

2

抗腫瘍性抗生物質エスペラミシンの 活性化とDNA切断作用に関する研究

1992

植沢 芳広

目 次

序 論	1
実験の部	5
第一章 チオール系還元剤によるエスペラミシンの活性化と DNA切断作用	8
第一節 種々の還元剤共存下でのエスペラミシンの DNA切断反応	8
第二節 酸素及びラジカル捕捉剤の影響	10
第三節 エスペラミシンの塩基配列特異的切断と DNA相互作用様式	17
第四節 DNA分解におけるエスペラミシンの構造活性相関	22
第二章 紫外線照射によるエスペラミシンの活性化と DNA切断作用	28
第一節 エスペラミシンによる紫外線誘起DNA切断と その塩基配列特異性	28
第二節 エスペラミシンの紫外線による活性化機構	35
第三章 加熱によるエスペラミシンの活性化とDNA切断作用	47
第一節 エスペラミシンによる熱誘起DNA切断と その塩基配列特異性	47
第二節 エスペラミシンの熱による活性化機構	55
総 括	59
謝 辞	61
引用文献	62

序 論

エスペラミシン (ESP) はアルゼンチンで採集された放線菌 *Actinomadura verrucosospora* から単離された、極めて高い抗菌、抗腫瘍活性を示す抗生物質である (1)。その抗菌活性はグラム陽性菌に対して特に強いほか、グラム陰性菌、カビ類にも及んでいる (表1)。また、インビトロで各種腫瘍細胞の増殖を 1~3 pg/ml の濃度で阻止し (2)、マウス移植の白血病 p388、B16 黒色腫、Lewis 肺癌等の実験腫瘍に著しい抗腫瘍活性が知られている (3)。これらの活性はアドリアマイシンの数千倍に達し、その発見以前に最強の抗癌性物質として知られていた CC-1065 と比較しても約 10 倍強いものである。

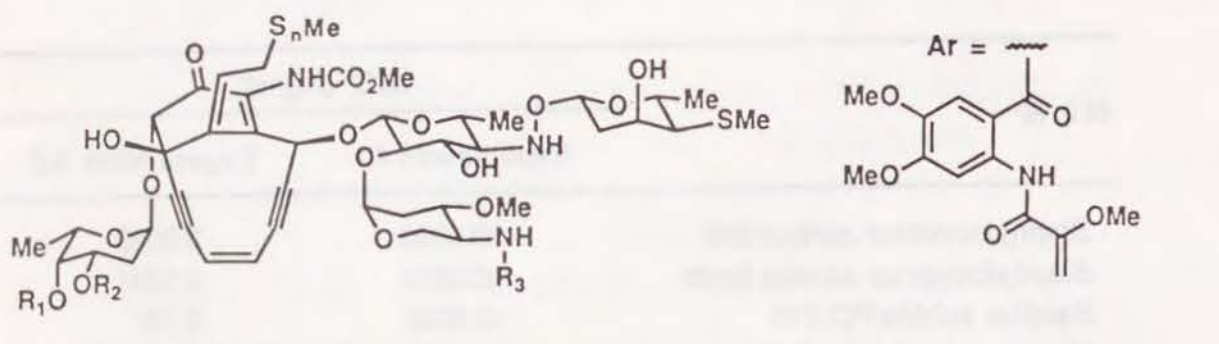
表1 エスペラミシンの抗菌活性

微生物	MIC* (mg/ml)	
	Esperamicin A1	Esperamicin A2
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	<0.0008	0.0063
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	<0.0008	0.0031
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	<0.0008	0.05
<i>Micrococcus luteus</i> 1001	0.0016	0.0063
<i>Micrococcus flavus</i>	0.0008	0.0016
<i>Mycobacterium</i> 607	0.05	0.1
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	0.1	0.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> D11	0.4	0.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> D15	0.8	1.6
<i>Bacteriodes fragilis</i> A 20928	0.2	1.6
<i>Clostridium difficile</i> A 21675	0.4	0.8
<i>Clostridium perfringens</i> A 9635	0.05	0.8
<i>Candida albicans</i> IAM 4888	0.4	0.4
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1.6	3.1

* 最小生育阻止濃度

ESPの構造は、1987年に小西ら Bristol-Myers Squibb社の研究陣によって決定された(1)。表2に示したように、その基本骨格は従来の天然物にない非常にユニークな構造単位から構成されており、糖部分の置換基等によって数種類に分類されている。筆者の研究においては ESPA1及びそれを化学的に修飾した類縁体を用いている。2-デオキシ-L-フコースを除く3個の糖部分はいずれも新規のものであり、特にヒドロキシアミノ糖の存在は、やはり特異なNO-グリコシド結合の存在と合わせて興味深い。またアグリコン部も、メチルトリスルフィド、1,5-ジイン-3-エン、 α,β -不飽和ケトン等を有する特異な構造を有している(図1)。

表2 種々のエスペラミシン抗生物質



	n	R ₁	R ₂	R ₃
Esperamicin A ₁	3	H	Ar	CHMe ₂
Esperamicin A _{1b}	3	H	Ar	Et
Esperamicin A _{1c}	3	H	Ar	Me
Esperamicin P	4	H	Ar	CHMe ₂
Esperamicin A ₂	3	Ar	H	CHMe ₂
Esperamicin A _{2b}	3	Ar	H	Et
Esperamicin A _{2c}	3	Ar	H	Me

この抗生物質は細胞系でのDNA合成を抑制し、細胞内及びインビトロにおいてDNAを効果的に切断することから、その生物活性発現のための一次作用は細胞内核酸の複製レベルでの阻害であると考えられている(2、5)。ESPの生体内外での挙動、作用発現のための機作を把握し、また治療薬としての用途の拡大をはかるために、筆者はこの薬物の示すDNA切断反応の機構を分子レベルで明らかにすることを計画し、塩基配列決定等の分子生物学的手法及びESR等の物理化学的手法を用いて追究した。これらの実験結果から、ESPは、チオール系化合物の添加による還元、紫外線照射、または熱処理の3つの系において活性化されDNAを効率良く切断することが明らかになった。

ESPのDNA切断反応に関するこれらの活性化系について、筆者が得た知見を以下に示す。

実験の部

本実験では、エスペラミシン (ESP) として単離・精製されたESPA1を用いた。

(1) 試薬

ESPA1、C、D及びZは Bristol - Myers Squibb 社の T. W. Doyle 博士から、プラスミド pUC19 の AccI - AccII DNA フラグメントは京都大学農学部の駒野教授から各々供与されたものである。T4 ポリヌクレオチドキナーゼ、バクテリアルアルカリフォスファターゼ (各種DNA修飾試薬) 及びDNA制限酵素類はTOYOBO (株) とニッポンジーン (株) から購入、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP はアマシャム・ジャパン (株) より購入した。その他の試薬は試薬特級品を用いた。また本実験で用いた水は、蒸留水をさらに NANO pure II 超純水製造装置 (Barnstead) にて処理し、比抵抗 $10\text{ M}\Omega$ 以上の純水を使用した。

(2) エスペラミシン・ジスルフィド (ESP disulfide) (6) の合成

反応液はESPA1のアセトニトリル溶液 (10.0 mM) $10\mu\text{l}$ にメタノールに溶解したメルカプトメタノール溶液 (30%) $20\mu\text{l}$ を加えアセトニトリルにて総量 $1000\mu\text{l}$ に調製した。この反応液を 20°C で21時間インキュベートした後、減圧下にて留去した。得られた残渣は HPLC により精製し NMR によって構造確認した。

(3) DNA切断活性の測定

通常の方法 (7) にしたがって、トランスフォームした大腸菌より単離したpBR322 プラスミドDNAを用いて、各種試薬のDNA切断活性を測定した。このDNAを各項に示した条件で試薬と反応させた後、冷エタノール (3倍量) と酢酸ナトリウム (0.3M) を加え、ドライアイス-エタノール中で冷却してDNAを塩析することによって反応を停止させた。沈殿したDNAを回収し、最終的に少量のグリセロール (10%) - BPB (0.05%) 色素溶液に溶解して電気泳動用試料とした。電気泳動は、DNA染色のためにエチジウムブロマイド ($0.5\mu\text{g/ml}$) を含有したアガロース (1%) を担体とする平型ゲルを用い、 5V/cm で泳動した。

泳動後、紫外線照射下、赤色及び紫外線用フィルターを装着したカメラにて泳動像を撮影した。プラスミドDNAの形態変化 (スーパーコイル

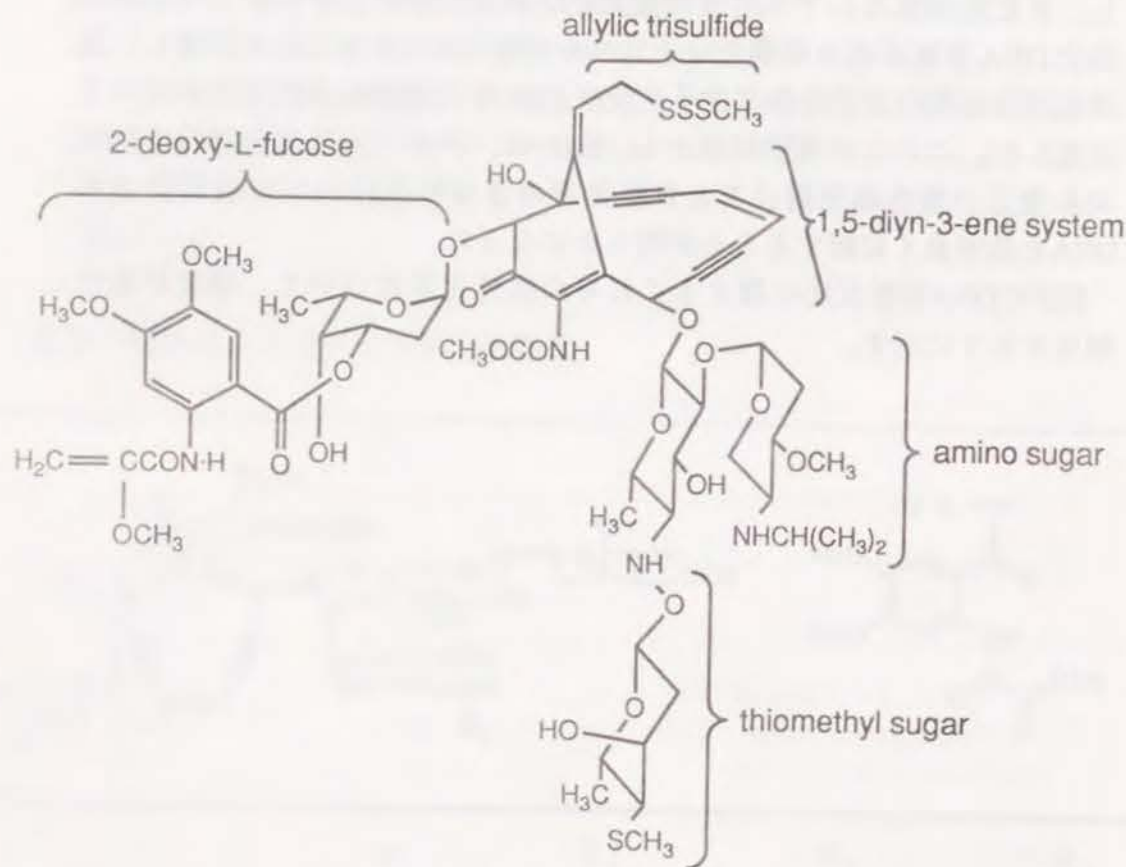


図1 エスペラミシンA₁の構造

状 (form I)、開環状 (form II)、及び直鎖状 (form III) の割合を、LKB 2222 Ultro Scan XLレーザーデンシトメーター (Pharmacia LKB) によって測定し、各反応系におけるDNA切断活性を評価した。

(4) DNA切断塩基特異性の観察

ESPA1等によるDNA切断塩基部位は、片側 5'末端を ^{32}P にて標識した各種DNAフラグメントを用いてMaxam-Gilbert法 (8) により検索した。 ^{32}P 標識 DNA フラグメントを超音波処理した子牛胸腺 DNA $1\mu\text{g}$ と共に各項中に示した条件で反応させ、反応後、冷エタノールにて沈殿、回収し、最終的に 5M 尿素 - 50mM NaOH - 0.1% BPB - 0.1% キシレンシアノール溶液に溶解して電気泳動用試料とした。塩基配列決定用の塩基特異的化学反应 (G、A>C、C+T、G+A) は報告された方法 (8) に従って行なった。

すべての泳動用試料は 90°C で1分間加熱急冷した後、ゲル上にアプライした。電気泳動は 7M 尿素と 10% ポリアクリルアミド ($0.5 \times 300 \times 400\text{mm}$ または $0.5 \times 200 \times 475\text{mm}$) を担体とした縦型スラブゲルで行ない、1500V 定電圧で泳動した。泳動後、ゲルをオートラジオグラフにかけ、各バンドの黒化度をスキヤニングデンシトメーターで測定し、各部位の相対的な切断強度を観察した。

(5) 液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析

ESPA1の化学変化等を A301-JS-120A ODS カラム (ヤマムラ化学、 $4.6 \times 100\text{mm}$) を用いた HPLC によって評価した。流速は $1\text{ml}/\text{分}$ に設定し、その流出液は 254 nm 波長の吸光度測定モニターにより分離分析した。

(6) 紫外線の照射

紫外線光源として 254nm に中心波長を持つ殺菌ランプ (東芝 GL15)、または 310nm に中心波長を持つトランスイルミネーター (Ultra-Violet Products, Inc., TM36) を使用した。光源と反応液の距離は 3 ~ 10 cm とし、トランスイルミネーターを用いた実験系においては 300nm 以下の短波長側の紫外光を UV フィルターによって遮断して照射した。

(7) 各種スペクトルの測定

X-バンド ESR スペクトルの測定は日本電子 (株) JES - FE3X (100kHz) を用いて室温で行ない、g 値ならびに磁場は、MgO 中の Mn^{2+} ($\Delta H_{3,4} = 86.9\text{G}$) により求めた。 ^1H -NMR スペクトルの測定は JEOL JNM - GX

400 NMR 装置を用い、プロトンの化学シフトは溶媒メタノール (3.3 ppm) を基準として CD_3OD 中に行なった。UV 吸収スペクトルの測定は日本分光 (株) UVIDEC - 610 型可視紫外分光光度計で行なった。

第一章 チオール系還元剤によるエスペラ ミシンの活性化とDNA切断作用

第一節 エスペラミシンの還元剤共存下での DNA切断反応

ESPA1の構造中には容易に還元され得る特徴的なメチルトリスルフィド基が存在する。このような単純なトリスルフィドあるいはセレノトリスルフィドのシステイン、グルタチオンのようなチオールによる還元が報告されている事から(9、10)、筆者はまず還元剤のESPA1-DNA切断系に対する影響をインビトロで検索することを試みた(図2)。10 μ MのESPA1に基質として0.5 μ gのpBR322 DNAを加え、チオール系還元剤ジチオスレイトール(100 μ M)の存在下37 $^{\circ}$ Cのインキュベーションを行ったところ、スーパーコイル状(form I)の基質プラスミドDNAに傷(nick)が入る事によって生じる開環状(form II)、あるいは直鎖状(form III)DNAが検出され、ESPA1は極めて強いDNA切断を引き起こしていることがわかった。この活性は明らかにインキュベーション時間に依存していることが観察された(レーン2~8)。一方、ジチオスレイトールを除いたESPA1単独でのDNA切断活性(レーン1)は、還元活性化された同様の反応系(レーン8)に比べ極めて弱いものであった。なお、非還元的な活性化系に関しては第2節、第3節に詳細に述べる。

次に筆者は各種還元剤のESPA1活性化に対する効率を比較する実験を上記と同様の方法を用いて行なった(図3)。10 μ MのESPA1に対して、各種還元剤は全て0.1 mMに調製し、基質DNAとともに37 $^{\circ}$ Cに於て30分間インキュベートした。その結果チオール系還元剤であるグルタチオン、システイン、ジチオスレイトール、及びイオウ原子が還元に直接関与する亜ジチオン酸ナトリウムによるESPA1の活性化は、それ以外の還元性物質(水素化ほう素ナトリウム、NADPH、アスコルビン酸)を使用した反応系と比較して明らかに強いDNA切断を引き起こした。

