

## わらび発癌物質および合成類縁物質のDNAに対する反応性

### Reactivities of Bracken Carcinogen and Its Synthetic Analogues toward DNA

研究代表者 名古屋大学理学部助教授  
Assoc. Prof., Faculty of Science, Nagoya University  
Hideo KIGOSHI

木越 英夫

Ptaquiloside (1) is a potent carcinogenic compound isolated from the bracken fern *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. The ultimate carcinogen, dienone 2 generated from ptaquiloside (1) under weakly basic conditions acts as a powerful alkylating agent toward amino acids and nucleic acid bases, and causes cleavage of DNA. The studies on reactivities of bracken carcinogen and its synthetic analogues toward DNA have been effected, and the results are as follows: (1) The molecular mechanism of DNA cleavage with dienone 2 has been determined using a deoxytetranucleotide as a DNA model. (2) The ketone 3, a simpler analogue of 2, has been synthesized and has been found to be much more stable than 2 and to possess DNA cleaving activity comparable to that of 2. (3) The DNA binding moiety has been introduced into ketone 3 to increase the DNA cleaving activity of ketone 3 and to provide the base-sequence selectivity to ketone 3.

#### 研究目的

抗癌性抗生物質 (Mitomycin, Bleomycin, CC-1065 など) によるDNAの修飾は医学・生物学分野のみならず化学分野でも重要な研究課題であり、近年多大な成果が挙げられている。一方、天然発癌物質による核酸の修飾に関する化学的研究は少ない (Monocrotaline, Aflatoxin)。その理由はDNAと直接反応する天然発癌物質の求電子活性分子 (究極発癌物質) が通常代謝活性化により生体内で微量

生成するのみで、化学的研究に必要な量入手し難いためである。植物わらびの発癌物質プタキロサイド (1)<sup>1,2)</sup> は代謝活性化を必要とせず、化学的に容易に究極発癌物質 (2) へ変換できる点、化学的研究に好都合である。このわらび究極発癌物質 (2) を用いれば、DNAが発癌物質 (アルキル化剤) によって損傷をうける生体内現象を分子構造レベルで解析することができると思われる。

ところが上記の究極発癌物質 (2) は非常に

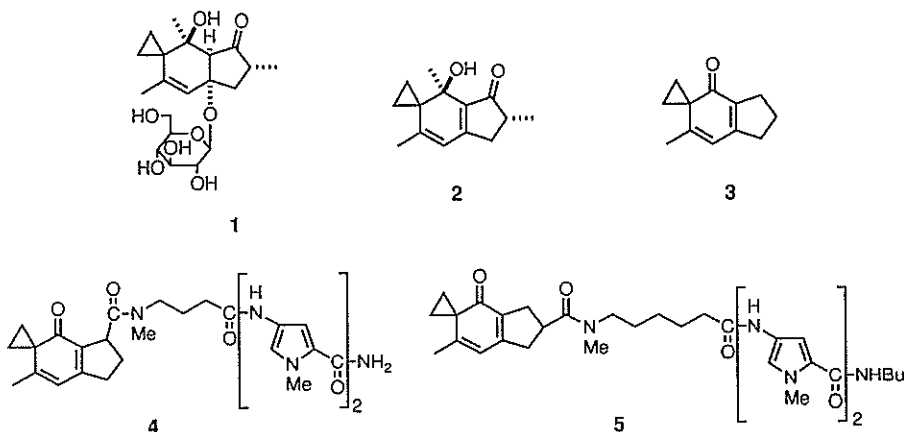


図1 わらび発癌物質プタキロサイド (1)、究極発癌物質 (2) および人工類縁物質

不安定であり、究極発癌物質 (2) の構造変換を行いDNA修飾との関係を解析するには制約がある。そこで、本研究ではわらび究極発癌物質 (2) を規範として新しいタイプの人工求電子活性分子を設計し、必要量を化学合成により供給し、DNAとの反応性を明らかにすることを目的とする。

