九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

新規な機能をもつ核酸結合性小分子の研究

井原，敏博
九州大学工学研究科合成化学専攻

https://doi.org/10.11501/3065524

出版情報：九州大学，1992，博士（工学），課程博士
バージョン：
権利関係：

新規な機能をもつ核酸結合性小分子の研究

井　原　敏　博

新規な機能をもつ核酸結合性小分子の研究

平成５年１月

井原 敏博

目 次

第1章　序論 1

第2章　連結鎖が金属配位能をもつビスアクリジン型化合物 16

2-1　緒言 16

2-2　1,14-ビス[9'-(6'-クロロ-2'-メトキシアクリジルアミノ)]-3,6,9,12-テトラオキシテトラデカン二塩酸塩（**1**）の合成 18

2-2-1　6-クロロ-2-メトキシ-9-フェノキシアクリジン 18

2-2-2　1,14-ジフタルイミジル-3,6,9,12-テトラオキシテトラデカン 19

2-2-3　1,14-ジアミノ-3,6,9,12-テトラオキシテトラデカン二塩酸塩 20

2-2-4　1,14-ビス[9'-(6'-クロロ-2'-メトキシアクリジルアミノ)]-3,6,9,12-テトラオキシテトラデカン二塩酸塩 21

2-2-5　まとめ 22

2-3　DNA-**1**の結合定数に及ぼす金属塩の効果 24

2-3-1　結果 25

2-3-2　考察 29

2-4　**1**共存下での金属イオンによるプラスミドDNAの切断 31

2-4-1　加水分解反応による切断 32

2-4-2　ラジカル反応による切断 35

2-4-3　考察 37

2-5　**1**の結合部位と切断部位 39

2-5-1　ビスアクリジンの結合選択性 41

2-5-2　ビスアクリジン共存下でのCu^{2+}によるDNAの切断反応 44

2-5-3　考察 46

2-6　結言 50

第3章 連結鎖が電気化学的活性をもつビスアクリジン型化合物 51

3-1　緒言 51

3-2　1-1'-ビス[3''-[9'''-(6'''-クロロ-2'''-メトキシアクリジルアミノ)]プロピル]-4,4'-ビピリジニウムブロミド二臭化水素酸塩（**2**）の合成 54

3-2-1　6-クロロ-2-メトキシ-9-フェノキシアクリジン 54

3-2-2　9-[1'-(3'-ブロモプロピルアミノ)]-6-クロロ-2-メトキシアクリジン臭化水素酸塩 54

3-2-3　1,1'-ビス(3''-アミノプロピル)-4,4'-ビピリジニウムブロミド二臭化水素酸塩 55

3-2-4　1-1'-ビス[3''-[9'''-(6'''-クロロ-2'''-メトキシアクリジルアミノ)]プロピル]-4,4'-ビピリジニウムブロミド二臭化水素酸塩 56

3-2-5　まとめ 58

3-3　DNA-2の結合平衡解析 60
3-3-1　Scatchard解析とエチジウムブロミド追い出し法 61
3-3-2　考察 67

3-4　DNA-2複合体のゲル電気泳動 72
3-4-1　結果と考察 72

3-5　2のDNAへの結合様式 78
3-5-1　粘度滴定 79
3-5-2　ゲル電気泳動を用いた滴定 81
3-5-3　考察 88

3-6　2の結合配列特異性 94
3-6-1　結果 94
3-6-2　考察 96

3-7　DNA-2複合体のゲルろ過 98
3-7-1　結果と考察 98

3-8　DNA-2複合体の電気化学的挙動 100
3-8-1　結果 100
3-8-2　考察 100

3-9　2を用いたDNAの光化学的切断 105
3-9-1　プラスミドDNAの光切断 105
3-9-2　切断機構の検討 109
3-9-3　考察 117

3-10　結言 120

第4章 電気化学活性基で修飾したオリゴヌクレオチド 122

4-1　緒言 122

4-2　合成 125
4-2-1　オリゴヌクレオチドの合成 125
4-2-2　フェロセン修飾オリゴピリミジン（5、6）の合成 129
4-2-2-a　フェロセンカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル 129
4-2-2-b　フェロセン修飾オリゴピリミジン（5） 130
4-2-2-c　フェロセン修飾オリゴピリミジン（6） 132
4-2-3　まとめ 132

4-3　フェロセン修飾オリゴピリミジンとDNAの複合体の形成 133
4-3-1　融解曲線の観察 134
4-3-2　ゲル電気泳動による複合体の観察 141
4-3-3　エチジウムブロミドの蛍光を利用した複合体形成の観察 143
4-3-4　複合体形成反応の熱力学的パラメータの算出 144
4-3-5　考察 146

4-4　フェロセン修飾オリゴピリミジンの電気化学的挙動 155
4-4-1　結果と考察 156

4-5　標的DNAの検出の感度 159
4-5-1　結果 159
4-5-2　考察 163

4-6　結言 168

第5章　結論 170

参考文献 177

付録 182
1. 仔牛胸腺DNAの精製 182
2. アガロースゲル電気泳動 182
3. pKaの決定 183
4. Scatchard解析 183
5. エチジウムブロミド追い出し法 184
6. DNAフラグメントの末端標識 185
7. DNaseIフットプリンティング 186
8. Maxam-Gilbert反応 187
9. ゲルの銀染色 188
10. DNAのトポロジー 189
11. 粘度滴定 193
12. プラスミドDNAの光切断 193
13. 光照射によるビオローゲン還元体の観察 194
14. オリゴヌクレオチドの化学合成 194
15. 変性ポリアクリルアミドゲルによる合成オリゴヌクレオチドの精製 196
16. オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション 198
17. 融解温度、T_mの測定 199
18. エチジウムブロミドを用いたオリゴヌクレオチドの滴定 200
19. DTCを用いたオリゴヌクレオチドの複合体形成の平衡解析 200
20. 融解曲線の解析による熱力学的パラメータの概算 204

謝辞

第1章　序論

分子生物学の発達は、従来の複雑な多くの事実の記載にとどまっていた生物学の見方を根本から覆し、種々の生命現象や生体の機能を分子のレベルで考えることを可能にした。このように、今まで抽象的な概念から推測していた生物体そのものをより基礎的かつ具体的に把握できるようになったために、生物体は化学者や薬学者にとっても興味深く、また比較的アプローチのしやすいテーマになってきている。また同時に、生命現象を司る多くの分子間相互作用（抗原-抗体、酵素-基質、核酸-タンパク質）の分子レベルでの解明には化学が必要不可欠なものとなってきたということが言えるかもしれない。

上記の種々の分子間相互作用のうちで、核酸（DNA）のからむ化学は遺伝情報の伝達という生体において最も重要な生命現象に関与し、非常に重要でかつ興味深い研究対象である。さらに核酸は下等動物から高等動物まであまねく存在し、その集合状態は別として、分子レベルでの部分構造は不変であるという点でこの研究の持つ意味は大きい。またある種のDNAに起こる変化がガンと直接に関係があると考えられており、実際、天然の抗腫瘍性薬剤はDNAとの特異的結合、及び切断によってその薬理活性を発現していることがわかっている。従って、この相互作用の解明は、抗腫瘍性薬剤の開発を考えたときにも欠くことのできない研究分野である。

DNAと薬物の相互作用は、分子受容体としてのDNAの独特な分子構造によるところが大きい。DNAは、1953年、WatsonとCrickによりその構造が明かにされた[1]。いわゆるDNAの二重らせんモデ

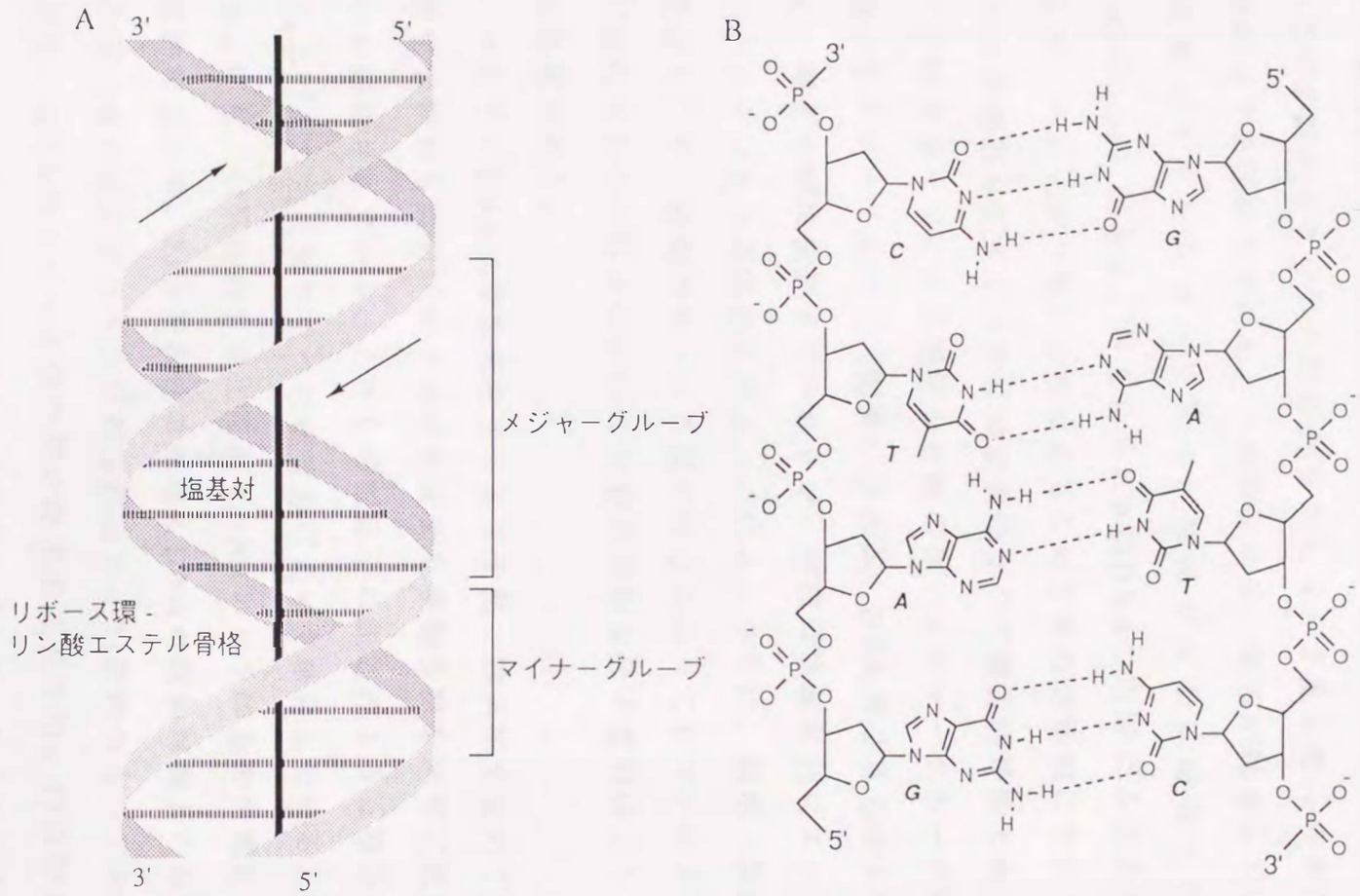
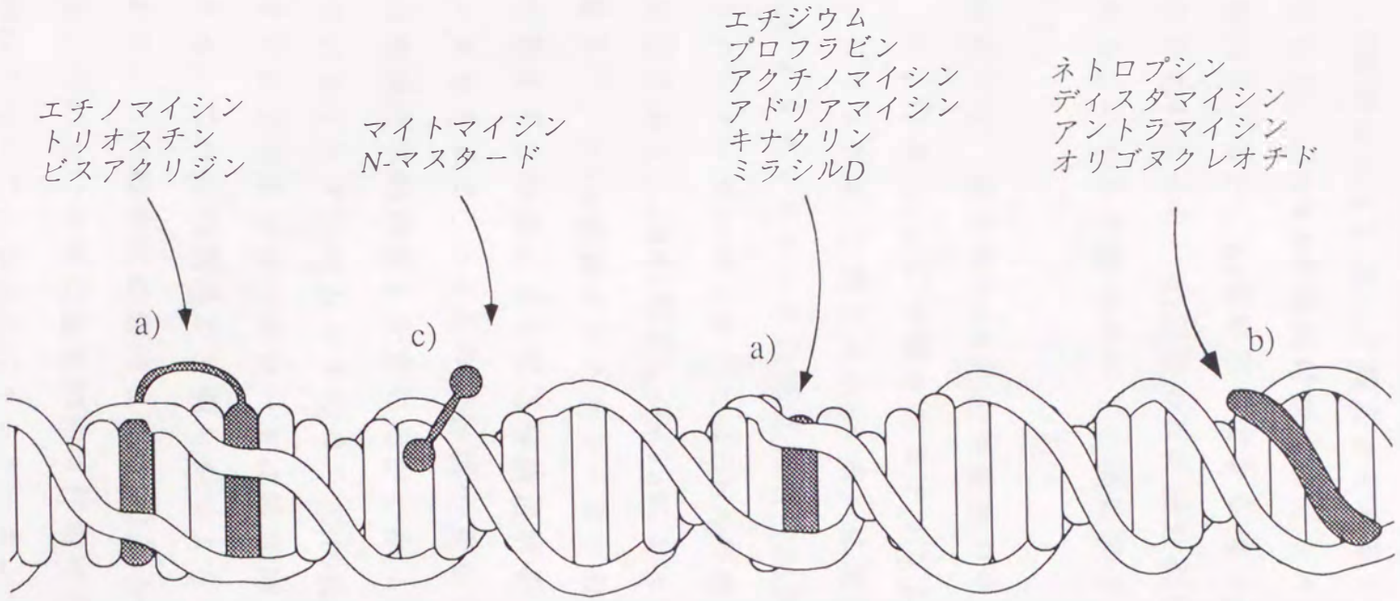


図1-1　DNA二重らせんの模式図（A）とその化学構造（B）

ルである（図1-1）。DNAを構成している4つの塩基、A（アデニン）、G（グアニン）、T（チミン）、C（シトシン）のうちAとT、GとCが水素結合を介した塩基対をつくり、2重らせんの中央部に疎水的コアを形成している。その外側には、塩基が結合している5員環糖デオキシリボースとリン酸基が交互に結合した骨格（backbone）がある。さらに特にB型DNAで明瞭にみることができるが、グルーブ（溝）と呼ばれるこの2本の骨格間にできる空間もDNAの構造を記述する際には重要な1つの構造的特徴である。そしてこのグルーブには骨格間の距離の長いメジャーグルーブ(主溝)と短いマイナーグルーブ（副溝）がある。DNAの2重らせん構造は一見、剛直な棒状構造と思われるが、実際は塩基配列によってそのコンホメーションは微妙に異なっている。さらに、環境（塩濃度、温度など）や、薬物やタンパク質の接近によってもコンホメーションが変化するので我々はDNAを比較的柔軟な分子受容体としてとらえる必要がある。

これまでにDNA結合性配位子として天然、非天然を含めて低分子有機化合物から高分子のタンパク質まで多種多様な非常に数多くのものが研究されている。これらの配位子は先述のような構造を持つDNAに対して主に次の4つの結合力によって結合していると考えられる。即ち、1)薬物のもつ正電荷とDNAのリン酸基の負電荷の間の静電的相互作用。2)芳香族性の薬物とDNAの塩基対間との疎水的相互作用（またはスタッキング相互作用）。3)薬物のもつアルキル鎖などと、DNAのリボース環の間の疎水的相互作用。4)薬物とDNAの塩基またはリン酸基の間の水素結合、である。ほとんどの配位子の結合にはこれらの4つの結合力のうちのただ1つではなく幾つかが協同的にはたらいて塩基配列選択的なDNAへの結合が実現してい



a) 塩基対間へのインターカレーション

b) DNAの溝への結合

c) DNAへの共有結合

図1-2　DNAと相互作用する種々の薬物とその結合様式

ると考えられる。

これとは別のとらえ方として、これらの配位子をその相互作用の様式（結合モード）という観点からみると大きく分けて次の3種に分類される。a)DNAの塩基対間へのインターカレーション（主に2)の結合力による）、b)骨格間にできる溝（groove）への結合（主に4)の結合力による）、c)薬物の反応活性部位によるDNAへの共有結合である。これらの結合モードの模式図とその代表的な分子を図1-2に示す。

本研究では、種々のDNA結合性薬物の中でも、a)のインターカレータ（2、3章)とb)に分類されるトリプルヘリックスモチーフ(トリプルヘリックス，三重らせん；4章）に着目した。

DNA-インターカレータの相互作用の模式図を図1-3に示す。ここで言うインターカレーションとはDNAの隣り合う塩基対間への平行挿入反応であり、1961年にLermanによってはじめて確認された現象である[2]。DNA鎖はインタカレータとの結合によって伸長し、らせんが巻き戻される。さらにX線構造解析では、塩基対、インターカレータを含めて、3.4Åの芳香環の重なり間隔が保たれるという種々の物理化学的性質を示すことがわかっている。これまでに報告されているインターカレータのうちで代表的なものを図1-4に示した。ほとんどのインターカレータは縮合環3個からなる複素環化合物である。これらの構造から明らかなようにその多くは正電荷を有しており、この結合には前述した1)の結合力が不可欠であることがわかる。その上にさらに疎水的相互作用や水素結合（2)や4)の結合力）がはたらいているためにインターカレータとしてDNAに強く結合し、塩基配列選択性が生じていると考えられる[3~7]。インターカレータはそのユニークな相互作用様式や、比較的単純な分子構造に

