダイナミシンAは還元剤の添加、あるいは可視光線の照射による活性化機構と同様の様式でDNA鎖を切断するものと考えられる。

第二章 ダイナミシンAによるDNA高次構造の精密認識とDNAとの相互作用様式

ダイナミシンAは他のエンジン型抗癌抗生物質と比較すると塩基配列選択性が低い。このように特定の塩基や塩基対に対して選択性が低いDNA攻撃分子は、ある種のDNA高次構造に対して高い選択性を示す場合があることから、ミスマッチ、バルジおよびニック構造をもつDNAをダイナミシンAと反応させた。その結果、これら局所高次構造が歪みや緩みを有していることを示すとともに、ダイナミシンAがそれぞれの局所構造を精密に認識、切断することを明らかにした。また、エキソヌクレアーゼIIIを用いた実験系により、ダイナミシンAはアルカリ性条件下においては中性または酸性条件下と比べてDNAとより強く結合することを見出したが、これは高pH条件下では塩基対間の水素結合がより緩みやすくなったためと考えられる。かさ高いダイナミシンAによるDNA認識の起源は、DNAの歪みや緩みを伴う高次構造にあると考えられる。

他方、アンスラサイクリン系薬物は、そのアンスラキノン環を介してDNA塩基対間にインターカレートすることから、アンスラキノン環を有するダイナミシンAも同様の相互作用様式を示すと推定される。事実、ダイナミシンAがDNAと非共有結合的に相互作用することを明らかにしたこと、ダイナミシンHの可視吸収スペクトルの淡色効果および長波長シフトを観測することができたこと、ダイナミシンHの蛍光スペクトルの消光を確認することができたこと、DNA巻き戻し実験によって超らせん構造を回復したバンドを検出することができたことなどから、ダイナミシンはDNAの塩基対間にインターカレートすることが強く示唆された。

第三章 ダイナミシン A による配列依存的な 2 段階 DNA 両鎖切断反応

DNA の両鎖切断は、単鎖切断のみの場合と比べて細胞内での修復がより困難であり、エンジン型抗癌抗生物質が示す強力な抗癌活性を理解する上で重要である。例えばネオカルチノスタチン、カリケミン、C-1027 などの他のエンジン型抗癌抗生物質は、2つのラジカル活性種により制限酵素のように DNA 両鎖を同時に切断することが知られている。しかし、ダイナミシン A で切断したプラスミド DNA をアガロース電気泳動法で評価したところ、DNA 両鎖切断は単鎖切断の蓄積により段階的に進行することが示された。事実、分子力場計算によると、ダイナミシン A は単鎖切断しか引き起こし得ないと報告されている。DNA 両鎖切断が単鎖切断を経て進行するならば、DNA は途中で 1 塩基を欠いたギャップ構造をとると考えられる。そこで、中央部分にギャップ構造を含む DNA を合成し、これをモデル基質としてダイナミシン A と反応させたところ、ダイナミシン A は 5'-Pu-Pu/3'-PyPuPy という配列を含む DNA を選択的に認識し、切断することを見出した。したがって、ダイナミシン A は DNA の単鎖切断を引き起こしてギャップ構造を形成させ、別のダイナミシン A 分子がその反対鎖を配列依存的に切断するという 2 分子による 2 段階反応で DNA 両鎖切断を誘導することが提案される。

以上より、ダイナミシン A は DNA 局所高次構造を精密に認識し、インターカレーションにより DNA と相互作用する「分子くさび」であり、しかも DM 両鎖を切断する高性能の「分子はさみ」であるといえる。本研究の結果は、エンジン型抗癌抗生物質の 1 つダイナミシン A による DNA 認識と鎖切断反応について明らかにしており、ダイナミシン A の抗癌活性を分子レベルで理解する上で有用な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

ダイナミシン A は 10 員環エンジン骨格に加えて、アンスラキノロン環を併せもった一種のハイブリッド型分子であり、種々の実験腫瘍に対して強い抗癌活性を有している。エンジン型抗癌抗生物質の高い抗癌活性は、その強い DNA 鎖切断能に大きく起因していることが予想されるが、ダイナミシン A は他のエンジン型抗癌抗生物質とはかなり異なった分子構造を持っているので、ダイナミシン A による DNA 結合や DNA 鎖切断特性について明らかにすることは、ダイナミシン A の抗癌活性を分子レベルで理解する上で重要である。本研究の結果は以下のような新しい、かつ興味深い知見を与えた。

ダイナミシン A は還元剤の添加や可視光線の照射によって活性化されて DNA 切断反応を引き起こすことが知られているが、アルカリ性条件下では還元剤や光を必要とせず、効率よく活性化されて強い DNA 鎖切断能を示すことが見出された。本条件下でのダイナミシン A の反応生成物はダイナミシン N であることが HPLC 分析から同定され、還元剤や可視光線と同様の活性化機構によって DNA 鎖切断が誘起されることが示唆された。

かさ高い分子であるダイナミシン A による DNA 認識を追究するため、ミスマッチ、バルジおよびニック構造をもつ DNA に対するダイナミシン A の反応性について検討した。その結果、局所構造に歪みや緩みを有するこれら DNA において、ダイナミシン A がそれぞれの局所高次構造を精密に認識して、切断することを明らかにした。また、可視吸収スペクトルの淡色効果・長波長シフト、蛍光スペクトルの消光現象、DNA 巻き戻し実験の超らせん構造バントなどの検出から、ダイナミシン A は DNA 塩基対間にインターカレートすることが強く示され、かさ高いダイナミシン A による DNA 認識は塩基配列よりも DNA の歪みや緩みを伴った局所部位へのインターカレーションに基づいていることが推定された。

ダイナミシン A による DNA 両鎖切断様式を解明するため、DNA の中央部分に 1 塩基を欠いたギャップ構造を含む DNA オリゴマーを合成し、これをモデル基質としてダイナミシン A と反応させたところ、ダイナミシン A は、5'-Pu-Pu/3'-PyPuPy という配列をもつギャップ DNA を特異的に切断した。この事実は、ダイナミシン A はまず DNA の単鎖切断を引き起こしてギャップ構造を形成させ、次いで別のダイナミシン A がその反対鎖を配列依存的に切断する 2 分子による 2 段階反応で両鎖切断を誘起することが強く示唆された。DNA の両鎖切断は、単鎖切断に比較して細胞内での修復が難しく、エンジン型抗癌抗生物質の強い抗癌活性を理解する上で重要である。

以上、本研究で得られた知見は、エンジン型抗癌抗生物質の中でも特異な構造を有するダイナミシン A の DNA 認識、DNA 切断そして抗癌活性を化学の言葉で理解するのに極めて有用と考えられる。よって、審査に当たった富岡教授、川崎教授そして私は、本論文が博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。更に、平成 11 年 4 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。