
修飾シクロデキストリンを用いた
DNAインターカレータの研究

課題番号 09650869

平成9年度 ～ 平成12年度
科学研究費補助金 基盤研究(C)(2)研究成果報告書

平成13年4月

研究代表者 池田 宰

広島大学工学部助教授

はしがき

研究組織

研究代表者：池田 幸（広島大学工学部助教授）

研究経費

平成 9年度	1, 800 千円
平成10年度	500 千円
平成11年度	500 千円
平成12年度	500 千円
計	3, 300 千円

研究発表

(1) 学会誌など

- (1) T. Ikeda, K. Kajiyama, T. Kita, K. Kunita, N. Takiguchi, A. Kuroda, J. Kato H. Ohtake, Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria using Synthetic Autoinducers and Their Analogues, Proceedings of ISEB 2000, (CD-ROM), 2000
- (2) A. Ueno, A. Ikeda, H. Ikeda, T. Ikeda, F. Toda, Fluorescent Cyclodextrins Responsive to Molecules and Metal Ions. Fluorescence Properties and Inclusion Phenomena of N^α -Dansyl-L-lysine- β -cyclodextrin and Monensin-Incorporated N^α -Dansyl-L-lysine- β -cyclodextrin, J. Org. Chem., Vol. 64, 382-387, 1999
- (3) T. Ikeda, A. Nakazato, M. Mori, A. Ueno, F. Toda, H.-J. Schneider, Conformational Studies on Anthryl(alkylamino)- β -cyclodextrin Complexes and their Abilities as DNA Intercalators, A. W. Coleman (ed.), Molecular Recognition and Inclusion, 373-376, 1998
- (4) S. Usui, K. Hamasaki, T. Kuwabara, A. Nakamura, T. Ikeda, H. Ikeda, A. Ueno, F. Toda, Molecular Dynamics Conformational Search for the Factors that Determine Conformation of Modified Cyclodextrins, Supramol. Chem., Vol. 9, 57-67, 1998
- (5) T. Aoyagi, A. Nakamura, H. Ikeda, T. Ikeda, H. Mihara, A. Ueno, Alizarin Yellow Modified β -Cyclodextrin as a Guest Responsive Absorption-Change Sensor, Anal. Chem., Vol. 69, 659-663, 1997

- (6) K. Hamasaki, S. Usui, H. Ikeda, T. Ikeda, A. Ueno, Dansyl-Modified Cyclodextrins as Fluorescent Chemosensors for Molecular Recognition, *Supramol. Chem.*, Vol. 8, 125-135, 1997

(2) 口頭発表など

- (1) T. Ikeda, K. Kajiyama, T. Kita, Y. Inoue, A. Suehiro, N. Takiguchi, A. Kuroda, J. Kato, H. Ohtake, Chemical Approaches to Molecular Recognition in Biological System, Workshop on Combinatorial and Supramolecular Chemistry, 12/7-10, 2000
- (2) T. Ikeda, K. Kajiyama, T. Kita, N. Takiguchi, A. Kuroda, J. Kato, H. Ohtake, H-J. Schneider, The Correlation Between Structure and Activities in Molecular Recognition System : Autoinducers in Bacteria and DNA Intercalators, The 62nd Okazaki Conference - Structural Hierarchy in Molecular Science, 1/10-13, 1999
- (3) 池田宰、黒田章夫、國本宏和、滝口昇、加藤純一、大竹久夫、リン酸修飾シクロデキストリンの合成と機能、第16回シクロデキストリンシンポジウム、10/15-16、1998
- (4) 池田宰、修飾シクロデキストリンを用いた酵素モデル、分子認識およびDNAインターカレーターに関する研究、第15回シクロデキストリンシンポジウム学会奨励賞受賞講演、11/6-7、1997
- (5) 池田宰、中里明日香、上野昭彦、戸田不二緒、H-J. Schneider、大竹久夫、アントラセン修飾シクロデキストリン-ゲスト包接体の核酸認識能、第15回シクロデキストリンシンポジウム、11/6-7、1997
- (6) 池田宰、中里明日香、上野昭彦、大竹久夫、DNA認識能を有する修飾シクロデキストリンの合成と機能、第2回バイオテクノロジー部会シンポジウム、9/28-29、1997
- (7) T. Ikeda, A. Nakazato, A. Ueno, F. Toda, H-J. Schneider, Synthesis and Characterization of Anthryl(alkylamino)- β -cyclodextrin Complexes as DNA Intercalators, 7th Asian Chemical Congress, 5/16-20, 1997

