The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies on recognition by a minor groove-binding drug and mechanism of alkali degradation of the (6-4) photoproduct
Author(s)	橋本, 安希
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49615
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【81】

氏　　名	橋本（稲瀬）安　希（はしもと いなせ あ き）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２３０３０　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 基礎工学研究科物質創成専攻
学　位　論　文　名	Studies on recognition by a minor groove-binding drug and mechanism of alkali degradation of the (6-4) photoproduct （(6-4) フォトプロダクトの副溝結合性薬物による認識とアルカリ加水分解の機構に関する研究）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　岩井　成憲 （副査） 教　授　北山　辰樹　　教　授　宮坂　　博

論　文　内　容　の　要　旨

紫外線損傷を修復するために人間にはヌクレオチド除去修復 (NER) という機構が存在している。色素性乾皮症 (XP) に代表されるヒト遺伝子疾患ではこの機構が正常に機能しないため損傷を修復できず、高頻度に皮膚がんを発症することが報告されている。もし紫外線損傷をもう一つの修復機構である塩基除去修復 (BER) の経路にのせることが出来れば、NER機構が欠損しているXPの患者でも、完全な損傷の修復が可能となる。そのためにはｉ）紫外線損傷を特異的に認識する化合物を見つける、ii）見つけた化合物に紫外線損傷部位を分解させる機能をもたせる、ということが必要になる。本論文は紫外線損傷の中でも変異原性の高いpyrimidine (6–4) pyrimidone photoproduct ((6–4) photoproduct) を研究対象とし、ｉ)、ii）の基礎研究として副溝結合性薬物による認識及びアルカリ加水分解の機構について記述したものである。

第一章では、DNA損傷および修復機構、またその欠損に関わる疾患についてまとめるとともに、本研究の背景及びその目的について述べる。

第二章ではｉ)の基礎研究として (6–4) photoproductを有するDNAと副溝結合性薬物であるdistamycin A による認識について述べる。Distamycin AはDNAのAT-richな配列を認識し、van der Waals contactsや水素結合により副溝に結合することが知られている。Circular dichroism (CD) による解析から (6–4) photoproductを有するDNAに対しても、その塩基部位の化学構造の変化に関わらずdistamycin Aの結合が顕著に観測された。得られたCDスペクトルを元に330 nmでの楕円率の変化をプロットし、カーブフィッティングにより結合のパラメータを算出した結果、損傷を有するDNAには少なくとも二分子のdistamycin Aが結合していることが示唆された。結合のモル比を明らかにするためにCD差スペクトルにより比較検討した。その結果、損傷のないDNAではdistamycin Aが1:1で結合するのに対し、(6–4) photoproductを有するDNAではdistamycin Aが2:1で結合することを明らかにした

第三章ではdistamycin Aによる(6–4) photoproductを有するDNAの認識機構を解明するために、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いた解析について述べる。この方法はDNAに二種類の蛍光色素を導入し、色素間のエネルギー移動を蛍光強度により定量して距離の情報を得ることで、DNAの構造変化を観測するものである。FRETの結果からはdistamycin Aの結合によってDNAは構造変化を起こさないことがわかり、ゲル電気泳動の結果もこれを支持した。

第四章ではdistamycin Aによる様々なDNA損傷を有するDNAに対する認識について述べる。Distamycin A とDNA損傷 (Thymine glycol やAP site) を有するDNAとの結合の解析がsurface plasmon resonance (SPR) によって調べられ、(6–4) photoproductだけでなくそれ以外の損傷を有するDNAにも結合することが明らかとなったが、その認識機構に対する知見が得られないままであった。そこでSPRで結合が観測された損傷を有するDNAを用いて、distamycin Aとの結合をCDを用いて詳細に行った。SPRで示されたように、distamycin Aの結合を示すスペクトル変化が観測され、そのスペクトルを元に325 nmでの楕円率の変化をプロットし、カーブフィッティングにより結合のパラメータを算出した。SPRとCDの結果をそれらの化学構造から考察したところ、塩基対の副溝側の化学構造に特徴がみられ、水素結合のacceptorと立体障害の有無が重要であることがわかった。また、(6–4) photoproductを有するDNAに対しては、その3'pyrimidoneのO2原子がacceptorとして働いていると考えられ、distamycin Aによる認識は従来のものと同様であると結論付けた。