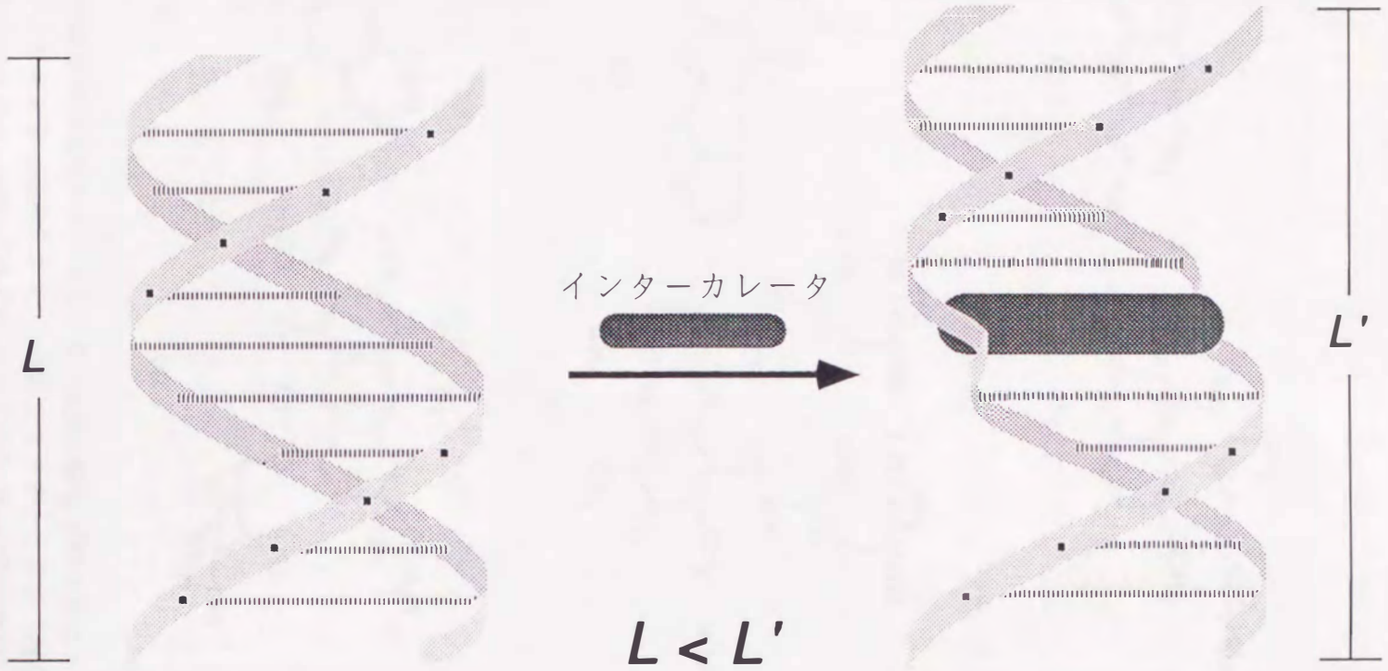


図1-3　DNAへのインターカレーションの模式図
インターカレーションによりDNA骨格が変形し
伸長している

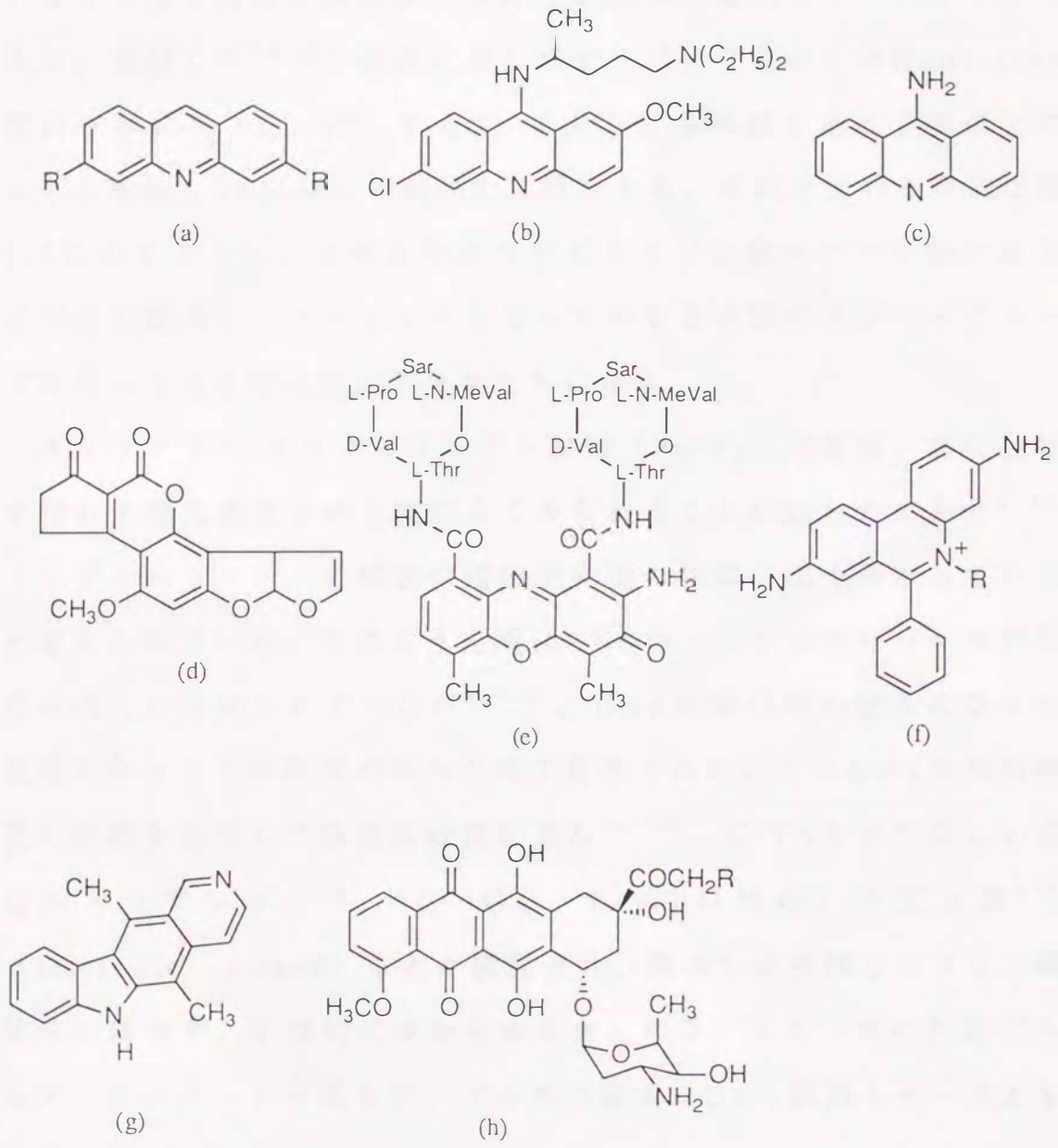


図1-4　代表的なDNAインターカレータ　(a)R=-NH_2 プロフラビン, R=-$N(CH_3)_2$ アクリジンオレンジ　(b)キナクリン　(c)9-アミノアクリジン　(d)アフラトキシンB1　(e)アクチノマイシン　(f)R=-CH_2CH_3 エチジウム, R=-$(CH_3)_3N^+(C_2H_5)_2$ プロピジウム　(g)エリプチシン　(h)R=-H ダウノマイシン, R=-OH アドリアマイシン

もかかわらず、DNAに対しある程度の配列選択性を有するという点で興味深い化合物である。

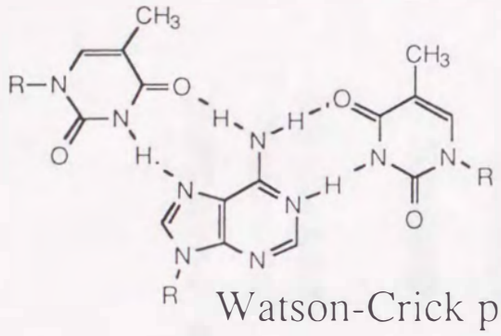
DNAのトリプルヘリックスは、DNA化学の中で、現在知られているうち最も強力で塩基配列特異的なDNAの認識モチーフの1つである。連続したプリン部位に対してオリゴピリミジンはHoogsteen型の水素結合（C⁺-GC、T-AT）を介して3本鎖を形成することにより2本鎖DNAに対して相補的に結合する。そのマクロな構造は図1-5に示すように、3本目のオリゴピリミジン鎖はプリン鎖に対して平行に配向し、ターゲットとなっている2本鎖のメジャーグルーブに沿って巻き付いたようなかたちになる。

オリゴプリン-オリゴピリミジン配列（Pu-Py）は原核、真核生物を問わず構造遺伝子の上流によくみられることが知られており[8,9]、トリプルヘリックスの形成が遺伝子発現の制御に深く関わっていると考えられている。このように既にDNAのトリプルヘリックスの存在は古くから知られていたが[10~13]、DNA認識化学の盛んになった最近になってその存在があらためて見直された。主にDNAの配列特異的切断を目指して基礎的研究が進み[14,15]、G-TAなどの新しい塩基のトリプレット[16]（C⁺-GC、T-AT以外の）や交互鎖[17]（alternate strand）などが開発され、現在では連続したプリン環領域に限らず、原理的にはあらゆる全てのシークエンスに対応できるテーラーメードで最もシンプルかつ確実なDNA認識モチーフとなっている。

本研究は新しい機能を有するDNA結合性配位子の開発を目指している。先述したa)、b)、c)のような種々の配位子に目的のある機能を付与することを考えた場合、配位子分子内に独立にその機能を持つ部位を導入することは非常に単純でそれ故に一般性のある戦略で

(a)

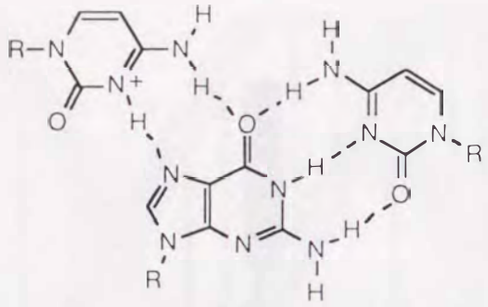
Hoogsteen pairing



Watson-Crick pairing

T-AT

Hoogsteen pairing



Watson-Crick pairing

C^+-GC

(b)

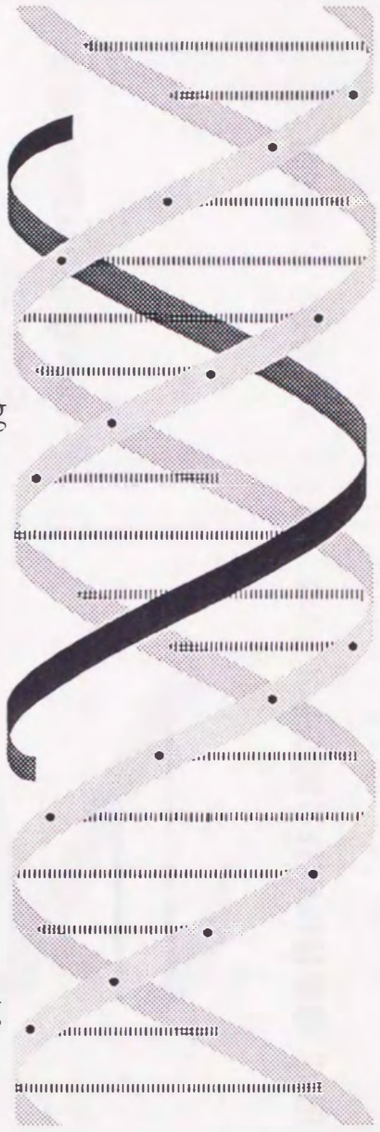


図1-5　DNAトリプルヘリックスの塩基のペアリング(a)とその模式図(b)

オリゴピリミジンはHoogsteen型のペアリングにより２本鎖DNAのメジャーグルーブに沿って結合する

DNA結合部位；

・DNAへの結合
・塩基配列特異性

機能性部位；

・金属結合能
・酸化還元活性
・光反応活性
・DNA結合への協同的効果

図1-6 機能性DNA結合配位子（インターカレータの場合）の摸式図

ある（図1-6）。即ち、目的に合致した適当なDNA結合部位と機能性部位の組み合せ（ハイブリッド）によって全く新しい機能をもつDNA結合性配位子を実現できるのである。

この代表的な例としてDervanらのフットプリンティング試薬がある[18]。この化合物はDNA結合部位として、強い親和性は持つが塩基配列特異性のほとんどないメチジウムを、機能性部位として高いDNA切断活性をもつEDTA-Fe(II)錯体を用いたものである。これまでのDNaseIフットプリンティングは、もともとDNaseIのもつ配列特異性により必ずしも明瞭な結果が得られないことがあった。さらにDNaseI自体が大きなタンパク質であるため、小分子のブロック部位をより大きく見積りがちであった。この化合物はそれぞれの機能を組み合せただけの単純なものであるが、これらの問題点をいっきに解決する全く新しいDNA結合性配位子である。

また、福田らはインターカレータであるアクリジンとクラウンエーテルのハイブリッド化合物を合成している[19]。この化合物は中性領域では無電荷であり、アルカリ金属やアルカリ土類金属とクラウンエーテル部位との錯生成により初めて正電荷を持ちDNAにインターカレート相互作用をする。このときクラウンエーテルの金属選択性を反映して共存金属の種類によってDNAとの親和性が変化することをを見いだした。さらにこの化合物は共存金属イオンをCu^{2+}、La^{3+}やTh^{4+}に変えるとDNA切断活性も発揮することが判った[20]。この他にもDNA結合タンパクと金属配位部位とのハイブリッド[21]、オリゴヌクレオチドとインターカレータとのハイブリッド[14]、オリゴヌクレオチドとヌクレアーゼとのハイブリッド[22,23]、DNA結合タンパクとヌクレアーゼとのハイブリッド[24]、そしてDNAとの結合モードが全く異なった配位子同志のハイブリッドにより配列選択

性を変化させた例[25,26]などハイブリッド化合物は多数報告されている。

本研究ではこのハイブリッドの手法により、DNA結合部位として上述したインターカレータとオリゴヌクレオチドを用いて次の2つの新規試薬の分子設計を行なっている。

即ち

・DNA切断試薬

・DNAの電気化学的検出試薬

である。最近の遺伝病やガン発生機構の研究により遺伝子解析の重要性が広く世に認められるようになった。これらの試薬の開発は膨大な数のゲノムDNAのマッピングや遺伝子の分離などの遺伝子操作のために有用であることはいうまでもない。

非常に簡単に言えば、遺伝子解析は基本的に次の2ステップ、即ち、解析対象のゲノムの適当な部位での切断、そして生成したフラグメントを分離・分析することによって行なう。切断には通常、制限酵素を用いる。つまり、必然的に切断は天然に存在する制限酵素の切断部位に限定されるわけである。従って、人工のヌクレアーゼによりこの制限を取り去ってゲノムの好みの部位（1次構造だけに限らず2次、3次構造の認識・切断）を切断することができれば解析の効率が飛躍的に向上するだろう。

一方、切断の次の段階であるDNAフラグメントの分離・分析については、これまではゲル電気泳動法が主流であった。しかし、近年の充填材の改良、検出器を含む周辺機器の急速な発展により最近はHPLCが急激に汎用されてきている。HPLC法はゲル電気泳動法と比較した場合、操作が簡便で試料の分取も容易であり、使用するカ

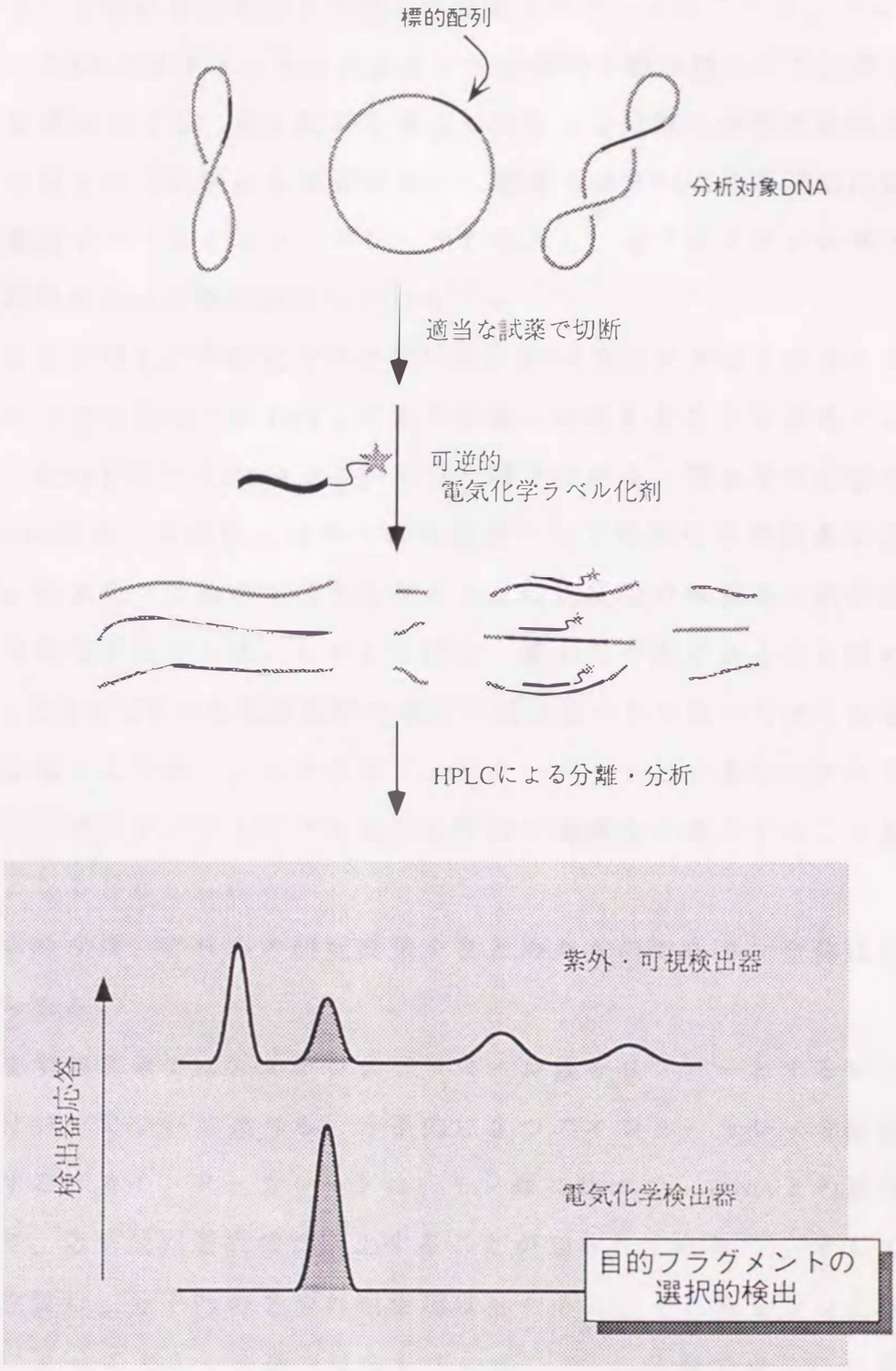


図1-7　電気化学活性プローブによるDNAの分離・分析

ラム（充填剤）により分離モードを変えたり、種々の検出器（検出手法）を用いることにより多くの情報を得ることができる。ところが、DNAフラグメントをその長さや全体的な疎水性などで分離する方法はあっても、塩基配列を認識したうえで分離・分析する手法は未だほとんど未開拓の状態にある。道津らはHPLCの固定相に塩基認識分子であるインターカレータを導入し、オリゴヌクレオチドの配列異性体の分離に成功している[27]。

これに対し、本研究では分析対象のDNAフラグメント自体を可逆的にラベル化した後HPLCにより分離・分析することを考えた。即ち、HPLC法へのDNAプローブ法の導入である。簡単な摸式図を図1-7に示す。具体的にはラベルの種類として電気化学活性基を選んだ。電気化学は他の手法と比べると比較的簡便で本質的に高感度化が可能な手法である。しかしながら、優れた手法であるにも関わらず、DNA化学への電気化学の導入の例は幾つかを除いてはこれまでにはほとんど無い。この手法によりターゲットとするシークエンスをもつフラグメントだけを電気化学的に高感度に検出することが可能となると考えられる。

本論文は、これらの研究成果をまとめたものであり、全体は5章からなる。

まず第2章では、エチレングリコール鎖をリンカーとするビスアクリジンについて述べる。分子内に2つのインターカレート部位を有するビスインターカレータは、モノ体に比べて、DNAとの結合定数や、塩基配列選択性が向上することが知られている[28]。そしてその性質は、分子内の2つの複素環はもちろん、それらをつなぐ連結鎖によって大きく特徴づけられている[29~35]。2章ではここに着目して連結鎖の性質を積極的に生かしてDNA切断活性を持つビスイン

ターカレータの分子設計を行なっている。

第３章では、DNAの電気化学的検出を目的としてビスアクリジンのリンカー部位にredox活性部位を導入した化合物について述べる。さらにこの化合物のもう１つの活用法としてDNAの光切断試薬（人工フォトヌクレアーゼ）としての応用の可能性も見いだしたので併せて述べる。

