

貯留雨水の生物化学的浄化システム

～雨水利用の普及を目的として～

研究代表者 今川 朱美

■研究の概要

近年、雨水利用が環境負荷低減システムの中で大きな注目を受けている。雨水の利用システムの導入は、節水効果だけではなく、災害時には非常用飲料水としての利用が期待されている。しかし、貯留した雨水には、大腸菌、細菌等が検出されるため、散水や便器洗浄水などの人体に害を及ぼさない範囲での利用に限定されており、雨水利用システムの普及に至っていない。このため、幅広く雨水を利用するためには水道水質基準を満たし、手洗いやウォシュレットなど人体に直接関わる利用や、災害時の非常用飲料水として安全に活用できることが課題である。このような問題点を解決するためには、雨水中の人体に有効な菌を生かしながら、悪影響をおよぼすもののみを死滅させることが雨水の活用には必須となっている。

そこで、人体に悪影響をおよぼす菌のみを遺伝子のレベルで判別し、死滅へと誘導するシステムの開発を行った。

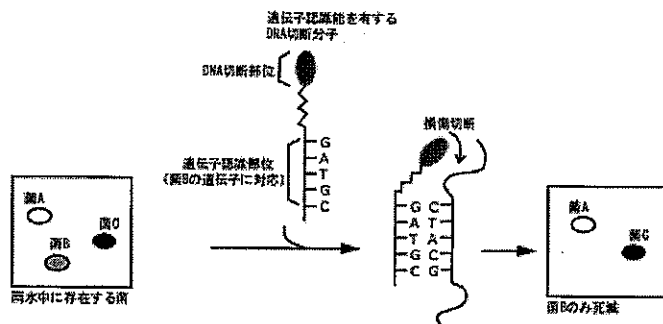
現在、大腸菌をはじめとする菌の遺伝子の解読が急速に進んでいる。個々の菌の有する遺伝子配列の違いを利用することで、特定の菌のみを選別することは可能であると考えられる。我々は、既に DNA をアルキル化、あるいは酸化することによって、DNA に損傷を与え、切断する分子の開発を行っており、こうした分子に DNA オリゴマーを導入することによって遺伝子認識能を獲得させることが可能であると考えた。すなわち、遺伝子認識能を有する DNA 損傷分子はその相補的な遺伝子を有する菌のみのみ作用することによって、遺伝子に損傷を与え、最終的に標的とする菌のみを死へと導くことが可能であると仮定し、そのドラッグの開発を行った。

■研究方法の概要

本申請研究では、菌それぞれの遺伝子配列の違いを利用して、特定の菌のみを死滅へと誘導するシステムの構築を目指す。本提案の概念図を下記に示す。雨水中には、様々な菌が存在しており、菌はそれぞれ固有の遺伝子配列を持っている。DNA 切断分子は遺伝子認識部位 (DNA オリゴマー) を持っているため、その認識配列に適合した遺伝子とのみ結合し(下記図の場合は菌 B)、損傷を与える。その結果、選択された菌 (菌 B) は死滅するが、選択されない菌 (菌 A、C) は生存し続ける。

具体的な研究方法として下記のような実験を計画している。

- ① DNA 切断分子の DNA オリゴマーへの導入法の検討
- ② ①で合成した DNA 切断分子の細胞毒性と選択性の評価
- ③ 採取した雨水での DNA 切断分子の活性評価



■研究成果の概要

次の実験に取り組み、細菌や大腸菌の遺伝子を認識して、必要なものだけを殺傷可能なドラッグの開発に成功した。

- 1) 低酸素条件下で選択的に活性を発現するプロドラッグの開発
- 2) インドールキノン部含有 DNA を用いた遺伝子認識能をもつ光活性化型ドラッグの開発
- 3) ヘアピン型 DNA を用いたドラッグリリース反応の制御

ただし、現段階では、細胞実験はできておらず、in vitro 実験でドラッグが DNA (遺伝子) 配列を認識し得ることを確認している。今後、細胞実験を行う予定である。

貯留雨水の生物化学的浄化システム ～雨水利用の普及を目的として～

今川 朱美

京都大学工学研究科 物質エネルギー化学専攻 励起物質化学分野

1. はじめに

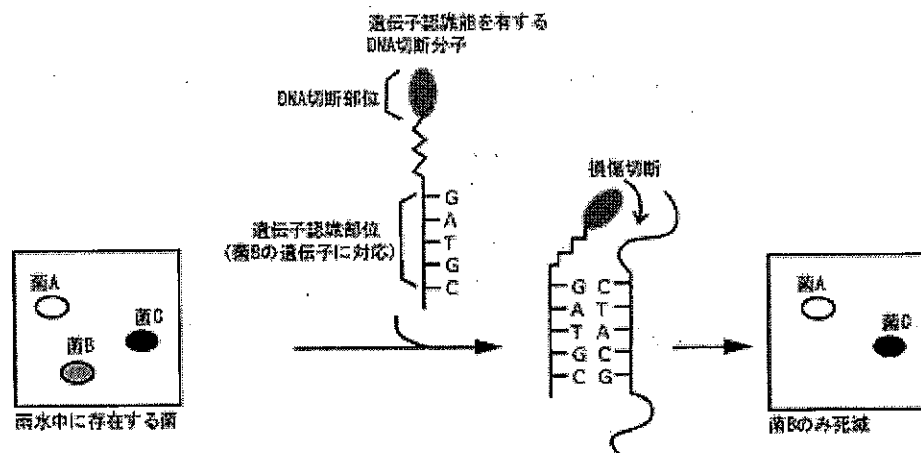
近年、雨水利用が環境負荷低減システムの中で大きな注目を受けている。雨水の利用システムの導入は、節水効果だけではなく、災害時には非常用飲料水としての利用が期待されている。しかし、貯留した雨水には、大腸菌、細菌等が検出されるため、散水や便器洗浄水などの人体に害を及ぼさない範囲での利用に限定されており、雨水利用システムの普及に至っていない。このため、幅広く雨水を利用するためには水道水質基準を満たし、手洗いやウォシュレットなど人体に直接関わる利用や、災害時の非常用飲料水として安全に活用できることが課題である。このような問題点を解決するためには、雨水中の人体に有効な菌を生かしながら、悪影響をおよぼすもののみを死滅させることが雨水の活用には必須となっている。

そこで、人体に悪影響をおよぼす菌のみを遺伝子のレベルで判別し、死滅へと誘導するシステムの開発を行った。

現在、大腸菌をはじめとする菌の遺伝子の解読が急速に進んでいる。個々の菌の有する遺伝子配列の違いを利用することで、特定の菌のみを選別することは可能であると考えられる。一方、我々は、これまでに数多くの DNA 切断分子を見い出している。また、我々は、これまでに数多くの抗がん剤のプロドラッグ化を試みており、光照射や放射線照射により活性を発現するプロドラッグの開発に成功している。こうした DNA 切断分子やプロドラッグ等の機能性分子に DNA オリゴマーを導入することによって遺伝子認識能を獲得させることが可能であると考えた。すなわち、遺伝子認識能を有する機能性分子はその相補的な遺伝子を有する菌にのみ作用することによって、遺伝子に損傷を与え、最終的に標的とする菌のみを死へと導くことが可能であると仮定し、そのドラッグの開発を行った。