(3) 出版物など

なし

【緒言】

近年、DNAと相互作用を有する化合物に関する研究が、生体系でのDNA認識のメカニズムの模倣、モデル化合物として注目されている。また、DNAを位置特異的に切断する機能や、位置特異的に認識する、またはインターカレートする機能などは、制癌剤を初めとする新規薬剤の重要な新しい機能性の一つとして注目・要求されている。これらは、ドラッグ・デリバリー・システムやドラッグ・ターゲティングなどの観点からも興味深いテーマである。アントラセン、アクリジン、キノン、キノリン及びその誘導体などは、DNAに対するインターカレータとして知られ、多数研究報告されている。これらの化合物には水溶性に難点がある物もあり、誘導体を用いた溶解性に対する改良や、金属イオンを配位させることによる切断活性の取得などが行なわれている。

そこで、グルコースが複数個環状に結合しその疎水性空洞に種々の有機化合物を取り込みコンプレックスを形成する能力を有するシクロデキストリンを用い、インターカレート能を有する残基を導入することによりDNAインターカレート能を有する修飾シクロデキストリンを合成し、DNAに対する相互作用（認識・切断）や、ドラッグ・デリバリー・システム、ドラッグ・ターゲティングに対する利用、応用などを検討することを本研究の目的とした。

シクロデキストリンを用いたドラッグ・デリバリー・システムやドラッグ・ターゲティングに対する研究は今までに多数行われてきているが、シクロデキストリンは単にカプセル剤として用いられた例がほとんどである。これは、シクロデキストリンが生体分子に対する強い相互作用、認識能を示さないということに起因する。そこで、シクロデキストリンに対しDNAインターカレート能を有する官能基を導入することにより、シクロデキストリンにDNA認識能を付加することとした。このことにより、直接DNAとの相互作用を有しない化合物も、シクロデキストリンとコンプレックスを形成させることにより、DNAに対するターゲティングが期待される。このようなシクロデキストリン単位を有するDNAインターカレータに関する研究は未だ行なわれたことはない。さらに、これらは、制癌剤を初めとするドラッグ・ターゲティングなどの機能を有する、新規薬剤設計の観点からも有用な知見となることが期待される。

【実験方法および結果、考察】

・平成9年度

グルコースが複数個環状に結合したオリゴ糖であるシクロデキストリン (Fig.1) は、その内部に疎水性空洞を有し、水溶液中で種々の有機化合物と包接複合体 (コンプレックス) を形成する能力があることが知られている。この包接複合体形成能を利用した、医薬品、食品、化粧品分野での実用的な応用がさかんに行われている。シクロデキストリン単体は、生体物質、特にDNA、RNAなど核酸に対する親和力をほとんど有しないため、DNAに対する親和力を有する置換基の導入を計画した。置換基としては、DNAに対しインターカレートすることが知られているアントラセンを用いることとした。

グルコース7つからなる β -シクロデキストリンの一級水酸基側にアントラセン残基を一つ導入した化合物の合成を試み、アントラセン修飾シクロデキストリン (Fig.2-a) を合成することに成功した。確認は、NMR、元素分析などにより行なった。得られた修飾シクロデキストリンは水溶液中では通常アントラセン残基がシクロデキストリン空洞に取り込まれた自己包接体を形成していることがNMRや円二色性スペクトルの測定などから明らかとなった。この状態ではアントラセン残基はシクロデキストリンに保護された形となり、DNAとの相互作用はなんら観測されなかった。そこで、この系にシクロデキストリンの空洞に強く包接される性質を有する1-アダマンタノールを添加すると、競争的效果によるアントラセン残基のシクロデキストリン空洞外への移動が観測された。この状態の場合、アントラセン残基とDNAとの相互作用が、UVスペクトルや蛍光スペクトルの測定より観測された。すなわち、ゲスト化合物の添加が、DNA認識能発現のスイッチとなることが明らかとなった。(Fig.3)