ESPA1は細胞系においても効率良くDNAを分解していくことが知られている(5)。しかしながらインビトロ系におけるこの抗生物質単独での作用は、インビボ系(3)、及び細胞系(5)での強力な生理作用を

説明しうる程度の強度を有しているとは言い難い。むしろこの薬物には酵素系など何らかの生化学的活性化機構が関与していると考えられるほうが妥当である。生体内にはシステイン、グルタチオンといったチオール系化合物が存在し、それらは酵素を伴う生体内還元系に寄与していることも少なくない。インビトロにおけるESPA1活性化に対するチオール系還元剤の優先性は、この抗生物質が生体内還元系によって活性化されている可能性を強く示唆するものである。

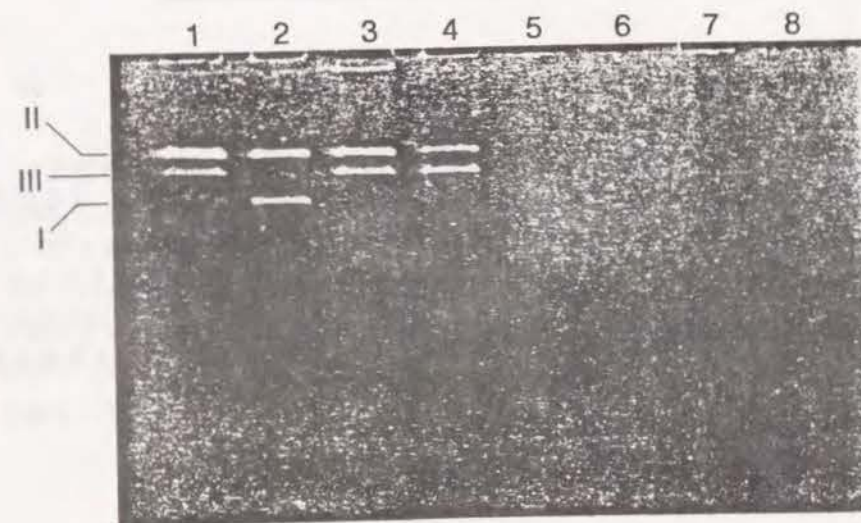


図2 還元活性化ESPA1によるDNA切断

ジチオスレイトール(0.1mM)存在下(レーン3~8)あるいは非存在下(レーン1)、ESPA1(10 μ M)によって処理したpBR322DNAのアガロースゲル電気泳動像。反応サンプルは37 $^{\circ}$ Cにおいて1分間(レーン3)、5分間(レーン4)、10分間(レーン5)、30分間(レーン6)、60分間(レーン7)、または120分間(レーン8)インキュベートした。レーン2はDNAブランクを示す。

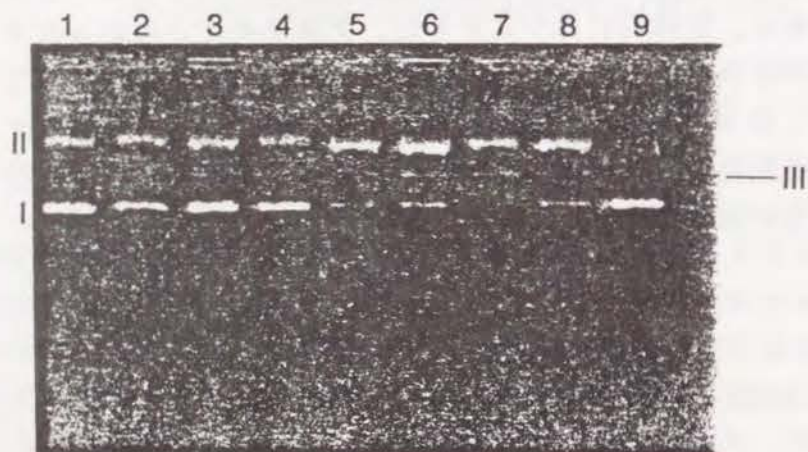


図3 各種還元剤によるESPA1活性化DNA切断

種々の還元剤（各々0.1mM）存在下、ESPA1（10 μ M）によって37 $^{\circ}$ C、30分間処理したpBR322DNAのアガロースゲル電気泳動像。（レーン2）NaBH₄、（レーン3）NADPH、（レーン4）L-アスコルビン酸、（レーン5）ジチオン酸ナトリウム、（レーン6）グルタチオン、（レーン7）L-システイン、（レーン8）ジチオスレイトール。レーン1はESPA1のみによる処理を、レーン9はDNAブランクを各々示している。

第二節 酸素及びラジカル捕捉剤の影響

ESPA1のDNA切断における溶存酸素の影響を調べるために、アルゴン置換したサンプル溶液をツーンベルグキューベット中にて真空吸引した脱酸素系を使用して反応を試みた。一方比較のため、有酸素系では反応液に一分間酸素ガスを通したものをを使用した。反応は還元剤として0.1mMのジチオスレイトールを用い、基質DNAとともに10 μ MのESPA1を20 $^{\circ}$ Cに於て5分間インキュベートした。図4はその結果のアガロースゲル電

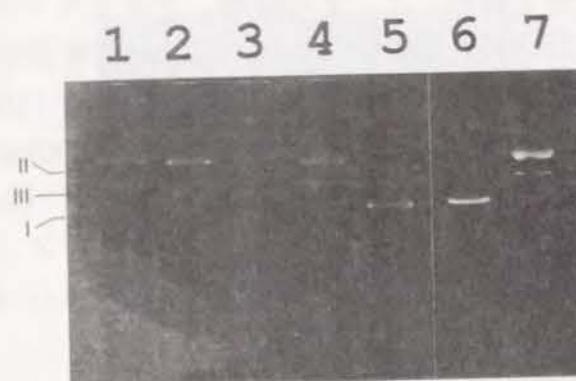


図4 有酸素条件および無酸素条件におけるESPA1のDNA切断

無酸素条件下（レーン1、3）及び有酸素条件下（レーン2、4）、ESPA1（10 μ M）によって20 $^{\circ}$ C、5分間処理したpBR322DNAのアガロースゲル電気泳動像。レーン1及び2はESPA1単独で処理したものを、レーン3及び4はジチオスレイトール（0.1mM）存在下ESPA1により処理したものを、またレーン5はDNAブランクを各々示す。レーン6及び7はペプロマイシン-鉄（II）錯体（20 μ M）により無酸素条件下（レーン6）及び有酸素条件下（レーン7）0 $^{\circ}$ Cにおいて20分間処理した結果を示す。

気泳動像である。有酸素条件下（レーン2、4）におけるESPA1のDNA切断活性は、無酸素条件下（レーン1、3）における結果とほとんど同じであり、この反応に酸素が本質的には影響を与えていないことを明確に示している。なお、同様の実験条件に於てペプロマイシン-鉄（II）錯体の有酸素系で発現するDNA切断活性（レーン7）は脱酸素系において強く抑制された（レーン6）。この結果より、ここで用いた脱酸素法が、プレオマイシン類縁抗生物質（11）の様に酸素をDNA切断の補助因子として必要とする化合物の活性阻害に関して有効であることは明らかである。

さらに筆者は、ESPA1が活性化される際の活性酸素ラジカル種の有無を調べるため、活性酸素種の除去に関与している酵素あるいは薬物の、DNA切断反応に対する影響を観察した。その結果、ジチオスレイトール (0.1mM) によって活性化されたESPA1 (1 μ M) のDNA切断反応 (20 $^{\circ}$ C、5分) は、活性酸素種の影響を強く抑制するカタラーゼ (10 μ g/ml、450U/ml)、スーパーオキシドジスムターゼ (0.1mg/ml、300U/ml)、ヨウ化カリウム (1mM)、1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン (1mM)、D-マンニトール (1mM)、N-tert-ブチル-a-フェニルニトロソ (100mM)、又はチロン (1mM) の添加によって全く影響されなかった (図5及び図6)。

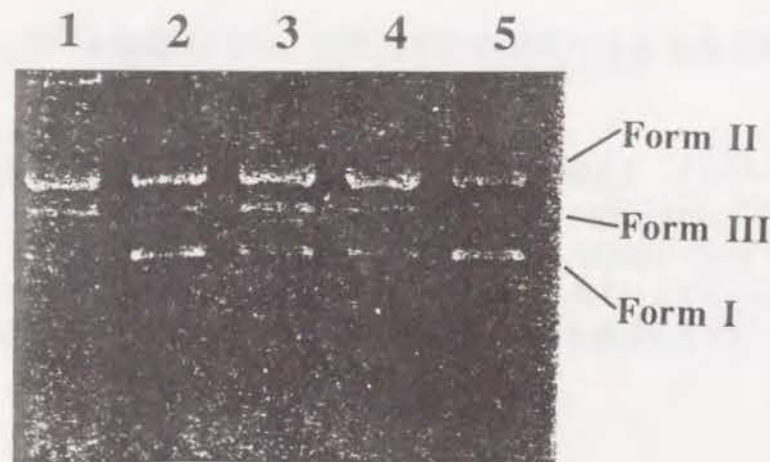


図5 ESPA1のDNA切断反応に対するカタラーゼ及びSODの影響

レーン2~5は各々、熱変性SOD (0.1mg/ml)、SOD (0.1mg/ml、300U/ml)、熱変性カタラーゼ (10 μ g/ml)、またはカタラーゼ (10 μ g/ml、450U/ml) の存在下、ESPA1 (1 μ M) - ジチオスレイトール (0.1mM) 系によって20 $^{\circ}$ C、5分間処理したpBR322DNAのアガロースゲル電気泳動像を示す。レーン1は酵素非存在下においてESPA1-ジチオスレイトール系により処理した結果を示す。



図6 ESPA1のDNA切断反応に対する種々のラジカル消去剤の影響

レーン1~5は各々、マンニトール (1mM)、KI (1mM)、1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン (1mM)、チロン (1mM)、またはN-tert-ブチル-a-フェニルニトロソ (100mM) の存在下、ESPA1 (1 μ M) - ジチオスレイトール (0.1mM) 系によって20 $^{\circ}$ C、5分間処理したpBR322DNAのアガロースゲル電気泳動像を示す。レーン6はラジカル消去剤非存在下におけるESPA1-ジチオスレイトール系による処理を、またレーン7はDNAブランクを示す。

以上の観察は、酸素及び活性酸素ラジカル種がESPのDNA鎖切断に直接関与していないことを強く示唆している。DNA切断分子として知られているプレオマイシン-鉄 (12、13)、o-フェナンスロリン-銅 (14、15)、EDTA-鉄 (16)、メチジウムプロピルEDTA-鉄 (MPE-鉄) (17) などは補助因子として酸素を要求し、それを活性ラジカル種に変換することによって反応を進行させている。これらの薬物と比較してESPA1は全く異なったDNA切断機構を有していると考えられる。

ESPA1産生菌から発見されたESPXの構造 (図7) は、この反応機構の解釈に重要な手掛かりを与えることになった (1)。ESPA1分子中の二つの三重結合は、ブリッジヘッド二重結合の存在によって空間的に広げられている (スキーム1、1)。生体内酵素還元等によってトリスルフ

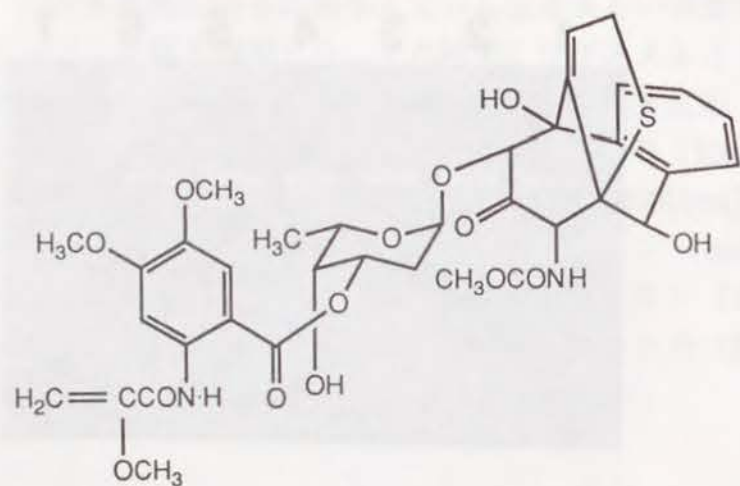
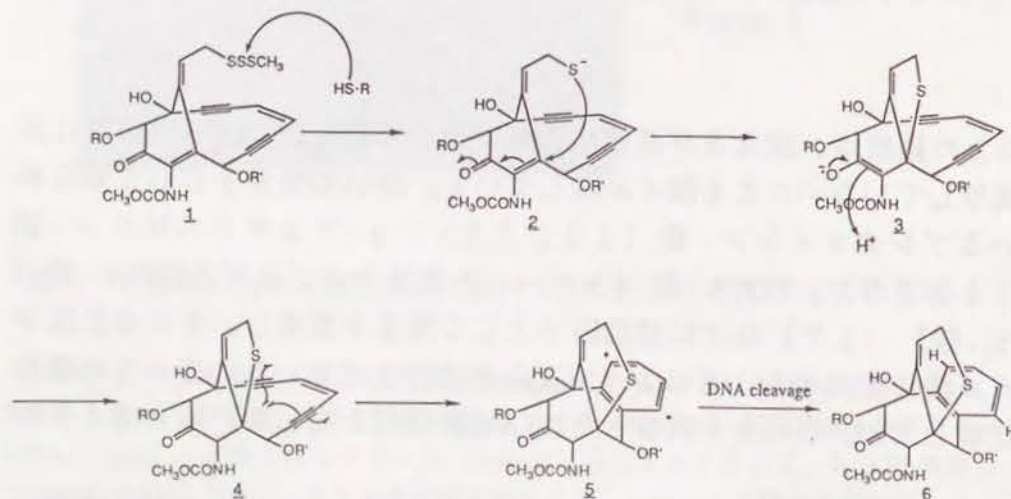


図7 エスペラミシンXの構造

イドから生じるチオレートアニオン (2) がブリッジヘッド二重結合に Michael 型付加をする (5、18、19) (3)。この付加物 (4) ではブリッジヘッド炭素の結合角度の減少のために、1,5-ジイン-3-エンを含む十員環にひずみを生じ、二つの三重結合の末端同士が接近している。このため常温で芳香環化反応である Bergman 転位が進行する。このとき生成する1,4-デヒドロベンゼンジラジカル (5) が、DNA 存在下においてデオキシリボース中の水素を引き抜き、結果としてDNA切断が起こると推測される (20)。現在1,5-ジイン-3-エンを含む化合物の Bergman 環化反応に関する知見が各方面において蓄積されている (21~25)。1,5-ジイン-3-エンにおける二つの三重結合末端間の距離が 3.20~3.31Å 以下のとき、室温で Bergman 反応が進行し得るという分子力場計算 (MM2) の結果 (24) も上記のESPA1 活性化機構を支持している。一方ESPA1と同系列の分子構造を有するカリケミシン (CAL) (26) (図8) が炭素中心ラジカルを生じることが、 CD_2Cl_2 中の重水素を引き抜くことから証明されている (27)。このようにESP-CAL系抗生物質は作用メカニズム的にも新しいタイプのDNA切断活性を持つ化合物と考えられ、新型抗腫瘍剤としての臨床における発展が期待されている (1、2、5、18、26)。



スキーム1 ESPA1の還元活性化系におけるDNA切断機構

第三節 エスペラミシン分子の塩基配列特異的 切断とDNA相互作用様式

ESPA1 - ジチオスレイトール系によるDNA切断における攻撃塩基部位を検索するため、DNA塩基配列決定法の一つである Maxam - Gilbert 法 (8) を適用して実験を行った。

図9 レーン4 及び 11 は、その実験結果の一例として、片側 5' 末端を ^{32}P で標識したプラスミド pUC19 DNA の制限フラグメント (Acc I と Acc II により調製した 322 塩基対のDNA断片) をESPA1 (50 μM) - ジチオスレイトール (0.5mM) 反応系 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、15分間) により切断し、変性ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った結果である。対応する塩基部位は Maxam - Gilbert 法より求め表示した。泳動像におけるバンドの黒化度が強いほどそれに対応する塩基部位での切断強度が大きいことを示している。

