

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：26860079

研究課題名(和文) DNA脱塩基部位に対する特異的結合および切断分子の開発

研究課題名(英文) Development of selective binding and cleavage ligands for the AP sites

## 研究代表者

阿部 由紀子 (Abe, Yukiko)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：40586856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脱塩基部位(APサイト)に特異的に結合し切断する分子リガンドをAPサイト検出プローブおよび抗がん剤の作用増強剤へと展開する事を検討した。本研究期間を通じてアデニンおよびグアニンリガンドのin vitroによる細胞実験を行い、その細胞毒性効果を明らかにし、DNAアルキル化剤MMSとの併用により細胞毒性効果がわずかながら増強される事を明らかにした。また、親和性向上を目的とした4,4-トリアミンを有するグアニンリガンドを新規合成し、そのAPサイト親和性および切断能を明らかにした。向上には至らなかったもののリガンドのAPサイト結合および切断における重要な情報が得られた。

研究成果の概要(英文)：DNA is continuously damaged by endogenous and exogenous factors. In the base excision repair pathway, the damaged nucleobases are removed by DNA N-glycosylase to form AP sites. The AP site is representative DNA damage and the alkylating antitumor agents exhibit cytotoxicity through the formation of the AP site. Therefore blockage or modulation of the AP site repair pathway may enhance the antitumor efficacy of DNA alkylating agents. We studied the effects of nucleobase-polyamine conjugates (G-, A-ligands), which specifically bind and cleave at the AP site, on the potentiation of the cytotoxicities by the alkylating agents. In the combined application of the ligand and DNA alkylating agents MMS, the G- and A-ligands showed the potential of the enhancement of antitumor efficacy. Therefore we designed and synthesized the new ligand having the high affinity and cleavage activity to AP sites. The new ligand showed the affinity to the AP sites but have only a modest cleavage activity.

研究分野：有機化学

キーワード：b-脱離 抗がん作用増強

1. 研究開始当初の背景

DNA中の核酸塩基の酸化やアルキル化は、高い変異原性を有するDNA損傷の一つであり、細胞内では脱塩基部位 (AP サイト) と呼ばれる中間体を経由し修復される。アルキル化抗がん剤の多くはDNA中にアルキル化損傷塩基を生成し抗がん効果を発揮するが、アルキル化塩基の修復過程に生じるAPサイトの細胞毒性もまた抗がん効果の一因である。ニトロソウレア系の抗がん剤とAPサイト結合分子との併用により抗がん効果の増強が観察されたとの報告もある。そのため、APサイトの修復を阻害する物質は、そのものの新規抗がん剤としての可能性だけでなく、抗がん剤との併用による抗がん効果の増強剤としても期待される。詳細は未解明であるもののAPサイト結合分子は抗がん効果との関連において魅力的な標的である。

核酸塩基とポリアミンの結合体は、APサイトと対をなす位置の核酸塩基に応じて塩基配列特異的に結合するAPサイト認識分子である (図1)。本分子の核酸塩基部分はAPサイト内でG:C, A:Tの相補的なワトソン-クリック塩基対形成を再現し、隣接塩基対とのスタッキング相互作用の寄与によりAPサイト内で安定化する。また、ポリアミン部分はDNAリン酸部との非特異的な静電的相互作用によりDNA2本鎖に対する親和性を高めるだけでなく、APサイト部位特異的に1本鎖切断をも引き起こす。しかし、その詳細な切断機構および切断産物の解明は未だなされていなかった。

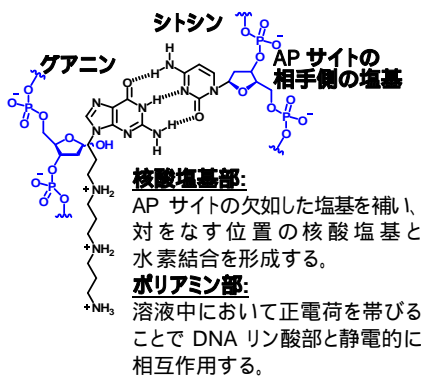


図1 核酸塩基-ポリアミン結合体によるAPサイト認識

2. 研究の目的

本研究では、これまでに明らかとなった核酸塩基-ポリアミン結合体のAPサイト認識および切断作用の詳細を解明し、結合および切断能を向上させた新規APサイト認識分子を開発する。これらの性質を応用する事により、APサイト検出プローブおよび抗がん剤の作用増強剤へと展開する事を目的とする。

3. 研究の方法

本研究課題では、APサイト認識および切断能を向上させた新規リガンドの開発にあ

たり、まず結合および切断作用の詳細解明を行う。次に、得られた情報を基に蛍光基の導入検討、最適なポリアミン構造の検討を行い、検出プローブおよびAPサイト親和性向上を期待した新規分子の合成を行う。