本申請研究では、菌それぞれの遺伝子配列の違いを利用して、特定の菌のみを死滅へと誘導するシステムの構築を目指す。本提案の概念図を下記に示す。雨水中には、様々な菌が存在しており、菌はそれぞれ固有の遺伝子配列を持っている。DNA 切断分子は遺伝子認識部位 (DNA オリゴマー) を持っているため、その認識配列に適合した遺伝子とのみ結合し(下記図の場合は菌 B)、損傷を与える。その結果、選択された菌 (菌 B) は死滅するが、選択されない菌 (菌 A, C) は生存し続ける。

具体的な研究方法として下記のような実験を計画し、研究を行った。



- ① 機能性分子の探索と DNA オリゴマーへの導入法の検討
- ② ①で合成した DNA オリゴマーの反応詳細の検討
- ③ ①で合成した DNA 切断分子の細胞毒性と選択性の評価
- ④ 採取した雨水での DNA 切断分子の活性評価

その結果、上記①、②について、いくつかの知見を得た。まず、一電子還元反応により活性化されるプロドラッグの探索を行い、光照射もしくは放射線により活性化されるプロドラッグを見出すとともに、プロドラッグの DNA への導入に成功した。続いて、遺伝子のモデルとして、種々の配列をもつ DNA オリゴマーの共存下においてプロドラッグ活性化反応を行ったところ、特定の塩基配列をもつ場合にのみ、ドラッグが活性化されることを見出した。このことは、特定の遺伝子配列をもつ菌においてのみ、ドラッグが活性化され、特定の菌のみを死滅させることが可能であることを示唆している。また、上記③および④については、今後、実際の細胞を用いて、作成した遺伝子認識能をもつプロドラッグの評価を行う予定である。

また、本研究の過程において見出したプロドラッグは、低酸素状態で選択的に活性化される。従って、酸素濃度に応答して機能発現を制御できる薬剤であるため、次世代の抗癌剤としての応用が期待でき、非常に興味深い。

本報告書では、今回見出した知見の詳細として、以下の3項目について報告する。

- 【1】 低酸素条件で選択的に活性を発現するプロドラッグ
- 【2】 遺伝子配列認識能をもつプロドラッグ1：インドールキノン誘導体の光還元反応の利用
- 【3】 遺伝子配列認識能をもつプロドラッグ2：ヘアピン型 DNA の構造変化の利用

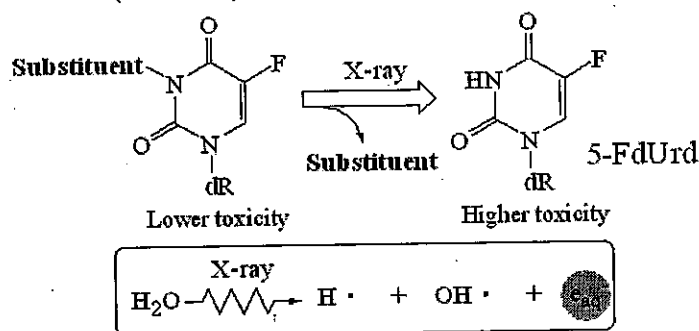
2. 研究内容

【1】低酸素条件下で選択的に活性を発現するプロドラッグ

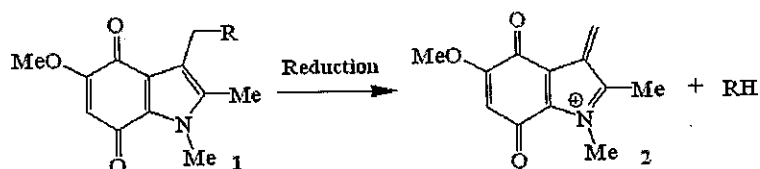
■ 緒言 ■

マウス乳癌由来 EMT6/KU 細胞とヒト乳癌 5-フルオロデオキシウリジン(5-FdUrd)は、強い毒性を持ち抗癌活性があることで知られているが、正常細胞に対しても効果を示すため臨床応用では投与量が制限されており、十分な治療効果を得られないことが問題となっている。近年、このような副作用のあるドラッグの治療効果を高める目的で、正常細胞と腫瘍細胞を差別化する試みが活発に行われている。当研究室では、5-FdUrd のプロドラッグ化に注目し、低酸素雰囲気下での放射線照射によって、5-FdUrd を遊離するプロドラッグシステムを報告している(Scheme 1)¹。

インドールキノンを始めとするキノン化合物 1 は、還元されると N(3)位で開裂を起こす。また、反応生成物であるイミニウム誘導体 2 は、DNA 等の生体分子をアルキル化し、強い毒性を示すことが知られている(Scheme 2)^{2,3}。



Scheme 1. Radiolytic reduction of 2-oxoalkyl substituted 5-FdUrd under hypoxic conditions.



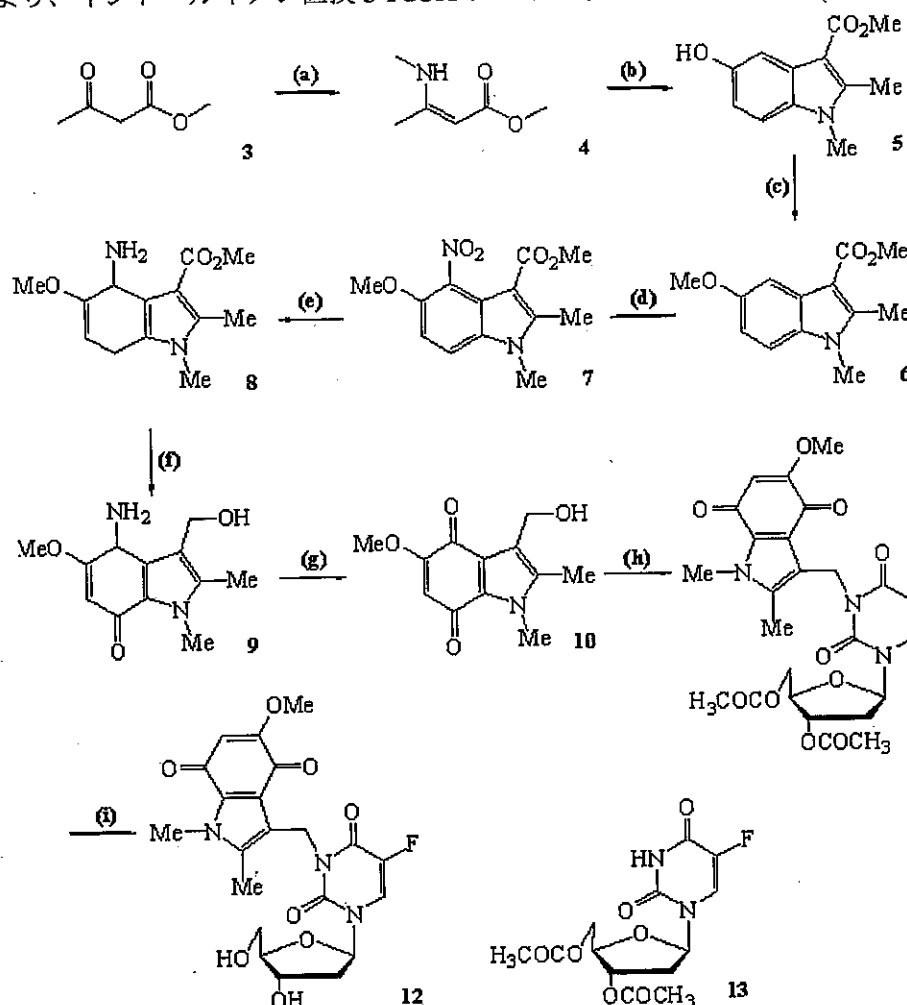
Scheme 2. Reductive release of a drug from ndolequinone moiety.