図からわかる通り、ESPA1によるDNA切断反応では明らかに優先的な切断部位が存在する。その最も有効な切断部位は、チミン塩基であり、その攻撃塩基の頻度 (T>C>A>G) は類似したDNA切断活性を有するカリケミシン (C>>T>A=G) (18)、ネオカルチノスタチン (T>A>C>G) (28~33)、あるいはプレオマイシン - 鉄 (C>T>A>G) (34) とは異なっていた。ネオカルチノスタチンによるDNAの損傷はチミン及びアデニン塩基で生じ、すべてのチミン部位で切断が引き起こされる (29、30、35、36)。ESPA1に関してもその最も優先的な切断部位はチミン塩基であるが、攻撃塩基の順序は明らかにネオカルチノスタチンと異なっている。ESPA1によるDNA分解はピリミジン塩基に対して高度に選択的である。加えてESPA1は 5' - CTC - 3'、5' - TTC - 3'、5' - TTT - 3' のようなオリゴピリミジン領域中のチミン及びシトシン塩基、あるいは 5' - TG - 3'、5' - CG - 3' 配列中のチミン及びシトシン塩基を優先的に攻撃する。ネオカルチノスタチンは場合により 5' - TG - 3' 配列におけるチミン塩基を優先的に切断する (29) が、隣接塩基に対する明白な特異性は示さない。構造的にESPA1との類似性が極めて高いカリケミシンもまた 5' - TTC - 3'、5' - CTC - 3' の様なオリゴピリミジン領域中のチミン及びシトシンを優先的に攻撃する事が報告されている (18) が、攻撃塩基の順序はESPA1とは異なっている。またプレ

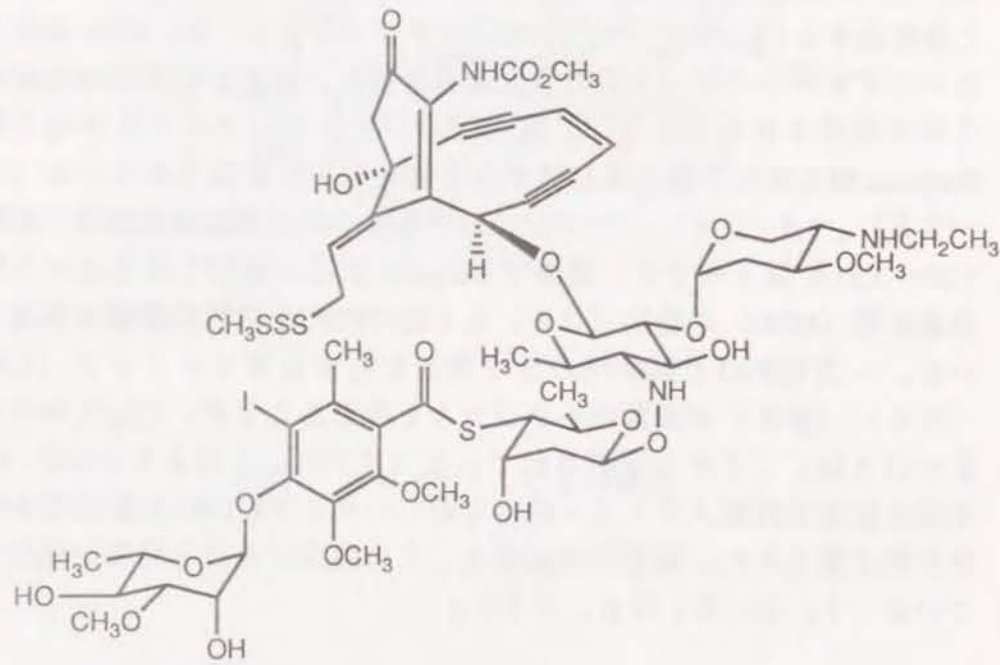


図8 カリケミシン γ_1 の構造

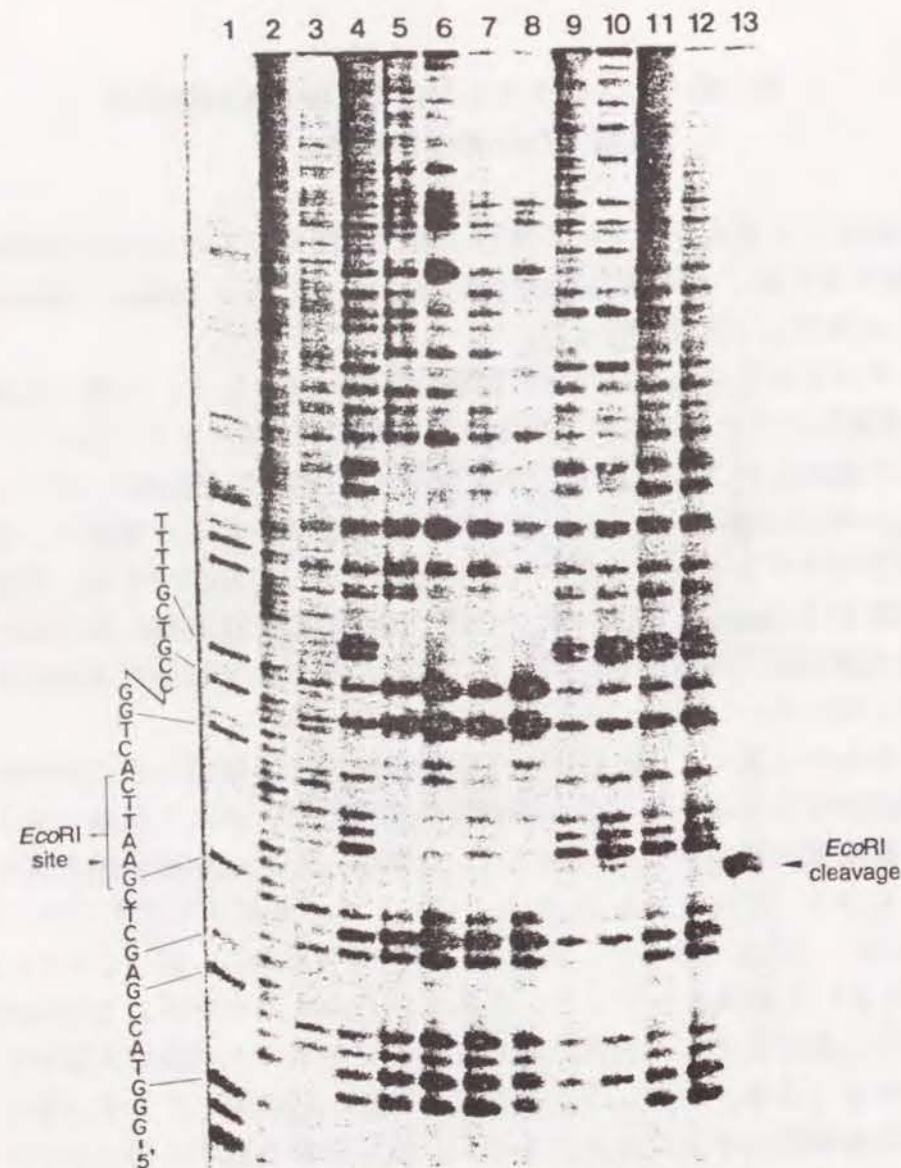


図9 DNAグループ修飾によるESPA1切断部位の変化

5'-末端 ^{32}P 標識 pUC19 DNA Acc I - Acc II 未修飾断片 (レーン4、11)、及びネトロプシン (レーン5、6)、ディスタマイシンA (レーン7、8)、アクチノマイシンD (レーン9、10)、またはEcoRI (レーン12) による修飾断片をESPA1によって処理した結果のオートラジオグラフィ像。基質DNAをこれらの修飾薬物とともに薬物/ヌクレオチド比0.05 (レーン5、7、9) 及び0.25 (レーン6、8、10) の条件下、37°Cにおいて30分間インキュベートした後、ジチオスレイトール (0.5mM) 存在下ESPA1 (50 μM) とともに37°Cにおいて15分間処理した。レーン13はEcoRIによる未修飾DNAの切断を、またレーン1、2、及び3はMaxam-Gilbert反応 (各々G、A>C、及びC+T) を示す。

オマイシンによるDNA鎖切断においても同様のピリミジン塩基特異的分解が観察されている。プレオマイシンの場合、優先的切断部位は5'-GC-3' 及び5'-GT-3' 配列である (37~40)。

次にESPA1とDNA結合試薬との相互作用を観察しESP分子のDNAへの結合様式を探るため、あらかじめ各種試薬を結合させたDNAをESPA1-ジチオスレイトール系で切断し、その切断活性及び切断塩基部位の変化を上記と同様の方法を用いて検索した (図9)。ネトロプシン、ディスタマイシンA、アクチノマイシンD (図10)、あるいは制限酵素EcoRIを用いてこの基質DNAを非共有結合的に修飾した後にESPA1 (50 μM) -ジチオスレイトール (0.5mM) 系において37°C、15分間処理した。

図9に明白に示したように、ネトロプシンあるいはディスタマイシンAによるDNAの前処理によってESPA1の塩基特異的切断は大きな影響を受けた。この二種類の薬物はともに典型的なDNAマイナーグループ結合物質であり、アデニン及びチミンに結合特異性を有している (41)。実際に、ESPA1本来の切断部位であるA,Tオリゴマー部位 (5'-AATTC-3'、5'-TTTTA-3'、5'-AAAA-3') はネトロプシン及びディスタマイシンAによって強く保護された。また、これらの薬物は5'-AATTC-3' と5'-TTTTA-3' の間にある二つのシトシン塩基に対する切断を増強した。これらの観察結果はネトロプシン及びディスタマイシンAによる局所的なDNAの構造変化を暗示している。5'-GCTCG-3' 及び5'-CCG-3' の様な切断部位もまた、DNAのマイナーグループにGC塩基対を通してインターカーレートするアクチノマイシンDによって保護された (42)。一方、制限酵素EcoRIはDNAのメジャーグループ側から5'-GAATTC-3' の二本鎖配列を選択的に認識する (43)。EcoRIは Mg^{2+} の存在下でこの制限部位を切断する (図9、レーン13) が、EDTAを使用し Mg^{2+} の影響を除去することによってこの配列のメジャーグループ側を保護することができる。しかしながら、EcoRIの結合によるESPA1切断パターンに変化は観察されなかった (図9、レーン12)。

以上の結果をまとめ、3'末端標識した相補鎖DNAの切断部位とともに図式化して図11に掲げた。これらの結果は、ESPA1がB型DNAにマイナーグループ側から相互作用していることを強く示唆している。この性質はDNAヘリックスの3'側に三塩基対ずれた対称な切断パターンからも補足され、ESPアグリコンの1,5-ジイン-3-エン部位がヘリックス

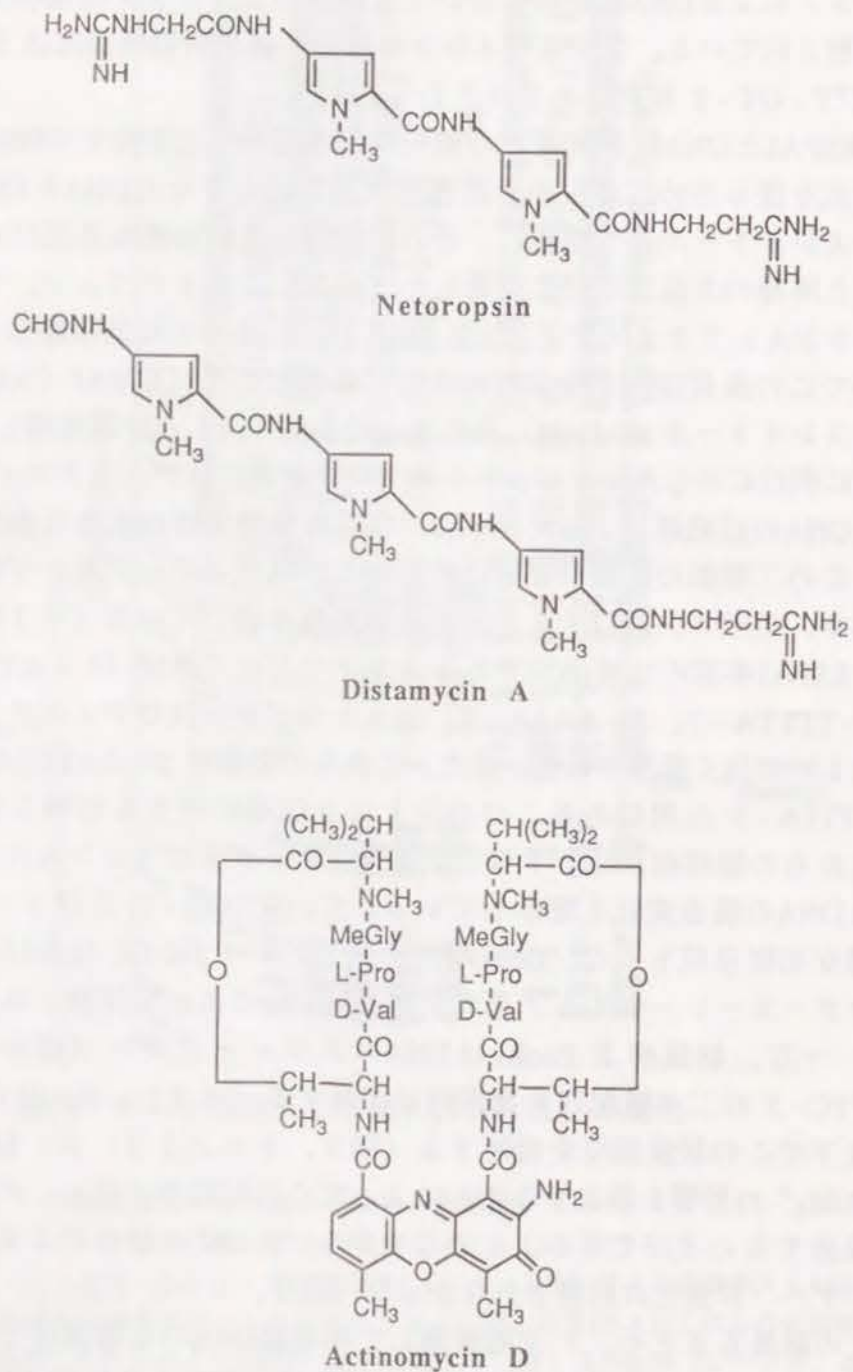


図10 ネットロプシン、ディスタマイシンA
及びアクチノマイシンDの構造

内の塩基対平面に対して垂直に位置していることを暗示している。更に詳細な結合状況を把握するために、ESP生成ラジカルDNAデオキシリボース分子に対する攻撃部位の特定、NMRやX線結晶解析によるDNA中のESP分子配座の決定等今後の研究が期待される。

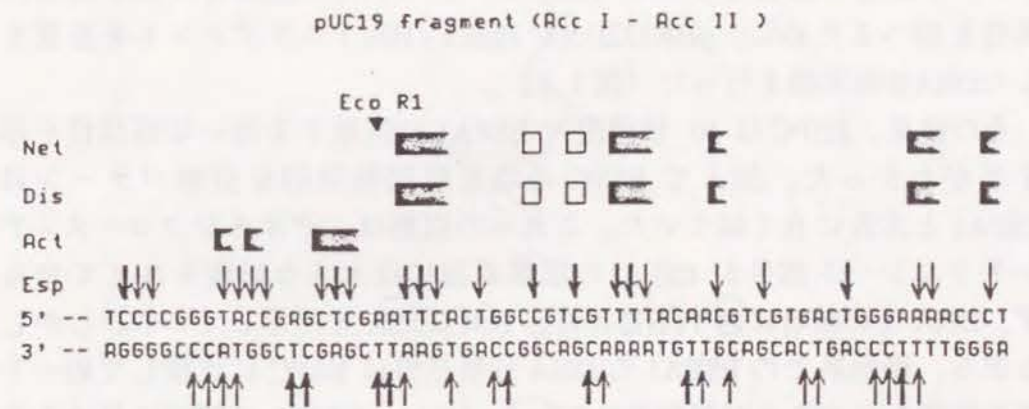


図11 ESPA1 (Esp) のDNA切断部位、及びネットロプシン (Net)、
ディスタマイシンA (Dis)、またはアクチノマイシンD
(Act) の前処理によって誘起された変化

