真核細胞 DNA トポイソメラーゼ I 阻害剤の作用メカニズム†

田村悦臣, 池上洋二*

(名古屋市立大学薬学部, *明治薬科大学)

はじめに

DNA トポイソメラーゼは, DNA のトポロジーを変換する酵素で, 1971 年 Wang⁽¹⁾により最初の報告がなされて以来, 原核細胞から高等動物にいたるまで広く存在することが知られ, 転写, 複製, 組換え等, DNA 代謝に関与する酵素であることが, 近年明らかとなってきた⁽²⁾. とくに最近, 抗癌剤のターゲット酵素であることが明らかとなり⁽³⁾, 研究が加速してきている.

DNA トポイソメラーゼは, その反応メカニズムから 2つのタイプに分類される. タイプ I (トポイソメラーゼ I) は, DNA の 1 本鎖切断と再結合を介して, また, タイプ II (トポイソメラーゼ II) は 2 本鎖の切断と再結合を介して DNA のトポロジー変換を行っている. 一般に I 型は ATP 非要求性, II 型は要求性である.

DNA トポイソメラーゼの阻害剤として最初に見出されたのは, 現在広く臨床に应用されているナリジキシン酸に代表されるジャイレース (タイプ II) 阻害剤である. これらの阻害剤の阻害のメカニズムについては既に多くの報告があり, ここでは省略し, 本稿ではとくに真核細胞の DNA トポイソメラーゼ阻害剤, なかでも DNA トポイソメラーゼ I 阻害剤に焦点をあて, 筆者らの行った研究を中心に紹介する.

トポ I 阻害剤—カンプトテシン

カンプトテシン (camptothecin; CPT) は中国原産の喜樹と呼ばれる植物 *Camptotheca acuminata* から単離されたアルカロイドで図 1 のような構造をしている. CPT は 20 年以上も前から抗腫瘍作用が知られていたが⁽⁴⁾, その作用メカニズムについては不明であった.

CPT は培養細胞に対して S 期に特異的な細胞毒性を示し, DNA の断片化を引き起こす. しかし, 多くの抗腫瘍剤が持つ DNA に対する塩基間挿入 (intercalation) 活性はもたない. DNA, RNA 合成を強く阻害することから, 核酸代謝のいずれかの段階に作用するものと予想されていた. 1985 年 Liu ら⁽⁵⁾は CPT が *in vitro* で子牛胸腺由来の DNA トポイソメラーゼ I (以下トポ I と略す) の活性を阻害し DNA の断片化を引き起こすことを示し, CPT の作用メカニズムの解明がスタートした.

トポ I の反応機構は現在, 図 2 のようなメカニズムが考えられている. まず, トポ I は DNA に結合し (1), 次に DNA の一方の鎖を切断し同時に自身のチロシン残基を介して 3' 側のリン酸に結合し (2), もう一方の鎖が切れ目を通過後 (3), 切断点を再結合する (4). (2)→(4) の反応を繰り返すことにより超らせん DNA を弛緩すると考えられている. この反応の特徴は (2) の反応中間体をとることである. この中間体は非常に短命のものであるが SDS やアルカリなどの変性剤で処理することにより検出できる. CPT をトポ I の反応系に加えると (2) の中間体が蓄積することが Liu らにより示され, CPT は反応中間体を安定化することによりトポ I の反応を阻害していることが明らかとなった. CPT により DNA が断片化することも上の阻害メカニズムより説明される.

CPT のトポ I 阻害のメカニズムをさらに明らかにし, 新たな抗腫瘍剤の開発を目指して, われわれは, 広島大学医学部岡田らがヒト T 細胞白血病細胞 RPMI 8402 より樹立した CPT 耐性細胞 CPT-K5 のトポ I の解析を行った. 耐性細胞のトポ I を精製したところ酵素自体 CPT に対して 125 倍以上耐性になっていることがわかり, 蛋白レベルでの変異が起こっていることが予想された⁽⁶⁾. そこで, 酵素の遺伝子を単離してどのような変異が起こっているかをしらべた. 親株, 耐性株のおのの cDNA ライブラリーからトポ I cDNA を単離し塩基配

† Mode of Inhibition of Eukaryotic DNA Topoisomerase I Inhibitors.

Hiro-omi TAMURA and Yoji Ikegami* (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Mizuho-ku, Nagoya 467; *Department of Biopharmaceutics, Meiji College of Pharmacy, Setagaya-ku, Tokyo 154)

図 1 カンプトテシンとその誘導体 CPT-11 の構造

* 7-ethyl-10-(4-(1-piperidyl)-1-piperdyl)-carbonyloxy-CPT

図 2 DNA トポイソメラーゼ I の反応様式

列を決定したところ、C末側 1/3 付近に 2 カ所のアミノ酸の置換が見出された。さらに、おのおのの cDNA を大腸菌内で発現させて CPT に対する感受性を見たところ、耐性細胞由来の cDNA を発現させたものは、やはり CPT に耐性であった。以上のことより、2 カ所のアミノ酸の変異の、相方もしくは一方が CPT 耐性に関与していることが明らかとなった⁽⁷⁾。変異の見つかった領域は、これまでに配列のわかっている他のトポ I の配列と比較すると、良く保存された領域であり、蛋白のこの領域がトポ I の反応、とくに切断、再結合に関与している可能性が示唆される⁽⁸⁾。さらに、西川らの方法による蛋白の三次元構造予測では、この領域は蛋白の表面に露出していることが予想され、親株トポ I では、CPT の結合はこの領域を介して起こり、耐性トポ I ではアミノ酸の変異により CPT が結合できない構造に変わっているものと予想される (図 3)。

以上トポ I 阻害剤 CPT について述べた。次に、われ

図 3 CPT 感受性および CPT 耐性トポ I の反応様式 (モデル)