以上のように、平成9年度において、ゲスト化合物との包接複合体形成に伴う修飾残基の移動によるDNAインターカレート能発現機能を有する修飾シクロデキストリンの構築に成功した。

・平成10年度

平成9年度にDNAインターカレート能発現機能を有する修飾シクロデキストリンの構築に成功したことを受け、リンカー鎖としてエチレンジアミンおよび、1,4-ジアミノブタンを導入した β -シクロデキストリンに対し、カップリング反応によりアントラセン残基の導入を試み、新たに2種類のアントラセン修飾シクロデキストリン (Fig.2-b,c) を合成することを計画した。反応終了後、カラムクロマトグラフィーによる精製を行ない、それぞれの化合物を得ることに成功した。得られた2種類の化合物を用い、リンカー鎖長による機能性の差異についての検討を行なった。リンカー鎖長の差異により、水溶液中において、アントラセン残基のシクロデキストリン空洞に対する配向が異なることが、NMR、CDスペクトルの測定より明らかとなった。また、DNAに対する認識能にも差異が現れることが、UVスペクトルの測定より示唆された。

以上のように、構造の異なる2種類のDNAインターカレート能を有する修飾シクロデキストリンの構築に成功し、その構造の差異による異なった機能性に対する知見を得ることに成功した。

・平成11年度

平成10年度に合成した2種類のアントラセン修飾シクロデキストリンのアントラセン残基の配向について詳細な検討を行なった。この2つの化合物は、単体においてもアントラセン残基のシクロデキストリン空洞に対する配向がそれぞれ異なっていることが確かめられたが、ゲスト化合物を添加した後もアントラセン残基のシクロデキストリン空洞に対する配向が異なっていることが、NMR、円二色性スペクトルの測定などより明らかとなった。これは、リンカー鎖の構造によるアントラセン残基の移動の自由度の差異と、シクロデキストリン空洞の疎水性とバルクな水層との環境差のバランスによるものと思われる。また、このような構造の違いが、DNAとの相互作用に影響を及ぼしていることも示唆された。

以上のように、構造の異なる種々のアントラセン修飾シクロデキストリンの単体、およびゲスト化合物添加時の構造の差異による異なったDNAインターカレート能に対する知見を得ることに成功した。

・平成12年度

新たにジエチレントリアミンをリンカー鎖として用いたアントラセン修飾シクロデキストリン (Fig.2-d) を合成した。平成11年度までに得られている化合物とあわせ、3種類の化合物 (Fig.2-b, c, d) を用いて、化合物単体およびゲスト化合物添加時の立体構造の解析、および、DNAインターカレート能について、NMR、円二色性スペクトル (Fig.4)、UVスペクトル (Fig.5) などの測定を行なうことにより、検討を行なった。リンカー鎖の構造の違いが、各化合物の立体構造の差異およびDNAインターカレート能に影響を及ぼしていることが明らかとなった。(Fig.6)

以上のように、構造の異なる種々のアントラセン修飾シクロデキストリンを構築し、単体、およびゲスト化合物添加時の構造の差異により異なったDNAインターカレート能を有する化合物に関する知見を得ることに成功した。

