

VO(phen) 関連錯体—過酸化水素系による DNA 切断とその機構

田村 英之・桜井 弘

(京都薬大・代謝分析学*)

DNA Cleavage and its Mechanism by Vanadyl-1, 10-Phenanthroline Derivatives in the Presence of Hydrogen Peroxide

Hideyuki TAMURA and Hiromu SAKURAI

Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

Vanadium complexes have been proposed to show antineoplastic activity. Among them, a newly synthesized 1 : 1 vanadyl-1, 10-phenanthroline (VO(phen)) complex has been found to have a characteristic antitumor activity in *in vitro* experiments. To know the mechanism, we investigated the reactivity of VO complex with substituted phenanthroline for DNA. The VO(phen) derivatives induced DNA cleavage effectively in the presence of hydrogen peroxide. Lineweaver-Burk plots for the complex binding to calf thymus DNA suggested that the VO(phen) derivatives have high affinities to DNA molecule. To examine the active species for DNA cleavage, ESR spin trapping was performed. Hydroxyl radicals were detectable in VO(phen) derivatives-H₂O₂ systems. VO(phen) derivatives are indicated to bind DNA and cleave it with the formation of hydroxyl radicals by a Fenton-like reaction when H₂O₂ is present in the system.

生体微量元素の一つと考えられているバナジウム(V)には血糖正常化作用をはじめとして様々な生理活性を有している¹⁾。バナジウムは実験動物に対して抗腫瘍活性と毒性とを合わせ持つことが知られているが、その機構の詳細についてはまだ明らかではない。これまで我々は、その機構として、バナジウムイオンと過酸化水素との反応により生成するヒドロキシルラジカルによるDNA切断反応に基づくことを提案している^{2,3)}。今回、バナジウム錯体として、VO(1,10-phenanthroline(phen))関連錯体(Fig. 1)を用いて同様の検討を行ったので報告する。

実験方法

1. Tris-acetate buffer 中で plasmid Col EI DNA を VOSO₄ あるいは VO(phen) 関連錯体と過酸化水

*所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607)

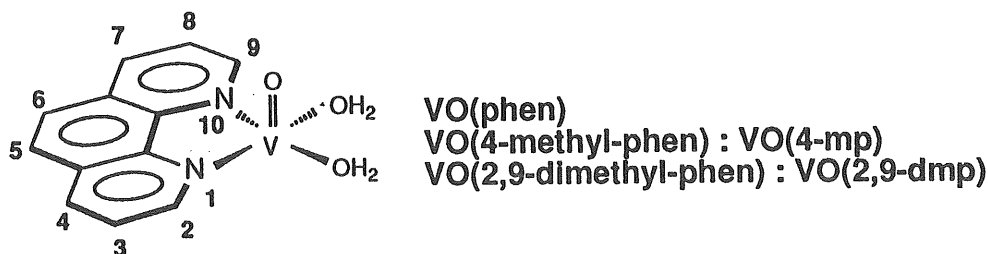


Fig. 1 Structures of VO(phen) derivatives

素を反応させアガロース電気泳動により DNA 切断活性を検討した。

2. VOSO_4 あるいは VO(phen) 関連錯体を含む calf thymus DNA 溶液の紫外線吸収スペクトルを測定し、Lineweaver-Burk プロットより結合定数 k_m 値を求めた。

3. Tris-acetate buffer 中で VOSO_4 あるいは VO(phen) 関連錯体と過酸化水素を含む系について、スピントラップ剤として DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) を用い ESR-スピントラップ法を行った。

Table 1. Parameters for DNA cleavage, DNA binding and generation of $\cdot\text{OH}$ in vanadyl complex- H_2O_2 systems

complex	DNA cleaving activity (%)	K_m value (μM)	DMPO-OH adduct
VO(phen)	73	1.58	95.2
VO(4-mp)	57	2.56	101.7
VO(2,9-dmp)	19	3.13	92.6
VOSO_4	5	4.76	100.0

