

②

制癌抗生物質エスペラミシンA₁ およびエルサミシンA
による DNA 塩基認識と鎖切断反応に関する研究

1995

上杉 志成

目次

緒言	1
第一章 制癌抗生物質エスベラミシンA ₁ による塩基配列認識の起源	4
第一節 研究方針	4
第二節 塩基配列認識に必要な最小構造	9
第三節 疎水性相互作用と DNA 構造の再編成	21
第四節 DNA ヘリックスの柔軟性と特異的結合の相関	31
第五節 実験の部	38
引用文献	43
第二章 制癌抗生物質エルサミシンAによるグアニン認識と DNA 鎖切断 ..	47
第一節 研究方針	47
第二節 グアニン特異認識と DNA 鎖切断	51
第三節 DNA 鎖を切断する真の攻撃種	55
第四節 DNA 鎖切断のメカニズム	62
第五節 グアニン認識の起源	73
第六節 アミノ糖鎖のスイッチ機能	85
第七節 実験の部	91
引用文献	97
第三章 結語および要約	99
謝辞	102

緒言

Figure 0-1 は本研究の究極の目的を表している。すなわち、天然低分子化合物と DNA との相互作用を追究し、その相互作用の裏に隠されているシンプルな考え方を抽出することである。蛋白質のような高分子と比較して低分子はその構造が単純なので、複雑さからある程度のがれることができると予想される。低分子による DNA の塩基認識の起源や DNA 相互作用の基本様式などが解明できれば、DNA - 蛋白質といったさらに複雑な系を理解する上で基礎的な知見を提供すると期待される。

DNA に結合する天然低分子化合物の中から、本研究では制癌抗生物質エスペラミシン A_1 とエルサミシン A を取りあげた (Figure 0-2)。これらの抗生物質は DNA と結合するように自然によってデザインされており洗練されている。エスペラミシン A_1 とエルサミシン A を選択した理由を以下に挙げる。

1. 化学構造が DNA 結合分子として新奇である。

自然によってデザインされた新しい構造は新しい考え方を生む可能性を秘めている。

2. 新奇性と共にある程度の普遍性も併せ持っている。

エスペラミシン A_1 およびエルサミシン A は共に糖鎖を備えており、糖鎖モデルとして有用かも知れない。糖鎖と DNA との相互作用は未開の分野である。また、エルサミシン A は鉄錯体として機能するので錯体と DNA との相互作用モデルとなりえる。

3. DNA に塩基配列特異的に結合する。

エスペラミシン A_1 はオリゴプリン/オリゴピリミジン配列に特異的に結合し、エルサミシン A はグアニン残基を特異的に認識する。これらの塩基配列認識の起源を解明すれば、転写因子などの DNA 結合蛋白質と DNA との特異的相互作用の研究に基本的な情報を提供すると考えられる。

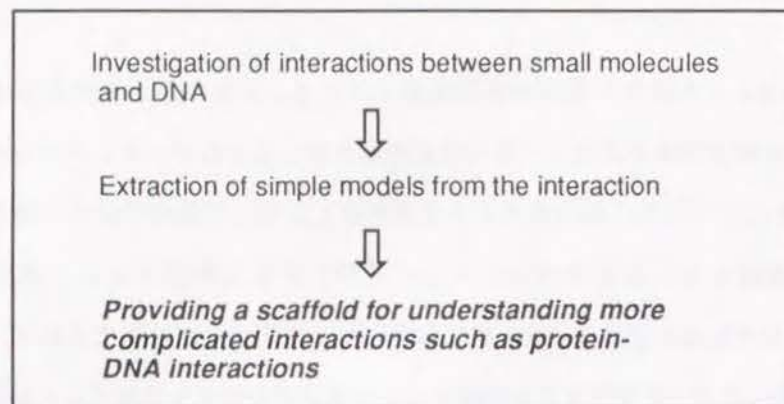


Figure 0-1 The ultimate aim of this study.

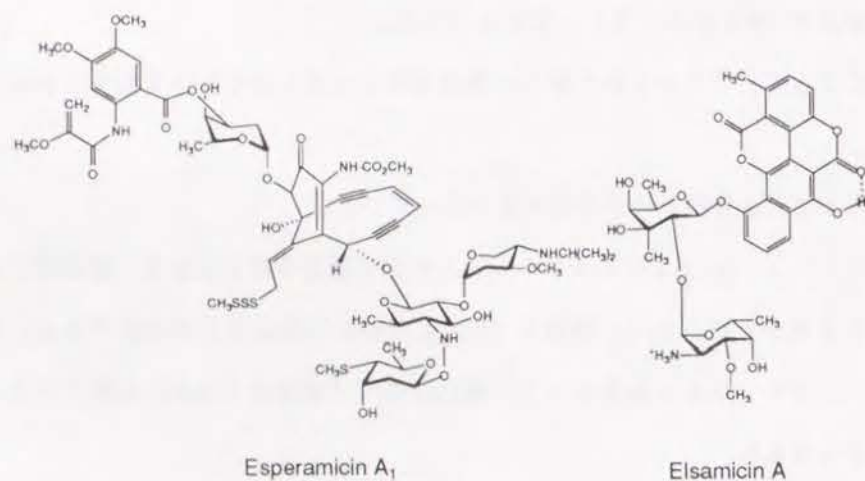


Figure 0-2 Chemical structures of esperamicin A₁ and elsamicin A.

4. DNA に結合する能力に加えて DNA 鎖を酸化的に切断する能力を持つ。

DNA 切断能を持つことは事態を少し複雑にするが、研究の魅力を大きく増す要因ともなる。特異的結合と反応を同時進行させるという点で「制限酵素モデル」となりえるので、ヒトゲノム解析に必要な人工制限酵素の開発に有用な知見を提供すると予想される。また、結合した DNA と反応するため、結合サイトを極めて明瞭に同定できる利点がある。

5. 抜群の制癌作用を有する。

癌細胞は増殖が非常に速く DNA も裸に近いので DNA 切断分子に弱いのである。このような制癌分子を研究材料としてとりあげることで癌化学療法に貢献できるかも知れない。実際、エスペラミシン A₁、エルサミシン A は臨床実験に入っている。

著者は以上の理由からエスペラミシン A₁・エルサミシン A と DNA との相互作用に興味を持ち、塩基認識の解明と DNA 鎖切断機構の解明を目指して本研究に着手した。

第一章

制癌抗生物質エスペラミシンA₁による

塩基配列認識の起源

第一節 研究方針

自然の産物は淘汰され洗練されているため、人間にとって新しい考え方と方向を暗示する。制癌抗生物質エスペラミシンA₁はDNAに結合し、同時にDNA鎖を切断するように自然によって巧妙にデザインされている。その構造の新奇性や興味深いDNA切断機構のため、類縁抗生物質であるカリチエミシンと共に世界中の科学者に注目されている。第一節では、本研究以前におけるエスペラミシンA₁の研究経過と本研究の研究方針について詳述する。

1 制癌抗生物質エスペラミシンA₁

エスペラミシンA₁は放線菌 *Actinomadura verrucosospora* から単離された分子量約1300の抗生物質である。1985年にBristol-MyersのDoyleらによりアルゼンチンのPto Esperanzaから採集されたことから、このエスペラミシンという名がつけられた¹。その制癌活性は驚異的であり、各種腫瘍細胞の増殖を1~3 pg/mLの濃度で阻止する。マウス移植の白血病p388、B-16黒色腫、Lewis肺癌等の実験腫瘍に対しても著しい抗腫瘍活性がみられる¹。これらの活性はアドリアマイシンの数千倍の値に達しており、以前知られていた最強の抗腫瘍性抗生物質CC-1065よりも約10倍強力である。エスペラミシンA₁は現在、欧米でphase II臨床実験に入っている²。

2 新奇的な化学構造

エスペラミシンA₁の化学構造は1987年にBristol-Myers Squibb社の研究陣によって決定された (Figure 1-1-1)³⁻⁷。その構造は三点において新奇である。第一に、心臓部母核として1,5-ジイン-3-エン構造 (エンジイン構造) を備える。その三重結合炭素は¹³C-NMRで比較的特異な δ 85~95 ppm領域に二本の単一線として認められ、この炭素とsp²炭素との異核間2次元NMRを解析することで、このエンジイン特殊構造は解かれた。第二に、天然化合物としては極めて特異なアリルトルスルフィド基を13位に備える。後で述べるように、この部分はDNA切断作用を開始するための起爆装置 (triggering device) であることが解明されている^{8,9}。第三に、三つの新規糖を備える。すべて6-デオキシ糖であり疎水性は高い。また、ヒドロキシアミノ糖での窒素-酸素グリコシド結合はこれまでの天然物に皆無の構造である。

エスペラミシンA₁は画期的な制癌作用と新奇な化学構造を併せもっている。1987年の化学構造の発表と同時に、世界の化学者や分子生物学者は作用発現機構の完全解明を待望し、また自らそれに取組みはじめた。有機化学者は、この天然物の全合成やモデル分子の合成研究を開始した^{10,11}。

3 興味深い作用発現機構

エスペラミシンA₁になぜ制癌活性が発現されるのか。その制癌作用に重大に関わっているのは「遺伝子そのものであるDNAの切断」だと考えられている。癌細胞は増殖が非常に速くDNAも裸に近いのでDNA切断分子に弱いからである。事実、エスペラミシンA₁はチオールのようなマイルドな還元剤の存在下でDNA鎖を切断することが知られており^{8,9}、そのDNA切断活性は非常に強力で数nMの濃度でも有効である。また *in vivo* でも、ヒトのHCT116腫瘍細胞を低濃度 (1 pg/mL) のエスペラミシンA₁にさらすと腫瘍細胞のDNAが切断されることが見いだされている¹²。

DNAを切断する発現機構は巧妙である (Figure 1-1-2)^{8,9}。まずトリルスルフィド部

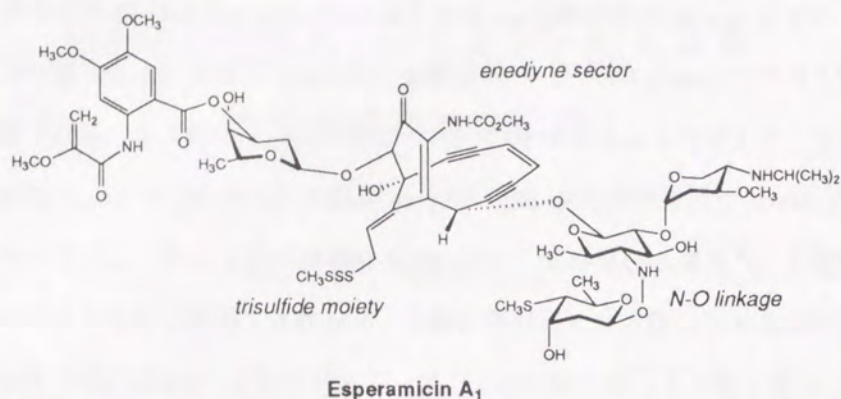


Figure 1-1-1 Chemical structure of esperamicin A₁.

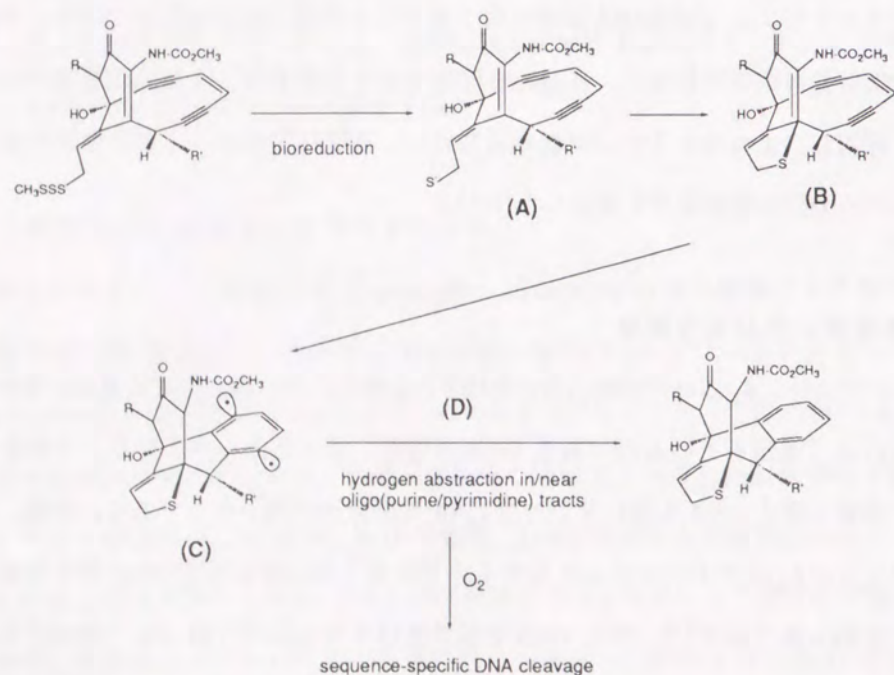


Figure 1-1-2 Mechanism of DNA cleavage by esperamicin A₁.

分が生体内還元される。生体内に存在するグルタチオンなどのチオール系分子はトリスルフィドを効率よく還元する。生じるチオレートアニオンは次の反応に最適な場、つまりエノンのβ位へのマイケル付加に最適な位置にある(A)。マイケル付加によって二重結合が飽和すると橋頭位炭素の結合角度が減少し、エンジン部分にひずみが発生する(B)¹³。これにより三重結合同士が接近するのでバーグマン型の環化反応が進行し、1,4-デヒドロベンゼンジラジカルが生じる(C)。この反応性に富むラジカル種がDNAのデオキシリボース骨格から水素原子を引き抜いてDNA鎖の切断を引き起こす(D)¹⁴⁻¹⁶。1,4-ベンゼンジラジカルは一分子に二つのラジカル活性種を有するので、制限酵素のようにDNAを二本鎖同時に切断できることが予想される(Figure 1-1-3)^{17,18}。また重要なことに、このDNA切断は塩基配列特異的である^{8,9}。これまでの研究によると、エスペラミシンA₁はオリゴプリン/オリゴピリミジン領域を認識して切断する。いかなる様式でDNAと結合し塩基配列を認識するのか。DNAのどの水素原子を引き抜いて、いかなる反応経路でDNAを切断するのか。本研究が開始された1990年当時全く謎であった。

4 研究着想

エスペラミシンA₁の作用発現機構には三つの興味深い局面がある。

- (1) オリゴプリン/オリゴピリミジン領域の精密認識 (the fine recognition of oligo(purine)/oligo (pyrimidine) tracts)
- (2) 一分子によるDNAの二本鎖同時切断 (the double-stranded scission by a single drug molecule)
- (3) トリスルフィド部位の引き金としての役割 (the triggering function of the trisulfide moiety)

筆者はこのうち第一点目に焦点を絞り、塩基配列認識の起源を分子レベルで理解することを目指した。なぜ塩基配列認識の化学が重要なのか。分子レベルで塩基配

列認識を解明すれば多くの研究の礎石となる。第一に、DNAと蛋白質のなどのDNAをとりまく複雑な相互作用を解明する上で、低分子モデルとして基礎的な知識を提供すると期待される。第二に、エスベラミシンA₁のDNA結合/認識を分子レベルで捉えれば、制癌剤の合理的設計に寄与できることが期待される。特定の遺伝子を認識する遺伝子制御分子の合理的設計にもひとつの方向を示す。ゆえにエスベラミシンの基礎的な塩基配列認識の化学は幅広い研究分野での有用性と展開を秘めている。

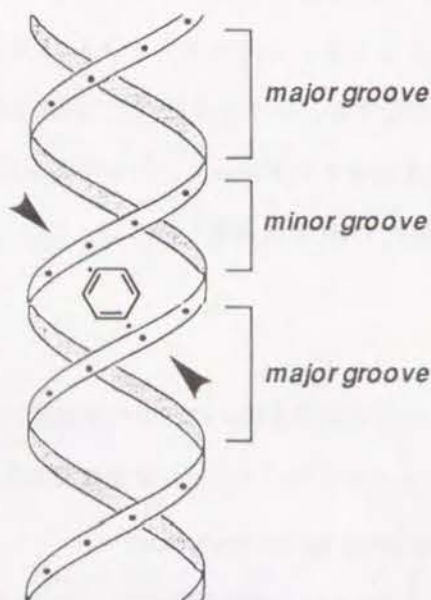


Figure 1-1-3 Double-stranded scission in the minor groove of DNA helix.

第二節 塩基配列認識に必要な最小構造

エスベラミシンA₁とその類縁体カリチェミシン γ_1^1 ¹⁹⁻²⁴はDNAのオリゴプリン/オリゴピリミジン領域を認識して切断する。しかし詳細にはそれらの特異性は少し異なっており、議論の対象となった。

1988年、Zcinらがカリチェミシン γ_1^1 の塩基配列特異性を初めて報告している²³。見いだされた認識塩基配列は全てオリゴプリン/オリゴピリミジン領域であった。例えば、5'-AGGA/TCCT, 5'-AGGC/GCCT, 5'-CGGA/TCCG, 5'-GGGA/TCCC, 5'-AGAG/CTCTなどがある。これらのオリゴプリン/オリゴピリミジン配列にはGC塩基対が含まれており、GC塩基対の重要性も強調された²⁵。

一方、エスベラミシンA₁の塩基配列特異性は1989年にBristol-Myersと我々の研究室によって報告されている^{8,9}。エスベラミシンA₁においてもオリゴプリン/オリゴピリミジン領域の切断は強く、エスベラミシンA₁はこの領域を認識している。しかし、カリチェミシン γ_1^1 と比較して認識は弱く、詳しい切断部位も若干異なる。

DNA二重らせんにはメジャーグループ（主溝）とマイナーグループ（副溝）があるが(Figure 1-2-1)、エスベラミシンA₁とカリチェミシン γ_1^1 はマイナーグループに結合すると考えられている^{9,23}。典型的なマイナーグループ結合分子ネトロブシン(Figure 1-2-2)によって切断反応が阻害されるからである^{9,23}。言い換えれば、エスベラミシンA₁とカリチェミシン γ_1^1 は共にプリン/ピリミジン連続配列の情報をマイナーグループから読みとっている。しかし、プリン/ピリミジン連続配列の認識という枠の中でエスベラミシンA₁とカリチェミシン γ_1^1 の特異性は微妙に異なっているのである。

エスベラミシンA₁とカリチェミシン γ_1^1 の厳密な特異性の相違は何なのか。その相

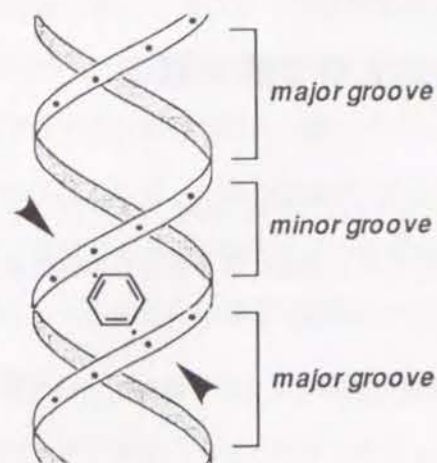


Figure 1-2-1 Asymmetric DNA cleavage pattern in the minor groove of DNA helix. In the minor groove, the proximal deoxyriboses on opposite strands are shifted to the 3'-side.

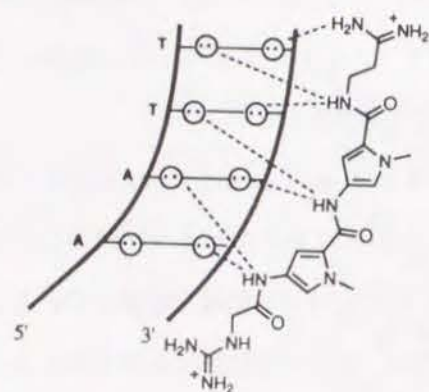


Figure 1-2-2 Complex of netropsin with 5'-AATT-3' in the minor groove of DNA⁶⁹. Circles with dots represent lone pairs of N3 of purines and O2 of pyrimidines. Putative hydrogen bonds are illustrated by dashed lines.

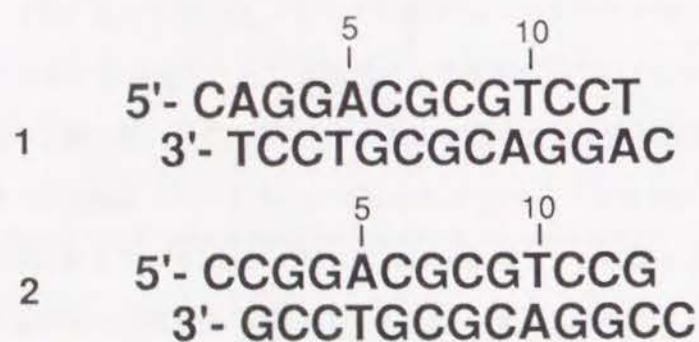


Figure 1-2-3 Sequences and numbering of DNA oligomers 1 and 2.

違は何に起因するのか。オリゴプリン/オリゴピリミジン領域の認識に必要な最小構造は何なのか。この第二節ではこれらの疑問を解く²⁶。

1 DNA オリゴマー 1 の 에스ベラ미신 A₁ と 카리체미신 γ₁¹ による切断

DNA オリゴマー 1 は典型的な標的塩基配列 5'-AGGA/TCCT を含んでいる (Figure 1-2-3)。この 5' 末端を ³²P で標識したものを 에스베라미신 A₁ と 카리체미신 γ₁¹ により切断した。切断された DNA 断片はポリアクリルアミドゲルで分離後、オートラジオグラフィーによって視覚化することができる。Figure 1-2-4 がその電気泳動結果とヒストグラムである。明らかに、 에스베라미신 A₁ と 카리체미신 γ₁¹ の切断部位は異なっている。

카리체미신 γ₁¹ の切断パターンは Zein らが報告した結果と類似する^{23,24}。つまり、G-7 と C-11 が切断されており、お互いに 3' 方向にずれている。この 3' 方向にずれる切断パターンはマイナーグループでの二本鎖同時切断の特徴である。なぜならマイナーグループ中では DNA のら旋構造のために最近接のデオキシリボースが 3' 側にずれるからである (Figure 1-2-1)²⁷。

G-7 の二重バンド (doublet band) はこの部位で二種の 3' 末端プロダクトが生成していることを示している。泳動度の遅いバンドはマキサム-ギルバート反応のマーカールと同じ泳動度であり、3' リン酸末端を持つ (Figure 1-2-5)。速く泳動するバンドはエルサミ신 A - 鉄錯体²⁸によるバンドと同じ電気泳動度であり、3' ホスホグリコール酸末端と考えられる。このプロダクトはデオキシリボースの 4' 水素原子引き抜きによるプロダクトとしてよく知られている (Figure 1-2-6)²⁹。この研究の発表と同じ時期にこの点に関して報告があった。Hangeland らは 4' 水素を特異的に重水素化した DNA オリゴマーを合成し、この重水素が 카리체미신分子に引き抜かれることを NMR 法を用いて証明している¹⁶。

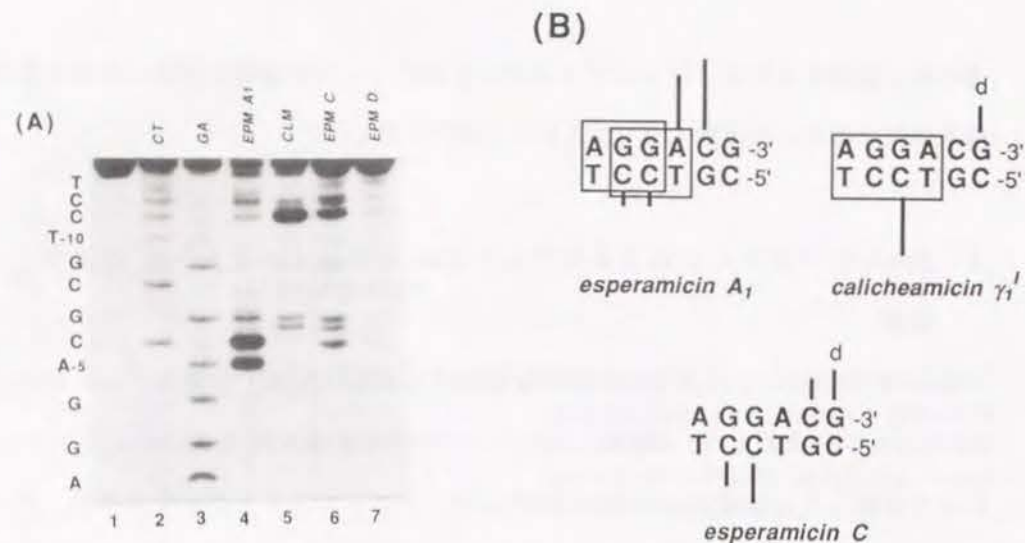


Figure 1-2-4 Comparison of DNA cleavages by esperamicins and calicheamicin γ_1^I . (A) The 5'-labeled oligomer 1 was incubated with esperamicin A₁ (EPM A₁, lane 4), calicheamicin γ_1^I (CLM, lane 5), esperamicin C (EPM C, lane 6), or esperamicin D (EPM D, lane 7), and subjected to 15% gel electrophoresis. Lane 1 shows intact DNA alone. Lanes 2 and 3 are the Maxam-Gilbert sequencing ladders for C+T and G+A. (B) Histograms of the cleavage patterns. The cleavage frequencies were obtained from densitometric scans of the gel autoradiogram shown in (A). The "d" presents a doublet band.

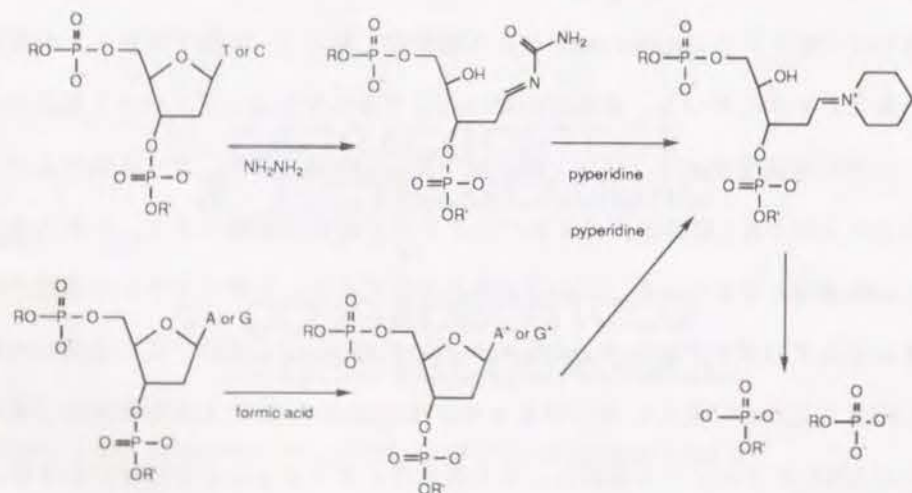


Figure 1-2-5 Maxam-Gilbert chemical cleavage of DNA.

エスペラミシンA₁の切断パターンはカリチェミシン γ_1^I のパターンとは異なる。基本的にはオリゴプリン/オリゴピリミジン領域を認識しているものの、詳しい切断部位が明らかに異なる。プリンリッチ鎖ではA-5及びC-6で強い切断がある。これらは共に三連続プリンの3'側に位置している。反対鎖はC-11とC-12で弱く切断される。反対鎖での切断パターンが3'側にずれる現象はカリチェミシン γ_1^I の場合と同様にマイナーグループでの二本鎖同時切断の特徴である (Figure 1-2-1)²⁷。

2 エスペラミシンA₁は三連続プリン/ピリミジンを認識する

DNAオリゴマー2はDNAオリゴマー1のA-2とT-13をC-2とG-13で置き換えたものである (Figure 1-2-1)。つまり三連続プリン/ピリミジンを一つしか含まない (5'-GGA/CCT)。Figure 1-2-7に示すように、エスペラミシンA₁はこのオリゴマーをC-6で特異的に切断している。つまりA-5の切断が消失したことになる。このC-6はGGAボックスの一塩基3'側の位置にあり、エスペラミシンA₁が三連続プリン/ピリミジンを認識することがわかる。カリチェミシン γ_1^I は四塩基を認識するため切断位置に変化がない。

この現象がオリゴマーに特異なものではないことを証明するために、プラスミドpBR322 DNAからオリゴマー2に類似する配列部分を含む190塩基対を取り出し、これを基質として用いた。Figure 1-2-8に見られるように、エスペラミシンA₁は三連続プリン/ピリミジンを認識している。エスペラミシンA₁のこの性質は短鎖DNAオリゴマーに特異なものではなく、基質DNAの長短に関わらない性質である。

エスペラミシンA₁とカリチェミシン γ_1^I の選択性の相違の根本は「エスペラミシンA₁は三塩基対を認識するが、カリチェミシン γ_1^I は四塩基対を認識する」という事実にある。このため認識の際に切断されるヌクレオチドはずれてしまう。エスペラミシンA₁の若干弱い認識についても、認識配列が一塩基対分少ないことから理解できる。

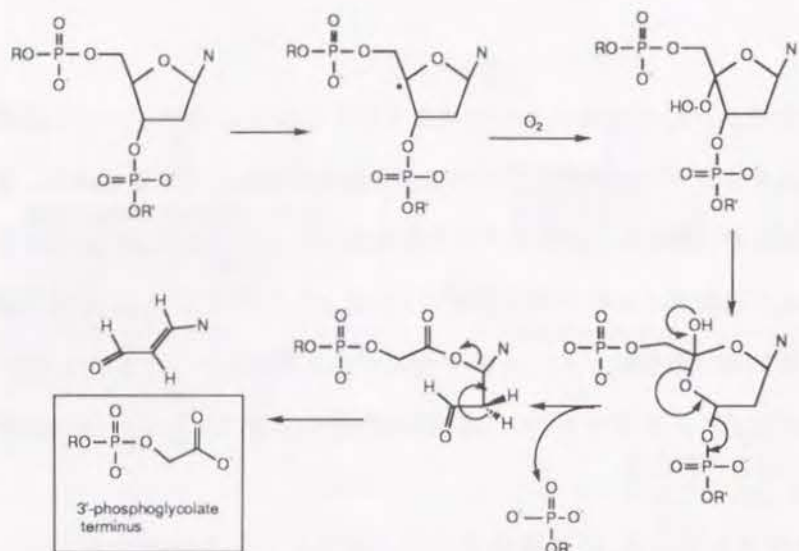


Figure 1-2-6 Production of 3'-phosphoglycolate termini.