矢印は切断部位を、矢印の太さはオートラジオグラフィー像のバンドの相対的な強度を示す。■はDNAの切断が抑制された部位を、□は増強された部位を各々表す。また▼はEcoRI切断部位を示す。

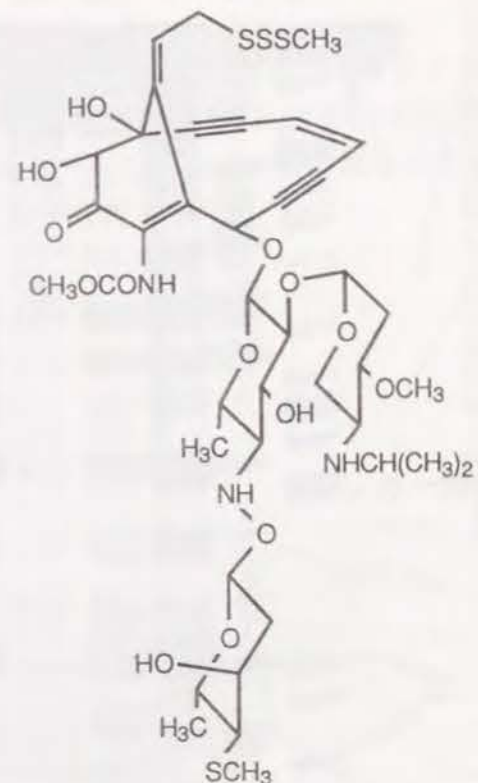
第四節 DNA分解におけるエスペラミシンの 構造活性相関

ESPA1は天然物としては他に類を見ない構造を持つ特徴的な糖鎖部を有している。分子中の主要な骨格を占めるこの構造単位のDNA切断反応における役割を調べるために、二種類のESP類縁体を用いてDNA塩基配列特異性を決定する実験を行った。ここで用いた類縁体ESPCはESPA1から2-デオキシ-L-フコースと芳香環（アントラニレート）部分を取り去ったものである。またESPDはESPCからさらにチオメチルヘキサピラノース部分を除去してある（図12）。これらの類縁体の攻撃塩基特異性を調べるために、pBR322DNA Hinf I-Hha Iフラグメントを基質としたDNA切断実験を行った（図13）。

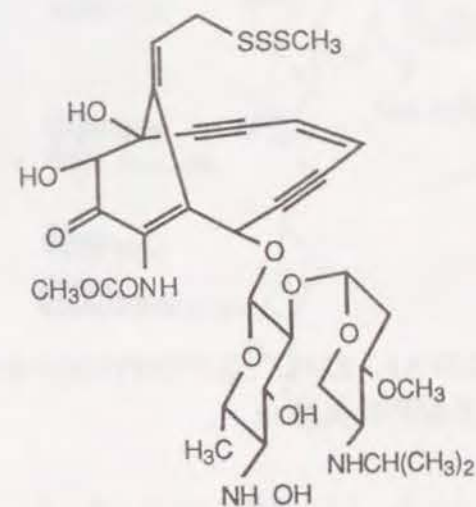
その結果、ESPCは10倍濃度でESPA1に匹敵する高い切断活性を示す事がわかった。加えてESPCの塩基配列特異的な分解パターンはESPA1と非常に良く似ていた。これらの観察は、デオキシフコース-アントラニレート部分がESPA1の塩基認識には大きな影響を与えておらず、DNAとの結合に対する寄与も小さいことを暗示している。しかしながら、細胞系でのESPA1のDNA分解活性はESPCに比較して約一千倍の強度を示すことが報告されている（5）。ESPA1の細胞におけるこの強力な活性はデオキシフコース-アントラニレート部分の細胞膜薬物輸送に対する担体としての関与を意味しているのかも知れない。

一方、ESPDもまたほとんど同様の配列特異性を示すが、そのDNA分解活性はESPA1及びESPCと比べてかなり低かった。この結果はESPA1のトリサッカライド側鎖がDNAに対する結合に関して重要な役割を担っていることを強く示唆している。この糖鎖を構成する糖は全て6-デオキシ糖であり、遊離水酸基は2個にすぎない。このためトリサッカライド鎖はかなり疎水性であり、DNAマイナーグループ内で疎水性相互作用により会合安定化している可能性が考えられる。更に、チオメチルヘキサピラノースのN-O結合がDNAの極性官能基と水素結合を形成している事も予測される。

また各類縁体の共通部分であるESPアグリコンがこの抗生物質による配列特異的分解に関して必須の構造単位である事が推察される。アグリコン部は1,4-デヒドロベンゼンジラジカルを形成してDNA切断に直接関



Esperamicin C



Esperamicin D

図12 エスペラミシンC及びエスペラミシンDの構造

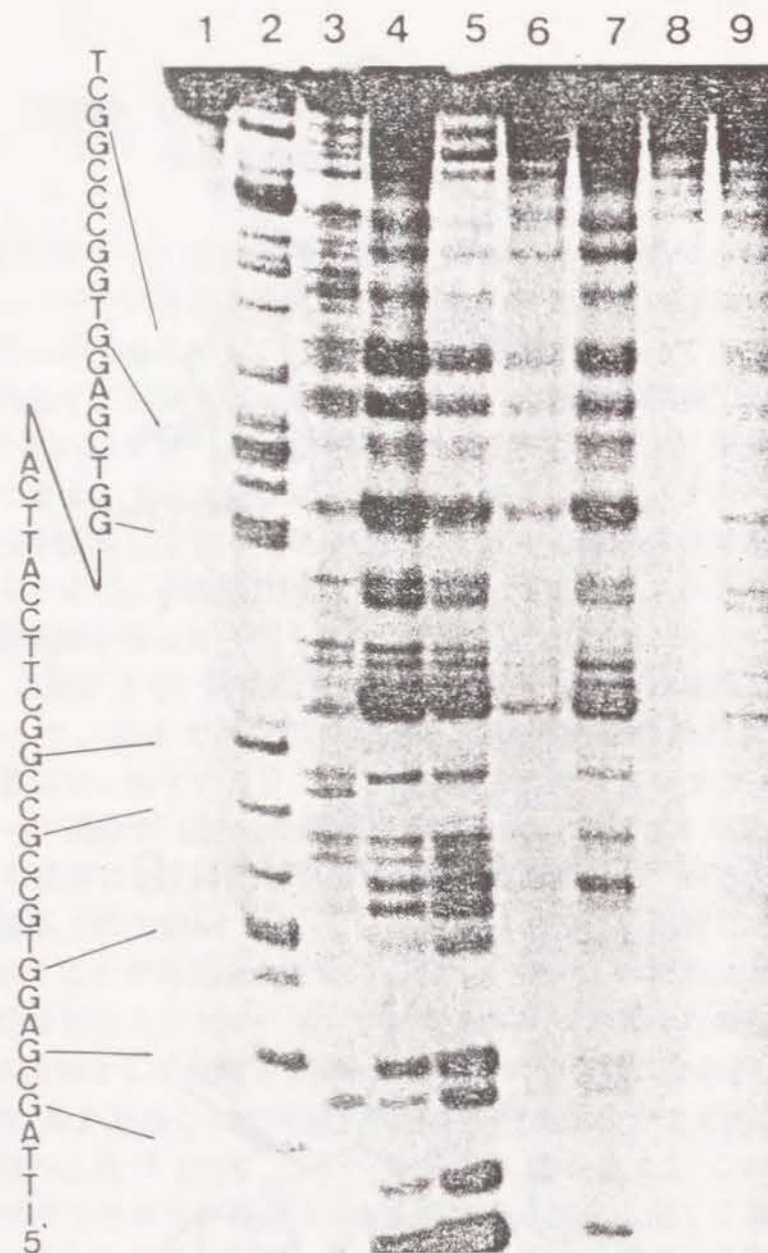


図13 ESPA1、ESPC、及びESPDのDNA切断における塩基配列特異性

ESPA1 (レーン4、5)、ESPC (レーン6、7)、ESPD (レーン8、9) によって処理した5'-末端 ^{32}P 標識 pBR322 DNA Hinf I - Hha I 断片のオートラジオグラフィ像。DNAサンプルはジチオスレイトール (10mM) 存在下ESP 0.2 μM (レーン4、6)、2 μM (レーン5、7、8)、または20 μM (レーン9) とともに37 $^{\circ}\text{C}$ において30分間処理した。レーン1はDNAブランクを、レーン2及び3はMaxam-Gilbert反応 (各々G及びC+T) を示す。

わる反応の中心であり、この部分が塩基認識をも兼ねていることは特に興味深い。このように、ESPA1はDNA鎖切断部位、塩基配列認識部位、及びDNA結合部位といった異なる機能原子団を同一分子中に所有していることが理解できる (図14)。

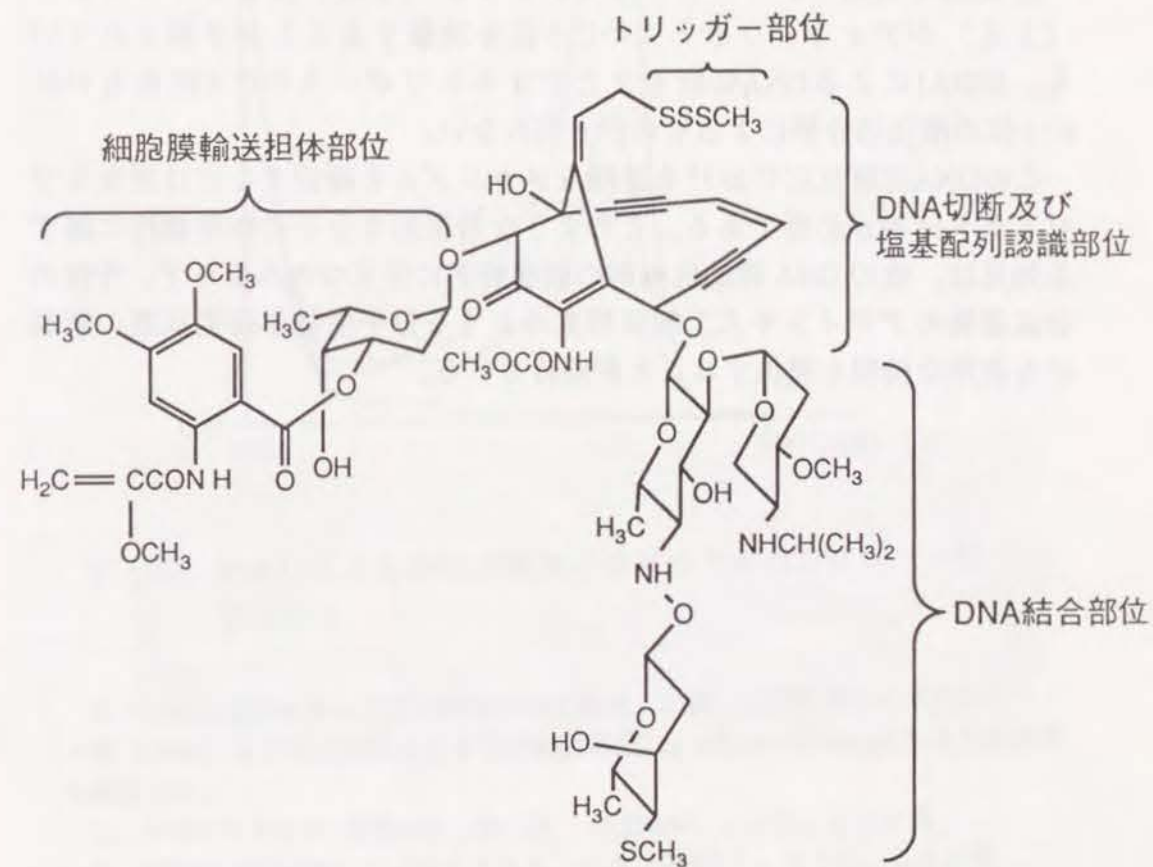


図14 エスペラミシンA1の機能領域

ブレオマイシンによるDNA切断の際に生じるマロンジアルデヒドは核酸塩基とデオキシリボース環中の三つの炭素からなり、この反応がデオキシリボースのC-4'位を酸化的に攻撃することに起因していることを示している(37、44)。チオバルビツール酸を用いた程色反応により、ESPA1のDNA切断反応によってマロンジアルデヒド様の化合物がブレオマイシンの場合と同様に検出された(図15)。このチオバルビツール酸反応プロダクトはo-フェナンスロリンの様にデオキシリボースC-1'位を攻撃するDNA切断試薬においてほとんど生成しない(22)。一方最近の研究で、ネオカルチノスタチン(46)及びカリケミシン(18)がデオキシリボースのC-5'位を攻撃することが予想されている。ESPA1によるDNA切断もまたデオキシリボースのC-4'位あるいはC-5'位の酸化的分解によるものかも知れない。

このDNA切断反応における詳細なメカニズムを確定するには更なるプロダクト分析が必要である。このような特徴的な分子の作用機作に関する知見は、他のDNA標的抗癌剤の機構解明に役立つのみならず、今後の合成薬物のデザインや人工制限酵素のような分子生物学研究試薬の創製にも有用な情報を提供することが期待される。

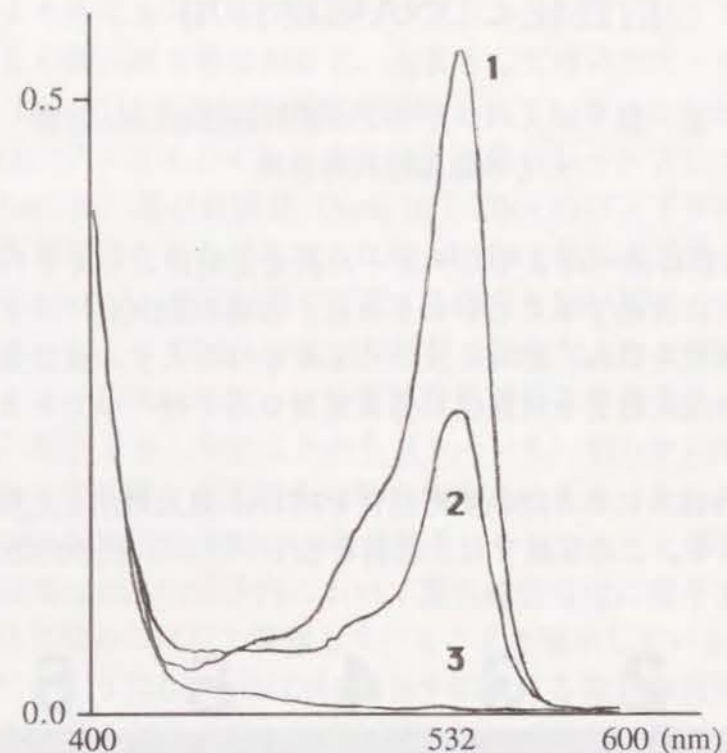


図15 ESPA1によるDNA切断反応溶液のチオバルビツール酸アッセイ

以下の反応条件において子牛胸腺DNAを処理した後、反応溶液をチオバルビツール酸(5mM)とともに92℃にて20分間熱処理し、400nm~600nmにおける吸光度を測定した。

1. バプロマイシン(0.2mM) - 鉄(II)(0.25mM)、0℃、20分間
2. ESPA1(0.3mM) + ジチオスレイトール(10mM)、37℃、30分間
3. ジチオスレイトール(10mM)、37℃、30分間

第二章 紫外線照射によるエスペラミシンの活性化とDNA切断作用

第一節 エスペラミシンの紫外線誘起DNA切断とその塩基配列特異性

ESPA1は前章に述べたようにチオール系還元剤によってそのDNA切断活性を飛躍的に亢進することがわかった。筆者はESPA1に関する更なる活性化系の追究を試み、254nm及び310nmを中心とする波長領域の紫外線照射がこの抗生物質を活性化し得る重要な因子の一つであることを見出した。

