

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	かしわざき げんご 柏 崎 玄 伍
学位 (専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 24 年 3 月 26 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
(学位論文題目) Design and Biological Evaluation of PI Polyamide Conjugates (PI ポリアミドコンジュゲートの設計と生物学的評価)	
論 文 調 査 委 員	(主査) 杉 山 弘 教授 三 木 邦 夫 教授 藤 井 紀 子 教授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏 名	柏 崎 玄 伍
論文題目	Design and Biological Evaluation of PI Polyamide Conjugates (PI ポリアミドコンジュゲートの設計と生物学的評価)		
(論文内容の要旨)			
<i>N</i>-メチルピロール-<i>N</i>-メチルイミダゾール (PI) ポリアミドはネトロプシンやディスタマイシンといった抗生物質由来の人工分子であり、DNA の副溝に入り込んで配列を認識するという興味深い性質をもっている。<i>N</i>-メチルピロールは A、C、T と、<i>N</i>-メチルイミダゾールは G との間に水素結合を形成することにより配列の認識が可能になっている。人工分子であるにもかかわらずその結合能並びに配列認識能は転写因子に匹敵する。PI ポリアミドを DNA アルキル化剤と結合させることで DNA 配列特異的なコンジュゲートが合成される。 第 1 章ではヘテロ 3 量体の設計に基づきヒトテロメア配列をアルキル化する <i>seco</i>-CBI-PI ポリアミドコンジュゲートについて記述している。「末端複製問題」により正常細胞のテロメアは細胞分裂ごとに短くなりやがてその細胞は死を迎えるが、がん細胞は主にテロメラーゼとよばれるテロメア伸長酵素の発現を上昇させることでテロメア長を維持し不死化している。そのためテロメアやテロメラーゼは抗がん剤開発の際の魅力的なターゲットとなっている。そこでテロメア配列をアルキル化する PI ポリアミドコンジュゲートの設計に取り組んだ。ヒトテロメア配列は 6 塩基対 5' -GGGTTA-3' の繰り返しであるが、そのおよそ 2 サイクル分である 11 塩基対を認識してアルキル化させることを目指した。そして合成したコンジュゲートの機能をゲル電気泳動で確認した結果、このような長い配列を認識する際には長いアルキル化剤 PI ポリアミドコンジュゲートと 2 つの短いパートナー分子を用いる、ヘテロ 3 量体設計が有用である可能性が示された。 第 2 章ではクロラムブシル PI ポリアミドコンジュゲートによる、ヘテロ 3 量体型でのヒトテロメア配列のアルキル化について記述している。クロラムブシルは上述の <i>seco</i>-CBI コンジュゲートに比べて安定であるためそのコンジュゲートは合成が容易である。クロラムブシルコンジュゲートのアルキル化能をゲル電気泳動により評価した結果、PI ポリアミドの C 末端にクロラムブシルを結合させることで両方の DNA 鎖をアルキル化できることが明らかとなった。 第 3 章ではマイクロアレイ法やヌードマウスを用いた実験など、より生物学的な実験手法に重点を置いて研究を進めた。まずはゲル電気泳動によりコンジュゲートの配列特異性を評価し、細胞毒性アッセイにより既存の抗がん剤に匹敵する高い毒性を確認した。DNA マイクロアレイ実験による遺伝子発現パターンの解析からは、発現減少している共通遺伝子が各コンジュゲート間で少ない一方、発現上昇している共通遺伝子は多いことを見出した。このことから、発現減少側の遺伝子は PI ポリアミド配列の差を反映しており、発現上昇側の遺伝子は共通のアルキル化剤部位の影響を受けていることが示唆された。続いて <i>in vivo</i> における抗腫瘍効果の評価を行った。ヌードマウスにヒトのがん細胞を移植し、アルキル化剤 PI ポリアミドコンジュゲートの DMSO 溶液を腹腔内投与した。しかし腫瘍の増殖抑制効果は確認できなかったため、コンジュゲートのリポソーム溶液を調製し、同様の実験を今度は静脈投与により行った。その結果、わずかではあるものの、あるコンジュゲートと細胞株の組み合わせにおいては抗腫瘍効果が現れることを確認した。			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

今回申請者は生物有機化学的手法を駆使して、配列特異的な DNA アルキル化を行う分子を設計合成し、その反応性や生物学的な活性について検討を行った。*N*-メチルピロール-*N*-メチルイミダゾール (PI) ポリアミドは DNA の副溝に入り込んで塩基配列を認識するという画期的な性質をもつ人工分子である。申請者は DNA アルキル化剤にこの PI ポリアミドと結合させ DNA 配列特異的な様々なコンジュゲートを合成に成功し、その生物活性について報告した。

第 1 章ではヒトテロメア配列をアルキル化する *seco*-CBI-PI ポリアミドコンジュゲートを合成しその活性について検討した。癌細胞ではテロメアの短縮を防ぐメカニズムを獲得しているため、テロメアやそれを伸張するテロメラーゼは抗がん剤開発の際の魅力的なターゲットである。そこで申請者はテロメア配列をアルキル化する PI ポリアミドコンジュゲートを合成している。ヒトテロメア配列は 6 塩基対の繰り返しであるが、その 2 回繰り返しに対応する 11 塩基対を認識してアルキル化させることに成功した。すなわち申請者が合成したコンジュゲートは 2 分子のパートナー分子と DNA の副溝でヘテロ 3 量体を形成しアルキル化を示すことが明らかになった。

第 2 章では抗がん剤であるクロラムブシルと PI ポリアミドコンジュゲートを合成した。これらのコンジュゲートはヘテロ 3 量体を形成しヒトテロメア配列のアルキル化を引き起こした。さらにクロラムブシルコンジュゲートはクロラムブシルコンジュゲートを含む DNA 鎖とその相補鎖の DNA 鎖とともにアルキル化できることを示した。

第 3 章ではマイクロアレイ法やヌードマウスを用いて配列特異的なアルキル化剤の生物化学的な評価を行った。まずゲル電気泳動によりコンジュゲートの DNA アルキル化の配列特異性を確認している。さらに細胞毒性アッセイによりマイトマイシンなどの抗がん剤に匹敵する高い毒性を確認した。次に DNA マイクロアレイによる解析から、発現が減少している遺伝子は共通性が少ない一方、発現上昇している遺伝子はアポトーシスに関連しているものが多いことを見出した。このことから、DNA アルキル化の配列特異性が細胞への効果に反映していることを示した。また合成したコンジュゲートについて動物実験を行っている。単独では腫瘍の増殖抑制効果は確認できなかったため、コンジュゲートをリポソームに内包させ静脈投与により行った。その結果、特定のコンジュゲートと細胞株の組み合わせにおいて細胞増殖が抑えられることを実証することに成功した。

以上、本論文は配列特異的なアルキル化剤の合成と生物活性について、様々な角度から検討した結果を報告したものであり、分子生物学や細胞生物学などの研究分野にも波及する新たな知見を提供する学術的に価値が高い研究である。またこれらの分野に有機化学が大きく貢献できることを示す重要な結果である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 24 年 1 月 17 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。

要旨公開可能日： 年 月 日以降