

カチオン性 Schiff 塩基二核銅(II) 錯体による DNA 切断と生理活性の検討

DNA Cleavage and Cytotoxicity of Dicopper (II) Schiff Base Complexes with Cationic Substituents

応用化学専攻 東城 翠
TOJO Midori

適切な中心金属や配位子構造を選択することで、遷移金属錯体に DNA への高い親和性や切断活性などの機能を付与することができる。本研究では、架橋部位の構造を変えた5種のカチオン性 Schiff 塩基二核銅(II)錯体を合成し、子牛胸腺DNAへの結合親和性を評価した。また、これらの錯体はプラスミド DNA の GC 塩基部位に特異的に結合し、DNA を切断することがわかった。さらに、ヒト乳ガン由来の MCF-7 細胞に対しての細胞毒性を見出した。

緒言

DNA に作用する機能性遷移金属錯体は、新たな抗腫瘍剤や抗ウイルス剤となる可能性を有しており、注目を集めている。

我々の研究室での先行研究によって、平面型構造をとるカチオン性 Schiff 塩基単核銅錯体 (Figure 1) は、DNA の AT 配列を認識して結合することがわかった。また、その架橋構造が変わると結合様式に顕著な差が現れることを見出した^{1,2)}。さらに、Figure 2 に示す二核化した銅(II)錯体 **1** は、単核錯体よりも高い結合親和性及び切断能を示した³⁾。DNA との相互作用点が増えたことにより親和性が向上し、二つの金属イオンの協同作用が効果的な切断活性に繋がったと考えられる。

本研究では、架橋構造を様々に変えた錯体 **1** の類似体 **2, 3, 4, 5** を合成し、架橋部位の違いによる DNA への親和性や結合様式、切断能の比較を行った。さらに、MTT 法を用いて癌細胞に対しての生理活性を確認した。

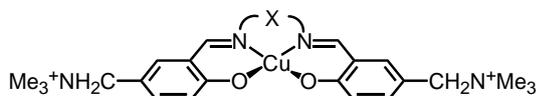


Figure 1. Structure of the functional mononuclear copper (II) complexes. (x = CH₂CH₂, *o*-C₆H₄)

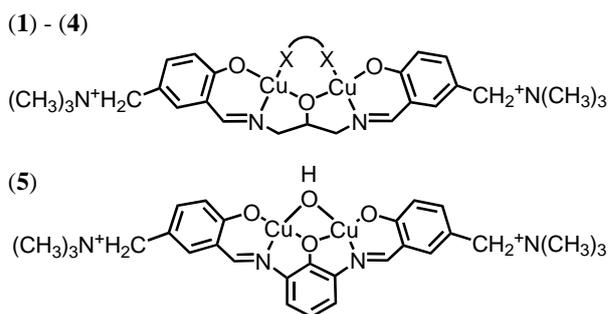


Figure 2. Structure of the functional dinuclear copper (II) complexes. $\overset{\curvearrowright}{\underset{\curvearrowleft}{X}}$: deprotonated anions of pyrazol (1), 3-methyl-5-pyrazolone (2), 3,5-dimethylpyrazole (3), and acetic acid (4).

実験方法

1. 錯体の合成

錯体 **1** の配位子となる Schiff 塩基は、1, 3-ジアミノ-2-プロパノール (1 mmol) と 5-(trimethylammoniomethyl)salicylaldehyde chloride (MS) (2 mmol) を混合し、エタノール中で一時間反応させて得た。塩化銅六水和物 (2 mmol), ピラゾール (1 mmol), トリエチルアミン (3 mmol) をエタノール中に溶かし、配位子の溶液に攪拌しながら加えた。三時間攪拌した後、得られた溶液に、メタノールに溶かした過塩素酸ナトリウム (2 mmol) を加えた。生じ

た沈殿を、ろ過、乾燥し青紫色粉末を得た。同様の方法で他の錯体の合成を行ったところ、灰青色 (2)、濃青色 (3)、淡青色 (4) 粉末を得た。錯体 5 においては、1,3-ジアミノ-2-プロパノールの代わりに 2,6-ジアミノフェノールを用い、エタノールと水の混合溶媒中で同様の方法で合成を行い、緑色粉末を得た。各錯体は、元素分析並びに ESI-MS, UV-vis, IR 測定により合成を確認した。

2. DNA への親和性評価

100 μM 子牛胸腺 DNA (*ct*-DNA) 溶液に、錯体を様々な濃度比で添加して調整した混合溶液 (20 mM HEPES 緩衝液, pH = 7.4, 30 mM NaCl) を、恒温槽で一晩 37°C でインキュベーションし CD 測定を行った。そして、各濃度比に伴うスペクトルの変化を解析し、結合定数 K 、及び、結合サイトサイズ s を算出した。