われが行った新規トポ I 阻害剤トポスチンの研究について述べたい。

トポ I 阻害剤—トポスチン

われわれは新たなトポ I 阻害剤の発見を目指して、約二千種の土壌分離菌についてスクリーニングを行い、*Flexibacter* 属の新菌種 (*F. topotinus* B-572 と命名) より新規トポ I 阻害剤を見出し、トポスチン (Topostin ; TPS) と命名した⁽⁹⁾。TPS は、培養上清より溶媒抽出、吸着、薄層、高速液体クロマトグラフィーにより、数種の近縁化合物として精製された。最も比活性の高い TPS-B は、分子式 $C_{33}H_{63}NO_6$ (分子量 553) と $C_{34}H_{65}NO_6$ (分子量 567) の二種類の化合物の約 1:1 の混合物であることが明らかとなった⁽¹⁰⁾。そして、これらはいずれも新規化合物であることが示された。

TPS は、10 μ M 以下の低濃度でマウスおよびヒト由来のトポ I 活性を阻害するが、トポ II および DNA ポリメラーゼ α 、RNA ポリメラーゼ I、II の活性は阻害しない。また、*E. coli*、*S. aureus* に対する抗菌作用は示さないが、ヒト急性リンパ性白血病細胞 RPMI 8402 に対して増殖阻害を示し、その有効濃度が *in vitro* における酵素阻害濃度と同程度であることから、TPS の阻害は真核細胞トポ I に特異的であり、その細胞内標的は主にトポ I であることが強く示唆された。

TPS のトポ I 阻害様式については、これまでの研究

図 4 TPS と CPT のトポ I 阻害機構のモデル

から以下のことが明らかとなっている。1. DNA に対する塩基間挿入活性は持たない。2. CPT で見られる中間体の蓄積は、TPS では起こらない。3. CPT が非拮抗阻害であるのに対し TPS は拮抗阻害である。4. TPS はトポ I の DNA への結合を阻害する。以上のことから、TPS の阻害の様式は図 4 に示すように、TPS がトポ I に結合し、その DNA との結合を阻害することによりトポ I 活性を阻害すると考えられる。このことは *in vivo* において CPT が DNA の断片化を引き起こすのに対し TPS は起こさないという事実からも示唆される。

おわりに

以上、真核細胞トポ I の阻害剤、CPT、TPS について述べた。そのほかの阻害物質として、酸性リン脂質が、トポ I 活性を阻害するが、その阻害のメカニズムは、TPS と同様に、トポ I と DNA との結合の段階を阻害している⁽¹¹⁾。また、硫酸ヘパリンなどのポリアニオン化合物もトポ I 活性を阻害することが知られている⁽¹²⁾。しかし、それらの阻害の特異性は明らかでない。

ここでは、トポ II 阻害剤についてはふれなかったが、その阻害のメカニズムは、CPT と同様に中間体の安定化によるものが主であり、DNA の断片化を引き起こす⁽¹³⁾。DNA の断片化と抗腫瘍作用の相関性が考えられている。

CPT はその誘導体が制癌剤として臨床的にも有望視されており、現在、世界的規模で精力的にトポ I 阻害剤の研究が行われている。新たな阻害剤の発見が期待される。

(付記)

最後に、ここに述べた研究は、筆者らが、明治薬科大学田無校衛生化学教室において安藤俊夫教授（現、愛知県がんセンター研究所生化学部長）の指導のもとに行ったものであることを記して、ここに感謝いたします。また、TPS に関して共同研究者の山ノ内製薬中央研究所斎藤武博士に感謝します。

- (1) J. C. Wang : *J. Mol. Biol.*, **55**, 523 (1971).
- (2) J. C. Wang : *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 665 (1985).
- (3) L. F. Liu : *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 351 (1989).
- (4) S. B. Horwitz : *Antibiotics*, Vol. III (eds. W. Corcoran and F. E. Hahn), 48 (1975).
- (5) Y.-H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht and L. F. Liu : *J. Biol. Chem.*, **260**, 14873 (1985).
- (6) T. Andoh, K. Ishii, Y. Suzuki, Y. Ikegami, Y. Kusunoki, Y. Takemoto and K. Okada : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5565 (1987).
- (7) H. Tamura, C. Kohchi, R. Yamada, T. Ikeda, O. Koiwai, E. Patterson, J. Keen, K. Okada, E. Kjeldsen, O. Westergaard, K. Nishikawa and T. Andoh : *Nucleic Acid Res.*, **19**, 69 (1991).
- (8) 安藤俊夫, 石井一行, 田村悦臣, 岡田浩佑, 河内千恵 : *細胞工学*, **9**, 111 (1990).
- (9) K. Suzuki, H. Yamaguchi, S. Miyazaki, K. Nagai, S. Watanabe, T. Saito, K. Ishii, M. Hanada, T. Sekine, Y. Ikegami and T. Andoh : *J. Antibiot.*, **43**, 154 (1990).
- (10) Y. Ikegami, N. Takeuchi, M. Hanada, Y. Hasegawa, K. Ishii, T. Andoh, T. Sato, K. Suzuki, H. Yamaguchi, S. Miyazaki, K. Nagai, S. Watanabe and T. Saito : *J. Antibiot.*, **43**, 158 (1990).
- (11) H. Tamura, Y. Ikegami, K. Ono, K. Sekimizu and T. Andoh : *FEBS Lett.*, **261**, 151 (1990).
- (12) K. Ishii, S. Futaki, H. Uchiyama, K. Nagasawa and T. Andoh : *Biochem. J.*, **241**, 111 (1987).
- (13) E. Nelson, K. Tewey and L. F. Liu : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1361 (1984).