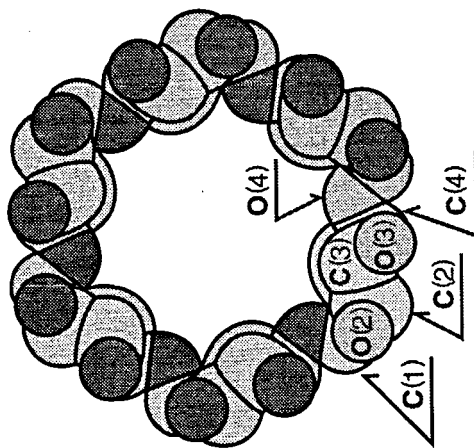
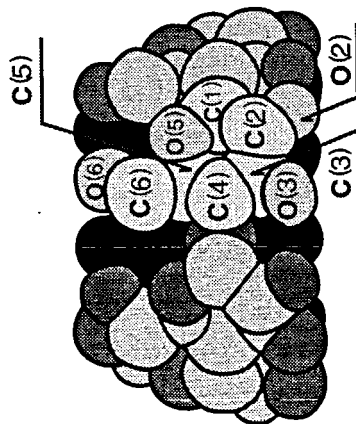
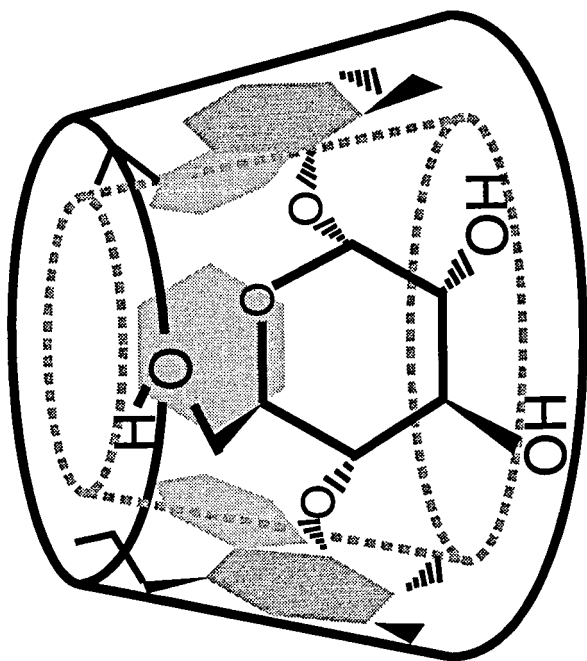
【総括】

DNAインターカレート能を有する修飾シクロデキストリンを、シクロデキストリンに対しアントラセン残基を導入することにより合成した。得られたアントラセン修飾シクロデキストリンは、アントラセン残基がシクロデキストリン空洞内に包接された自己包接体を形成しているため、単体ではDNAに対する親和性はほとんど示さないが、ゲスト化合物と包接複合体を形成することにより、アントラセン残基のシクロデキストリン空洞外への移動が起こり、DNAインターカレート能を発現した。ゲスト化合物添加がDNAインターカレート能発現のスイッチとなるわけである。

アントラセン残基とシクロデキストリンとを結ぶリンカー鎖の構造の差異により、ゲスト化合物無添加時および添加時の化合物の構造に差異が生じ、DNAインターカレート能にも影響が出ることが示された。さらに詳細に検討を加えることにより、DNAインターカレート能発現に最適な構造を有する化合物の設計、構築が可能になるものと期待される。

一方、この機能により、DNAに対し親和力を有しない化合物をゲスト化合物として用いることにより、DNA近傍に輸送することが可能となる。

シクロデキストリンは、その包接能をもとに、食品、化粧品、医薬品の添加物として広く利用されている。シクロデキストリンに対しDNAインターカレート能を付加することにより、さらにその発展が期待される。



	Numbers of glucose residues	Cavity dimensions (Å)	
		Internal diameter	Depth
α -CD	6	4.5	6.7
β -CD	7	7.0	7.0
γ -CD	8	8.5	7.0