また、10 μM 臭化エチジウム (EB) 溶液に、*ct*-DNA を加えながら 595 nm 付近での EB の発光強度を確認した。発光が飽和したところを EB の結合が平衡に達した点とみなした ($C_{\text{DNA}} = 46 \mu\text{M}$)。その溶液に錯体を 0.7 μM ずつ加えると EB と錯体間での競争的結合により、発光強度の減少が生じた。その際の強度の変化から Stern-Volmer plots を作成し、消光定数 K_{sq} を算出した。

3. DNA 結合率評価

20 mM HEPES 緩衝液 (pH = 7.4, 30 mM NaCl) 中で錯体と *ct*-DNA を混合し (錯体: *ct*-DNA = 1 : 20), 3 時間攪拌した。その後、60000 rpm で 7 時間、超遠心分離機にかけ、*ct*-DNA を沈殿、分離させた。その上澄み液から求めた錯体濃度から、DNA に結合した錯体の濃度を算出し、結合率を求めた。

4. DNA 切断反応

マイクロチューブに 50 μM プラスミド DNA (pBR322), 100 mM HEPES 緩衝液 (pH = 7.4), 錯体溶液をそれぞれ 2 μl ずつ加え、滅菌済み超純水で全量を 20 μl に調整し、これを反応溶液とした。37°C の恒温槽で種々の時間インキュベーションし、

反応停止時に 100 mM EDTA を 2 μl 加え、DNA の切断を停止させた。その後、アガロースゲル電気泳動法により DNA 切断能を評価した。また、反応溶液に 2 μl の 1 mM H_2O_2 を添加した場合についても同様な実験を行った。

また、5'-CAGCTG-3' を認識し GpC を切断する制限酵素 Pvu II と、5'-AGTACT-3' を認識し TpA を切断する制限酵素 Sca I によるプラスミド DNA の切断が、錯体の添加によりどのような影響を受けるかを確認し、その結果より錯体の結合時における塩基認識性の評価を行った。

5. 細胞毒性評価

ヒト乳ガン由来の MCF-7 細胞を 96 ウェルプレートに等量ずつ蒔き、そこに錯体を加え (0 - 180 μM)、37°C で 72 時間インキュベーションした。接着細胞の剥離を行うため 0.25 % トリプシン-EDTA 溶液で処理し、その後、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を 20 μl (5 mg ml^{-1}) 加えた。更に 3 時間 CO_2 存在下でインキュベーションし、生きた細胞の持つ還元酵素と MTT の反応により生じたホルマザン沈殿を DMSO で溶かした。そのホルマザンの濃度を 570 nm の吸光度から求め、 IC_{50} を算出した。

結果と考察

1. DNA への親和性評価

錯体と *ct*-DNA との相互作用の評価を行うために CD スペクトルを測定した。その結果、錯体 1-4 においては 360 nm 付近に、錯体 5 においては 459 nm に誘起 CD が観測された。これは右巻らせん構造を有する DNA に錯体が結合して誘起されたシグナルであり、DNA に錯体が結合していることを示している。また、錯体 1-4 では錯体濃度に比例して正のコットン効果の増加が見られたが (Figure 3a)、錯体 5 は、他の錯体とは明らかに異なるスペクトル変化の挙動を示した (Figure 3b の点線と実線)。このことから、錯体 5 は DNA に対して錯体 1-4 とは違う結合様式を持つことが推測される。

CD スペクトルの変化が一様に得られたものにつ

いては Inase 等の最小自乗式⁴⁾を用い、その変化から親和力の指標である結合定数 K 、及び、錯体 1 分子あたりの DNA 塩基対の認識度を示す結合サイトサイズ s を算出した (Table 1).

