

脱塩基部位認識分子の開発とDNA修復阻害剤への展開

阿部（貞松），由紀子

<https://doi.org/10.15017/4060264>

出版情報：Kyushu University, 2019, 博士（創薬科学），論文博士
バージョン：
権利関係：

氏 名	阿部(貞松) 由紀子		
論 文 名	脱塩基部位認識分子の開発と DNA 修復阻害剤への展開		
論文調査委員	主 査	九州大学 教授	佐々木 茂貴
	副 査	九州大学 准教授	谷口 陽祐
	副 査	九州大学 教授	王子田 彰夫
	副 査	九州大学 教授	平井 剛

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

DNA は様々な要因により絶えず損傷を受けており、生じた損傷は多様な修復機構により速やかに修復される事で正確な遺伝情報が維持されている。中でも塩基除去修復機構は、核酸塩基の酸化やアルキル化等による損傷の修復に関与しており、修復過程においては損傷塩基を取り除き、脱塩基部位 (AP サイト) を生じる。この修復中間体である AP サイトもまた DNA 損傷として働き、塩基除去修復過程の阻害による AP サイトの蓄積は細胞毒性や変異の原因となる。このような背景のもと、AP サイトの修復阻害は既存抗がん剤の作用増強剤、また新規抗がん剤の創薬ターゲットとして注目を集めている。そこで本研究では、AP サイト修復阻害に基づく抗がん作用増強剤すなわち DNA 修復阻害剤を開発する事を目的に、AP サイトの化学的性質に基づく特異的結合分子の合成、それらの結合特性や反応性の解明、特異的結合分子の AP サイト修復阻害効果が検討された。

まず、AP サイト特異的結合分子として核酸塩基とポリアミンの結合体リガンドが設計された。本リガンドは AP サイト内において欠失した核酸塩基を補い、相補位置の塩基と塩基対を形成する事で AP サイトを特異的に認識し、ポリアミン部はリン酸アニオンとの静電的相互作用によりリガンドの DNA 親和性を高めることが期待された。核酸塩基-ポリアミン結合体リガンドは、これまで合成された AP サイト結合分子に比べて最もシンプルな構造である。核酸塩基部としてアデニン、グアニン、シトシン、チミン、およびウラシルを持つリガンドが合成され、これらのリガンドの AP サイトに対する結合特性を明らかにし、塩基対形成による AP サイト認識の一般性確認が検討された。

結合特性の評価は AP サイトアナログとしてテトラヒドロフラン (THF) 環を導入したオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) を用いて、2 本鎖の融解温度測定、表面プラズモン共鳴 (SPR) および等温滴定カロリメトリー (ITC) による測定によって行われた。その結果、各リガンドは THF 環を有する 2 本鎖 ODN に対してそれぞれの核酸塩基部に応じた選択的な安定化効果をもたらした。ITC により測定した結合の熱力学的パラメーターから、リガンドと THF 環を有する 2 本鎖 ODN との結合はリガンド核酸塩基部の AP サイト内での水素結合やスタッキング相互作用に由来する事が示された。これらの結果より、リガンドの AP サイト内での塩基対形成に基づく AP サイト認識の一般性、有効性が示された。

次に、リガンドの AP サイトに対する反応性が調べられた。リガンドポリアミン部はリン酸アニオンとの静電的相互作用による 2 本鎖 ODN への親和性の獲得に加えて、AP サイト β -脱離反応の求核剤とし

ての役割が期待された。AP サイトの β -脱離反応により生じる断片は AP サイト修復にかかわる塩基除去修復機構において、ポリメラーゼの複製を阻害し、AP サイト修復を阻害する 3'ブロックとなることから、修復阻害剤としてのリガンドの作用が期待された。

リガンドによる β -脱離反応はデオキシウリジンを含む 2 本鎖 ODN からグリコシラーゼを用いて調整した AP サイトを含む 2 本鎖 ODN を用いてリガンドの塩基選択性や反応効率等が調べられた。その結果、ピリミジン塩基を有するリガンドでは AP サイトに対する β -脱離反応は顕著ではなかったが、プリン塩基を有するリガンドでは効率的に β -脱離体の生成を促進し、塩基除去修復を阻害する 3'ブロックを効率的に生じる事が明らかとなった。更に、AP サイトを認識し 1 本鎖切断を触媒する酵素 APE1 の反応に対するリガンドの作用が検討され、プリン塩基を有するリガンドによって生成する β -脱離体が APE1 の AP サイト切断を阻害し、修復反応を阻害する 3'ブロックとして働く可能性が示された。

次に AP サイト修復阻害効率を高めるため 3'ブロックの効果的な生成を目的に新たにチオグアニンリガンド (S G-リガンド) が設計された。チオグアニンはピリミジン塩基と光環化反応を経て共有結合を形成する事、また AP サイト β -脱離断片と共役付加反応により共有結合を形成する事が期待された。THF 環を有する 2 本鎖 ODN を用いて光反応が検討された結果、 S G-リガンドは THF 環の 3'側にシトシンを有する配列と光反応し共有結合により付加体を形成する事が HPLC 分析や質量分析から示された。一方、実際の AP サイトを含む 2 本鎖 ODN と S G-リガンドとの反応は、光照射なしに行われ、期待通り β -脱離断片とリガンドとの付加体が形成された。ゲル電気泳動、HPLC 分析、質量分析より、 S G-リガンドが AP サイト認識後、 β -脱離反応を誘起し、引き続き β -脱離断片と付加体を形成する事が明らかにされた。 S G-リガンドと β -脱離断片との付加体は AP サイト修復系において β -、 δ -脱離断片よりも強力な 3'ブロックとなる事が期待される。

DNA アルキル化剤の細胞毒性に対する核酸塩基-ポリアミン結合体リガンドの増強作用の *in vitro* 予備検討として、CHO 細胞株と A549 細胞株を用いて DNA アルキル化剤メチルメタンスルホナート (MMS) の A-, G-リガンドによる細胞毒性増強効果が調べられ、リガンドと MMS との併用による MMS 毒性の増強作用が確認された。

本研究では、核酸塩基-ポリアミン結合体リガンドを開発し、AP サイト空間内での核酸塩基部の塩基対形成に基づき AP サイト特異的に結合し、 β -脱離反応による効果的 AP サイト切断を実現した。更に、核酸塩基部にチオグアニンを有するリガンドでは β -脱離反応に続き、チオカルボニルと β -脱離断片との付加体が形成されることを明らかにした。これらの結果は AP サイト修復を阻害する 3'ブロック体の形成によってアルキル化抗がん剤の細胞毒性を増強する可能性を示す独創的なアプローチであり、本研究は博士（創薬科学）の学位に値すると認める。