発癌性複素芳香族アミンによる化学発癌初期過程の研究から制癌剤分子設計へ

橋本祐一

東京大学薬学部, 〒113, 文京区本郷 7-3-1

Initial Chemical Events Caused by Carcinogenic Heterocyclic Amines and Molecular Design of Anti-tumor Agents

YUICHI HASHIMOTO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo,
7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113, Japan

Initial chemical events caused by carcinogenic 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]-imidazole (Glu-P-1) and molecular design of antitumor agents on the basis of the intercalative ability of Glu-P-1 skeleton are reviewed.

Glu-P-1 binds to deoxyribonucleic acid (DNA) at the 8-position of guanine residues after metabolic activations. Structures of modified nucleic acid base and the activated metabolites were confirmed by alternative synthesis. The pathway of chemical modification of DNA with Glu-P-1 is established chemically, and found to occur *in vivo*. The chemical modification of oncogene *proto-ras* caused transforming activity of the gene toward NIH3T3 cells. In other words, chemical modification of DNA with Glu-P-1 results in cell transformation. The established pathway of the DNA modification provides a fundamental standpoint in the study of chemical carcinogenesis caused by Glu-P-1.

Glu-P-1 possesses intercalative ability toward double stranded DNA. We designed and synthesized polyamino-Glu-P derivatives and Hemin-Glu-P-1 derivatives. Polyamino-Glu-P derivatives were found to possess extremely high affinity toward DNA. Hemin-Glu-P-1 derivatives cleaved DNA efficiently. Hemin-Glu-P-1 derivatives were suggested to cleave DNA in the same mode of reaction as bleomycin: Hemin-Glu-P-1's are functional analogs of bleomycin. The results suggested the possibility of the method of molecular design described might be served for the development of new antitumor agents.

Keywords—2-amino-6-methyldipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1); DNA chemical modification; carcinogen; intercalation; DNA cleavage

I. はじめに

癌は医学・薬学・生物学・化学などの多岐に亘る分野において幅広くかつ精力的に研究されている対象である。一口に癌と言っても様々な癌があるように、その原因も様々なところに求められる。確立されている実験系だけをみてもウイルス発癌, 化学発癌, 放射線による発癌, 刺激 (物理的刺激と食塩の組み合わせなど) による発癌などが挙げられる。人癌の原因が主としていずれに求められるかは別として, 癌の発症機構を化学的に研究する上で化学発癌は優れた実験系であろう。化学発癌実験においてはしばしば人癌臨床例に酷似した癌が発生し, 職業癌の存在や疫学的知見は人癌においても化学発癌の占める割合が決して少なくないことを物語っている。このような観点から, 環境中に存在する発癌性化合物の検索が数年来精力的に行われいくつかの注目すべき事実が明らかにされてきた。その1つは発癌性化合物の加熱調理食品中における存在である (Fig. 1).¹⁾ 図に示す一連の発癌性化合物はいずれも縮合三環性の複素芳香族アミンであり, ヘテロ原子の α 位にアミノ基を有する点で構造的にも類似しており1つの化合物群を形成している。²⁾ こうした発癌性化合物に対する我々の被曝度を正確に求めることはできないが, 通常成人が一日に摂取する各種発癌性複素芳香族アミンの総量は最大 $1.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 程度であろうと推定されている。³⁾ ちなみにこの量はマウスの発癌試験から求められた実質安全濃度 (発癌頻度の上昇が100万個体に1個体の割合である濃度) の約100倍に相当する。³⁾ 筆者らはこれら発癌性複素芳香族アミンの

*本総説は昭和61年度日本薬学会奨励賞受賞業績を中心に記述したものである。

Fig. 1. Carcinogens in Cooked Foods

代謝活性化と deoxyribonucleic acid (DNA) 化学修飾に代表されると考えられる化学発癌初期過程⁴⁾に関する化学研究を行ってきた。それは化学発癌に関する議論の多くが「DNA の化学修飾」という現象の上に成立しており、DNA の化学修飾過程に対して化学的に確実な解答を得ることはこれらの議論すべてに対して確たる立脚点を与えることになると考えたからである。発癌性複素芳香族アミンによる DNA の化学修飾過程については既にいくつかの総説^{2,4-8)}を発表してあるので本総説では前半に筆者らの研究の中から 2-アミノ-6-メチルジピリド [1,2-*a*:3',2'-*d*]イミダゾール (Glu-P-1) に関するものを例にとり得られた解答を簡単に、最近の研究成果を含めて概説する。

一方、筆者らは発癌研究は制癌研究に応用されるべきであると考えてきた。多くの制癌剤はその標的が DNA であり、その点においても制癌研究と発癌研究は重複するところも多い。研究の一例は制癌性抗生物質マイトマイシン C と DNA との反応の解析、3 種のマイトマイシン C 結合ヌクレオチドの構造決定⁷⁻¹²⁾であるが紙面の都合により割愛する。いま 1 つの研究例は上述 Glu-P-1 の DNA 認識能に着目した新規制癌剤の分子設計である。^{13,14)} 多くの制癌剤が DNA に対して高い親和性を有すること、また主要な制癌剤の作用機作の 1 つとして DNA 鎖の切断が考えられることから筆者らはより優れた DNA 認識能を有する Glu-P 誘導体 (ポリアミノ-Glu-P) 及び DNA 鎖切断能を有する Glu-P-1 誘導体 (ヘミン-Glu-P-1) の分子設計を行ってきた。本総説の後半ではこれらの、DNA と相互作用する化合物に関する研究成果を概説する。

II. Glu-P-1 による化学発癌初期過程

II-1. 修飾核酸塩基の構造 Glu-P-1 は小菅・杉村らにより初めグルタミン酸熱分解物中より変異原性を指標として単離された発癌性化合物である。¹⁵⁻¹⁷⁾ Glu-P-1 による化学発癌は DNA 化学修飾により惹起される一連の生化学的反応が原因の 1 つと考えられるが、DNA の化学修飾に対する直接的な解答は修飾された DNA (部分) の構造を決定してはじめて与えられる。そこでまず *in vitro* で Glu-P-1 による DNA 化学修飾を行い、修飾核酸塩基の構造決定を行った。