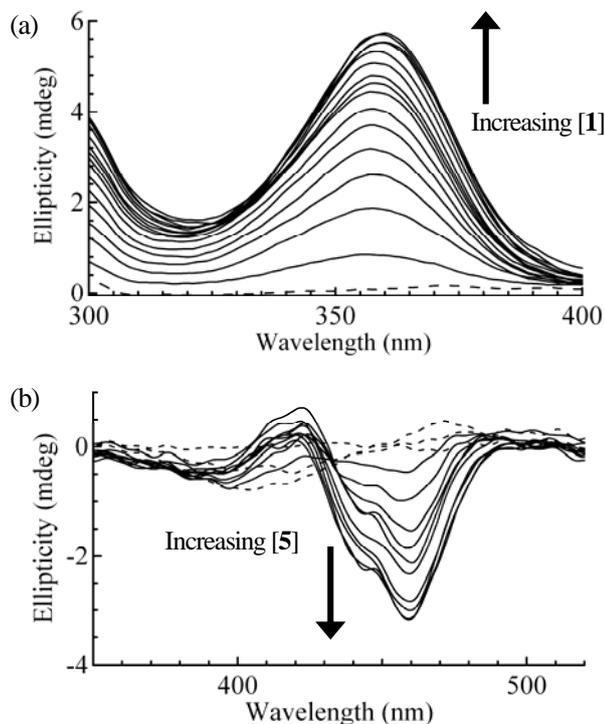


Figure 3. The change of CD spectra with the addition of (a) **1** and (b) **5** to *ct*-DNA.

Table 1. Binding properties of complexes.

complex	K	s	K_{sq}
1	4.1×10^5	4.4	9.20 ± 0.03
2	5.1×10^5	3.5	7.52 ± 0.09
3	3.0×10^6	4.1	11.5 ± 0.27
4	1.0×10^7	5.7	13.7 ± 0.37
5	-	-	5.60 ± 0.15

K (M^{-1}); binding constant

s (base pair / molecule); binding sites size

K_{sq} ; quenching constant

その結果、錯体 **1** に対して架橋構造を変えた錯体 **2 - 4** の方がより強い親和性を有していることがわかった。特に錯体 **3, 4** の結合定数の向上は顕著であった。錯体 **2** においてのみ、他の錯体と異なり、結合サイトサイズが結合定数に比例しなかった。結合サイトサイズが小さいことから、塩基認識性が他より低い可能性が示唆される。錯体 **2** の架橋構造のカ

ルボニル基と MS 配位子との間に静電的な反発が生じ、平面性が崩れたことが影響していると考えられる。DFT 計算からも、配位子内の静電的な反発により銅の配位構造に歪みが生じている可能性が示唆された。

また、DNA 上での EB と錯体の競争的結合の挙動を EB の発光測定より観測した。その結果、すべての錯体において、その濃度の増加に伴い EB の発光の減少が確認された。EB は DNA の塩基対間に結合することで強く発光する。よって錯体を加えた際に見られる発光強度の減少は、錯体が EB に置き代わって DNA に結合したことを意味する。その発光強度の変化から消光定数 K_{sq} を算出したところ (Table 1)、錯体 **1 - 4** の結合サイトサイズと消光定数との間には相関性が見られた。

2. DNA の結合率について

DNA に対する結合率は、錯体 **5** > **4** > **3** > **2** > **1** の順で、97%、78%、75%、73%、68%であった。この値は CD 測定から求めた結合定数と相関性があり、結合定数を算出できなかった錯体 **5** は極めて強い親和性を持つことが明らかとなった。しかし、EB を用いた消光実験の結果、最も低い K_{sq} 値を示したことから、錯体 **5** においては他の錯体と異なり、EB の結合を阻害しないような状態で結合している成分が存在していることがわかった。Figure 1 に示す単核錯体においても同様の実験を行ったところ、エチレン架橋錯体は 52%、フェニレン架橋錯体は 99% の結合率を示し、顕著な差が見られた。以上からも、錯体 **5** のような架橋構造は DNA に対して錯体 **1 - 4** とは異なる結合様式を持つことが考えられる。

3. DNA 切断反応

切断促進剤に H_2O_2 を用いて切断能を評価したところ、すべての錯体において反応時間に比例して切断の進行が確認された (Figure 4)。錯体 **1 - 4** においては反応時間 20 分後に DNA の二本鎖切断を示す Form III まで切断が進行していたが、錯体 **5** では 60 分経過しても Form III を確認することは出来なかった。 H_2O_2 を用いない加水分解的切断能を評

価したところ、同様に時間の進行に伴いすべての錯体において切断の進行が確認された。特に反応開始から 20 時間後において、錯体 2 でのみ Form III への切断が確認できた。錯体の平面性が崩れたことで銅の配位環境が不安定化し、DNA のリン酸ジエステル部位に銅の軸配位が接近しやすくなったことが切断効率の向上に繋がったものと考えられる。