本研究では、還元条件下において強い活性を発現し得るインドールキノン基を N3 位に導入した 5-FdUrd プロドラッグ合成し、放射線還元あるいは光増感還元条件下での反応挙動を解析した。この、低酸素条件下で目的とする細胞を選択的に活性を発現するプロドラッグシステムの構築は、各種菌の選択的活性が可能だけでなく、癌細胞に対し抗腫瘍活性への応用も可能である。

■ 結果及び考察 ■

■ インドールキノン置換 5-FdUrd プロドラッグの合成

アセト酢酸メチル **3** を出発原料として、7段階を経てインドールキノン誘導体 **10** を得た^{2,4}。ついで **10** と 5-FdUrd 誘導体 **13** を光延反応を用いて縮合した後、アセチル基を塩基性条件下で除去することにより、インドールキノン置換 5-FdUrd プロドラッグ **12** を合成した(Scheme 3)。



Scheme 3. Synthesis of N(3)-substituted 5-FdUrd prodrug possessing indolequinone unit: (a) MeNH₂, TMOF, MeOH; (b) 1,4-Benzoquinone, MeNO₂, reflux (quant, 2 steps); (c) NaH, MeI, DMF, 0 °C to r.t. (36 %); (d) HNO₃, AcOH, 0 °C (68 %, + 21 % 6-nitro isomer); (e) Sn, HCl, EtOH, reflux (78 %); (f) LiAlH₄, THF, 0 °C; (g) (K₂S₂O₈)₂NO, Me₂CO, NaH₂PO₄ buffer, 0 °C (39 %, 2 steps); (h) DEAD, PPh₃, di-O-acetyl-5FdUrd (**13**), THF, 0 °C; (i) NaOH_{aq}, MeOH, 0 °C (32 %, 2 steps)

■ 放射線還元活性

合成したプロドラッグ **12** の水溶液中における放射線還元反応性について検討した。水の放射線分解により水和電子と OH ラジカルが発生する。OH ラジカル捕捉剤である *t*-ブチルアルコール (*t*-BuOH) を過剰に含む **12** の水溶液にアルゴンを通気して低酸素条件にした後、放射線を所定時間照射した¹。その結果、低酸素条件下の放射線照射により 5-FdUrd の遊離が確認され、900 Gy の照射により 20% の 5-FdUrd が遊離することがわかった(Figure 1)。なお、5-FdUrd 遊離の選択率(遊離 G 値/分解 G 値)は 27% であった。一方、有酸素条件下で放射線を照射すると、基質の分解速度

は約3分の1に低下した(Figure 2)。これらの結果より、12からの5-FdUrdの遊離は水和電子による一電子還元を経て進行し、酸素は遊離反応を阻害することが明らかとなった。

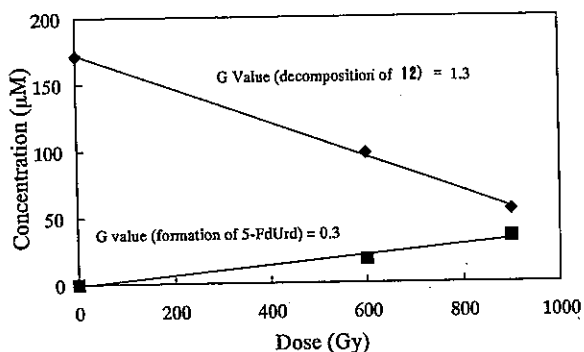


Figure 1. Dose responses for decomposition of prodrug 12 (◆) and release of 5-FdUrd (■) upon hypoxic X-irradiation.

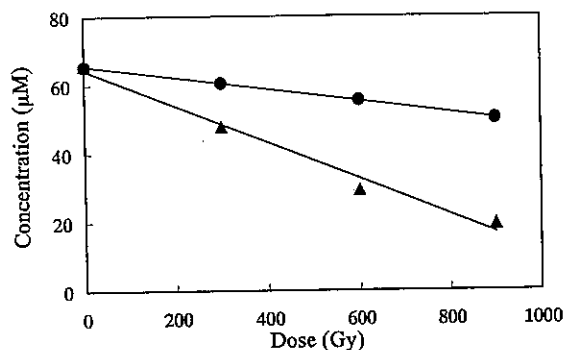


Figure 2. Difference in reactivity of prodrug 12 in the radiolytic reduction under hypoxic (▲) and aerobic (●) conditions.

■ 光増感還元活性

DNAの光損傷構造(ピリミジン二量体など)を光増感還元修復(光回復)することが知られているFAD (flavin adenine dinucleotide)を電子供与剤に用いて、12の光増感還元反応性について検討した。低酸素条件、FAD共存下において12の水溶液に紫外光($\lambda_{ex}=365\text{nm}$)を照射すると、70%の選択率で5-FdUrdが遊離した。一方、有酸素条件下で紫外光を照射すると、基質の分解速度は約7分の1に低下し、5-FdUrdの遊離は全く見られなかった(Figure 3)。

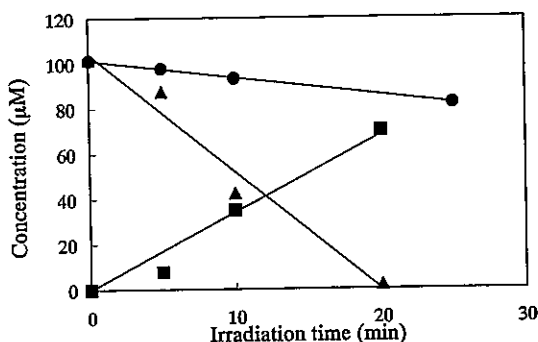


Figure 3. Concentration changes of prodrug 10 (hypoxic, ▲; aerobic, ●) and 5-FdUrd (■) upon photoirradiation at 365nm.

