

シクロブタン型ピリミジン二量体を光開裂する人工フォトリアーゼのデザインと合成

Design and Synthesis of Artificial Photolyase for Photosplitting of Cyclobutane Pyrimidine Dimers

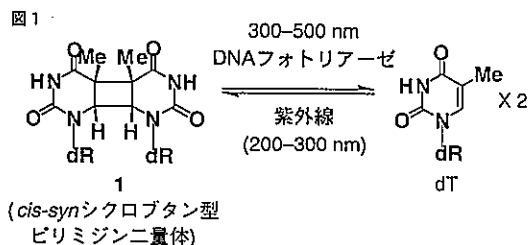
研究代表者 広島大学医学部総合薬学科 助手 青木 伸
Instructor, Dept of Medicinal Chemistry, Faculty of Medicine,
Hiroshima University

Exposure of nucleic acids to UV radiation leads to a variety of lesions, which are represented by photo[2+2]cycloaddition reaction giving *cis-syn*-cyclobutane pyrimidine dimer (T[c,s]T) as a major product. In this study, the effect of zinc(II) complexes of macrocyclic tetramine, especially dimeric zinc complexes, on the photo[2+2]cycloaddition of thymidyl(3'-5')thymidine (d(TpT)) and photosplitting of T[c,s]T was examined. Among tested, dimeric zinc complexes effectively inhibited the cycloaddition of d(TpT) and accelerated splitting of T[c,s]T. Unfortunately, acceleration of photosplitting of T[c,s]T by monomeric zinc complexes having anthraquinone as a photosensitizer was negligible. Highly selective recognition of thymidine nucleotide (thymidine phosphate) by dimeric zinc complexes and supramolecular complexation by self-assembly of trimeric zinc complexes were also studied.

1. 研究目的

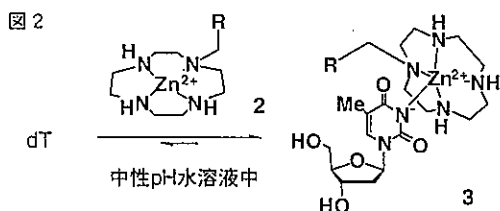
細胞が紫外線 (200-300 nm) の照射を受けると、核酸に様々な損傷がおこることが知られている。その最も代表的な例が、ポリヌクレオチド鎖中で隣接する2つのピリミジン間で進行する光[2+2]環化反応であり、*cis-syn*配置のシクロブタン型ピリミジン二量体 **1** が主生成体として生成する (図1)。核酸上にこのような変異がおきるとDNA複製の際に誤った塩基を取り込んで欠失や付加の原因となり、その結果細胞死や突然変異が誘発される。

太陽光 (300-500 nm) を用いて **1** のシクロブタン環を開裂させ、本来のピリミジン-ピリミジン配列に修復する酵素がDNAフォトリアーゼ (DPL) であるが、人間の体内に存在するという証拠はまだ得られていない。オゾンホール拡大の危機が叫ばれている昨今、核酸の光損傷を修復する人工化合物は、DNAフォトリアーゼの触媒メカニズムを解明するためだけではなく、新薬のリード化合物として大いに期待される。



大環状テトラアミン-亜鉛(II)錯体 **2** (亜鉛-サイクレン錯体) は、亜鉛イオンのルイス酸性によって水中で **1** のイミドプロトンを選択的に引き抜き、イミド N⁻-Zn²⁺結合に基づく複合体 **3** を生成する。その時置換基 R は、シクロブタン環に空間的に非常に近接した位置に固定されると考えられる。本研究では R に光増感ユニットを導入して複合体 **3** の特異的な吸収波長を照射し、励起された光増感ユニットがシクロブタン環の開裂反応を引き起こすことを期待した (図2)。

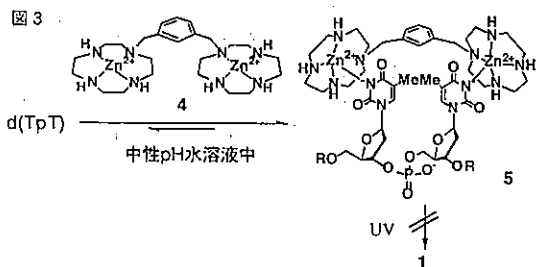
理論的には、3 のみを励起する波長を選択することによって触媒的に機能する人工フォトリパーゼを開発することができるはずである。