Glu-P-1 は変異原性発現に代謝酵素系の存在が必要であるが、これに対応して代謝酵素系の存在下にはじめて DNA に共有結合する。この DNA 化学修飾は極めて特異的であり、得られる修飾 DNA を加水分解すると修飾核酸塩基として Gua-Glu-P-1 のみが得られた。Gua-Glu-P-1 を強アルカリにより更に加水分解すると収率よく尿酸と Glu-P-1 が生成した (Chart 1)。この結果及び Gua-Glu-P-1 の各種スペクトルデータから Gua-Glu-P-1

Chart 1. Formation and Degradation of Gua-Glu-P-1

Chart 2. Synthesis of Gua-Glu-P-1

の構造を 2-(グアニン-8-イル)アミノ-6-メチルジピリド[1,2-*a*:3',2'-*d*]イミダゾールと推定し別途合成品との比較からこの構造を確認した.^{18,19)} 別途合成は Glu-P-1 の 3-アセトキシンググアニンに対する 8 位炭素求核置換反応^{20,21)} 及び 2-カルボエトキシアミノ-6-メチルジピリド[1,2-*a*:3',2'-*d*]イミダゾールと 1,2,5-トリアミノ-6-ヒドロキシピリミジンとの縮合環化反応により行った (Chart 2). これらの反応は グアニンの 8 位炭素に発癌性芳香族アミンのアミノ基窒素が結合した修飾核酸塩基の一般的合成法として有用であり, 本法により 3-アミノ-1-メチル-5*H*-ピリド[4,3-*b*]インドール (Trp-P-2),^{22,23)} ナフチルアミン,²⁴⁾ 1-ニトロピレン²⁵⁾ などにより修飾された核酸塩基の合成と同定が成功している.

II-2. 代謝活性体の構造 前節に述べた修飾核酸塩基 Gua-Glu-P-1 の構造は 1) 系としての酸化状態がもとの系に比して一段階上昇していること, 2) グアニンの 8 位炭素が DNA 中の求核中心の 1 つであることなどから Glu-P-1 の代謝活性化の中間体に対応するヒドロキシルアミン, 2-ヒドロキシアミノ-6-メチルジピリド[1,2-*a*:3',2'-*d*]イミダゾール (N-OH-Glu-P-1) であることを示唆する. 芳香族ヒドロキシルアミン誘導体は N-O 結合のヘテロリシスにより炭素求核試薬による攻撃を受けることが確立している.²⁶⁾ そこで Glu-P-1 をラット肝より調製したマイクロゾーム分画で処理し代謝産物を検索した. その結果, 唯一の主代謝産物として N-OH-Glu-P-1 を別途合成品との比較から確認することができた.^{19,27)} 別途合成は Chart 3 に示す方法により行った. 一般に芳香

Chart 3. Synthesis of N-OH-Glu-P-1

族ヒドロキシルアミンに対応するアミンの酸化により得ることは困難であるため, Glu-P-1 を一旦対応するニトロ化合物に酸化し, 次いで部分還元する方法を計画した. Glu-P-1 は種々酸化条件を検討した結果, 過酸化水素-トリフルオロ酢酸-モリブデンヘキサカルボニル-メチレンクロリドという複雑な系で 80—90% の収率で対応するニトロ化合物に酸化できた. これを含水テトラヒドロフラン中, アルミニウムアマルガムにて還元することにより N-OH-Glu-P-1 を得ることができた. この還元反応は 2-ヒドロキシアミノピリジン系や 2-ヒドロキシアミノイミダゾール系などの不安定なヒドロキシルアミン誘導体の合成に有用な一般的方法であると考えている.^{28,29)} 合成した N-OH-Glu-P-1 の構造は元素分析, 核磁気共鳴スペクトル (NMR), 質量分析, 紫外線吸収スペクトル (UV) などにより確認し, 更にニトロソベンゼンとの反応によりフェニルアゾキシ誘導体に導いてヒドロキシルアミノ基の存在を確認した (Chart 3).

II-3. N-OH-Glu-P-1 と DNA との反応 前項で Glu-P-1 の代謝産物としての N-OH-Glu-P-1 の合成と同定について述べた。N-OH-Glu-P-1 が Glu-P-1 による DNA 化学修飾過程における代謝活性化の中間体であることを証明するために、合成した純粋な N-OH-Glu-P-1 を用いて DNA との反応を検討した。

N-OH-Glu-P-1 それ自身は中性条件においても弱酸性条件においても DNA と反応しないいわゆる proximate form (DNA の化学修飾における代謝活性化過程の中間体) であることが分かった。そこで更なる代謝活性化として、ヒドロキシルアミノ基 N-O 結合のヘテロリシスを大きく促進することが確立している O-アシル化²⁶⁾の寄与を推定した。実際、N-OH-Glu-P-1 をケテンもしくは無水酢酸により O-アセチル化し 2-アセトキシアミノ-6-メチルジピリド[1,2-*a*:3',2'-*d*]イミダゾール (N-OAc-Glu-P-1) とすると中性条件下でも効率よく DNA と反応する。得られる修飾 DNA を加水分解すると、*in vitro* で生成したのと同じ Gua-Glu-P-1 が唯一の主修飾核酸塩基として得られた (Chart 4).^{19,27)} このことは Glu-P-1 の ultimate form (DNA との反応に直接関与する究極の代謝活性体) が N-OH-Glu-P-1 の水酸基がアシル化されたものであることを強く示唆している。生体内における O-アシル化としてはアセチル化、スルホン化、ホスホリル化など種々考えられるが、最近加藤らにより N-OH-Glu-P-1 の O-アセチル化が示されている。³⁰⁾ いずれにしても Glu-P-1 の代謝を Glu-P-1 が DNA を化学修飾するために必要な化学変換の過程として捉えるかぎり、N-水酸化による N-OH-Glu-P-1 の生成とそれに引き続く O-アシル化ということで十分に必要な解答が一義的に得られたものと考えている。