ESPA1-紫外線系によるDNA切断活性をESPA1-還元剤系と比較したものが図16である。この実験では、基質としてプラスミドpBR322DNA、紫

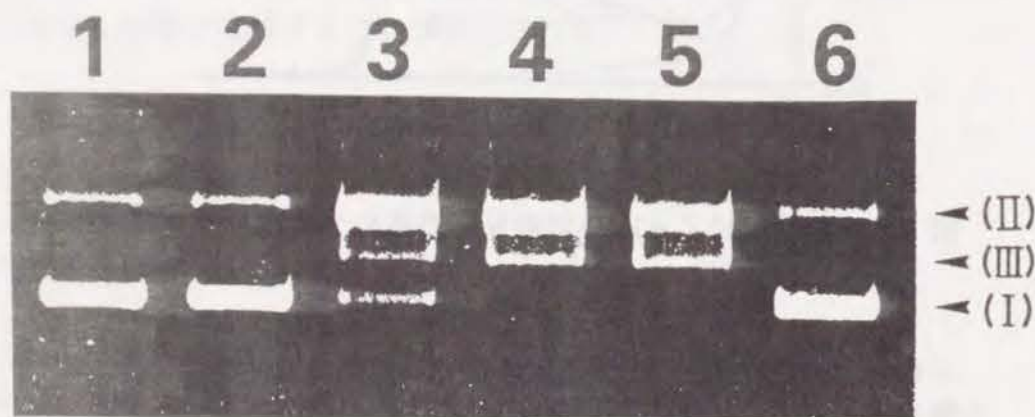


図16 紫外線活性化ESPA1によるDNA切断

ジチオスレイトール (1mM) 存在下 (レーン3、5) または非存在下 (レーン2、4)、及び紫外線照射 (レーン4、5) または遮光条件 (レーン2、3) においてESPA1 (1 μ M) によって処理したpBR322DNAののアガロースゲル電気泳動像。レーン1はDNAブランクを、レーン6はESPA1非存在下、ジチオスレイトール及び紫外線によって処理した結果を示す。

外線光源として254nmに極大波長を持つ殺菌ランプ、そしてチオール系還元剤としてジチオスレイトールを用いた。ESPA1を暗所に於て単独でDNAに加えた系にみられるDNAのバンド (レーン2) は、ブランク (レーン1) との間に殆ど相違がなく、基質として用いたスーパーコイル状 (form I) DNAに対する切断活性が誘起されていないことがわかる。一方、ESPA1にジチオスレイトールを加えた系 (レーン3) では明らかに開環状 (form II) 及び直鎖状 (form III) DNAのバンドが増加し、基質DNAの切断が確認された。これと比較しESPA1-紫外線活性化系 (レーン4) に於てもESPA1-還元剤系に匹敵する強力なDNA切断の生じていることが観察された。このDNA切断が紫外線で活性化されたESPA1に起因していることは、ESPA1を加えない紫外線照射のみの反応系に於ては殆ど基質DNAに障害を与えないことから (レーン6) 明らかに示唆される。またESPA1に紫外線と還元剤を同時に作用させた系 (レーン5) に於ても、そのDNA切断活性はESPA1-紫外線系 (レーン4) と同程度だった。この観察結果はESPA1分子内において紫外線活性化に関与する部分が還元剤活性化に関わる部位と重複していることを暗示している。

以上述べたようにESPA1はDNA存在下における紫外線照射によって切断活性を発現するが、このとき直接的にDNAの分解に関与する化学種が還元剤活性化系と類似した不安定な炭素中心ラジカル種であるならば、ESPA1に対する紫外線の影響は不可逆的に進行していくことが予想される。このことを確認するためにDNA非存在下においてESPA1を紫外線処理し、その後反応系中に基質DNA及び還元剤ジチオスレイトールを加えることにより紫外線前処理がその後のESPA1-ジチオスレイトール系におけるDNA切断活性に与える影響を検討する実験を行った。

この実験における紫外線前照射時間は0分、15分、30分、又は60分とし、全サンプルとも紫外線照射後速やかに1mMのジチオスレイトールを加え37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした。表3は、この実験で用いた基質pBR322DNAのコンホメーション変化をエチジウムブロマイド含有アガロースゲル電気泳動にて検出し、form I、form II、及びform III DNAの割合をレーザーデンストメーターによって数値化したものである。

この表からわかるように、form I DNAの割合は紫外線前照射時間が長くなるにしたがって増加していき、この実験系における60分間の紫外

る。図18は同様の実験を、基質DNAとして、5'末端を³²Pで標識したpBR322DNA SalI-DraII 制限フラグメントを用いて行ったものである。各塩基に対する攻撃頻度は矢印の大きさによって表した。この場合においても還元剤活性化系と紫外線活性化系の配列特異性は良い一致を示し、この現象が基質DNAの種類に関わらず再現性のあることが確認された。

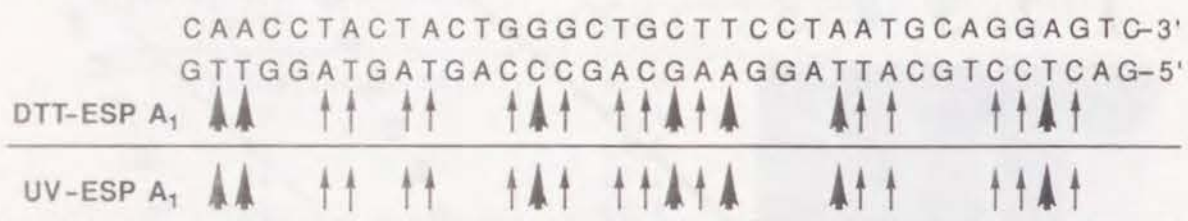


図18 pBR322 DNA Sal I - Dra II 断片のジチオスレイトール (DTT-ESP A₁) 存在下及び紫外線照射 (UV-ESP A₁) におけるESP A₁による切断塩基部位

矢印とその太さは分解部位及びオートラジオグラフィ像におけるバンドの相対強度を示す。

第一章第四節に述べたように、ESP A₁分子の中でDNA塩基配列の認識を担う部分はアグリコン部である可能性が高い。塩基配列に関わらず得られるESP A₁の還元剤及び紫外線の両活性化系による攻撃塩基特異性の一致を示す観察結果は、アグリコン部分の化学変化及び活性化メカニズムに高い類似性のあることを暗示している。即ちチオール系還元剤と同様に、紫外線は1,5-ジイン-3-エン部位の芳香環化を誘導し、この際經由する1,4-デヒドロベンゼンジラジカルがESP A₁のDNA分解活性に直接関与している事が予測される。ESP A₁をチオール系物質とともに16時間処理することによって得られるESP Z (5) (図19)はチオール誘起活性を消失している。このことから示されるように、1,5-ジイン-3-エン部位はESP系抗生物質におけるDNA切断反応に対する最も重要な官能基の一つである。ESP A₁に対する紫外線照射は活性ラジカル種を經由してESP Zと類似した不活性種を形成しているかも知れない。筆者の実験におけるESP A₁に対する254 nmの短波長光の照射実験では、実際に有機フ

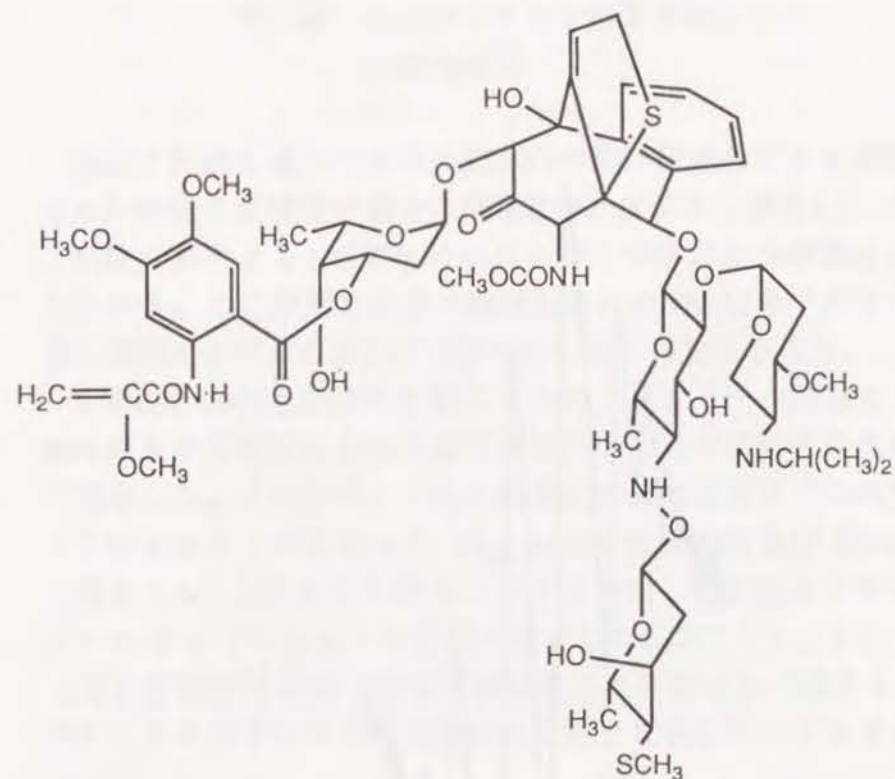


図19 エスペラミシンZの構造

リーラジカルが5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド(DMPO)を用いたESRスピントラッピング法によって明らかに検出された(図20)。さらに、エンジンユニットの芳香環化によって特徴付けられるESP Zは光誘導分解活性を示さなかった。この実験により得られた結果は、紫外線活性化されたESP A₁のDNA切断反応がチオール系還元剤で処理された場合と同様にエンジン基を1,4-デヒドロベンゼンジラジカルに変換することに直接起因している事を示す有力な証拠になると考えられる。チオール系還元剤による活性化系と類似したこのような化学変換は、生体内還元とともに天然の紫外線もまた微生物の二次代謝産物としてのESP A₁本来の働きに関与していることを暗示している。実際、ESP A₁を活性化し得る300 nm以上の波長の紫外線は太陽光中に大量に含まれている。

第二節 エスペラミシンの紫外線による活性化機構

前節で詳細に述べたようにESPA1の紫外線照射による活性化には、チオールによる活性化の場合と同様ESPアグリコン部の1,5-ジイン-3-エン部位から生じる1,4-デヒドロベンゼンジラジカルが関与していると考えられる。ここで筆者は紫外線照射されたESPA1分子がラジカル形成に至る機構を考察する目的で実験を行い以下の知見を得た。

まずESPA1の吸光特性を調べるため、メタノール溶液としたESPA1の紫外部及び可視部における吸収スペクトルを可視紫外分光光度系によって測定した。その結果この抗生物質には紫外領域に二つの大きな吸光ピークのあることがわかった (λ_{\max} 323nm (ϵ 10900) 及び 253nm (ϵ 25900)) (図2 1-a)。これらの吸光スペクトルは、ESPA1分子からデオキシフコース-アントラニレート部位を除去したESPC (1, 5) (第一章、図1 2) に関する同様の測定では観察されなかった (図2 1-b)。吸光スペクトルは分子内の各官能基団の性質を反映していると考えられること

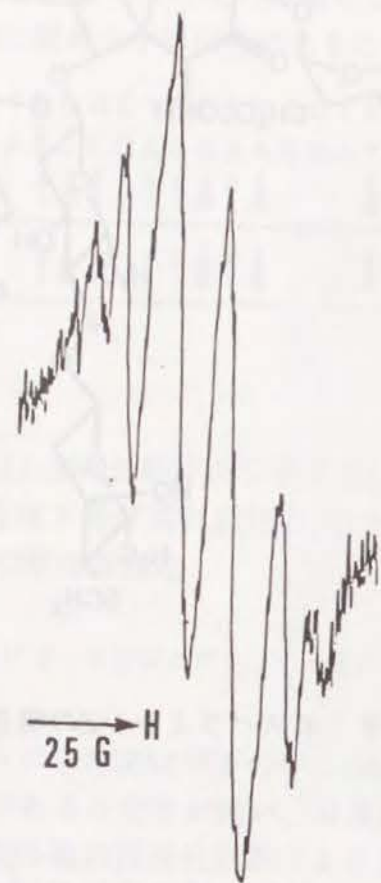


図2 0 ESPA1-DMPO系に紫外線照射した結果のX-バンドESRスペクトル

ESPA1 (50 μ M) 及びDMPO (5mM) を含む50%メタノール溶液に紫外線を5分間照射した。同様の実験条件において、DMPOのみの反応系にはこのようなESRシグナルは見られなかった。

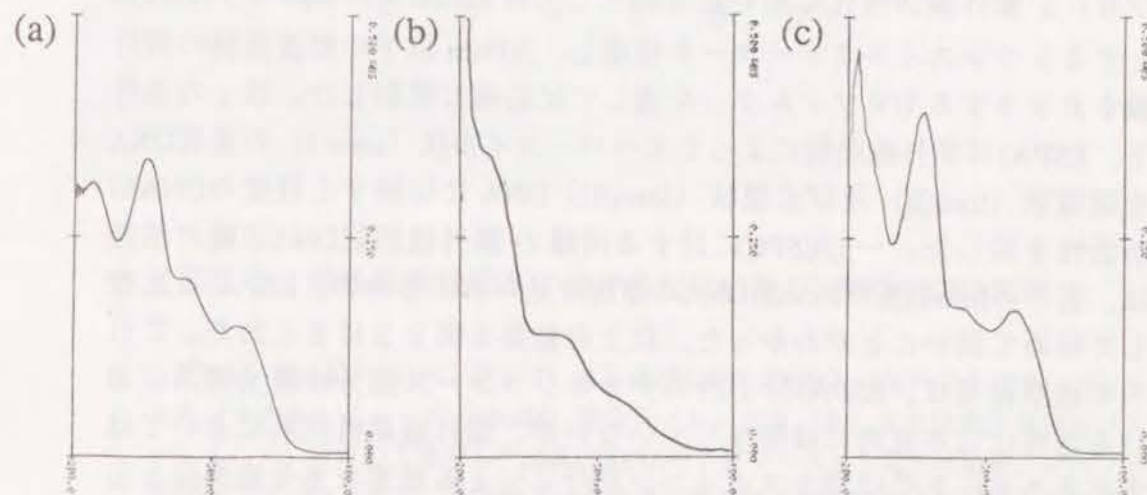


図2 1 エスペラミシンの紫外吸光スペクトル

- (a) メタノール溶液としたESPA1 (10 μ M) の紫外吸光スペクトル
- (b) メタノール溶液としたESPC (15 μ M) の紫外吸光スペクトル
- (c) メタノール溶液としたESPZ (20 μ M) の紫外吸光スペクトル

から、ESPCにおける二つのピークの消失は、323 nm 及び 253 nm 波長の吸光の原因となる原子団がESPA1分子中のデオキシフコース-アントラニレート中に存在することを意味している。この結果は、トリスルフィドの消失、イオウ原子の Michael 付加による環化反応、及び1,5-ジイン-3-エン部のBargman 転位による芳香環化等ESPA1からアグリコン部のみが大幅に変化したESPZ (5) (第一章、図19) においても依然としてESPA1と同一波長に吸光スペクトルをもつという測定結果によっても確認された (図21-c)。

紫外線照射によるESPA1の活性化には紫外領域に吸光波長をもつ分子内官能基であるデオキシフコース-アントラニレート部分に関与していることが予想される。そこで筆者はESPA1とESPCの紫外線活性化系におけるDNA切断能を比較する実験を行うことによって、ESPCにおいて除去されているデオキシフコースアントラニレートの役割を確認することを試みた。ESPA1とESPC (2 μ M) の反応条件は大過剰のジチオスレイトール (10mM) を添加することによって基質DNAを同程度にフラグメンテーションさせる活性を発現するように設定した (図22、レーン3及び6)。紫外線活性化に用いた光源としては310nm紫外領域を中心波長とするトランスイルミネーターを使用し、300nm以下の短波長側の紫外線をカットするUVフィルターを透過して反応液に照射した。以上の条件下、ESPA1は紫外線照射によってスーパーコイル状 (form I) の基質DNAを開環状 (form II) 及び直鎖状 (form III) DNAに切断する程度のDNA切断活性を示した。一方ESPCに対する同様の紫外線照射DNA切断の活性は、若干のform II及びform III DNAの増加は見られるものの、ESPA1と比較して極めて弱いことがわかった。以上の結果を図23にまとめた。これらの観察結果は、ESPA1分子内のデオキシフコース部分は還元剤系における活性化に本質的には関与していないが、紫外線活性化系においては光エネルギーを受け取りアグリコン部分に伝える重要な光受容部位として作用している事を明らかに示唆している。