■ レーザーフラッシュフォトリシス法による反応機構解析

12からの5-FdUrd脱離反応機構をレーザーフラッシュフォトリシス法により解析した。増感還元剤としてN,N'-ジメチルアニリン(DMA)を含む12の水溶液にArを通気して低酸素条件にした後、266nmのレーザー光を照射した¹。その結果、12のセミキノノンラジカル[Q^{•-}]とDMAラジカルカチオン[DMA^{•+}]に帰属される特徴的な吸収が極大波長360nmおよび450nmに観測された²(Figure 4)。360nmの吸光度の逆数を時間に対してプロットする

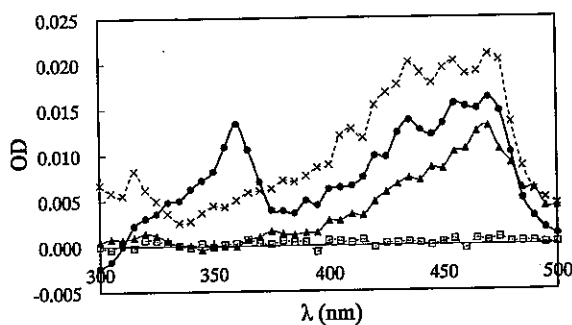


Figure 4. Transient absorption spectra of semiquinone radicals of 12 and DMA cation radicals (●) generated by laser-flash photolysis of Ar-saturated phosphate buffer (10mM, pH 7.4) (aerobic conditions (▲), without DMA (□), without 12 (×) as a control).

と、直線関係が成立し、それぞれの勾配は一定で DMA 濃度に依存しないことがわかった(Figure 5, right, inset)。さらに、DMA のラジカルカチオン濃度は時間経過とともに速やかに減少したことから(Figure 5, left)、セミキノンラジカルは2分子反応により消失することが示唆された。

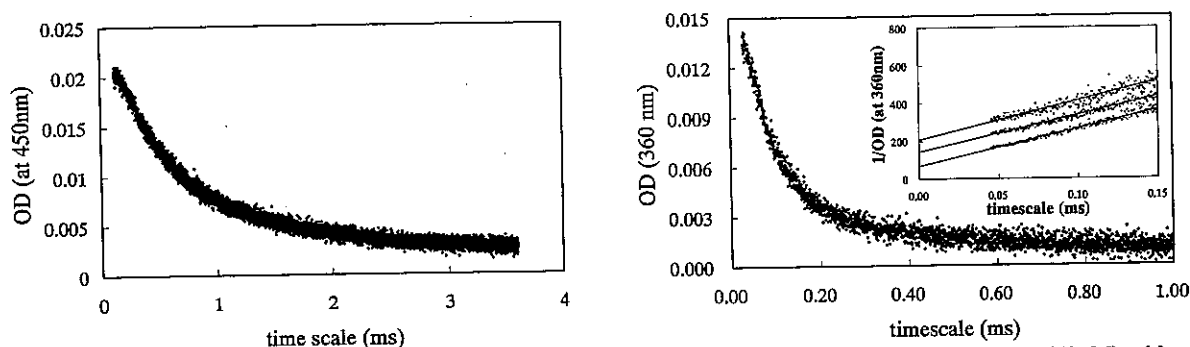
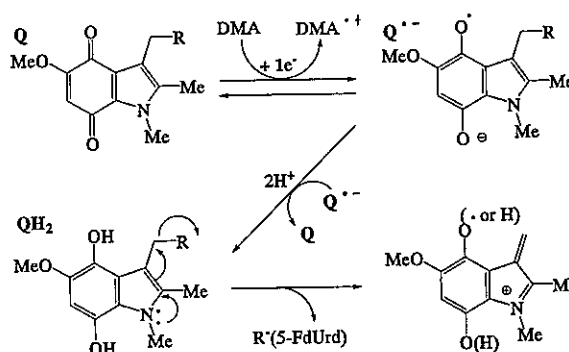


Figure 5. Transient absorptions at 450nm (left), 360 nm (right) as observed on the photoreaction of 12 (50µM) with DMA in Ar-saturated phosphate buffer (10mM, pH 7.4). Inset: plots of the reciprocal of the absorbance at 360nm against time at several initial DMA concentrations at pH 7.4.

以上の動的挙動から、インドールキノンは、励起 DMA から電子移動により一電子還元され、セミキノンラジカルアニオン[Q^{•-}]を生成した後、不均化を起こして 5-FdUrd を遊離したと考えられる(Scheme 4)。



Scheme 4. Proposed mechanism of reductive activation pathway of indolequinone derivative possessing 5-FdUrd moiety.

■ 細胞毒性

マウス乳癌由来 EMT6/KU 細胞とヒト乳癌 MCF-7 細胞を用いて、12 の細胞毒性を評価した。IC₅₀ 値を Table 1 に示す。EMT6/KU 細胞に対する 12 の細胞毒性は 5-FdUrd に比べて約 220 分の 1 以下にまで低下した。さらにヒト乳癌 MCF-7 細胞に対しても毒性の低下が見られ、プロドラッグとしての有効性が示唆された。

Table 1. Cytotoxicity as Measured by IC₅₀ of 5-FdUrd and Prodrug 12 toward EMT6/KU and MCF-7 Cell Lines under Aerobic Conditions.

Compounds	EMT6/KU(µM)	MCF-7(µM)
5-FdUrd	2.4 × 10 ⁻⁸	1.0 × 10 ⁻³
IQ-5-FdUrd	2.4 × 10 ⁻⁶	>1.0 × 10 ⁻³

■ In Vitro 放射線増感効果

癌細胞内における 5-FdUrd の遊離と毒性発現を評価するために、EMT6/KU 細胞を用いて、放射線照射下における 12 の毒性試験を行った⁵。12 を含む EMT6/KU 細胞懸濁培養液に放射線を照射した場合、低酸素条件下では強い毒性が発現したが、有酸素条件下では毒性発現が抑制された。このことは、固形癌等の低酸素腫瘍細胞に対して強い毒性を示す放射線還元活性化プロドラッグとして 12 が有効であることを示唆している。

しかしながら、低酸素条件下の放射線照射によって発現する毒性は有酸素条件下の場合の5倍程度であり、期待していたような大きな増感効果は見られなかった。薬剤が細胞内部に浸透するには親油性と親水性を同時に兼ね備えた両親媒性であることが必須である。12は高いオクタノール/水分配係数($P_{O/W}$: 2.89)をもつ親油性化合物であることから、12の細胞内濃度が十分に高くならなかったことが、大きな増感効果を得られなかった原因であると考えられる。

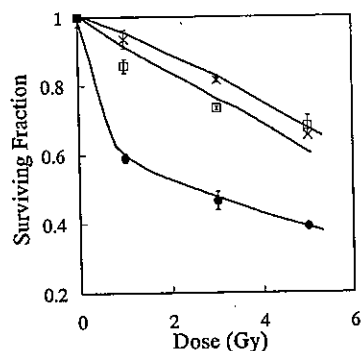


Figure 6. Hypoxic-cell radiosensitizing characteristics of 12 at 0.2mM: EMT6/KU cells were exposed to 12 for 1h at 37°C before X-irradiation under hypoxic (●) and aerobic (□) conditions. A control X-irradiation without 12 (×) under hypoxic conditions is also shown.