結果と考察

VOSO_4 および VO(phen) 関連錯体による DNA 切断活性、DNA への結合性およびヒドロキシルラジカルの生成を Table 1 にまとめた。DNA 切断活性に関して、VO(phen) 関連錯体-過酸化水素系は VOSO_4 -過酸化水素系に比べて高い活性を示した。活性の順は、VO(phen)、VO(4-mp)、VO(2,9-dmp)、 VOSO_4 であった。DNA への親和性は、VO(phen) 関連錯体は VOSO_4 より高い親和性を有し、またリガンドに置換基のより少ないものほど高い親和性を示した。 VOSO_4 -過酸化水素系および VO(phen) 関連錯体-過酸化水素系とも、Fenton 様反応に基づくと考えられるヒドロキシルラジカルの生成が確認された (Fig. 2)。また、ヒドロキシルラジカルの生成はいずれの系においてもほぼ同程度となった。

DNA 切断活性は DNA への親和性と正の相関性を示した。つまり、リガンドのフェナントロリン骨格にメチル基が導入され親和性が低下するにしたがい、DNA 切断活性が低下した。DNA 切断の本体であると考えられるヒドロキシルラジカルは高い反応性を有している反面、寿命が短く、生成した部位より数十オングストローム以内の分子としか反応できない。そのため、立体構造上、DNA のより近傍でヒ

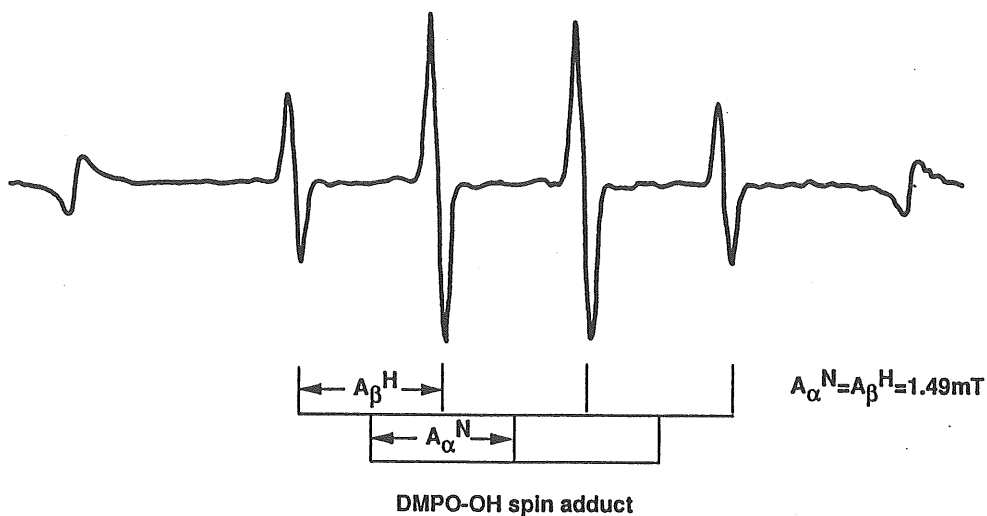


Fig. 2 ESR spectrum for spin-trapping in VO(phen)-H₂O₂ system at pH 7.8

ドロキシルラジカルが発生することにより、より高いDNA切断をひきおこすものと推定された。

以上をまとめると、VO(phen) 関連錯体はDNAと結合し、その周辺に過酸化水素が存在すると、Fenton様反応を生じ、ヒドロキシルラジカルを生成してDNAを切断することが明らかとなった。フェナントロリン骨格にメチル基を導入すると、おそらく立体障害のためDNAへの結合が阻害され、そのためDNA切断活性が低下すると考えられた。

今回の実験では、立体障害の最も少ないと考えられるVO(phen)が最も高いDNA切断活性を示した。今後は、このような切断が塩基特異的に生じているかどうか検討していきたいと考えている。

文 献

- (1) 桜井 弘 (1995) *ファルマシア*. 31 : 593
- (2) Hiromu Sakurai, Masami Nakai, Takao Miki, Koichiro Tsuchiya, Jitsuya Takada and Ryokuji Matsushita (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189 : 1090
- (3) Hiromu Sakurai, Hideyuki Tamura and Kunihiro Okatani (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206 : 133