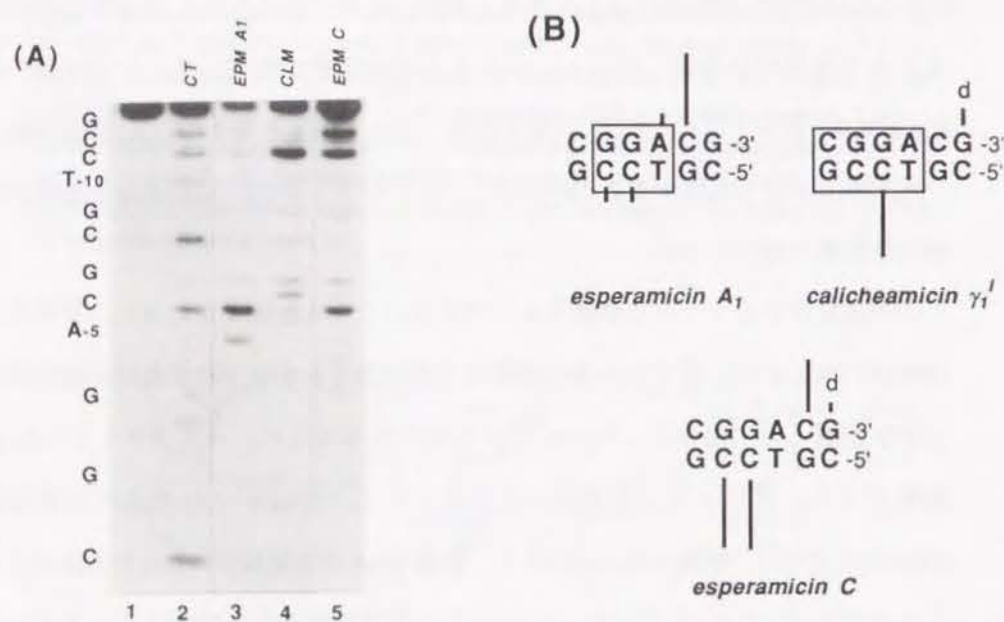


Figure 1-2-7 Comparison of DNA cleavages by esperamicins and calicheamicin γ_1^I . (A) The 5'-labeled oligomer 2 was incubated with esperamicin A₁ (EPM A1, lane 3), calicheamicin γ_1^I (CLM, lane 4), or esperamicin C (EPM C, lane 5), and subjected to 15% gel electro-phoresis. Lane 1 shows intact DNA alone. Lane 2 is the Maxam-Gilbert sequencing ladders for C+T. (B) Histograms of the cleavage patterns. The cleavage frequencies were obtained from densitometric scans of the gel autoradiogram shown in (A). The "d" presents a doublet band.

3 オリゴプリン/オリゴピリミジンの認識に必要な最小構造

エスペラミシン C はエスペラミシン A₁ からデオキシフコース - アンスラニレート部位を取り除いた誘導体である (Figure 1-2-9)。つまり、カリチェミシン γ_1^I からメトキシラムノース - アンスラニレート部位を取り除いたものとはほぼ同一である。オリゴマー 1 及び 2 をエスペラミシン C で切断したところ、その特異性はエスペラミシン A₁ とカリチェミシン γ_1^I の特異性をたし合わせたものに近くなっている (Figure 1-2-2, 1-2-7)。また、プラスミド pBR322 DNA からオリゴマー 2 に類似する配列部分を含む 190 塩基対を取り出し、これを基質とした場合もオリゴマー 2 と同じ結果が得られた (Figure 1-2-8)。この性質も DNA の長短に関わらない性質である。

エスペラミシン D はエスペラミシン C からさらにチオメチルヘキサピラノース部分を取り除いたものである (Figure 1-2-9)。Figure 1-2-2A の lane 7 はこのエスペラミシン D の切断パターンを示している。明らかに、エスペラミシン D の特異性はエスペラミシン C よりも激減している (Figure 1-2-2B)。実際、DNA に対する親和性もエスペラミシン C の約 1/50 である。以上の結果から、エスペラミシン A₁ とカリチェミシン γ_1^I の特異性の最小必須構造はエスペラミシン C、つまりエンジン部分と三糖部分にあるといえる。

エスペラミシン C と比較してエスペラミシン D の特異性は大きく低下しているという事実は、チオメチルヘキサピラノースという単糖部分が塩基配列認識に重要であることを意味するのだろうか。答えは否である。この単糖のみが親和性と特異性を決定するとは考えにくい。なぜなら、単糖はマイナーグループと強く結合し塩基配列を識別するにはあまりにも小さすぎるからである。では三糖部分が特異性を決定するのか。この答えも否である。事実、Aiyar らは三糖部分のみ (エスペラミシン C の糖鎖部分, Figure 1-2-9) を合成し、その貧弱な DNA 結合能と特異性を明らかにしている³⁰。三糖部分だけでは DNA に結合できないのだ。結局、エスペラミ

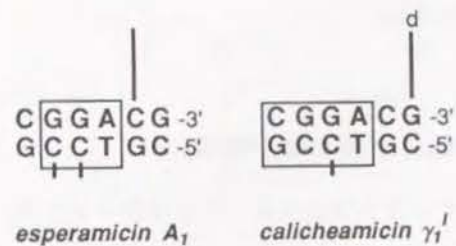


Figure 1-2-8 Comparison of DNA cleavages by esperamicins and calicheamicin γ_1^I using the 5' or 3'-labeled 190-bp *Bam*HI-*Sph*I fragment from pBR322 DNA. The "d" presents a doublet band.

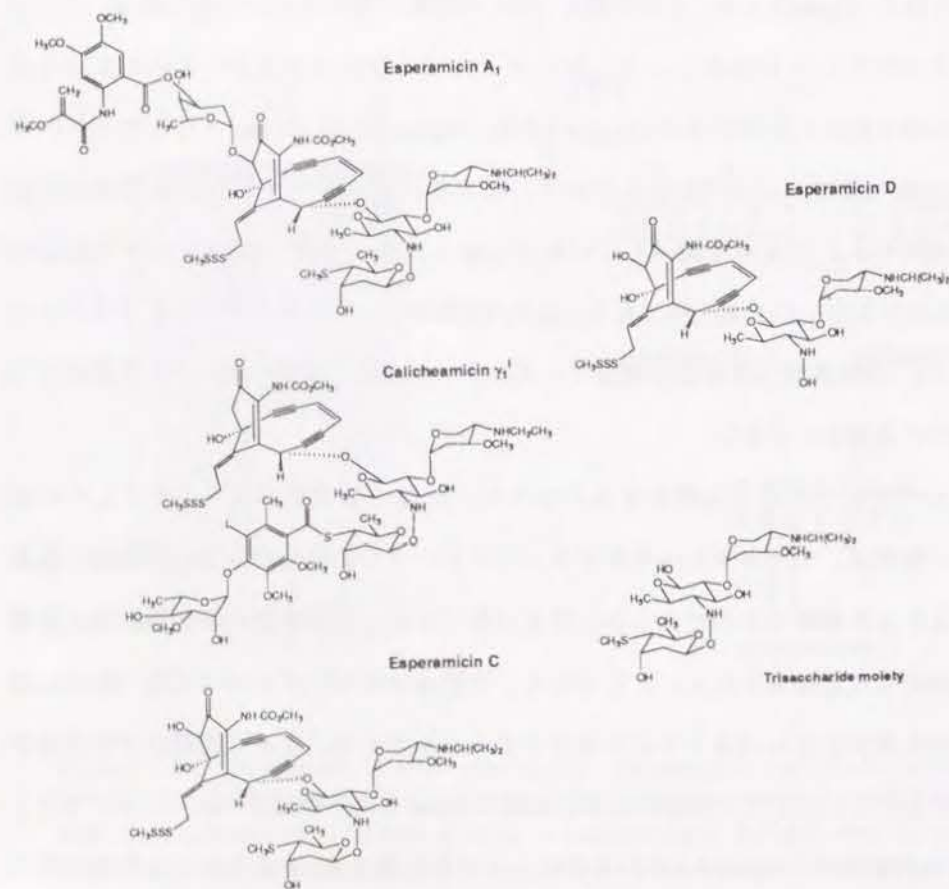


Figure 1-2-9 Chemical structures of esperamicins and calicheamicin γ_1^I .

シン C の全体構造、つまりエンジン部分と三糖部分の両方が必要である。エスペラミシン A₁ とカリチェミシン γ_1^I のオリゴプリン/オリゴピリミジン認識の起源はエンジン部分と三糖部分を合わせた全体構造 (エスペラミシン C) にあると考えられる。

4 エスペラミシン C の疎水性が DNA 結合には重要である

エスペラミシン A₁ とカリチェミシン γ_1^I の特異性の起源はエスペラミシン C にある。そのエスペラミシン C はいかにして DNA と結合するのか。エスペラミシン C の構造中には四つしか遊離水酸基がなく疎水的であるので (Figure 1-2-9), DNA との疎水的な結合が重要と考えられる。

疎水性相互作用の重要性を評価するために、DNA 切断効率に対する無機塩の影響を調べた。DNA 切断効率は閉環状プラスミド pBR322 DNA に対する反応性から容易に判断できる。閉環状プラスミド (Form I) は一本鎖が切断されると開環状 (Form II) となり、さらに切断されると直鎖状 (Form III) となる (Figure 1-2-10)。これらの形状変化はアガロースゲル電気泳動によって容易に検出できるので、ゲル上のバンドをデンストメーターで定量すれば DNA 切断効率が評価できる。Figure 1-2-11 は、そのようにして得たエスペラミシン C の DNA 切断効率に対する無機塩の影響を示している。カチオン、アニオン共にその阻害順序は Hofmeister series と一致している。すなわち水和力の弱い塩ほどエスペラミシン C による DNA 切断を阻害している。これらの塩の影響は疎水性結合の証拠として一般に受け入れられている^{31,32}。なぜなら、水和力の弱い塩ほど DNA の疎水性部分を覆ってしまい、薬物が DNA と疎水結合できなくなるからである。

5 考察

結局、エスペラミシン C の全体の構造と全体の疎水性が DNA 結合と塩基配列認

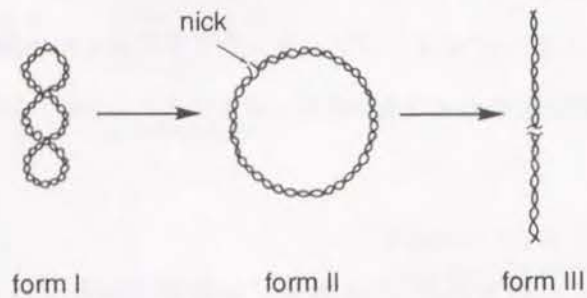


Figure 1-2-10 Cleavage of plasmid DNA. Changes among forms I-III represent extent of cleavage.

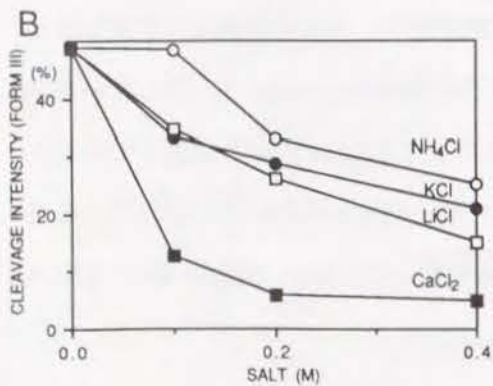
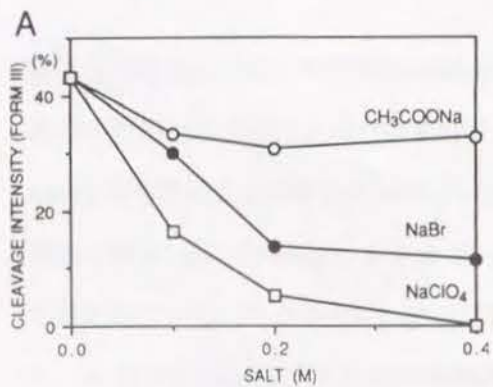


Figure 1-2-11 Effect of inorganic salts on DNA cutting efficiency of esperamicin C. Plasmid pBR322 was damaged by esperamicin C with increasing concentrations of salts (0-0.4 M). (A) Comparison among anions. (B) Comparison among cations.

識に重要といえる。これまで、われわれもアメリカの科学者もエンジン部分と糖鎖部分を分けて特異性の起源を探ろうとしてきた。エンジン部分だけ又は糖鎖だけが特異性を決定すると考えることは正しくない。オリゴプリン/オリゴピリミジンの基本的特異性はエスペラミシンC (エンジン部分と三糖部分) の全体構造と全体の疎水性によるのだ。そして、エスペラミシンA₁においてはデオキシフコース-アンスラニレートが、カリチェミシン γ_1^1 においてはメトキシラムノース-チオベンゾエートが、この基本的なエスペラミシンCによる特異性をさらに変化させ、さらに特異性を高くしている。逆に言えば、オリゴプリン/オリゴピリミジン領域の認識という枠の中で、エスペラミシンA₁のDNA結合様式はカリチェミシン γ_1^1 のDNA結合様式とは異なるものであり、エスペラミシンCはその両方の結合様式をとることができる (Figure 1-2-12)。

エスペラミシン/カリチェミシンには独特な塩基配列特異性がある。その特異性の源は糖鎖だけではない。エンジン部分だけでもない。芳香族部位だけでもない。全体として独特な特異性を持っている。この全体の重要性は疎水結合という点で説明できる。なぜなら、疎水結合の場合ある特定部位の相互作用よりも全体の立体空間的な相補性が問題となるからである。

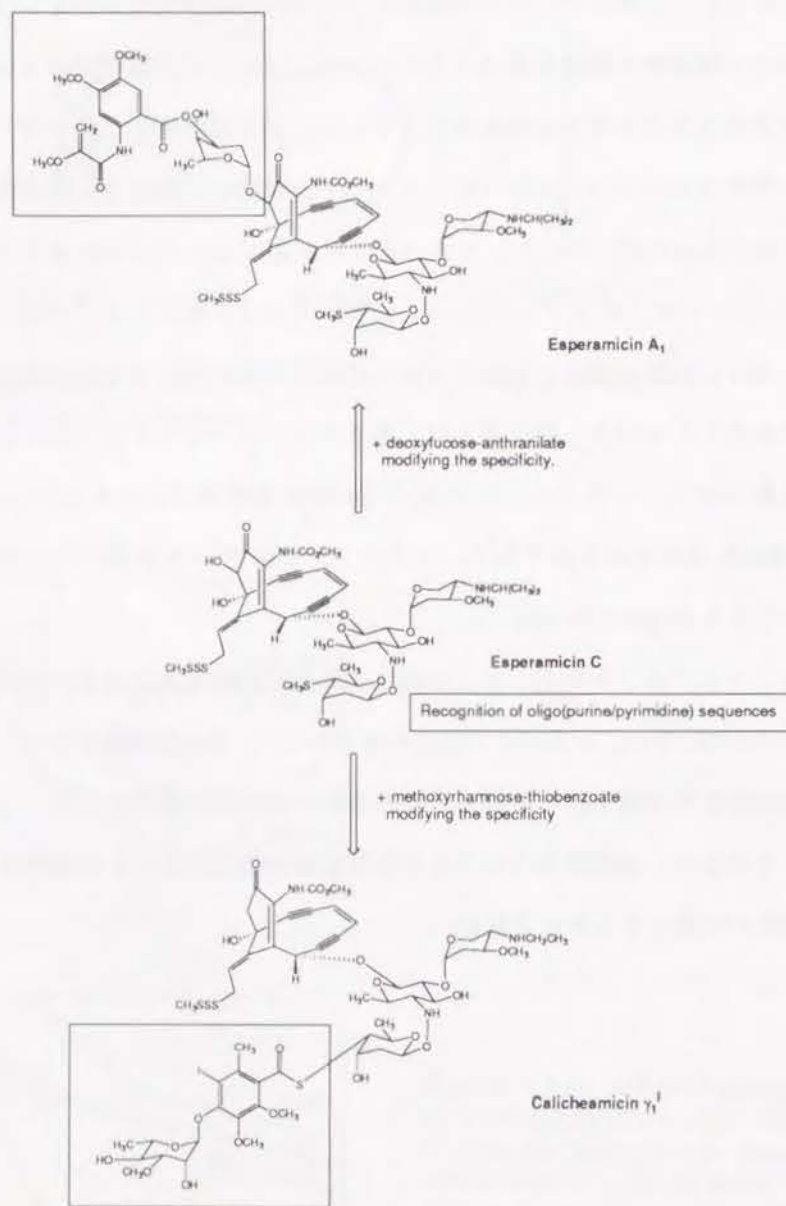


Figure 1-2-12 Schematic representation showing that the selectivities of esperamicin A₁ and calicheamicin γ_1^I are based on that of esperamicin C.

第三節 疎水性相互作用と DNA 構造の再編成

DNA のマイナーグループは一見何もない溝のように感じられるが、だからこそ逆に複雑といえる。水に溶けているかぎり水和分子がある。しかも塩基配列や環境によって水和分子の形状は刻々と変化してやまない。水和分子は DNA そのものの形状にも反作用し、変化させる。第二節で述べたように、エスペラミシン A₁ は DNA と疎水結合しており、水和分子を考慮する必要がある。第三節ではエスペラミシン A₁ がマイナーグループと疎水結合することによる DNA の構造変化を捉え、水和構造との相関を考察する²⁶。

1 DNA オリゴマー 3 の切断

第一節で用いたオリゴマー 1 は 5'-AGGA/TCCT の標的塩基配列を含んでいた。オリゴマー 3 は GC base pair を含まない 5'-AAAA/TTTT を標的塩基配列として備える (Figure 1-3-1)。このオリゴマー 3 をエスペラミシン/カリチェミシンの反応基質として用いた。Figure 1-3-2 は切断部位の解析である。切断反応の強度はオリゴマー 1 の場合よりも若干弱められるものの、エスペラミシン A₁ もカリチェミシン γ_1^I もオリゴマー 1 の場合と同様にオリゴマー 3 を認識し切断している。エスペラミシン C においてもほぼ同様である (Figure 1-3-2B)。

この結果は筆者を全く驚かせた。なぜなら AT 塩基対の連続する DNA と GC 塩基対を含む DNA とではマイナーグループの幅や形状が全く異なるからである。つまり X 線結晶構造解析やヒドロキシルラジカル解析によると、AT 塩基対の連続する DNA のマイナーグループは特別狭くなっているからである³³⁻⁴⁰。

プリンまたはピリミジンの連続を認識して、しかも AT rich, GC rich 両方のマイ

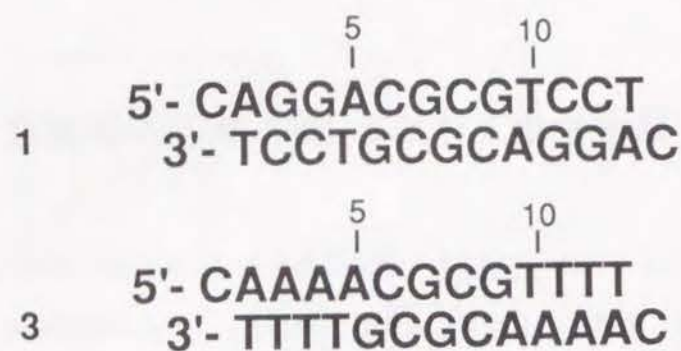


Figure 1-3-1 Sequences and numbering of DNA oligomers 1 and 3.

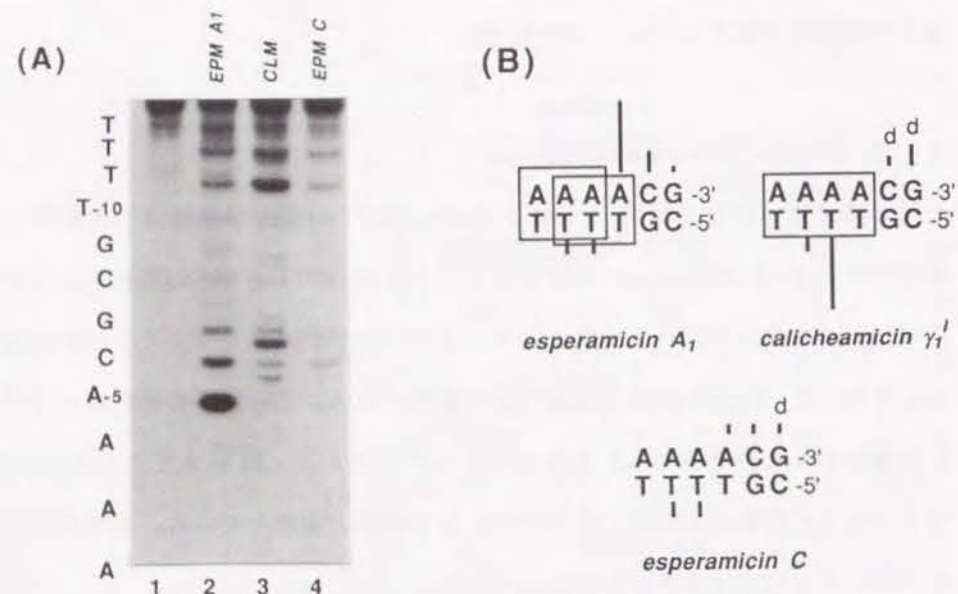


Figure 1-3-2 Comparison of DNA cleavages by esperamicins and calicheamicin γ₁^I. (A) The 5'-labeled oligomer 3 was incubated with esperamicin A₁ (EPM A1, lane 2), calicheamicin γ₁^I (CLM, lane 3), or esperamicin C (EPM C, lane 4), and subjected to 15% gel electrophoresis. Lane 1 shows intact DNA alone. (B) Histograms of the cleavage patterns. The cleavage frequencies were obtained from densitometric scans of the gel autoradio-gram shown in (A). The "d" presents a doublet band.

ナーグループに結合する分子。これまでにこんな DNA 結合分子はなかった。マイナーグループ結合分子を AT-rich binder と GC-rich binder とに区別するこれまでの分類はエスペラミシンA₁ とカリチエミシンγ₁^I にはあてはまらない (Figure 1-3-3)。エスペラミシンA₁ とカリチエミシンγ₁^I は新しいタイプのマイナーグループ結合分子といえる。

2 エスペラミシン結合によるホストDNA の構造変化

形が異なるマイナーグループに結合できるのは"induced fit" による結合だからではないか。すなわち、エスペラミシンが DNA と結合することでホスト DNA の構造が変化していると考えられる。

DNA の構造変化を調べるには円二色性スペクトルの測定が有益な情報を提供する。Figure 1-3-4 は DNA オリゴマー 1 とエスペラミシン Z による複合体の円二色性スペクトルである。エスペラミシン Z を用いたのは、実際に DNA を切断するラジカル中間体がエンジン構造よりもむしろベンゼン環構造に近いからである (Figure 1-3-5)。エスペラミシン Z が存在しないとき、オリゴマー 1 はワトソン-クリック B 型に特徴的なコットン効果を示す。しかし、ここへエスペラミシン Z を加えるとこのコットン効果は変化しており、エスペラミシン Z の結合によってホスト DNA が何らかの構造変化を強いられていることを示唆している。ここで、この構造の変化がいかなる構造の変化なのかという疑問が生じる。

一見、DNA はデオキシリボース、リン酸、塩基の三つの成分から成るように見える。しかし実際にはもう一つ水和分子があり、疎水結合の場合この水和分子を考慮する必要がある。オリゴマー 1 の円二色性スペクトルを 50% エタノール又は 80% エチレングリコール溶液中で測定すると、エスペラミシン Z を加えたときと同じようなコットン効果の変化を生じる。事実、8 μM のエスペラミシンを加えたときの円二色性スペクトルは 50% エタノールや 80% エチレングリコール溶液中でのスペク

minor groove binders

{	AT-rich binders	distamycin netropsin CC-1065 Hoechst 33258 etc
	GC-rich binders	bleomycin actinomycin chromomycin mithramycin etc

Figure 1-3-3 Traditional division of minor-groove binders.

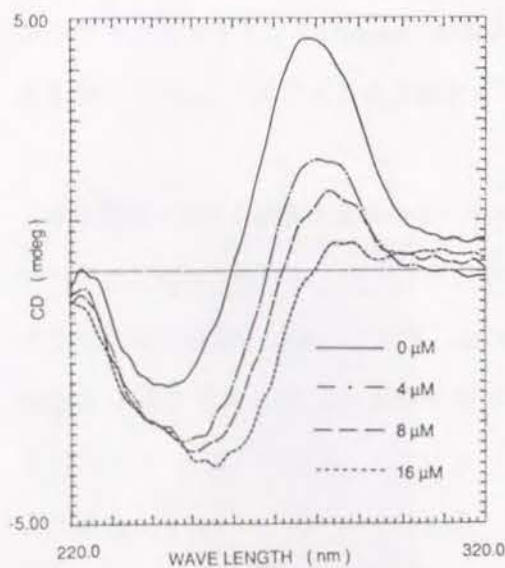


Figure 1-3-4 Circular dichroism spectra of oligomer 1. Various amounts of esperamicin Z were added to a 10% methanolic solution (1 mL) containing 2.9 μM oligomer 1, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and 0.1 M NaCl.

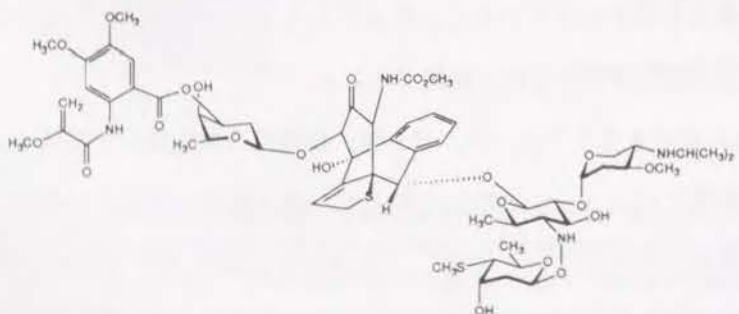


Figure 1-3-5 Chemical structure of esperamicin Z.

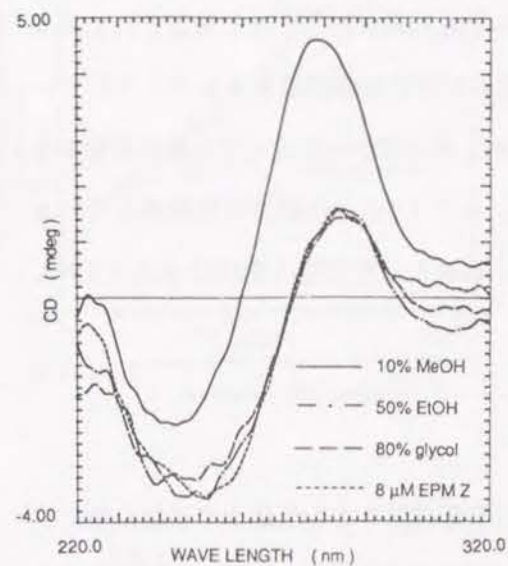


Figure 1-3-6 Circular dichroism spectra of oligomer 1 (2.9 μM) in 50% ethanolic solution, in 10% methanolic solution, in 80% ethylene glycolic solution, and in 10% methanolic solution with 8 μM esperamicin Z. Each sample contained 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 0.1 M NaCl.