## 研究経過および成果

### 1. 究極発癌物質によるDNA切断反応の分子機構

プタキロサイド (1) から弱塩基性条件下、定量的に生成する究極発癌物質 (2) は強力なアルキル化剤であり、DNAを塩基選択的にアルキル化し切断する<sup>2,3a)</sup>。まず、わらび究極発癌物質 (2) によるDNA切断の詳細を有機化学的に検討した。

DNAは高分子であり、DNA切断断片の

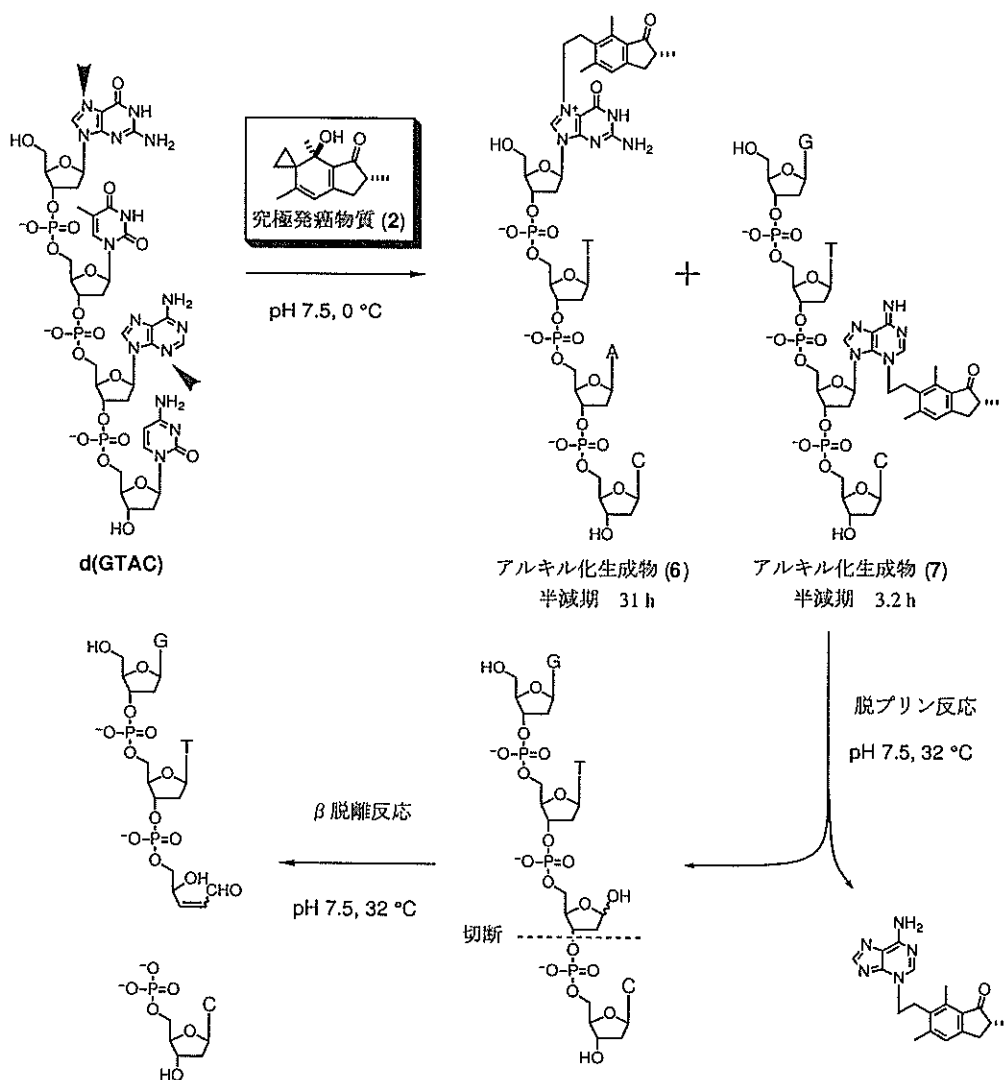


図2 わらび発癌物質 (2) によるヌクレオチド鎖切断反応の分子機構

化学構造を検討することは困難である。そこでDNAの最小単位とも言えるデオキシテトラヌクレオチド d(GTAC) を大量に合成し、この化合物をDNAモデルとして究極発癌物質 (2) による切断反応を行った。その結果、(1) まず、デオキシテトラヌクレオチドのグアニンの N-7 位とアデニンの N-3 位が選択的にアルキル化されて2種類のアルキル化生成物 (6, 7) が生成する；(2) 化合物 (7) のアルキル化アデニン部は化合物 (6) のアルキル化グアニン部よりもはるかに不安定であり、容易に脱プリン反応を起こしてアデニンが欠如したデオキシヌクレオチドが生成する；(3) アデニンの欠如したデオキシテトラヌクレオチドは生理的条件下ゆっくりとβ脱離反応を引き起こしてヌクレオチド鎖が切断される；と表すことのできるわらび発癌物質によるヌクレオチド鎖切断の分子機構を説明した<sup>30)</sup> (図2)。

高分子であるDNA (放射性リン標識体) の切断反応の研究で得られている数々の知見もまた上記の分子機構により理解することができる<sup>30)</sup>。

## 2. 人工求電子活性分子

究極発癌物質 (2) によるDNA切断反応は他の天然アルキル化剤 (例：CC-1065) とは異なり生理的条件下で進行するので、本究極発癌物質は制限酵素機能分子を創製するために