2. 研究経過

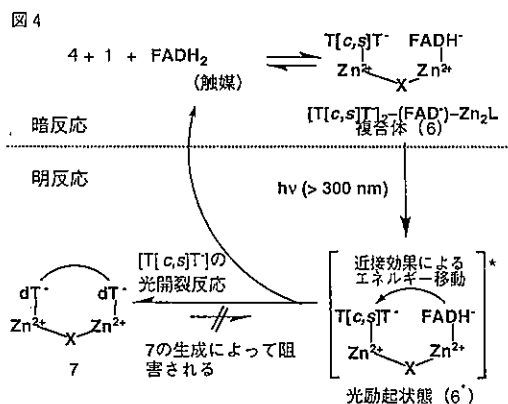
2-1 複核亜鉛錯体による光[2+2]付加環化反応の阻害と新たな触媒反応系の検討

当初、チミジリル(3'-5')チミジン (d(TpT)) の光 [2+2] 環化反応が、二核亜鉛錯体 4 によって効率的に阻害されることが明らかになった。これは、d(TpT)のイミドプロトンが亜鉛-サイクレン錯体によって引き抜かれてアニオンが発生する電子的な効果と、二つの T 部位が、4 のもつ、約 10Å 離れた二つの亜鉛イオン上に固定化される立体的な効果という二つの要因に起因すると結論された (図3)。さらに重要なことは、4 と d(TpT)の複合体 5 の寿命 (約 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ 秒) が、d(TpT)の光励起状態の寿命 (また約 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ 秒) よりもはるかに長いことである。



また、*cis-syn* シクロブタン型光二量体 1 を合成して 4 との複合体生成様式を検討したところ、1 と 4 は 2 対 1 で複合体を生成することが明らかになった。この複合体を紫外光で励起すると、開裂反応が進行し、その初速度がコントロール反応に比べて約 1.7 倍ほど増大することを見出した。

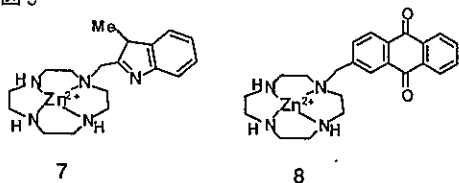
そこで図4の様な触媒反応系を考えた。DPL は、その活性中心にリボフラビン化合物 (FAD) を有し、これが光エネルギーを化学エネルギーに変換する上で重要な役割をになっている。リボフラビンは dT や 1 と同じイミド構造を有するので、亜鉛錯体 4 や 5 と複合体を生成する。そこで、4、1、FAD を共存させて三元複合体 6 を生成させ、これを光励起すると FAD から 1 へ速やかにエネルギー移動が起こって 1 の開裂反応が進行するのではないかと考えた。しかし、その反応加速は FAD の有無に関わりなく、ほぼ同じであった。



2-2 光増感ユニットを有する亜鉛錯体の合成と光反応

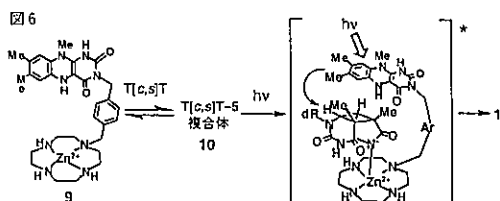
光増感ユニットとしてインドール、アントラキノンを導入した 7、8 の合成を試みた。これらのユニットは、それぞれ単独にシクロブタン開裂のための光増感剤として検討され、ある程度の活性が認められているので選択した (図5)。

図5



7はそのリガンドが酸に対して非常に不安定であり、十分な精製が行えなかったため合成を断念した。次いで8の合成を行い、 $[Ti(c,s)T]$ の光開裂反応を検討したが、反応加速は、光増感ユニットをもたない4と同程度であった。