Fig. 1 Structures of cyclodextrins

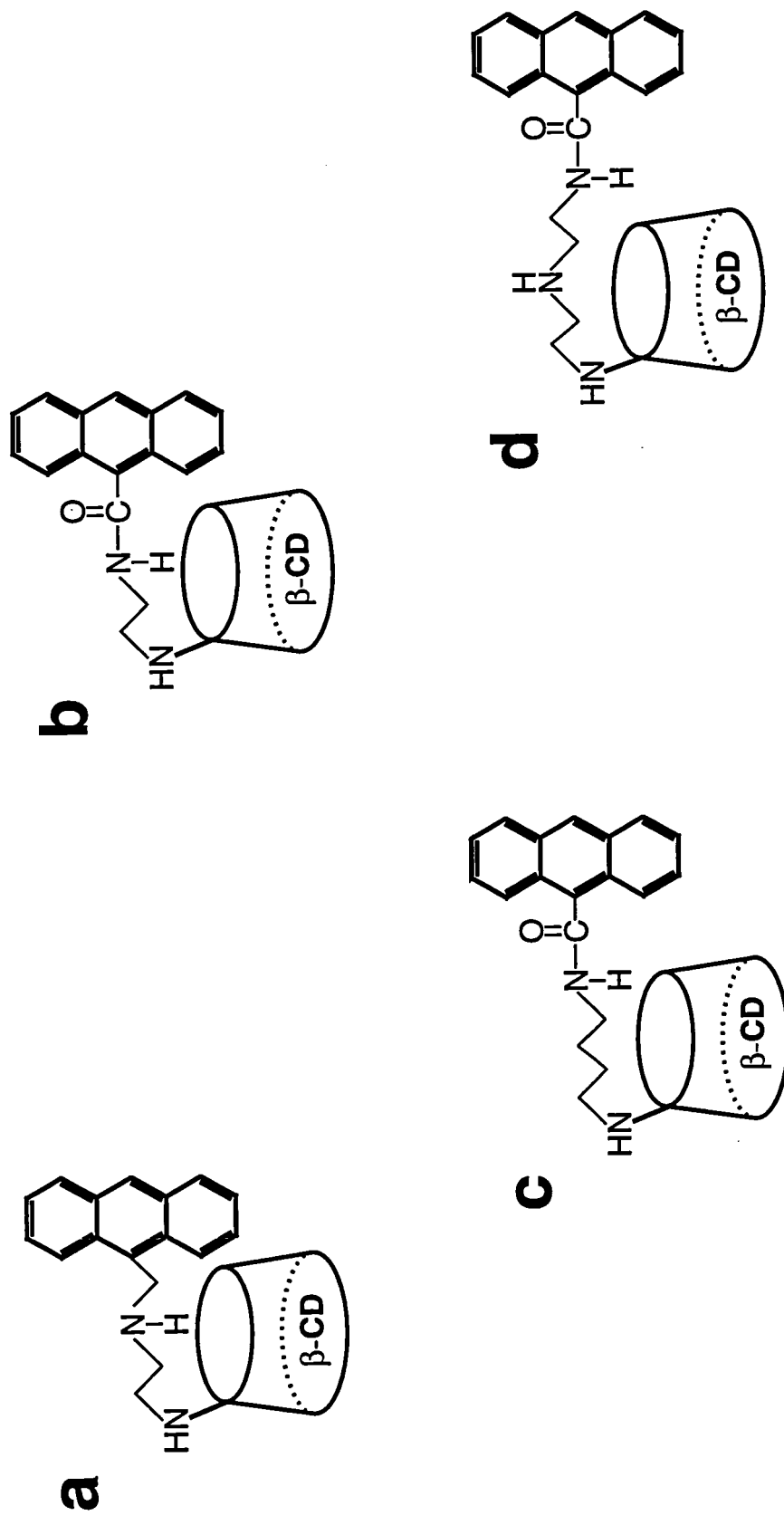


Fig. 2 Structure of Anthryl(alkylamino)-β-cyclodextrins

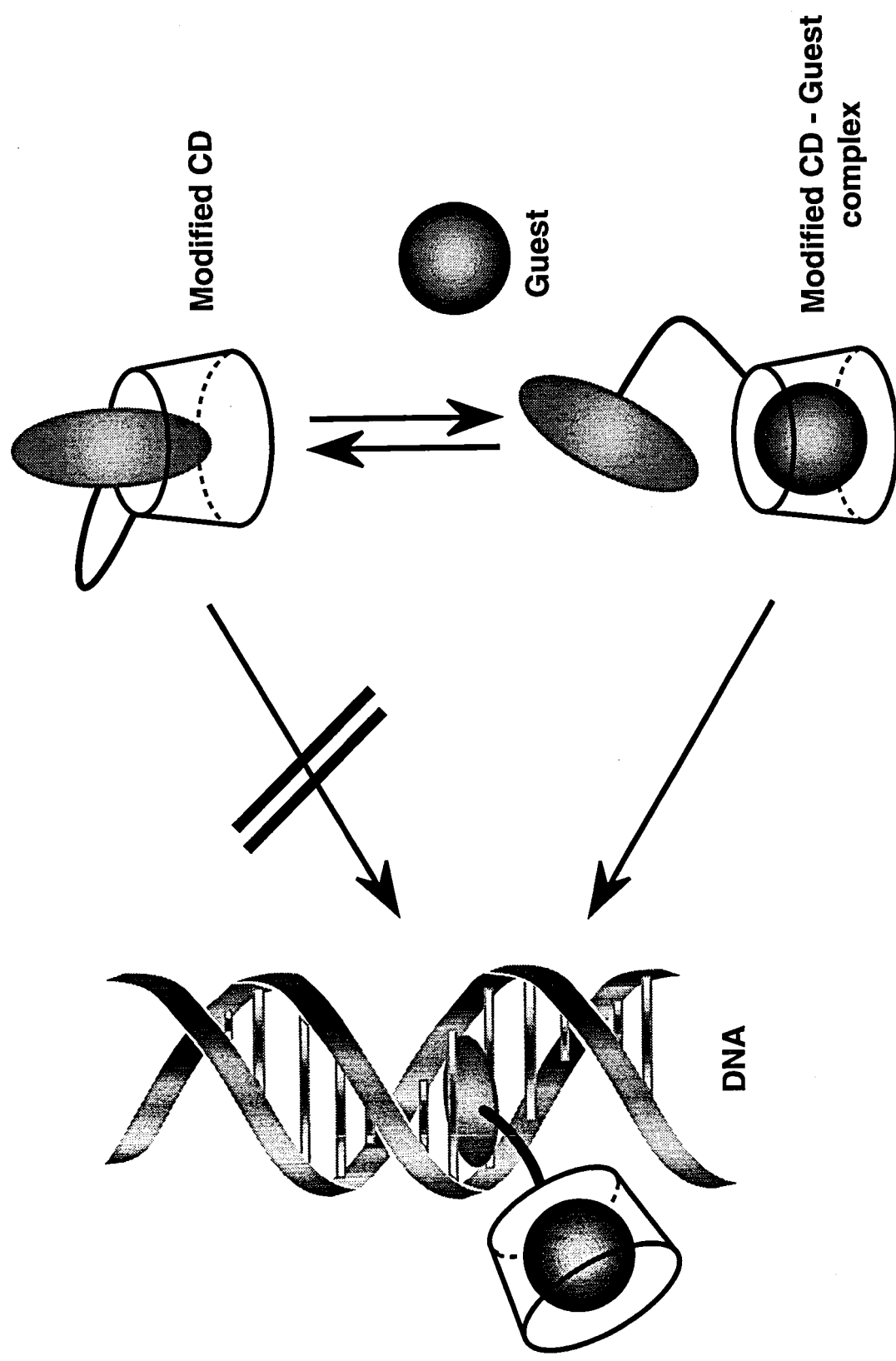