有用であると考えられる。ところが、究極発癌物質 (2) が非常に不安定であるため、究極発癌物質に対して化学修飾によりDNA塩基配列認識機能を付加することは不可能である。そこで、筆者らは究極発癌物質 (2) の構造を単純化した人工求電子活性分子 (3) を設計した。3,3-ジメチルアクリル酸から得られるジエン (8) とシクロペンテンジカルボン酸無水物 (9) の Diels-Alder 反応によりヒドリندان骨格を形成した後、3員環を導入してシクロプロピルケトン (11) を調製した。この化合物を用いて人工求電子活性分子 (3) を合成した (図3)。その結果、人工求電子活性分子 (3) が究極発癌物質 (2) よりもはるかに安定であり、かつ究極発癌物質と同程度のDNA切断活性を有することを見いだした<sup>4)</sup>。

## 3. DNA認識部位を持つDNA切断分子

さらに、人工求電子活性分子 (3) のDNA切断能力の効率と塩基配列選択性を向上させた制限酵素機能分子を開拓を行った。ネトロブシン型ペプチドは2本鎖DNAのアデニン-チミン塩基対が連続する塩基配列を認識してマイナーグループに結合することが知られている。そこで、人工求電子活性分子 (3) のヒドリندان骨格1位または2位にネトロブシン誘導体を連結することにより制限酵素機能分子を開発できると考えた (図4)。

前述のシクロプロピルケトン (11) を共役ケ

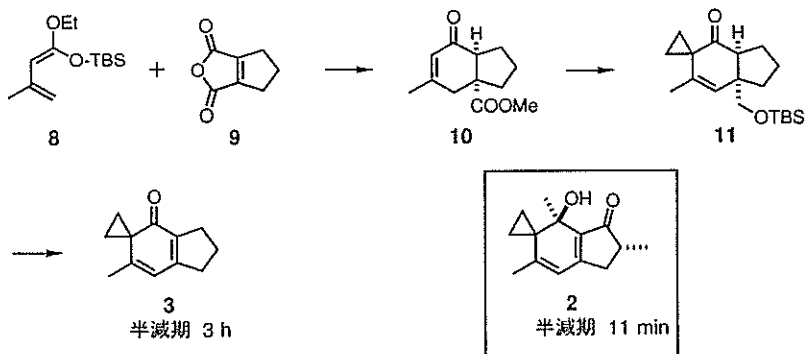


図3 人工求電子活性分子 (3) の合成

トン (12) に変換した後、ヒドリンダン骨格 1 位にカルボキシル基を導入してラクトン (13) を得た。ラクトン (13) に対してネトロブシン誘導体を連結し、制限酵素機能分子 (4) を合成した (図 4)。