Chart 4. Reaction of N-OH-Glu-P-1 with DNA

II-4. 生体内における Glu-P-1 による DNA 化学修飾 以上述べてきたように Glu-P-1 による DNA 化学修飾の過程は化学的に再現することができその実体が明らかとなった。同様の DNA 化学修飾が生体内で生じていることを確認することは Glu-P-1 による化学発癌過程を論じる上においても重要である。筆者らは Glu-P-1 をラットに腹腔内投与し、肝 DNA を抽出して分析した。その結果、唯一の主修飾核酸塩基として Gua-Glu-P-1 を確認することができ、上述の Glu-P-1 による DNA 化学修飾と同様の過程が生体内においても起こっていることを証明した。³¹⁾ Glu-P-1 の結合量は 25 mg/kg の投与量の時に約 20 万ヌクレオチドに 1 分子の割合であり、この値は投与後 8—48 時間の間ではほぼ一定であった。

II-5. インターカレーションの重要性 Glu-P-1 の ultimate form (の 1 つ) である N-OAc-Glu-P-1 とグアニン関連化合物との反応を検討したところ、Glu-P-1 骨格の DNA 塩基対間への平行な挿入 (インターカレーション) の重要性が示唆された。すなわち、N-OAc-Glu-P-1 は二重らせん DNA や相補的ジヌクレオチドであるグアニル (3'→5')シチジンとは効率よく反応し、加水分解により Gua-Glu-P-1 を与えるが一本鎖 DNA、ポリグアニル酸、グアニル酸などでは化学修飾の効率が大きく低下する。²⁷⁾ この結果は N-OAc-Glu-P-1 (もしくはその N-O 結合のヘテロリシスにより生じたカチオン種) のインターカレーションがグアニンとの共有結合形成にとって好都合なためと解釈できる。実際、N-OAc-Glu-P-1 と DNA との反応に際して G-C 塩基対に選択的なインターカレーターであるダウノマイシンを共存させると Gua-Glu-P-1 の生成収率が低下する。³⁷⁾ N-OAc-Glu-P-1 とグアニン残基との反応による Gua-Glu-P-1 の生成は芳香族求電子置換反応であり、中間体として π 錯体を経由すると考えられる。Glu-P-1 骨格の DNA へのインターカレーションにより生ずる複合体のコンフォメーション

ョンはこの π 錯体もしくはそれに近いコンフォメーションを有するものと推定される。このことは山口・板井らによる Glu-P-1 骨格-DNA 複合体の三次元構造に関するエネルギー計算の結果からも支持される。⁸²⁾ すなわち、Glu-P-1 骨格-DNA 複合体のエネルギー的に最も安定なコンフォメーションにおいては反応中心である Glu-P-1 の 2 位アミノ基窒素とグアニンの 8 位炭素とが近い位置にある。⁴⁾ この状態から π 錯体、次いで σ 錯体を經由して Glu-P-1 結合 DNA (Gua-Glu-P-1-DNA) を生成する過程においては、Glu-P-1 骨格は DNA 二重らせん内に他の塩基対と平行に配向してとどまり、グアニン残基が DNA 二重らせんの外側にとび出す (インターカレーティブ共有結合) と考えている。このインターカレーティブ共有結合は、Glu-P-1 骨格に由来するケイ光スペクトルの各種消光剤に対する挙動や Gua-Glu-P-1-DNA の流動二色測定³³⁾ により支持されている。

なお、Glu-P-1 骨格と DNA との物理的相互作用については今村らにより詳細に検討され、以下の結果から Glu-P-1 骨格のインターカレート能が証明されている。すなわち、1) Glu-P-1 の DNA 共存下における紫外線吸収やケイ光の濃度依存的な変化から 10^4 M^{-1} 程度の結合定数が得られた、³⁴⁾ 2) 流動二色法により、DNA に物理的に結合している Glu-P-1 は DNA の塩基対と平行に配向していることが確認された、³⁵⁾ 3) 超らせん環状 DNA の巻き戻し実験により、DNA に物理的に Glu-P-1 が結合すると 1 分子当り $20\text{--}25^\circ$ の DNA 二重らせん巻き戻しを起こすことが示された。³⁴⁾

II-6. Glu-P-1 による DNA 化学修飾の塩基配列選択性 前項で Glu-P-1 による DNA 化学修飾が Glu-P-1 骨格のインターカレーションにより大きく促進されていることを示した。DNA にインターカレートして反応する化合物は塩基配列選択性を示す可能性がある。一方、筆者らは Gua-Glu-P-1-DNA の化学的性質として、Gua-Glu-P-1 部分のグリコシド結合が選択的に加水分解できるのを見出した。すなわち、Gua-Glu-P-1-DNA はその水溶液を加熱すると Gua-Glu-P-1 が定量的に遊離する。これをピペリジン存在下で行えば、DNA は Gua-Glu-P-1 の結合していた位置で切断される (Chart 5)。この一連の反応を、末端を ^{32}P で放射標識した DNA について行い、生成する DNA 断片をマクサム・ギルバート法³⁶⁾ と併用して塩基配列決定用ゲル電気泳動で分析すれば、Glu-P-1 の結合位置が塩基配列のレベルで決定できる。^{37,38)} 結果を Fig. 2 に示す。星印が Glu-P-1 による修飾頻度を示している。C もしくは G にはさまれた G は高頻度に化学修飾を受け、A と T にはさまれた G の修飾頻度は低い。言い換えると Glu-P-1 によるグアニン残基に特異的な DNA 化学修飾は G-C rich region にあるグアニンに選択的であると言える。この塩基配列選択性は、Ames 試験におけるサルモネラ菌 TA 98 の突然変異にかかわる部分塩基配列や、後述する腫瘍遺伝子 *ras* の活性化にかかわる点突然変異の部分塩基配列が比較的 G-C rich であることを考えるとその生物学的意味は小さくないと思われる。

Chart 5. Cleavage of DNA at the Glu-P-1 Bound Sites

Fig. 2. Base-Sequence-Selective Modification of DNA with N-OAc-Glu-P-1

* = relative probability of modification with N-OAc-Glu-P-1.