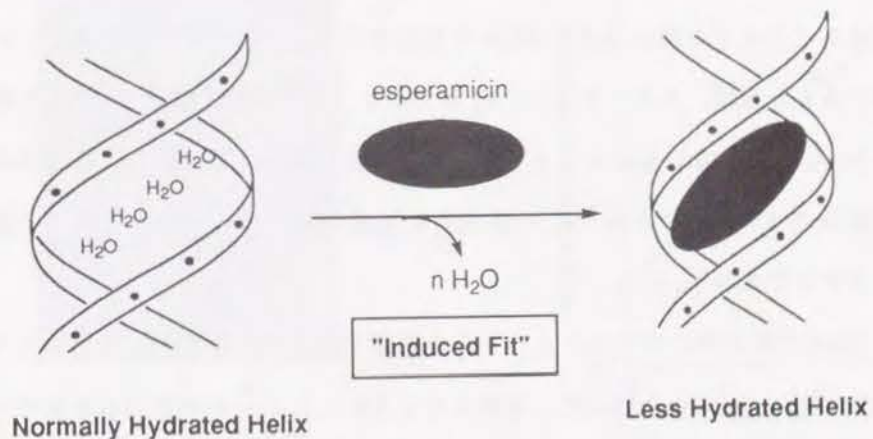


Figure 1-3-7 Schematic representation for the DNA binding process of esperamicin A₁.

トルと合致する (Figure 1-3-6)。このような有機溶媒中では DNA から水和分子がグループ中から遊離することでターンあたりの塩基対数が減少すると報告されており 41-43, 280 nm 付近のコットン効果はその塩基対数に直接関連すると考えられている。ゆえに、疎水性のエスペラミシンZが DNA のマイナーグループと疎水結合すると水和分子がマイナーグループから遊離し、ホスト DNA の構造は再編成していると考えられる (Figure 1-3-7)。エスペラミシン結合という環境の変化にホスト DNA は動的に呼応しているといえる。

3 有機溶媒の影響

疎水結合によるコンフォメーション変化は有機溶媒を含む溶液中では起こりやすいと一般に考えられている⁴⁴。ゆえに、有機溶媒を含む溶液中では DNA 分子はある程度脱水和され、疎水結合に対してある程度 preorganize されているはずである。もしもエスペラミシン結合による DNA の構造変化が主に疎水結合 (脱水和) によるものであるならば、エスペラミシンA₁ はこのような溶液中では DNA により強く結合し DNA をより強く切断すると予想される。逆にそうでないなら、有機溶媒を含む溶液中ではエスペラミシンA₁ の疎水的な効果が弱められ、DNA に対する親和性は低下するであろう。

まず DNA 切断効率に対するエタノールの影響を調べた。基質としてはプラスミド pBR322 DNA (form I) を用いた。基準となる 5% エタノール中で弱い切断のみが見られるようにエスペラミシンA₁ の濃度を 2 nM とし、エタノール濃度を増加させて DNA 切断強度を測定した。Figure 1-3-8 に示すように、エタノールは DNA 切断効率を増大させた。メタノールにおいては同様の効果が観察されたが、エチレングリコールでは切断効率増大の効果は小さかった。CD (円二色性) スペクトルによる研究によると^{26,43}、エチレングリコールはエタノールやメタノールに比べて脱水和の効果が小さく、DNA に構造変化を与えにくいことが知られており、ここでの実験

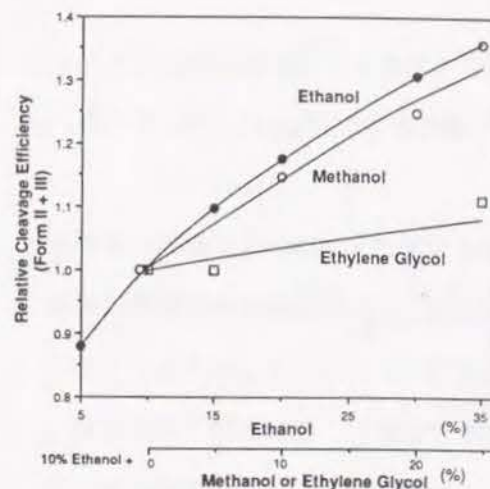


Figure 1-3-8 Effects of organic solvents on the rate of cleavage of pBR322 by esperamicin A₁

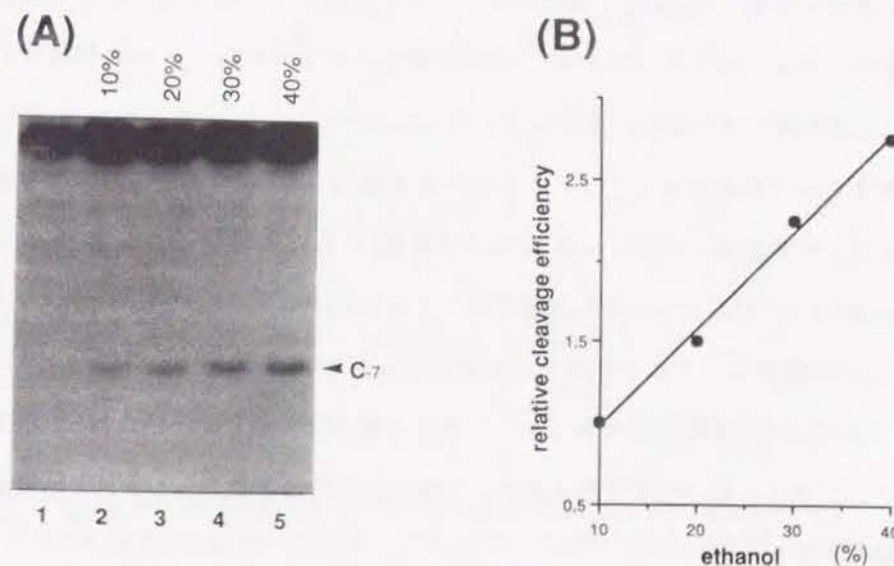


Figure 1-3-9 (A) Cleavage of duplex 4 (see Figure 1-4-1) by esperamicin A₁ with increasing concentrations of ethanol: lane 2, 10%; lane 3, 20%; lane 4, 30%; lane 5, 40%. Lane 1 shows intact 4 alone. (B) Quantitation of the cleavage bands by scanning densitometry.

結果と一致している。DNA duplex 4 (Figure 1-4-1) を基質とした場合、10% エタノール中に比べ30% エタノール中では切断強度は約二倍となった (Figure 1-3-9)。この際、切断箇所に変化はなかった。

つぎにエタノール 10%, 30% のそれぞれの溶液中での 5'-AGG/CCT 配列に対するエスペラミシン A₁ の結合定数を求めることを試みた。この目的のために筆者は末端標識したオリゴヌクレオチド 5 (5'-AGGCCT) を基質として用いた。エスペラミシン A₁ はこのオリゴヌクレオチドをほとんど C のみで切断し、電気泳動ゲル上に唯一の切断産物を生成する (Figure 1-3-10)。切断バンドと未反応バンドをゲルから切り出し、液体シンチレーションカウンターで放射能を計測することで、切断効率を求めることができる。Figure 1-3-10C はエスペラミシン A₁ を増加させたときの切断効率の変化である。明らかにエタノール 30% 溶液中ではエタノール 10% 溶液中においてよりも切断効率は高い。結合しているエスペラミシン A₁ はすべて DNA 鎖を切断できるものと仮定することで、エタノール 10% および 30% 溶液中での結合定数を求めた。その結果、エタノール 10% 中では $K_a = 1.3 \times 10^4$ 、エタノール 30% 中では $K_a = 3.4 \times 10^5$ であった。この実験で用いられた反応条件 (1 mM ジチオスレイトール, 20 時間反応) では全てのエスペラミシン A₁ が活性化されるので、エスペラミシン A₁ の活性化反応に対するエタノールの影響は除外することができる。事実、さらにジチオスレイトールを加えても、さらに反応時間を長くしても同じ切断効率が観察される。

4 5'-AAAA/TTTT の認識に関する考察

以上の実験によって 5'-AAAA/TTTT の認識を説明することができる。5'-AGGA/TCCT のような GC 塩基対を含んだ配列と比較して 5'-AAAA/TTTT 配列のマイナーグループは特別狭いが³³⁻⁴⁰、この狭いマイナーグループを安定化しているのは spine of hydration という水和分子の連なりと一般に考えられている^{36,45,46}

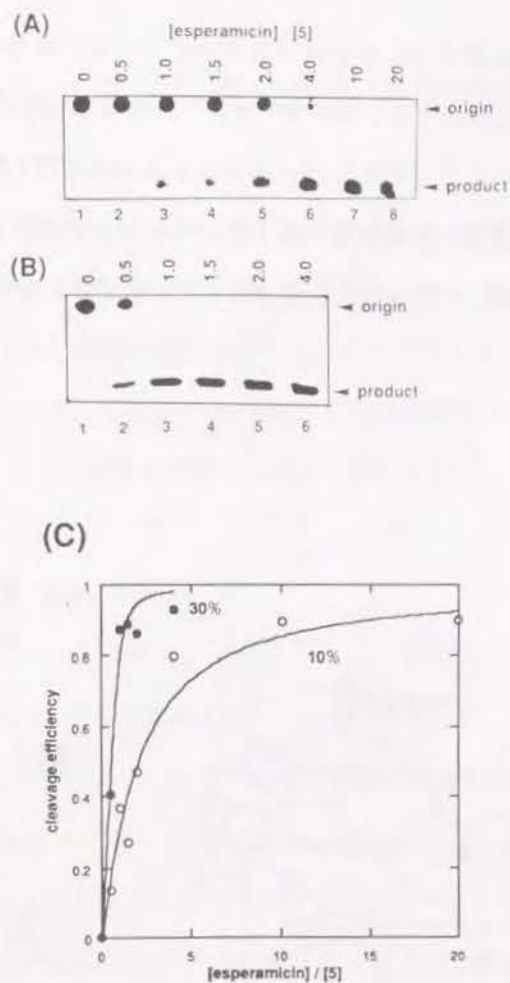


Figure 1-3-10 Cleavage of 5 by esperamicin A₁ (1). (A) Autoradiogram showing cleavage products in a 10% ethanolic solution. (B) Autoradiogram showing cleavage products in a 30% ethanolic solution. The concentration of 5 ([5]) was fixed to be 50 μ M. The ratios [esperamicin]/[5] were 0 (lane 1), 0.5 (lane 2), 1.0 (lane 3), 1.5 (lane 4), 2.0 (lane 5), 4.0 (lane 6), 10 (lane 7) and 20 (lane 8). The products were separated on 15% sequencing gels. (C) Cleavage efficiencies acquired from panels (A) and (B). Lines were calculated according to the formula $E = 1/2[(X+1+1/CKa) - \{(X+1+1/CKa)^2 - 4X\}^{1/2}]$, where E, C, X, and K_a are cleavage efficiency, [5], [esperamicin]/[5], and the binding constant for the interaction, respectively. This formula was obtained from the equilibrium $5 + \text{drug} \leftrightarrow 5 \cdot \text{drug}$. The drug concentration at which half the DNA is cleaved corresponds to $1/K_a$.

(Figure 1-3-11)。この章で示したのは「エスベラミシン/カリチェミシンが DNA のマイナーグループに結合するとマイナーグループから水和分子が遊離し、DNA の構造が変化する」ということであった。ゆえに 5'-AAAA/TTTT 配列の認識において考慮すべきなのは、通常の水和状態にある狭いマイナーグループの形というよりもむしろ水和分子が遊離した低い水和状態でのマイナーグループの形であろう。

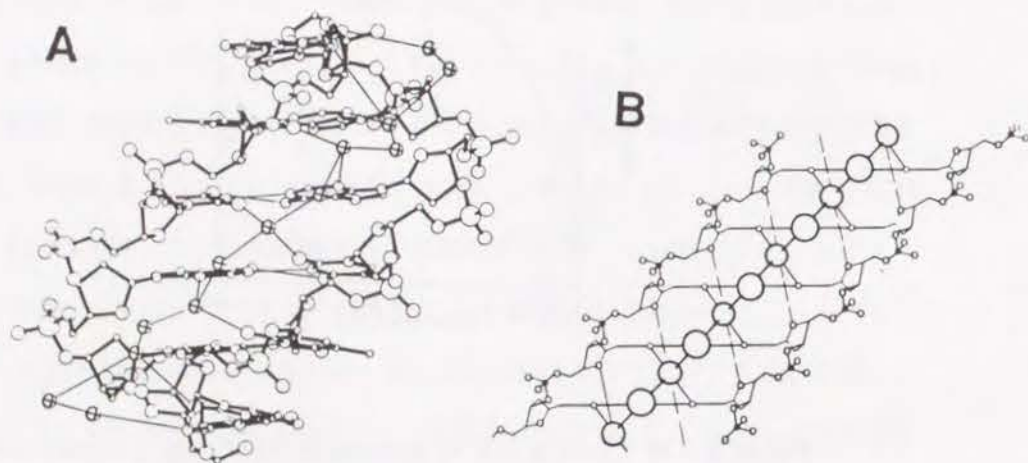


Figure 1-3-11 Minor-groove geometry of solvent in 5'-AATT-3'. (A) Crossed spheres are oxygen atoms of water molecules, whose presumed hydrogen-bond interactions are drawn as thin lines³⁶. (B) Idealized diagram of the spine of hydration in AT-rich sequences⁴⁵.

第四節 DNA ヘリックスの柔軟性と特異的結合の相関

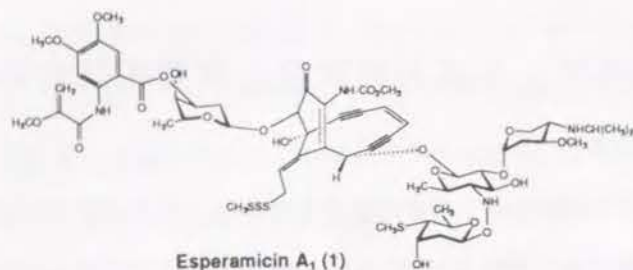
DNA は固定物ではなく環境に応じて常に変化している。エスベラミシン A_1 に対しても DNA は単なる受け身な受容体ではない。疎水的なエスベラミシン A_1 の結合という環境変化によって DNA 自体の構造は変化し、エスベラミシン A_1 にとって最適な場を DNA は提供している。第四節では DNA の動的な側面すなわち柔軟性を直視し、エスベラミシン A_1 による特異的結合との相関を追究する⁴⁷。

1 柔軟性の異なる基質 DNA の設計

一連の合成 DNA オリゴマーを設計し、これらをエスベラミシン A_1 (1) の基質として用いた。Figure 1-4-1 に示す DNA duplex 2 ~ 4 は典型的な標的塩基配列 5'-GGA/TCC を含んでいる²⁶。しかし、そのヘリックスの自由度はそれぞれ異なる。duplex 2 は自らを折り畳んだヘアピン構造を形成し、5'-GGA/TCC 配列周辺は構造変化を受けにくい。duplex 2 の自由度を高めるために二種の方法を採用した。duplex 3 では duplex 2 の 3' 末端にある二つのヌクレオチドを取り去った。duplex 4 では duplex 2 のループ部分の束縛を放った。この二つの duplex は末端のほぐれのためにヘリックスの自由度が高まるはずである。

2 ヘリックスの熱的柔軟性

duplex 2 ~ 4 の熱動的柔軟性を UV 融解曲線で評価した。DNA 濃度を $2.5 \mu\text{M}$ に固定した時の UV 融解曲線を Figure 1-4-2 に示す。二本鎖構造が温度により解かれ一本鎖になると UV 吸収は上昇する。それぞれの duplex の融点温度 (T_m) は Figure 1-4-1 に示してある。予想通り融点温度は $2 > 3 > 4$ の順に低下しており、ループ構



		<i>T_m</i> (°C)	ΔH_{VH} (kcal/mol)
2	<pre> 5' TATGGACGC T ATACCTGCG T </pre>	64	94
3	<pre> 5' TATGGACGC T ACCTGCG T </pre>	60	66
4	<pre> 5' TATGGACGC T ATACCTGCG T </pre>	20	50

Figure 1-4-1 Schematic diagram of the base sequences of duplexes 2-4. The arrowheads point to the nucleotides cleaved by esperamicin A₁(1). Melting temperatures (*T_m*; 2.5 μ M strand concentration) and van't Hoff enthalpy changes (ΔH_{VH}) of each oligonucleotide were obtained at 260 nm in a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 0.1 mM NaCl.

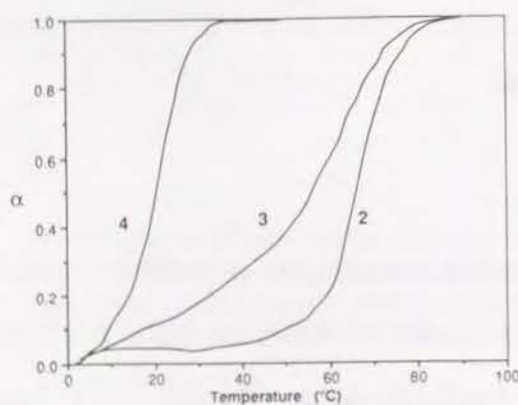


Figure 1-4-2 Ultraviolet melting curves of duplexes 2-4. α is the fraction of total change in absorbance upon thermal denaturation. The data were taken in 2.5 μ M duplex, 10 mM Tris-HCl, and 0.1 mM NaCl at pH 8.0.

造を取り除いた duplex 4 は他に比べて融点が大きく低下していることがわかる。

duplex 2 および 3 においては duplex の濃度を上昇させても融点温度に変化はなかった。この事実はヘアピン構造と一致する。なぜならヘアピン構造の融解は単分子会合だからである⁴⁸。それぞれのヘアピン構造の van't Hoff のエンタルピー変化 (ΔH_{VH}) は UV 融解曲線の形状を分析することで得られる⁴⁹⁻⁵²。一方, duplex 4 の融点温度は濃度に大きく影響される。なぜなら二分子間会合だからである。融点温度の逆数対 log 濃度をプロットし, その傾きと切片から ΔH_{VH} が得られる⁴⁹⁻⁵²。得られた duplex 2 ~ 4 の ΔH_{VH} は融点温度とともに Figure 1-4-1 にまとめられている。これら三つの合成 duplex が様々なヘリックスの自由度をもつモデル基質であることがわかる。

3 エスペラミシンA₁による duplex 2 ~ 4 の切断

ホスト DNA におけるヘリックスの柔軟性がエスペラミシンの結合に関係するならば, エスペラミシンA₁ は「より硬い」DNA に対して低い切断活性を発現するはずである。筆者は duplex 2 ~ 4 をエスペラミシンA₁ で切断し, その切断効率を求めた。まずそれぞれの duplex を ³²P で 5'-末端標識し, エスペラミシンA₁ で反応後, 15% ポリアクリルアミドゲルで反応産物を解析した。duplex 2 と 4 の電気泳動結果を Figure 1-4-3A に示す。エスペラミシンA₁ は予想どおり 5'-AGG 部位の 3' 側に隣接するヌクレオチドを切断している²⁶。(今回の基質ではピリミジン鎖での切断は観察されず, エスペラミシンA₁ が主に一本鎖切断を起こしているという考え方に一致する^{17,18,53}) これらのオートラジオグラムをデンストメーターで解析し, 数値化したものが Figure 1-4-3B である。ヘリックスの柔軟性が増加するにつれて切断効率は大きく上昇している。すなわち切断強度は duplex 2 < 3 << 4 の順に増加している。しかし, duplex 3 と duplex 4 の間の変化が著しい一方で, duplex 3 と 2 の相違は ΔH_{VH} や *T_m* の相違と比較して小さいことを明記しておくべきであろう。duplex

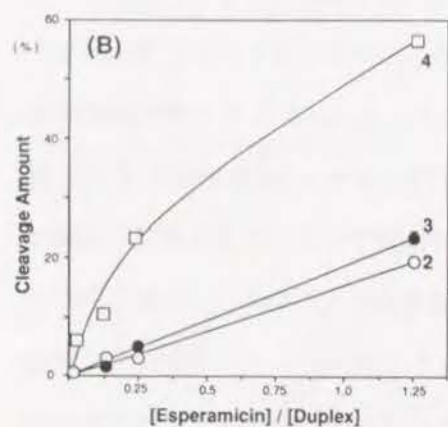
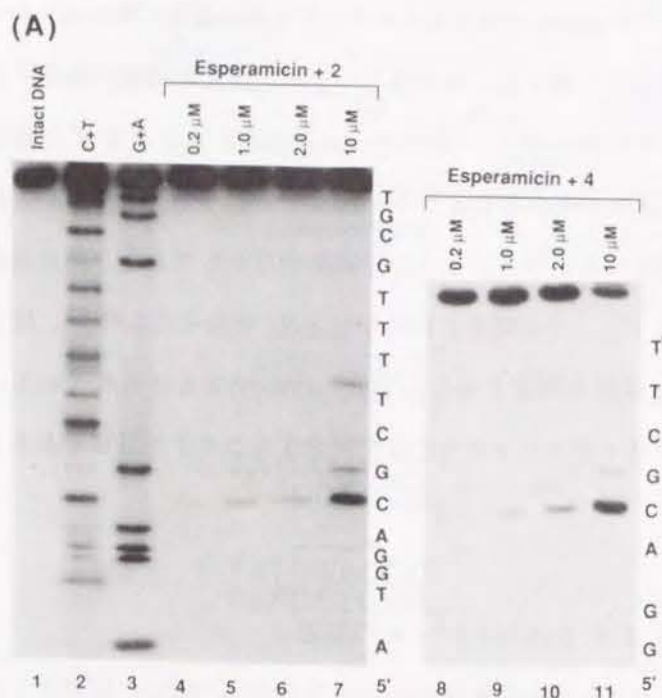


Figure 1-4-3 Cleavage of oligonucleotide duplexes by esperamicin A₁ (1). (A) Autoradiograms showing cleavage of duplexes 2 (lanes 4-7) and 4 (lanes 8-11). Drug concentration was varied: lanes 4 and 8, 0.2 μM; lanes 5 and 9, 1.0 μM; lanes 6 and 10, 2.0 μM; lanes 7 and 11, 10 μM. Lane 1 shows intact 2 alone. Lanes 2 and 3 are the Maxam-Gilbert sequencing ladders. (B) Densitometric analyses of the auto-radiograms.

3 と 2 のループ構造による固定化が薬物結合の際に必要な構造変化のエネルギー障壁を特別に高いものとしているのであろうと筆者は解釈している。このようなコンフォメーション的制約は ΔH_{H1} や T_m の値によって正確に評価できない。

ヘアピン構造の効果としてコンフォメーションの制約だけを考えるのは危険かもしれない。すなわちヘアピン構造はヘアピン以外の部分(ステム部分)の構造を変えてしまう可能性がある。しかし、duplex 2 と 4 の円二色性スペクトルはほとんど同一であり、ステム部分の構造に変化がないことを示唆している。実際、ほかの類似したヘアピンオリゴヌクレオチドの二次元 NMR 解析によるとステム部分は B 型に特徴的なコネクティビティーを示し、そのコネクティビティーはループ部分とは独立したものであることが示されている⁵⁴⁻⁵⁶。

4 特異性の起源に関する考察

エスペラミシン・カリチェミシンは新しいタイプのマイナーグループ結合分子である。AT rich, GC rich 両方のオリゴプリン/オリゴピリミジン領域を認識して切断する^{26,57}。AT 塩基対の連続する DNA と GC 塩基対を含む DNA とではマイナーグループの構造が全く異なる³³⁻⁴⁰。それゆえ、この塩基配列認識は静的なグループの幅や塩基対を認識するような古典的なものではない。現在までに理解されたことをまとめると「エスペラミシン・カリチェミシンが DNA と結合すれば、その疎水性結合により DNA の構造が変化し、薬物は DNA のマイナーグループの中に収納される」ということになる。この知識を発展させて塩基配列認識の起源を探ることができる。

(1) ホスト DNA の「柔らかさ」

ホスト DNA の構造が変化するような結合においては、DNA は単なる受け身な受容体ではない⁵⁸⁻⁶⁰。434 フェージリプレッサーと DNA の結合は良い例である。リプレッサーのヘリックスターンヘリックス部位を巻き込むようにして DNA は曲がっている。この塩基配列特異的な DNA 結合には DNA の柔軟性が重要とされている^{57,58}。同じ

ことがエスベラミシンやカリチェミシンにもいえる。つまり、必要とされる構造変化を塩基配列が起こせるかどうかエスベラミシンやカリチェミシンの特異性を決定しているのかもしれない（間接的な塩基配列の読みだし）。事実、オリゴプリン・オリゴピリミジン配列は柔軟な構造をもっていると考えられている⁶¹。例えば、一本鎖に特異的な S1 ヌクレアーゼはホモプリン/ホモピリミジン配列を強く切断し、二つの鎖におけるオーバーラップの違いが変性したコンフォメーションを安定化していると考えられている^{62,63}。またアンスラマイシンの最近の研究によると、オリゴプリン/オリゴピリミジン配列は元々柔軟であるとされている⁶⁴。

(2) ゲスト薬物の疎水性と「硬さ」

オリゴプリン/オリゴピリミジンの認識にはエスベラミシン C の全体構造、つまりエンジン部分と三糖部分の両方が必要だと先に述べた。「全体構造が特異性の起源である」とはどのような意味か、今その意味を理解できる。

エスベラミシン・カリチェミシンとの疎水性結合が DNA 構造を変化させているのは明らかだが、その構造の変化を安定化しているのは薬物中の特定の官能基だろうか。そうではなく、相補的で疎水的な表面を持ったもっと広範囲な相互作用領域だろう。言い換えれば「疎水的な全体構造」である。エスベラミシン C の中からある一部分だけを取り出して、「これが特異性の起源だ」と言うことはできない。

全体構造が重要なら、その全体構造は「硬い」必要がある。なぜなら「硬い」ゲスト薬物こそがホストである DNA に構造変化を強いるからである。疎水的で硬い薬物は DNA の柔軟な部分を読むことで特異性を発揮できる。特異性の起源を決定することは、今やエスベラミシン C の構造を硬くしている要因を探し出すという問題になってきた。エスベラミシン C は実際に「硬い」構造なのか。分子力場計算によるとエスベラミシン C はかなり硬い。三糖部分はとくに硬い構造をとっており、いくつかの溶媒中で糖同士の間強い NOE (核オーバーハウザー効果) が観察されることも証拠の一つである⁶⁵。「硬い」構造の原因は二つ挙げられる。一つはエスベ

ラミシン C の構造中には環構造が多いこと。環構造は分子のとりえる形を極端に制限する。第二に窒素-酸素グリコシド結合の存在である。この特異なグリコシド結合が分子の形を特に制限していると現在では考えられている^{66,67}。

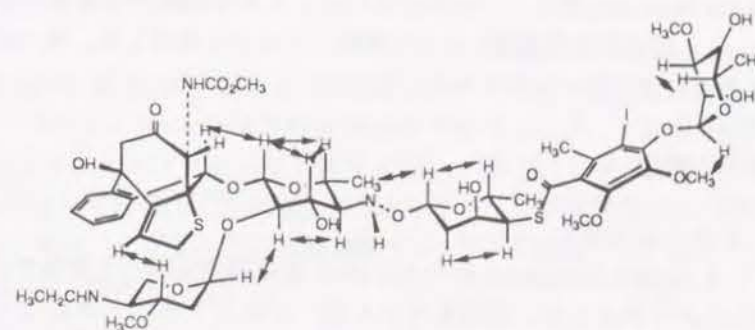


Figure 1-4-4 Reported through-space connectivities of calicheamicin ε are indicated by arrows⁶⁵.

