

カテコールの制癌作用とデオキシリボ核酸に対する反応

村上, 浩紀
九州大学農学部食糧化学教室

山藤, 一雄
九州大学農学部食糧化学教室

<https://doi.org/10.15017/23025>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 24 (1), pp.13-17, 1969-02. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

カテコールの制癌作用とデオキシリボ核酸に対する反応

村上 浩紀・山藤 一雄

Antitumor activity of catechol and its reaction with deoxyribonucleic acid

Hiroki Murakami and Kazuo Yamafuji

前報において著者ら⁶⁾は可溶性リグニンが制癌作用を有することを発見し、さらに関連するフェノール類について同じくそれらの抗腫瘍性を試験した。⁷⁾ これらの物質の中で特にピロカテコールに関してその効果の機作を明らかにするために著者らのウイルス研究に基づき、¹¹⁾ デオキシリボ核酸との反応について検討を加えた。

方法と材料

制癌作用の検定

生後4週のddN均一系雄マウスに sarcoma 180 を移植し、第1表に示した日程にしたがってピロカテコール-Cu²⁺ 混液を1回に0.2 ml あて投与した。この混液0.2 ml 中には1 mg のピロカテコールと0.7 mg の硫酸銅が含まれ、そのモル比は2:1である。

デオキシリボ核酸 (DNA) の調製

仔牛胸腺から Kay, Simmons⁴⁾ の方法によつて sodium dodecyl sulfate (SDS) を用いて抽出し、さらに10% 塩化カルシウムを加えて精製した。アルコールを加えて糸状に得たのち、0.15 M 塩化ナトリウム-0.015 M くえん酸ナトリウム (SSC) 溶液に溶解し、濃塩化ナトリウム溶液を添加して DNA-Ca を Na 型にしたのち緩衝液にとかして用いた。

DNA の粘度測定

Ostwald 型粘度計を用い、この粘度計の緩衝液の流下時間は31.3秒であつた。SSC 溶液に mg/ml の割合で溶解した仔牛胸腺 DNA の溶液1 ml に硫酸銅溶液0.1 ml および緩衝液2.9 ml を加え37°C で5分間保持する。1 M ピロカテコール溶液1 ml を加えて10秒後に最初の粘度測定を行なう。

アプリン酸の調製

仔牛胸腺 DNA から Chargaff ら⁹⁾ の方法によつて調製した。このアプリン酸中にはプリン塩基は殆んど存在しないことをペーパークロマトグラフィーによ

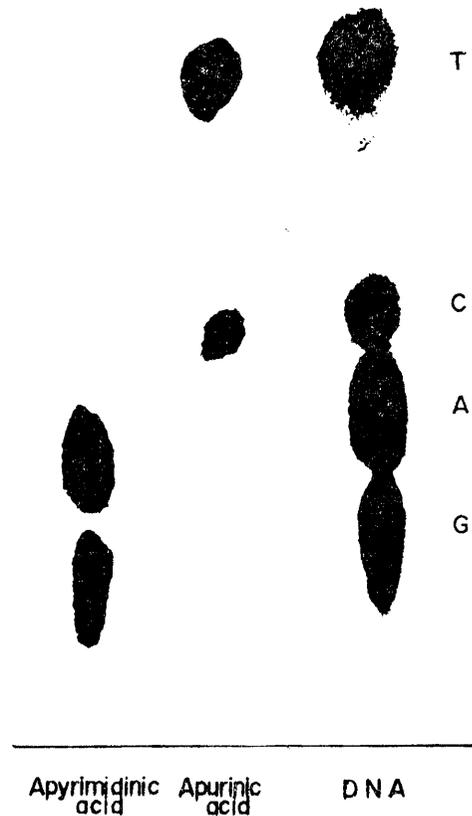


Fig. 1. Paper chromatogram of apurinic and apyrimidinic acids.