II-7. 腫瘍遺伝子 *ras* の化学修飾による活性化 以上, Glu-P-1 による DNA の化学修飾過程を Glu-P-1 による化学発癌の初期過程であるとして述べてきた. この DNA 化学修飾過程は化学的に確立したものであり, 生体内でも生じていることを証明したが, それが細胞癌化の直接の原因であることの科学的証明はない. それは細胞の癌化が成立するまでの数々のステップが生物学的・生化学的にも解明されていないからであるが, 最近の腫瘍遺伝子に関する研究は極めて示唆的である. 現在までに 20 種以上の腫瘍遺伝子が報告されているが, 細胞癌化はそれら腫瘍遺伝子のうちのいくつかは活性化 (細胞をトランスフォーメーションさせるという意味で) し協同作用した結果として捉えることができる.³⁹⁾ 筆者らが注目したのは *H-ras* という腫瘍遺伝子である. ヒト正常組織由来の *H-ras* (*proto-ras*) は繁用される検定細胞であるマウス繊維芽細胞 NIH3T3 をトランスフォームする活性を持たないが, ヒト腫瘍組織由来の *H-ras* (*c-ras*) はしばしば NIH3T3 に対してトランスフォーメーション活性を有している. そしてこの非活性型な *proto-ras* と活性型の *c-ras* の違いは 12 番目あるいは 61 番目などのコドンの点突然変異であることが明らかにされている.³⁹⁾ このような活性型 *c-ras* はヒト腫瘍由来の培養細胞の約 20%, ヒト腫瘍手術例からは約 5% の頻度で検出されている. この数字は癌や腫瘍遺伝子の多様性からみて決して低い値ではなからう. *Proto-ras* の点突然変異によるトランスフォーメーション活性の獲得, すなわち *proto-ras* の活性化, の細胞癌化過程における位置は諸説紛々としていて確立していないが, 筆者らは *proto-ras* の活性化が化学発癌の原因の 1 つであると考えて良いと捉えている. そこで Glu-P-1 による *proto-ras* の化学修飾が *proto-ras* のトランスフォーメーション活性獲得の原因となることを証明しようとした. 以下にその研究成果を述べるが, 用いた腫瘍遺伝子はすべて国立がんセンター研究所 関谷剛男博士より供与して頂いたものである.

遺伝子に対して Glu-P-1 による化学修飾が生ずるとその機能が損われることは予想できる. そこでまず, ヒトメラノーマ由来の活性型 *H-ras* を組み込んだプラスミド pSK2⁴⁰⁾ を反応基質として N-OAc-Glu-P-1 と反応させ, 得られる Glu-P-1 結合 pSK2 を NIH3T3 にトランスフェクトし, そのトランスフォーメーション活性を測定した (Table I).^{41,42)} 予想したとおり, Glu-P-1 の結合量の増加に伴い Glu-P-1 結合 pSK2 のトランスフォー

TABLE I. Effect of Reaction with N-OAc-Glu-P-1 on Transforming Activity of pSK2

DNA/N-OAc-Glu-P-1	Binding amount	% of transforming activity remaining
1 : 0	0	100 (=630 foci/ μ g)
300 : 1	1/10000	45
30 : 1	1/ 1200	97
3 : 1	1/ 400	42
1 : 3	1/ 400	40
1 : 30	1/ 200	3

TABLE II. Induction of Focus-Forming Activity Following Reaction of N-OAc-Glu-P-1 with Plasmid Containing Proto-H-ras (pSVMBras-gpt)

DNA/N-OAc-Glu-P-1	Binding amount	Total foci/total plates	foci/ μ g
1 : 0	0	(1)/4	0 (0.01)
30 : 1	1/1500	30/8	0.15
3 : 1	1/ 500	2/8	0.01
1 : 3	1/ 400	9/8	0.05

メーション活性は低下し、200 スクレオチドに一分子の結合量ではほとんどトランスフォーメーション活性が失われる。この結果を参考に反応条件を設定し、*proto-ras* と等価な塩基配列を有する pSVMB_{ras-gpt}⁴³⁾ を用いて同様の実験を行った (Table II)。^{41, 42)} pSVMB_{ras-gpt} そのものには当然のことながらほとんどトランスフォーメーション活性が無いが、これに化学的に Glu-P-1 を結合させて調製した修飾 DNA には確実にトランスフォーメーション活性が認められた。このことは、Glu-P-1 による DNA 化学修飾が *proto-ras* の活性化の直接の原因であることを確実に証明したことになる。化学的に確立してあり生体内でも生じていることを証明してある Glu-P-1 による DNA 化学修飾過程を化学的手法で完成させ、得られる修飾 DNA を細胞内で発現させて細胞をトランスフォームさせたという意味で細胞の癌化過程をある程度人工的に再現できたものと考えている。

生じたトランスフォーマントにおいては、Glu-P-1 による化学修飾の結果として突然変異を生じトランスフォーメーション活性を獲得した *proto-ras* が発現していると考えられる。その一部は 11—12 番目のコドンにおける突然変異であることが、制限酵素 *MspI* を用いた加水分解実験から示唆されている。他のものについてはトランスフォーメーション活性の獲得がいかなる突然変異に帰因するものであるかを現在検討中である。

II-8. 総括 以上、Glu-P-1 による化学発癌初期過程について得られた解答は Chart 6 に示される。Glu-P-1 はまず N-水酸化を受け、さらに O-アシル化された後に DNA と反応し Gua-Glu-P-1 を与える。この反応は DNA 中グアニンの 8 位炭素に特異的であり、修飾されるグアニンは G-C rich region にあるグアニンに選択的である。この過程において Glu-P-1 骨格のインターカレート能は重要な因子となっており、Glu-P-1 の DNA に対する結合はインターカレーティブ共有結合である。この DNA 化学修飾は突然変異の直接的原因であり、*proto-ras* の化学修飾はトランスフォーメーション活性の獲得に至る。言い換えると、Chart 6 に示す Glu-P-1 による DNA の化学修飾過程は化学発癌の直接の原因である。