第五節 実験の部

1 試薬

エスベラミシンA₁, C, DはBristol-Myers Squibb社のTerrence W. Doyle博士, 小西正隆博士により供給されたものを使用した。カリチェミシンγ₁¹はAmerican Cyanamid Lederle研究所George A. Ellestad博士により供給されたものを用いた。プラスミドpBR322 DNAは*Escherichia coli* C600から単離した。バクテリアアルカリ性フォスファターゼ, T4ポリヌクレオチドキナーゼ, 各種制限酵素はTakaraから購入した。[γ-³²P]ATPはDu Pontから購入したものを用いた。また本実験では蒸留水をさらにSybron Nanopure II超純水製造装置によって精製したものを使用した。他の試薬は販売されている最も純度の高いものを使用した。

2 第二節に関する実験

オリゴヌクレオチドの合成

DNAオリゴマーはApplied Biosystems社の391 DNA合成装置を用いて固相フォスフォアミダイト法により合成した。縮合を行った後, 20%アンモニア水によってDNAをカラムから切り出し, 密栓して55℃で8時間処理した。減圧濃縮後, 逆相C₁₈カラムを装着したHPLCによりジメチルトリチル基を有するDNAのみを分取した。溶出は0.1 M トリエチルアミン-酢酸緩衝液 (pH 7.0) 中, 5~50%アセトニトリルの直線濃度勾配で行った。この際, 流速は1.0 mL/minとした。減圧濃縮後, 80%酢酸溶液で30 min処理し, 溶媒除去後, 残さに0.1 M トリエチルアミン-酢酸緩衝液 (pH 7.0)を加え, エーテルで三回洗浄し, 逆相C₁₈カラムを装着したHPLCにより目的物をさらに精製した。定量はそれぞれのDNAオリゴマーの紫外線吸光度から計算した。

オリゴヌクレオチドの5'-末端標識

DNAオリゴヌクレオチドの5'-末端標識はポリヌクレオチドキナーゼおよび[γ-³²P]ATPを用いて行った。標識後, 7 M尿素を含んだ15%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動によって標識DNAをさらに精製した。

エスベラミシンA₁によるオリゴヌクレオチド1および2の切断

標準的な反応溶液 (全量: 20 μL) は0.2 μM エスベラミシンA₁ (エスベラミシンCの場合は2 μM, エスベラミシンDの場合は40 μM, カリチェミシンγ₁¹の場合は

0.2 μM) および1 mM ジチオスレイトール, 3 pmole 末端標識DNAを含み, 20 mM トリス-塩酸緩衝液によってpHを7.5とした。薬物とジチオスレイトールを加える前にいったん90℃で5分間加温し, 室温までゆっくりとさました後, 再アニーリングのため少なくとも1時間4℃に放置した。最後に薬物とジチオスレイトールを加えることで切断反応を開始し, 4℃で60 min 放置した後, 氷冷エタノールを60 μLと3 M酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.5) 5 μLを加えエタノール沈殿を行うことで反応を停止し, DNAを回収した。それぞれのDNAサンプルに5 μLの泳動用緩衝液 (95%ホルムアミド, 10 mM EDTA, 0.01%プロモフェノールブルー)を加えてよく攪拌したものを電気泳動用サンプルとした。電気泳動は7 M尿素を含んだ15%ポリアクリルアミドゲルを用い, TBE緩衝液中 (89 mM トリス-ホウ酸 (pH 8), 2 mM EDTA) 2000 Vで約1時間電気泳動した。塩基配列の同定はマキサム-ギルバート法により行った⁶⁸。切断強度はレーザーデンスitomーター (LKB Model 2222 Ulro-Scan XL)を用いて評価した。

pBR322 DNA断片の調製と末端標識

pBR322プラスミドDNAを制限酵素*Bam*HIで処理した後, その5'-末端をバクテリアアルカリ性フォスファターゼで脱リン酸し, T4ポリヌクレオチドキナーゼと[γ-³²P]ATPによって標識した。標識したDNAをさらに制限酵素*Sa*Iで切断し, 非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (5%ゲル)により精製し, 目的とする5'-末端標識*Bam*HI-*Sa*I断片を得た。

エスベラミシンA₁によるpBR322 DNA断片の切断

反応溶液 (全量: 20 μL) は0.2 μM エスベラミシンA₁ (エスベラミシンCの場合は2 μM, エスベラミシンDの場合は40 μM, カリチェミシンγ₁¹の場合は0.2 μM) および1 mM ジチオスレイトール, 微量の末端標識DNA, 0.4 μg 子牛胸腺DNAを含み, 20 mM トリス-塩酸緩衝液によってpHを7.5とした。最後にジチオスレイトールを加えることで切断反応を開始し, 37℃で7 min 放置した後, 氷冷エタノールを60 μLと3 M酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.5) 5 μLを加えエタノール沈殿を行うことで反応を停止し, DNAを回収した。それぞれのDNAサンプルに5 μLの泳動用緩衝液 (95%ホルムアミド, 10 mM EDTA, 0.01%プロモフェノールブルー)を加えてよく攪拌し, 一旦90℃で一時間処理したものを電気泳動用サンプルとした。電気泳動は7 M尿素を含んだ15%ポリアクリルアミドゲルを用い, TBE緩衝液中 (89 mM トリス-ホウ酸 (pH 8), 2 mM EDTA) 2000 Vで約2時間電気泳動した。塩基配列の同定はマキサム-ギルバート法により行った⁶⁸。切断強度はレーザーデンスitomーター (LKB Model 2222 Ulro-Scan XL)を用いて評価した。

DNA切断効率に対する無機塩の影響

反応溶液 (全量: 20 μL) は0.2 μM エスベラミシンC および1 mM ジチオスレイトール

トール, 0.4 μg pBR322 DNA, 0.1 M NaCl, 様々な濃度の無機塩を含み, 20 mM トリス - 塩酸緩衝液によって pH を 7.5 とした。0.1 M NaCl は DNA のイオン交換効果を最小限に抑えるために加えられている。最後にジチオスレイトールを加えることで切断反応を開始し, 20 $^{\circ}\text{C}$ で 5 min 放置した後, 氷冷エタノールを 60 μL と 3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.5) 5 μL を加えエタノール沈殿を行うことで反応を停止し, DNA を回収した。それぞれの DNA サンプルに 20 μL の泳動用緩衝液 (10% グリセロール, 0.05% プロモフェノールブルー) を加えてよく攪拌し, 65 $^{\circ}\text{C}$ で一分間処理したものを電気泳動用サンプルとした。電気泳動は 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のエチジウムブロミドを含んだ 1% アガロースゲルを用い, TBE 緩衝液中 (89 mM トリス - ホウ酸 (pH 8), 2 mM EDTA) 100 V で約 30 分間電気泳動した。続いてトランスイルミネーター上のゲルをボラロイド 665 フィルムを用いて撮影し, そのネガをレーザーデンシトメーター (LKB Model 2222 Ultro-Scan XL) を用いて解析することで, プラスミドのそれぞれのフォームの定量を行った。

3 第三節に関する実験

エスペラミンA₁ によるオリゴヌクレオチド 3 および 4 の切断

オリゴヌクレオチド 3 および 4 の合成と標識, 切断は第二節で行ったものに準ずる。

円二色性スペクトルの測定

円二色性スペクトルは Jasco J-720 を用いて測定し, セルは Shimadzu S-260 SPR-8 により温度制御を行った。0.1 M NaCl, 20 mM トリス - 塩酸 (pH 7.5), 2.9 μM オリゴマー 1 を含んだ 10% メタノール溶液 (1 mL) を準備し, ここに 15 $^{\circ}\text{C}$ に温度を制御しながら 4 mM のエスペラミンZ 溶液 (メタノール溶液) を 1 μL ずつ加えた。スペクトルは 10 回積算の平均値で, 緩衝液と薬物のベースラインが引かれている。各種溶媒中でのスペクトル測定はこれに準ずる。

DNA 切断効率に対する有機溶媒の影響

エスペラミンA₁ による pBR322 DNA の切断は全量 40 μL の反応溶液中で 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min で行った。20 mM トリス - 塩酸 (pH を 7.5), 0.4 μg pBR322 DNA, そして様々な量の有機溶媒を含んだ 36 μL の溶液をまず準備し, 25 $^{\circ}\text{C}$ で 60 min 放置した後, エスペラミンA₁ のエタノール溶液を 2 μL 加える。最後にジチオスレイトールを 2 μL 加えることで切断反応を開始した。薬物とジチオスレイトールの最終濃度は, それぞれ 2 nM と 1 mM とした。この薬物濃度は有機溶媒濃度を変えてもプラスミドのフォーム変換が定量できるように設定してある。氷冷エタノールを 120 μL と 3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 7.5) 5 μL を加えエタノール沈殿を行うことで反応を停止し, DNA を回収した。それぞれの DNA サンプルに 20 μL の泳動用緩衝液 (10%

グリセロール, 0.05% プロモフェノールブルー) を加えてよく攪拌し, 65 $^{\circ}\text{C}$ で一分間処理したものを電気泳動用サンプルとした。電気泳動は 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のエチジウムブロミドを含んだ 1% アガロースゲルを用い, TBE 緩衝液中 (89 mM トリス - ホウ酸 (pH 8), 2 mM EDTA) 100 V で約 30 分間電気泳動した。続いてトランスイルミネーター上のゲルをボラロイド 665 フィルムを用いて撮影し, そのネガをレーザーデンシトメーター (LKB Model 2222 Ultro-Scan XL) を用いて解析することで, プラスミドのそれぞれのフォームの定量を行った。

d(AGGCCT) との結合定数の評価

反応溶液 (10% または 30% エタノール溶液で全量は 20 μL) は様々な量のエスペラミンA₁ および 1 mM ジチオスレイトール, 50 μM d(AGGCCT) (5), 微量 (<2 pmole) 末端標識 5, 0.1 M NaCl を含み, 20 mM トリス - 塩酸緩衝液によって pH を 7.5 とした。コンフォメーション変化を平衡状態とするために, 薬物とジチオスレイトールを加える前に少なくとも 1 時間 4 $^{\circ}\text{C}$ に放置した。最後に薬物とジチオスレイトールを加えることで切断反応を開始し, 4 $^{\circ}\text{C}$ で 20 h 放置した後, 凍結乾燥した。それぞれのサンプルに 5 μL の泳動用緩衝液 (95% ホルムアミド, 10 mM EDTA, 0.01% プロモフェノールブルー) を加えてよく攪拌したものを電気泳動用サンプルとした。電気泳動は 7 M 尿素を含んだ 15% ポリアクリルアミドゲルを用い, TBE 緩衝液中 (89 mM トリス - ホウ酸 (pH 8), 2 mM EDTA) 2000 V で約 1 時間電気泳動した。得られたオートラジオグラムとゲルを並べてバンドを分取し, バンドの放射能を Beckman LS1800 を用いて計測することで切断効率を求めた。結合した薬物はすべて DNA を切断すると仮定して (すなわち切断効率が薬物の結合している割合を表すと仮定して), データを $5 + \text{drug} \leftrightarrow 5 \cdot \text{drug}$ の平衡にフィットさせることで結合定数を計算した。データフィットには Apple Macintosh Computer の Kaleida Graph ソフトウェアを用いた。

4 第四節に関する実験

duplex 2-4 の合成と定量

duplex 2-4 の合成は第二節で行ったものに準ずる。duplex の濃度は 260 nm の紫外線吸収によって決定した。一本鎖の 25 $^{\circ}\text{C}$ における吸収を紫外線融解曲線の上部ベースラインを引き伸ばすことで求め, Warshaw らの方法⁷⁰により得た 25 $^{\circ}\text{C}$ におけるそれぞれの吸光係数と比較することで濃度を計算した。

duplex 2-4 の融解温度とエンタルピー変化の測定

それぞれの測定溶液は 10 mM トリス - 塩酸 (pH 8.0), 0.1 mM NaCl を含み, 全量を 1 mL とした。数回アニーリングを行った後, 毎分 1.0 $^{\circ}\text{C}$ の速さで 0 $^{\circ}\text{C}$ から 90 $^{\circ}\text{C}$ まで温度を変化させ, そのときの 260 nm の吸光度を測定し, 吸光度 (260 nm) 対温

度の融解曲線を得た。吸光度の測定には Shimadzu UV-2200 を用い、温度制御を Shimadzu SPR-8 で行うとともにセル内温度を Chino DB1000 によりモニターした。二状態遷移と近似し、広く用いられている方法により、 ΔH_H と T_m (融解温度) の値を求めた。ヘアピン構造の ΔH_H は融解曲線の形状を分析することで得られる⁴⁹⁻⁵²。一方、duplex 4 の融点温度は、融点温度の逆数対 log 濃度をプロットし、その傾きと切片から ΔH_H が得られる⁴⁹⁻⁵²。

エスペラミシンA₁ による duplex 2-4 の切断

反応溶液 (全量: 20 μ L) は様々な量の エスペラミシンA₁ および 1 mM ジチオスレイトール, 0.1 mM NaCl, 160.2 pmole の DNA duplex, 微量 (< 2 pmole) の末端標識 duplex を含み, 20 mM トリス-塩酸緩衝液によって pH を 7.5 とした。対照標準の反応溶液には薬物の代わりに同じ量のエタノールを加えた。薬物とジチオスレイトールを加える前にいったん 90 °C で 5 分間加温し, 室温までゆっくりとさました後, 再アニーリングのため少なくとも 1 時間 4 °C に放置した。最後に薬物とジチオスレイトールを加えることで切断反応を開始し, 4 °C で 60 min 放置した後, 氷冷エタノールを 60 μ L と 3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.5) 5 μ L を加えエタノール沈殿を行うことで反応を停止し, DNA を回収した。それぞれの DNA サンプルに 5 μ L の泳動用緩衝液 (95% ホルムアミド, 10 mM EDTA, 0.01% プロモフェノールブルー) を加えてよく攪拌したものを電気泳動用サンプルとした。電気泳動は 7 M 尿素を含んだ 15% ポリアクリルアミドゲルを用い, TBE 緩衝液中 (89 mM トリス-ホウ酸 (pH 8), 2 mM EDTA) 2000 V で約 1 時間電気泳動した。塩基配列の同定はマキサム-ギルバート法により行った⁶⁸。切断強度はレーザーデンシトメーター (LKB Model 2222 Ultrascan XL) を用いて評価した。

引用文献

1. Konishi, M., Ohkuma, H., Saitoh, K. and Kawaguchi, H. (1985) *J. Antibiot.* 38, 1605-1609.
2. Doyle, T. W., Golik, J., Wong, H., Lam, K. S., Langley, D. R., Forenza, S., Vyas, D. M. and Kelley, S. (1992) Esperamicin A₁ (BMY-28175) - A Novel Antitumor Agent of the Diyne-ene Class. In *Cytotoxic Anticancer Drugs: Models and Concepts for Drug Discovery and Development*; Valeriote, F. A., Corbett, T. H. and Baker, L. H., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Norwell, MA; p 345.
3. Golik, J., Clardy, J., Dubay, G., Groenewold, G., Kawaguchi, H., Konishi, M., Krishnan, B., Ohkuma, H., Saitoh, K. and Doyle, T. W. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 3461-3462.
4. Golik, J., Dubay, G., Groenewold, G., Kawaguchi, H., Konishi, M., Krishnan, B., Ohkuma, H., Saitoh, K. and Doyle, T. W. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 3462-3464.
5. Golik, J., Wong, H., Vyas, D. M. and Doyle, T. W. (1989) *Tetrahedron Lett.* 30, 2497-2500.
6. Golik, J., Doyle, T. W., Van Duyne, G. and Clardy, J. (1990) *Tetrahedron Lett.* 31, 6149-6150.
7. Golik, J., Wong, H., Krishnan, B., Vyas, D. M. and Doyle, T. W. (1991) *Tetrahedron Lett.* 32, 1851-1854.
8. Long, B. J., Golik, J., Forenza, S., Ward, B., Rehfuß, R., Dabrowiak, J. C., Catino, J. J., Musial, S. T., Brookshire, K. W. and Doyle, T. W. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 2-6.
9. Sugiura, Y., Uesawa, Y., Takahashi, Y., Kuwahara, J., Golik, J. and Doyle, T. W. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7672-7676.
10. Nicolaou, K. C. and Dai, W. (1991) *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 30, 1387-1416.
11. Nicolaou, K. C., Hummel, C. W., Nakada, M., Shibayama, K., Pitsinos, E. N., Saimoto, H., Mizuno, Y., Baldenius, K.-U. and Smith, A. L. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 7625-7635.
12. Schurig, J. E., Rose, W. C., Kamei, H., Nishiyama, Y., Bradner, W. T. and Stringfellow, D. A. (1990) *Invest. New Drugs* 8, 7-15.
13. De Voss, J. J., Hangeland, J. J. and Townsend, C. A. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 4554-4556.
14. Zein, N., McGahren, W. J., Morton, G. O., Aschcroft, J. and Ellestad, G. A. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111, 6888-6890.
15. De Voss, J. J., Townsend, C. A., Ding, W., Morton, G. O., Ellestad, G. A., Zein, N.,

- Tabor, A. B. and Schreiber, S. L. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 9669-9670.
16. Hangeland, J. J., De Voss, J. J., Heath, J. A., Townsend, C. A., Ding, W., Ashcroft, J. S. and Ellestad, G. A. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 9200-9202.
 17. Kishikawa, H., Jiang, Y., Goodisman, J. and Dabrowiak, J. C. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113, 5434-5440.
 18. Christner, D. F., Frank, B. L., Kozarich, J. W., Stubbe, J., Golik, J., Doyle, T. W., Rosenberg, I. E. and Krishnan, B. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 8763-8767.
 19. Lee, M. D., Dunne, T. S., Siegel, M. M., Chang, C. C., Morton, G. O. and Borders, D. B. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 3464-3466.
 20. Lee, M. D., Dunne, T. S., Chang, C. C., Ellestad, G. A., Siegel, M. M., Morton, G. O., McGahren, W. J. and Borders, D. B. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 3466-3468.
 21. Lee, M. D., Manning, J. K., Williams, D. R., Kuck, N. A., Testa, R. T. and Borders, D. B. (1989) *J. Antibiot.* 42, 1070-1087.
 22. Lee, M. D., Dunne, T. S., Chang, C. C., Siegel, M. M., Morton, G. O., Ellestad, G. A., McGahren, W. J. and Borders, D. B. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 985-997.
 23. Zein, N., Sinha, A. M., McGahren, W. J. and Ellestad, G. A. (1988) *Science* 240, 1198-1201.
 24. Zein, N., Poncin, M., Nilakantan, R. and Ellestad, G. A. (1989) *Science* 244, 697-699.
 25. Hawley, R. C., Kiessling, L. L. and Schreiber, S. L. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 1105-1109.
 26. Uesugi, M. and Sugiura, Y. (1993) *Biochemistry* 32, 4622-4627.
 27. Dervan, P. B. (1986) *Science* 232, 464-471.
 28. Uesugi, M. and Sugiura, Y. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 580-587.
 29. Stubbe, J. and Kozarich, J. W. (1987) *Chem. Rev.* 87, 1107-1136.
 30. Aiyar, J., Danishefsky, S. J. and Crothers, D. M. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7552-7554.
 31. Ding, W. and Ellestad, G. A. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113, 6617-6620.
 32. Dill, K. A. (1990) *Biochemistry* 29, 7133-7155.
 33. McNamera, P. T. and Harrington, R. E. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 12548-12554.
 34. Yoon, C., Privé, G. G., Goodsell, D. S. and Dickerson, R. E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6332-6336.
 35. Nelson, H. C. M., Finch, J. T., Luisi, B. F. and Klug, A. (1987) *Nature* 330, 221-226.
 36. Drew, H. R. and Dickerson, R. E. (1981) *J. Mol. Biol.* 151, 535-556.
 37. Drew, H. R., Wing, R. M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K. and Dickerson, R. E. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 2179-2183.
 38. Coll, M., Frederick, C. A., Wang, A. H. and Rich, A. (1897) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 8385-8389.
 39. Burkhoff, A. M. and Tullius, T. D. (1987) *Cell* 48, 935-943.
 40. Burkhoff, A. M. and Tullius, T. D. (1988) *Nature* 331, 455-457.
 41. Bokma, J. T., Johnson, W. C. Jr. and Blok, J. (1987) *Biopolymers* 26, 893-909.
 42. Girod, J. C., Johnson, W. C., Jr., Huntington, S. K. and Maestre, M. F. (1973) *Biochemistry* 12, 5092-5096.
 43. Green, G. and Mahler, H. R. (1971) *Biochemistry* 10, 2200-2216.
 44. Guerrier-Takeda, C., Haydock, K., Allen, L. and Altman, S. (1986) *Biochemistry* 25, 1509-1515.
 45. Privé, G. G., Heinemann, U., Chandrasegaran, S., Kan, L.-S., Kopka, M. L. and Dickerson, R. E. (1987) *Science* 238, 498-504.
 46. Privé, G. G., Yanagi, K. and Dickerson, R. E. (1991) *J. Mol. Biol.* 217, 177-199.
 47. Uesugi, M., Kusakabe, T. and Sugiura, Y. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
 48. Ikuta, S., Chattopadhyaya, R., Ito, H., Dickerson, R. E. and Kearns, D. R. (1986) *Biochemistry* 25, 4840-4849.
 49. Martin, F. H., Uhlenbeck, O. C. and Doty, P. (1971) *J. Mol. Biol.* 57, 201-215.
 50. Breslauer, K. J., Sturtevant, J. M. and Tinoco, I., Jr. (1975) *J. Mol. Biol.* 99, 549-565.
 51. Albergo, D. D., Marky, L. A., Breslauer, K. J. and Turner, D. H. (1981) *Biochemistry* 20, 1409-1413.
 52. Marky, L. A. and Breslauer, K. J. (1987) *Biopolymers* 26, 1601-1620.
 53. Langley, D. R., Golik, J., Krishnan, B., Doyle, T. W. and Beveridge, D. L. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116, 15-29.
 54. Hare, D. R. and Reid, B. R. (1986) *Biochemistry* 25, 5341-5350.
 55. Senior, M. M., Jones, R. A. and Breslauer, K. J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6242-6246.
 56. Williamson, J. R. and Boxer, S. G. (1989) *Biochemistry* 28, 2819-2831.
 57. Walker, S., Landovitz, R., Ding, W., Ellestad, G. A. and Kahne, D. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4608-4612.
 58. Koudelka, G. B., Harbury, P., Harrison, S. C. and Ptashne, M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4633-4637.
 59. Hogan, M. E. and Austin, R. H. (1987) *Nature* 329, 263-266.
 60. Spolar, R. S. and Record Jr, M.T. (1994) *Science* 263, 777-783.
 61. Drew, H. R. and Travers, A. A. (1984) *Cell* 37, 491-502.
 62. Nickol, J. M. and Felsenfeld, G. (1983) *Cell* 35, 467-477.
 63. Schon, E., Evans, T., Welsh, J. and Efstratiadis, A. (1983) *Cell* 35, 837-848.
 64. Kizu, R., Draves, P. H. and Hurley, L. H. (1993) *Biochemistry* 32, 8712-8722.
 65. Walker, S., Valentine, K. G. and Kahne, D. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 6428-6429.
 66. Walker, S., Yang, D. and Kahne, D. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113, 4716-4717.
 67. Walker, S., Gange, D., Gupta, V. and Kahne, D. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116,

3197-3206.

68. Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) *Methods Enzymol.* 65, 499-560.

69. Kopka, M. L., Yoon, C., Goodsell, D., Pjura, P. and Dickerson, R. E. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 1376-1380.

70. Warshaw, M. M. and Cantor, C. R. (1970) *Biopolymers* 9, 1079-1103.

第二章

制癌抗生物質エルサミシンAによるグアニン認識と

DNA鎖切断

第一節 研究方針

制癌抗生物質エルサミシンAはDNAに結合し、鉄を補因子としてDNA鎖を切断するように自然によって巧妙にデザインされている。しかも、そのDNA結合と鎖切断はグアニン・シトシン塩基対に富む領域で起こる。第一節では、本研究以前におけるエルサミシンAの研究経過と本研究の研究方針について詳述する。

1 制癌抗生物質エルサミシンA

エルサミシンAは未同定の放線菌から単離された分子量約650の抗生物質である。Bristol-MyersのKonishiらによりEl Salvadorで採集されたことから、このエルサミシンという名がつけられた¹。その制癌活性は強力であり、マウスP388 leukemiaおよびB16 melanomaに対し、1-8 mg/kg/dayの投与でT/C 200%以上の活性を示す^{1,2}。

化学構造は1987年にBristol-MyersのSugawaraらによって報告されており、既知の制癌抗生物質チャートルシンに似ていることが明らかにされた(Figure 2-1-1)³。すなわち、それらは同じチャータリン骨格のアグリコン部位を備えているが、糖鎖部位が異なる。チャートルシンは実験腫瘍で強い制癌作用を示すことからこれまで研究されていたが、水溶性に乏しく素早く胆汁排泄されるため臨床応用されなかった⁴。エルサミシンAは新規アミノ糖を含むため水溶性が極めて高く、薬物動態が改善されている⁵。現在エルサミシンAは臨床実験に入っている⁵。

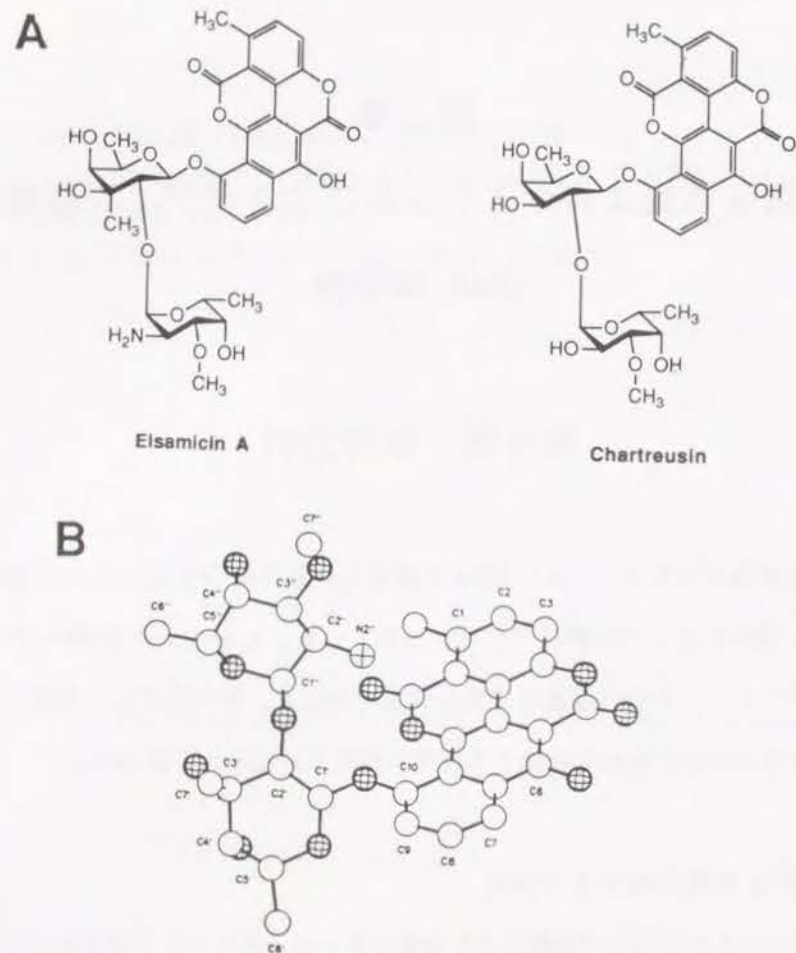


Figure 2-1-1 (A) Chemical structures of elsamicin A and chartreusin. (B) Computer-generated perspective drawing of the X-ray model of elsamicin A. Hydrogens are omitted for clarity.

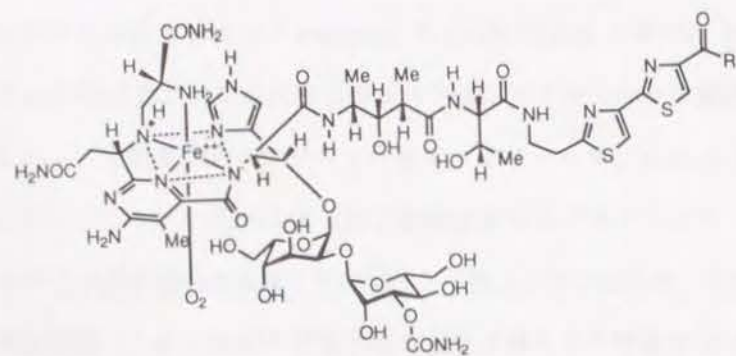


Figure 2-1-2 Chemical structure of the bleomycin-Fe(II) complex.