第４章では、DNA結合部位としてオリゴピリミジンを、電気化学活性部位としてフェロセンを有する新しいDNA検出試薬について述べる。この電気化学活性配位子は２本鎖ターゲットに対してトリプルヘリックスを形成して結合すると考えられるので、真の意味での特異的塩基配列認識が期待できる。

第５章は、第２章から第４章までの総括であり、DNA結合部位と機能部位のハイブリッドにより達成することのできた新規の機能性配位子について要約して考察する。

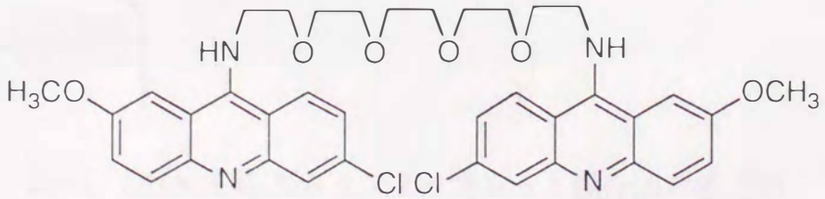
第２章　連結鎖が金属配位能をもつ
ビスアクリジン型化合物

2-1　緒言

現在、DNAやRNAを特異的な部位で切断する分子の研究が、世界の注目を集めている。なぜ今このような分子の研究が重要なのであろうか。それはこのような研究が次世代のバイオサイエンス、生物有機化学、ひいては有機化学そのものの発展のための大きな柱になると考えられるからであり、遺伝子-タンパク質間の分子認識の研究には必要欠くべからざるものであるからである。

制ガン剤開発の立場からみても、ブレオマイシンやシスプラチンなどDNAを切断することによってその薬理活性を発揮する分子化合物が数多く発見されてきている[36]。さらに、膨大な数のゲノムDNAのマッピングや遺伝子の分離などの遺伝子操作のためにも新しいDNA切断試薬の開発研究が必要である。

そこで、この第２章では第１章で述べたハイブリッドの概念を利用した。具体的にはビスインターカレータの連結鎖に金属配位能を有するペンタエチレングリコール鎖を導入したビスアクリジン**1**を合成した。



1

この化合物1は図2-1に示すように、DNAへの結合に際して次の2つの機能を発現すると考えられる。1）金属がDNAのリン酸と1のエチレングリコール鎖へ配位することによるDNA-1複合体の安定化と、2）金属のDNAへの濃縮によるDNA鎖の部位特異的加水分解である。これら2つの可能性について以下検討を行なった。

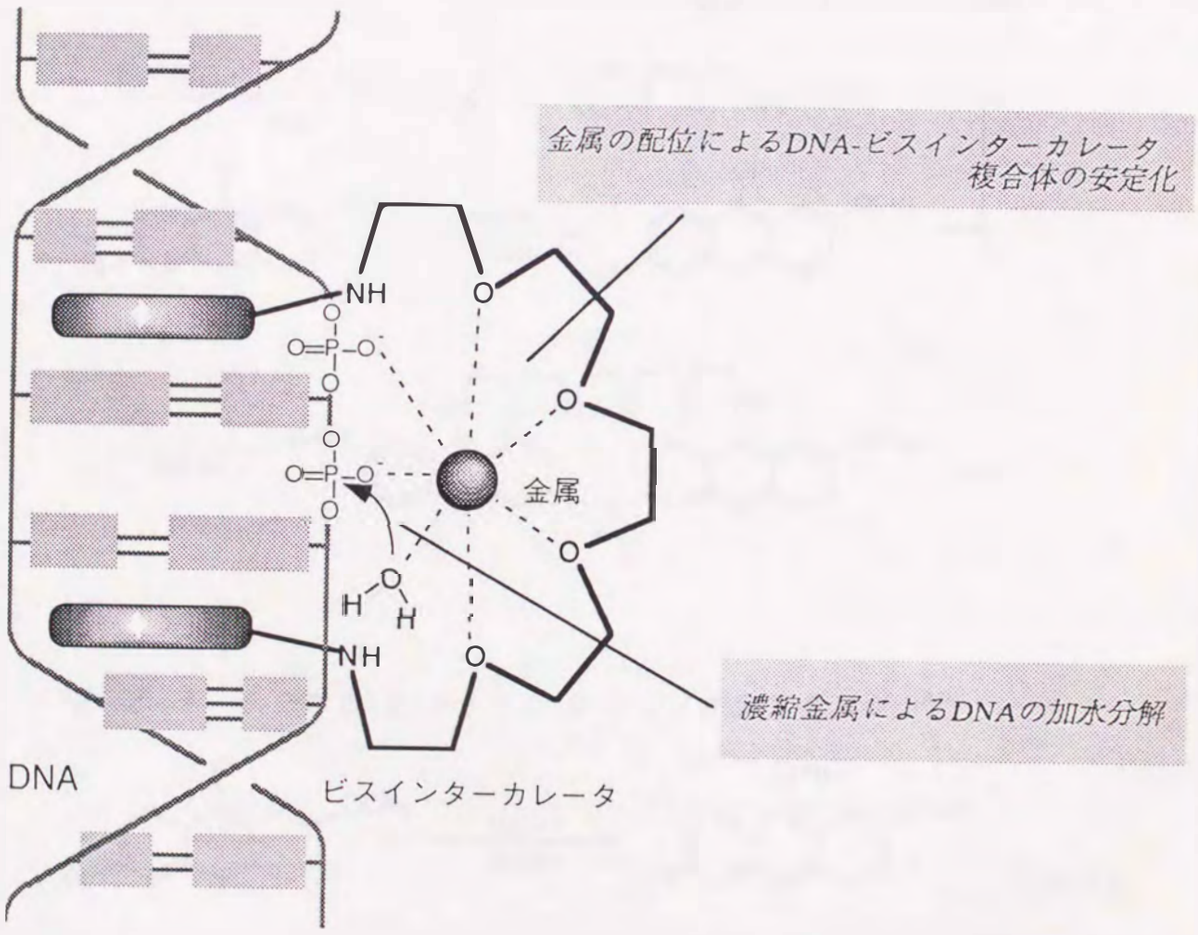
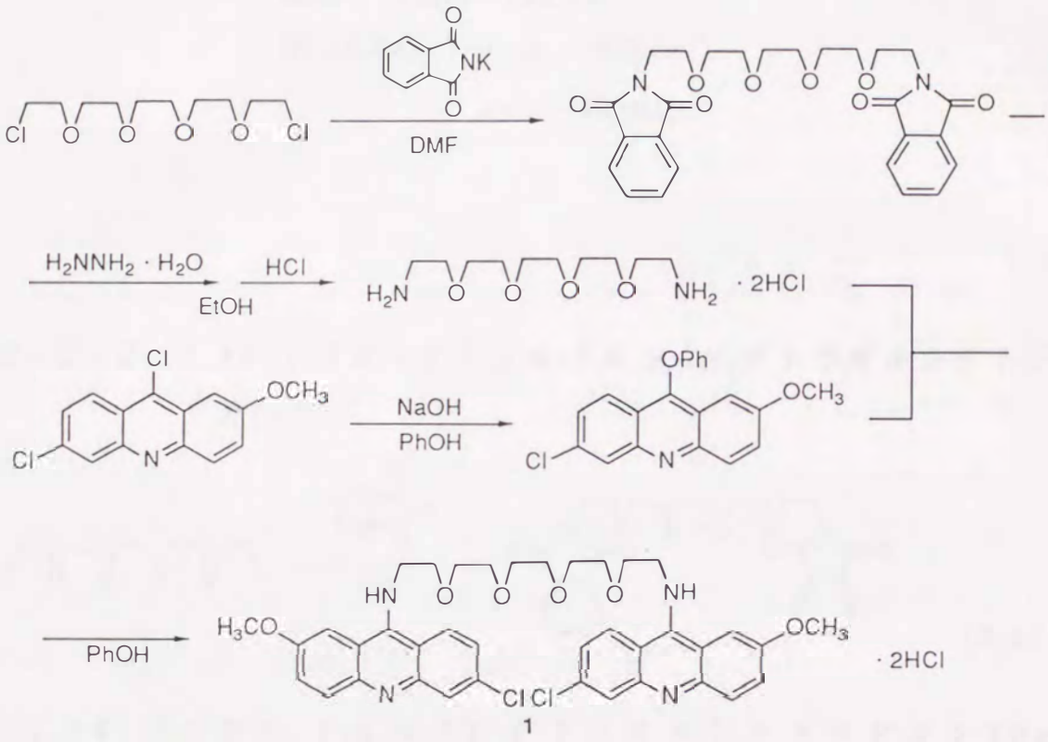


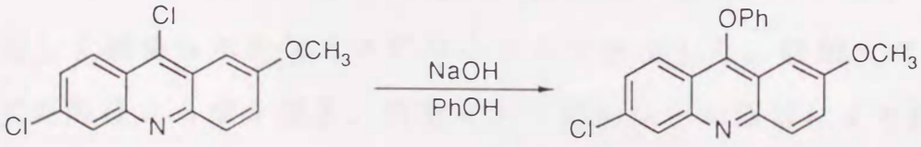
図2-1　DNA-金属-ビスインターカレータ複合体の模式図

2-2　1,14-ビス[9'-(6'-クロロ-2'-メトキシアクリジルアミノ)]-3,6,9,12-テトラオキシテトラデカン二塩酸塩(**1**)の合成

ビスアクリジン**1**の全合成スキームを以下にまとめて示す。



2-2-1　6-クロロ-2-メトキシ-9-フェノキシアクリジン[37]



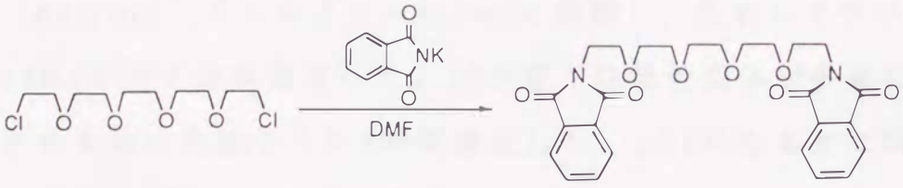
(2-1)

100mlビーカーにフェノール40gを入れ、80℃で水酸化ナトリウム1.6g（40mmol）を溶解した。この溶液に6,9-ジクロロ-2-メトキシアクリジン10g（36mmol）を加えて溶解し、100℃で1時間半加

熱撹拌した。放冷後、反応溶液を2M水酸化ナトリウム水溶液300mlに注ぎ、析出した暗緑色固体をろ取し、2M水酸化ナトリウム水溶液で数回洗浄した。

性状　暗緑色固体
収量　13.2g（98%）
融点　158.6～159.1℃
IR（KBr）　$\nu_{C\text{-}C}$　1630cm^{-1}
　　$\nu_{C\text{-}O}$　1230cm^{-1}

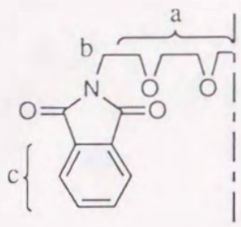
2-2-2　1,14-ジフタルイミジル-3,6,9,12-テトラオキシテトラデカン[38、39]



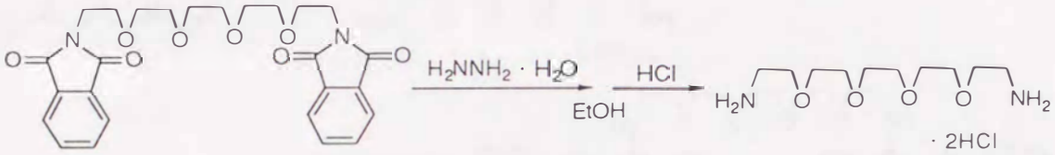
(2-2)

1,14-ジクロロ-3,6,9,12-テトラオキシテトラデカン30g（100mmol）を乾燥DMF500mlに溶解し、この溶液を撹拌しながらフタルイミドカリウム41g（220mmol）を加えた。90℃で3時間加熱撹拌後、反応混合物が冷える前に生じた沈澱をろ別、ろ液を留去して残渣に水を加えクロロホルムで抽出した。硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ液を留去、残渣をクーゲルロール蒸留により精製した。

性状　黄褐色油状液体
収量　32g（59%）
60MHz ^{1}H-NMR（$CDCl_3$, 内部基準TMS）
　δ値（ppm）
　　3.6（20H, m, $H^{a,b}$）
　　7.7（7.0H, m, H^c）



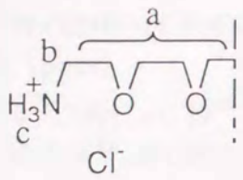
2-2-3　1,14-ジアミノ-3,6,9,12-テトラオキシテトラデカン二塩酸塩[38、39]



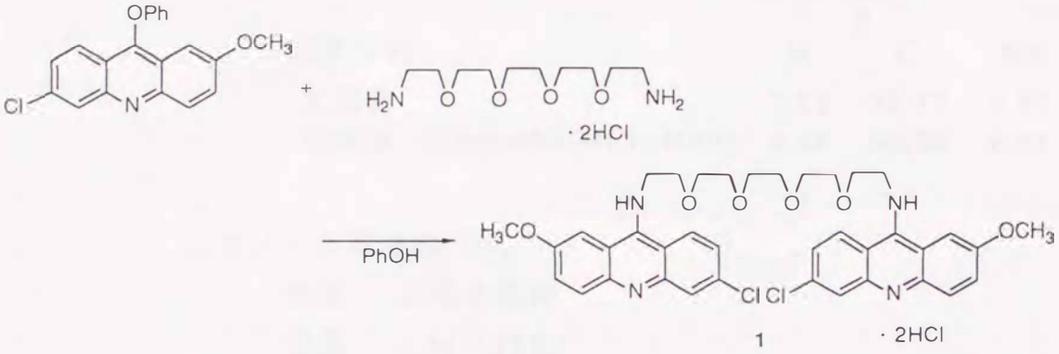
(2-3)

1,14-ジフタルイミジル-3,6,9,12-テトラオキシテトラデカン32g（64mmol）をエタノール300mlに溶解し、抱水ヒドラジン（80%）25mlを加え加熱還流した。10分程で白緑色固体が多量に生じたが、これを砕いた後さらに2時間還流した。pH1になるまで塩酸を加え、続けて3時間加熱還流。放冷後沈澱をろ取し、ろ液を留去して白黄色固体を得た。

性状　白黄色固体
収量　18g（90%）
融点　室温付近（～25℃）
バイルシュタインテスト　陽性
IR（KBr）　$\nu_{C\text{-}O}$　1100 cm^{-1}
　　$\nu_{N\text{-}H}$　1500 cm^{-1}
　　$\nu_{C\text{-}H}$　2900 cm^{-1}
60MHz ^{1}H-NMR（DMSO-d6, 内部基準TMS）
δ値（ppm）
3.6（20H, m, $H^{a,b}$）
8.0（6H, m, H^{c}）



2-2-4　1,14-ビス[9'-(6'-クロロ-2'-メトキシアクリジルアミノ)]-3,6,9,12-テトラオキシテトラデカン二塩酸塩[37]（1）



（2-4）

6-クロロ-2-メトキシ-9フェノキシアクリジン13g（39mmol）を、80℃でフェノール40gに溶解し、1,14-ジアミノ-3,6,9,12-テトラオキシテトラデカン２塩酸塩5g（16mmol）を加え、120℃で2時間半加熱撹拌した。放冷後、反応混合物をエーテルに注ぎ、生じたタール状の黒色沈澱をエタノールで洗浄、ろ取して暗緑色固体（A）を得た。一方、エタノール可溶物を多量のエーテルに注いで生じた黄褐色沈澱をろ取した。

エタノール不溶物（A）

性状　暗緑色固体

収量　6.5g（51%）

融点　219.5～221.0℃（200℃付近で変色）

IR（KBr）　$\nu_{N\text{-}N}$　3400　cm^{-1}

$\nu_{C\text{-}H}$　2870　cm^{-1}　（O-CH_2）

$\nu_{C\text{-}C}$　1630　cm^{-1}　（ar C-C）

$\delta_{N\text{-}H}$　1590　cm^{-1}

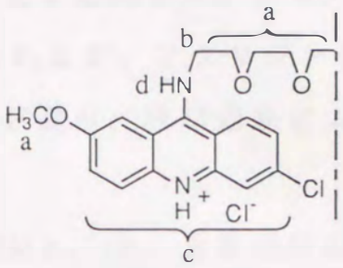
$\nu_{C\text{-}O}$　1245　cm^{-1}

60MHz ^{1}H-NMR（CF_3COOH, 内部基準TMS）

δ値（ppm）

3.6（29H, m, $H^{a,b,d}$）

7.2（12H, m, H^c）



元素分析	*H*	*C*	*N%*
実測値	5.22	56.17	6.92
計算値（$C_{38}H_{42}N_4O_6Cl_4 \cdot H_2O$）	5.48	56.30	6.91

エタノール可溶物（B）

性状　黄褐色固体

収量　3.5g（28%）

融点　110.5～118.0℃

IR（KBr）　（A）と同じ

60MHz ^{1}H-NMR（CF_3COOH, 内部基準TMS）

δ値（ppm）

3.6（31H, m, $H^{a,b,d}$）

7.2（12H, m, H^c）

2-2-5　まとめ

2-2-1の反応はほとんど化学量論的に進行することが知られており[37]、当研究室でも何度か合成されているので融点、IR測定のみで目的物が得られたものと判断し、次の反応に用いることにした。

2-2-2、2-2-3のガブリエル合成は、ほぼ満足できる収率で反応が進行した。

2-2-4において、アクリジンのフェノキシ体に対するアルキル

アミン塩酸塩の求核反応を行なった。ハロゲン化アクリジンとフリーのアルキルアミンでも同じ様に反応すると考えられるが、後者は反応収率が低いとの報告があり[37]、この方法を選択した。アミンが塩酸塩になると求核性は弱くなると考えられるが、アクリジンの9位への求核攻撃と同時にN位のプロトン化が進み、誘起効果により求核反応が促進されるのかもしれない。

また、この反応で得た生成物A、Bは、NMR、IR、元素分析の結果からいずれも目的物の1,14-ビス[9'-(6'-クロロ-2'-メトキシアクリジルアミノ)]-3,6,9,12-テトラオキシテトラデカン２塩酸塩（**1**）であると判断した。しかしながら興味深いことにその融点には100℃近い差があった。これは結晶水の数、または両アクリジン環のスタッキング状態などの違いに起因するものではないかと考えている。Aの水からの再結晶を試みたが結晶化せず、水を留去して再び融点を測定したところ120～125℃とBの融点に近い値を示した。再結晶操作の際に、恐らくAはBに近いコンホメーションに変化したものと考えられるが、現段階では詳細は明らかではない。

2-3 DNA-ビスアクリジン（1）の結合定数に及ぼす金属塩の効果

仔牛胸腺DNAと**1**との相互作用を種々の金属塩の一定濃度存在下でScatchard解析[40]にて検討した。対照化合物としてモノ体ではあるが**1**と同じアクリジン核と、同様に2つの正電荷を有するキナクリンを用いた。DNAと代表的な幾つかのインターカレータの相互作用において、結合定数に与える金属塩濃度の影響について述べた文献[41]から、初めは測定条件として金属の種類によって結合定数にほとんど差のない濃度1.0Mを選んだが、セル中で懸濁して吸光度の正確な測定ができなかった。そこで金属塩濃度を0.1Mにして結合定数を求め、対照物質（分子内にエチレングリコール鎖を持たないインターカレータ;キナクリン）と比較することによりエチレングリコール鎖の影響を評価することにした。図2-2にエチジウムブロミドの結合定数に与える金属塩濃度の効果[41]を示した。

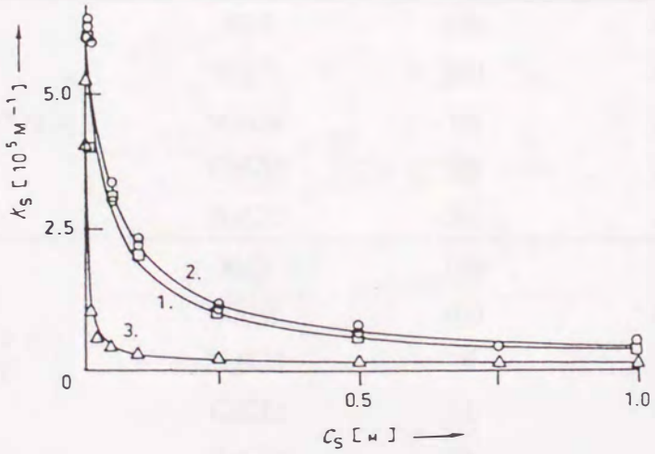


図2-2　エチジウムブロミド-DNAの結合定数,Ksに与える塩濃度,Csの影響[41]．NaCl（○）, KCl（□）, MgCl2（△）, T=298K, 文献41より転写.