Chart 6. Initial Events Caused by Carcinogenic Glu-P-1

もちろん、発癌プロモーターやそのモジュレーターなどのエピジェネティックな問題は細胞の癌化過程においてまた別の大変重要な課題であるし、腫瘍遺伝子産物の生物活性やその作用機作、細胞増殖因子とのかかわりなど多くの課題についての研究が急速に進行しつつある。

III. ポリアミノ-Glu-P 誘導体

III-1. デザインと合成 発癌研究は制癌研究に応用されるべきである。筆者らが着目したのは Glu-P 骨格のインターカレート能である。多くの制癌剤は DNA にインターカレートすることにより作用を発現すると考えられており、インターカレーションに着目した制癌剤開発の試みは広く行われている。¹⁴⁾ そこで筆者らはより優れた DNA 認識能を有する Glu-P 誘導体を得ることを目的とした研究を行ってきた。

Glu-P 骨格の DNA へのインターカレート能を生かしつつより優れた DNA 認識能を有する化合物へ誘導する方法として次の 3 つが考えられる。1) Glu-P 骨格そのものを、より DNA 塩基対間空間にフィットする分子型に変換する、2) Glu-P 骨格に対してそのインターカレート能を損うことなく DNA に対して親和性を有する置換基を導入する、3) Glu-P 骨格をスパーサーを介して結合させポリインターカレターとする、の 3 つである。1) の Glu-P 骨格の改変は、DNA にインターカレートして生ずる複合体のコンフォメーションの問題などに遭遇し、分子設計が困難である。一例は、強力なインターカレターである制癌剤エリプチシンとの構造的関連から考案したベンゾ-Glu-P 誘導体である。Fig. 3 に構造とその DNA との結合定数を示すが、6,7-ベンゾ-Glu-P 誘導体のみが Glu-P-2 の約 10 倍の DNA 親和性を有していた。⁴⁴⁾ 上述 2) 及び 3) のタイプとして筆者らは DNA に対して高い親和性を有する スペルミンなどの ポリアミンを Glu-P 骨格に導入した ポリアミノ-Glu-P 誘導体 (GP-Sp, 2GP-Sp, 2GP-Spd) を Chart 7 に示す方法により合成した。^{18,46)} Glu-P 骨格の N-アルキル化の位置はこれらの化合物を 2-ブロムジピリド[1,2-a : 3',2'-d]イミダゾールから別途合成して確認した。

Fig. 3. Structure of Benzo-Glu-P's and their Binding Constants to DNA

Chart 7. Synthesis of Polyamino-Glu-P-Derivatives

a: TsCl, K_2CO_3 , DMF; b: $Br(CH_2)_4Br$, DMF; c: $SOBr_2$, $CHCl_3$; d: N-Tosyl-Glu-P-2, NaH, DMF; e: 47% HBr; f: NH_3 , EtOH; g: $ZnCl_2$, AcBr; h: $TsNH(CH_2)_3OH$, NaH, DMF; i: HCl, MeOH.

III-2. DNA との物理的相互作用 ポリアミノ-Glu-P 誘導体の DNA との物理的相互作用には複数の相互作用様式が存在する。このため、DNA との親和性の尺度として DNA にインターカレートしているエチジウムブロミドを 50% 追い出す濃度 (C_{50} 値)^{21,46)} を測定した (Table III).⁴⁶⁾ ポリアミノ-Glu-P 誘導体はいずれも対応する Glu-P 骨格、2-アミノジピリド[1,2-a : 3',2'-d]イミダゾール (Glu-P-2) に比して極めて高い親和性を有している。ポリアミン部分の構造は DNA に対する親和性に大きく影響し、2GP-Sp のスペルミン部分をスペルミンに置き換えた 2GP-Spd は 2GP-Sp の 1/50 程度の DNA 親和性しか持たない。ポリアミノ-Glu-P 誘導体と

TABLE III. C_{50} Values^{a)} for Ethidium Displacement

Drug	C_{50} (μ mol)	Drug	C_{50} (μ mol)
EtBr	1.25	2GP-Sp	0.11
Glu-P-2	1 100	GP-Sp	0.13
Spermine	0.23	2GP-Spd	6.5
Spermidine	1.00	Spermine + Glu-P-2 ^{b)}	0.24

a) C_{50} value was defined as a micro-molar concentration of added drug necessary to displace 50% of the DNA-bound EtBr (calf thymus DNA; 0.98 μ M, EtBr; 1.25 μ M, in 1 mM phosphate buffer, pH 7.3) and measured by the fluorescence intensity of DNA-bound ethidium (excited at 546 nm, emitted at 655 nm).

b) Glu-P-2 was added twice as molar amount of spermine.

TABLE IV. Melting Temperature (T_M) of Calf Thymus DNA^{a)}

Drug	T_M ($^{\circ}$ C)	Drug	T_M ($^{\circ}$ C)
None	70.0	2GP-Sp	83.5
EtBr	76.1	GP-Sp	82.5
Glu-P-2	71.5	2GP-Spd	71.8
Spermine	78.5	Spermine + Glu-P-2 ^{b)}	78.6

a) In 0.1 SSC (0.015 M NaCl, 0.0015 M $\text{Na}_3\text{-citrate}$, calf thymus DNA; 4.29×10^{-2} mmol P, drug; 4.29×10^{-3} mM).

b) Spermine (4.29×10^{-3} mM) and Glu-P-2 (8.58×10^{-3} mM).