還元剤活性化系において、ESPアグリコン部のトリスルフィドが還元された結果生じる高エネルギー Michael 付加生成体 (スキーム1、4) は、室温において速やかにバークマン転位反応を引き起こしエンジイン基を芳香環化する。この過程はESPのDNA切断反応における律速段階であり、室温では反応速度が大きいため還元剤の消費とほぼ同時にDNAの



図22 紫外線活性化系におけるESPA1及びESPCのDNA切断

ESPA1 (2 μ M) (レーン2、3、4) 及びESPC (2 μ M) (レーン5、6、7) によりジチオスレイトール (10mM) 存在下 (レーン3、6) または紫外線照射 (レーン4、7) において処理したpBR322DNAのアガロースゲル電気泳動像。レーン1はDNAブランクを示す。紫外線系は3分間の紫外線照射の後37 $^{\circ}$ Cにて15分間のインキュベーションを、他のレーン (レーン2~6) は37 $^{\circ}$ Cにおいて15分間のインキュベーションを施した結果を示す。

	ESP A1	ESP C
DTT-activation	+	+
UV-activation	+	-

図23 図22におけるDNA切断活性の評価

ESPA1及びESPCのジチオスレイトール活性化系 (DTT-activation) 及び紫外線活性化系 (UV-activation) DNA切断に対する活性評価を+ (活性有り)、- (活性無し) として表記した。

切断は終了すると考えられる。一方、ESPA1に紫外線を15分間照射し、その後暗所にてDNAを添加する実験を行ったところ、基質DNA存在下では全く紫外線を照射していないにもかかわらず、ESPA1を加えなかった対照系と比較して明らかなDNA切断活性が観察された。紫外線によって活性化されたESPA1もまた上記の還元剤系活性中間体と類似した化学種を経由して1,4-デヒドロベンゼンジラジカルを形成していくことが予想されるが、その中間体のエネルギー、即ちエンジイン環にかかる歪みの大きさは、DNA切断反応の速度より検討することができる。筆者は活性中間体の構造の手掛かりを得るため、紫外線照射を停止した時点からのESPA1のDNA切断活性残存時間及び残存活性強度を詳細に調べる実験を行った。

ここで行った実験には紫外線光源として254 nmを中心波長とする紫外線殺菌燈を使用し、15分間10 μ M ESPA1/DMSO溶液に照射した。この溶液は0分、15分、30分、1時間、2時間、または24時間37 $^{\circ}$ Cにおいてインキュベートした後、基質pBR322DNA含有反応液に各々分注し、最終的に紫外線処理ESPA1が1 μ Mとなるように調製した。この反応液を厳密に遮光してさらに15分間インキュベートし、エタノール沈殿

法によって系外にDNAを分離して反応を停止した。各々の反応系における基質DNAの切断状況の相違をエチジウムプロマイド含有アガロースゲル電気泳動法によって検出し (図24)、更にこの泳動像から各反応系におけるform I DNAの割合をレーザーデンシトメーターによって数値化した (表4)。これらの値を、紫外線照射をしていないESPA1を用いたコントロールレーン (レーン2) におけるform I DNAの割合から差し引いた数値 (ESP form I - ESP* form I (%)) を縦軸に取り、紫外線照射してから基質DNAを添加するまでの放置時間 (time (min)) を横軸に取ったグラフが図25である。このグラフにおける各ポイントを最小二乗法により計算すると割合良く指数曲線に近似された。グラフの横軸をx、縦軸

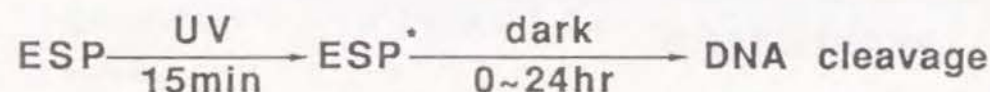


図24 ESPA1の紫外線処理後残存活性

ESPA1のDMSO溶液 (10 μ M) に紫外線を15分間照射した後、37 $^{\circ}$ C、暗所にて0分間 (レーン3)、15分間 (レーン4)、30分間 (レーン5)、1時間 (レーン6)、2時間 (レーン7)、及び24時間 (レーン8) インキュベートした。その後、各紫外線処理ESPA1溶液をpBR322DNA溶液に加え、終濃度1 μ Mに調製して37 $^{\circ}$ Cにおいて15分間処理し、アガロースゲル電気泳動によりDNA切断の強度を測定した。レーン1、9はDNAブランク、レーン2は遮光条件におけるESPA1のみのDNA切断を示す。

表4 ESPA1の紫外線処理後残存活性

time* (min)	ESP* .form I	ESP.form I (=42.2%) - ESP* .form I (%)
0	0.0	42.2
15	4.56	37.6
30	6.82	35.4
60	10.4	31.8
120	12.0	30.2
1440	41.4	0.8

* 紫外線照射後放置時間

図2.4における紫外線照射放置時間に対するform I DNAの割合 (ESP*.form I) 及び紫外線非照射ESPA1におけるform Iの割合 (ESP.form I:42.2%、図2.4; レーン2) と各ESP*.form I (%)の差 (ESP.form I - ESP*.form I)。DNA切断はデンシトメーターによって評価した。

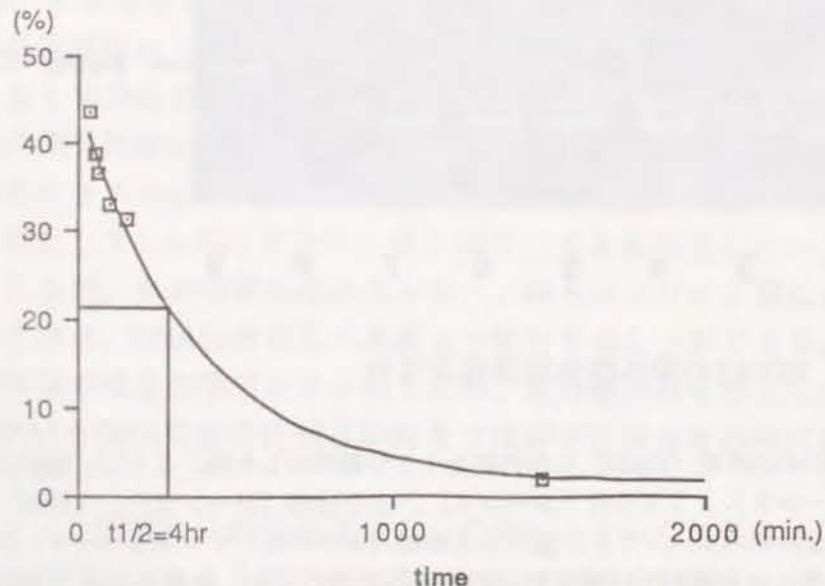


図2.5 紫外線照射後放置時間 (横軸、表4: time) とESPA1のDNA切断活性 (縦軸、表4: ESP.form I - ESP*.form I) の変化

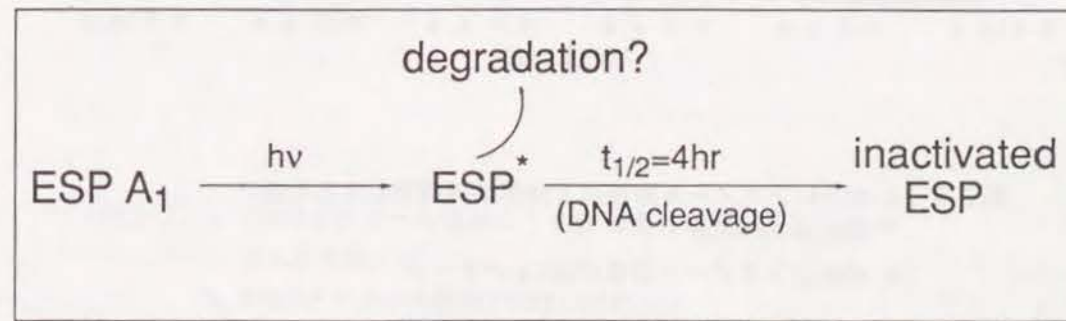
をyと置くと、この指数関数は

$$y=39.7 \times 10^{-1.18e-3x}$$

と表される。

このグラフより、15分の紫外線照射によって活性化されたESPA1が37℃において失活していく速度は半減期約4時間と見なすことができる。この実験結果から考察したESPA1の光化学変化をスキーム2にまとめて示した。このスキームにおけるESP*は紫外線によって活性化されたESPA1の準安定中間体を示している。この準安定中間体は4時間の半減期で徐々に失活していくが、その過程はDNA分解に直接関与する不安定なベンゼンピラジカルを形成することによって進行していくものと考えられる。

図2.6は254nm波長の紫外線を照射したESPA1メタノール溶液のHPLC分析の結果である。生成物は単一ではなく、様々な光反応が進行していることが予想される。一方同様の紫外線照射実験をESPZ(5)に施し、HPLC分析を行った結果を図2.7に示した。ESPA1に対してアグリコン部のみが変化したこの不活性な化合物は紫外線による影響を全く受けなかった。この実験事実により、ESPA1とESPZの共通構造である糖鎖部位は紫外線による直接の化学変化を受けず、光エネルギーを受け取ると考えられるデオキシフコースアントラニレート部位もESPアグリコンの存在無しには構造に変化は起こさないものと考えられる。一方、ESPA1のア



スキーム2 ESPA1の光反応に関するモデルスキーム

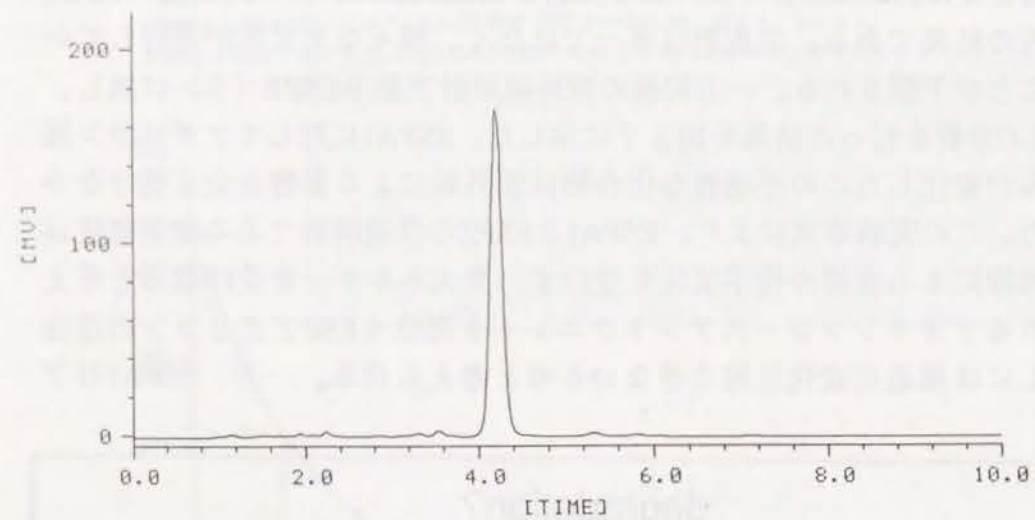
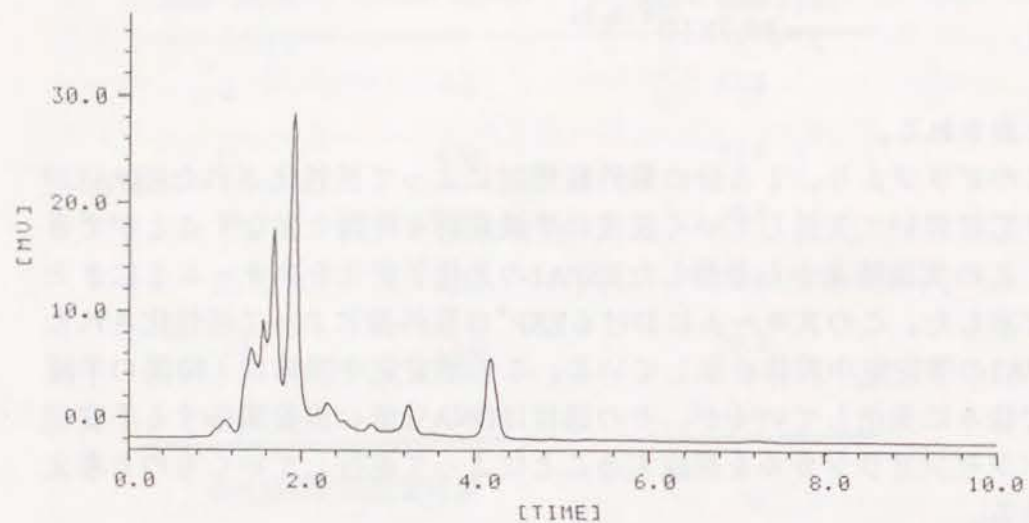


図26 a. ESPA1メタノール溶液に2分間紫外線照射をした後のHPLCパターン
b. ESPA1メタノール溶液のHPLCパターン

移動相として0.1Mギ酸アンモニウム/アセトニトリル (65% v/v) を使用。

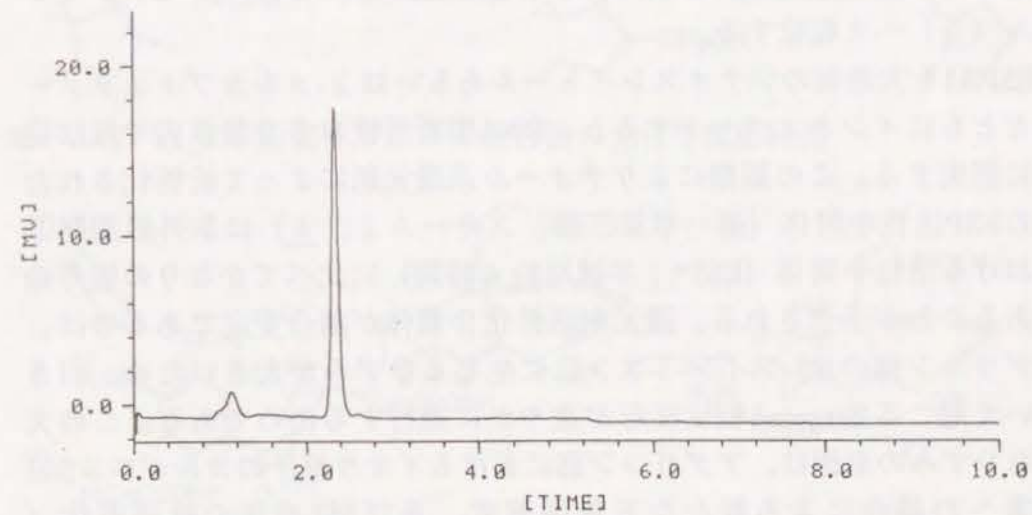
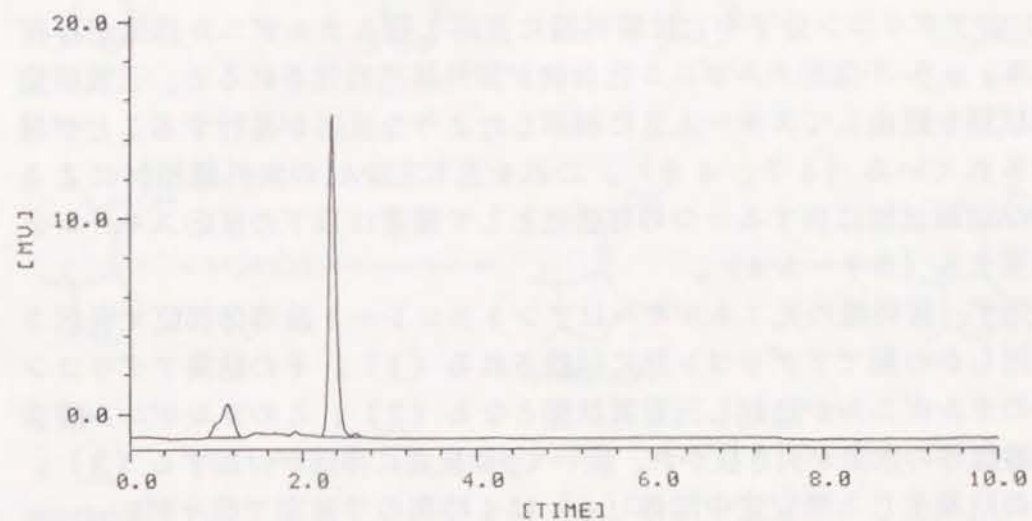