2-3-1　結果

図2-3に仔牛胸腺DNA添加に伴う**1**の吸収スペクトル変化を示す。DNAの濃度増加に伴って吸収スペクトルは明らかに深色シフト（417→424nm）と淡色シフト（Hypochromicity,H%=44）をしている。これはDNA結合性薬物に特徴的な挙動である[42、43]。従ってこのビスアクリジン**1**もDNAと相互作用、特に淡色シフトが大きいことからインターカレーション相互作用をしていると考えられる。図2-3の吸光度変化（図2-4）から、数種のアルカリ（KCl、NaCl）、アルカリ土類金属（$MgCl_2$、$CaCl_2$、$BaCl_2$）共存下での**1**のDNAに対する結合定数を求めた。それぞれの条件下でのScatchardプロットを図2-5～2-8に、また、これらのプロットから求めた結合定数を表2-1にまとめて示す。

表2-1　種々の金属共存下での**1**，キナクリンのDNAに対する結合定数. 100μM :MES（pH6.5）, 25℃

DNA結合配位子	共存金属塩 (0.1M)	結合定数 $Kx10^{-3}$ (M^{-1})	結合座席数 n（塩基対）
キナクリン	KCl	900	4.6
	NaCl	380	4.5
	$MgCl_2$	10	22
	$CaCl_2$	30	22
	$BaCl_2$	30	17
ビスアクリジン **1**	KCl	780	5.5
	NaCl	400	4.4
	$MgCl_2$	25	13
	$CaCl_2$	31	28
	$BaCl_2$	33	13

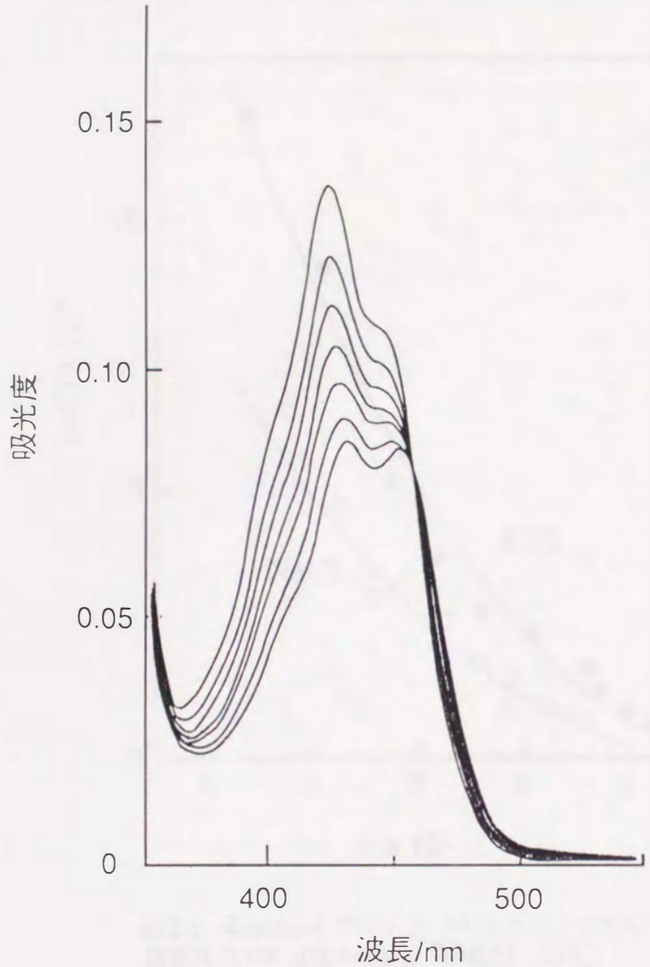


図2-3　仔牛胸腺DNA添加に伴う1のスペクトル変化.
10μM 1, DNA濃度は上から0, 40, 75, 100, 120, 170, 250μM, 100μM MES（pH6.5）, 0.1M NaCl, 25℃

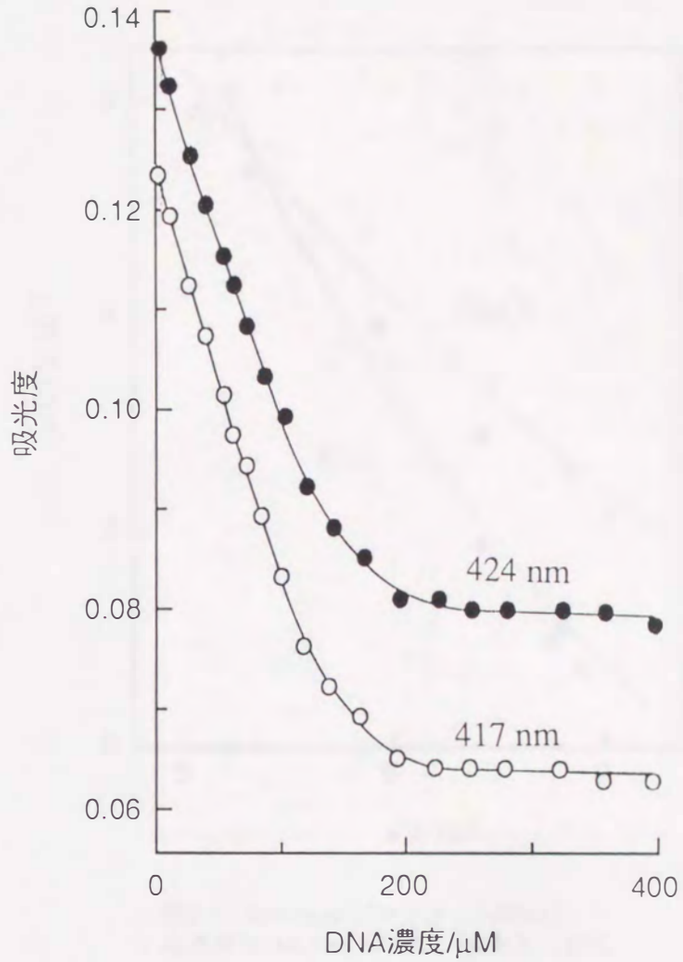


図2-4　DNA添加に伴う1の吸光度変化.
図2-3のスペクトルから2つの波長における吸光度をプロットした.

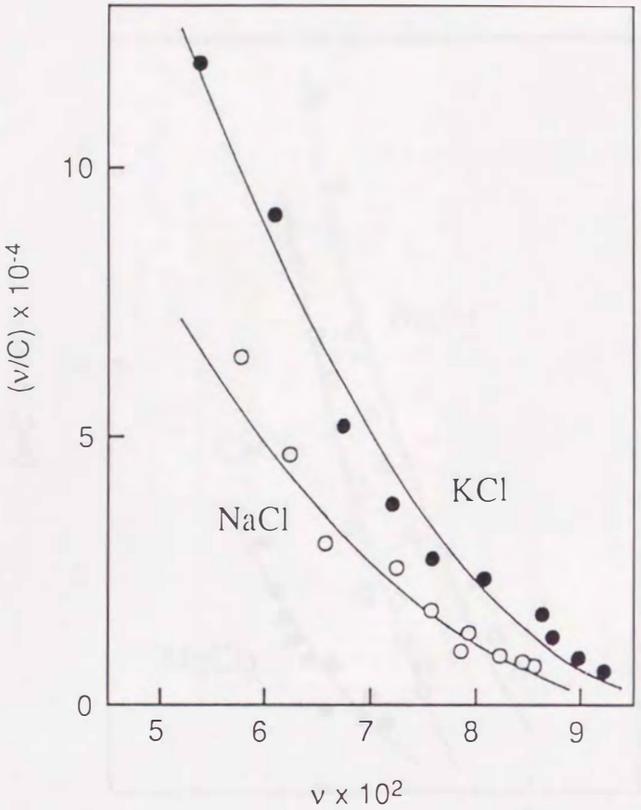


図2-5　Scatchard プロット（キナクリン-DNA）.
塩濃度 0.1M, 100μM MES（pH6.5）, 25℃

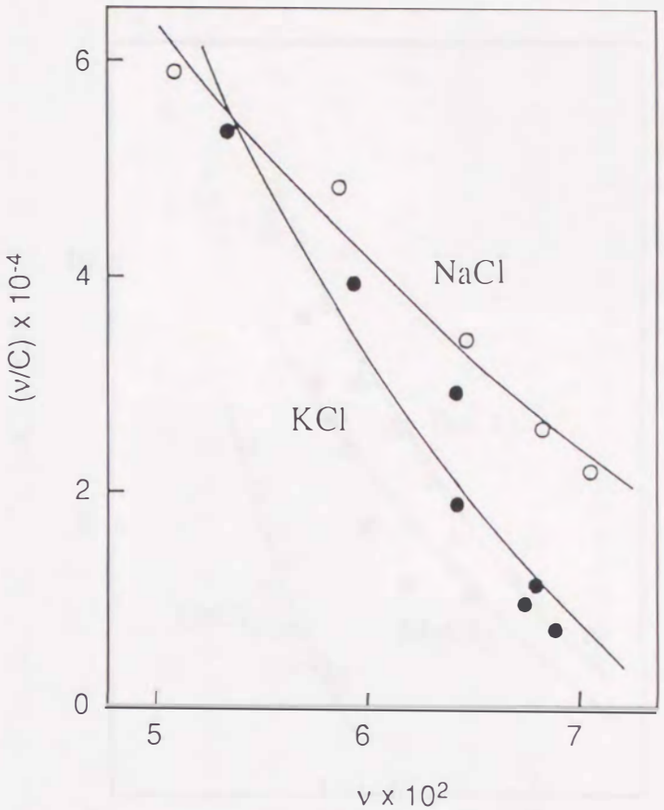


図2-6　Scatchard プロット（1-DNA）
塩濃度 0.1M, 100μM MES（pH6.5）, 25℃

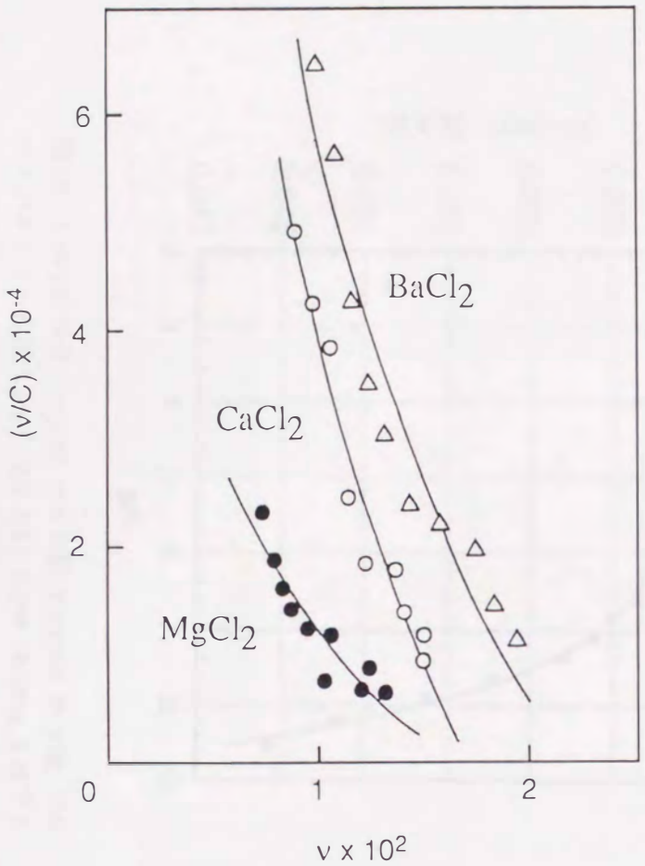


図2-7　Scatchard プロット（キナクリン-DNA）．
塩濃度 0.1M, 100μM MES（pH6.5）, 25℃

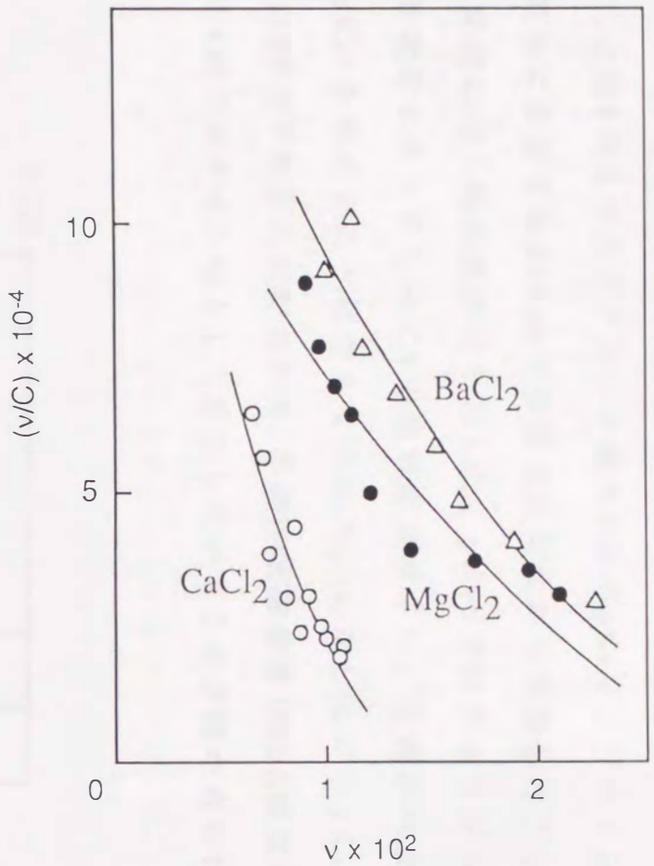


図2-8　Scatchard プロット（1-DNA）．
塩濃度 0.1M, 100μM MES（pH6.5）, 25℃

2-3-2 考察

化合物1の2つのアクリジン環のN位のpKaを、プロトンの可逆的な結合に由来する444nmでの吸光度変化から評価した[44]。図2-9にpH変化に伴う吸光度変化を示した。pH>9ではアクリジン環が完全に無電荷になったために1の溶解度が減少し、沈澱が生成してしまいpKa2を求めることはできなかった。しかしながらpKa1～8.0、pKa2≧9.0であることがわかり、本節の実験条件（MES緩衝液pH6.5）では1はジカチオン体として存在していることが確かめられた。

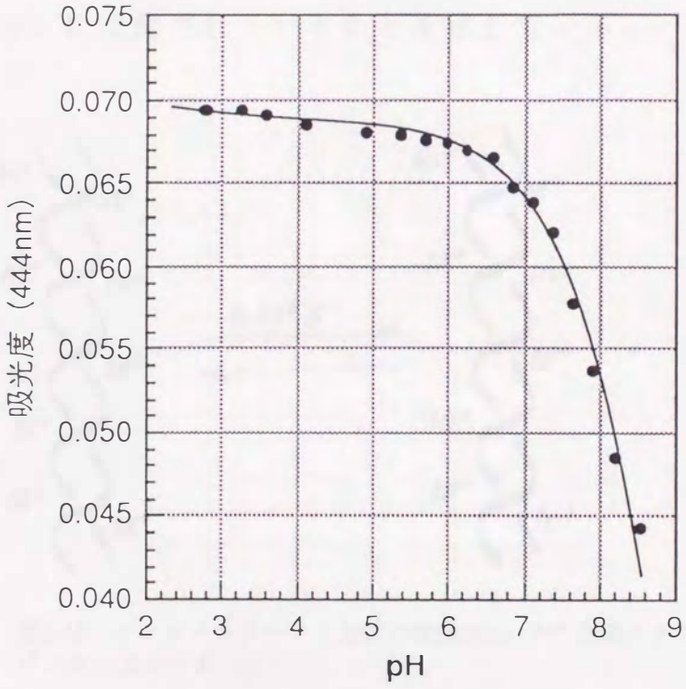


図2-9　1 の pH 滴定. 1:5μM; クエン酸, KH_2PO_4, ホウ酸, ジエチルバルビツール酸:5.7mM（pH 2.6）に5M $NaOH_{aq.}$ を滴下してpHを変化させ平衡到達後A_{444}を測定した.

1はビス体であるので結合親和性の増大が期待されたが、表2-1の結果をみると実際はキナクリンの結合定数と同程度の値であった。いずれもジカチオン体としてDNAと相互作用していると考えられるので、これらのアクリジン誘導体の結合に際しては、疎水的相互作用よりもむしろ荷電の効果が大きく、結合定数は主に静電的相互作用によって決定されているものと考えられる。

各々の金属共存下での1とDNAの結合定数の大きさの序列はK>Na>Ba>Ca>Mgであった。一方、金属イオン自身のDNAとの親和力の強さの序列は、Mg>Ca>Ba>Na>K、即ち全く逆である[45~47]。このことは、金属イオン共存下での1やキナクリンのDNAとの相互作用は、やはり、おもに金属との静電的な交換反応—カチオン交換—（図2-10）に支配されていることを示している。

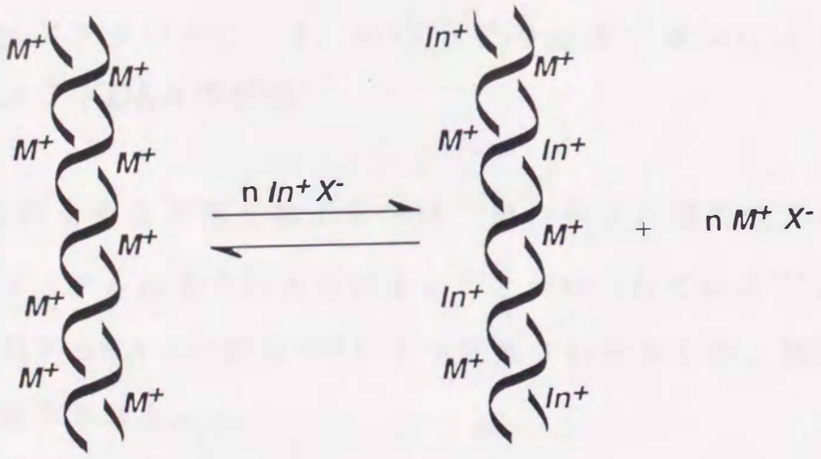


図2-10　インターカレータと金属の交換反応. M^+:金属カチオン; In^+: インターカレータ.