■ 結言 ■

本研究では、低酸素雰囲気下における一電子還元により、5-FdUrdを遊離する新規プロドラッグの開発を試みた。5-FdUrdのN(3)位にインドールキノン基を導入した5-FdUrd誘導体12を合成し、放射線照射または光増感還元反応を調べた結果、セミキノンラジカルアニオンの不均化反応を経て、効率よく5-FdUrdを遊離することがわかった。また、低酸素条件下で放射線を照射した場合、12は強い毒性を発現することがわかった。

ただし、本研究の目的である、人体に有害な菌類への活性については、サンプルとなる貯留雨水の採集と、それより検出される菌類の選出を行うことができなかったため、細胞毒性については、入手可能であったマウス乳癌由来EMT6/KU細胞とヒト乳癌MCF-7細胞を用いて、12の細胞毒性を評価した。この後、特定の細菌・大腸菌に対し同実験を行う予定である。

【参考文献】

- 1) Tanabe, K.; Mimasu, Y.; Eto, A.; Tachi, Y.; Sakakibara, S.; Mori, M.; Hatta, H.; Nishimoto, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4551-4556
- 2) Matthew, A. N.; Elizabeth, S.; Steven, A. E.; Mohammed, J.; John, N.; Naomi, R.; Stacey, D. L.; Kantial, B. P.; Madeleine, F. D.; Michael, R. L. S.; Peter, W.; Gerald, E. A.; Christopher, J. M.; Ian, J. S., *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2720-2731.
- 3) Elizabeth, S.; Paola, B.; Ann, M. O.; Walter, T. G.; Anna, R. H.; Howard, D. B.; Christopher, J. M. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3311-3319.
- 4) James, B. P.; Elizabeth, K. S., *Tetrahedron Letters* **1979**, *42*, 4009-4012
- 5) Tanabe, K.; Kojima, R.; Hatta, H.; Nishimoto, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2633-2635.

【2】 遺伝子配列認識能をもつプロドラッグ1 インドールキノン誘導体の光還元反応の利用

■ 緒言 ■

近年、ゲノムの解読が完了し、その遺伝情報を基にして個々の患者に適した予防・治療を可能とするテーラーメイド医療の研究が盛んに行われている。ヒトの遺伝子は約 30 億の塩基対から成っており、その中で約 1000 個から 2000 個に 1 個の割合で一塩基多型(SNPs)と呼ばれる変異があることが知られている。このことが個人によって薬効が異なる、または副作用が現れる原因の 1 つとして考えられている。そこで、個々の遺伝子配列を認識する機能をもつ薬剤の開発が積極的に行われている。このような試みの 1 つとして DNA の高い塩基配列認識能を利用し、特定の塩基配列と二重鎖形成する場合にのみ薬剤を遊離する機能性核酸の開発が活発に行われている。この、ヒトの遺伝子配列の違いを見分けるドラッグの開発は、本研究の“各種菌”の遺伝子配列の違いを見分けるドラッグの開発に通ずるものである。

本研究では、三成分系 DNA システムを構築し、標的 DNA を認識して光誘起電子移動によって薬剤を遊離する機能性核酸の開発を目指している。三成分系 DNA システムは、標的となる塩基配列をもつ DNA、還元反応によって薬剤を放出する部位（前述のインドールキノン誘導体）をもつ DNA、光増感還元剤をもつ DNA で構成される。標的となる塩基配列をもつ DNA の存在下でのみ薬剤放出部位をもつ DNA と光増感還元剤をもつ DNA がそれぞれ標的 DNA と二重鎖形成し、その結果として空間的距離が近づくために光還元薬剤放出反応が促進される (Figure 1)。

以上のプロセスにより、雨水中の人体に悪影響を与える各種菌などの遺伝子配列の違いを見分けるドラッグが構築可能であると考えられる。

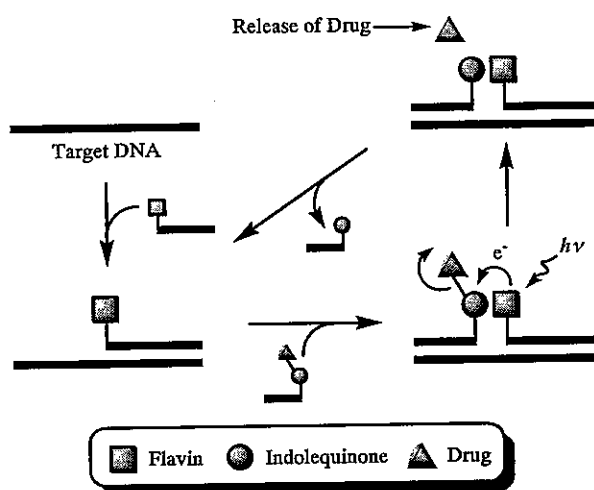


Figure 1. Photo-induced drug release from functionalized oligonucleotide in the presence of a target DNA.

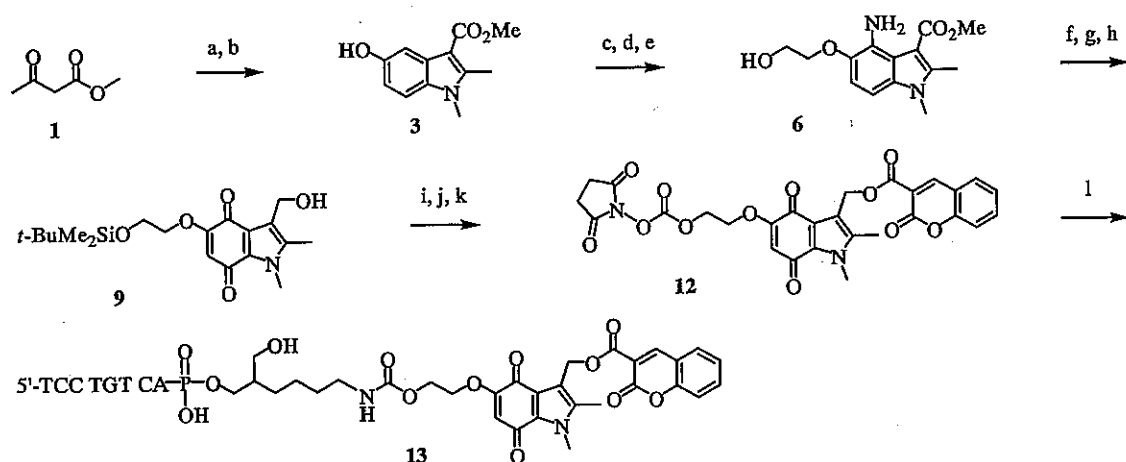
■ 結果および考察 ■

■ DNA への薬剤放出部位の導入

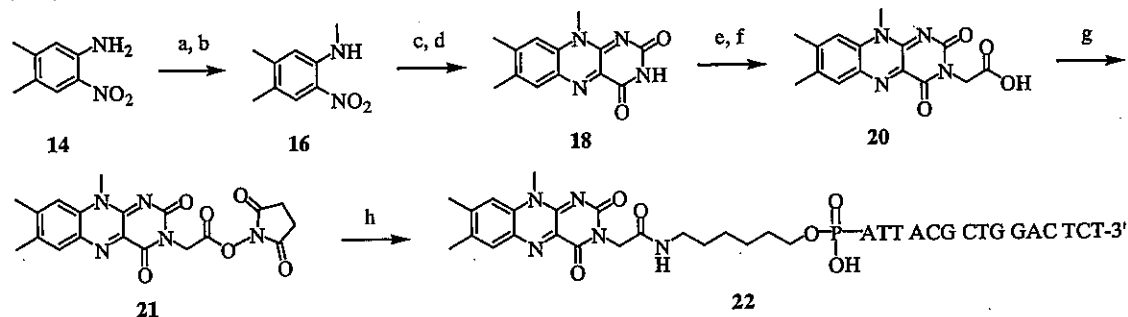
Scheme 1 に従って薬剤放出部位であるインドールキノンを DNA へ導入した。アセト酢酸メチル **1** を出発原料として用い Nenitzescu 反応を用いてインドール **3** を合成した。アルキルリンカー、アミノ基をそれぞれ導入した後 Fremy 塩を用いてインドールキノロン **9** を得た。さらに薬剤としてクマリンをエステル結合を用いてインドールキノロンと縮合させた後、スクシンイミジル基を導入して **12** とした。その後アミノ末端 DNA へと導入し、目的とする ODN **13** を得た。