Fig. 3 Chemically switched DNA intercalator

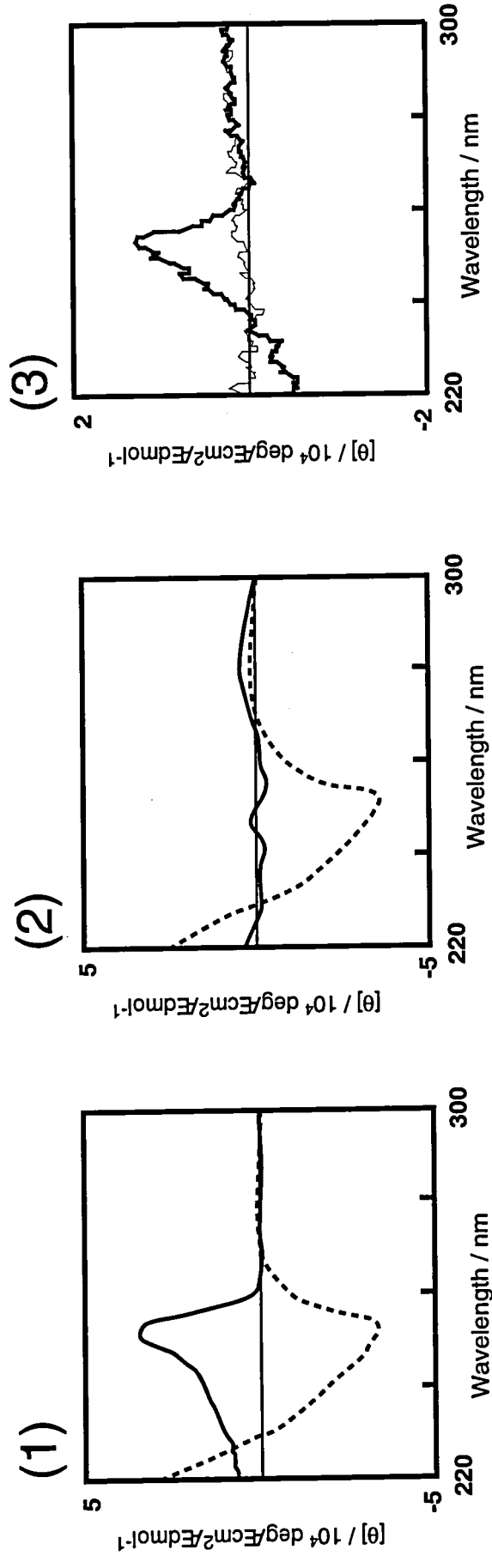


Fig. 4 Induced circular dichroism spectra of (1) **b** (10 μ M), (2) **c** (10 