2価金属イオン共存下でも、1とキナクリンの間には大きな差はみられない。しかしながらMg^{2+}存在下でのみ1の結合定数がキナクリンよりも目立って大きな値を示した。この1-Mg^{2+}系での結合定数

の増大は、Mg^{2+}が1の分子内のペンタエチレングリコール鎖とDNAのリン酸に同時に相互作用してDNAと1の結合を助けていることを示唆している。即ち、初めの分子設計で期待した通りMg^{2+}はDNA-1複合体のクラウンエーテル類似の空孔内に結合し、錯体を安定化している可能性がある。通常、Mg^{2+}は水中ではクラウンエーテルとはほとんど相互作用しないことが知られているが[48]、DNA近傍での局所的な極性は水よりも低くメタノールに近いという知見があり[19,49]、さらにリン酸の負電荷の寄与も考えると、この結果は不合理なものではないと考えられる。

2-4　ビスアクリジン（1）共存下での金属イオンによるプラスミドDNAの切断

DNAに結合する多価金属イオンは、そのルイス酸的性質によりリン酸ジエステル結合を加水分解することが知られている[50]。さらにもし金属のDNAへの結合が1により促進されるならば、加水分解の増強が期待される。

本節では、1を用いたDNA切断の基礎的検討行なった。DNAには閉環状（スーパーコイル状）のプラスミドDNAを用いた。この閉環状のプラスミドDNAは、図2-11に示すようにスーパーコイル構造（ccc）をもち、その２本鎖の一方にニック（切れ目）が生じると開環状（oc）に変化する。さらに切断が進むと直鎖状（l）になるが、これらの形態の異なるDNAは分子量は等しくてもアガロースゲ

ル電気泳動では分離することがすることができ、切断反応を非常に高感度に追跡することができる。

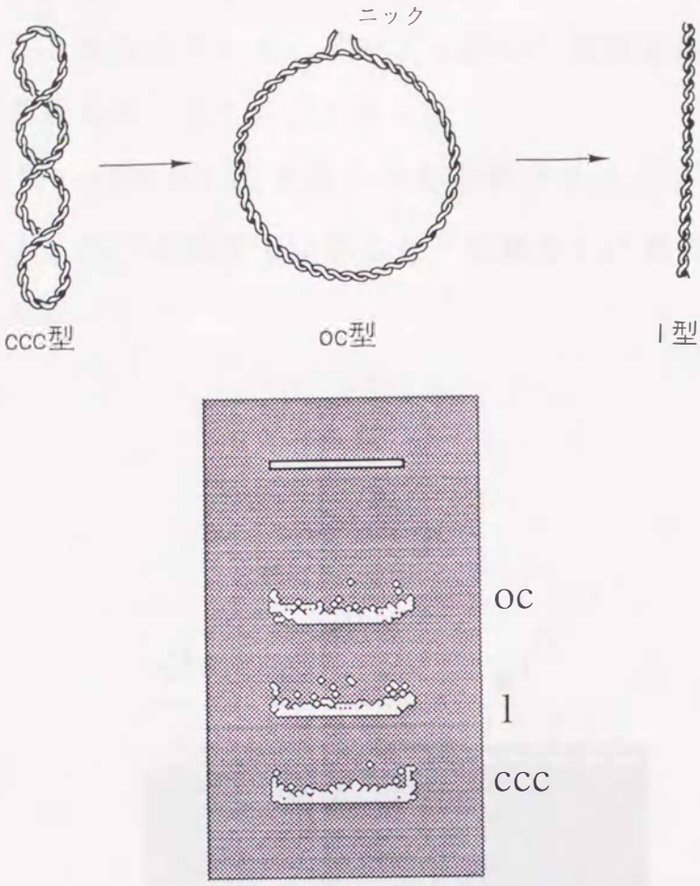


図2-11　プラスミドDNAの形態変化（ccc→oc→l）
とそれぞれのアガロースゲル電気泳動挙動.

2-4-1　加水分解反応による切断

プラスミドDNA、pUC9-terR(+)を用いてビスアクリジン、1の共存下Cu^{2+}による加水分解を行なった。図2-12に切断反応後のアガロースゲル電気泳動の結果を示す。この写真をデンシトメーターで

定量化したものを図2-13に示した。定量化にあたっては、oc型はccc型よりも1.5倍ほどエチジウムブロミドに染まり易い[51]ことを考慮して値を補正した。図中の0%はccc型とoc型の割合がコントロールと同じことを示している。このようにCu^{2+}濃度上昇に伴ってDNAの切断が進行していることがわかる。

また、図2-14にはLa^{3+}を用いた場合のプラスミドDNAの切断の結果を示す。Cu^{2+}の場合とは異なり、明確なLa^{3+}濃度依存性はみられなかった。

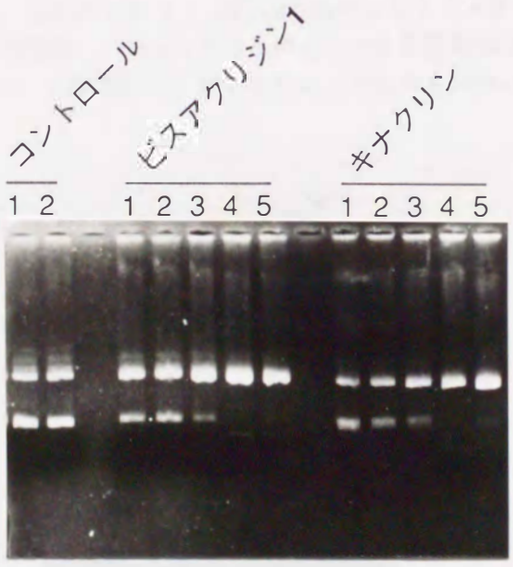


図2-12　インターカレータ-Cu^{2+}共存下でのプラスミドDNAの切断反応. 0.3μM　1, キナクリン; 25 μM DNA-phosphate; 55μM Tris-HCl(pH7.5); レーン1～5はそれぞれ0, 0.8, 5.6, 11.2, 16μMのCu^{2+}を含む. 混合物を37℃, 12時間インキュベート後1%アガロースゲルで泳動. エチジウムブロミドで染色. コントロール1と2はCu^{2+}を含まず, 1はインキュベートをしていない.

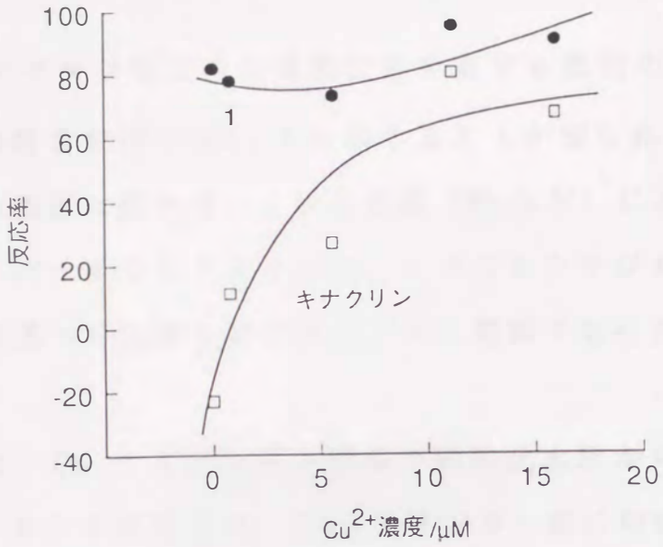


図2-13　反応率プロット. 図2-12からデンシトメーターを使って定量化,　コントロールのデータを反応率0%とし, cccのバンドが消失して全てocになったものを100%とした.

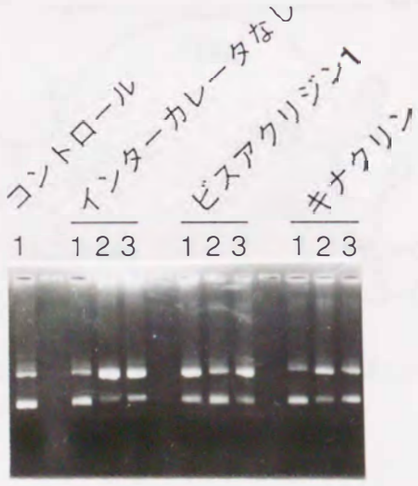


図2-14　インターカレータ-La^{3+}共存下でのプラスミドDNAの切断反応. 0.3 μM　1, キナクリン; 25 μM DNA-phosphate; 55 μM Tris-HCl(pH7.5); レーン1～3はそれぞれ0, 0.16, 1.6 μMのLa^{3+}を含む. 混合物を37℃, 12時間インキュベート後1%アガロースゲルで泳動し,エチジウムブロミドで染色した.　左の1～3はインターカレータを含んでいない.

2-4-2　ラジカル反応によるDNAの切断

ブレオマイシンなどの金属配位能を有する数種のDNA結合性薬物は、その結合部位でDNAを切断することが知られている[52、53]。そしてこの切断は錯形成している金属（Feなど）により還元されて生じたスーパーオキシドイオンや、ヒドロキシラジカルによるリボース環や塩基への攻撃で始まるラジカル機構で進行すると考えられる。

ここでは、Cu-アスコルビン酸系で過酸化水素から効率的にヒドロキシラジカルを発生させ、DNAをラジカル的に切断することを試みた[54]（図2-15）。

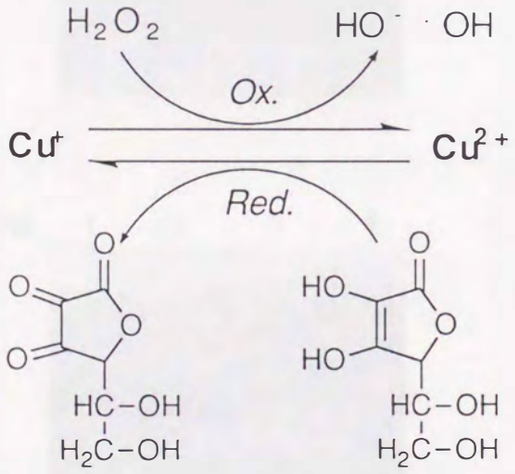


図2-15　Cu-アスコルビン酸系を利用したヒドロキシラジカルの発生.

この基礎的な実験としてまず条件検討を行なった。共存する銅イオン、インキュベートの時間を変化させてDNA切断を行なった。結果を図2-16に示す。図2-16（A）での条件がきびしすぎたためにレーン3、4ではDNAが完全に細かく断片化されて、DNAバンドが消失

した。次に銅イオン濃度を下げ、さらにインキュベートの時間を6分の1（1時間→10分間）にしたが（B）に示すとうり（A）と同様に、DNAバンドを検出することができなかった。

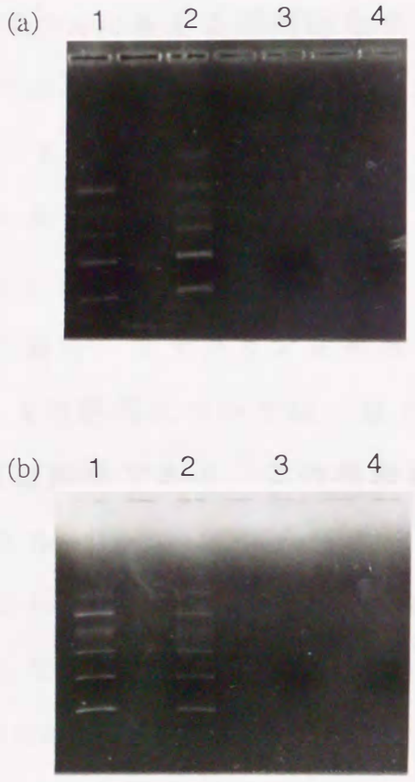


図2-16　酸化還元系でのプラスミドDNAの切断．3.3 μM DNA-phosphate; 450 μM Tris-HCl（pH7.5）; 9mM H_2O_2; 9mM アスコルビン酸; レーン1はコントロール，レーン2はCu^{2+}を含まない．（A）レーン3は450 μM，レーン4は900 μMのCu^{2+}を含む．混合後37℃で1時間インキュベートした．（B）レーン3は90 μM，レーン4は450 μMのCu^{2+}を含む．混合後37℃で10分間インキュベート．1% アガロースゲル電気泳動後のゲルをエチジウムブロミドで染色

2-4-3　考察

図2-12、図2-13より、ビスアクリジン**1**はCu^{2+}非共存下でも明らかにDNA切断を促進している。一方、キナクリンはコントロールに比べるとCu^{2+}非共存下では逆に切断が抑制されている。このようにこの２つのアクリジン誘導体の性質にははっきりとした違いがあるがこれが何に起因するものかは現在は明らかではない。あるいはビスアクリジン**1**がDNAに与える局所的なひずみによるものであるかも知れない。このひずみは、もし**1**がその２つのアクリジン部位の両方をDNAにインターカレートさせているならば、ビス体である分だけモノインターカレータであるキナクリンの与えるひずみよりも大きいと考えてもよいだろう。

Cu^{2+}を添加した場合、キナクリン共存系については大きく切断効率が上昇したが、**1**共存系については、既にCu^{2+}濃度が0の時点でほとんど100%の切断効率であり、この実験条件ではCu^{2+}濃度の効果は明らかにはならなかった。しかしながら、**1**を加えないCu^{2+}だけの場合の切断効率の方が、**1**共存系よりも高いという結果も得ており（データは示していない）、ここでも2-3-2で述べたようなポリアニオンであるDNAへのカチオン種（インターカレータとCu^{2+}）の交換反応が支配している様子がうかがえる。

以上の結果をまとめると、カチオン性の複素環部位を有する**1**はそれのみで弱いDNA切断活性をもつ。一方、Cu^{2+}自身も強い切断活性をもっている。しかしながら、これら２つの活性は協同的というよりもむしろ競争的に作用していることがわかった。このことは本研究の当初の作業仮説とは異なるものである。スーパーコイルの緩

和を利用したこの研究法は、その操作、原理の単純さからよく用いられるが、緩和はたった1つのニッキングでも起こり、非常に特異な反応であると言うことができる。つまり、スーパーコイルDNAの緩和はDNA切断反応の特別な一面しか捉えておらず（しかもスーパーコイルDNAは部分的にZ型部位や2本鎖を組んでいない部分が存在し[55]、そこは非常に切断され易い）、ビスアクリジン**1**-Cu^{2+}によって協同的に起こるDNA切断の可能性についてはさらに詳細に検討すべきである。

図2-14より、La^{3+}は、明らかにDNAを切断することができた。さらにCu^{2+}同様、La^{3+}とインターカレータの競争的な作用が観察された（**1**、キナクリン存在下でDNAの切断が抑制された）。しかしながら、その切断効率のLa^{3+}濃度依存性や再現性は非常に乏しかった。この理由としては、この実験条件（pH7.5）ではLa^{3+}が加水分解してしまい、反応溶液中にはもはや期待した濃度のLa^{3+}が存在していなかったということが考えられる。

また、ラジカル反応によるDNA切断（図2-16）は現在のところ図2-17を含む幾つかの機構で進行すると考えらている[56, 57]。本節の反応も同様な機構によると考えられるがCu^{2+}濃度、反応時間の調節では発生するヒドロキシラジカルの濃度の制御が難しかった。今後の可能性としては、反応温度、H_2O_2-アスコルビン酸の濃度の調節が考えられるが、この機構が加水分解と比べて反応性が非常に高いことや、さらにこの系の実験方法（スーパーコイルプラスミドDNAの緩和過程の観察）では、**1**とCu^{2+}は競争的に作用することから、この反応系でビスアクリジン**1**の特異性をみるのは難しいと考えられる。今後は、操作の簡便性、条件検討のしやすさから加水分解について詳細に検討する。

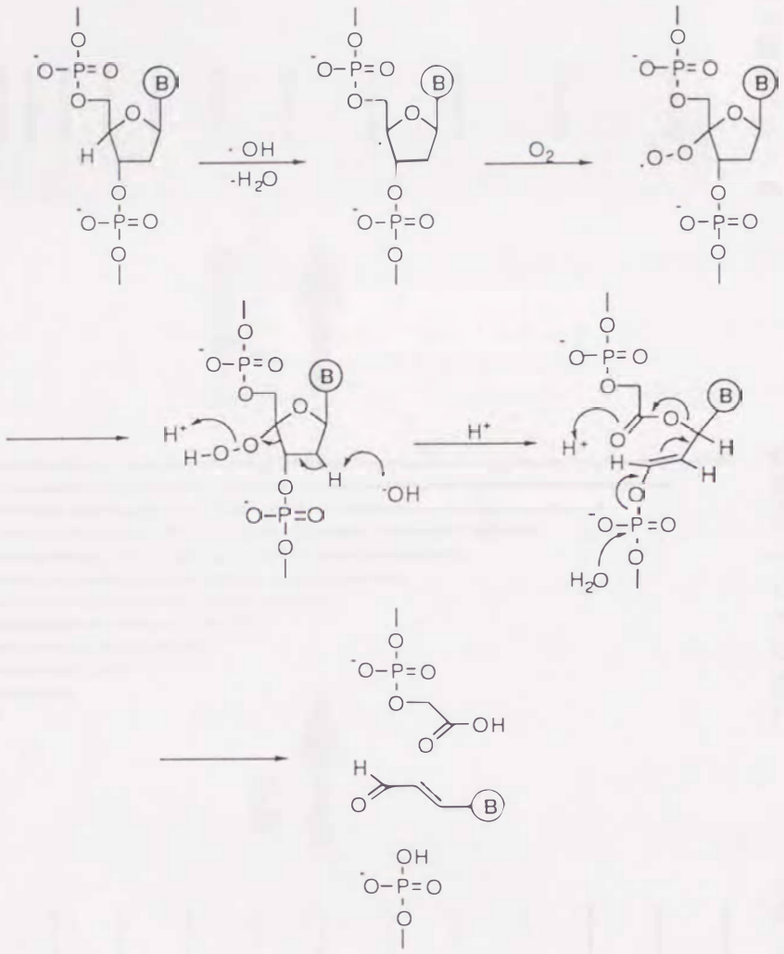


図2-17　ヒドロキシラジカルによるDNAの切断機構.