また、共役ケトン (12) の共役エノン系の  $\gamma$  位におけるアルキル化反応により、ヒドリンダン骨格 2 位に官能基を導入したアセタール (14) を合成した。ジメチルアセタール基を足がかりとしてネトロブシン誘導体を連結し、制限酵素機能分子 (5) を合成した。

制限酵素機能分子 (4, 5) の DNA 切断活性をプラスミド DNA を用いて検定した。その

結果、両者の DNA 切断活性はほぼ同じであり、それぞれ、DNA 塩基配列認識部位を持たない対照化合物に対して約 4 倍の DNA 切断活性を有していることが明らかになった<sup>9)</sup>。

#### 今後の課題と発展

制限酵素機能分子 (4, 5) が予想したよりも不安定であったため、当初計画していた DNA 塩基配列選択性に関する研究まで行うことができなかった。今後、本研究で得られた知見に基づいて安定な人工求電子活性分子を開発し、有効な制限酵素機能分子へと発展させてゆきたい。

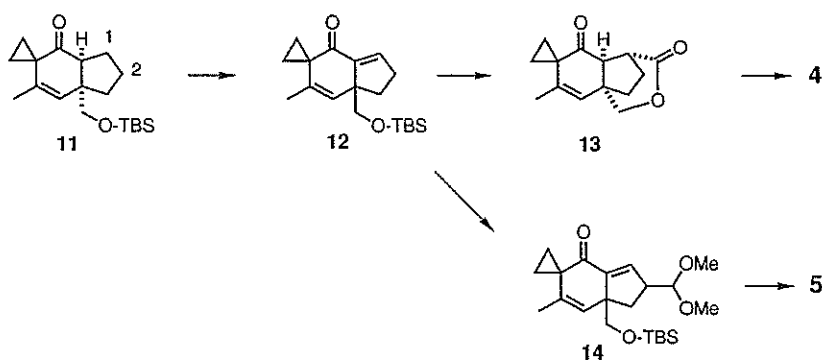


図 4 DNA 認識部位を持つ DNA 切断分子 (4, 5) の合成

#### 謝辞

本研究は山田静之教授 (名古屋大学理学部) の御指導のもと行われたものであり、ここに御礼申し上げます。また、共同研究者の小鹿 一、水田和宏、田中秀幸、広川順一、丹羽実佐子、大橋秀和の諸氏に深謝いたします。放射性リンで標識した DNA の切断に関する研究は杉浦幸雄教授 (京都大学化学研究所)、上杉志成氏、串田達志氏との共同研究であり、ここに厚く感謝の意を表します。

#### 引用文献

1) (a) H. Niwa, M. Ojika, K. Wakamatsu, K. Yamada, I. Hirono, and K. Matsushita, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 4117 (1983). (b) H. Niwa, M. Ojika, K. Wakamatsu, K. Yamada, S.

Ohba, Y. Saito, I. Hirono, and K. Matsushita, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 5371 (1983). (c) S. Ohba, Y. Saito, I. Hirono, H. Niwa, M. Ojika, K. Wakamatsu, and K. Yamada, *Acta Crystallogr., Sect. C*, **40**, 1877 (1984).

- 2) M. Ojika, K. Wakamatsu, H. Niwa, and K. Yamada, *Tetrahedron*, **43**, 5261 (1987).  
 3) (a) M. Ojika, K. Sugimoto, T. Okazaki, and K. Yamada, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1775 (1989). (b) T. Kushida, M. Uesugi, Y. Sugiura, H. Kigoshi, H. Tanaka, J. Hirokawa, M. Ojika, and K. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 479 (1994).  
 4) H. Kigoshi, H. Tanaka, J. Hirokawa, K. Mizuta, and K. Yamada, *Tetrahedron Lett.*, **33**, 6647 (1993).  
 5) H. Kigoshi, M. Niwa, H. Ohashi, H. Tanaka, J. Hirokawa, H. Ishiwata, and K. Yamada, *Tetrahedron Lett.*, **35**, 5349 (1995).