DNA とで形成される複合体の安定性の指標として、ポリアミノ-Glu-P 誘導体の二重らせん-DNA の融解温度 (T_M) に与える効果を測定した (Table IV).⁴⁵⁾ ポリアミノ-Glu-P 誘導体の DNA 二重らせん構造安定化能はこれらの化合物の DNA 親和性 (Table III) によく対応している。

2GP-Sp などの Glu-P 二量体はビスインターカレーターであると期待できる。伊藤らは 2GP-Sp の DNA 共存下におけるケイ光寿命を測定し、2GP-Sp が一分子の DNA にビスインターカレートすることを示した。⁴⁷⁾

これらのポリアミノ-Glu-P 誘導体は、培養細胞 (HeLa 細胞) に対して増殖阻害作用を示し、DNA ポリメラーゼ α による DNA 複製系も阻害する。⁴⁸⁾ なお、ポリアミノ-Glu-P 誘導体は Ames 試験において変異原性を示さない。⁴⁹⁾

IV. ヘミン-Glu-P-1 誘導体

IV-1. デザインと合成 DNA 鎖の切断は主要な制癌剤の作用機作の 1 つである。そこで DNA を認識するインターカレーターである Glu-P-1 に DNA 鎖を切断する機能を組み込んだ化合物を得ようとした。DNA 鎖切断を主たる作用機作とする制癌剤の代表はブレオマイシンであると思われるが、⁵⁰⁾ ブレオマイシンは (i) DNA にインターカレートするビスチアゾール環部分、(ii) 主として鉄に配位し、DNA 鎖切断に係わる活性酸素種発生の触媒となるペプチド鎖部分、及び (iii) 膜透過に係わるとされている糖部分、からなるとみられる。このようなブレオマイシンの構造と機能に関する考察はインターカレーターである Glu-P-1 に腫瘍組織に親和性を有することが知られており、かつ酸素活性化の触媒になりうるヘミン鉄を結合させた化合物、ヘミン-Glu-P-1 (Charts 8, 9) が DNA 鎖切断能を有する可能性を示唆している。^{13,14)} そこで筆者らは一連のヘミン-Glu-P-1 を Chart 8 及び 9 に示す方法により合成した。^{51,52)} H_nG ($n=2-4$) 及び H_nG_2 ($n=2-4$) はそれぞれ Glu-P-1 部分とヘミン鉄部分を連結するスペーサーである メチレン鎖の長さが異なるヘミン-モノインターカレーター及びヘミン-ビスインターカレーターである。Chart 9 に示す H4G-His 及び H4G-Im はそれぞれヘミン-モノインターカレーターである H4G に、更にヘミン鉄の第 5 配位子となり得る官能基、ヒスチジン及びプロピルイミダゾールをも組み込んだ化合物である。これらの化合物の純度及び構造は元素分析、質量分析、紫外吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトル、高速液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー及び電気泳動により確認した。

IV-2. DNA 鎖切断活性 合成したヘミン-Glu-P-1 誘導体の DNA 鎖切断能は、超らせん環状 DNA の開環状 DNA への変化として測定できる。Table V に超らせん環状 DNA の DNA 鎖が切断されて生ずる開環状 DNA の収率を示す。⁵²⁾ ヘミン-Glu-P-1 誘導体による効率の良い DNA 鎖切断にはヘミン鉄を 2 価に保つために還元剤の共存が有効であるので、ここではハイドロサルファイトナトリウムを加えてある。ヘミン-Glu-P-1 誘導体はいずれも DNA 鎖切断能を有するが、特に分子内にヘミン鉄の第 5 配位子になりうる官能基を組み込んだ化合物、H4G-His 及び H4G-Im はブレオマイシンの 1/2—2/3 という強い DNA 鎖切断能を有している。ヒスチジン部分やイミダゾール部分による DNA 鎖切断活性上昇の効果は、単に H4G とヒスチジンやイミダゾールを混合しただけでは再現できず、これらの官能基は同一分子内に組み込まれている必要がある。

Chart 8. Synthesis of Hemin-Glu-P-1's (HnG's and HnG₂'s)

Chart 9. Synthesis of Hemin-Glu-P-1's (H4G-His and H4G-Im)

TABLE V. Percentage of Closed Circular DNA Which Was Converted to Open Circular DNA

Drug	μM	% ^{a)}	Drug	μM	% ^{a)}	Drug	μM	% ^{a)}
None		9	H4G	10	15	H4G-Im	10	47
FeCl ₂	100	8	H4G	25	24	H4G-Im	25	46
Hemin	100	10	H4G	50	47	H4G-Im	50	50
H2G ₂	100	39	H4G	100	42	H4G-Im	100	56
H2G	100	41	H4G+histidine ^{b)}	100	41	Bleomycin	10	64
H3G ₂	100	40	H4G+imidazole ^{b)}	100	43	Bleomycin	50	78
H3G	100	40	H4G-His	10	36			
H4G ₂	10	20	H4G-His	25	50			
H4G ₂	100	41	H4G-His	50	49			
			H4G-His	100	64			

The reaction mixture (10 μl) contained final concentrations of 200 μM nucleotides of pBR322 DNA, 4 mM Na₂S₂O₄, 10 mM Tris (pH 7.8), and 50 mM NaCl. The reaction mixture was saturated with air and incubated at 20°C for 1 h.

a) The percentage was calculated from the ratio of closed circular DNA to open circular DNA. b) Concentration of the additive (histidine or imidazole) was 1 mM.