2-5　ビスアクリジン（1）の結合部位と切断部位

本節では、Cu^{2+}によるDNA切断に及ぼす1の効果を詳細に検討するため^{32}P-末端標識DNAフラグメントを用いた。はじめにDNaseIを用いたフットプリンティングにより、1の結合部位の検討を行な

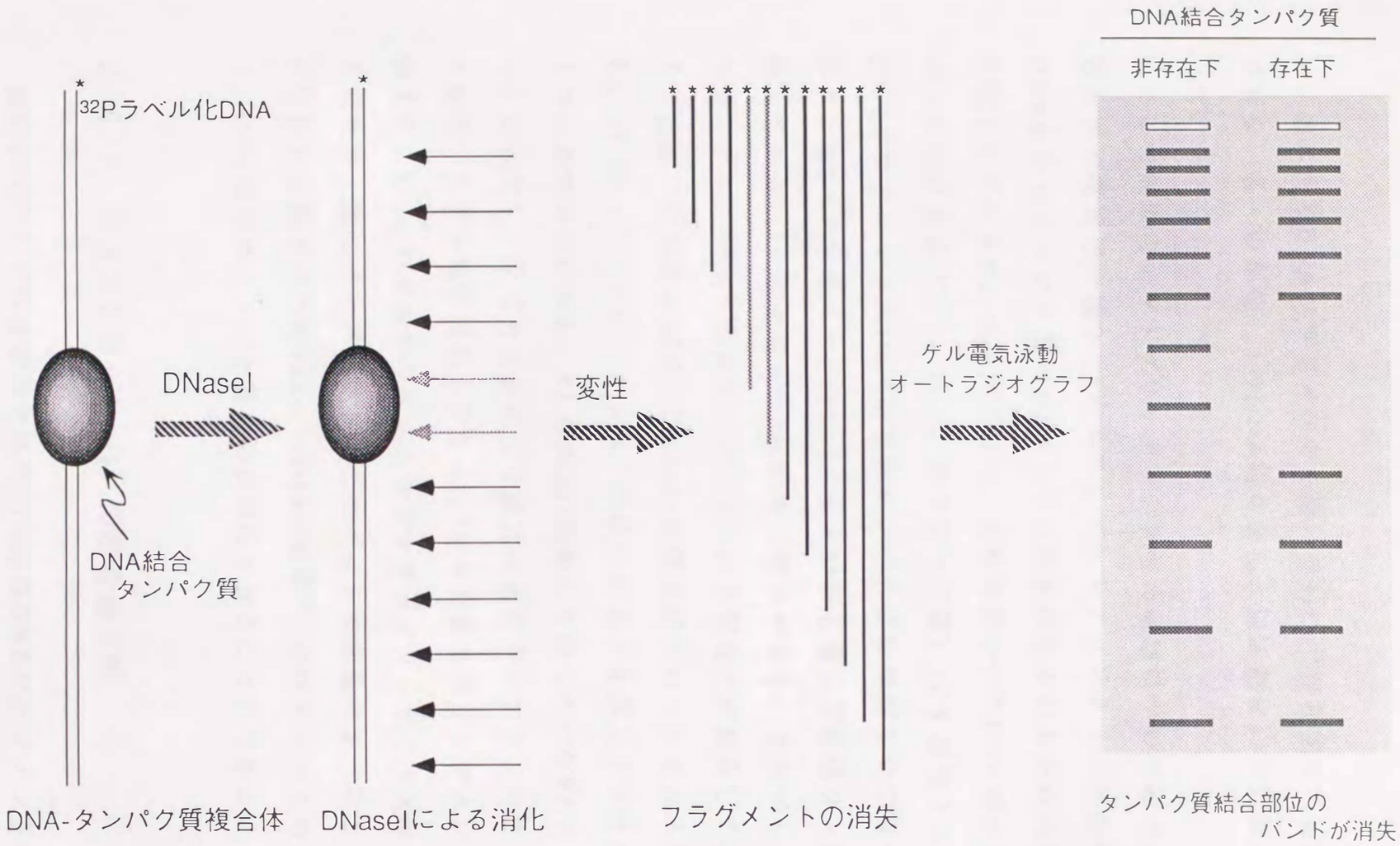


図2-18　フットプリンティングの原理

い、次に同じDNAフラグメントを用いて**1**-Cu^{2+}存在下での切断操作を行ない各々の部位（**1**のDNA結合部位と切断部位）の比較を行なった。

ここで簡単にフットプリンティング法の原理について述べる。原理を示す模式図を図2-18に示す。フットプリンティング法は元来DNA結合性タンパク質のDNA上での結合部位を知るために開発された手法であるが、全く同じ様に、比較的低分子のDNA結合性薬物にも応用できる[58~60]。以下、順を追って図2-18を説明する。1）DNAフラグメントにDNA結合性タンパク質を作用させて複合体を得る。DNAフラグメントの5'または3'の片末端は放射性リン標識を施してある。2）複合体にDNaseIを作用させると、まんべんなくかつランダムにDNAを切断するが、タンパク質などが結合していると、その部位での切断が抑制（DNaseIの接近がブロックされる）される。3）従って、ブロックされた部位に対応する長さのフラグメントの生成が抑えられる。4）DNaseI処理して得られたDNAフラグメントを変性し、尿素を含む適当な濃度の変性ポリアクリルアミドゲルを用いてゲル電気泳動を行ない、各々の長さのフラグメントを分離する。5）このゲルからオートラジオグラフィーによりX線フィルムにラダー状のバンドを得る。このバンドの消失パターンと、同時に平行に泳動させたMaxam-Gilbert反応[61]のパターンとの比較から、DNA結合性タンパク質の結合部位を知ることができる。

2-5-1　ビスアクリジン（1）の結合選択性

図2-19に^{32}P-5'末端標識された216bpのDNAフラグメントを用いた**1**共存下のDNaseIフットプリンティングの結果を示す。右側の四

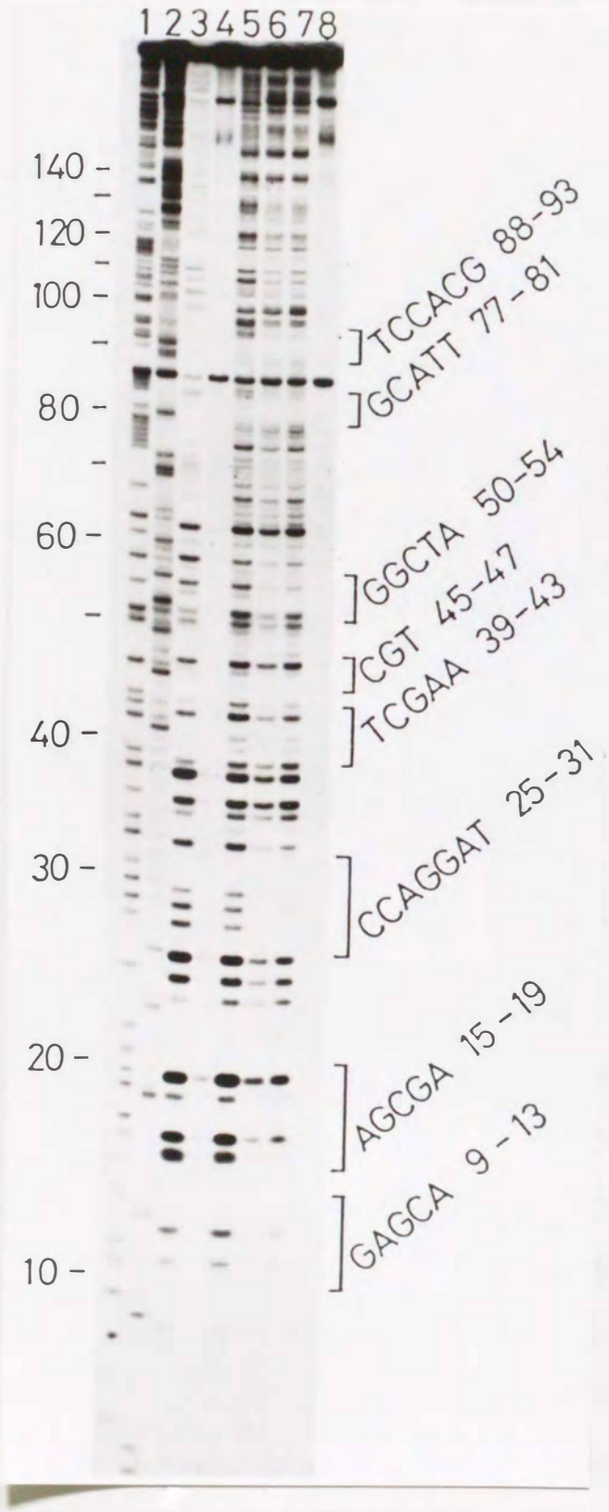


図2-19　1のDNaseIフットプリンティング．40pM DNA-phosphate，レーン3～8はそれぞれ，0，0.05，0.13，0.25，0.30，0.50の[1]/[DNA-p]　で1を添加している．レーン1，2はそれぞれMaxam-GilbertのA/G，C/T反応．8%ポリアクリルアミドゲルで2000Vで泳動後X線フィルムに感光させた．

表2-2　ビスアクリジン1の結合選択性。

塩基配列 5'-X-Y-3'	全X-Yの数	結合 X-Y の数	占有率: 結合XYの数 全XYの数	配列選択性: 占有率 0.35
(X-Y)	(139)	(48)	(0.35)	(1.00)
C-G	6	6	1.00	2.86
G-G	2	2	1.00	2.86
G-C	6	4	0.67	1.91
A-G	9	5	0.56	1.60
G-A	11	6	0.55	1.57
C-A	12	4	0.33	0.94
A-T	12	4	0.33	0.94
T-C	10	3	0.30	0.86
T-T	11	3	0.27	0.77
C-C	8	2	0.25	0.71
T-A	8	2	0.25	0.71
G-T	4	1	0.25	0.71
A-C	10	2	0.20	0.57
A-A	14	2	0.14	0.40
T-G	7	1	0.14	0.40
C-T	9	1	0.11	0.31

角形で囲まれた部分は、**1**によってブロックされた部位を示している。CPKモデルから、**1**は、DNAの2～3塩基対にまたがって結合できる大きさをもつことがわかったので、塩基配列選択性を評価する際には、**1**が2塩基配列を認識するものと仮定した。図2-19に示すシークエンスゲル（8%ポリアクリルアミド）で140の塩基配列を読み取ることができた。即ち、この中には139個の2塩基の配列（**1**の認識し得る座席）が存在することになる。そのうち**1**によってプロテクトされている2塩基配列は図2-19より48個存在していたので平

均して48/139 即ち0.35の割合で**1**が結合していると考えられる。従って可能な16個の塩基配列のそれぞれのうち**1**に占められている割合が、0.35よりも高いか低いかによって結合選択性を評価し、その値を表2-2にまとめた。配列選択性が1.0より大きい場合、**1**がその配列に好んで結合し、また、1.0より小さい場合、その配列から排除されていることを意味している。**1**は5'-CG-3'、5'-GG-3'、5'-GC-3'に強く結合し、逆に5'-CT-3'からは強く排除されていることがわかった。

2-5-2　ビスアクリジン（1）共存下でのCu^{2+}によるDNAの切断反応

図2-20には図2-19と同じDNAフラグメントのCu^{2+}-**1**による切断のようすを示す。レーン3をみると、2-4のスーパーコイルDNAのときと違ってCu^{2+}のみではわずかな切断活性しかもたないことがわかった。一方、ビスアクリジン**1**を共存させた場合（レーン4、5）には、切断効率がかなり上昇し、Cu^{2+}のみで4週間反応させたもの（レーン6）とほぼ同程度であった。さらにレーン4と5とを比較するとCu^{2+}の活性は**1**の濃度が低い方が効果的である。このことは、DNAに結合するカチオン性の**1**の濃度は、さらに結合しなければならないCu^{2+}のことを考えると、あまり高すぎてはいけないことを示している。

また、**1**のみでは、ほとんどDNAを切断することはできなかった（データは示していない）。DNAの形態、濃度などの条件が全く異なるので、このことは先の2-4の結果（**1**とCu^{2+}の競争的な関係）

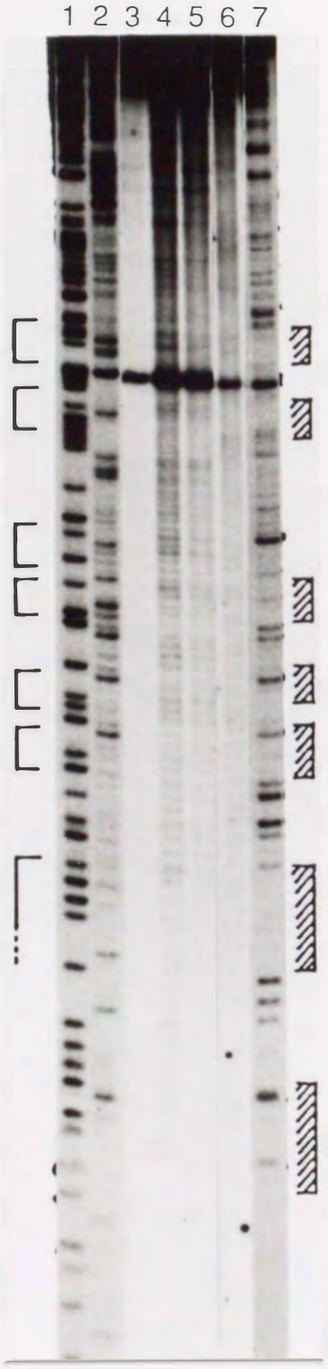


図2-20　1-Cu^{2+}系によるDNA切断
40pM DNA-phosphate. 200pM Cu^{2+}（レーン3～6），レーン3, 6は1を含まずそれぞれ12時間, 2週間インキュベート（37℃）. レーン4, 5はそれぞれ20pM, 200pMの1を含み, 12 時間37℃でインキュベートしたもの. レーン7はフットプリンティング. [は切断部位,]はフットプリント部位（1結合部位）を示す. レーン1, 2はそれぞれMaxam-GilbertのA/G, C/T反応. 8%ポリアクリルアミドゲルで2000Vで泳動後, X 線フィルムに感光させた.

と矛盾するとは言えない。一方、キナクリンのみでは、ほとんどDNAを切断することはできず、Cu^{2+}を共存させても切断増強部位は見あたらなかった（データは示していない）。

2-5-3　考察

Cu^{2+}のみでのDNAの切断パターン（図2-20、レーン6）とCu^{2+}-1系での切断パターン（レーン4、5）は全く異なっていた。後者には、明らかにバンドパターンに濃淡が存在し、特定部位での切断の増強が示唆される。しかしながら、スーパーコイルDNAの系（2-4）で示したのと同様に、1の濃度を上げると切断は抑制された。即ち、カチオン性の1の結合により、DNAのトータルの負電荷が減少しカチオン種がDNAに近づきにくくなったのであろう。このことは、適当なカチオンの存在は、DNAと1の形成する擬環状複合体を安定化し、その生成を促進するという初めの仮定に相反するものである。Cu^{2+}のイオン半径は、Mg^{2+}と非常に近いが、Cu^{2+}は“かたい”金属イオンではないのでポリエチレングリコール鎖や、DNAのリン酸とのとの強い結合は期待されない。これら2つの金属の錯体化学は全く異なっており、1の金属共存下でのDNAへの結合を明確にするにはさらに検討が必要である。

図2-20でのCu^{2+}、Cu^{2+}-1により切断されたフラグメントの泳動バンドは非常に明瞭で、しかもそのバンド間隔、位置はMaxam-Gilbert反応のそれと全く一致していた。さらにDNaseIフットプリンティングのバンドと比較すると半塩基分遅れていた。これらのことは、Cu^{2+}、Cu^{2+}-1系のDNA切断は、切断箇所の3'末端にリン酸を

残していることを示している。図2-21にはMaxam-Gilbert反応、DNaseI処理後の切断箇所の末端の分子構造を示している。

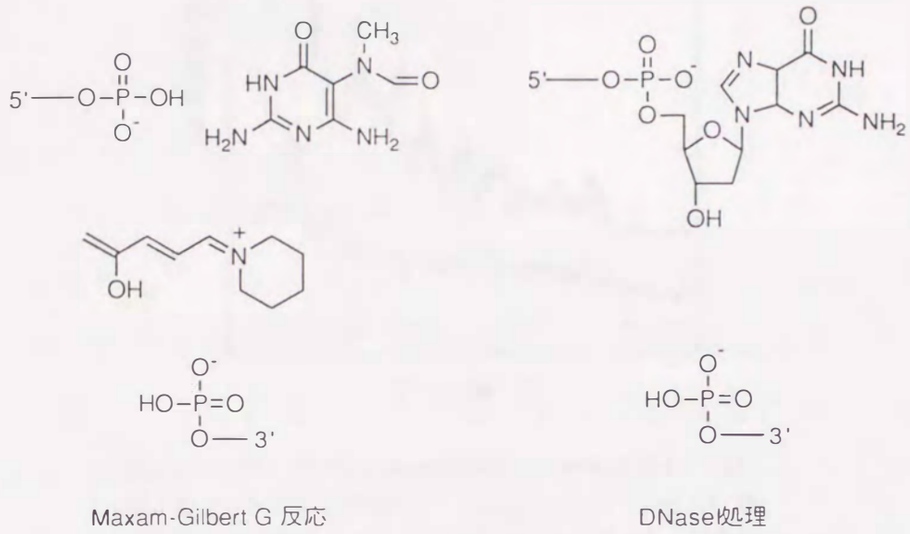


図2-21　Maxam-Gilbert反応（G反応）とDNaseI処理後のDNAの切断箇所の分子構造．Maxam-Gilbert反応では塩基のメチル化の後ピペリジンを反応させている．

図2-22にCu^{2+}-1の切断部位と結合部位の相関を示す。両者はかなりの良好な一致を示し、本研究開始当初の仮定であるCu^{2+}と1の協同効果がでていると言ってもよいだろう。すなわち、Cu^{2+}は1とDNAの形成する擬環状エーテル中に入り、1とDNAの両方に同時に結合し、ルイス酸触媒としてDNAのリン酸ジエステル結合の加水分解を助けていると考えることができる（図2-1）。しかしながら表2-1に示した1の結合定数に与える金属の効果、図2-20に示した1高濃度での切断抑制などを説明することはできない。

これを受けて以下の２つの異なる切断機構を考えた。一つめは、２-４でも述べたとおり1がDNAに結合することで誘起されるDNAのひずみによるものである。1のビスインターカレーションにより

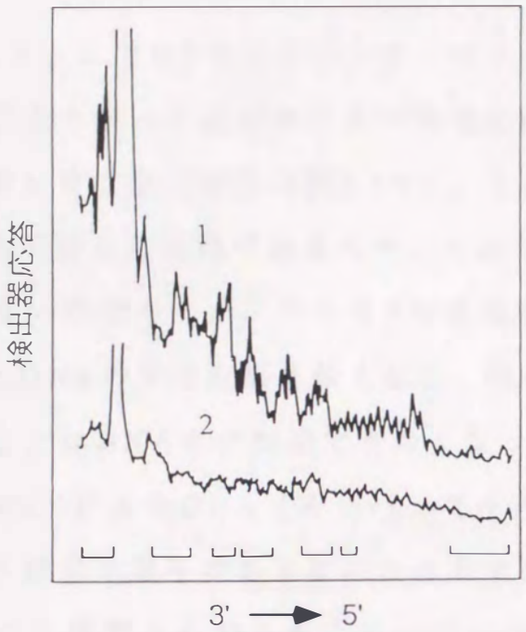


図2-22　Cu^{2+}-1系でのDNA切断部位と1の結合部位．1は図2-20のレーン4（1共存下），2は図2-20のレーン6（1 非共存下）をデンシトメータでスキャンしたもの．下の括弧はフットプリンティング部位を示す．

DNAへの局所的なひずみの誘起が余儀なくされ、そこがCu^{2+}による加水分解を受け易くなる。この機構では必ずしもCu^{2+}はDNA-1複合体の形成する空孔内に結合する必要はなく、もし1がDNAのマイナーグルーブから結合していればCu^{2+}は逆のメジャーグルーブから作用し、ひずみのかかったジエステル結合は容易に加水分解される。しかし、1の濃度が高すぎるとDNAのトータルの負電荷は減少し、Cu^{2+}はたとえ1の裏側からであってもDNAに接近し難くなる。二つめの機構は、今までの加水分解とは全く異なり、$Cu^{+} \rightarrow Cu^{2+} + e^{-}$の反応により還元されて生じた活性酸素種によるラジカル機構である。ヒドロキシラジカルはDNA鎖のむきだしになった部分を効率的に切断することが知られており、DNAの構造プローブとして使用されて