つて確かめた (Fig. 1)。

アピリミジン酸の調製

仔牛胸腺 DNA から Takemura⁹⁾ の方法を改変して調製した。すなわち、原報によれば600 mg の DNA を2.8 ml の無水ヒドラジンと60°C、60分保温することによりピリミジン塩基を選択的に除去したが、このアピリミジン酸中にはシトシンは殆んど残っていない

がチミンは約15%が残存していたので、著者らはこの条件を改良してヒドラジンの量を3倍に増加し、保温時間を120分に延長した。その結果得られたペーパークロマトグラム中にはピリミジン塩基は認められなかった (Fig. 1)。

ゲル口過

3.5 cm×27 cm のカラムに Sephadex G-25 を充填して用いた。G-50, G-75 も場合によりあわせ用いた。

吸収スペクトルの測定

日立マルチパーパス 自記分光光度計 MPS-50 L を使用した。1 cm のセルを用い、作動条件は λ_{speed} 3 分, Range A : 0.1, Response : 1, PM : 500 PbS で

ある。

実 験 結 果

1. ピロカテコール-Cu²⁺ 混液の制癌作用

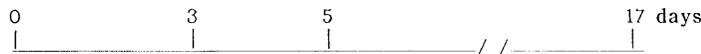
ピロカテコール-Cu²⁺ 混液の投与の結果を第1表に示す。(a)の場合は sarcoma 180 移植後3日目に第1回の投与を行ない、5日目に第2回の計2回の投与であるにもかかわらず、顕著な抑制を示している。また(b)の場合のように移植後第1日目から計3回投与した場合にはその効果は著しく大である。この混液の投与によつては被験群と対照群との体重差は殆んどなく、解剖所見も正常の場合のそれと変化がない。

Table 1. Antitumor activity of pyrocatechol-Cu²⁺ mixtures on sarcoma 180.

(a)

Mouse number	Test		Control	
	Body weight (g)	Tumor weight (g)	Body weight (g)	Tumor weight (g)
1	25.0	2.7	28.5	7.6
2	32.0	2.5	32.0	5.6
3	30.0	2.1	29.0	4.3
4	27.0	0.4	24.0	4.2
5	28.0	0.2	33.0	3.1
6	25.0	0.2	33.0	2.8
7	25.0	0.2	28.5	2.0
8	23.0	0.1	24.0	1.1
9			23.5	1.1
Average		1.05		3.53

Schedule of injection



Tumor

transplantation 1st injection 2nd injection killed

(b)

Mouse number	Test		Control	
	Body weight (g)	Tumor weight (g)	Body weight (g)	Tumor weight (g)
1	23.0	1.0	32.0	5.6
2	28.0	0.9	32.0	5.5
3	26.5	0.9	25.5	2.5
4	22.5	0.8	29.0	2.0
5	21.5	0.3	30.0	1.9
6	18.0	0.2	27.0	1.5
7	23.0	0.1	28.0	1.2
8	28.5	trace	24.0	1.0
9	22.0	trace	23.0	0.8
10	22.0	0		
Average		0.42		2.44

Schedule of injection



Tumor

transplantation 1st injection 2nd injection 3rd injection killed

2. ピロカテコール-Cu²⁺ 混液の DNA 溶液の粘度低下作用

適当な濃度のピロカテコールと硫酸銅の混液は DNA の粘度を低下させることが知られた。すなわち 0.2 M ピロカテコールと 10⁻³M Cu²⁺ が共存するとき、その低下速度が最も著しい。Cu²⁺ 濃度が 10⁻²M になるとその低下速度はおさえられる (Fig. 2)。

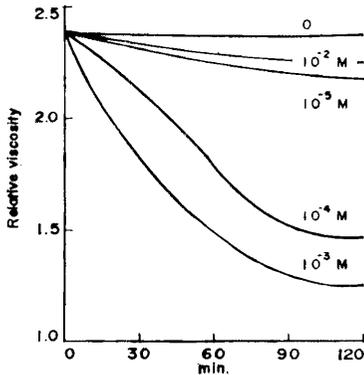


Fig. 2. Effect of various Cu²⁺ concentrations on the relative viscosity of calf thymus DNA and pyrocatechol mixture.

処理した DNA の融解曲線 (Fig. 3) をしらべると Cu²⁺ 濃度が 10⁻³M 以下の場合には正常の二本鎖 DNA のそれと差はないが、10⁻²M の Cu²⁺ で処理した場合には明らかに融解点 (T_m) が低下し、hyperchromicity の度合も少ない。

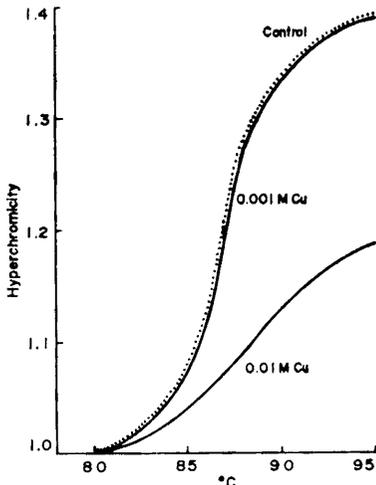


Fig. 3. T_m curves of DNA's treated with pyrocatechol-Cu²⁺ mixture.