図27 a. ESPZメタノール溶液に10分間紫外線照射をした後のHPLCパターン
b. ESPZメタノール溶液のHPLCパターン

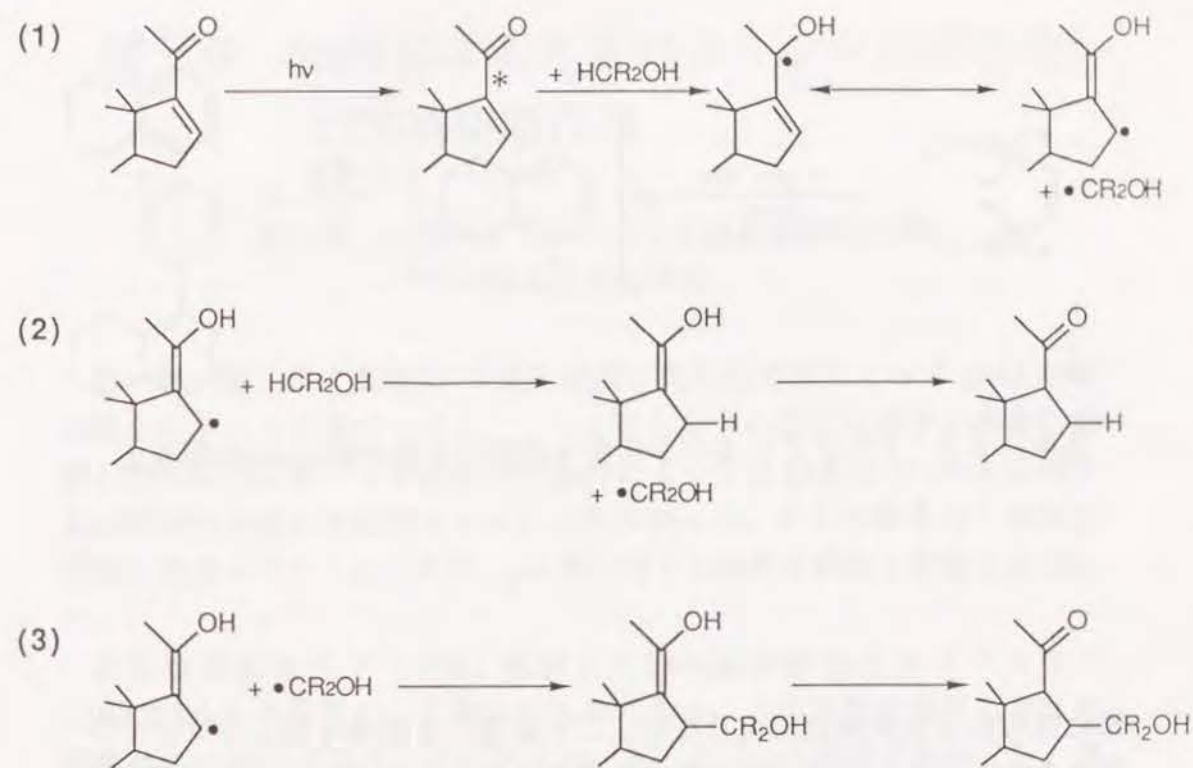
移動相として0.1Mギ酸アンモニウム/アセトニトリル (65% v/v) を使用。

グリコン部は紫外線照射によって複雑な構造変化を来すことが予想される。

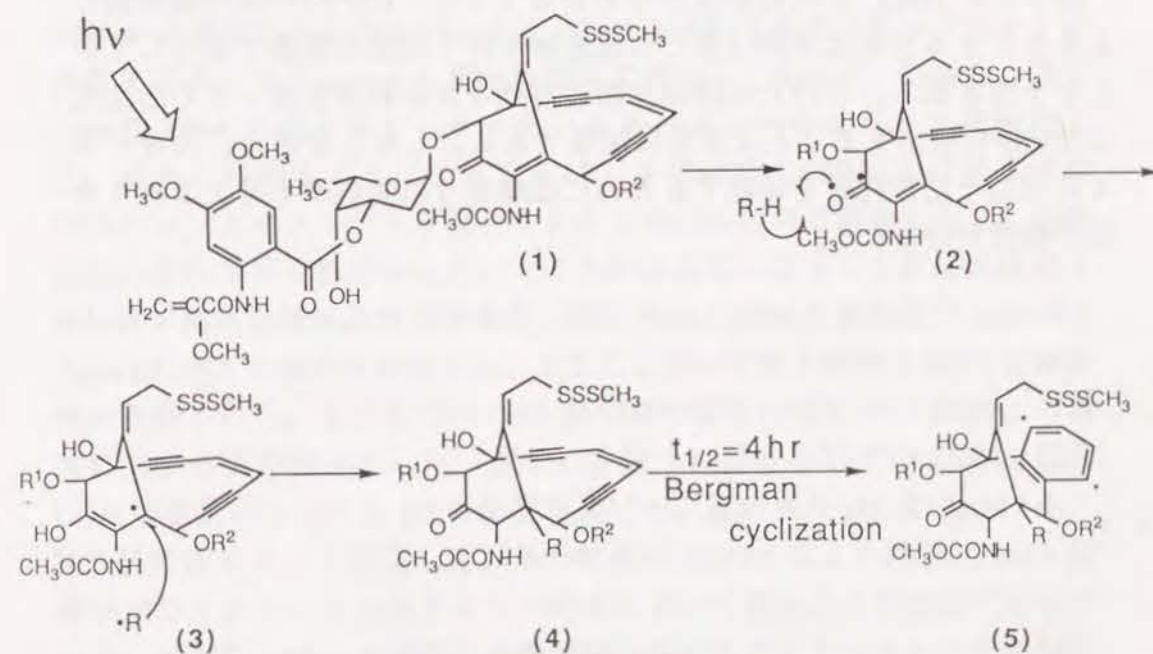
ESPアグリコン分子中には紫外線に反応し得るカルボニル部位が存在する。 α,β -不飽和カルボニル化合物が紫外線活性化されると、三重項励起状態を経由してスキーム3に例示したような反応が進行することが報告されている(47、48)。これを基にESPA1の紫外線照射によるDNA切断活性に関する一つの可能性として筆者は以下の反応スキームを提案する(スキーム4)。

まず、紫外線の光エネルギーはアントラニレート誘導体部位で吸収され何らかの形でアグリコン部に伝播される(1)。その結果アグリコン中のカルボニルが励起し三重項状態となる(2)。このカルボニル酸素に溶媒等の水素が引き抜かれ、続いて β 位炭素に溶媒が付加する(3)。この結果生じる準安定中間体(4)は4時間の半減期で徐々にBergman反応を引き起こしDNAに直接障害を与える1,4-デヒドロベンゼンジラジカル(5)へと転位する。

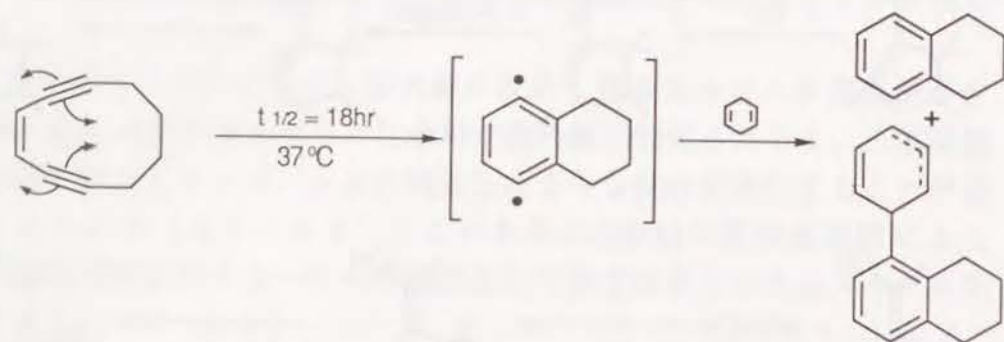
ESPA1を大過剰のジチオスレイトールあるいは2-メルカプトエタノールとともにインキュベートすると、DNA切断活性は30分以内ではほぼ完全に消失する。この観察によりチオール系還元剤によって活性化された際のESP活性中間体(第一章第二節、スキーム1、4)は紫外線照射系における活性中間体(ESP*:半減期約4時間)に比べてかなりの短寿命であることが予想される。還元剤活性化中間体が割合安定であるのは、アグリコン部の1,5-ジイン-3-エン位に生じるひずみが大きいいため、引き続いて起こるBergman転位反応が速やかに進行するためである。この大きなひずみの原因は、アグリコン部におけるイオウ原子のカルボニル β 位炭素への結合による新たな五員環形成、及び β 位炭素の軌道変化($sp^2 \rightarrow sp^3$)に伴う結合角の減少に起因する(20)。もしこのイオウ含有五員環の形成なしに β 位炭素の接合角の変化する反応が進行すれば、その結果生じる中間体のエンジン環にかかるひずみは還元剤活性化中間体よりも若干小さくなることが予想される。実際、飽和炭化水素鎖のみからなるエンジンを含む十員環化合物の半減期は37°Cで18時間とかなり安定である(25)(スキーム5)。紫外線活性化において予想される活性中間体(スキーム4、4)に於ても、 β カルボニル位炭素に軌道の変化は生じているものの、チオール系還元剤活性化の結果生じる中間



スキーム3 α,β -不飽和カルボニル化合物の光化学反応経路



スキーム4 予想されるESPA1の紫外線照射による活性化機構



スキーム5 1,5-ジエン-3-エン含有十員環化合物のBergman転移反応

体に見られる五員環は形成しない。この結果、中間体4は、エンジン環にかかるひずみが還元剤活性化中間体よりも小さくなり、半減期が長くなるものと考えられる。

図26のHPLC分析の結果からわかるように、ESPA1の紫外線照射によるラジカル反応は実際は多くの副産物を伴う複雑な経路で進行していくと予想される。このためDNA切断に有効な反応経路を通して不活性化したESPを検出することは非常に困難である。しかしながら、スキーム4に示した活性化系を確認するためには構造5の同定が不可欠であり今後の検討が待たれる。

第三章 加熱によるエスペラミシンの活性化とDNA切断作用

第一節 エスペラミシンによる熱誘起DNA切断とその塩基配列特異性

第一章、第二章でESPA1は還元剤及び紫外線照射によってDNA切断活性を示すことを述べてきた。一方これら2つの活性化因子を厳密に排除した反応系においても温度等の条件によってはESPA1のDNAに対する切断活性の残存が観察されることがわかった。そこで筆者はこの残存活性に焦点を当て、反応温度、pH等に関する条件を検討し詳細に追究した。

表5は遮光条件下ESPA1単独でのDNA鎖切断活性をプラスミドpBR322 DNAを基質として調べたものである。この実験に使用した反応温度は0～50℃であり、インキュベーターによって精密に調整した。反応は基質pBR322 DNAを10μM ESPA1とともに30分間インキュベートすることによって達成し、エタノール沈殿法によって停止した。基質DNAの切断反応によるコンフォメーション変化をエチジウムプロマイド含有アガロースゲルによる電気泳動にて検出し、form I、form II、及びform III DNAの割合をレーザーデンシトメーターを使用して数値化した。表からわかるように、0℃及び10℃に於てESPA1を作用させたDNAのコンフォメーションはブランクとほとんど同じ割合であり、切断反応の進行は見られなかった。ところが20℃、37℃と反応温度の上昇に伴い基質切断を示す形状変化、即ちform I DNAの減少及びform IIとform III DNAの増加が確認され、50℃において最も顕著なDNA切断活性が観察された。50℃でのDNA鎖切断の頻度は明らかにESPA1の濃度に対する依存性を示した(表6)。表7には50℃でのESPA1媒介DNA切断反応におけるpHの影響を掲げた。反応液のpHは10mM Tris・HCl緩衝液によって設定した。その結果はESPA1による熱誘起DNA分解がpH7.5あるいはpH6.5よりpH9.5において強いことを明白に示している。加えて、DNAの類似した熱誘起分解がカリケミシンのような他のエンジン含有抗生物質においても観察された(表8)。

表5 ESPA1 (10 μ M) によるDNA切断 (30分間、pH9.5) における反応温度の影響

reaction temperature (°C)	amount of DNA (%)		
	form I	form II	form III
blank (intact DNA)	76.4	23.6	0.0
0	53.1	42.2	4.7
10	51.1	43.9	5.0
20	41.9	49.5	8.6
37	33.2	55.3	11.5
50	20.4	57.9	21.7
50 (without esperamicin)	75.5	24.5	0.0

表6 ESPA1-熱誘起DNA切断 (50°C、30分間、pH9.5) における薬物濃度の影響

concentration of esperamicin A ₁ (μ M)	amount of DNA (%)		
	form I	form II	form III
blank (intact DNA)	76.4	23.6	0.0
100.0	0.0	45.1	54.9
10.0	20.4	57.9	21.7
1.0	55.2	38.3	6.5
0.1	67.8	29.5	2.7
0.0	75.5	24.5	0.0

表7 ESPA1 (10 μ M) - 熱誘起DNA切断 (50°C、30分間) におけるpHの影響

reaction pH	amount of DNA (%)		
	form I	form II	form III
blank (intact DNA)	76.4	23.6	0.0
6.5	55.1	31.1	13.8
7.5	35.6	48.8	15.6
9.5	20.4	57.9	21.7

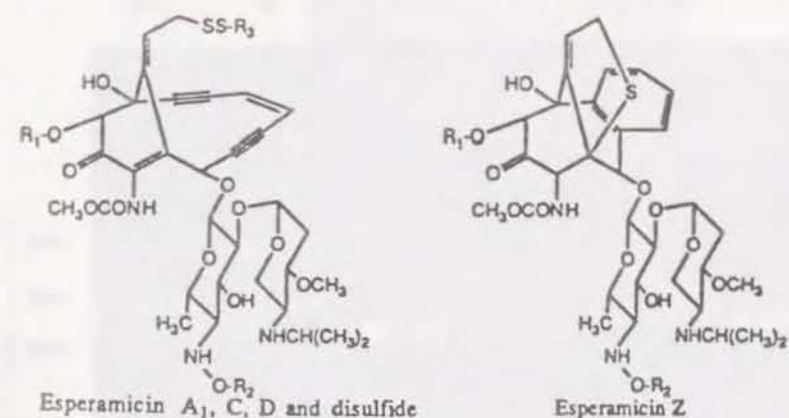
表8 各種ESP類縁体 (10 μ M) による熱誘起DNA切断 (50°C、30分間、pH9.5)

esperamicin analogues	amount of DNA (%)		
	form I	form II	form III
blank (without esperamicin)	75.5	24.5	0.0
esperamicin A ₁	20.4	57.9	21.7
esperamicin C	31.1	27.1	41.8
esperamicin D	65.5	23.7	10.8
esperamicin Z	76.0	24.0	0.0
esperamicin disulfide	22.4	46.1	31.5
calicheamicin	0.0	12.9	87.1

次に筆者は ESPA1 分子内の各官能基団の熱誘起活性に対する役割を確認するために、糖鎖部、エンジン骨格、メチルトリスルフィドを除去あるいは修飾した 4 種類の ESP 類縁体を用いて DNA 切断反応の比較を行った。ここで使用した ESP 類縁体の構造を新たに一括して図 28 にまとめた。ESPC 及び ESPD は ESPA1 分子内の糖鎖の一部を除去したものであり、ESPZ は ESPA1 の 1,5-ジイン-3-エン部分が還元活性化に基づく Bergman 転位反応を経由して芳香環化したものである (1, 5)。また、ESP disulfide は ESPA1 のメチルトリスルフィド部位 (-SSMe) をメチルジスルフィド (-SSMe) に変換したデスルフィドホモログである (6)。

