

氏名	おくのやすし 奥野恭史
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第635号
学位授与の日付	平成12年9月25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	高分解能 NMR 法を用いた抗腫瘍抗生物質 C-1027 クロモフォアのアポタンパク質および DNA 精密構造認識と反応メカニズムに関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 杉浦幸雄 教授 半田哲郎 教授 富士 薫

論文内容の要旨

抗腫瘍抗生物質 C-1027 はエンジインクロモフォア (Chr) が、アポタンパク質 (Apo) に非共有結合的に会合したクロモプロテイン複合体として存在しており、その薬理活性は活性本体である Chr が Apo により核内に輸送された後に放出され、DNA の特定配列を認識、切断するものと考えられている。他のエンジイン化合物とは異なり、C1027-Chr は極めて不安定であり、自発的にその反応が進行するという特異性を有する。著者は、NMR 法を中心とした構造解析法を用いて、(1) C1027-Chr-DNA 相互作用解析、(2) C1027-Chr-Apo 相互作用解析、そして(3) DNA、溶液中、Apo 間における Chr の動的構造変化と反応性相関などについて研究し、C-1027 の DNA および Apo 分子認識機構および反応メカニズムに関して以下のような価値ある知見を明らかにした。

1. d(T1G2C3C4A5T6C7)/d (G8A9T10G11G12C13A14) オリゴマーと芳香環化した C1027-Chr との 1:1 複合体について NMR 測定を行った。NOESY 測定から DNA の分子内 NOE 144 個、Chr の分子内 NOE 33 個、DNA と Chr との分子間 NOE 36 個の合計 213 個の NOE ピークが決定された。これらの NOE 距離情報に基づく分子動力学計算の結果、RMSD 値 0.72 Å の複合体最適化構造モデルの構築に成功した。本モデルから、C1027-Chr はベンゾオキサゾリン環 (BO) 部分の C3G12-C4G11 塩基対間へのインターカレーションおよびアミノ糖 (AS) 部分の A5T6/A9T10G11 配列のマイナーグループへの結合を通して、DNA の C3C4A5T6/A9T10G11G12 を認識していることが示された。ここで、芳香環化エンジイン部分の 3 位と 6 位のプロトンは、G12 の H1' (距離 4.72 Å) と A5 の H1' (3.26 Å) または H4' (2.18 Å) と接近しており、これらの水素を引き抜いて DNA 切断を誘起しているものと予想される。一方、他のオリゴマーである d(TATAC)₂ と Chr との複合体の NMR 構造モデルの構築も同様に行ったところ、d(TGCCATC)/d(GATGGCA) の場合と類似した結合様式を示しており、本研究の C1027-Chr の DNA 結合様式における普遍性を示唆している。

2. C1027-Apo-Chr 複合体および単独の Chr を用いた DNA 切断実験を比較することにより、C1027-Apo は DNA との反応には無関係であるが Chr の活性保護と運搬の役割を担っていることが示された。蛍光分光法、CD スペクトル法を用いて、Apo-Chr 相互作用について検討したところ、Chr は Apo と 1:1 で結合しており、Chr の BO 環が Apo との相互作用に重要な役割を果していることが示唆された。さらに、経験的分子力場計算 (CHARMM 力場) に基づいて、C1027-Apo-Chr 複合体の立体構造モデルの構築を試みた。CHARMM 力場を用いて Apo と Chr それぞれのファンデルワールスポテンシャル、静電ポテンシャルを算出し、Apo と Chr 互いのポテンシャル値が相殺して出来るだけ低くなるように複合体モデルを構築した。しかしながら、NMR 構造モデルと比較したところ、BO 環の配置が異なっていることがわかった。これはファンデルワールス相互作用の算出における CHARMM 力場計算の限界を示唆している。これらの Apo-Chr 複合体モデルに基づいて、Apo はそのポケットの疎水性環境内に Chr を包含するばかりでなく、エンジイン環を BO 部分、AS 部分、クロロフェノール部分、さらには Tyr32 残基によって取り囲むことにより、Chr を安定化させていることが推定された。