粘度低下作用は中性においても著しいが、水素イオン濃度それ自体によつては DNA 溶液の粘度が影響をうけないような弱酸あるいは弱アルカリ側においてはさらに顕著である (Fig. 4)。

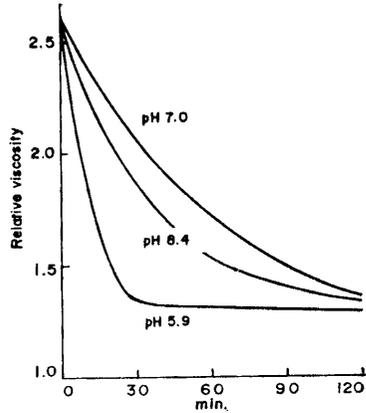


Fig. 4. Effect of pH's on the relative viscosity of the DNA and pyrocatechol-Cu²⁺ mixture.

3. アプリン酸とピロカテコール-Cu²⁺ 混液の反応

アプリン酸 10 mg を 5 ml の蒸留水に溶解し、137.5 mg のピロカテコールを 5×10⁻³M 硫酸銅溶液 2.5 ml に溶解した液を加え、M/100 リン酸緩衝液 2.5 ml で pH 5.2 に調節する。これを 37°C、24 時間反応させる。反応終了後、Sephadex G-25 で蒸留水を用いてゲルろ過を行なうことにより着色したアプリン酸を未反応のピロカテコールおよび硫酸銅などから分離する。この着色物は Sephadex G-75 で処理してもアプリン酸から分離しない。このようにして得られた着色アプリン酸をさらに冷所で蒸留水に透析して混在する低分子物質の除去を完全にする。

アプリン酸は可視部に吸収を示さないが、上記反応を行なつたアプリン酸は 530 mμ に極大値をもつ比較的鋭どくない吸収スペクトルを示す (Fig. 5)。また紫外部においてはその領域全体にわたつて吸光度が増加する。

同様の反応をアピリミジン酸について行なつても 530 mμ 付近における特異的吸収は認められない。

考 察

マウスを用いての制癌実験はピロカテコール-Cu²⁺ 混液が顕著な作用を持つていることを示している。さらにピロカテコール単独の場合よりも強い効果が見られることから、ピロカテコールの酸化現象の促進が癌

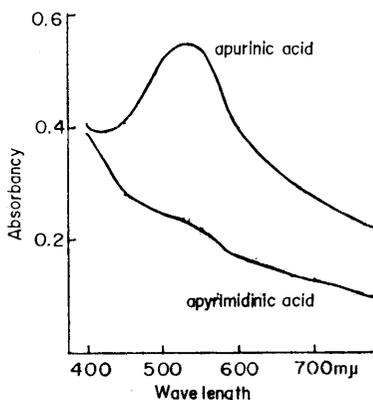


Fig. 5. Absorption spectrum of apurinic acid treated with pyrocatechol- Cu^{2+} mixtures.

細胞の増殖抑制にたいして意義をもっていると考えられる。

現在知られている制癌物質のうちマスタードガスあるいはマイトマイシンなどのアルキル化剤は DNA 中の塩基と結合して、その二本鎖間に架橋し、あるいは塩基をデオキシリボースから離脱させ、それによつてポリヌクレオチド鎖の切断をひきおこす。そしてこれらの薬剤が作用する塩基は主としてグアニンであることが知られている。

ピロカテコール- Cu^{2+} 混液は中性においても DNA 溶液の粘度を低下させる。DNA 溶液の粘性が大幅に低下する現象は DNA の二本鎖間の塩基対によつて形成されている水素結合の破壊による場合と DNA 鎖を切断することによる時との両者が考えられる。この混液による DNA 溶液の粘度低下の機構が後者にもとづくものであることは、処理した DNA 溶液の T_m 曲線が正常 DNA のそれと変異していないこと、および一本鎖のみに作用するホルムアルデヒドとは反応しないことから明らかである。