2 作用発現機構

類似制癌物質チャートルシンの制癌作用は DNA との相互作用と関連すると推定されていた⁶⁻⁸。しかし、臨床応用されないがゆえに、制癌作用がなぜ発揮されるのかについては追究されなかった。1988 年にエルサミシン A による腫瘍細胞内での DNA 生合成阻害と DNA 損傷が報告され², DNA 結合と DNA 鎖切断がエルサミシン A による制癌作用に重大に関係していることが示された。癌細胞は増殖が非常に速く DNA も裸に近いので DNA 切断分子に弱いのである。どのようにして DNA に結合するのか、またどのようにして DNA 鎖を切断するのか。本研究が開始された 1990 年当時全く謎であった。

3 研究着想

DNA 結合と DNA 鎖切断がエルサミシン A の制癌作用に重大に関係しているのであれば、*in vitro* でも DNA 結合と DNA 鎖切断がエルサミシン A に観察されるはずである。実際、第二節で詳述するように、エルサミシン A は二価の鉄イオンと還元剤の存在下で DNA 鎖を切断する。しかも、その DNA 鎖切断はグアニンの 3' 側に隣接するヌクレオチドに特異的であり、エルサミシン A は DNA 鎖切断と塩基認識を同時に行う一種の「酵素モデル」として機能している。このような酵素的機能は制癌剤プレオマイシンに類似する (Figure 2-1-2)⁹。プレオマイシンにおいても、二価の鉄イオンと還元剤の存在下でグアニンの 3' 側のヌクレオチドを特異的に切断する。しかし、エルサミシン A とプレオマイシンでは化学構造が全く異なるので、エルサミシン A は新しい DNA 切断分子として、そして新しい DNA 結合分子として研究される必要がある。エルサミシン A を研究材料として取り上げることは制癌作用の分子レベルでの理解に役立つばかりでなく、一般に生物活性分子による DNA 塩基認識や DNA 鎖切断反応についても有用な基礎的知見を提供すると考えられる。

第三、四節で筆者が追究する局面はDNA切断反応である。「どのような反応によってエルサミシンAは二価の鉄イオン存在下でDNA鎖を切断するのか」という疑問に答えるのが目的である。DNA鎖切断の基本原理を探ることで分子生物学用DNA切断試薬の設計に役立つものと予想される。

第五節ではグアニン認識の起源を追究する。エルサミシンAはDNAと結合するように自然によってデザインされており洗練されている。低分子によるDNAの塩基認識の起源やDNA相互作用の基本様式などが解明できれば、DNA-蛋白質といったDNAをとりまく複雑な系を理解する上で有用な知見を提供すると期待される。

エルサミシンAに関するもう一つ興味深い点はアミノ糖鎖の役割に関してである。DNA結合性抗生物質にはアミノ糖鎖を備えたものが数多いが、アミノ糖鎖の役割ははっきりしていない。そこで第六節ではエルサミシンAのアミノ糖鎖が果たす役割について検討する。

第二節 グアニン特異認識とDNA鎖切断

DNA結合とDNA鎖切断がエルサミシンAの制癌作用に重大に関係しているのであれば、*in vitro*でもDNA鎖切断がエルサミシンAによって引き起こされるはずである。第二節では、*in vitro*でのエルサミシンAによるDNA切断作用と塩基配列特異性について追究する¹⁰。

1 エルサミシンAによるプラスミドpBR322 DNAの切断

エルサミシンAによるDNA切断能を評価するために、閉環状プラスミドpBR322 DNAを基質として用いた。閉環状プラスミド(c. c. c.; Form I)は一本鎖が切断されると開環状(open circular; Form II)となり、さらに切断されると直鎖状(linear; Form III)となる(Figure 2-2-1)。これらの形状変化はアガロースゲル電気泳動によって容易に検出できるので、DNA切断活性が評価できる。まずトリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)中でエルサミシンAのみによるDNA切断活性を調べたところ、明らかなDNA切断活性は見られなかった。ところが、ここに微量の二価の鉄イオンを添加すると弱い切断活性が検出され、さらにジチオスレイトールなどの還元剤を加えるとDNA切断活性は激増した。Figure 2-2-2のレーン1および2は、ジチオスレイトールとFeSO₄存在下でのエルサミシンAによる強いDNA切断活性を示している。薬物濃度15 μMで4 min反応させるとプラスミドのほとんどはForm IIIに変換され、薬物濃度30 μMではDNAはフラグメンテーションしている。還元剤の種類を変化させたところ、アスコルビン酸>ジチオスレイトール>2-メルカプトエタノール>NaBH₄>NADPH=Na₂S₂O₄の順に活性は低下した。補因子の金属は二価の鉄イオンがもっとも効果的で、Cu(II)、Co(II)などの他の金属は有意な効果を示さなかった。

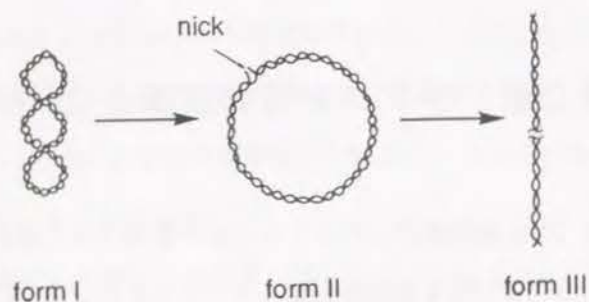


Figure 2-2-1 Cleavage of plasmid DNA. Changes among forms I-III represent extent of cleavage.



Figure 2-2-2 Agarose (1 %) gel electrophoretic patterns of ethidium bromide-stained pBR322 DNA after treatment with elsamicin A (lanes 5 and 6), *N*-acetyl elsamicin A (lanes 3 and 4), and chartreusin (lanes 1 and 2). The samples contained 0.8 μg of pBR322 DNA, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), ferrous sulfate (the equivalent concentrations to those of drugs), and the following additions: chartreusin (lane 1, 30 μM and lane 2, 15 μM), *N*-acetyl elsamicin A (lane 3, 30 μM and lane 4, 15 μM), and elsamicin A (lane 5, 30 μM and lane 6, 15 μM). Lanes 7 and 8 show controls with ferrous sulfate (30 μM and 15 μM , respectively) in the absence of drugs; and lane 9 presents intact DNA alone. The reactions mixtures were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 4 min in the presence of dithiothreitol (1 mM).

以上の実験によって、筆者は腫瘍細胞でのエルサミシンAによるDNA切断を *in vitro* で再現することに成功した。生体内に存在する鉄イオンや還元剤を利用してエルサミシンAはDNAを切断していると考えられる。

2 切断の塩基配列特異性

切断の塩基配列特異性は5'-末端または3'-末端が ^{32}P 標識されたDNAフラグメントを用いて調べられた。二価の鉄イオンとジチオスレイトールの存在下でエルサミシンAによって切断した後、切断されたフラグメントをポリアクリルアミド電気泳動によって解析した。Figure 2-2-3は得られたオートラジオグラムをデンストメーターで定量したものである。切断部位はマキサム-ギルバート法によって同定した¹¹。明らかに、二価の鉄イオンとジチオスレイトールの存在下でエルサミシンAはグアニンの3'側に隣接するヌクレオチドを切断していることが分かる。切断の強度はグアニンの3'側に隣接する塩基に依存しており、5'-GG領域が最も強く切断されている。

3 エルサミシンAのpoly[d(G-C)]₂に対する結合

エルサミシンAは267 nmの光で励起すると465 nm付近に蛍光を発する¹⁰。この蛍光を利用して、DNAとの結合を評価することができる。poly[d(G-C)]₂をエルサミシンAの溶液に加えると蛍光スペクトルは変化し、最大蛍光波長は長波長側にシフトする(Figure 2-2-4)。465 nmの蛍光強度の変化によって結合定数を評価すると、およそ $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であった。poly[d(A-T)]₂を用いたところpoly[d(G-C)]₂で見られたような最大蛍光波長の変化は見られず、エルサミシンAがグアニン塩基を認識してDNA鎖を切断していることがわかる。



Figure 2-2-3 Histogram showing DNA-cleavage sites by elsamicin A. The heights of the bars represent the relative cleavage intensities at the indicated bases.

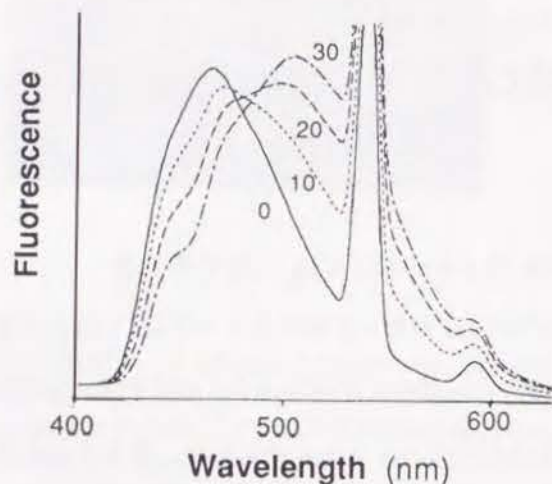


Figure 2-2-4 Effect of poly[d(G-C)]₂ on the fluorescence spectrum of elsamicin A. Poly[d(G-C)]₂ was added to a solution of 5 μM elsamicin A at pH 8.3. Concentrations of poly[d(G-C)]₂ were 0, 10, 20, and 30 μM (bp). Excitation was at 267 nm.

第三節 DNA 鎖を切断する真の攻撃種

エルサミシンA は二価の鉄イオンと還元剤の存在下で グアニンの 3' 側に隣接するヌクレオチドを特異的に切断する。第三節で筆者が追究するのは、DNA を切断する真の攻撃種である。「なぜエルサミシンA は二価の鉄イオンと還元剤の存在下で DNA 鎖を切断できるのか」という疑問に答える¹²。

1 DNA 切断に必要な最小構造

エルサミシンA, そしてその糖鎖類縁体であるチャートルシン, 糖鎖を欠くチャータリン (Figure 2-3-1) はいずれも, 二価の鉄と還元剤の存在下で DNA を切断した。それぞれの DNA 切断活性をプラスミド pBR322 DNA を基質として比較したところ, エルサミシンA ≧チャートルシン>チャータリンの順に低下した (Figure 2-2-2 参照)。チャータリンは特に DNA 切断活性が乏しかったが (エルサミシンA と比較して約 1/5), これは水に対する溶解度が低いためと考えられる。DNA 切断活性に差が見られるものの三つの分子すべてに DNA 切断活性があるので, 共通するアグリコン部位が DNA 切断に直接関与していると考えられる。

2 C6 位フェノールの解離

まずエルサミシンA の C6 位に存在するフェノール基の解離状態を調べた。エルサミシンA の水溶液を塩酸で滴定したところ, 弱酸に特有の滴定曲線が得られた (Figure 2-3-2A)。半等量点の pH を読むことで pKa は 6.3 と評価された。さらにエルサミシンA の可視吸収スペクトルを pH を 7.2, 6.0, 5.0 に変化させて計測したところ, 等吸収点を 431 nm に持つ明らかな二状態遷移を示し, pKa と一致した (Figure

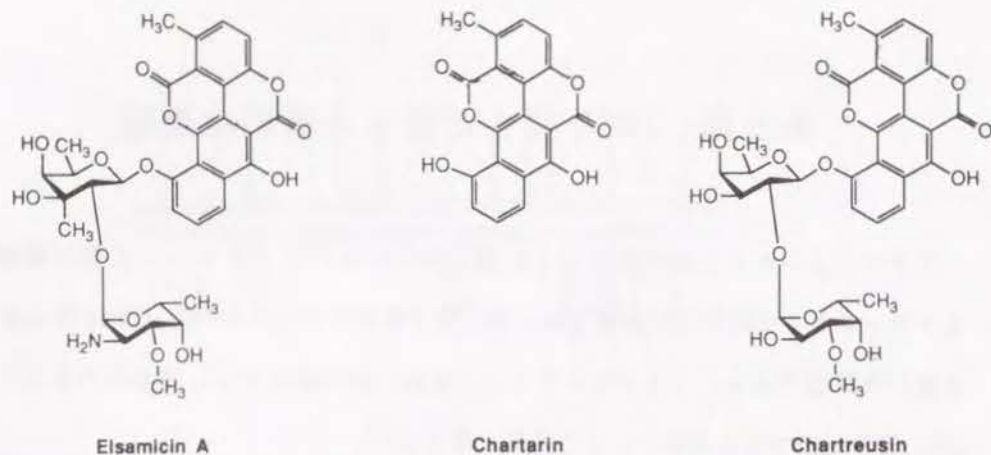


Figure 2-3-1 Chemical structures of elsamicin A, chartarin, and chartreusin.

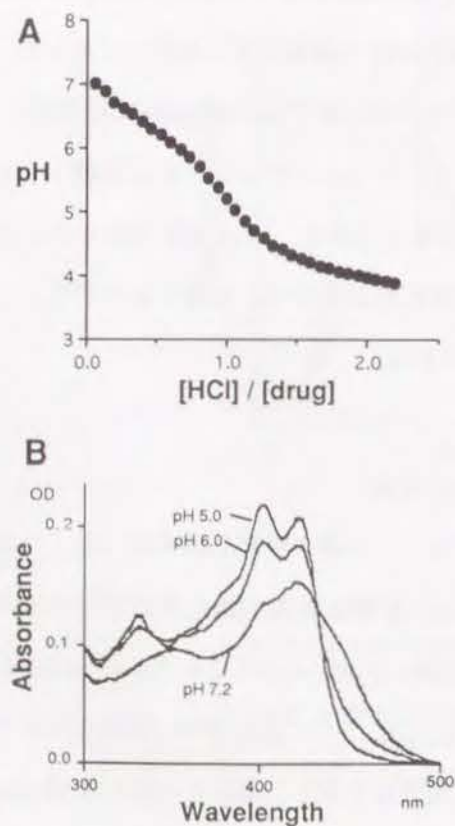


Figure 2-3-2 (A) Titration of elsamicin (100 μ M) with HCl. (B) Visible absorption spectra of elsamicin at pH 5, 6, and 7.2. Samples contained 40 μ M elsamicin and 10 mM sodium cacodylate buffer.

2-3-2B)。その二つの基底状態を確認するために、重水中で pD 7.7 から 6.0 に変化させながら ^1H NMR (核磁気共鳴) スペクトルを測定した。帰属を TOCSY, DQF-COSY および NOESY によって行ったところ、アグリコン部位に存在するプロトンの化学シフトのみが pD の変化によって大きく変化しており (Figure 2-3-3), フェノールの解離に一致する。以上の結果から、エルサミシンA は pH 7 以上の生理的 pH においてフェノレートとして存在していると考えられる。

3 エルサミシンA -鉄(II) 錯体と酸素活性化

エルサミシンA は二価の鉄イオンと錯体を形成し、二価の鉄錯体が三価の鉄錯体に酸化される際に酸素を活性化することが十分予想される。ヒドロキシルラジカルのような活性酸素種は DNA のデオキシリボース骨格から水素原子を引き抜いて DNA 鎖を切断することが知られているからである。もしも C6 位のフェノレートアニオンが鉄錯体形成に関与するのであれば、エルサミシンA は低い pH では鉄錯体を形成できないはずである。この点を調べるために、pH 7.2 と pH 5.0 で鉄 (III) 錯体の ESR (電子スピン共鳴) スペクトルの測定を行った。pH 7.2 では、 $g = 4.3$ の高スピン鉄 (III) 錯体が検出され、エルサミシンA が pH 7.2 で鉄錯体を形成することが確認された (Figure 2-3-4)。一方 pH 5.0 では ESR シグナルは観測されず、エルサミシンA は pH 5.0 で鉄錯体を形成できないことが解かった。

さらに、*N-tert-butyl- α -phenylnitron*e を用いてスピン補足実験を行ったところ、Figure 2-3-5 に示すように pH 7.2 では *N-tert-butyl- α -phenylnitron*e のスピン付加体が観測された (triplet of doublet, $g = 2.0057$ and $d^N = 15.3$ G)。このことは pH 7.2 および還元剤の存在下でエルサミシン - 鉄 (II) 錯体が酸素を活性化してヒドロキシルラジカルを生成していることを示している。予想されるように、錯体を形成できない pH 5.0 ではスピニアダクトは検出されなかった (Figure 2-3-5)。

以上の ESR 実験の結果から考えると、低い pH ではエルサミシンA は DNA 切断

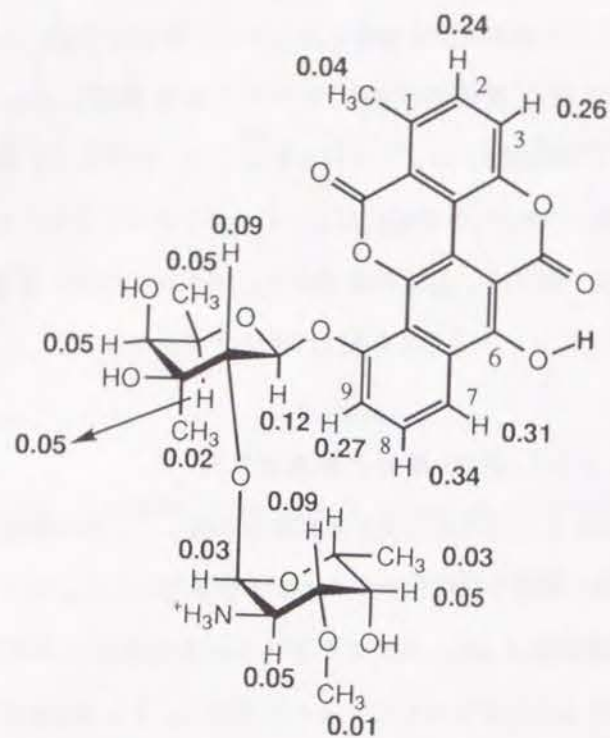


Figure 2-3-3 Schematic representation of the chemical shift changes in ^1H NMR induced by varying pD (pD 7.7 \rightarrow 6.0). Positive numbers indicate downfield shifts upon decreasing pD.

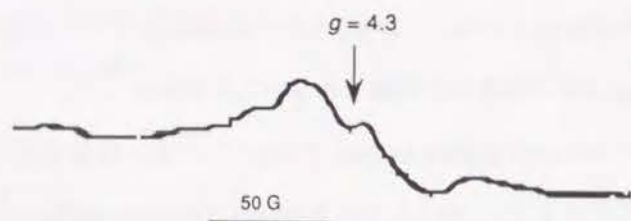


Figure 2-3-4 ESR spectrum of the elsamicin-Fe(III) complex at pH 7.2.

活性も乏しいはずである。実際、プラスミド pBR322 DNA を用いて DNA 切断能を評価すると、pH 7.2 > 6.0 > 5.0 の順に DNA 切断能は減少した (Figure 2-3-6)。これらの実験事実は、C6 位のフェノレートアニオンが鉄錯体形成に関与し、結果的には酸素活性化と DNA 切断反応にも関係していることを示している。

エルサミシン A は約 420 nm 付近に可視吸収帯を持つので¹⁰、エルサミシン - 金属錯体の組成を吸収滴定によって評価できる。ところが鉄 (II) イオンとの滴定は定量的にはできなかった。なぜなら鉄 (II) イオンは素早く鉄 (III) イオンに酸化し、その鉄 (III) イオンがオール化してコロイド状になるからである。そのため吸収を利用した実験では鉄 (II) の代用としてコバルト (II) を用いた。コバルト錯体は配位における性質の類似から、鉄錯体の構造モデルとして一般に受け入れられているからである^{13,14}。(事実、エルサミシン - 鉄 (II) 錯体による DNA 切断をコバルト (II) は阻害する) Figure 2-3-7 は硝酸コバルトによるエルサミシン A の吸収滴定を示している。滴定率 0~1.0 において等吸収点が 420 nm と 480 nm に見られ、滴定率が 1.0 を越えると 450 nm 付近の吸収スペクトルに変化が観測されなくなっている。このことは 1 : 1 のコバルト (II) 錯体が生成していることを示唆している。

以上の実験事実から、エルサミシン - 鉄 (II) 錯体の配位様式と DNA 切断作用について以下のように推測することができる。エルサミシン - 鉄 (II) 錯体の配位様式については Scheme 2-3-1 に示すように、C6 位フェノレートアニオンの酸素と隣接するカルボニル基の酸素が鉄 (II) イオンに配位し 1 : 1 錯体を形成していると考えられる。二座配位子としてのエルサミシン A はかさ高いので、エルサミシン A は一分子しか配位できないのであろう。さらに還元剤が存在すると、この高スピン鉄錯体は触媒的にヒドロキシルラジカルを発生して DNA 鎖を切断していると考えられる (Scheme 2-3-1)。つまり DNA 切断の真の攻撃種はこの鉄錯体から発生するヒドロキシルラジカルであろう。Figure 2-3-5 で検出された *N*-tert-butyl- α -phenylnitron のスピン付加体の量から判断して、エルサミシン - 鉄 (II) 錯体の酸素活性化能力は大きなも

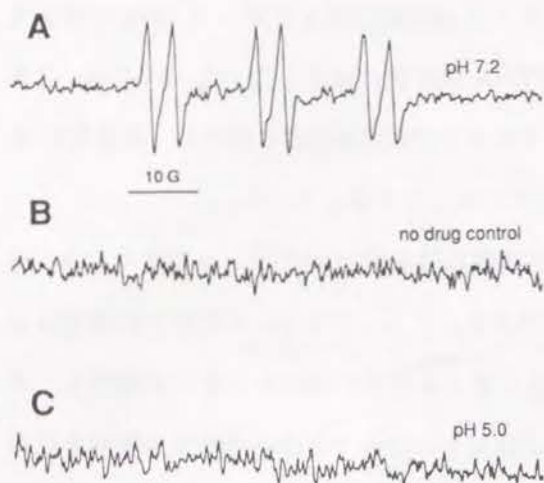


Figure 2-3-5 (A) ESR spectrum of a spin adduct of *N*-*tert*-butyl- α -phenylnitron. Conditions: 1 mM elsamicin, 0.2 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2), 10 mM FeSO₄, 10 mM dithiothreitol, and 0.1 M *N*-*tert*-butyl- α -phenylnitron, 25 °C. (B) no drug control (C) pH 5.0.

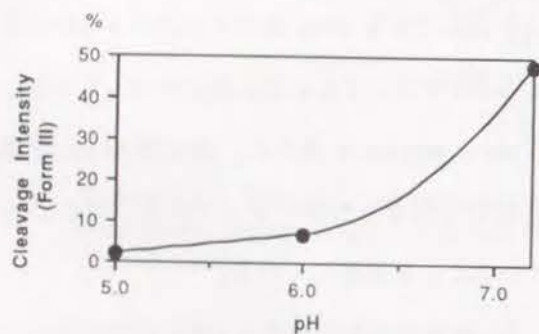


Figure 2-3-6 Effect of varying pH on DNA cleavage efficiency of the elsamicin plus Fe(II) system.

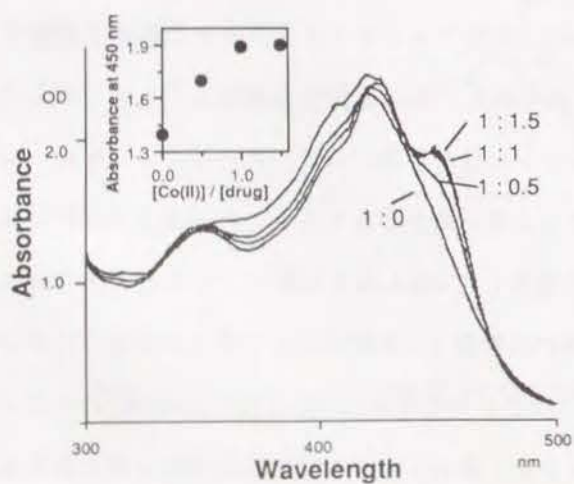
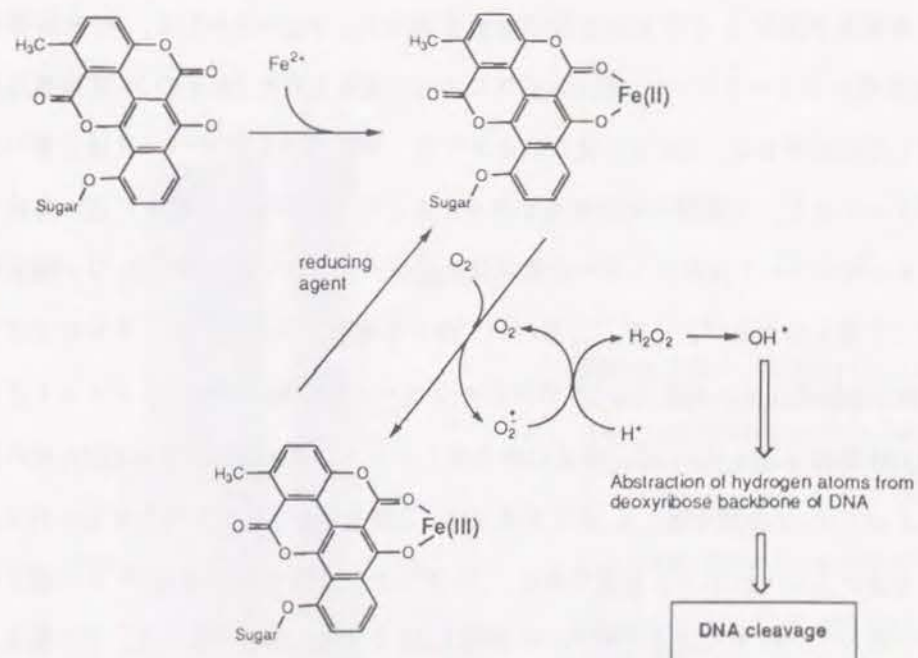


Figure 2-3-7 Visible absorption spectral changes of elsamicin (250 μ M) on titration with Co(NO₃)₂ at pH 7.2. In the insert, saturation at 450 nm is shown for the titration.

のではない。しかし、エルサミシン - 鉄(II) 錯体が DNA に結合することで DNA 近傍でのヒドロキシルラジカル濃度は高くなり、DNA を切断することができるのだと考えられる。

Scheme 2-3-1



第四節 DNA 鎖切断のメカニズム

エルサミシンAは二価の鉄イオンと錯体を形成し、二価の鉄錯体が三価の鉄錯体に酸化される際に酸素を活性化していると考えられる。事実、pH 7.2 および還元剤の存在下でエルサミシン-鉄(II)錯体が酸素を活性化してヒドロキシルラジカルを生成することを前節で示した。では発生したヒドロキシルラジカルはいかにしてDNA鎖を切断するのか。第四節ではこの疑問を解く¹⁵。

1 DNA 切断末端の解析

切断されたDNAフラグメントの末端構造を明らかにすれば、DNA鎖切断のメカニズムを解明する上での有用な手掛かりとなる。筆者は高分解能ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって末端構造の解析を試みた。Figure 2-4-1は、5'-末端標識DNAを用いてエルサミシン-鉄(II)錯体によって切断されたDNAの3'-末端構造を検討したものである。lane 3に見られるように、切断箇所を示すバンドは二重バンドになっており、二種類の末端構造が存在することが解かる。泳動度の遅い方はマキサム-ギルバート法のマーカーと電気泳動度が一致しているので、3'-リン酸末端を持つと考えられる¹¹。一方、二重バンドのうち泳動度の速い方は、プレオマイシン-鉄(II)錯体によって生じる3'-ホスホグリコール酸末端を持つフラグメントと同じ電気泳動度を示している⁹。ゆえにエルサミシン-鉄(II)錯体によるDNA鎖の切断によって3'-リン酸末端と3'-ホスホグリコール酸末端が生じていると考えられる。デンストメトリーによって定量すると、3'-グリコール酸末端の量は3'-リン酸と同程度であった。5'-末端構造の解析は3'-標識DNAを用いて同様に行った。その結果、切断バンドはすべてマキサム-ギルバート法のマーカーと電気泳動度が一致してお



Figure 2-4-1 Analysis of 3'-termini on a 15% DNA sequencing gel. The pBR322 DNA restriction fragments labeled at the 5'-terminus were incubated with 15 μ M Fe(II)-elsamicin A (lane 3), or 1 μ M Fe(II)-bleomycin (lane 4). Lanes 1 and 2 show the Maxam-Gilbert C+T and G+A ladders, respectively.



Figure 2-4-2 Analysis of 3'-termini on a 15% DNA sequencing gel. The pBR322 DNA restriction fragments labeled at 5'-end were incubated with 15 μ M Fe(II)-elsamicin A (lane 4), 15 μ M Fe(II)-elsamicin A followed by T4 polynucleotide kinase (lane 5), or DNase I (lane 6). Lanes 1-3 shows intact DNA alone, the Maxam-Gilbert C+T, and G+A reactions, respectively.