いる[62~64]。やはりここでも1のビスインターカレーションによって生じたひずみが引金となって近傍のリボース環がむきだしになり、活性酸素種の攻撃を受け易くなる（図2-17）。ここでは直接反応に関与するのは拡散可能な化学種であるので、なおさらCu^{2+}はDNAに結合する必要はないのであるが、やはり1の濃度が高くなると静電反発のためCu^{2+}とDNAの平均距離は長くなり、特に寿命の短いヒドロキシラジカルなどはDNAまで到達できなくなってしまう。Basilらによると[50]、Cu^{2+}によるDNA（スーパーコイル型）の切断には、かなりのラジカル機構の関与があるということであるので、この二つ目の機構はかなり重要なものと考えている。さらに、図2-20のCu^{2+}-1系の切断はDNAバンドが明瞭で、切断されたフラグメントは全て一様に3'末端にリン酸を残していることがわかった。実際、切断後のプラスミドDNAフラグメントにT4リガーゼ（3'-OH、5'-リン酸のみをつなぐことができる）を作用させたところ、全くライゲーションは起こらなかった（データは示していない）。もし非常に単純な加水分解であるならば、5'側と3'側にリン酸を残す確率はあまり変わらないという報告もある[50]。

このように、ラジカル反応説で以上の現象がかなり説明できるのであるが、反応系中には、ヒドロキシラジカルを与え易い過酸化水素や、Cu^{2+}の還元剤などを共存させていないのでヒドロキシラジカルの効率的な発生は望めない。さらに単純なリン酸エステルがCu^{2+}で効率的に加水分解されることは古くから多くの研究者によって確かめられており[65]、これがDNAのリン酸ジエステルで起こってもなんら不思議はない。いずれにしてもCu^{2+}-1系のDNA切断機構に満足な説明を与えるには、さらに詳細な検討を加える必要がある。

2-6　結言

Cu^{2+}とビスアクリジン1の協同的な作用によって温和な条件下、DNAを切断することができた。そしてその切断部位選択性は主として1のインターカレーション部位選択性に支配されており、本研究はDNAの切断においてCu^{2+}とインターカレータの協同作用を示したはじめての例である。

切断機構においてはリン酸ジエステル結合の加水分解が示唆されたが、酸化還元反応によるラジカル過程のような他の機構も否定できない。リン酸エステルの加水分解は古くから数多く知られているが[65]、DNAに関する研究は最近になるまでほとんど行なわれていなかった。本章で述べた手法が制限酵素のような選択性をもつDNA切断試薬の設計において重要な指針となることを願うものである。

第３章　連結鎖が電気化学的活性部位をもつビスアクリジン型化合物

3-1　緒言

近年の分子生物学のめざましい発達により、現在までに多くの遺伝子の構造解析がなされ、生命現象の解明に大きく貢献している。これに伴い、特定の塩基配列を有する遺伝子を簡便に、しかも高感度に分離・分析する手法の開発が強く望まれている。

本章ではこれを実現する手法として、潜在的に高感度化の可能性を持つと考えられる電気化学的検出に着目した。しかしながらDNAは電気化学的に不活性である。活性化も可能ではあるが、それには測定前に構造破壊的な前処理が必要である。したがって、非破壊的で可逆的なDNAのラベル化を可能にすることができれば、DNAを非常に簡便にしかも高感度に検出することが可能となると考えられる。このように電気化学的活性なDNA結合性配位子の研究は、電気化学を利用したDNAの高感度検出プローブとして、さらにはDNA-配位子相互作用の研究の新しい方法論としても潜在的な重要性を有している。

DNAとの相互作用研究のプローブとしてこれまでに幾つかの酸化還元活性なDNA結合性インターカレータ[66~68]や、金属錯体[69,70]の研究が行なわれている（図3-1）。しかしながら、DNAの電気化学的高感度検出を目的とした酸化還元活性配位子による非共有結合的（可逆的）ラベル化剤の研究は、酸化還元活性を有するDNA結

合性配位子が限られているために、これまでにはほとんど行なわれていない。

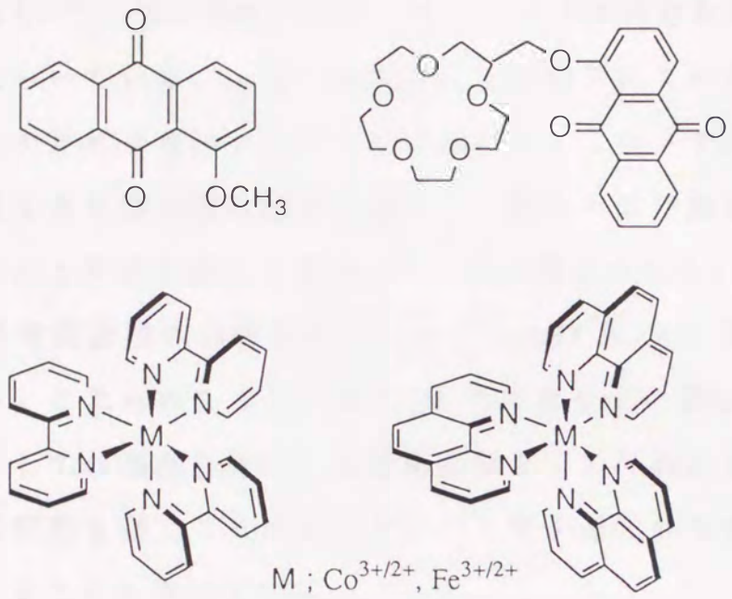


図3-1　報告されている酸化還元活性DNA結合性配位子.

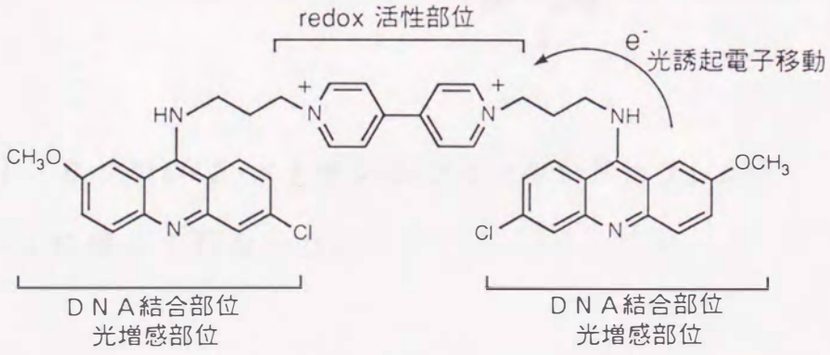
第２章においては、金属配位性連結鎖を有するビスインターカレータの設計を行なったが、本章ではこの連結鎖として酸化還元活性部位を用いたDNA結合性配位子について述べる。

メチルビオローゲンは、酸化還元活性であり、さらに効果的にDNAに結合することが知られている。さらにアクリジン環がDNAに強くインターカレートすることは広く知られており、第２章でも証明済みである。したがって、ビオローゲンを連結鎖としたビスアクリジン**2**は、非共有結合的で可逆的なDNAの電気化学的ラベル化剤としての可能性をもち、これを用いてDNAの高感度検出が可能になると考えられる。

さらにビスアクリジン**2**にはもう１つの機能が期待できる。それは**2**の分子内の光励起電子移動を利用した新しいタイプのDNAの切

断試薬としての応用である。DNAに結合した異なる配位子間（エチジウムブロミドとメチルビオローゲン）の光励起電子移動が既に報告されており[71]、そこではメチルビオローゲンは強力な電子受容体としてはたらいている。一方、除草剤として知られているパラコートはこのメチルビオローゲンそのものであり、このメチルビオローゲンの１電子還元体が溶存酸素を還元し、種々の活性酸素種を発生させることによりその活性を発現していると考えられる。DNAがこのような活性酸素種の作用を受けやすいことは２-４で既に述べた通りである。これらのことは、**2**が、そのアクリジン部位を（DNA結合部位としての機能以外に）光増感部位として可視光を吸収し、分子内電子移動を通してビオローゲンの１電子還元体を生成させることができることを示している。

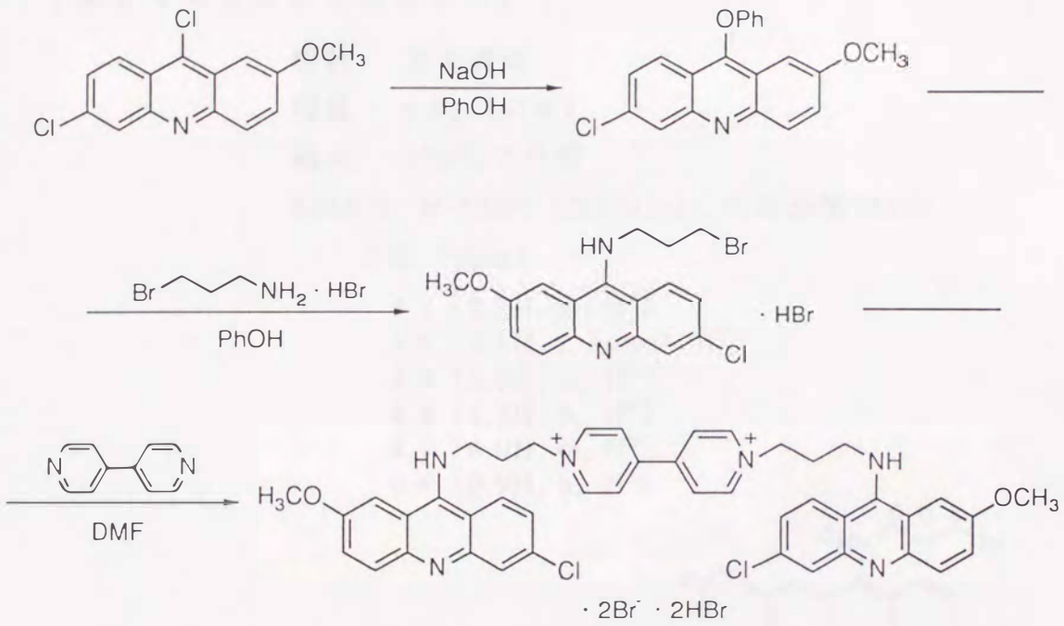
本章では、ビスアクリジン**2**のこれら２つの可能性について検討を行なった。



2

3-2　1-1'-ビス[3''-[9'''-(6'''-クロロ-2'''-メトキシアクリジルアミノ)]プロピル]-4,4'-ビピリジニウムブロミド二臭化水素酸塩（2）の合成

ビスアクリジン2の合成反応を以下にまとめて示す。

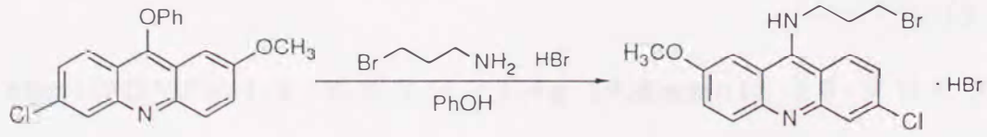


2

3-2-1　6-クロロ-2-メトキシ-9-フェノキシアクリジン[37]

2-2-1に準じて行なった。

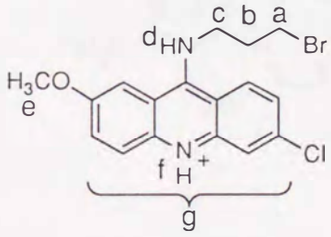
3-2-2　9-[1'-(3'-ブロモプロピルアミノ)]-6-クロロ-2-メトキシアクリジン臭化水素酸塩[37]



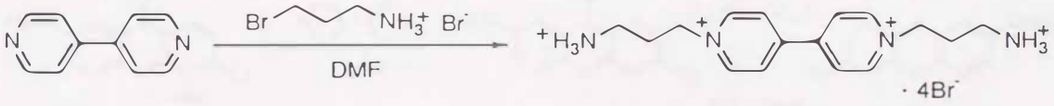
(3-1)

100mlのビーカーにフェノール40g、6-クロロ-2-メトキシ-9-フェノキシアクリジン13g（35mmol）を入れ、これに3-ブロモプロピルアミン臭化水素酸塩7.7g（35mmol）を加え、加熱して溶解させた。続いて2時間120℃で加熱撹拌。反応溶液を500mlエーテルに注ぎ、生じた沈澱をろ取、メタノールから再結晶した。TLCより1成分であることを確認した。

性状　黄色固体
収量　9.8g（61%）
融点　220℃で分解
60MHz ^{1}H-NMR（DNSO-d_6, 内部基準TMS）
δ値（ppm）
3.1（2.2H, m, H^b）
3.6（2.1H, t, J_{a-b}=7, H^a）
3.9（5.0H, m, $H^{c,e}$）
4.2（1.3H, b, H^d）
8.1（6.0H, m, H^g）
9.6（0.9H, b, H^f）



3-2-3　1,1'-ビス(3''-アミノプロピル)-4,4'-ビピリジニウムブロミド二臭化水素酸塩

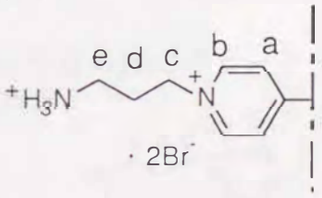


(3-2)

60mlのDMFに4,4'-ビピリジン1.4g（9.6mmol）と3-ブロモプロピルアミン臭化水素酸塩8g（37mmol）を溶解し、アンプル管中で

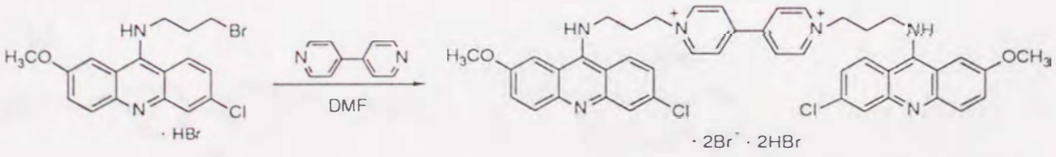
脱気封管後100℃で加熱撹拌。2時間で白黄色固体が析出してきたが、さらに8時間加熱を続けた。析出した固体をろ取し、DMFで数回洗浄した。乾燥後、^{1}H-NMRから微量の副生成物（3-ブロモプロピルアミンが1つだけ結合したもの）を確認したので、水-DMFから再結晶して精製した。

性状　白黄色固体
収量　1.6g（28%）
融点　>250℃
バイルシュタインテスト　陽性
400MHz 1H-NMR（D_2O, H_2O基準）
δ値（ppm）
2.49（2.0H, quin, J_{d-e}=7.8, J_{d-c}=7.8, H^d）
3.18（1.9H, t, J_{e-d}=7.8, H^e）
4.76（2.0H, t, J_{c-d}=7.8, H^c）
8.58（2.1H, d, J_{a-b}=6.7, H^a）
9.16（1.9H, d, J_{b-a}=6.4, H^b）



3-2-4　1-1'-ビス[3''-[9'''-(6'''-クロロ-2'''-メトキシアクリジルアミノ)]プロピル]-4,4'-ビピリジニウムブロミド二臭化水素酸塩（2）

(a)

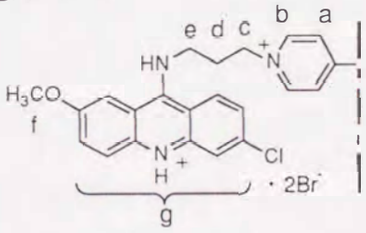


（3-3）

60mlのDMFに9-[1'-(3'-ブロモプロピルアミノ)]-6-クロロ-2-メトキシアクリジン臭化水素酸塩1.8g（3.9mmol）、4,4'-ビピリジン

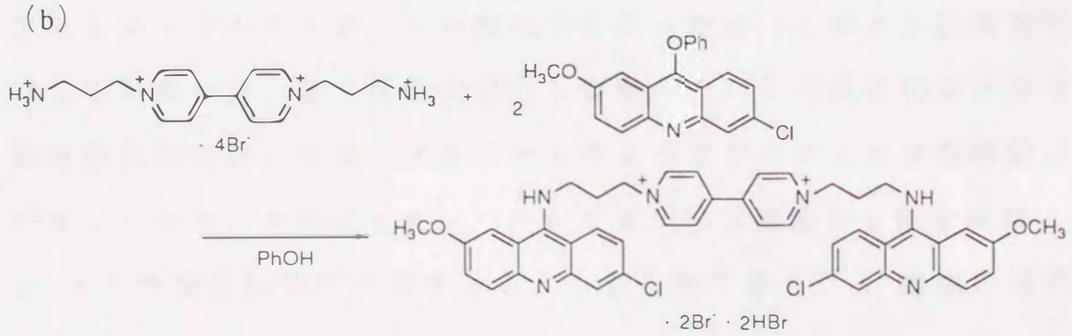
0.15g（0.96mmol）を溶解し、アンプル管中で脱気封管後95℃で加熱撹拌した。3時間ほどで黄色固体が析出してきたが、さらに続けて17時間加熱撹拌した。放冷後、黄色固体をろ取した。この固体の1H-NMR測定から、1箇所しか4級化されていない副生成物が主成分であった。しかし水から2回再結晶することにより目的物を得ることができた。

性状　黄色固体
収量　0.11g（11%）
融点　>250℃
400MHz ^{1}H-NMR（D_2O, H_2O基準）
δ値（ppm）
2.64（2.1H, m, H^d）
3.87（3.0H, s, H^f）
4.18（1.7H, m, H^c）
7.23～7.91（6.2H, m, H^g）
8.06（2.0H, m, H^a）
8.85（2.0H, m, H^b）
cのピークは、4.7ppm付近のH_2Oのピークに隠れていると思われる



元素分析	*H*	*C*	*N*%
実測値	3.97	47.39	7.40
計算値($C_{44}H_{42}N_6O_2Cl_2Br_4 \cdot 2H_2O$)	4.17	47.46	7.55

(b)



(3-4)

100mlのビーカーにフェノール100mlを入れ、これに6-クロロ-2-メトキシ-9-フェノキシアクリジン3g（8.9mmol）を加え、80℃でこれを溶解させた。続いて1-1'-ビス(3'-アミノプロピル)-4,4'-ビピリジニウムブロミド2臭化水素酸塩1.0g（1.7mmol）を加えて120℃で5時間加熱撹拌した。放冷後、反応混合物を500mlエーテルに注ぎ、生じた赤褐色固体をろ取した。この固体が半ばオイル状であったので、これを少量のメタノールに懸濁して再びエーテルに注ぎ、茶褐色固体を得た。この粗生成物の^{1}H-NMRからかなりの不純物を含むが、主成分は目的物と考え、数回メタノールで洗浄してメタノール不溶物と可溶物についてそれぞれ^{1}H-NMR可溶物についてそれぞれを測定した。しかしながら相変わらずピークは複雑であり、解析が困難であったので、このルートでの合成を断念した。

粗生成物　性状　茶褐色
　　収量　0.8g
　　融点　>250℃

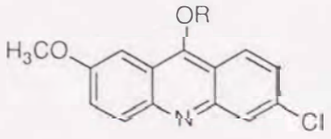
3-2-5　まとめ

収率は低いが、（3-3）の合成ルートにより目的物である**2**の合成法を確立することができた。（3-3）の合成ルートは、はじめは、アセトニトリルやメタノール溶媒で行なったが（このとき脱気封管はしていない）、全く反応が進行しなかった。この反応のような求核置換反応においては、メタノールのようなプロティックな溶媒は好ましくなく、さらにメタノールがビピリジン窒素のα位を攻撃し、α-メトキシ付加体が生成することも知られており[72]、溶媒の選択