Bendich ら¹⁾ および Lesko ら⁵⁾ は彼等の DNA 標品中のアミノ酸の存在、アルカリ、ヒドロキシルアミンおよび蛋白分解酵素の DNA に対する影響などの研究から DNA 中の遺伝子単位の仕切りとしてのオリゴペプチド鎖の存在を主張した。しかし DNA フェージの試験管内酵素的合成法²⁾ および各動物中におけるポリシストロニックメッセンジャー RNA の存在¹⁰⁾ が明らかにされるつれて DNA 鎖はヌクレオチドのみによつて構成されていると考えられるようになっていく。このことを考慮するとピロカテコール- Cu^{2+} 混液は DNA 中リン酸エステル結合を切断するとするの

妥当である。

さらに、この混液は pH 5.2 において DNA と反応させるとき、ピロカテコールの酸化生成物がアプリンに選択的に結合し、アピリミジン酸とは結合しない。これは酸化物がプリン塩基よりもピリミジン塩基と作用することを示すものであり、この点で従来の制癌剤の DNA との反応様式と異なっている。なお、この反応はピリミジンモノヌクレオチドには起こらないことが電気泳動的に示されている。

DNA 中にはピリミジンヌクレオチドが連続して存在する部分があることが知られており、³⁾ これらの事実からピロカテコール- Cu^{2+} 混液は DNA 中のピリミジンオリゴヌクレオチド部分を切断することが推定される。この混液による癌細胞 DNA の切断あるいは酸化物との結合が染色体の総一的機能をかく乱し、癌細胞の増殖をおさえると考えられる。

要 約

癌現象には染色体の異常が関与するという想定のもとに制癌作用を示すピロカテコールを用いて DNA との反応性について検討した。ピロカテコールは Cu^{2+} と共存するときその抗腫瘍性を著しく増進し、中性付近において DNA の二本鎖を一定単位鎖長に切断する。さらに pH 5.2 においてこの混液から生成するピロカテコールの酸化物がアプリン酸に特異的に親和性をもつことから、DNA の切断部はピリミジン塩基が連続して存在する部分であることが示唆される。

文 献

- 1) Bendich, A., E. Borenfreund, G. C. Korngold, M. Krim, and M. E. Bales (1964): *Acid nucleic loro funzione biologica Istituto Lombardo: Fondazione Baselli* 214.
- 2) Goulian, M., A. Kornberg, and R. L. Sinsheimer (1967): *Proc. N. A. S.*, **58**, 231.
- 3) Habermann, V. (1963): *Biochim. Biophys. Acta.* **76**, 310.
- 4) Kay, E. R. M., N. S. Simmons, and A. L. Dounce (1952): *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 174.
- 5) Lesko, S. A., and A. J. Emery, Jr. (1966): *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **23**, 707.
- 6) 村上浩紀・山藤一雄 (1968): *九大農芸学誌* **23**, 103.
- 7) 村上浩紀・山藤一雄 (1968): *九大農芸学誌* **24**, 19.
- 8) Takemura, S. (1959): *Bull. Chem. Soc. Japan*, **32**, 920.
- 9) Tamm, C., H. Shapiro, and E. Chargaff (1952): *J. Biol. Chem.*, **199**, 313.

-
- 10) Vaughan, M. II., J. R. Warner, and J. E. Darnell (1967) : J. Mol. Biol., **25**, 235. Virus Formation; Crosby Lockwood London, 1964.
- 11) Yamafuji, K. : Nutritional Factors in

Summary

We investigated the reaction of DNA with pyrocatechol under the assumption that chromosomal abnormalities concern with cancer phenomena. Pyrocatechol enhances its antitumor potency under co-existence with Cu^{2+} in spite of decreased administration. This result suggests that oxidative process and oxidation product of pyrocatechol have some significance to its anti-tumor function.

Mixtures of pyrocatechol and Cu-salts remarkably lowered the viscosity of DNA solution at neutral pH. That DNA treated by this mixture still maintains double stranded nature is evident from analyses of T_m curves and insensitivity to formaldehyde.

Experiments further showed that the oxidation product which is formed from catechol in the presence of Cu combines specifically with apurinic acid, but does not react with apyrimidinic acid or pyrimidin mononucleotides. So it is supposed that a certain chain-length of pyrimidin-oligonucleotides are indispensable for such reactions.

It is now assumed that the pyrocatechol- Cu^{2+} breaks some portions of pyrimidin clusters in nuclear DNA, killing thus cancer cells.