■ DNA への光増感還元剤の導入

Scheme 2 に従って光増感還元剤であるフラビンを DNA へ導入した。アニリン誘導体 **14** を出発原料としてルミフラビン **18** を合成した後、N(3)位にカルボン酸を導入して **20** を合成した。スクシンイミジル基を導入して **21** とした後、アミノ末端 DNA へと導入し、目的とする ODN **22** を得た。



Scheme 1. Incorporation of the indolequinone moiety into DNA. Reagents: (a) MeNH₂, TMOF, MeOH (b) 1,4-Benzoquinone, MeNO₂ (quant in 2 steps) (c) *t*-BuMe₂SiOCH₂CH₂Br, NaH, DMF (37%) (d) HNO₃, AcOH, CH₂Cl₂ (67%) (e) Sn, HCl, EtOH (quant) (f) *t*-BuMe₂SiCl, Imidazole, DMF (97%) (g) DIBAL-H, CH₂Cl₂ (90%) (h) Fremy's salt, Trioctylmethylammonium chloride, 0.3 M NaH₂PO₄aq, THF (38%) (i) Coumarin-3-carboxylic acid, DCC, DMAP, CH₂Cl₂ (60%) (j) PPTS, MeOH (98%) (k) DSC, Et₃N, CH₃CN (72%) (l) NH₂-DNA, NaHCO₃, CH₃CN (24%).



Scheme 2. Incorporation of flavin moiety into DNA. Reagents: (a) (CF₃CO)₂O, Pyridine (98%) (b) MeI, K₂CO₃, DMF (86%) (c) Sn, HCl, EtOH (d) Alloxane, H₃BO₃, AcOH (69% in 2 steps) (e) Bromo ethylacetate, K₂CO₃, DMF (26%) (f) HCl (92%) (g) NHS, DCC, DMF (60%) (h) DNA-NH₂, NaHCO₃, CH₃CN (13%).

■ 光誘起薬剤遊離反応

ODN 13、ODN 22、および標的 DNA の 3 種の DNA の共存下、非共存下において紫外線照射を行ってクマリンの遊離反応を追跡した(Figure 2)。その結果、標的 DNA の存在下では非常に効率のよいクマリンの遊離が確認された。一方、一成分でも DNA が存在しなければ光遊離反応は著しく抑制された。このことは ODN 13 と ODN 22 が標的 DNA と二重鎖形成したため、効率の良い光誘起薬剤遊離反応が進行したことを示している。

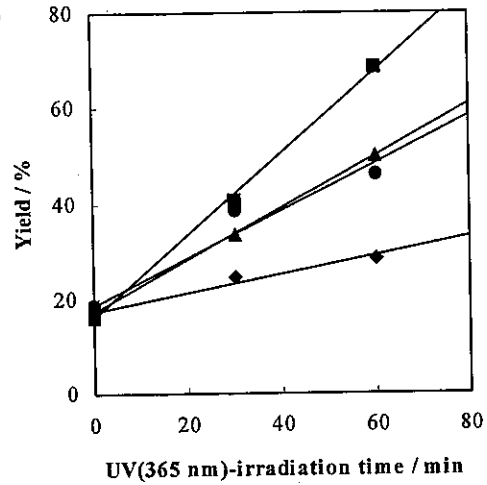


Figure 2. Kinetics of coumarin-3-carboxylic acid release from ODN 13 (■) in the presence of target DNA, (●) in the absence of target DNA, (▲) in the absence of ODN 22, (◆) without the photo-irradiation (365 nm).

■ 結言 ■

以上の結果から本システムを用いることにより標的 DNA の有無により光誘起薬剤遊離反応を制御できることが示された。この研究成果より貯留水中の人に有害な菌類の DNA に対して働きかけ、ターゲットとなる細菌や大腸菌などを死滅させることが可能であることから、貯留雨水の利用システムへの応用に繋がることが期待される。

【3】 遺伝子配列認識能をもつプロドラッグ2 ヘアピン型 DNA の構造変化の利用

■ 緒言 ■

近年、特異的な核酸を認識するための手法として、モレキュラービーコンに代表されるヘアピン型核酸蛍光プローブの開発研究が活発に行なわれている*1。この検出システムを応用することにより、核酸塩基配列を特異的に認識して薬剤を放出することが可能になると考えられる。本研究では、ヘアピン型 DNA の構造変化と三重項励起エネルギー移動(TET)を利用して、標的となる DNA が存在する場合にのみ、光照射下においてドラッグを放出するシステムの構築を試みた。

本システムでは、Figure 1 に示す2つの機能部位をもつヘアピン型 DNA(H-DNA)を利用する。H-DNA の一方の末端には光照射によりドラッグを遊離する部位を、他方の末端には光反応の消光剤を導入する。H-DNA がその相補的な配列を認識することによる構造変化の結果、近接していた光反応部位と消光部位が離れ、光ドラッグ放出反応が進行する。齋藤らは、これまでにアセトフェノン誘導体を導入したヘアピン型 DNA を用いて、光薬剤放出反応が制御できることを報告している*2。しかしながら、従来のシステムには、短波長の紫外光を必要とすること、さらに紫外光照射によって DNA の損傷が併発することなどの問題があった。

本研究では、より長波長の光を吸収してドラッグを放出すると期待されるニトロベンゼン誘導体*3に注目した。光ドラッグ放出部位としてニトロベンゼン誘導体、消光部位としては探索実験を通じて見出した1-アミノナフタレン*4を H-DNA に導入し、光照射下における反応挙動を追跡した。その結果、相補鎖 DNA の有無によって効果的にドラッグ放出反応を制御できることがわかった*5。

