



Title	3,4-エポキシピペリジン骨格を基盤とするDNAアルキル化分子に関する生物有機化学的研究
Author(s)	河田, 裕治
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58563
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

【16】	
氏 名	かわ だ ゆう し 河 田 裕 治
博士の専攻分野の名称	博 士（薬 学）
学 位 記 番 号	第 2 4 5 2 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 23 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	3,4-エポキシペリジン骨格を基盤とするDNAアルキル化分子に関する 生物有機化学的研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小比賀 聡 (副査) 教 授 小林 資正 教 授 藤岡 弘道 教 授 田中 徹明

論 文 内 容 の 要 旨

我々の研究室ではかつて抗腫瘍性天然有機化合物azinomycin類の活性中心部位である4-ヒドロキシ-1-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン骨格を基に、新規DNAアルキル化分子として3,4-エポキシペリジン骨格を設計した。そしてこの考えに基づきエポキシペリジン類縁体を合成し、そのDNAアルキル化活性を評価したところ期待通りエポキシペリジン類に顕著なDNA切断活性を見出した。この結果よりエポキシペリジン類は従来にないDNAアルキル化分子として、抗がん医薬品への発展が期待される。そこで著者はエポキシペリジン類のDNAアルキル化分子としての詳細な活性発現機構の解明、及びその活性を活かした機能性DNAアルキル化分子の開発を目的とした生物有機化学的研究に着手した。

著者はまずエポキシペリジン類の構造活性相関の解明、高活性化化合物の探索を目的としたエポキシペリジンライブラリーの構築を試みた。多数の化合物を効率良く合成する手段として著

上記の計画に基づき著者はHuisgen反応に適応可能なアジド基を導入したエポキシビペリジン類縁体を合成し、種々のアルキン分子とのHuisgen反応を行った。アルキン分子と、アジド体のHuisgen反応を行ったところ、首尾よく反応は進行し目的とするトリアゾール体が得られた。また続く脱Teoc化も迅速に進行し目的とするエポキシビペリジンライブラリーの構築に成功した。

合成したライブラリー分子の活性を、プラスミドDNAを用いたDNA切断試験にて評価したところ、期待通り導入した置換基により活性が変化することが明らかとなった。特に芳香環を導入した化合物は活性の変化が顕著であり、これは期待通り芳香環がインターカレーターとして働いた結果と考えられる。合成したライブラリー分子の中ではナフタレン環を導入した化合物が最も高活性であり、従来我々の研究室で報告してきたエポキシビペリジン類縁体よりも数倍高活性であることが明らかとなった。このように著者はHuisgen反応を用いることで簡便にエポキシビペリジンライブラリーを構築し、そしてその中から従来報告してきた化合物よりも高活性な化合物を見出すことに成功した。

次に著者はエポキシビペリジン骨格を用いた光応答性DNAアルキル化分子の開発に着手した。ライブラリー分子の中からフェニルトリアゾリル基を有する化合物を選び、このものに四種類の光感受性保護基を導入した。得られた四種類の化合物をUV照射条件下におけるDNA切断活性及び、細胞毒性を評価したところ、期待通りこれらの化合物はUV非照射時には活性を示さなかった。またこの四種類の化合物は導入した保護基の感受性に依存し、UV照射に対して異なる挙動を示した。特に α -メチル-2-ニトロベンジル基を導入した化合物は、短時間のUV照射で効率良くDNA切断活性、細胞毒性を発現しており、ケージドDNAアルキル化分子として非常に有望であると考えられる。

さらに、著者はエポキシビペリジン骨格を用いた配列選択的DNAアルキル化分子の開発を行った。特定の配列を認識し特異的にアルキル化することが可能になれば、変異したがん細胞の遺伝子だけを認識し、正常細胞に負荷をかけない理想的な抗がん剤の開発につながると考えられる。