り、5'-末端はすべて5'-リン酸末端であると考えられる。

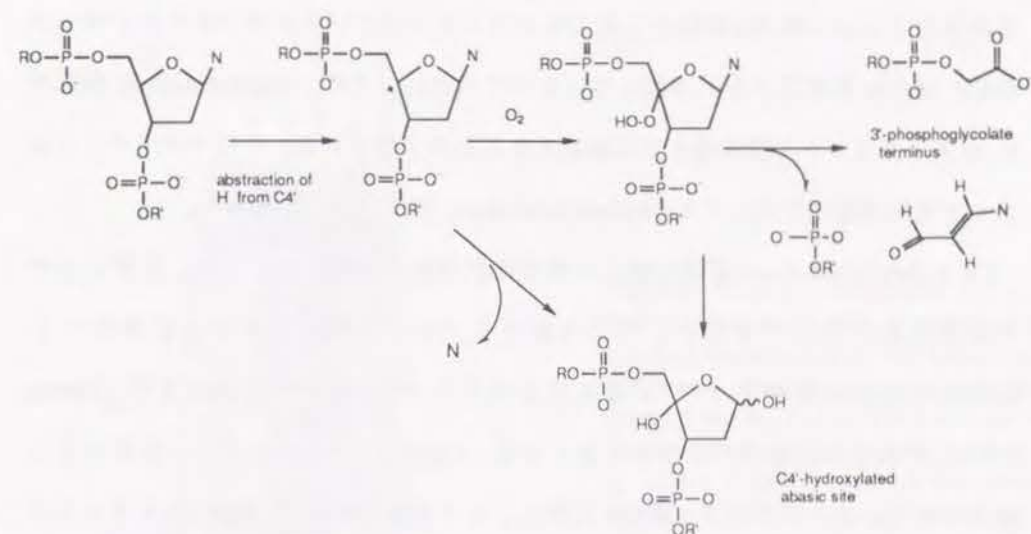
次に5'と3'-末端に存在すると思われるリン酸基の確認を行った。3'-末端に存在するリン酸基はT4ポリヌクレオチドキナーゼ処理によって確認できる。T4ポリヌクレオチドキナーゼは低いpHで3'-脱リン酸活性を持つことが知られており¹⁶、これを利用する。Figure 2-4-2のlane 4と5を比較すると、T4ポリヌクレオチドキナーゼ処理によって二重バンドの一方のバンドが消えて新しいバンドが約0.5塩基分上流に現われていることが分かる。消えたバンドはマキサム-ギルバート法のマーカーと電気泳動度が一致していたバンドであり、新しく現われたバンドはDNase Iによって切断されたもの(lane 6)と泳動度が同じである。DNase Iは3'-水酸基末端を産生することが知られているので、この実験結果は3'-末端に存在していたリン酸基がT4ポリヌクレオチドキナーゼ処理によって取り除かれたことを示している。また、3'-ホスホグリコール酸末端を持つと思われる速い泳動度のバンドは、予想どおり、T4ポリヌクレオチドキナーゼ処理によって変化を受けなかった。

5'-末端に存在するリン酸基はバクテリアアルカリ性ホスファターゼ処理によって同様に確認できる。バクテリアアルカリ性ホスファターゼ処理されると、電気泳動度が0.5塩基分だけ遅くなり、5'-水酸基末端をもつマイクロコッカリヌクレアーゼによるDNA断片と移動度が一致した。この実験結果は5'-末端に存在していたリン酸基がバクテリアアルカリ性ホスファターゼ処理によって取り除かれたことを示しており、5'-末端にリン酸基が存在していることを証明している。

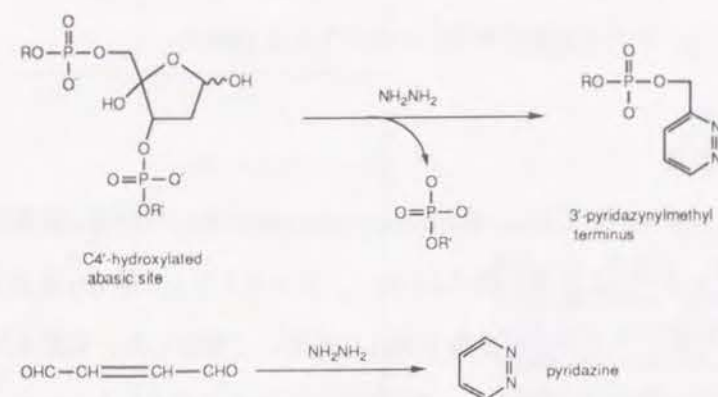
2 C4'-hydroxylated abasic 部位の検出

3'-ホスホグリコール酸末端はラジカルによってC4'の水素原子が引き抜かれた場合に生じる切断末端としてよく知られている。デオキシリボースのC4'位からの水素原子引き抜きは、ブレオマイシン-鉄(II)錯体^{9,17-19}やネオカルチノスタチン²⁰などに見られ、いずれの場合もC4'-hydroxylated abasic部位の生成を伴うことが知

Scheme 2-4-1



Scheme 2-4-2



られている²⁰⁻²²。C4'位の水素原子引き抜きから3'-ホスホグリコール酸末端およびC4'-hydroxylated abasic部位の生成に至る反応経路をScheme 2-4-1に示した。もしもエルサミシン-鉄(II)錯体から生じるヒドロキシルラジカルがデオキシリボースのC4'位から水素原子を引き抜いているのであれば、C4'-hydroxylated abasic部位が3'-ホスホグリコール酸末端と共に生成することが予想される。そこでポリアクリルアミド電気泳動法を用いてC4'-hydroxylated abasic部位の検出を試みた。

C4'-hydroxylated abasic部位は糖リン酸骨格が切断されていないため、直接にはゲル電気泳動で検出できない。ところがヒドラジンと反応させると定量的に3'-pyridazinylmethyl末端と5'-リン酸末端を生じてDNA鎖の切断が起き²²(Scheme 2-4-2)、ゲル電気泳動での検出が可能となる。Figure 2-4-3がヒドラジン処理による結果である。エルサミシン-鉄(II)錯体によって切断された5'-標識DNAをヒドラジンで処理すると、3'-リン酸末端のバンドよりも遅く泳動する新たなバンドが生じる(lane 4)。このバンドは3'-pyridazinylmethyl末端をもつフラグメントと考えられる。なぜなら、ブレオマイシン-鉄(II)錯体によって切断されたDNAをヒドラジン処理して得られる新たなバンドと泳動度が同じだからである(lane 6)。

3 遊離塩基の生成

Scheme 2-4-1から明らかなように、C4'-hydroxylated abasic部位の生成は遊離塩基の生成を伴うはずである²²。この点を調べるために、エルサミシン-鉄(II)錯体によってpoly[d(G-C)]₂を切断し、その切断産物をHPLCを用いて解析した。切断産物を逆相カラムを装備したHPLCに直接注入し紫外線吸収によって検出したところ、リテンション時間3.0 minにシトシンが溶出した。グアニンはほとんど検出されず、グアノシンの3'側のヌクレオチドに選択的であることと一致する。紫外線吸収から生成したシトシンを定量すると、エルサミシン-鉄(II)錯体の濃度と良い相関関係を示した(Figure 2-4-4)。



Figure 2-4-3 Detection of C-4' hydroxylated abasic sites. A portion of the standard reaction mixture was treated with hydrazine prior to gel electrophoresis (lanes 4 and 6). Lanes 3 and 4 show the reaction sample treated by Fe(II)-elsamycin A. Lanes 5 and 6 indicate the sample treated by Fe(II)-bleomycin. Lanes 1 and 2 show C+T and G+A ladders. The pyridazine derivatives of C-4' hydroxylated products migrate slower than the corresponding phosphate products.

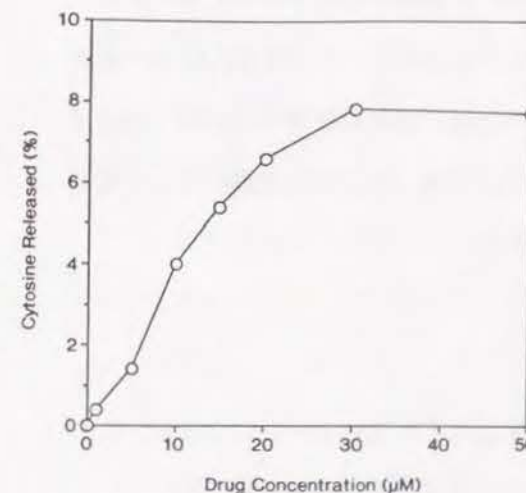


Figure 2-4-4 Production of free cytosine. Three nmol (bp) of poly[d(G-C)]₂ were treated with various concentrations of Fe(II)-elsamycin A at 37 °C for 30 min. Each reaction mixture was analyzed by HPLC equipped with μBondapak C₁₈ column, and the amount of cytosine was determined by UV-absorption.

4 C4' 位の水素原子引き抜き

以上の実験で同定した DNA 切断産物をまとめると、5' および 3'-リン酸末端、3'-ホスホグリコール酸末端、C4'-hydroxylated abasic 部位、遊離塩基となる。3'-リン酸末端以外のすべての産物は、C4' からの水素原子引き抜きに始まる一連の反応経路に組み込むことができる (Scheme 2-4-3)。まず還元剤の存在下でエルサミン - 鉄(II) 錯体が酸素を活性化してヒドロキシルラジカルを生成すると、このラジカルは DNA のデオキシリボースの C4' から水素原子を引き抜くと考えられる。この水素引き抜きによって、デオキシリボースの C4' 位に炭素ラジカルが発生する。ここに酸素分子が反応するとベルオキシド体となり、Criegee-type の転位反応によって 3'-ホスホグリコール酸末端が生成すると考えられる⁹。一方、炭素ラジカルが水酸化された場合は、遊離塩基を伴って C4'-hydroxylated abasic 部位が生成する。

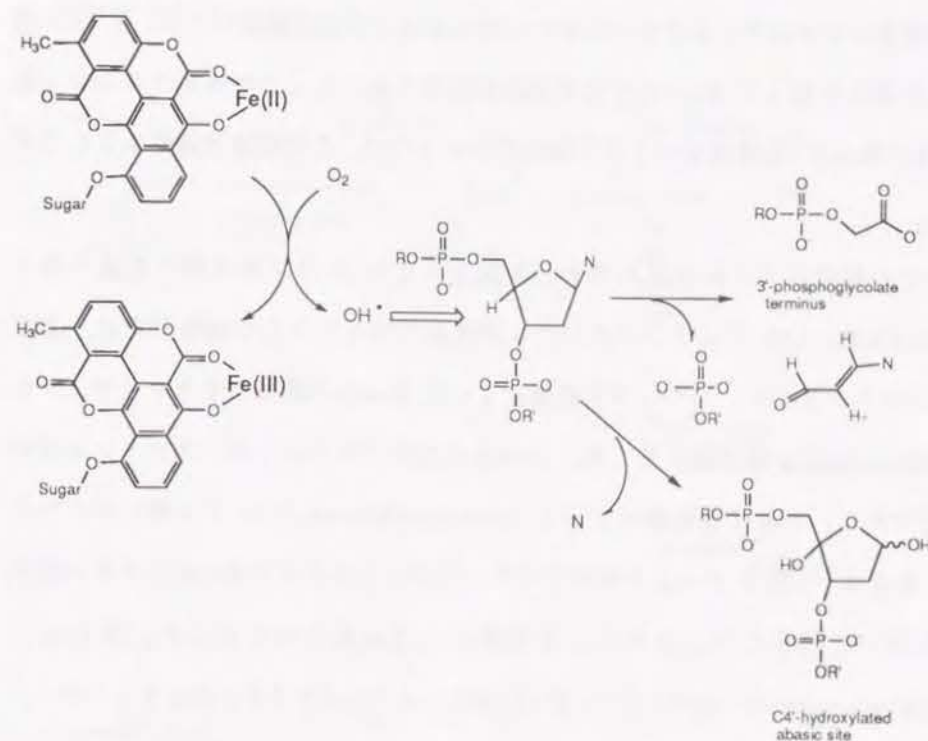
反応経路における酸素分子の関与を確認するために、酸素をバブリングさせて切断反応を行い、3'-ホスホグリコール酸末端と C4'-hydroxylated abasic 部位の生成比を求めた。(C4'-hydroxylated abasic 部位の定量は、定量的なヒドラジン処理によって生じる 3'-pyridazinylmethyl 末端を定量することでなされた) その結果、3'-ホスホグリコール酸末端と C4'-hydroxylated abasic 部位の比は、通常の状態では 40.5 : 59.5 であるのに対し、酸素バブリング中では 47.9 : 52.1 であった。この実験によって切断産物の分布における酸素分子の関与が支持された。

5 3'-リン酸末端に対する考察

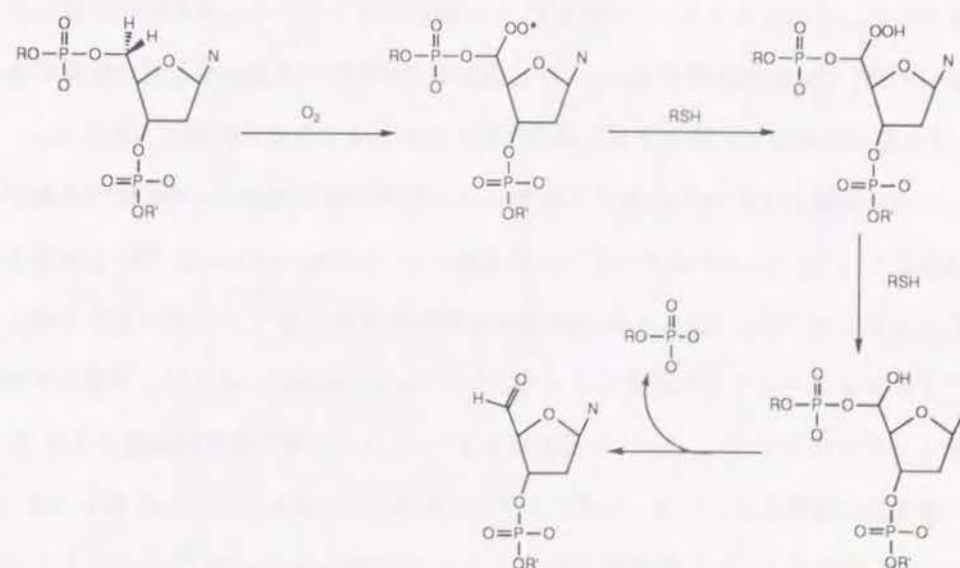
上に述べた Scheme 2-4-3 には 3'-リン酸末端は含まれていない。ここでは、この 3'-リン酸末端がどの水素原子引き抜きによって生じているのかを考察したい。

3'-リン酸末端を生成する経路として、これまでにいくつかの経路が知られている。一つは C5' 位の水素引き抜きによる 3'-リン酸末端の生成である (Scheme 2-4-4)。制

Scheme 2-4-3



Scheme 2-4-4

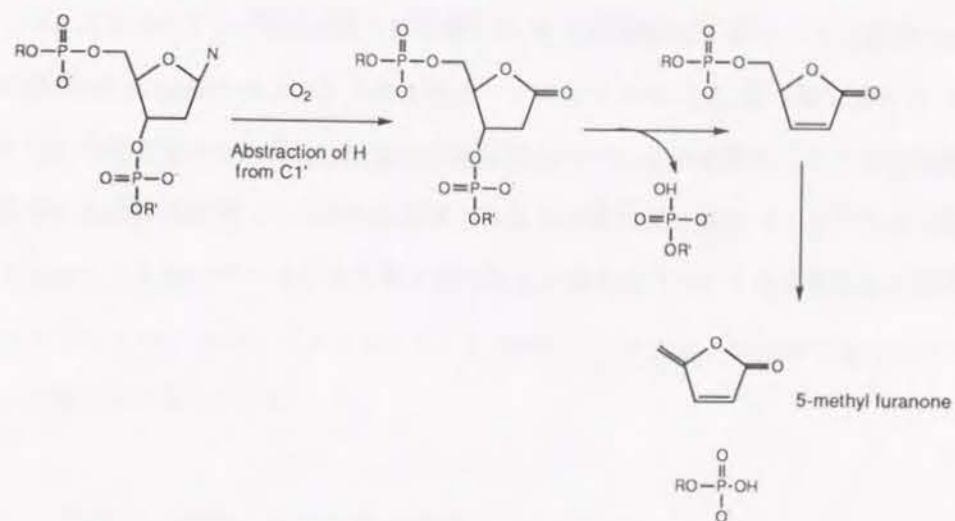


癌抗生物質ネオカルチノスタチンにおいて知られるこの反応経路²³では、3'-リン酸末端の生成に付随して5'-アルデヒド末端が生成する。ところがエルサミシン-鉄(II)錯体の場合5'-末端はすべてリン酸基であったので、この経路は除外することができる。

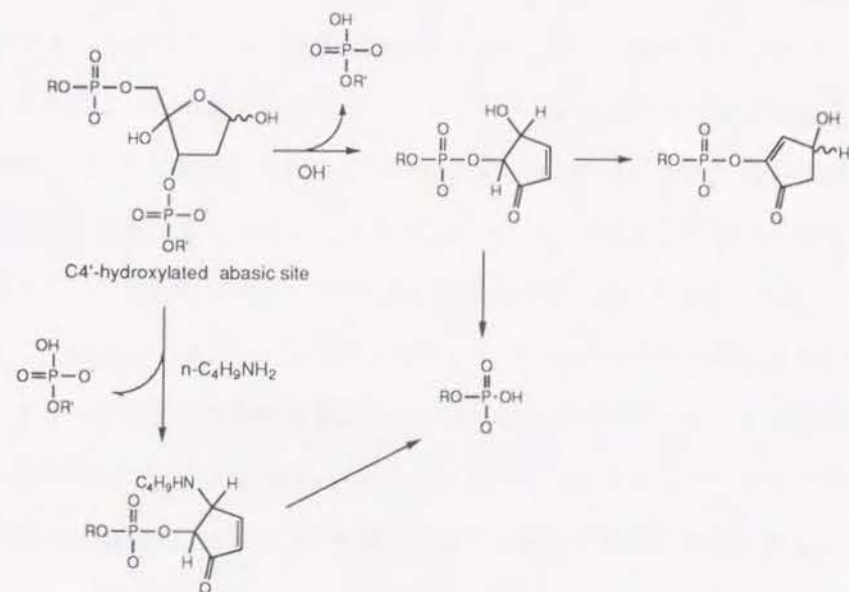
二つめの経路はC1'位の水素原子引き抜きによる3'-リン酸末端の生成である(Scheme 2-4-5)。1,10-フェナンスロリン-銅錯体で知られるこの経路²⁴では、まずC1'位がケトンとなり、つづいてβ脱離によって3'-α,β不飽和デオキシリボノラクトン末端と5'-リン酸末端を生じる。3'-α,β不飽和デオキシリボノラクトン末端は不安定であり、さらにβ脱離によって5-methylenefuranoneと3'-リン酸末端が生成する。筆者は不安定な3'-α,β不飽和デオキシリボノラクトン末端の検出をゲル電気泳動を用いて試みたが、それらしき切断バンドは見られなかった。さらに、5-methylenefuranoneがエルサミシン-鉄(II)錯体により生成するかを確認するために、poly[d(G-C)]₂とエルサミシン-鉄(II)錯体の反応産物をGC/MSで分析した。しかし、化学合成した5-methylenefuranoneと同じようなマススペクトルを示すものは検出されなかった。このように3'-リン酸と5'-リン酸が生成すること以外の証拠は得られなかったが、C1'位の水素はDNAヘリックス中でC4'位の水素に最も近い位置にあり、C1'位の水素がC4'位の水素と同様に引き抜かれることは十分考えられる。

三つめの経路はC4'位の水素引き抜きによる経路の延長である。C4'位の水素引き抜きによって、3'-ホスホグリコール酸末端とC4'-hydroxylated abasic部位が生成することは先に述べた。C4'-hydroxylated abasic部位は塩基存在下で一連の反応を起こすことがプレオマイシンの研究によって知られている(Scheme 2-4-6)²¹。少量の水酸化ナトリウム存在下では、3'-リン酸末端と3'-シクロペンテン誘導体末端および5'-リン酸末端に分解する。一方、*n*-ブチルアミンなどのアルキルアミンの存在下では、3'-リン酸末端と5'-リン酸末端が生成することが知られている²¹。このようにC4'-hydroxylated abasic部位は塩基が存在するときのみ分解するが、エルサミシン-

Scheme 2-4-5



Scheme 2-4-6



鉄(II)錯体によるDNA鎖切断においては、幾分かのC4'-hydroxylated abasic部位が何らかの影響によって3'-リン酸末端と5'-リン酸末端に分解しているのかも知れない。

3'-リン酸末端の量は3'-ホスホグリコール酸末端とC4'-hydroxylated abasic部位の総量と比較すると少量なので、3'-リン酸末端の生成がC1'位からの水素引き抜きの結果であろうとC4'位からの水素引き抜きの結果であろうと、結局のところ水素原子引き抜きのほとんどはC4'位で起こっていると考えられる。

第五節 グアニン認識の起源

低分子によるDNAの塩基認識の起源やDNA相互作用の基本様式などが解明できれば、DNA-蛋白質といったDNAをとりまく複雑な系を理解する上で有用な知見を提供すると期待される。エルサミンAは二価の鉄イオンと還元剤の存在下でグアニンの3'側に隣接するヌクレオチドを特異的に切断する。第五節ではこのグアニン認識の起源を追究する^{10,12}。

1 グアニン認識に必要な最小構造

エルサミンA、そしてその糖鎖類縁体であるチャートルシン、糖鎖を欠くチャータリン(Figure 2-5-1)はいずれも、二価の鉄と還元剤の存在下でDNAを切断することを第三節で述べた。DNA切断の塩基配列特異性を調べるために、末端標識したDNA断片をエルサミンA、糖鎖類縁体チャートルシン、糖鎖を欠くチャータリンのそれぞれによって切断し、そのプロダクトをポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。その結果、これら三つの分子はすべてグアニンの3'側に隣接する塩基を特異的に切断することが示された(Figure 2-5-2)。ゆえに三つの分子すべてに共通するアグリコン部位がグアニンの認識に直接関与していると考えられる。

しかし、Figure 2-5-2のオートラジオグラムをデンストメーターで定量的に解析すると、チャータリンの特異性はエルサミンAおよびチャートルシンの特異性と若干異なっていること分かる(Figure 2-5-3)。エルサミンAおよびチャートルシンでは、DNA切断強度はグアニンの3'側に隣接する塩基の種類に影響される。つまり5'-GGステップが他の5'-GNステップに比べて強く切断されている。ところが糖鎖を欠くチャータリンでは3'側塩基による影響は比較的弱く、5'-GGステップにおけ

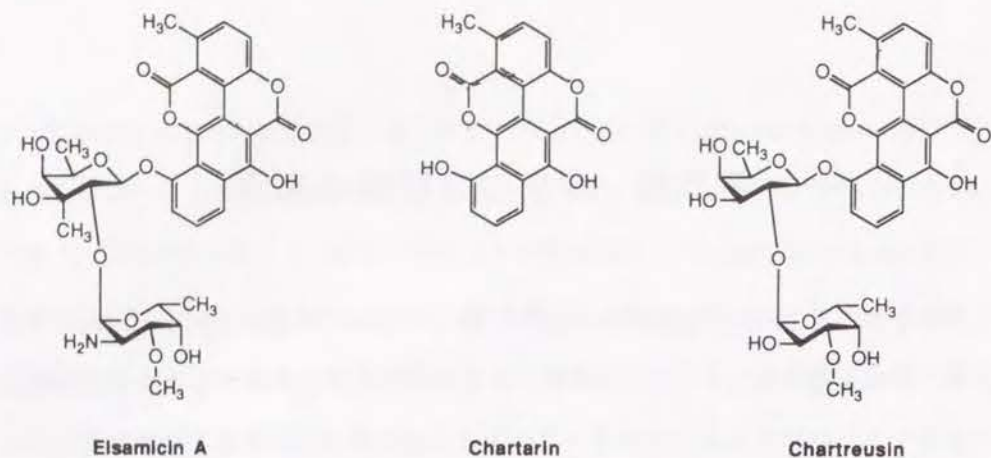


Figure 2-5-1 Chemical structures of elsamicin A, chartarin, and chartreusin.

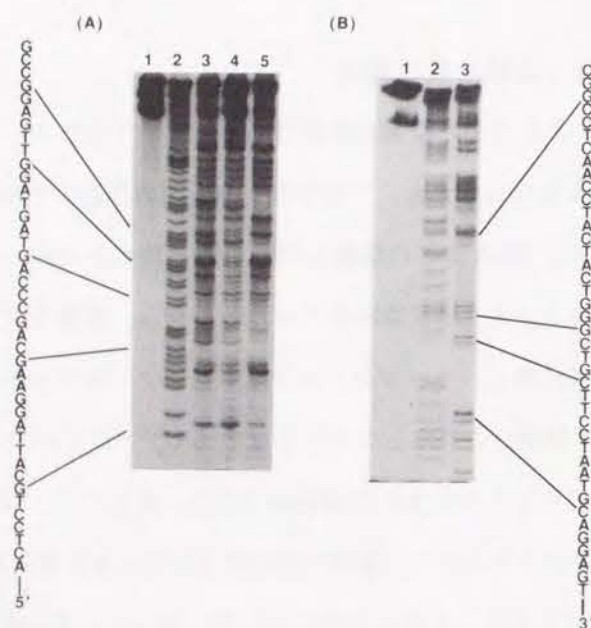


Figure 2-5-2 Autoradiograms of a 10% polyacrylamide/7 M urea slab gel electrophoresis for sequence analysis. (A) 5'-end-labeled pBR322 DNA (*SalI-DraII* fragment, 128-base pairs) was cleaved by elsamicin A (lane 3, 10 μ M), chartarin (lane 4, 20 μ M), and chartreusin (lane 5, 20 μ M) in the presence of ferrous sulfate (10 μ M for elsamicin A and 20 μ M for chartarin and chartreusin) and dithiothreitol (1 mM) at pH 7.5. The reaction mixtures containing each drug were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 5 min (lane 3), 20 min (lane 4), or 10 min (lane 5). (B) 3'-end-labeled DNA (the complementary strand of the same fragment) was cleaved by elsamicin A (lane 3, 10 μ M) in the same way. Lane 1 in (A) and (B) shows intact DNA, and lane 2 the Maxam-Gilbert sequencing for A+G.

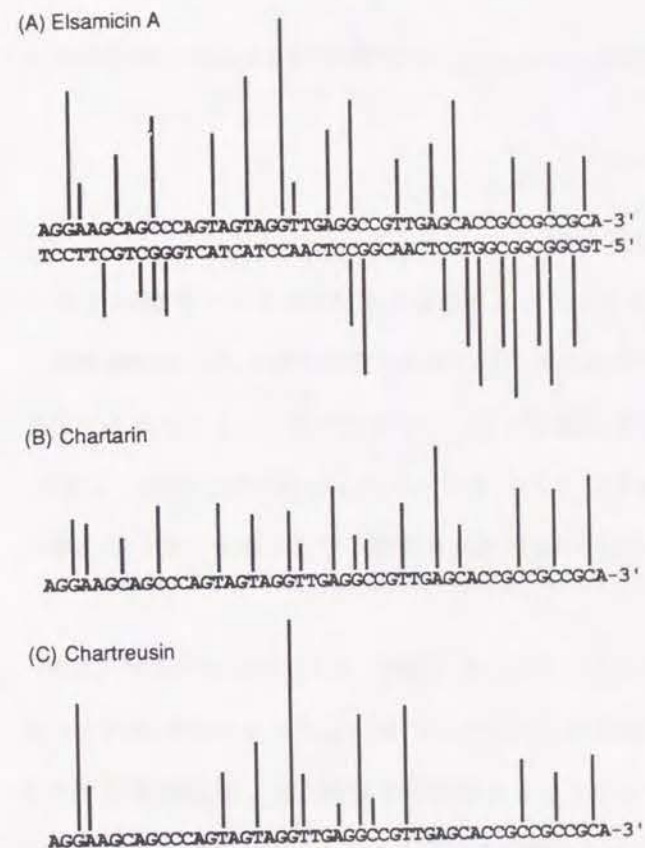


Figure 2-5-3 Histograms of DNA-cutting sites by elsamicin A (A), chartarin (B), and chartreusin (C). Relative DNA cleavage frequencies were obtained from densitometric scans of the gel autoradiograms shown in Figure 2-5-2. The heights of the bars represent the relative cleavage intensities at the indicated bases.

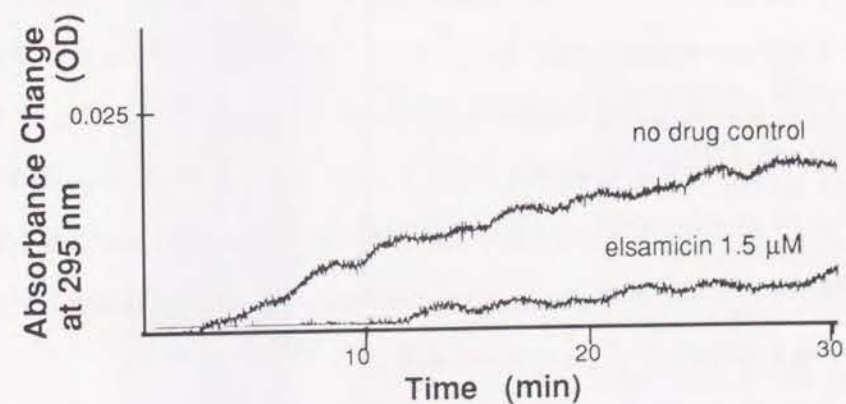


Figure 2-5-4 Inhibition of salt-induced B \rightarrow Z transition with elsamicin A. Samples contained 0.16 OD/mL poly-[d(GC)]₂, 2.5 M NaCl, and 1 mM sodium citrate buffer (pH 7.2). Changes of absorbance at 295 nm represent the extent of Z-form formation.

る強い切断もない。ゆえに、糖鎖部分はグアニンの3'側塩基と何らかの相互作用をしていると考えられる。

2 マイナーグループとの相互作用

エルサミシン-鉄(II)錯体はステム・ループ構造をもつ G4 ファージ DNA に対して一本鎖の部分は切断せず、二本鎖の部分だけを選択的に切断した。この結果は、エルサミシン-鉄(II)錯体が DNA に結合するためには二本鎖ヘリックス構造が必要であることを意味している。さらにエルサミシン A は poly[d(G-C)]₂ の塩による B-Z 変換を阻害し (Figure 2-5-4), B 型 DNA の構造を認識して強く結合していると考えられた。

DNA 二本鎖ヘリックスにはマイナーグループ (副溝) とメジャーグループ (主溝) がある。エルサミシン-鉄(II)錯体がこのどちらに結合しているのかを調べるために、各種修飾 DNA に対するエルサミシン A の作用を追究した。発癌物質アフラトキシン B₁ はクロロ過安息香酸によって酸化されるとグアニンの N7 位に共有結合することが知られている (Figure 2-5-5)²⁵。グアニンの N7 位をアフラトキシン B₁ によって修飾した後にエルサミシン-鉄(II)錯体によって切断したところ、切断パターンに影響はなかった (Figure 2-5-6)。また、シトシンの C5 位がグルコシル化させている T4 ファージ DNA に対する親和性を蛍光測定によって検討したところ、グルコシル化されていない変異体 T4dCDNA に対するものと非常に近かった (Figure 2-5-7)。グアニンの N7 位、シトシンの C5 位は共にワトソン-クリック型 DNA 二重らせんのメジャーグループにあるので (Figure 2-5-8), エルサミシン-鉄(II)錯体はメジャーグループとは相互作用していないと考えられる。

対照的に、DNA のマイナーグループに結合することが知られているディスタマイシン A (Figure 2-5-9) はエルサミシン-鉄(II)錯体による DNA 切断パターンに大きな影響を与えた (Figure 2-5-6)。この結果はエルサミシン-鉄(II)錯体が二重らせん DNA

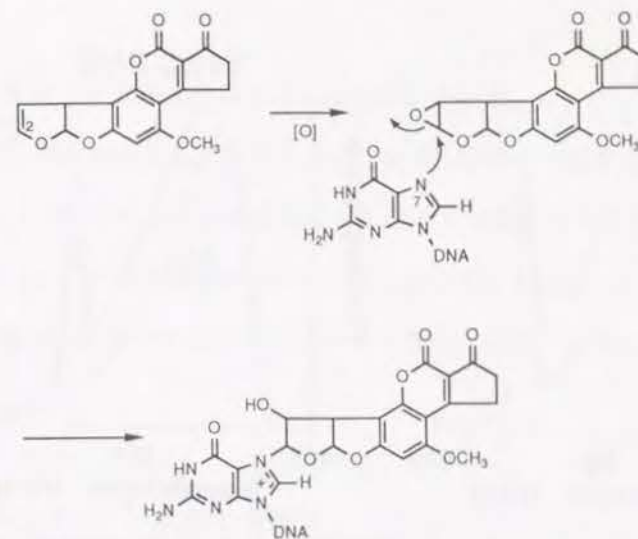


Figure 2-5-5 Reaction of aflatoxin B₁ with a guanine residue in DNA.