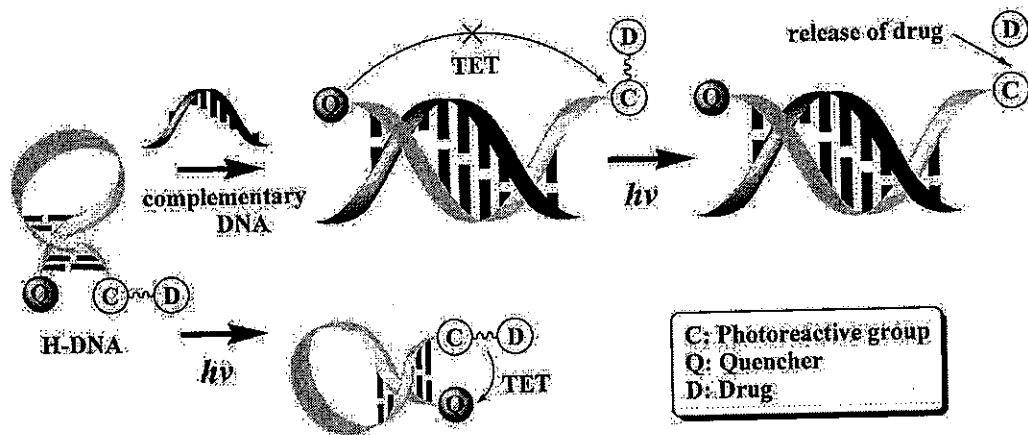


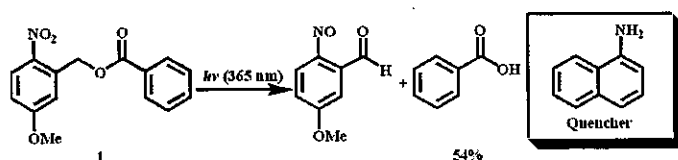
Figure 1. Concept of drug release from hairpin-type DNA by a molecular beacon strategy.

■ 結果および考察 ■

■ 消光機能部位の探索

ニトロベンゼン誘導体 **1** (三重項エネルギー: $E_T = 252 \text{ kJ/mol}$) は光照射下において安息香酸を放出することがわかっている。そこでまず、**1** の光反応の消光分子の探索を行なった。紫外光 (365 nm) の照射下でニトロベンゼン誘導体 **1** の光反応を追跡したところ、2 時間の光照射により、54% の安息香酸放出が確認された (Scheme 1)。

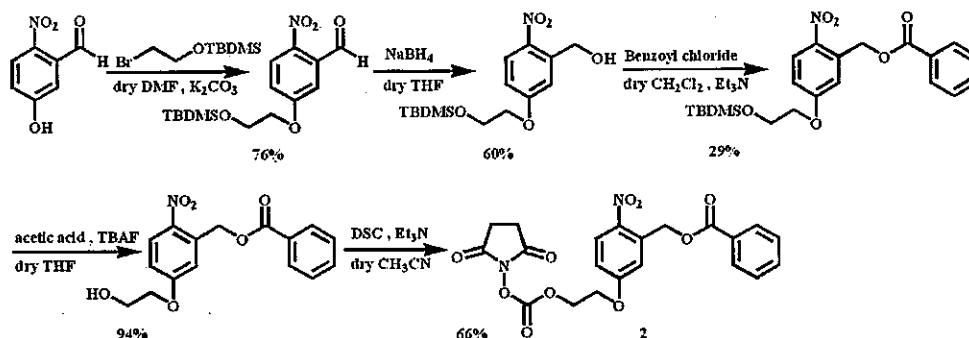
一方、三重項エネルギーの消光剤となり得る 1-アミノナフタレン ($E_T = 229 \text{ kJ/mol}$) の共存下で光を照射した場合には、反応が 12% 抑制された。このことより、1-アミノナフタレンがニトロベンゼン誘導体 **1** の光反応に対する消光剤として機能し得ることが示唆された。



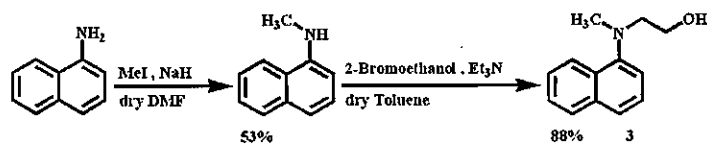
Scheme 1. Photoreaction of nitrobenzene derivative **1**.

■ 光ドラッグ放出部位と光反応消光機能部位を有するヘアピン型 DNA の合成

DNA に導入することを目的として、光ドラッグ放出部位であるニトロベンゼン誘導体 **2** と光反応消光機能部位である 1-アミノナフタレン誘導体 **3** の合成を行なった (Scheme 2 and Scheme 3)。

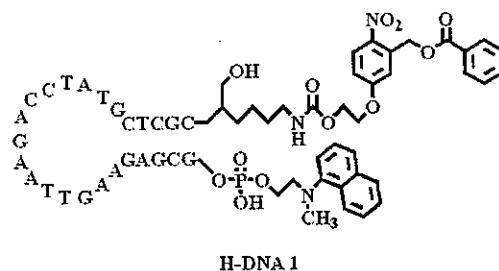


Scheme 2. Synthesis of nitrobenzene derivative **2** consisting of a succinimide group.



Scheme 3. Synthesis of 1-aminonaphthalene derivative **3**.

次にヘアピン型 DNA の合成を行なった。DNA 自動合成機を用いて 1-アミノナフタレン含有 DNA を合成し、続いてニトロベンゼン誘導体 2 と縮合することにより求める H-DNA 1 を合成した(Figure 2)。本研究では、ドラッグのモデルとして安息香酸を用いることとした。また、合成した DNA は酵素分解および MALDI-TOF MASS を用いて生成を確認した(Calcd. : 8506.68, found: 8505.27)。

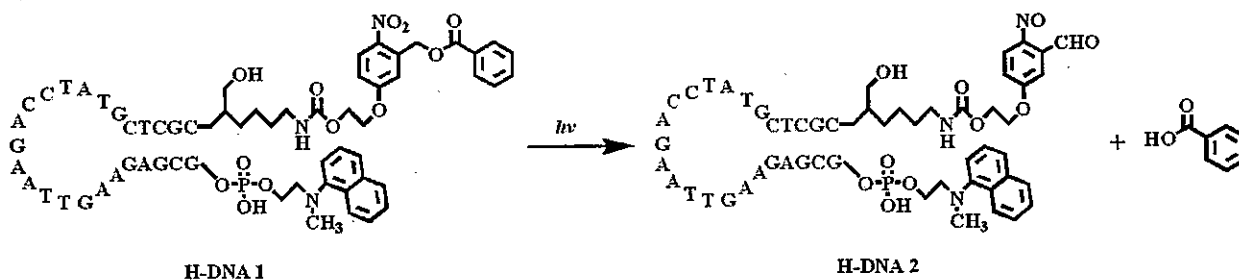


H-DNA 1

Figure 2. Representative oligodeoxynucleotide that consists of photoreactive group, drug and quencher (H-DNA).

■ヘアピン型 DNA の光反応

H-DNA 1 に 365 nm の紫外光を 0°C で 5 時間照射し、反応後の生成物を分析した。H-DNA 2 は MALDI-TOF MASS により、安息香酸は HPLC により同定した。その結果、H-DNA 1 の紫外光照射によって、安息香酸が放出され、ホルミル体 H-DNA 2 が生成することを見いだした。このことからニトロベンゼン誘導体の光ドラッグ放出反応により、DNA は損傷を受けないことがわかった (Calcd. : 8384.55, found: 8383.58)。



Scheme 4. Reaction mechanism of H-DNA 1 under photo-irradiation.