具体的には、本分子の切断作用はポリアミン部の一部の中性アミンによるAPサイトへの求核攻撃であり、β-脱離反応が起こっていると考えられた為、これを確かめる為に蛍光標識したAPサイトを有するODNを用いてAPサイト切断反応を行い、その切断産物をHPLC分析し、質量分析により切断断片の分子量を決定する事を計画した。得られた情報からより良いポリアミン部の長さや構造を検討し、新規APサイト認識分子を合成する。そのうち、APサイトを有する短鎖ODN2本鎖を用いてUV/Vis分光計による融解温度測定を行い、新規分子の有無におけるAPサイト安定化効果を検証する。更に、新規分子とAPサイトとの切断反応をHPLC分析およびゲル電気泳動により経時的に観察し、その切断効率についても検証する。これらの情報を基に、ヒト肺がん細胞由来A549細胞やヒト乳がん細胞由来MCL-7細胞などのがん細胞株にDNAアルキル化剤単独投与および新規分子との併用投与を行い、細胞生存率を指標として分子の抗がん効果増強剤としての可能性についても検証する。

4. 研究成果

核酸塩基-ポリアミン結合体によるAPサイト切断作用を解明する為に、核酸塩基としてグアニンを持つ分子、グアニンリガンドを用いてAPサイトを有するODN2本鎖との切断反応を行いHPLC分析により各ピークを分取した。これらのMALDI-TOFMS測定を行い反応産物の分子量決定を行った。基質となるAPサイトを有するODNは反応開始から2時間程度で完全に消失し、新たに得られたピークはAPサイトのβ-脱離により生じると予想される切断断片と分子量が一致した。

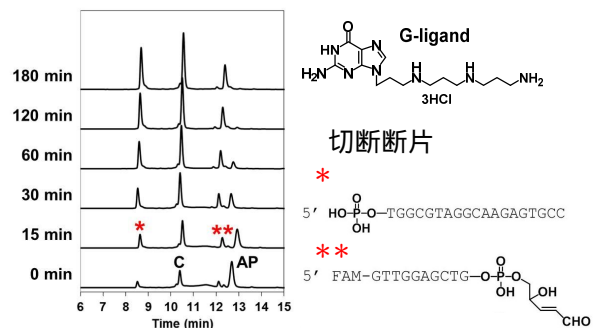
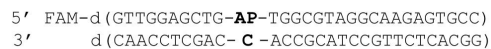


図2 グアニンリガンドによるAPサイト切断反応

これらの結果から、本リガンドのAPサイト切断は、最も核酸塩基部に近くpKa値の低いアミンの求核攻撃によるβ-脱離反応であり、

切断産物として $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和アルデヒドが3'末端に結合した構造が出来ている事が確認できた(図2)。

また、新規分子の評価における予備検討としてアデニンおよびグアニンリガンドの *in vitro* 感受性試験を行った。計39系のがん細胞株を用いたがん細胞パネル評価ではアデニンおよびグアニンリガンドそのもののがん細胞増殖阻害効果はほとんど観察されなかったが、A549細胞やMCF-7細胞など比較的感受性の高い細胞株についての情報が得られた。更に、A549細胞を用いてアデニンおよびグアニンリガンド単独またはDNAアルキル化剤メチルメタンサルホナート(MMS)との併用による細胞生存率の比較を行い(図3)、わずかではあるもののリガンドの併用によりMMSの細胞毒性が増強される事を明らかにした(表1)。

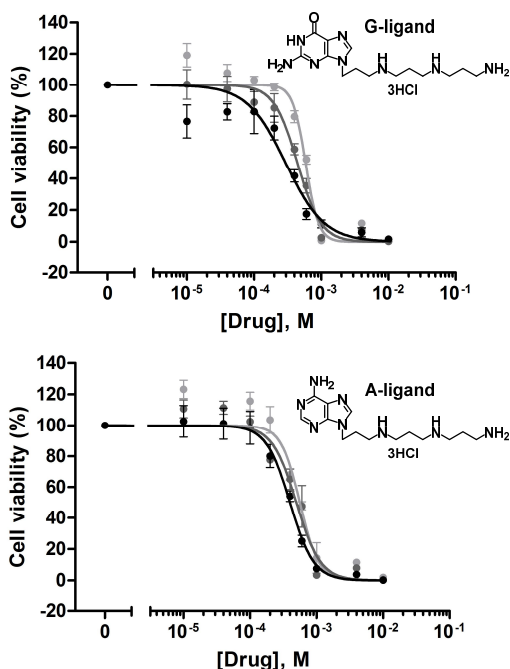


図3 アデニンおよびグアニンリガンドによるMMSの細胞毒性効果増強

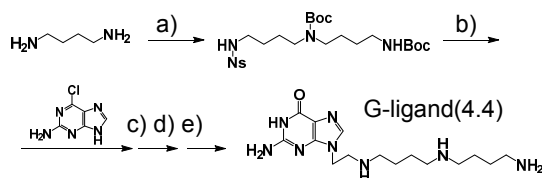
表1 IC<sub>50</sub>値

	MMS 単独	G-ligand	
		+10 $\mu$ M	+50 $\mu$ M
A549	585.5 $\mu$ M	442.2 $\mu$ M	295.2 $\mu$ M
	MMS 単独	A-ligand	
		+10 $\mu$ M	+50 $\mu$ M
A549	561.7 $\mu$ M	497.2 $\mu$ M	399.5 $\mu$ M

Cell viability and IC<sub>50</sub> values were determined with curve-fitting analysis (nonlinear regression curve, variable slope) provided by GraphPad Prism4 software.