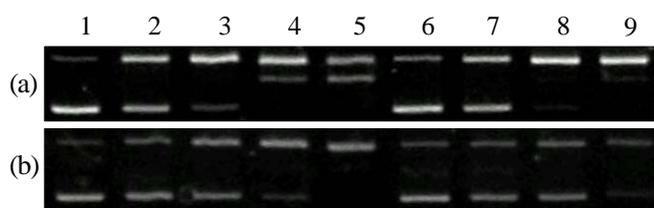


Figure 4. Electrophoresis for plasmid DNA after the treatment with several complexes. The solution of plasmid DNA (pBR322, 5 μ M) were incubated with each complex (2.5 μ M) in HEPES buffer 10 mM (pH = 7.4) at 37°C. Lane 1 : pBR322 alone, (a) Lane 2 - 5 : pBR322 + 2 (5, 10, 20, 30 h), Lane 6 - 9 : pBR322 + 3 (5, 10, 20, 30 h) (b) Lane 2 - 5 : pBR322 + 4 (5, 10, 20, 30 h), Lane 6 - 9 : pBR322 + 5 (5, 10, 20, 30 h)

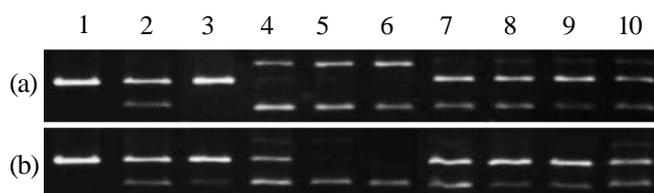


Figure 5. Electrophoresis for the enzymatic digestion of plasmid DNA after the treatment with several complexes. Before the addition of restriction enzymes (3U), plasmid DNA (pBR322, 5 μ M) were incubated with (a) 2 and (b) 5. Lane 1 : pBR322 + Pvu II, Lane 2 : pBR322 + Sca I, Lane 3 - 6 : pBR322 + Pvu II + complex (2.5, 5, 10, 20 μ M), Lane 7 - 10 : pBR322 + Sca I + complex (2.5, 5, 10, 20 μ M) incubated for 1 h at 37°C in Tris-HCl buffer 50 mM (pH = 7.5).

また Figure 5 に示す制限酵素阻害実験の結果より、すべての錯体において Sca I よりも Pvu II による DNA 切断を阻害することが明らかとなった。Pvu II は、プラスミド DNA 上の 1 箇所が存在する 5'-CAGCTG-3'を認識し、GpC を特異的に切断する。既に単核錯体 (Figure 1) は AT 配列を認識することが報告されているが¹⁾、二核錯体はその架橋構造に関わらず、すべてが GC 配列に認識性を持つことが明らかとなった。

5. 細胞毒性評価

MTT 法によりヒト乳ガン由来の MCF-7 細胞に対して活性を評価したところ、すべての錯体がある濃度において細胞毒性を示した。これは錯体が細胞に取り込まれ、細胞の代謝メカニズムに作用している可能性を示している。今回の結果では、各錯体の IC₅₀ が 1 は 112 μ M, 2 は 109 μ M, 3 は 55 μ M, 4 は 94 μ M, 5 は 172 μ M となった。架橋部位にメチル基を導入した錯体 3 が最も低い IC₅₀ を示し、他の錯体と比べて癌細胞に対するより効果的な活性が確認された。この値は既に抗がん剤として広く使われている Carboplatin が示す値 (IC₅₀ = 250 μ M / 24 h incubation time) に匹敵している⁵⁾。実際に薬剤へ応用させるために、錯体の細胞膜透過性など他の要因も考慮に入れながら、今後は DNA との相互作用と細胞への生理活性にどのような相関があるのか、引き続き詳細に検討する必要がある。

結言

シッフ塩基配位子の架橋構造を変えることにより、DNA の親和性と切断能並びに癌細胞への生理活性を検討した。その結果、平面性の高い架橋構造を持つ錯体 3, 4, 5 は DNA に対して強く結合することが明らかとなった。一方非対称性の架橋構造を持つ錯体 2 は、平面性を崩すことで DNA への切断能を向上させることに成功した。また DNA への作用だけでなく細胞にも活性を示すことが明らかとなり、架橋構造の設計がより効果的な抗腫瘍剤の開発につながることを示唆された。

参考文献

- (1) K. Sato, M. Chikira, Y. Fujii, A. Komatsu, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, **5**, 625-626.
- (2) T. Tanaka, K. Tsurutani, A. Komatsu, *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1997, **70**, 615-629.
- (3) 柿沼 好映, 中央大学大学院修士論文 (2006).
- (4) A. Inase, T. S. Kodama, J. Sharif, Y. Xu, H. Ayame, H. Sugiyama, S. Iwai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 11017-11023.
- (5) A. Ghezzi, M. Aceto, C. Cassino, E. Gabano, D. Osella, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 73-78.