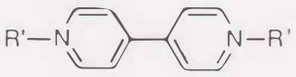
ミスであった。アセトニトリルについては、ビオローゲンを合成するのにしばしば使用される溶媒であるが、目的物はビオローゲンとしてはかなり立体的に込み入ったものであり、高収率を得るためには、さらにきびしい反応条件が必要であったと考えられる。

これとは別に同じ反応、（3-3）を条件をきびしくするためにオートクレーブを用いて200℃、100atm、24時間の加熱撹拌という条件で行なった。原料の溶解性のため、やはりここでもメタノール+エーテルを溶媒に用いた。この反応で形状の揃ったきれいな白黄色針状結晶が得られたが、この結晶の^{1}H-NMRの芳香環部分には、明らかに6種のプロトンしか存在せず、この化合物にはビオローゲン構造がないことがわかった。元素分析の結果などを併せて考えるとこの結晶は下に示すような構造をもつ化合物であることが推定された。また、反応混合物のろ液は濃青色を呈しており、ビオローゲンの還元体の生成が示唆された（しかし、空気中ですぐに再酸化を受けて無色になった）。これは、ビオローゲンが生成したものの条件がきびしすぎたためにアクリジンの9位の2級アミン部分が分解し、アクリジンのみが不溶物となって析出したと考えられる。

結局、最終的には、DMF溶媒、脱気封管95℃で目的の反応が進行したが、ビピリジンにアクリジンが1つ結合した段階でこれが反応溶液から析出してしまい、目的のジピリジニウム塩を主成分とすることはできなかった。溶媒を再検討するか、またはさらに温度を上げて長時間加熱撹拌すれば、もっと高収率で目的物を得ることができるかも知れない。



白黄色針状結晶



ろ液

3-3 DNA-ビスアクリジン（2）の平衡解析

インターカレータのDNAに対する結合定数は、通常、結合状態、非結合状態のスペクトル（吸収スペクトル[73]、蛍光スペクトル[74]）の差、透析[75]、フィルターバインディング[76]、などからScatchard解析[40]によって求める。しかしながら、その相互作用が複雑な化合物、例えば複数の結合部位を有するポリインターカレータなどは、その解析が非常に難しい。このような化合物のDNA結合性を大まかに知るにはその相互作用様式、結合定数がよく知られているエチジウムブロミドを基準として用いた追い出し法（Ethidium displacement assay）が有効である[74、77、78]。

この手法は、DNAとエチジウムブロミドを所定の濃度で共存させた溶液に、結合定数が未知の化合物を添加してゆき、はじめに結合していたエチジウムブロミドのうち半分（50%）を解離させるのに必要な濃度でその結合力を評価するものである。DNA 1μM-p、エチジウムブロミド1.26μMのときこの濃度をC_{50}（μM）として表記する。当然のことながらこのC_{50}は結合定数、Kとの間に相関をもち、これから求めることのできるKにより、目的とする化合物のDNAに対する総括的な結合力を評価できる。

本節では、Scatchard解析（吸収スペクトル）とエチジウムブロミド追い出し法の両方の手法で結合平衡の解析を行ない、ビスアクリジン**2**の結合定数Kと占有座席数nを算出した。

3-3-1　Scatchard解析とエチジウムブロミド追い出し法

図3-2に示すように、ビスアクリジン**2**のDNA共存下での吸収スペクトルに深色シフトと淡色シフトが観察された。これはDNA結合性色素に特徴的な挙動であることから、**2**は明らかにDNAと相互作用していることがわかった。このスペクトル変化（図3-3）からScatchard解析を行なった。Scatchardプロットを図3-4に示す。図中の実線は式(1)に示すMcGhee & von Hippelによる理論線[79]である。

$$\frac{\nu}{C} = K(1-n\nu)\left\{\frac{1-n\nu}{1-(n-1)\nu}\right\}^{n-1} \qquad (1)$$

この理論線は、上に示す式を非線型の最小二乗法で最適化してKとnを決定し、得たものである。

このとき$K=1.72\times10^{5}M^{-1}$、n=3.8bpであった。この値は、同じ条件下での金属捕捉能をもつビスアクリジン**1**（第２章）の結合定数、$K=4.0\times10^{5}M^{-1}$よりもやや小さい。分子設計の段階では、この酸化還元活性ビスアクリジン**2**は４つの正電荷をもつことから、大幅な結合定数の増大（**1**に比較して）を期待していたわけであるが、実際には全くこの予想は外れたわけである。

そこで**2**の可視部の吸収スペクトルからアクリジン環のpK_aを測定した。pHの変化に伴うA_{442}の変化を図3-5に示す。この結果**2**のpK_aはほぼpK_{a1}～4.0、pK_{a2}～7.5であった。結合定数の検討はpH=8.0で行なったために、このとき**2**のほとんどはジカチオン体として存在していたことがわかった。したがって、電荷の点では**1**と実質的に差がないことがわかった。これに加えて、**2**の非常にリジッドな

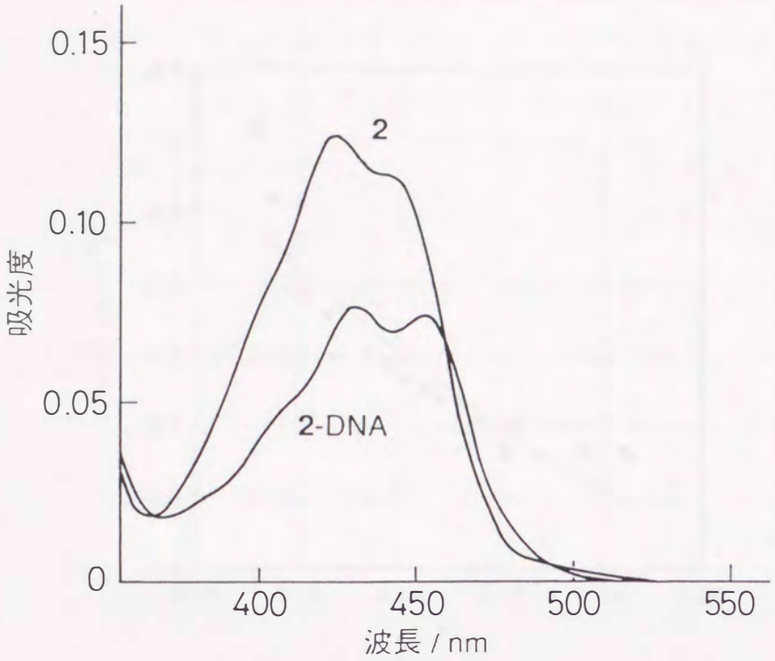


図3-2　DNA添加に伴う2の吸収スペクトル変化.
10μM 2, 150μM DNA-phosphate, 0.1mM Tris-HCl,
0.1M NaCl, 25℃

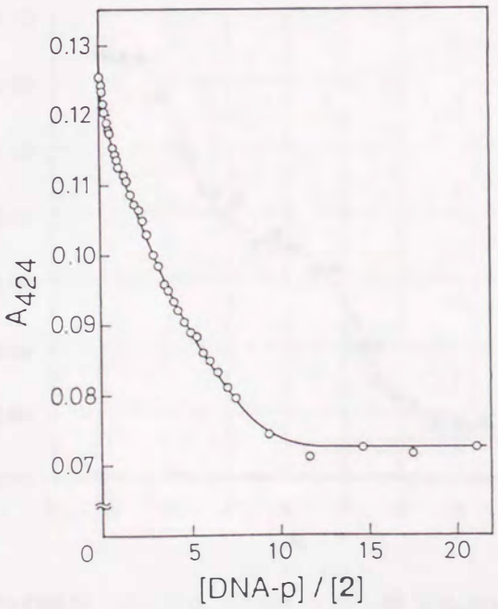


図3-3　DNA添加に伴う2の吸光度変化.　図3-2の結果から424nmの吸光度をプロットした.

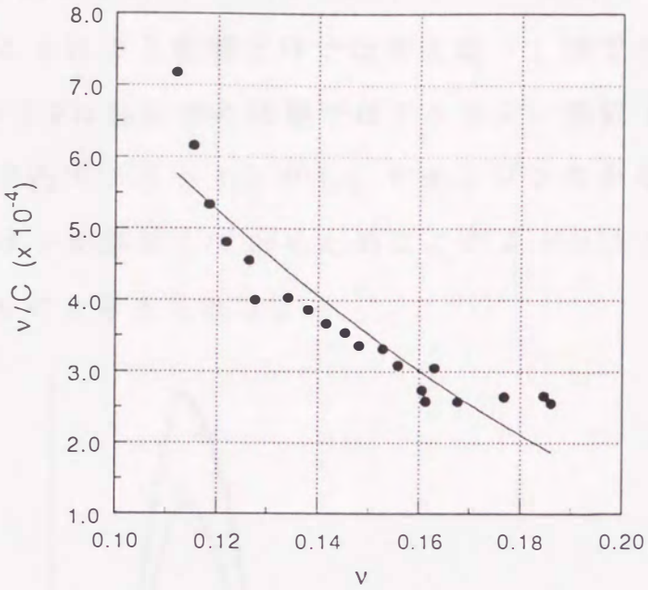


図3-4　2-DNAのScatchardプロット．0.1mM Tris-HCl（pH8.0），0.1M NaCl, 25℃, DNAは超音波照射して精製した仔牛胸腺DNAを用いた．

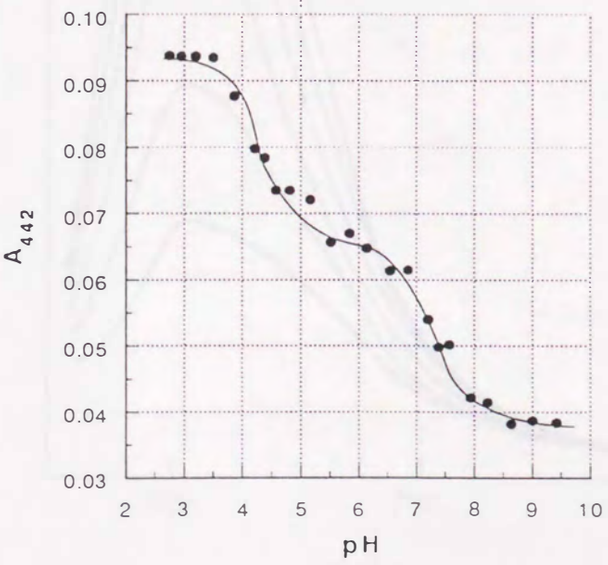


図3-5　2のpH滴定．5μM 2, 5.7mM クエン酸, KH_2PO_4, ホウ酸, ジエチルバルビツール酸（pH2.6）に5M $NaOH_{aq.}$を滴下してpHを上げA_{442}を測定した．25℃

分子構造を考えると、この程度のK値が妥当な値かもしれない。

このpKaの大きな変化（9.95→4.0）は単に構造的に正電荷が近傍に存在することによる影響だけでは考え難い。後でも述べるが（3-9-2）、恐らく**2**は非結合の状態ではアクリジン部位とビオローゲン部位とが分子内でスタッキングし、アクリジンのかなり近傍にビピリジルカチオンが存在しているためにこのような大きなpKa変化が観察されたものと考えられる。

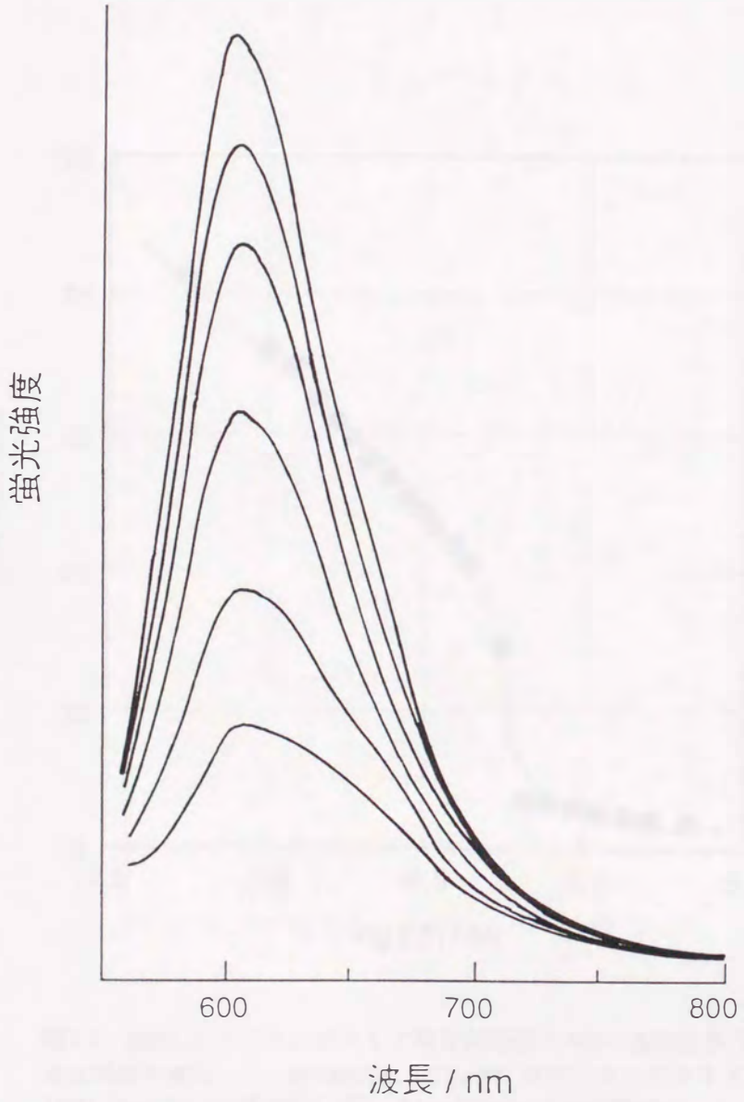


図3-6　DNA-エチジウムブロミド複合体溶液への**2**の添加に伴う蛍光スペクトル変化．1μM DNA-phosphate, 1.25μM エチジウムブロミド, 1mM Tris-HCl（pH8.0）, 25℃, λ_{ex}=546nm

次にエチジウムブロミド追い出し法について述べる。エチジウムブロミドはDNA結合に際し、蛍光が大きく増大することが知られているが[60]、これを利用してエチジウムブロミドの50%が解離した点（目的化合物のC50値）を簡単に知ることができる。図3-6にDNA-エチジウムブロミド系に2を添加していったときの蛍光スペクトルの変化（λ_{ex}=546nm）を示す。

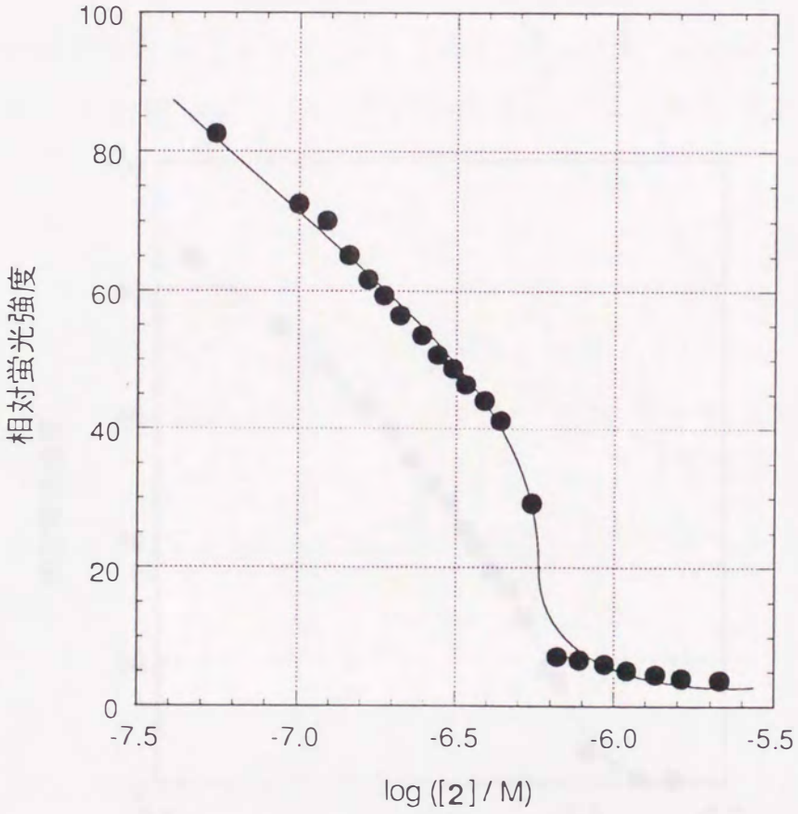


図3-7　DNA-エチジウムブロミド複合体溶液への2の添加に伴う蛍光強度の変化.　1μM DNA-p, 1.25μM　エチジウムブロミド, 1mM Tris-HCl, 0.1M NaCl, 25℃, λ_{em}=595nm, λ_{ex}=546nm

2の添加に伴い、DNA上でのエチジウムブロミドと2の交換が起こり、次第に蛍光が減少していることがわかる。過剰に2を添加すると、エチジウムブロミドは遂に完全にDNAから解離してしまい、その蛍光スペクトルは、エチジウムブロミド単独のものと一致する。このスペクトルの蛍光強度I_{595}を2の濃度の対数に対してプロットしたものを図3-7に示す。このプロットから50%のエチジウムブロミドが追い出された点、C_{50}を求めるとC_{50}=0.29（μM）であった。

図3-8には、NaClを加えずに同様の測定を行ない、得られたI_{595}-log([2]/M)プロットを示す。この条件で求めたC_{50}は0.087であった。

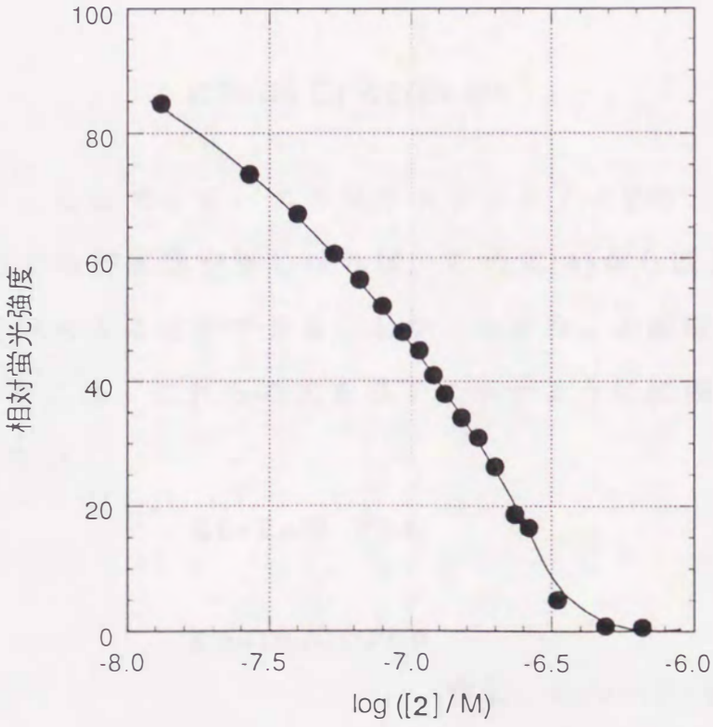


図3-8　DNA-エチジウムブロミド複合体溶液への2の添加に伴う蛍光強度の変化．1μM DNA-p, 1.25μM エチジウムブロミド, 1mM Tris-HCl, 25℃, λ_{em}=595nm, λ_{ex}=546nm, 図3-6からI_{595}をプロットした．