得られた結合および切断作用の詳細な情報から、蛍光基の導入と最適なポリアミン部の構造について検討した結果、蛍光基についてはポリアミン部の静電的相互作用を阻害しないよう2-アミノプリンに変更し蛍光性の核酸塩基類似体を導入する事にした。また、ポリアミン部は当初生体アミンの導入を予

定していたが、4,4-トリアミンが細胞内取り込みに有利であるとの文献を参考に、新規分子を設計・合成した(図4)。



a) c.f. Gardner R. A. et al. J. Med. Chem. 2004, 47, 6055-6069. b) 1,2-Dibromopropane, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dry DMF c) 2-amino-6-chloropurine, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dry DMF d) 0.5M HCl/MeOH, 60°C e) thiophenol, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dry DMF

図4 新規リガンドの合成

新規合成した4,4-トリアミンを有するグアニンリガンドについて $\beta$ -脱離反応の起こらない安定なAPサイトアナログを持つ2本鎖ODNを用いて融解温度測定を行った(表2)。APサイトと対をなす位置の核酸塩基がシトシンの場合に高い $\Delta T_m$ 値(+6.1°C)の上昇が観察され、従来の3,3-トリアミンを持つグアニンリガンド同様、高い塩基選択性が得られたが、顕著な結合親和性の向上には至らなかった。

表2 融解温度測定

	duplexes	+G-ligand (4.4)	$\Delta T_m$
AP/A	37.23	39.97	<b>+2.74</b>
AP/G	37.56	38.56	<b>+1.0</b>
AP/C	32.95	39.09	<b>+6.14</b>
AP/C	36.76	38.93	<b>+2.17</b>

The selective stabilization effects of the G-ligand (4.4) to the duplex ODN containing the AP site. [duplexes]: 4  $\mu$ M, [ligand]: 20  $\mu$ M, [NaCl]: 100mM. 5'-d GCG TAC AP CAT GCG-3' and 5'-CGC ATG X GTA CGC-3'. AP and X represent the tetrahydrofuran part and the nucleobase opposite the AP site, respectively.

また、新規分子のAPサイト切断活性についてもゲル電気泳動を用いて評価を行い、APサイトと対をなす位置の核酸塩基がいずれの場合においても、切断活性が低い事が明らかとなった(図5)。

5' FAM-d (GTTGGAGCTG-AP-TGGCGTAGGCAAGAGTGCC)  
3' d (CAACCTCGAC-X-ACCGCATCCGTTCTCACGG)

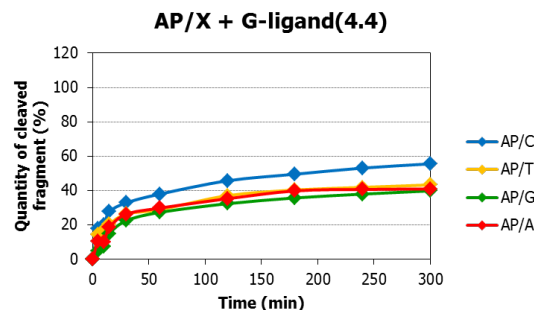


図5 新規G-リガンド(4.4)による $\beta$ -脱離反応

今回合成した4,4-トリアミンを有するグアニンリガンドはエチル基で核酸塩基部分とポ

リアミン部を連結しており、従来のプロピル基で連結したグアニンリガンドよりも短くなる。これにより AP サイト反応部位とポリアミン部の求核性のアミンの距離が遠くなり切断反応性が低下したと考えられる。本結果は目的とした親和性および切断能向上には至らなかったが、核酸塩基部とポリアミン部の結合距離が切断反応に大きな影響を与える事を明らかにした。

以上の結果は、今後の AP サイト検出プローブおよび抗がん剤の作用増強剤への展開において重要な情報となり、構造のさらなる最適化および細胞実験において役に立つと考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Abe S. Y., Sasaki S. DNA cleavage at the AP site via  $\beta$ -elimination mediated by the AP site-binding ligands. *Bioorg. Med. Chem. 査読有*, vol. 24, 2016, pp. 910-914, DOI: 10.1016/j.bmc.2016.01.016

〔学会発表〕(計 1 件)

Yukiko Abe, Shigeki Sasaki, DNA cleavage at the AP site by nucleobase-polyamine conjugates, The 43<sup>rd</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2016, 2016 年 9 月 27 日, 熊本大学工学部百周年記念館 (熊本県熊本市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bioorg.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

阿部 由紀子 ( Abe Yukiko )

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：40586856