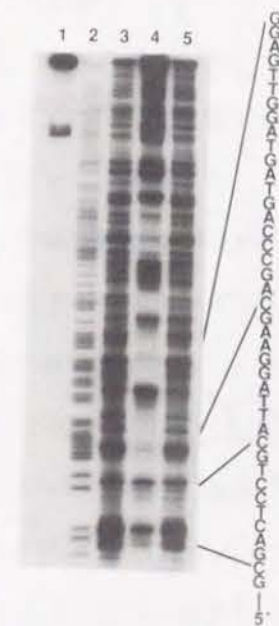


Figure 2-5-6 DNA-cleavage patterns of elsamicin A after pretreatment with distamycin A (lane 4) or aflatoxin B₁ (lane 5). After the pretreatment of the DNA fragment, the DNA-cleavage reactions were carried out with elsamicin A (15 μM) in the presence of dithiothreitol (1 mM) and ferrous sulfate (15 μM) at 37 °C for 5 min. Lanes 1-3 show intact DNA alone, the Maxam-Gilbert sequencing reaction for A+G, and elsamicin A-induced DNA cleavage for intact DNA, respectively.

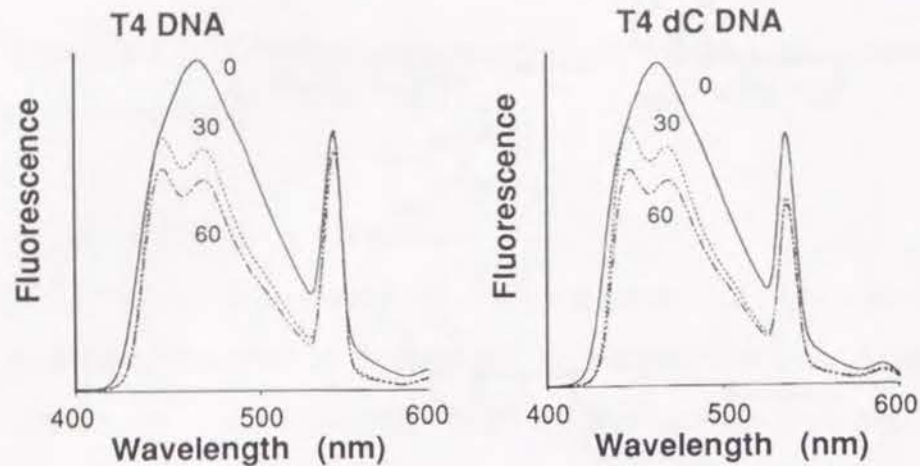


Figure 2-5-7 Effect of T4DNA and T4dCDNA on the fluorescence spectrum of elsamicin A. The DNAs were added to a solution of 5 μM elsamicin A at pH 8.3. Concentrations of DNA were 0, 30, and 60 μM (nucleotide). Excitation was at 267 nm.

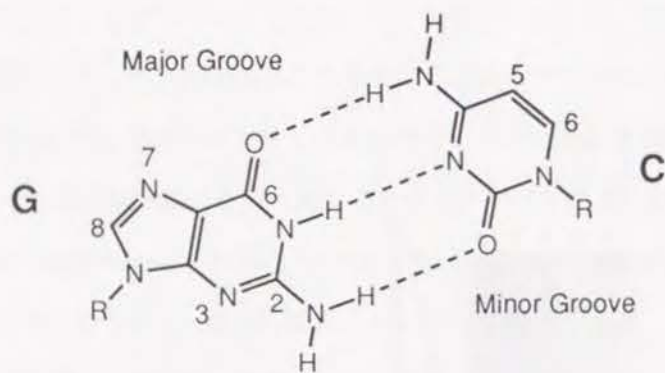


Figure 2-5-8 Structure of the Watson-Crick GC base pair.

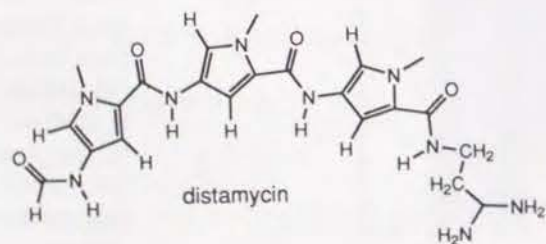


Figure 2-5-9 Chemical structure of distamycin A, a typical minor-groove binder.

のマイナーグループと相互作用しているを示している。

第四節で述べたように、エルサミシン - 鉄 (II) 錯体から発生するヒドロキシルラジカルは主にデオキシリボース骨格の C4' 位から水素原子を引き抜いて DNA 鎖を切断している。C4' 位の水素は DNA 二重らせんのマイナーグループ中にあり、エルサミシン - 鉄 (II) 錯体がマイナーグループと相互作用しているという見解とよく一致している。

3 グアニン 2 - アミノ基の重要性

上に述べたように、エルサミシン - 鉄 (II) 錯体はマイナーグループと相互作用していると考えられる。マイナーグループ中における GC 塩基対と AT 塩基対の違いは、GC 塩基対にはグアニンの 2 位アミノ基が存在することである (Figure 2-5-10)。ゆえに、グアニンの 2 位アミノ基がグアニン認識に重要であると予想される。もしこの考え方が正しいのであれば、DNA 中に存在する特定のグアノシンをイノシンに置換することによって、エルサミシン - 鉄 (II) 錯体はこの部分を認識しなくなるはずである。イノシンは塩基部分としてヒポキサンチンを含むヌクレオシドで、ヒポキサンチンはグアニンから 2 位アミノ基を取り去ったものである (Figure 2-5-10)。グアノシンをイノシンに置換することはマイナーグループの表面を変化させるが、メジャーグループは変化させない。

筆者は二つの 5'-GG ステップを含む DNA duplex 1 と、その二つの 5'-GG ステップのうち一方においてグアノシン (G) をイノシン (I) に置換したものを合成した。これらの 5'-GG, 5'-IG, 5'-GI, 5'-II の四種類の置換体 (duplex 1 ~ 4; Figure 2-5-11) を末端標識し、エルサミシン - 鉄 (II) 錯体による切断パターンをポリアクリルアミド電気泳動により解析した。Figure 2-5-12 がその結果である。lane 7 から明らかなように、エルサミシン - 鉄 (II) 錯体は duplex 1 中の二つの 5'-GG ステップを認識して G-9 と G-14 を強く切断している。切断バンドはすべて二重バンドになっており、第

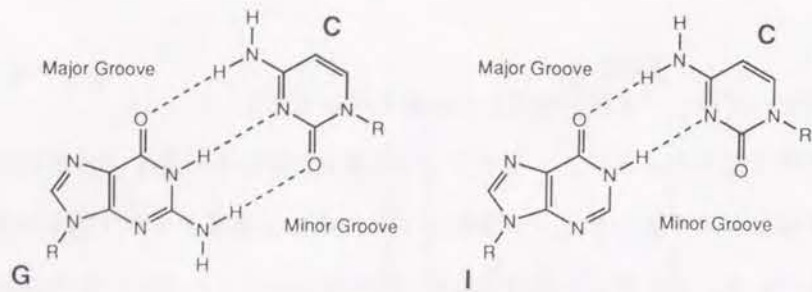


Figure 2-5-10 Comparison of the GC base pair with the IC base pair.

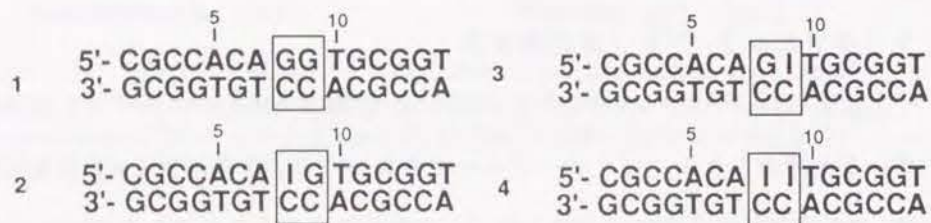


Figure 2-5-11 Sequences and numbering of DNA duplexes 1-4.

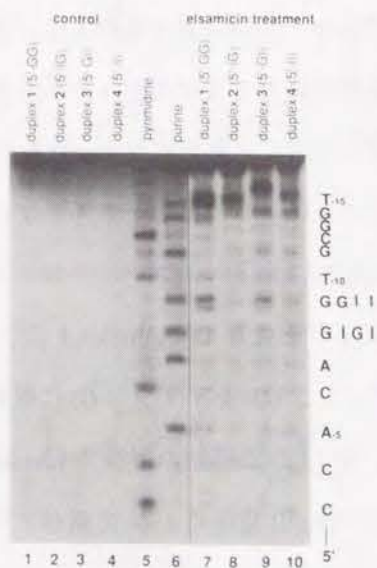


Figure 2-5-12 Comparison of strand breakage by the elsamicin-Fe(II) complex in oligonucleotide duplexes 1-4 (lanes 7-10). Each 5'-labeled duplex was treated with 5 μ M elsamicin in the presence of 5 μ M FeSO₄ and 1 mM dithiothreitol. Lanes 1-4 show intact duplexes 1-4. The Maxam-Gilbert markers (lanes 5 and 6) are for duplex 1.

四節で述べた 3'-リン酸末端と 3'-ホスホグリコール酸末端の生成と一致している。G-8 を I で置き換えた duplex 2 では (lane 8) G-9 での切断が見られなくなっている。このことは 5'-GG ステップの認識には 5'-G の 2 位アミノ基との相互作用が重要であることを示唆している。一方、G-9 が I で置換された duplex 3 においては (lane 9) 切断の強度が変化せず、3' 側にあるグアニンの 2 位アミノ基は重要ではないことを示している。G-8 と G-9 の両方を I に置換した duplex 4 ではもちろん切断が消失している (lane 10)。エルサミシン - 鉄 (II) 錯体によるグアニン認識において 2 位アミノ基との相互作用が重要であることを以上の実験は証明している。

4 DNase I を用いたフットプリンティング実験

本来フットプリント法は DNA 塩基配列上の蛋白質結合部位決定法として開発された手法である。Figure 2-5-13 にその原理を示した。まず末端標識した DNA 断片と蛋白質を結合させた後、希薄な DNase I 溶液を加えて DNA に切れ目 (ニック) を入れる。蛋白質が結合している部位には DNase I が作用できないため切れ目は入らない。変性ポリアクリルアミド電気泳動によって DNA 切断部位を解析すると、蛋白質が結合する部位の切断バンドは消失することになる。バンドが消失する現象はフットプリントと呼ばれている。

筆者はこの手法をエルサミシン A に応用した。エルサミシン A がグアニンに特異的に結合するならば、GC 塩基対に富む領域でフットプリントが観察されるはずである。事実、エルサミシン A を結合させた後に DNase I で処理すると GC 塩基対に富む領域でフットプリントが観察される (Figure 2-5-14)。もしも金属の配位が結合特異性に関係するのであれば、エルサミシン A そのものによるフットプリントのパターンはエルサミシン A の金属錯体によるパターンと明らかに異なるはずである。ところがエルサミシン - 鉄 (III) 錯体やエルサミシン - コバルト (II) 錯体によるフットプリントのパターンは、エルサミシン A そのものによるパターンとほとんど同じで

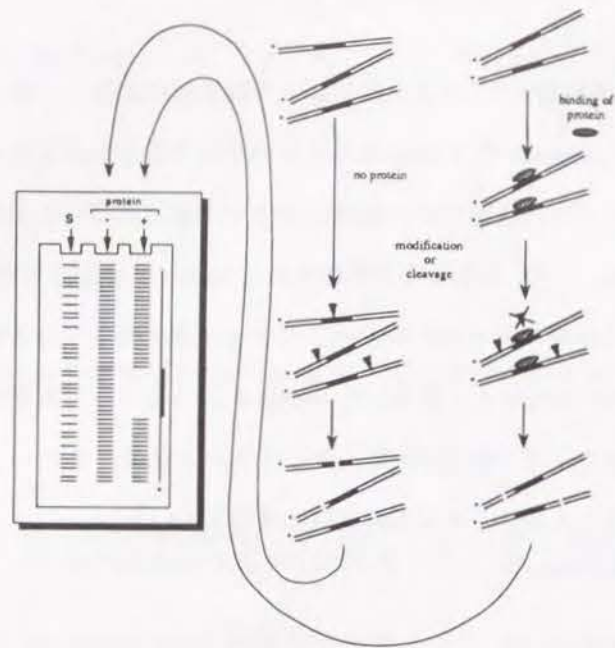


Figure 2-5-13 Principle of the DNase I footprinting experiment to detect binding sites in DNA.

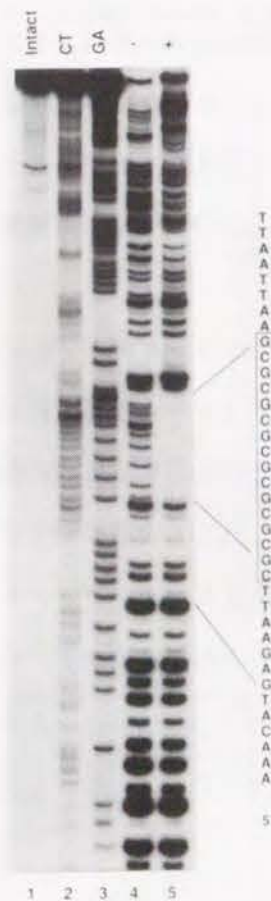


Figure 2-5-14 DNase I footprinting with elsamicin A. The DNA sample preincubated with elsamicin A (40 μM; lane 5) was digested with DNase I. Lane 4 shows no drug control. Lanes 2 and 3 are the Maxam-Gilbert sequencing ladders for C+T and G+A. Lane 1 shows intact DNA alone.

あった。この結果は金属の配位が特異性に影響していないことを示唆しており、エルサミシンA 構造中の金属配位部位の周辺はグアニン塩基認識に関与していないと考えられる。この見解に一致して、エルサミシン - 鉄 (III) 錯体の ESR シグナルは子牛胸腺 DNA を加えても変化しなかった。

5 5'-GN ステップに特異的な DNA 鎖切断のメカニズム

以上の実験結果を基にしてエルサミシンA によってなぜ 5'-GN ステップに特異的な DNA 鎖切断が起こるのかを考察することができる。筆者が提案する機構は Figure 2-5-15 にまとめられており、以下に詳述する。

まずエルサミシンA は C6 位フェノレートアニオンの酸素と隣接するカルボニル基の酸素によって鉄 (II) イオンに配位し、1 : 1 錯体を形成する。二座配位子としてのエルサミシンA はかさ高いので、エルサミシンA は一分子しか配位できないであろう。ここに DNA が存在すると、エルサミシン - 鉄 (II) 錯体は DNA のマイナーグループに結合し、マイナーグループの底から突き出しているグアニンの 2 位アミノ基との相互作用によってグアニンを認識する。このグアニンの 2 位アミノ基との相互作用は、金属配位部位の反対側に存在する 12 位のカルボニル酸素とグアニンの 2 位アミノ基との水素結合であると考えられる。この点に関してはさらなる研究を要するが、薬物が結合したマイナーグループという低極性環境下では、このような水素結合は大きなエンタルピー的な駆動力となり得る²⁶。この系に還元剤が存在すると、この高スピン鉄錯体は触媒的にヒドロキシルラジカルを発生する。DNA 切断の真の攻撃種はこのヒドロキシルラジカルであり、エルサミシン - 鉄 (II) 錯体が DNA のグアニンに結合している場合はグアニンの近傍にあるデオキシリボース骨格から水素原子を引き抜く。この水素原子引き抜きは、マイナーグループに存在する C4' 位起こると考えられる。なぜなら、主な切断産物が 5'-リン酸末端、3'-ホスホグリコール酸末端と C4'-hydroxylated abasic 部位だからである。

第六節 アミノ糖鎖のスイッチ機能

DNA 結合性抗生物質にはアミノ糖鎖を備えたものが数多い (Figure 2-6-1)。これらの抗生物質について最も興味ある問題は「アミノ糖鎖はどのような役割を果たしているのか」である。そこで筆者はエルサミシンAのアミノ糖鎖が果たす役割についてさらに検討した¹⁰。

1 N-アセチルエルサミシンAのDNA切断活性

エルサミシンAのアミノ糖鎖が果たす役割を追究するために、エルサミシンAの糖鎖部位アミノ基をアセチル化したN-アセチルエルサミシンA (Figure 2-6-2)のDNA切断活性を調べた。アガロースゲル電気泳動を用いて、pBR322プラスミドDNAに対するDNA切断活性を評価したところ、N-アセチル化は劇的にDNA切断活性を低下させた (Figure 2-2-2)。細胞毒性やDNA・RNA・タンパク質合成阻害作用においてもN-アセチルエルサミシンAの活性は劇的に低下しており (Table 2-6-1)、DNA切断活性の低下と一致する。

一方、アミノ基の代わりに水酸基を備えるチャートルシンのDNA切断活性はエルサミシンAに匹敵しており (Figure 2-2-2)、N-メチル体、N-ジメチル体においてもDNA切断活性は低下しなかった。ゆえに、N-アセチルエルサミシンAがDNA切断活性に乏しいのはアミノ基の電荷中和効果以外の要因によると考えられる。

2 N-アセチルエルサミシンAのDNA結合能

N-アセチルエルサミシンAの活性低下を説明するためにDNase I フットプリンティング実験及び蛍光消光実験を行ない、N-アセチル体のDNAに対する結合能を調べ

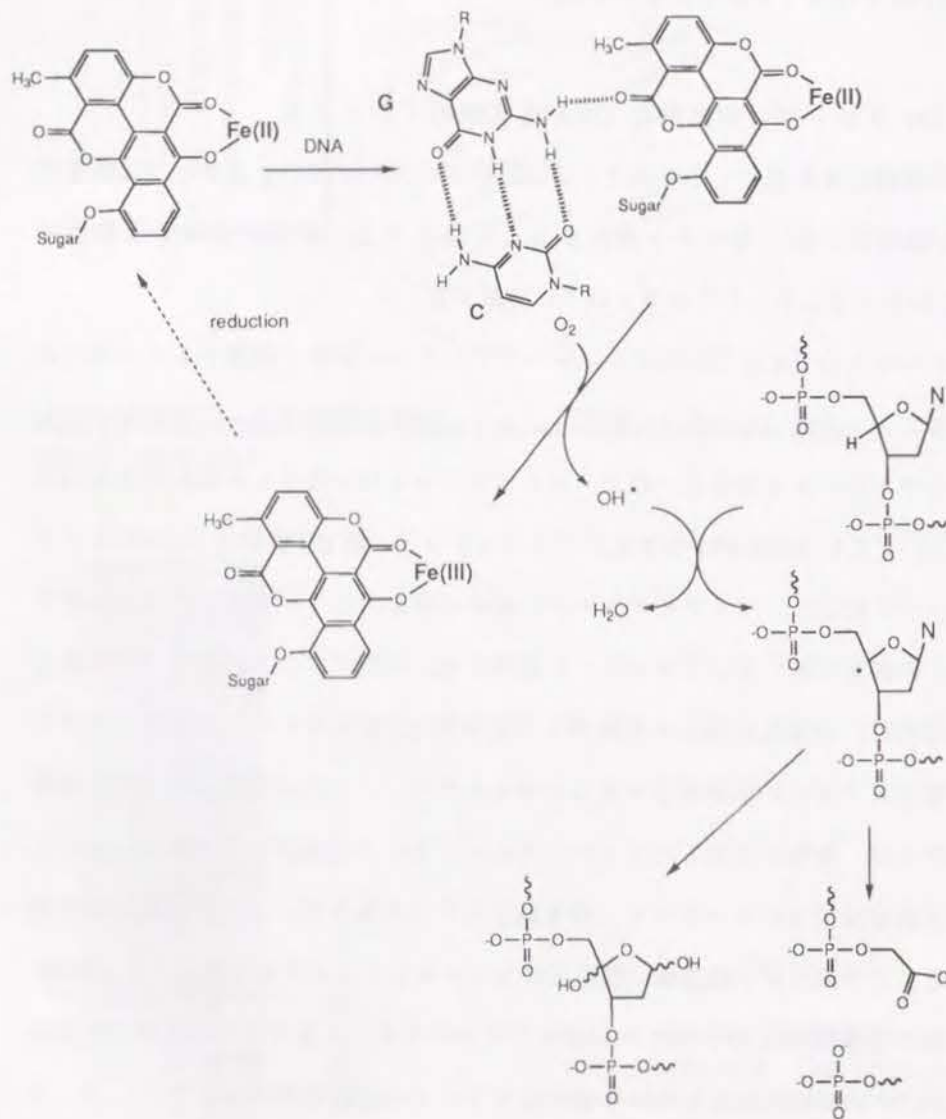


Figure 2-5-15 The proposed sequence of events in the GN-step recognition and cleavage by the elsamicin plus Fe(II) system.

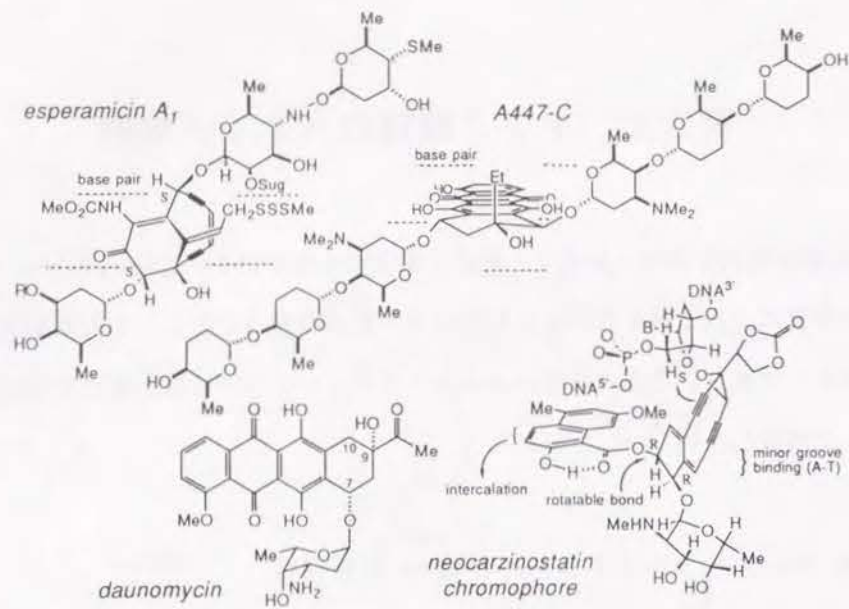


Figure 2-6-1 DNA-binding natural products equipped with amino sugars.

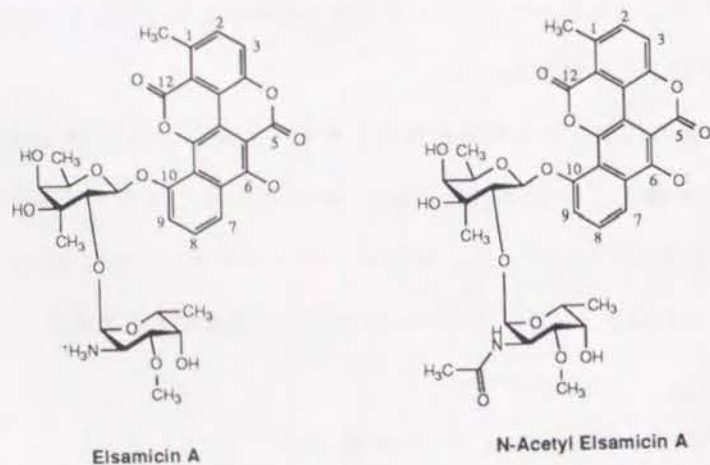


Figure 2-6-2 Chemical structures of elsamicin A, N-acetyl elsamicin A, and chartreusin.

た。Figure 2-6-3 は DNase I フットプリンティング実験の結果である。エルサミシン A は明らかに GC 塩基対に富む領域でフットプリントが観察されるのに対し、N-アセチル体は DNase I による DNA 切断を阻害しなかった。フットプリントの強度は DNA 結合の強さと関連するので、この結果は N-アセチル体の弱い DNA 結合能を示唆している。実際、N-アセチルエルサミシン A の蛍光スペクトルは poly[d(G-C)]₂ を加えてもほとんど変化しなかった (Figure 2-6-4)。

ゆえに、N-アセチル化による劇的な DNA 切断活性・生物活性低下は DNA に対する親和性の低下によるものと考えられた。¹H NMR スペクトルにおいて N-アセチルエルサミシン A のアセチル基のプロトンは高磁場領域 (δ0.8) に現われる³。この大きな高磁場シフトはチャータリン環 (アグリコン部位) の芳香族性環電流の効果と考えられ、チャータリン環上にアセチル基のプロトンがかぶさっていることによって起こる。ゆえに、アミノ糖鎖のアセチル基がアグリコンを覆うことで DNA のマイナーグループと立体障害を起こし、DNA との結合を不可能にさせているものと予想される。N-メチル体、N-ジメチル体において DNA 切断活性が低下しなかったので、アセチル基のカルボニルがチャータリン環とスタッキングなどの相互作用をしていると推測される。

3 アミノ糖鎖のスイッチ機能

以上の結果から考えて、アミノ糖鎖は生物学的なスイッチの役割を演じている可能性がある。すなわち、耐性菌や生産菌などでアミノ糖鎖は DNA 結合分子の活性を制御することができるかもしれない (Figure 2-6-5)。このような耐性のメカニズムはアミノグリコシド系の抗生物質に見られる。例えば、カナマイシン、ゲンタマイシン、ネオマイシンなどが挙げられる (Figure 2-6-6)。これらは耐性菌・生産菌の持つアセチルトランスフェラーゼによりアミノ糖鎖のアミノ基がアセチル化され不活性化されることがよく知られている²⁷。臨床応用されているダウノマイシンにおい

Table 2-6-1 Cytotoxicity of elsamicin A and its *N*-derivatives.

Compounds	IC ₅₀ (μg/ml)	
	L1210	B16
ElsamicinA	0.04	0.07
N-acetyl elsamicinA	>100	55
N-metyl elsamicinA	NT	1.7
N-dimetyl elsamicinA	0.40	0.36

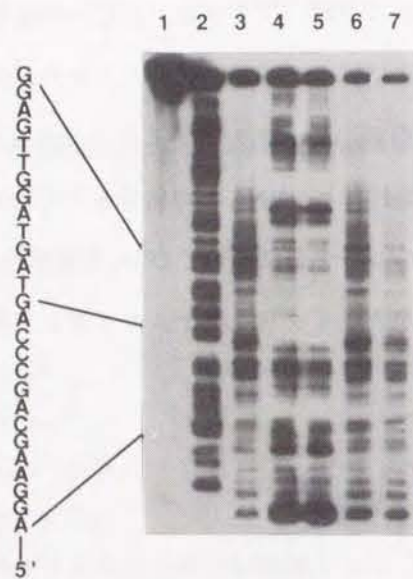


Figure 2-6-3 Autoradiogram showing DNase I footprints with elsamicin A and *N*-acetyl elsamicin A. The DNA pre-incubated with elsamicin A (lane 4, 15 μM and lane 5, 30 μM) and *N*-acetyl elsamicin A (lane 6, 15 μM and lane 7, 30 μM), and native DNA (lane 3) were digested with DNase I. Lane 2 shows the Maxam-Gilbert G+A sequencing reaction.

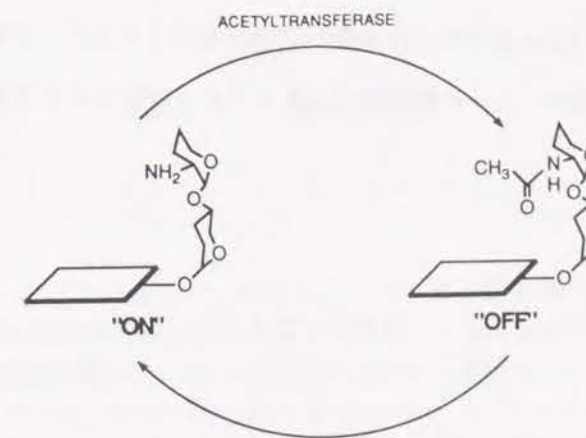


Figure 2-6-5 Schematic representation for the switch-function of amino sugar.

