The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	制癌剤ブレオマイシンによるDNAの分子認識機構に関する分光学的研究
Author(s)	廣明, 秀一
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3087920
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【4】

氏　　名	廣　明　秀　一（ひろ　あき　ひで　かず）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬学）
学位記番号	第　10232　号
学位授与年月日	平成4年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科　薬品化学専攻
学位論文名	**制癌剤ブレオマイシンによるDNAの分子認識機構に関する分光学的研究**
論文審査委員	(主査) 教授　今西　武 (副査) 教授　大森　秀信　　教授　岩田　宙造　　教授　冨田　研一

論文内容の要旨

ブレオマイシン（BLM）は，放線菌 *Streptomyces verticillus* の産生する分子量約1500の糖ペプチドで，制癌剤として広く臨床に用いられている。BLMの抗腫瘍活性は細胞内のDNA二重鎖を切断することによって発現される。BLMは分子内に二つの機能領域，すなわち，（1）Fe^{2+}などの遷移金属イオンを配位して溶存酸素を活性化する『配位子領域』と，（2）ビチアゾール～末端アミン残基領域の『DNA結合領域』を有している。BLMはDNAのグアニン－ピリミジン配列を選択的に切断するため，塩基配列を認識する何らかの分子認識機構がその分子内に備わっていると考えられてきたが，詳細はいまだに明らかにされていない。

筆者は化学的に合成したオリゴヌクレオチドを基質として用いて，水溶液中でBLMとDNAの相互作用をNMRにより直接観測することにより，BLMによるDNAの分子認識機構を明らかにすることを試みた。

筆者はBLMの切断配列であるG－ピリミジン配列をストランド内にただ一カ所有する自己相補的なDNA 12量体 d（CCCCAGCTGGGG）（以下GC-12 と略す）のプロトンおよびリンのシグナルをNMRで観測しながら，DNAに特異的に結合（bind）するが切断反応を起こさない『不活性なBLM誘導体』BLM－Ni^{2+}あるいはBLM－VO^{3+}で滴定して，その結合の際に生じるDNA側の変化を調べた。GC-12のG 6 pC 7部位をAT塩基対に置換したDNA 12量体d（CCCCAATTGGGG）（AT-12）を対照として用いた，蛍光および円二色性スペクトルによる実験からは，BLMがGC-12 の G 6 pC 7部位に結合していることと，その結合定数が$4.0\times10^{5}M^{-1}$であることが明らかになった。しかし，NMRによる滴定実験では，GC-12 のイミノプロトン，非交換性プロトンおよびリンの化学シフトにＢＬＭの結合に伴う

顕著な変化は観測されなかった。これらの化学シフトは薬物のDNAへのインターカレーションによって大きく変化することが知られている。従って，これらの結果はBLMをインターカレーターとする従来説では説明できない。

ついで，筆者はBLMの切断配列をGpT配列とした自己相補的なDNA 12量体 d（CCACCTAGGTGG）（GT-12）について，BLM－VO^{3+}を用いて前述と同様の滴定実験を行い，またBLM －VO^{3+}のプロトンをNMRで観測しながらGT-12で滴定実験を行いDNA結合の際に生じる薬剤側の変化も明らかにした。さらに，BLM・GT-12 複合体（1：1）を2次元NMRで測定し解析することで，大部分のプロトンシグナルの複合体形成に伴う化学シフト変化を明らかにした。その結果，（1）DNA側の変化はT10 の N3H とG12 の N1H にのみ顕著であること，（2）BLM結合に伴うDNAの立体構造変化はほとんどなく，塩基対間の重なりも連続性を保っていること，（3）BLM側の化学シフト変化はDNAのそれより大きく，ビチアゾール残基および末端のδ－アミノブチルグアニジニウム残基（G 残基）高磁場シフトが集中していること，（4）BLMのスレオニン残基およびメチル吉草酸残基に中程度の変化がみられたことの4点が明らかになった。これらの結果はBLMがDNAのマイナーグルーブに巻きつくように結合していることを示唆する。とりわけDNAのT10N3HとBLMのG残基のδ－NHシグナルの大きな変化は，G-δNHとDNAのT10C20（カルボニル酸素）の間に水素結合が生じたことを示唆している。