配列選択的DNAアルキル化分子の開発を目的とし、エポキシビペリジン類のDNA作用部位の解明を計画した。そこでオリゴヌクレオチドを用いたDNA切断実験を行いその分解生成物を解析することで、エポキシビペリジン類のDNA切断位置の解明を試みた。36-merの二重鎖DNAを、フェニルトリアゾリル基を有するエポキシビペリジン類縁体で処理し、その分解生成物をHPLCにて分取、MALDI-TOF-MSにより分子量の測定を行った。結果、得られた分解生成物はオリゴヌクレオチドのGの位置で切断された5'側、3'側断片であることが明らかとなった。またポリA配列、ポリT配列に対し同様の処理を行った時は分解生成物が生じなかったことから、エポキシビペリジン類はDNA中のGに対して作用しているということが示された。このような挙動は一般的なDNAアルキル化剤の作用と一致しており、この結果は我々の期待通りエポキシビペリジン類がDNAアルキル化分子として働くことを強く支持する結果である。

エポキシビペリジン類がDNA中のGに作用している事が確認できたため、次にこの知見を活かし配列中の特定のGを認識させるためエポキシビペリジン骨格とオリゴヌクレオチドのコンジュゲートを行った。両者のライゲーションは、ライブラリー構築と同様Huisgen反応を用いることとした。5'末端にアルキンを導入したオリゴヌクレオチドを調製し、このものとアジド基を有するエポキシビペリジン類縁体のHuisgen反応を行った。反応の進行をHPLCにて確認したところ、10分程度の短時間で原料のオリゴヌクレオチドが消失し、新たなピークが出現した。生成物を分取しMALDI-TOF-MSにより分子量を測定したところ、目的物であるエポキシビペリジン-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの分子量の理論値と良い一致を示した。得られたコンジュゲートを用いてターゲット配列のアルキル化の検討を行った。リン酸緩衝生理食塩水中でコンジュゲートとターゲット配列を37°C下、24時間インキュベートし反応物をHPLCで分析し生成物を確認したところ、新たに三つの生成物が検出された。分子量測定の結果から二つのピークはターゲット配列中の5'側から17番目のGの位置で切断された5'側、3'側断片である事が明らかとなった。ターゲット配列に由来する生成物はこの二つの生成物だけであったことから、エポキシビペリジン-オリゴ

ヌクレオチドコンジュゲートはターゲット配列中の特定のGを厳密に認識している事が示された。また残るもう一つの生成物はコンジュゲートのエポキシビペリジン骨格にグアニンが付加した生成物であることが確かめられた。これはエポキシビペリジン類がDNAアルキル化分子として働くという確固たる証拠であるといえる。

以上のように、著者は3,4-エポキシビペリジン類縁体を用いた生物有機化学的研究を行い3,4-エポキシビペリジン類がDNAアルキル化分子として多岐にわたる応用が可能な優れた分子種であることを見出した。

論文審査の結果の要旨

河田裕治君は、抗腫瘍性天然有機化合物azinomycin類の活性中心部位である4-ヒドロキシ-1-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン骨格に着目し、その等価体と考えられる3,4-エポキシビペリジン類を新規なDNAアルキル化分子、すなわち抗がん医薬品候補化合物としてとらえ、その生物有機化学的研究を実践した。その結果、以下のような研究成果を得た。

- 1) アジド基を有するエポキシビペリジン類縁体を合成し、種々のアルキン分子との Huisgen 反応により簡便に多数のエポキシビペリジンライブラリーを構築することに成功した。
- 2) 合成したライブラリー分子の DNA 切断活性を評価し、ナフタレン環を有する化合物に優れた活性がある事を見出した。
- 3) 活性が見られたエポキシビペリジン類に光感受性保護基を導入し、短時間の UV 照射でも十分な DNA 切断活性並びに細胞障害性を発現できる優れたケージド DNA アルキル化分子を創製した。
- 4) 二重鎖オリゴヌクレオチドと合成したエポキシビペリジン類との反応を精査し、エポキシビペリジン類が DNA 中の G に作用していることを明らかにした。
- 5) Huisgen 反応を用いてエポキシビペリジン-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの合成を行い、相補鎖配列の特定の塩基だけをアルキル化することに成功した。

以上の研究成果は、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。