μ M) and (3) **d** (10 μ M), (—) alone and (---) in the presence of 1-adamantanol (5 mM)

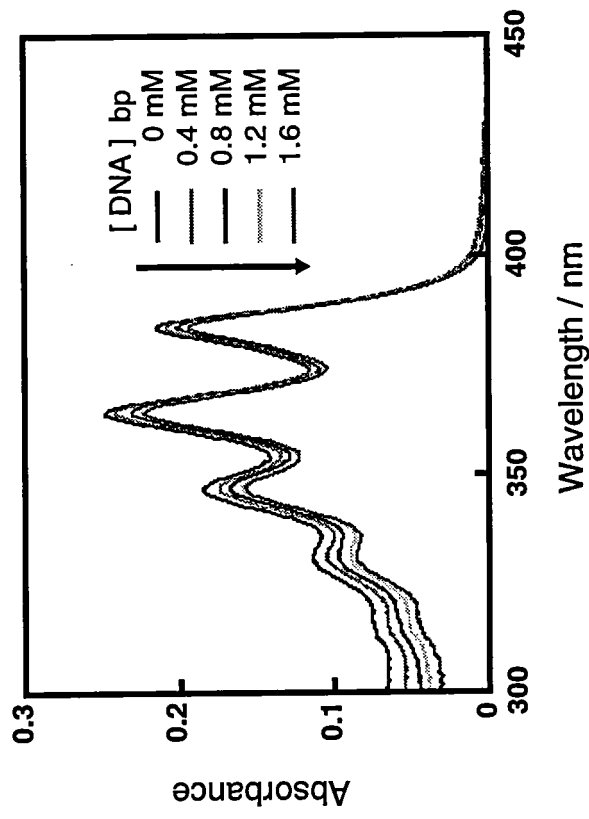
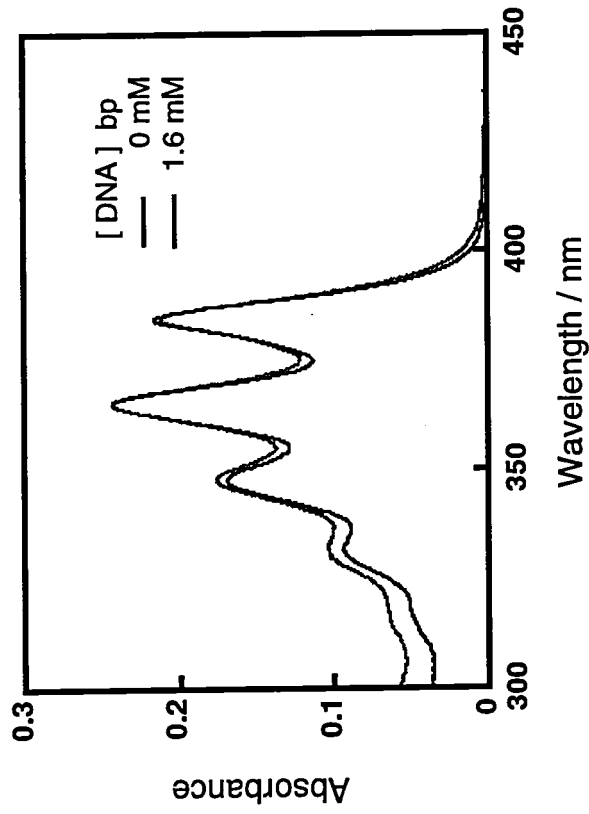