以上の結果に基づいて，筆者はBLMが二組の水素結合，すなわち（1）ビチアゾール環の N3／N3'とグアニン塩基の2位アミノ基との間の水素結合でG塩基を，（2）G 残基のδNHとピリミジンの2位酸素との間の水素結合でピリミジン塩基を，それぞれ認識しているという機構を提案した。またBLMのG残基の正電荷がDNAのリン酸の負電荷と静電的相互作用をしていて，BLMはスレオニン～メチル吉草酸の部位で折れ曲がり構造をとることにより，『配位子領域』が実際にプロトンの引き抜き反応が起こるピリミジン H4'近傍にくるという機構を提案した。筆者はコンピューターグラフィックを用いて3次元分子モデルを作成し，上記の機構が立体化学的に矛盾のないかどうか検討した。その結果，BLMは立体的に無理なくDNAのマイナーグルーブに結合可能なことが示唆された。また，この立体モデルは筆者が観測した実験結果のみならず，GpC およびGpT の両方の配列を効率よく切断するというBLMの塩基選択性等，従来から知られているBLMの種々の化学的な性質をも矛盾なく説明できることが明らかになった。

さらに，筆者はNMRおよび計算化学の手法によって，溶液中のDNAの詳細な立体構造を解明するというアプローチを用いて，上記の分子認識機構の検証を試みた。自己相補的なDNA 12量体 d（GGGGAGCTCCCC）（GA-12）は，分子5'側にプリン塩基，3'側にピリミジン塩基が連続する特徴的な配列であり，BLMの切断部位である G6pC7部位よりも本来なら切断を受けにくい G4pA5部位でよく切断される。2次元NMRから得られるプロトン間距離および二面角の情報に基づいた束縛分子動力学計算により，GA-12 はその分子中央のポリプリン－ポリピリミジン接合部で，二重らせんが巻き戻された構造をとることが示された。そのため，G6pC7部位のマイナーグルーブが歪み狭くなり，BLMが結合できないことが示唆された。一方，G4pA5部位では A5の3位窒素原子が通常のB型DNAよ

りも外側に向いていることが明らかになった。アデニンの3位窒素原子は薬物との水素結合のプロトン受容体として機能することが知られている。従って，GA-12のG4pA5部位ではBLMは A5N 3を水素結合により認識して結合し，切断するものと考えられる。このように，筆者の提案したBLM－DNAの分子認識機構は塩基配列に依存して局所的に歪んだ構造のDNAにおいても，その切断性を説明できる。これにより筆者の作成したモデルが正しいことが検証された。

論文審査の結果の要旨

ブレオマイシンは放線菌が産生する糖ペプチド系化合物で，DNAを切断することにより制癌活性を示す薬物として知られており，広く臨床に用いられている。

本論文では，ブレオマイシンがどのようにしてDNAの特定部位を認識して切断するかを明らかにするため，分光学的（特にNMR）手法を利用して溶液中でのブレオマイシンと合成DNAオリゴマーとの相互作用を調べている。そのためにまず，相互作用はするがDNAを切断しない「不活性なブレオマイシン」モデル系を確立している。次いで，合目的的に合成したDNAオリゴマーとの溶液中の相互作用をCDスペクトル，NMRスペクトルを高度に活用して検討した。その結果，本薬物はDNAのマイナーグルーブ（狭い溝）に沿って相互作用し，水素結合を介して特定のDNA配列を認識していることを明らかにしている。更に，その結論の妥当性を束縛分子動力学計算などを駆使して検証にも成功している。

この業績はこれまで不明確であったブレオマイシンによるDNA結合様式ならびにG塩基認識機構を実験的裏付けの下に明確にしたものであり，博士（薬学）の学位請求論文として，十分価値あるものと認められる。