そこで現在、シクロプタンの背後にリポフラビン基を固定するべく、錯体9の合成を行っている(図6)。



3- 研究成果

本研究では、大環状ポリアミンの二核亜鉛錯体が核酸塩基の光損傷の防御と修復に有効であることを示すことができた。

大環状ポリアミンの亜鉛錯体は光に対して安定であり、有機溶媒中、水溶液中を問わず、光反応を制御する因子として有力な武器となると考えている。立体選択的な光反応の触媒としての展開も期待される。

なお、本研究代表者の「複核亜鉛錯体によるチミジンの光損傷反応の制御」に関する研究成果が評価され、平成11年度錯体化学研究会「研究奨励賞」(平成11年9月25日)を受賞したことを付記する。

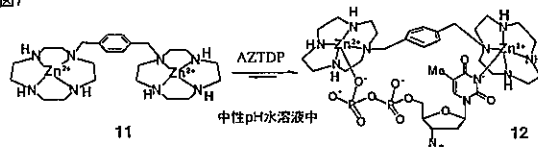
4 研究の新たな展開

4-1.チミジンヌクレオチドに対する高選択的レセプターとしての複核亜鉛錯体

複核亜鉛錯体が $d(TpT)$ と安定な複合体を生成することを述べた。実は、単核の亜鉛錯体は、リン酸モノエステルのジアニオン体とも水溶液中で複合体を生成する。従って、4や11は、チミジンとリン酸モノエステルを同一分子内にもつチミジンヌクレオチドと非常に安定な複合体を生成することが予想された(図7)。

予想通り、11は抗HIV薬として臨床使用されているAZTの活性体AZTDPと中性水溶液中で非常に安定な複合体12を生成することが明らかになった。(ヌクレオチド薬の新たなドラッグデリバリーシステムとして期待され

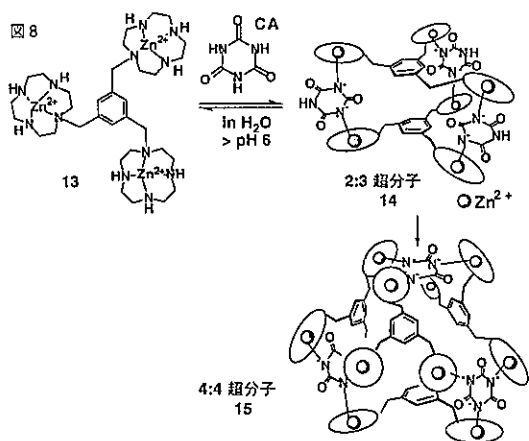
図7



る。

4-2.三核亜鉛錯体の可逆的自己集積による超分子化学

三核亜鉛錯体13と有機アニオン体であるシアヌル酸ジアニオン(CA^{2-})が2対3でサンドウィッチ型超分子14を生成することを、pH適定法、UV適定法、X線結晶解析によって明らかにした。さらに、13がシアヌル酸のトリアニオン(CA^{3-})とナノメートルスケールのかご型超分子15を生成することを発見した(図8)。



5 発表論文リスト

1. Efficient Inhibition of Photo[2+2]cycloaddition of Thymidyl(3'-5')thymidine and Promotion of Photosplitting of the *cis-syn*-Cyclobutane Thymine Dimer by Dimeric Zinc(II)-Cyclen Complexes Containing *m*- and *p*-Xylyl Spacers. Shin Aoki, Chizuyo Sugimura, and Eiichi Kimura, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10094–10102.

2. Highly Selective Recognition of Thymidine Mono- and Diphosphate Nucleotides in Aqueous Solution by Ditopic Receptors Zinc(II)-Bis(cyclen) Complexes (Cyclen = 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane). Shin Aoki, Eiichi Kimura, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4542–4548.

3. Three-Dimensional Supermolecules Assembled from a Tris(Zn^{2+} -cyclen) Complex and Di- and Trianionic Cyanuric Acid in Aqueous Solution (Cyclen = 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane) Shin Aoki, Motoo Shiro, Tohru Koike, and Eiichi Kimura, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 576–584.