Fig. 5 UV absorption spectra of **d** (100 μ M) in the absence and in the presence of DNA (**1**) without 1-adamantanol and (**2**) with 1-adamantanol (5 mM)

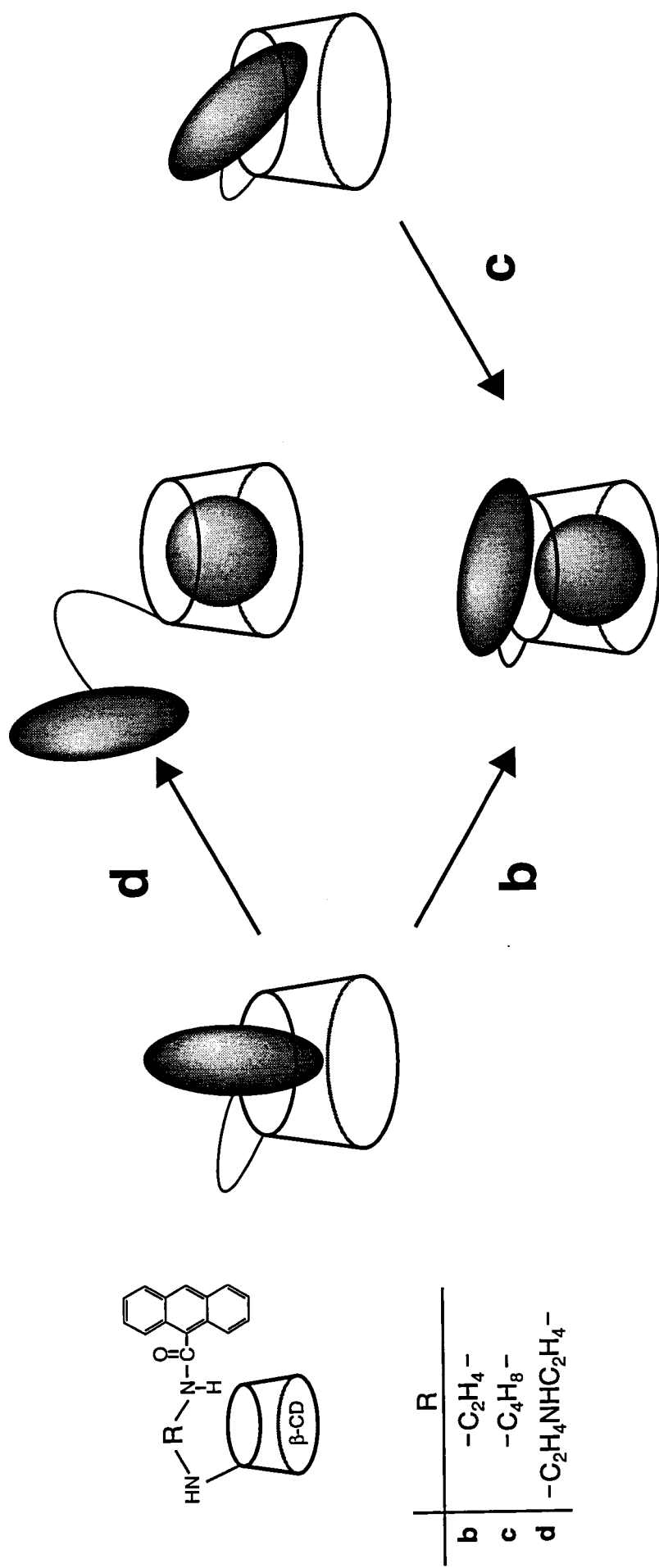


Fig. 6 Conformational changes with 1-adamantanol