第五章ではii)の基礎研究として (6–4) photoproductのアルカリ加水分解の機構に関して述べる。(6–4) photoproductはアルカリに不安定で熱アルカリ処理により鎖切断が生じることが知られている。(6–4) photoproductを有する4 merのオリゴヌクレオチドをアルカリ下で穏やかに加熱することで中間体が得られることがわかった。このことから (6–4) photoproductは5'pyrimidine側から加水分解を受けて変化していくと思われた。鎖切断はこの中間体から少なくとももう一段階を経て生じると考えられたので、その中間体を同定し、分解機構を解明することにした。その中間体を得るためには鎖切断が生じる前で反応を止める必要があるため、リン酸ジエステルのかわりにホルムアセタールリンカーを持つ (6–4) photoproduct analog を合成した。(6–4) analogを熱アルカリ処理したところ、予想に反して3'pyrimidone側のグリコシド結合が切断されて生じたと考えられる塩基部位の断片がHPLCで確認された。そこで (6–4) photoproductの3'pyrimidoneに類似した5-methylpyrimidin-2-one 2'-deoxyribonucleoside (5M2P) を用いて、同じ条件下でグリコシド結合の切断を調べたところ、5M2Pの水和物とその異性体の他にグリコシド結合が切断されて生じた塩基部位の水和物とその異性体と思われるピークが観測された。このことから (6–4) photoproductのアルカリ加水分解は5'pyrimidine側の分解を経由するのではなく、3'pyrimidoneのグリコシド結合切断が鎖切断の引き金となると考えられた。グリコシド結合の切断はAP siteが形成させることを意味し、AP siteではβ-eliminationにより3'-リン酸ジエステル結合が開裂する。AP siteを経由して分解していることを証明するためにdGT(6–4)TC 4merを熱アルカリ処理し、dCMPが生成することを示した。5M2Pのアルカリ加水分解による生成物のLC-MASSによる同定と、それを基にして考えられる (6–4) photoproductの加水分解機構について報告する。

論文審査の結果の要旨

申請者は紫外線によるDNA損傷の細胞内での人工修復法の開発を目指す研究の一環として、(6-4) フォトプロダクトを有するDNAに対するディスタマイシンＡの結合の解析と、この損傷DNAのアルカリ分解反応機構の解明を行った。

紫外線によりDNA中に(6-4) フォトプロダクトとCPDと呼ばれる２種類の損傷が生じるが、申請者はまずこれらの損傷を有するDNAを化学合成し、円二色性スペクトルの測定によりディスタマイシンＡの紫外線損傷DNAに対する結合を調べた。その結果、この薬物はCPDを有するDNAに結合しなかったのに対し、(6-4) フォトプロダクトには明らかな結合性を示すことを発見した。また、本来の結合配列に対しては１：１の結合が起こるのに対し、(6-4) フォトプロダクトを有するDNAには２分子が同時に結合することを明らかにした。次に、他の損傷や修飾を有するDNAに対するディスタマイシンＡの結合を調べ、この薬物はいくつかの種類のDNAに結合するがいずれの場合も副溝の化学構造を認識して１：１で結合するという結論を得た。鎖状あるいは環状に２分子のディスタマイシンＡを連結した化合物を用いた実験は成功しなかったが、そのような２量体型分子の設計が特異的結合を得るために有効である可能性が示唆された。

一方、(6-4) フォトプロダクトはアルカリ性条件下でDNA中に鎖切断を起こす。このときの最初の反応は損傷塩基の5′側成分のN3-C4間での加水分解であることが知られていたが、申請者はそれに続く反応を解析し、3′側ピリミドン環の5, 6位が水和されてそのグリコシド結合が切断されることを明らかにした。グリコシド結合が切断されるとβ脱離による鎖切断が起こるため、これで紫外線損傷DNAのアルカリ分解の全容が解明されたことになる。

本研究は(6-4) フォトプロダクトという重要な紫外線損傷塩基を人工的に認識させる分子を設計するための重要な指針を与え、また、本研究によりこの損傷を有するDNAのアルカリ分解の機構が解明された。よって、博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。