これらのヘミン-Glu-P-1 誘導体はまず Glu-P-1 部分で DNA にインターカレートし、次いでヘミン鉄部分による溶存酸素の還元活性化が DNA の近傍で生ずるために効率よく DNA 鎖が切断されると考えている。

IV-3. DNA 鎖切断の塩基配列選択性 前項で、合成したヘミン-Glu-P-1 誘導体が高い DNA 鎖切断能を有することを述べた。ヘミン-Glu-P-1 誘導体による DNA の切断位置を塩基配列のレベルで知るために、末端を ³²P で放射標識した DNA を反応基質として DNA 鎖切断反応を行い、生ずる DNA 断片を塩基配列決定用ゲル電気泳動で分析した。結果を Fig. 4 に示す。^{52,53)} 星印の数が切断頻度を示している。合成したヘミン-Glu-P-1 誘導体はいずれもブレオマイシンとはほぼ同一の塩基配列選択性をもって DNA 鎖を切断する。切断頻度は圧倒的にグアニン-ビリミジン塩基配列部分に高いことが分かった。

IV-4. DNA 切断断片の構造 ヘミン-Glu-P-1 誘導体もブレオマイシンも酸素依存的に DNA 鎖をグアニン-ビリミジン塩基配列選択的に切断するが、その反応機構は DNA 鎖切断に係わる活性酸素種の特異性もできておらず不明である。筆者らはまず、これらの DNA 鎖切断試薬により切断された DNA 断片の切断部分 (末端) の構造を酵素化学的手法と塩基配列決定用ゲル電気泳動を併用して解析した。複雑になるのでここでは得られた

Fig. 4. Base-Sequence-Selective DNA Cleavage by Hemin-Glu-P-1's and by Bleomycin

*=relative probability of cleavage by Hemin-Glu-P-1's and by bleomycin.

Chart 10. DNA Cleavage by Hemin-Glu-P-1's and by Bleomycin

結果の要点のみを述べる。詳細は文献^{13,52,54)}を参照されたい。

- (i) 切断された DNA の 3' 側断片はピリミジン塩基の除去による DNA 鎖切断に対応する。
- (ii) そしてその 3' 側断片はアルカリ性ホスファターゼの基質となり、5' 末端にリン酸モノエステル構造を有することが分かる。
- (i) 及び (ii) から、切断された DNA の 3' 側断片は Chart 10 の [A] で示される。
- (iii) 次に、切断された DNA の 5' 側断片は少なくとも 3 種以上存在する。

(iv) そしてそのうちの1つはターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼの基質となり、3'末端の構造が水酸基であることが分かる。

(v) この5'側断片はグアニンの除去によるDNA鎖切断に引き続く3'末端リン酸基の除去に対応している。

(iii)–(v) から、切断されたDNAの5'側断片の1つはChart 10の[B]で示される。他の5'側断片の1つは従来言われていた3'末端にホスホグリコール酸を有するもの⁶⁰⁾である可能性が強く、この場合にはピリミジン塩基の除去によるDNA鎖切断に対応する(Chart 10の[C])。

ここに得られた結果はヘミン-Glu-P-1誘導体及びブレオマイシンに共通したものであり、現在までのところ、ヘミン-Glu-P-1誘導体とブレオマイシンは同一の機構でDNA鎖を切断すると考えている。

IV-5. 生物活性 以上、合成したヘミン-Glu-P-1誘導体はDNA鎖切断の塩基配列選択性においても、生ずるDNAの切断断片の構造においてもブレオマイシンと区別できない「ブレオマイシンの機能的アナログ」であることを述べてきた。こうした点からもヘミン-Glu-P-1誘導体の生理活性に興味が持たれるが、国立がんセンター研究所 佐々木琢磨博士らによりヘミン-Glu-P-1誘導体の制癌試験がなされた。その結果ヘミン-Glu-P-1誘導体のいくつかはエーリッヒ腹水癌担癌マウスの延命効果検定など数種の検定系においてブレオマイシンと同様の効果を示すことが明らかとなった。⁵⁶⁾

本研究の成果は、ここに述べてきた分子設計の方法が新しい制癌剤開発のアプローチの1つになり得ることを示したものと考えている。

V. おわりに

本総説の前半では数年前にグルタミン酸熱分解物中より単離された発癌性化合物、Glu-P-1、による化学発癌の初期過程について述べた。その中で、Glu-P-1によるDNAの化学修飾過程については代謝活性体や修飾核酸塩基の別途合成などを通じて化学的に確立したものであり、生体内でも同様のDNA化学修飾が生じていることを証明した。更に上述したDNAのGlu-P-1による化学修飾がproto-rasの活性化の直接の原因であることを証明することによりDNA化学修飾と化学発癌の関連を明確にし、最新の発癌機構研究の整合性に対して確たる基盤を与えることができたものと考えている。腫瘍遺伝子産物の役割やその作用機作、発癌プロモーターの作用機作などが今後早急に解決されねばならない研究課題であろう。

更に本総説後半では上記発癌性化合物、Glu-P-1のインターカレーションによるDNA認識能に着目した制癌剤の分子設計について述べた。筆者らは化合物のインターカレート能とDNA切断能という2つの側面のみから考察を加えたがそれでもヘミン-Glu-P-1誘導体という目的とする活性を有する全く人工的な化合物を創製することができた。今後更に化合物の膜透過性や組織親和性などの薬物動力学の観点から、あるいは溶解性などの製剤学的観点、代謝化学的観点など、より総合的な広い、そして緻密な考察により更に優れた制癌剤の分子設計が可能であると考えている。

謝辞 本研究は東京大学薬学部名誉教授 岡本敏彦先生並びに東京大学薬学部教授 首藤紘一先生の御指導のもとに行われたものであり、心から感謝致します。また本研究を行うに当り種々御指導頂きました国立がんセンター 杉村 隆総長、静岡薬科大学 小菅卓夫教授、国立がんセンター研究所 関谷剛男博士、の各先生に深謝致します。更に共同研究者、太田敏晴、武田 敬、山口健太郎、李 金星、河内恵美子、今村正純、室伏良信、飯島博之、野崎義人、の諸氏に謝意を表します。

引 用 文 献

- 1) T. Sugimura, S. Sato, *Cancer Res.*, **43**, 2415s (1983).
- 2) 橋本祐一, 首藤紘一, 岡本敏彦, *ファルマシア*, **17**, 326 (1981).
- 3) 高山昭三, 大垣比呂子, 佐藤茂秋, *環境変異原研究*, **7**, 27 (1985).
- 4) 橋本祐一, 首藤紘一, 岡本敏彦, *化学の領域*, **35**, 25 (1981).
- 5) 橋本祐一, 首藤紘一, *衛生化学*, **31**, 298 (1985).
- 6) Y. Hashimoto, K. Shudo, *Environ. Health Perspect.*, **62**, 209 (1985).
- 7) 首藤紘一, 橋本祐一, 岡本敏彦, “動的天然物化学,” 後藤俊夫編, 講談社サイエンティフィック, 東京, 1983, p. 165.
- 8) Y. Hashimoto, K. Shudo, T. Okamoto, *Acc. Chem. Res.*, **17**, 403 (1984).