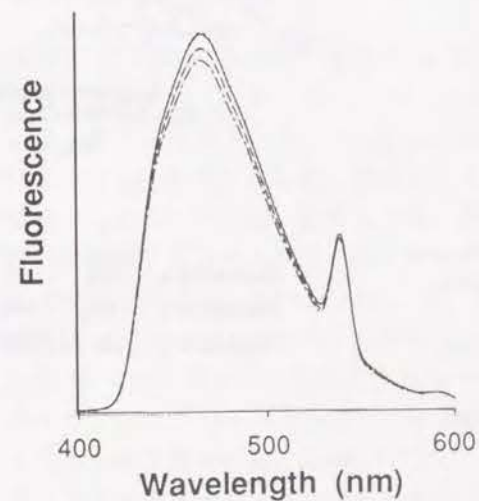


Figure 2-6-4 Effect of poly[d(GC)]₂ on the fluorescence spectrum of *N*-acetyl elsamicin A. The DNAs were added to a solution of 5 μM *N*-acetyl elsamicin A at pH 8.3. Concentrations of DNA were 0, 10, 20, and 30 μM (bp). Excitation was at 267 nm.

でも *N*-アセチル化は DNA 結合性及び生物活性共に低下させることが報告されているので²⁸, アミノ糖鎖のスイッチ機能はアンストラサイクリン系の抗生物質にもあてはまるかもしれない。

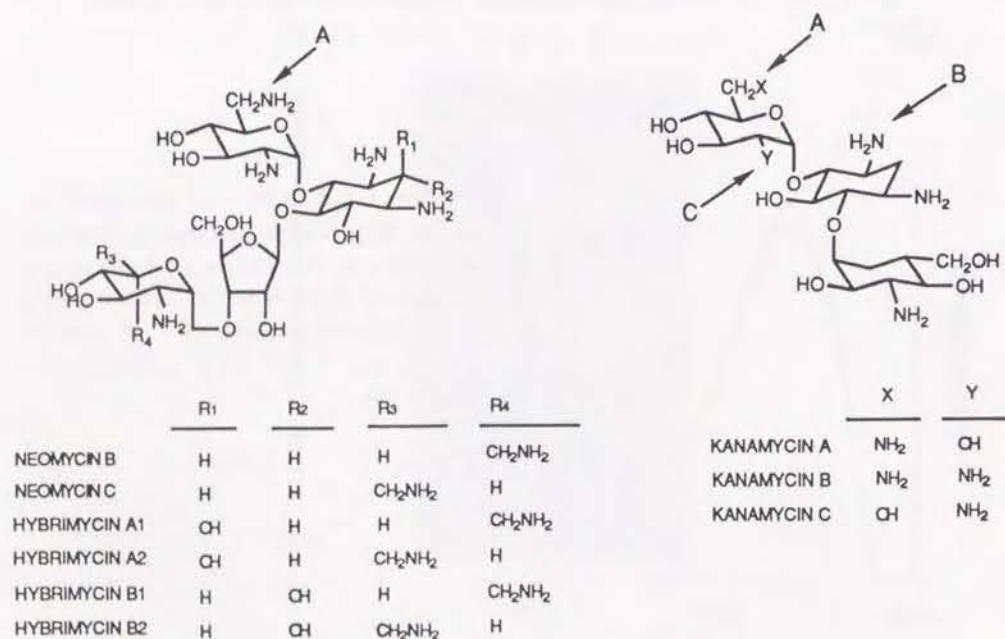


Figure 2-6-6 Structures of neomycins, hybrimycins, and kanamycins. The arrows indicate the sites of *N*-acetylation by kanamycin acetyltransferase (A), gentamicin acetyltransferase I (B), and gentamicin acetyltransferase II (C).

第七節 実験の部

1 試薬

エルサミシンA, チャートルシン, チャータリン, および各種エルサミシンA誘導体は Bristol-Myers Squibb 社の小西正隆博士の厚意により供給されたものを使用した。プラスミド pBR322 DNA は *Eschericia coli* C600 から単離した。バクテリアアルカリ性フォスファターゼ, *E. coli* DNA ポリメラーゼクレノウフラグメント, T4 ポリヌクレオチドキナーゼ, 各種制限酵素は Takara から購入した。[γ -³²P]ATP などの放射性化合物は Du Pont または Amersham から購入したものをを用いた。FeSO₄ 溶液は用事調製した。また本実験では蒸留水をさらに Sybron Nanopure II 超純水製造装置によって精製したものをを使用した。他の試薬は販売されている最も純度の高いものを利用した。

2 第二節に関する実験

pBR322 プラスミド DNA を用いた DNA 切断活性の測定

標準的な反応溶液 (全量: 20 μ L) は 15 μ M エルサミシンA と当量の FeSO₄ および 1 mM ジチオスレイトール, 0.8 μ g pBR322 DNA を含み, 20 mM トリス - 塩酸緩衝液によって pH を 7.5 とした。最後にジチオスレイトールを加えることで切断反応を開始し, 37°C で 4 min 放置した後, 氷冷エタノールを 60 μ L と 0.2 M EDTA および 3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 7.5) をそれぞれ 2 μ L を加えてエタノール沈殿を行うことで反応を停止し, DNA を回収した。それぞれの DNA サンプルに 20 μ L の泳動用緩衝液 (10% グリセロール, 0.05% プロモフェノールブルー) を加えてよく攪拌し, 65°C で一分間処理したものを電気泳動用サンプルとした。電気泳動は 0.5 μ g/mL のエチジウムブロミドを含んだ 1% アガロースゲルを用い, TBE 緩衝液中 (89 mM トリス - ホウ酸 (pH 8), 2 mM EDTA) 100 V で約 30 分間電気泳動した。続いてトランスイルミネーター上のゲルをポラロイド 665 フィルムを用いて撮影した。

pBR322 DNA 断片の 5' および 3'- 末端標識

pBR322 プラスミド DNA を制限酵素 *Sa*I で処理した後, 5'- 末端をバクテリアアルカリ性フォスファターゼにより脱リン酸し, T4 ポリヌクレオチドキナーゼと [γ -³²P]ATP によって標識した。標識した DNA をさらに制限酵素 *Dra*II で切断し, 非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (5%) により精製し, 目的とする 5'- 末端標識 *Bam*HI - *Sa*I 断片を得た。一方, 3'- 末端の標識は, *E. coli* DNA ポリメラーゼクレ

ノウフラグメントの3'-ポリメラーゼ機能により $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ を組み込むことを行った。

末端標識された pBR322 DNA 断片の切断

反応溶液 (全量: 20 μL) は 10 μM エルサミン A と当量の FeSO_4 および 1 mM ジチオスレイトール, 微量の末端標識 DNA, 0.4 μg 子牛胸腺 DNA を含み, 20 mM トリス-塩酸緩衝液によって pH を 7.5 とした。最後にジチオスレイトールを加えることで切断反応を開始し, 37 $^\circ\text{C}$ で 5 min 放置した後, 氷冷エタノールを 60 μL と 0.2 M EDTA および 3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 7.5) をそれぞれ 2 μL 加えエタノール沈殿を行うことで反応を停止し, DNA を回収した。それぞれの DNA サンプルに 5 μL の泳動用緩衝液 (95% ホルムアミド, 10 mM EDTA, 0.01% プロモフェノールブルー) を加えてよく攪拌し, 一旦 90 $^\circ\text{C}$ で一分間処理したものを電気泳動用サンプルとした。電気泳動は 7 M 尿素を含んだ 10% ポリアクリルアミドゲルを用い, TBE 緩衝液中 (89 mM トリス-ホウ酸 (pH 8), 2 mM EDTA) 2000 V で約 2 時間電気泳動した。塩基配列の同定は マキサム-ギルバート法により行った¹¹。切断強度はレーザーデンスitomーター (LKB Model 2222 Ultro-Scan XL) を用いて評価した。

蛍光スペクトルの測定

蛍光スペクトルは Hitachi F-3010 により測定した。測定溶液は 5 μM エルサミン A, 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3) を含み, 高濃度の $\text{poly}[\text{d}(\text{G-C})_2]$ 溶液を少量ずつ加えて滴定を行った。励起波長は 267 nm とした。結合定数の評価は 465 nm の蛍光変化を利用し, McGhee と von Hippel の方法²⁹により行った。

3 第三節に関する実験

塩酸による pH 滴定

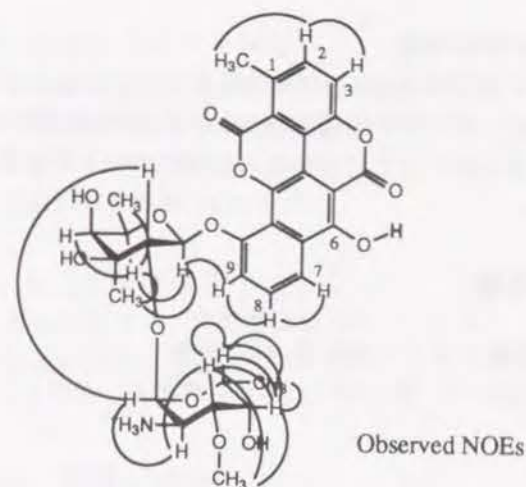
小型ガラス容器中に, 100 μM のエルサミン A を含む 5% メタノール水溶液 (全量: 20 mL) を入れ, ここに 0.01 N HCl 溶液を少量ずつ加えた。pH 値は Horiba F-13 によって測定した。

核磁気共鳴 (NMR) スペクトルの測定

^1H NMR スペクトルの測定には Varian XL-600 を用いた。DCI によって pD を調節し, 約 1 mg の試料を $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{OD}=8:1$ 中で 45 $^\circ\text{C}$ にて測定した。DSS を内部標準とし, TOCSY, DQF-COSY および NOESY にて帰属を行った。(観察された NOE は次ページ参照)

電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルの測定

エルサミン-鉄 (III) 錯体の ESR スペクトルは 77 K にて検出された。測定サン



プルは 50% メタノール水溶液とし, エルサミン A と FeSO_4 をそれぞれ 1 mM, カコジル酸緩衝液 (pH 5 または 7.2) を 0.1 M 含んでいる。数分放置することで錯体を空酸化させた後, ESR チューブに入れ, 液体窒素中で測定した。スペクトルは平均化した。スピン捕捉実験ではスピン捕捉剤として *N*-tert-butyl- α -phenylnitron を用いた。*N*-tert-butyl- α -phenylnitron は非常に安定なスピン付加体を形成する利点を持っている。測定サンプルはエルサミン A 1 mM, FeSO_4 10 mM, *N*-tert-butyl- α -phenylnitron 100 mM, カコジル酸緩衝液 (pH 5 - 7.2) 200 mM を含む 50% メタノール水溶液とした。酸素をバブリングした後, すばやく 25 $^\circ\text{C}$ で ESR の測定を行った。なお, ESR スペクトルの測定には JES-FE-3X を用いた。

DNA 切断効率に対する pH の影響

反応溶液 (全量: 20 μL) は 2.5 μM エルサミン A と当量の FeSO_4 および 1 mM ジチオスレイトール, 0.4 μg pBR322 DNA を含み, 10 mM カコジル酸緩衝液によって pH を調節した。最後にジチオスレイトールを加えることで切断反応を開始し, 25 $^\circ\text{C}$ で 5 min 放置した後, 氷冷エタノールを 60 μL と 0.2 M EDTA および 3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 7.5) をそれぞれ 2 μL を加えエタノール沈殿を行うことで反応を停止し, DNA を回収した。それぞれの DNA サンプルに 20 μL の泳動用緩衝液 (10% グリセロール, 0.05% プロモフェノールブルー) を加えてよく攪拌し, 65 $^\circ\text{C}$ で一分間処理したものを電気泳動用サンプルとした。電気泳動は 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のエチジウムブロミドを含んだ 1% アガロースゲルを用い, TBE 緩衝液中 (89 mM トリス-ホウ酸 (pH 8), 2 mM EDTA) 100 V で約 30 分間電気泳動した。続いてトランスイルミネーター上のゲルをポラロイド 665 フィルムを用いて撮影し, そのネガをレーザーデンスitomーター (LKB Model 2222 Ultro-Scan XL) を用いて解析することで, プラスミドのそれぞれのフォームの定量を行った。

硝酸コバルトによる吸収滴定

可視吸収スペクトルの測定は Beckman DU-640 を用いて行った。測定サンプルはエルサミン A 250 μ M, カコジル酸緩衝液 20 mM (pH 7.2) を含む全量 50 μ L の 12% メタノール水溶液とした。ここに高濃度の硝酸コバルト水溶液を滴定し、可視スペクトルを測定した。

4 第四節に関する実験

5' および 3'-末端標識された DNA 断片の切断

DNA 断片の標識, 切断は第二節で行ったものに準ずる。ただし, 電気泳動は 15% ゲルで行った。

末端に存在するリン酸の除去

3'-リン酸の除去は T4 ポリヌクレオチドキナーゼの 3'-フォスファターゼ活性を利用して行った。エルサミン - 鉄 (II) 錯体によって切断された標識 DNA を 20 μ L の緩衝液 (20 mM トリス - 塩酸 (pH 6.6), 20 mM 塩化マグネシウム, 10 mM β -メルカプトエタノールを含む) に溶解し, つづいて 6 unit の T4 ポリヌクレオチドキナーゼを加え, 一時間 37 $^{\circ}$ C で放置した。一方, 5'-リン酸の除去はバクテリアアルカリ性フォスファターゼの 5'-フォスファターゼ活性を利用して行った。エルサミン - 鉄 (II) 錯体によって切断された標識 DNA を 50 μ L の 100 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解し, つづいて 2 unit のバクテリアアルカリ性フォスファターゼを加え, 30 分間 65 $^{\circ}$ C で放置した。DNA はフェノール/クロロホルム抽出の後, エタノール沈殿によって回収した。

ヒドラジン処理

エルサミン - 鉄 (II) 錯体によって切断された標識 DNA を 20 μ L の 100 mM hydrazine hydrochloride (pH 7.0) に溶解し, 5 分間 90 $^{\circ}$ C で放置した。DNA はエタノール沈殿によって回収した。

遊離塩基の検出

反応溶液は 3 nmole (base pair) poly[d(G-C)]₂, 20 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.5), 様々な量のエルサミン A, 1 mM ジチオスレイトール, 1 mM FeSO₄ を含む全量 50 μ L の水溶液とした。37 $^{\circ}$ C で 30 min 反応させた後, 直接 HPLC で分析した。カラムは μ Bondapak C₁₈ カラム (Waters) を使い, 5 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.5) で溶出した。流速は 1 mL/min とし, 定量は 254 nm における紫外線吸収によって行った。

5 第五節に関する実験

アフラトキシン B₁ によるグアニン修飾

標識 DNA を含む 20 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.5) に, アフラトキシン B₁ (100 μ M) および *m*-クロロ過安息香酸 (500 μ M) を溶解した塩化メチレン液を加え, 振とうしながら室温で一時間反応させた。未反応のアフラトキシン B₁ をクロロホルムで抽出し, エタノール沈殿により修飾 DNA を得た。

ディスタマイシン A による前処理

標識 DNA を含む 20 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.5) にディスタマイシン A を 50 μ M 加え, 37 $^{\circ}$ C で 30 min 放置した後, 通常のエルサミン - 鉄 (II) 錯体による切断反応を行った。

duplex 1-4 の合成, 定量, 標識

duplex 1-4 は Applied Biosystems 社の 391 DNA 合成装置を用いて固相フォスフォアミダイト法により合成した。イノシンを含む DNA の合成は, 合成装置の X の位置にデオキシイノシンシアノエチルフォスフォロアミダイトを装着することで行った。合成装置による縮合を行った後, 20% アンモニア水によって DNA をカラムから切り出し, 密栓して 55 $^{\circ}$ C で 8 時間処理した。減圧濃縮後, 逆相 C₁₈ カラムを装着した HPLC によりジメチルトリチル基を有する DNA のみを分取した。溶出は 0.1 M トリエチルアミン - 酢酸緩衝液 (pH 7.0) 中, 5 ~ 50% アセトニトリルの直線濃度勾配で行った。この際, 流速は 1.0 mL/min とした。減圧濃縮後, 80% 酢酸溶液で 30 min 処理し, 溶媒除去後, 残さに 0.1 M トリエチルアミン - 酢酸緩衝液 (pH 7.0) を加え, エーテルで三回洗浄し, 逆相 C₁₈ カラムを装着した HPLC により目的物をさらに精製した。定量はそれぞれの DNA オリゴマーの紫外線吸光度から計算した。5'-末端標識はポリヌクレオチドキナーゼおよび [γ -³²P]ATP を用いて行った。標識後, 7 M 尿素を含んだ 15% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し, 標識 DNA をさらに精製した。

duplex 1-4 の切断

反応溶液 (全量: 20 μ L) は 5 μ M エルサミン A と当量の FeSO₄ および 1 mM ジチオスレイトール, 0.1 M NaCl, 100 pmole の DNA duplex, 微量 (< 2 pmole) の末端標識 duplex を含む, 10 mM カコジル酸緩衝液によって pH を 7.2 とした。薬物, FeSO₄ およびジチオスレイトールを加える前に一旦 90 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し, 室温までゆっくりとさました後, 再アニーリングのため少なくとも 1 時間 4 $^{\circ}$ C に放置した。最後に薬物とジチオスレイトールを加えることで切断反応を開始し, 37 $^{\circ}$ C で 5 min 放置した後, 氷冷エタノールを 60 μ L と 3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.5) 5 μ L を加えエタノール沈殿を行うことで反応を停止し, DNA を回収した。それぞれの DNA サンプルに 3 μ L の泳動用緩衝液 (95% ホルムアミド, 10 mM EDTA, 0.01%

プロモフェノールブルー)を加えてよく攪拌したものを電気泳動用サンプルとした。電気泳動は7 M 尿素を含んだ15%ポリアクリルアミドゲルを用い、TBE緩衝液中(89 mM トリス-ホウ酸(pH 8), 2 mM EDTA) 2000 Vで約2時間電気泳動した。塩基配列の同定はマキサム-ギルバート法により行った¹¹。切断強度はレーザーデンストメーター(LKB Model 2222 Ultra-Scan XL)を用いて評価した。

DNase I フットプリンティング実験

反応溶液(全量:20 μ L)は5'-末端標識DNA断片(約2000 cpm), 超音波処理した子牛胸腺DNA 4 μ g, 1 mM MgCl₂, 40 μ M エルサミンAを含み, 20 mM トリス-塩酸緩衝液でpHを7.5とした。(エルサミン金属錯体によるフットプリンティング実験の場合は, 十倍量の金属イオンを加えた。)20°Cで30 min 放置した後, 0.0035 unitのDNase Iを加えて20°Cで1 min インキュベートした。250 mM EDTAと3 M 酢酸ナトリウム溶液(pH 7.5)を含んだDNase I反応停止液を5 μ L加え, エタノール沈殿を行うことで反応を停止し, DNAを回収した。それぞれのDNAサンプルに5 μ Lの泳動用緩衝液(95%ホルムアミド, 10 mM EDTA, 0.01%プロモフェノールブルー)を加えてよく攪拌し, 90°Cで1 min 加温し急冷したものを電気泳動用サンプルとした。電気泳動は7 M 尿素を含んだ10%ポリアクリルアミドゲルを用い, TBE緩衝液中(89 mM トリス-ホウ酸(pH 8), 2 mM EDTA) 2000 Vで約2時間電気泳動した。塩基配列の同定はマキサム-ギルバート法により行った¹¹。

6 第六節に関する実験

第六節の実験はこれまでの節における実験に準ずる。

引用文献

1. Konishi, M., Sugawara, K., Kofu, F., Tomita, K., Miyaki, T. and Kawaguchi, H. (1986) *J. Antibiot.* 39, 784-791.
2. Shuring, J. E., Forenza, S., Long, B. H., Rose, W. C., Catino, J. J., Kamei, H., Nishiyama, Y., Bradner, W. H., Casazza, A. M., Stringfellow, D. A. and Doyle, T. W. (1988) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 29, 538-539.
3. Sugawara, K., Tsunakawa, M., Konishi, M. and Kawaguchi, H. (1987) *J. Org. Chem.* 52, 996-1001.
4. McGovern, J. P., Neil, G. L., Crampton, S. L., Robinson, M. I. and Douros, J. D. (1977) *Cancer Res.* 37, 1666-1672.
5. Gaver, R. C., Deeb, G. and George, A. M. (1989) *Cancer Chemother Pharmacol.* 25, 195-201.
6. Li, L. H., Clark, T. D., Murch, L. L., Wooden, J. M., Pschigoda, L. M. and Krueger, W. C. (1978) *Cancer Res.* 38, 3012-3018.
7. Yagi, M., Nishimura, T., Suzuki, H. and Tanaka, H. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98, 642-647.
8. Uramoto, M., Kusano, T., Nishino, T., Isono, K., Shishido, K. and Ando, T. (1983) *FEBS Lett.* 153, 325-328.
9. Stubbe, J. and Kozarich, J. W. (1987) *Chem. Rev.* 87, 1107-1136.
10. Uesugi, M., Sekida, T., Matsuki, S. and Sugiura, Y. (1991) *Biochemistry* 30, 6711-6715.
11. Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) *Methods Enzymol.* 65, 449-560.
12. Uesugi, M. and Sugiura, Y. (1995) submitted to *Biochemistry*.
13. Dabrowiak, J. C. and Tsukayama, M. (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103, 7543-7550.
14. Sugiura, Y. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* 102, 5216-5221.
15. Uesugi, M. and Sugiura, Y. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 580-587.
16. Cameron, V. and Uhlenbeck, O. C. (1977) *Biochemistry* 16, 5120-5126.
17. Giloni, L., Takeshita, M., Johnson, F., Iden, C. and Grollman, A. P. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 8608-8615.
18. Uesugi, S., Shida, T., Ikehara, M., Kobayashi, Y. and Kyogoku, Y. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 1581-1592.
19. Murugeson, N., Xu, C., Ehrenfeld, G. M., Sugiyama, H., Kilkuskie, R. E., Rodriguez, L. O., Chang, L. H. and Hecht, S. M. (1985) *Biochemistry* 24, 5735-5744.
20. Sugiyama, H., Fujiwara, T., Kawabata, H., Yoda, N., Hirayama, N. and Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 5573-5578.

21. Sugiyama, H., Xu, C., Murugeson, N., Hecht, S. M., van der Martel, G. A. and van Bom, J. H. (1988) *Biochemistry* 27, 58-67.
22. Sugiyama, H., Kawabata, H., Fujiwara, T., Dannoue, Y. and Saito, I. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 5252-5257.
23. Dedon P. C., Jiang, Z.-W. and Goldberg, I. H. (1992) *Biochemistry* 31, 1917-1927.
24. Sigman, D. S., Mazumder, A. and Perrin, D. M. (1993) *Chem. Rev.* 93, 2295-2316.
25. Suzuki, T., Kuwahara, J. and Sugiura, Y. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 916-922.
26. Jin, R. and Breslauer, K. J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85, 8939-8942.
27. Benveniste, R. and Davies, J. (1973) *Annu. Rev. Biochem.* 42, 471-506.
28. Di Marco, A. and Arcomone, F. (1975) *Arzneim. Forsch.* 25, 368-375.
29. Mc Ghee, J. D. and von Hippel, P. H. (1974) *J. Mol. Biol.* 86, 469-489.

第三章

結語および要約

エスペラミシンA₁とエルサミシンAはDNAと結合するように自然によってデザインされた抗癌抗生物質である。これらの天然低分子化合物によるDNA塩基認識の起源やDNA相互作用の基本様式などが解明できれば、DNA-蛋白質相互作用といたさらには複雑な系を理解する上で基礎的な知見を提供すると期待される。また、エスペラミシンA₁およびエルサミシンAはDNAに結合する能力に加えてDNA鎖を酸化的に切断する能力も持っており、結合と反応を同時進行させるという点で一種の「酵素モデル」となり得る。さらに、現在エスペラミシンA₁およびエルサミシンAは臨床実験に入っており、研究材料としてとりあげることは癌化学療法の基礎的研究面からも有益と考えられる。以上の理由から筆者は、これら二つの抗癌抗生物質とDNAとの相互作用を様々な手段を用いて検討し、以下の新知見を得た。

抗癌抗生物質エスペラミシンA₁による塩基配列認識の起源

エスペラミシンA₁はDNAのオリゴプリン/オリゴピリミジン領域を認識して切断する。この塩基配列認識の起源を探るため、様々な合成DNAオリゴマーと各種薬物誘導体との反応産物を解析し、塩基配列特異性と薬物の構造との相関を詳細に調べた。その結果、オリゴプリン/オリゴピリミジン認識にはエンジイン部分と三糖部分の両方が必須であることが見いだされた。DNA切断効率に対する無機塩の影響などによると、その必須部分はDNAのマイナーグループと疎水結合していると考えられ、ある特定部位の相互作用よりも全体の立体空間的な相補性が特異的結合に重要であることが理解された。さらに、エスペラミシン結合時の宿主DNAの円偏光二色性スペクトルの解析などから、エスペラミシン結合によってDNAから水

和分子が遊離し、DNA側に構造変化が生じることが示唆された。分子動力学計算によると、特異性を決定しているエスベラミシンの必須部分の構造は硬く、相補的な疎水結合に必要な構造変化をDNA側に強いることが理解された。この見解と一致して、様々なヘリックスの自由度を持つDNAオリゴマーをエスベラミシンA₁の基質として用いたところ、自由度の大きなDNAほどエスベラミシンA₁は強く切断した。以上の結果から、硬くて疎水的なエスベラミシンの必須部分はDNAの構造変化しやすい部分を読むことで塩基配列特異性を発揮していると推定された。事実、オリゴプリン/オリゴピリミジン配列は構造変化が容易な配列と考えられており、本研究で得られた知見とよく対応している。

制癌抗生物質エルサミシンAによるグアニン認識とDNA鎖切断

エルサミシンAは鉄と還元剤の存在下でグアニンの3'側のヌクレオチドを特異的に切断する。物理化学的実験によると、エルサミシンAの6位フェノールは生理的pHで解離しておりフェノレートとして存在している。このフェノレートアニオンとラクトン環のカルボニル基を介してエルサミシンAが鉄イオンと1:1錯体を形成することをESRスペクトルなどを用いて示した。この高スピン鉄錯体の鉄(II)が鉄(III)に酸化する際に酸素が活性化されてヒドロキシルラジカルが発生することも、スピン捕捉剤を用いたESR法によって示した。本錯体がDNAのグアニン塩基に結合していれば、ヒドロキシルラジカルは近傍にあるデオキシリボース骨格から水素原子を引き抜いて、グアニンの3'側でDNAを切断することが予想される。DNAの切断産物を追究したところ、水素原子引き抜きはデオキシリボースの4'位で起こっていると考えられた。

他方、エルサミシンAから糖鎖を除いた場合でもグアニン特異性は保持されており、特異性はクロモフォア部分に起因すると推定された。合成DNAを用いた実験などから、エルサミシンAはDNAのマイナーグループに結合し、マイナーグルー

プに突き出しているグアニンの2位アミノ基がグアニン認識に重要であることが明らかとなった。金属の配位はグアニン特異性に影響しなかったため、金属配位部位の反対側に存在する12位のカルボニル酸素とグアニンの2位アミノ基が水素結合していると予想された。さらに、DNA鎖切断反応におけるエルサミシンA分子中のアミノ糖鎖の役割についても考察した。

本研究はDNAを標的とする制癌抗生物質エスベラミシンA₁およびエルサミシンAの作用機序の分子レベルでの理解に役立つばかりでなく、一般に生物活性分子によるDNA塩基認識やDNA鎖切断反応に関しても有用な基礎的知見を提供していると考えられる。

謝辞

終わりに臨み、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました恩師、杉浦幸雄 教授に衷心より感謝の意を表します。

また、有機化学的な見地からご助言ならびにご激励を戴きました大塚雅巳 助教授に深く感謝致します。折にふれご激励やご討議を戴いた桑原 淳 博士（現 徳島大学助教授）、森井 孝 博士、NMR スペクトルを測定して戴いた菊池純子 博士（塩野義製薬）、実験の一部にご協力戴いた日下部哲也 学士、松木伸介 修士、種々ご討議戴いた京都大学化学研究所生体反応設計 II 部門の方々に深謝致します。

貴重なエスベラミシン類、エルサミシン類を寛大にご提供を下された Bristol-Myers Squibb 社の小西正隆 博士、Terrence W. Doyle 博士、カリチエミシン γ_1^1 を寛大にご提供下された American Cyanamid Lederle 研究所 George A. Ellestad 博士へ敬意と深謝を表します。また、本研究の一部は日本学術振興会より援助を受けたものであり、あらためて感謝致します。

果実の源は根や土にあります。この博士論文は私だけの力で成就したものではありません。根となって支え、土となって育ててくれた多くの力がありません。あるときは師であり、あるときは同僚であり、あるときは家族であり、そして常に世間の人々と天地自然でした。実となりえたことに深く感謝致します。