3. C1027-Chr-DNA 複合体および Chr-Apo 複合体の NMR 構造モデルを詳細に比較することにより、C1027-Chr によ

る DNA と Apo の認識様式の相違を検討した。Chr の DNA 認識には、主に BO と AS 部分が重要な役割を果しているのに対し、大環状 (MC) 部分は DNA との顕著な相互作用が認められなかった。一方、Chr の Apo 認識には、主に BO と MC 部分が重要な役割を果しているのに対し、AS 部分は Apo とほとんど相互作用していない。さらに、この相違は水素引き抜き反応を演じるエンジンの活性 (安定性) にも大きく反映しているものと考えられる。また、DNA 結合状態 > 溶液状態 > Apo 結合状態の順にある C1027-Chr の反応性が Chr のコンフォメーション変化に起因している可能性を検討するために、これら 3 状態における Chr の平均最適化構造を、エンジン環を基準に重ね合わせた。その結果、C1027-Chr はクロロフェノールを含む MC 部分のコンフォメーションを変化させることにより、Apo 内よりも DNA 内の方において反応性を上昇させていることが示唆され、この反応性の相違は *ab initio* 計算からも立証された。

これらの結果は、エンジン抗腫瘍抗生物質の作用メカニズムの分子レベルでの理解に役立つばかりでなく、新しい核酸標的分子や蛋白質標的分子の合理的設計にも有用な知見を提供するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

抗癌導生物質 C-1027 は、エンジנקロモフォア (Chr) がアポタンパク質 (Apo) に非共有結合的に会合したクロモプロテイン複合体として存在しており、その薬理活性は、活性本体である Chr が Apo により核内に輸送された後に、放出され、DNA の特定配列を認識、切断するものと考えられている。他のエンジン化合物とは異なり、C1027-Chr は極めて不安定であり、自発的にその反応が進行するという特異性を有する。したがって、NMR 立体構造解析に基づく抗腫瘍抗生物質 C-1027 の DNA および Apo 分子認識機構の解明は、エンジン化合物の反応メカニズムの分子レベルでの理解にとどまらず、多分子認識機構、構造活性相関を理解するうえで重要である。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。

d(T1G2C3C4A5T6C7)/d (G8A9T10G11G12C13A14) オリゴマーと C1027-Chr との複合体について NMR 測定を行い、NOE 距離情報に基づく最適化構造モデルの構築に成功した。本モデルから、C1027-Chr はベンゾオキサゾリン環 (BO) 部分の C3G12-C4G11 塩基対間へのインターカレーションおよびアミノ糖 (AS) 部分の A5T6/A9T10G11 配列のマイナーグループへの結合を通して、DNA の C3C4A5T6/A9T10G11G12 を認識していることが示された。ここで、芳香環化エンジン部分の 3 位と 6 位のプロトンは、G12 の H1' と A5 の H1' または H4' と接近しており、これらの水素を引き抜いて DNA 切断を誘起しているものと予想された。

経験的分子力場計算に基づいて、C1027-Apo-Chr 複合体の立体構造モデルの構築を試みた。NMR 解析による Apo-Chr 複合体モデルから、Apo はそのポケットの疎水性環境内に Chr を包含するばかりでなく、エンジン環を BO 部分、AS 部分、クロロフェノール部分、さらには Tyr32 残基によって取り囲むことにより、Chr を安定化させていることが推定された。

C1027-Chr-DNA 複合体および Chr-Apo 複合体の NMR 構造モデルを詳細に比較することにより、C1027-Chr による DNA と Apo の認識様式の相違を検討した。Chr の DNA 認識には、主に BO と AS 部分が重要な役割を果していたのに対し、MC 部分は DNA との顕著な相互作用が認められなかった。一方、Chr の Apo 認識には、主に BO と MC 部分が重要な役割を果していたのに対し、AS 部分は Apo とほとんど相互作用していなかった。さらに、この相違は水素引き抜き反応を演じるエンジンの活性や安定性にも大きく反映しているものと考えられた。また、DNA 結合状態、溶液状態、Apo 結合状態の 3 状態における Chr の平均最適化構造を重ね合わせた結果、C1027-Chr はクロロフェノールを含む MC 部分のコンフォメーションを変化させることにより、Apo 内よりも DNA 内の方において反応性を上昇させていることが示唆され、この反応性の相違は *ab initio* 計算からも立証された。

以上、本研究で得られた成果は、エンジン型クロモプロテイン C-1027 の DNA 切断および、抗腫瘍作用の分子レベルでの理解に重要な情報を与えたばかりでなく、新しい核酸標的分子、蛋白質酵素標的分子の合理的設計にも極めて有用な知見を提供するものと思われる。

よって、本論文を博士 (薬学) の論支として価値あるものと認める。

さらに、平成12年8月23日に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。