- 9) Y. Hashimoto, K. Shudo, *Environ. Health Perspect.*, **62**, 219 (1985).
- 10) Y. Hashimoto, K. Shudo, T. Okamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 1961 (1980).
- 11) Y. Hashimoto, K. Shudo, T. Okamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 861 (1983).
- 12) Y. Hashimoto, K. Shudo, T. Okamoto, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 677 (1982).
- 13) 橋本祐一, 首藤紘一, 有機合成化学, **43**, 908 (1985).
- 14) 橋本祐一, “生理活性物質の分子設計,” 吉岡宏輔, 首藤紘一編, ソフトサイエンス社, 東京, 1986, p. 96.
- 15) 小菅卓夫, 辻 邦郎, “化学の領域増刊, 128, 天然物化学 80A,” 南江堂, 東京, 1980, p. 71.
- 16) T. Yamamoto, K. Tsuji, T. Kosuge, T. Okamoto, K. Shudo, K. Takeda, Y. Iitaka, K. Yamaguchi, Y. Seino, T. Yahagi, T. Sugimura, *Proc. Jpn. Acad.*, **54(B)**, 248 (1978).
- 17) K. Takeda, K. Shudo, T. Okamoto, T. Kosuge, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 2924 (1978).
- 18) Y. Hashimoto, K. Shudo, T. Okamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2532 (1979).
- 19) Y. Hashimoto, K. Shudo, T. Okamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7636 (1982).
- 20) N. J. M. Birdsall, J. C. Parham, U. Wölke, G. B. Brown, *Tetrahedron*, **28**, 3 (1972).
- 21) 橋本祐一, 首藤紘一, “生化学実験講座・続, 第1巻, 遺伝子研究法 (I),” 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, 1986, p. 277.
- 22) Y. Hashimoto, K. Shudo, T. Okamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1058 (1979).
- 23) Y. Hashimoto, K. Shudo, T. Okamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4300 (1984).
- 24) Y. Murofushi, Y. Hashimoto, K. Shudo, T. Okamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2730 (1981).
- 25) Y. Hashimoto, K. Shudo, *Gann*, **76**, 253 (1985).
- 26) 首藤紘一, 薬誌, **102**, 111 (1982).
- 27) Y. Hashimoto, K. Shudo, T. Okamoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 971 (1980).
- 28) Y. Hashimoto, K. Shudo, T. Okamoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 355 (1980).
- 29) T. Okamoto, K. Shudo, Y. Hashimoto, T. Kosuge, T. Sugimura, S. Nishimura, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 590 (1981).
- 30) A. Shinohara, K. Saito, Y. Yamazoe, T. Kamataki, R. Kato, *Carcinogenesis*, **6**, 305 (1985).
- 31) Y. Hashimoto, K. Shudo, T. Okamoto, *Mutation Res.*, **105**, 9 (1982).
- 32) 山口健太郎, 板井昭子, 未発表.
- 33) 今村正純, 未発表.
- 34) M. Imamura, K. Shudo, T. Okamoto, T. Andoh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 968 (1980).
- 35) M. Imamura, K. Takeda, K. Shudo, T. Okamoto, C. Nagata, M. Kodama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 611 (1980).
- 36) A. M. Maxam, W. Gilbert, *Methods Enzymol.*, **65**, 499 (1980).
- 37) Y. Hashimoto, K. Shudo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 1100 (1983).
- 38) Y. Hashimoto, K. Shudo, *Environ. Health Perspect.*, **62**, 215 (1985).
- 39) 高野利也, “発癌遺伝子,” 講談社サイエンティフィック, 東京, 1984, p. 82.
- 40) T. Sekiya, M. Fushimi, H. Hori, S. Hirohashi, S. Nishimura, T. Sugimura, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 4771 (1984).
- 41) 橋本祐一, 日本薬学会第106年会講演要旨集, 千葉, 1986, p. 64.
- 42) Y. Hashimoto, E. Kawachi, K. Shudo, T. Sekiya, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, in press.
- 43) T. Sekiya, V. S. Prassolov, M. Fushimi, S. Nishimura, *Gann*, **76**, 851 (1985).
- 44) C.-S. Lee, Y. Hashimoto, K. Shudo, M. Nagao, *Heterocycles*, **22**, 2249 (1984).
- 45) C.-S. Lee, Y. Hashimoto, T. Ohta, K. Shudo, T. Okamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3046 (1982).
- 46) H. Tabor, *Biochemistry*, **1**, 496 (1962).
- 47) M. Itoh, H. Kurokawa, M. Usui, M. Ohno, E. Shimoda, Y. Hashimoto, K. Shudo, *Biochemistry*, **24**, 6401 (1985).
- 48) 花岡文雄ら, 未発表.
- 49) 長尾美奈子ら, 未発表.
- 50) L. F. Povirk, “Molecular Aspects of Anti-Cancer Drug Action,” ed. by S. Neidle, M. J. Waring, Macmillan Press Ltd., London 1983, p. 157.

-
- 51) Y. Hashimoto, C.-S. Lee, K. Shudo, T. Okamoto, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 1523 (1983).
 - 52) Y. Hashimoto, H. Iijima, Y. Nozaki, K. Shudo, *Biochemistry*, in press.
 - 53) Y. Hashimoto, H. Iijima, K. Shudo, *Gann*, **75**, 567 (1984).
 - 54) Y. Hashimoto, H. Iijima, Y. Nozaki, K. Shudo, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, **16**, 193 (1985).
 - 55) 佐々木琢磨ら, 未発表.