■ヘアピン型 DNA の構造に及ぼす温度効果

合成した H-DNA 1 がヘアピン型を形成していることを確認するために光ドラッグ放出反応の温度依存性を調べた。H-DNA 1 に種々の温度条件下で 365 nm の紫外光を 30 分照射した場合の安息香酸の放出効率を Figure 3 に示す。

この結果から、反応温度の上昇とともに、放出効率が向上することがわかった。このことは、低温条件下で H-DNA 1 はヘアピン型を形成しているため、光反応の消光が起こるが、温度の上昇とともにステム部が解離し、光ドラッグ放出部位と消光機能部位

が互いに離れたため、光反応の効率が向上したことを示している。なお、ヘアピン型構造ステム部の解離温度は 36.1°C であった。

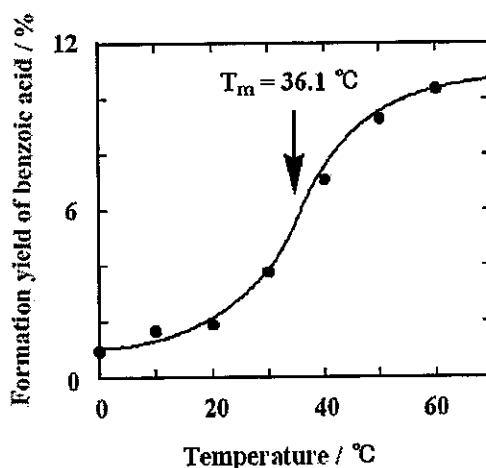


Figure 3. Change of formation yield of benzoic acid released from H-DNA 1 at various temperatures.

■ ヘアピン型 DNA の光ドラッグ放出反応

種々の塩基配列をもつ3種の DNA の共存下あるいは非共存下における安息香酸の光放出反応を追跡した。用いた DNA は Table 1 に示すように完全マッチ配列をもつ

DNA 1、一塩基ミスマッチ配列をもつ DNA 2、完全に非相補的配列の DNA 3 である。H-DNA 1 に対して5当量の DNA 1、DNA 2、DNA 3 の共存下、0°C で所定時間 365 nm の紫外光を照射した。HPLC を用いて安息香酸の放出を分析した結果を Figure 4 に示す。また、種々の DNA 共存下あるいは非共存下での安息香酸放出反応における速度定数を Table 2 に示す。その結果、完全マッチ配列をもつ DNA 1 の共存下において、非常に効率のよい安息香酸の遊離がみられた。一方、ひとつでもミスマッチ塩基対があると、光放出反応は大きく抑制され、相補的 DNA の非共存下の場合とほぼ同程度であった。このことは、H-DNA 1 は完全に相補的な DNA とのみ二重鎖を形成したため、効率のよい光ドラッグ放出反応が進行したことを示している。なお、非相補的な DNA の共存下あるいは H-DNA 1 のみの場合の光反応効率、完全相補的 DNA 共存下の場合と比較すると、それぞれ61%(一塩基ミスマッチ)、57%(完全非相補的配列)、49%(H-DNA 1 のみ)に抑制された。

Table 1. Full sequence of oligodeoxynucleotide used in this study.

DNA1: 5'CATAGGTCTTAACCTT-3'
DNA2: 5'CATAGGTGTTAACTT-3'
DNA3: 5'CTGGTGCTCGACGCG-3'

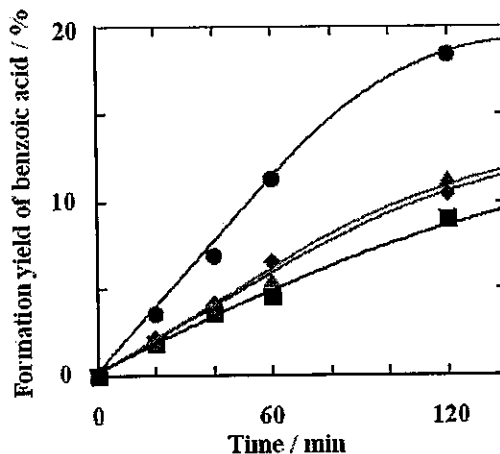


Figure 4. Photoinduced release of benzoic acid from H-DNA 1 (0, 20, 40, 60 and 120 min of irradiation time): H-DNA 1 alone (●); in the presence of complementary DNA 1 (■); in the presence of single base mismatch DNA 2 (▲); in the presence of non-complementary DNA 3 (◆).

Table 2. Rate constant of photoinduced release of benzoic acid from each system.

Sample	rate constant($10^{-4} \mu\text{M}/\text{sec}$)
H-DNA only	1.29
H-DNA + DNA1	3.11
H-DNA + DNA2	1.55
H-DNA + DNA3	1.54

■ 結言 ■

以上の結果から、光ドラッグ放出部位としてニトロベンゼン誘導体、消光機能部位として1-アミノナフタレン誘導体をもつ H-DNA を利用すると、相補的 DNA の有無により光ドラッグ放出反応を制御できることがわかった。本ドラッグ放出制御システムの特徴はドラッグを様々な機能分子に置換できる点にある。すなわち、本システムは遺伝子配列をダイレクトに利用できるプロドラッグ、あるいは遺伝子診断ツール等、幅広い分子機能システムとして利用できると考えられる。

【参考文献】

- 1)(a) Tyagi, S.; Kramer, F. R. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.
(b) Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, A. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 365-370.
(c) Marras, S. A. E.; Kramer, F. R.; Tyagi, S. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e122-129.
- 2) Okamoto, A.; Tanabe, K.; Inasaki, T.; Saito, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2502-2504.
- 3)(a) Barltrop, J. A.; Plant, P. J.; Schofield P. *Chem. Commun.* **1966**, 822-823.
(b) Patchornik, A.; Amit, B.; Woodward, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6333-6335.
(c) Kalbag, S. M.; Roeske, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 440-441.
- 4) Givens, R.S.; Weber, J. F. W.; Conrad II, P. G.; Orosz, G.; Donahue, S. L.; Thayer, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2687-2697.
- 5) Tanabe, K.; Nakata, H.; Okamoto, A.; Saito, I.; Nishimoto, S. *Photomedicine and Photobiology* *in press*.

3. まとめ

以上のように、我々は、雨水中の特定の菌のみを殺傷させるインテリジェントなドラッグの構築を目的として、遺伝子配列認識能をもつプロドラッグの開発を行った。インドールキノン誘導体やニトロベンゼン誘導体をクロモフォアとしてもつ修飾DNAオリゴマーを合成し、その光反応特性を評価した。その結果、いずれの修飾DNAオリゴマーにおいても、ある特定の塩基配列をもつ標的DNAの共存下において選択的にドラッグが遊離することを見出した。これらの成果は、遺伝子配列をドラッグが認識し得ることを示し、遺伝子のレベルで雨水中の各種菌を識別し、ドラッグにより殺傷し得ることを示唆している。現段階では、*in vitro* 実験の結果しか得られていないが、今後、実際の細胞（菌類）を使用して、これらプロドラッグの機能評価を行う予定である。

【謝辞】

最後に、本実験の契機を与えてくださったエスベック地球環境研究・技術基金に感謝申し上げます。

【共同研究者】

田 邊 一 仁 京都大学大学院工学研究科 物質エネルギー化学専攻 助手
城 幸 弘 京都大学大学院工学研究科 物質エネルギー化学専攻 博士後期課程