

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	橋本 (稲瀬) 安 希
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確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。