筆者は ESPA1 のトリスルフィド-トリッガー部位が熱誘導 DNA 分解活性に関与しているか否かを明らかにするためのプローブとして ESP disulfide を合成した。その結果、ESP disulfide は ESPA1 と同様に 50 °C で強くスーパーコイル状 (form I) の基質 DNA を切断した (図 29、レーン 6)。ESPA1 とそのデスルフィドホモログがほぼ同程度の熱誘導 DNA 分解活性を示すことは特に興味深い。一方、ジチオスレイトール活性化系における ESP disulfide の DNA 分解活性は ESPA1 に比べて極めて弱かった (図 29、レーン 3)。チオール活性化 DNA 分解において、ESPA1 とそのデスルフィドホモログとの相異はメルカプチド形成速度における速度論的な相違に基づいているのかも知れない。ジスルフィド及びトリスルフィドは還元剤存在下において大きく異なる安定性を示すことが予想される。またこの結果より、チオール還元剤系ではトリッガーとしての機能を担っているメチルトリスルフィド基が熱誘起 DNA 切断系においては関与していないと推測される。

表 8 は 50 °C における ESPA1、ESPC、ESPD、ESPZ、及び ESP disulfide の DNA 切断を比較したものである。ESPC もまた ESPA1 と同様 DNA 切断活性を示した。それに比較して、ESPD の活性はほとんど無く、1,5-ジイン-3-エン部分が芳香環化した ESPZ は同様の実験条件下で DNA 分解活性を全く示さなかった。ESPA1、ESPC、及び ESPD のこのような DNA 切断の頻度は第一章第四節に述べたチオール系還元剤による活性化系で追究した結果と良く一致しており、2-デオキシ-L-フコースとアントラニレート芳香環部位が ESPA1 による熱誘起 DNA 分解に必須ではないことを示している。一方、チオメチルヘキサピラノース部



Functional groups	Esperamicin analog				
	A ₁	C	D	disulfide	Z
R ₁		-H	-H		
R ₂			-H		
R ₃	-S-CH ₃	-S-CH ₃	-S-CH ₃	-CH ₃	—

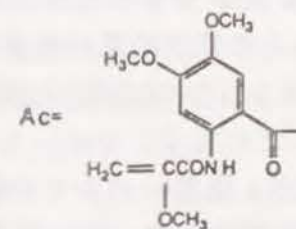


図 28 第 3 章において用いた各種 ESP 類縁体の構造

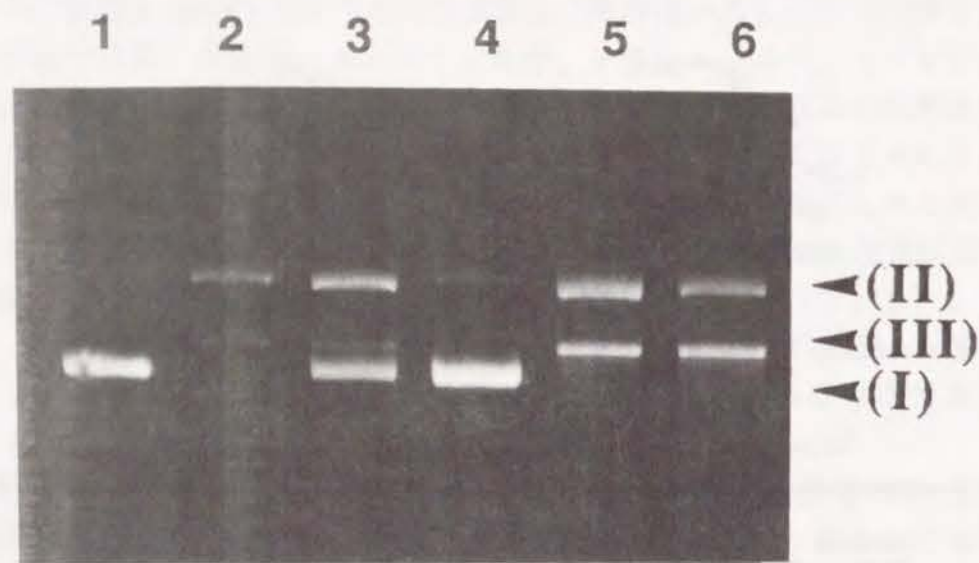


図29 ESPA1及びESPdisulfideの熱誘起DNA切断

5µM及び25µM ESPA1 (各々レーン2及び5)、または5µM及び25µM ESPdisulfide (各々レーン3及び6) によって処理したpBR322DNAのアガロースゲル電気泳動像。レーン1及び4はエスベラミシン未処理のサンプルを示す。レーン1～3は5mMジチオスレイトールの存在下20℃において1分間、またレーン4～6はジチオスレイトール非存在下50℃において30分間暗所にてインキュベートした結果を示す。各サンプルはpH9.5に調製した。

位はESPの熱誘起DNA切断に重要な影響を及ぼしている。これらの結果はチオール活性化DNA切断におけるESP分子の作用部位とよく対応している。一方、ESPZが不活性であるとの観察結果は熱誘起系においてもチオール還元剤系と同様に1,5-ジイン-3-エン部分が活性の中心であることを強く暗示している。

次に筆者は熱誘起活性化ESPA1のDNA塩基レベルでの特異性を検索し、チオール還元剤活性化系と比較する実験を行った。基質として5'末端を³²Pで標識したpBR322DNAのSal I-Dra IIフラグメント(86塩基対)を使用した。反応は37℃または80℃で15分間行い、切断塩基部位をMaxam-Gilbert法(8)によって決定した。得られた熱誘起活性化系DNA切断に関するデータを図30及び31に示した。同一のDNA

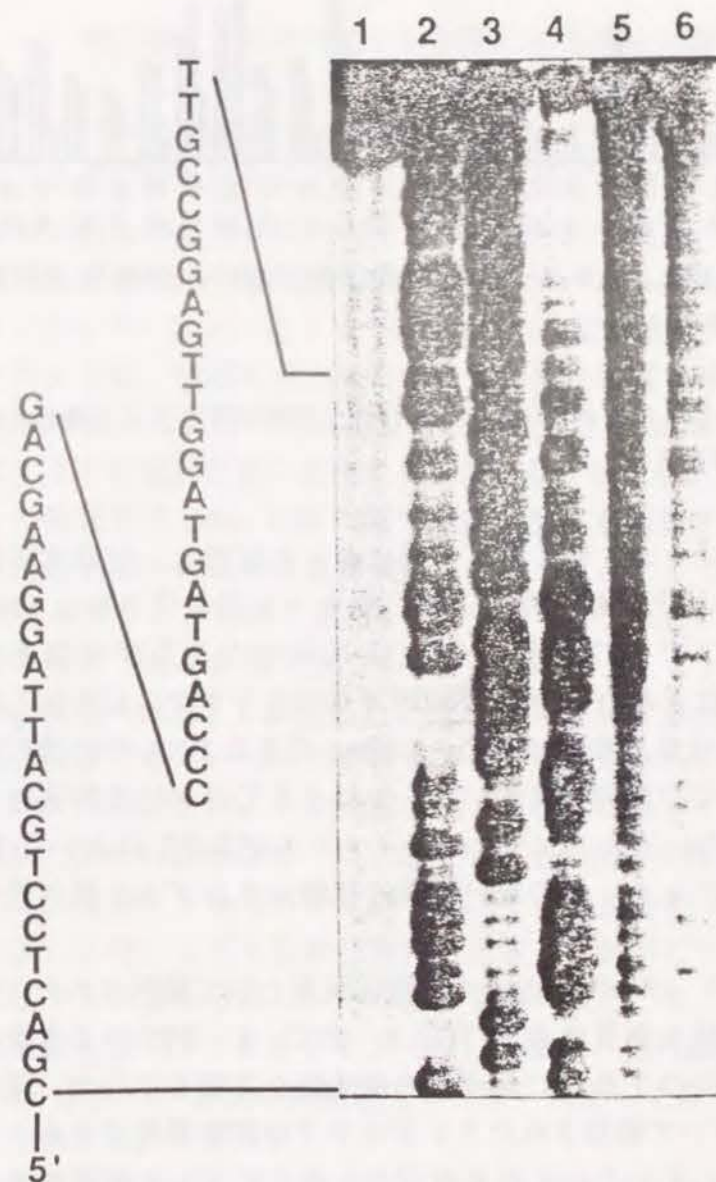


図30 熱活性化ESPA1によるDNA切断塩基配列特異性に関するオートラジオグラフィ像

基質5'-末端³²P標識pBR322DNA Sal I-Dra II断片の20℃におけるESPA1(0.2µM)-ジチオスレイトール(10mM)系による15分間の切断(レーン4)、及びESPA1(2µM)による85℃または37℃における15分間の切断(レーン5、6)。レーン1はDNAブランクを、レーン2、及びレーン3は各々Maxam-Gilbert反応のC+T及びA+Gを示す。



図3-1 ESPA1によるチオール誘起及び熱誘起DNA切断塩基部位のヒストグラム

■、▨及び□は各々ジチオスレイトール、37℃及び85℃にて誘起されたESPA1のDNA切断を示す。

断片をESPA1-ジチオスレイトール系によって処理し、対応する熱誘起DNA分解パターンと比較したところ、チオール活性化されたESPA1は優先的に5'-TT、5'-CT、及び5'-CC配列中のT及びC塩基を攻撃し、一方熱活性化されたESPA1の切断ではヒストグラムにも示したようにはほぼ均等に各塩基が攻撃された。ESPA1によるDNAの熱誘起分解において、50℃での配列特異的パターンは37℃における特異性とほとんど同じであった。また、ジチオスレイトールが50℃においてESPA1と共に使用されたとき、その配列特異的切断はランダムな熱活性化反応に優先した。

ジチオスレイトールがESPA1の活性化試薬として使用されたとき、このエンジン系抗生物質は5'-TTC、5'-CTC、5'-TTTのようなオリゴピリミジン配列中のT及びC塩基での優先的な切断を示した。紫外線活性化ESPA1において観察されたヌクレオチド分解特異性はチオール活性化の場合と類似していた。しかしながら、ここに示した熱誘起ヌクレオチド配列分解パターンは対応するチオール及び光誘起DNA切断とは明らかに異なっていた。この観察はESPC及びESPDを用いた糖鎖機能の類似性を示す結果とは対照的である。DNAを直接攻撃する炭素中心ラジカルを形成するアグリコンは、同時に塩基配列を高度に認識している可能性が強い事から(第一章第四節)、切断塩基特異性の相違はこのアグリコンにおける活性中間体の構造の相違を反映しているものと推察される。

第二節 エスペラミシンの熱による活性化機構

第一章、第二章に詳細に述べてきたように、ESPA1はDNA切断活性を引き起こす反応条件において、その活性を徐々に消失していく。これはESPA1がこれらの活性化条件の下で不可逆的に活性種へと変換していくことを示している。一方、熱処理の場合においてもESPA1自体は50℃でのインキュベーションによって徐々にDNA切断能を失っていく。前節に述べたように、同様の反応条件下でこの抗生物質は系中に存在するDNAを切断する。これらの実験結果から、熱処理はESPA1をDNA切断活性を有する不安定活性種に変換するものと考えられる。

ESPA1の熱活性化DNA切断に関する反応機構を類推するにあたり、この不安定活性種の知見を得る事は不可欠である。そこで筆者は熱処理後のESPA1メタノール溶液を逆相カラムを用いたHPLCによって分析した。アセトニトリル/0.1Mギ酸アンモニウムaq.(1:1)を移動相として用い、流速1ml/分に設定した。ESPA1を単独で熱処理したサンプルをHPLC分析すると一つの主要化合物の生成が示された(保持時間、18.6分)(図3-2)。小牛胸腺DNAの存在下においても同様の生成物が得られたがその収率は若干低くなった。その反応生成物はESPZ(保持時間、4.4分)とは明らかに異なり、その保持時間はESPA1(保持時間、12.2分)よりも低極性物質であることを示している。このピークを形成する物質を分取し、その活性を調べたところ、この化合物はチオール系還元剤(ジチオスレイトール)の添加、紫外線照射(254nm及び310nm波長)、または熱処理(50℃)によって全くDNA切断反応を示さなかった。

筆者は現在わかっている上記の知見を基にESPA1の熱活性化DNA切断に関する反応経路を類推し、以下に述べる三つの可能な機構を提案する。エスペラミシン、カリケミシン等のエンジン系抗生物質のDNA切断活性発現に関する反応機構において、1,5-ジイン-3-エンの1,4-デヒドロベンゼンジラジカルへの変換はもっとも重要なステップであると考えられる(第一章第二節、スキーム1、及び第二章第二節、スキーム4)。ESPZにDNA切断活性がないという事実は、ESPA1による熱誘起DNA切断においてもまた1,5-ジイン-3-エン部位が重要な役割を担っていることを解明し、チオール還元剤活性化系と類似した1,4-デヒドロ

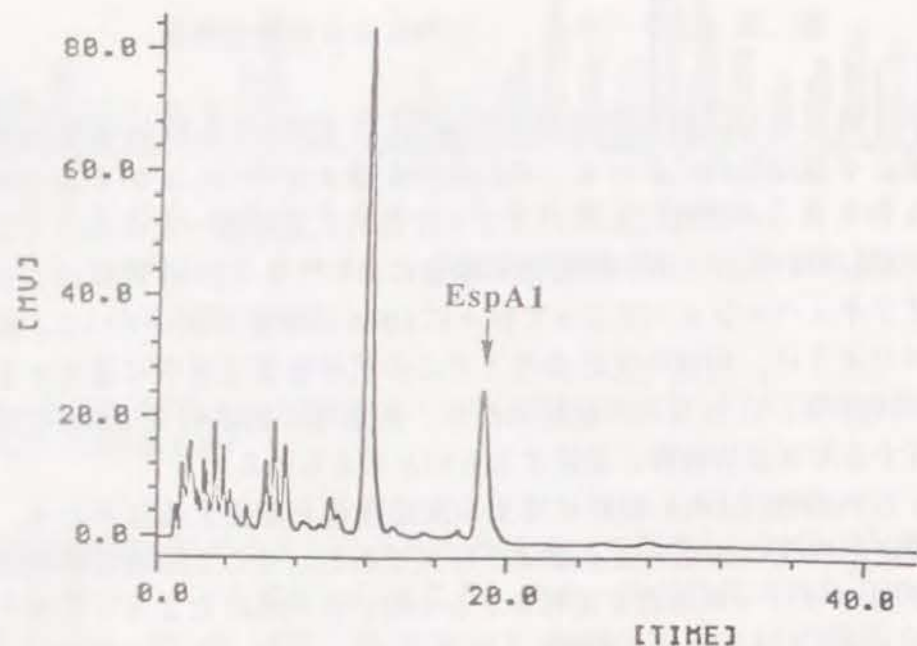
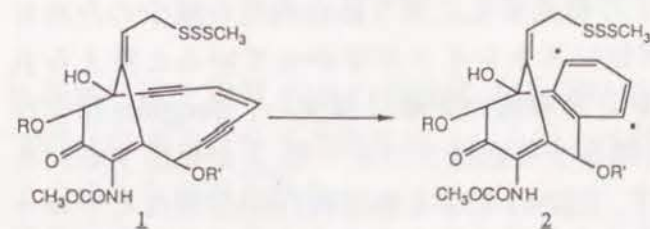


図32 65°Cにおいて1.8時間熱処理したESPA1のHPLCパターン

移動相として0.1Mギ酸アンモニウム/アセトニトリル (50% v/v) を使用。

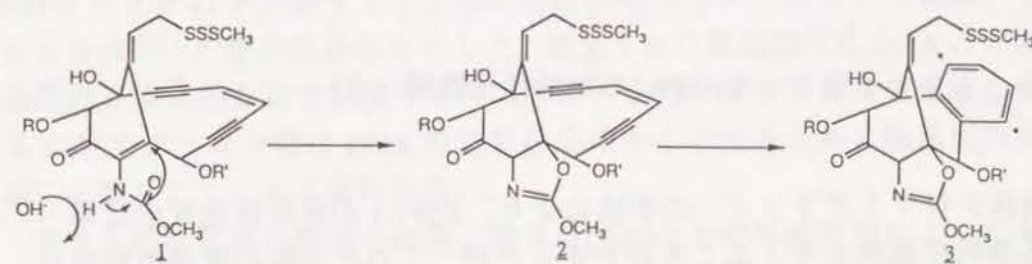
ベンゼンジラジカルがそのDNA切断に関与している可能性を強く示唆している(24, 27)。加えて、ESP disulfideの潜在的な熱誘起DNA切断活性はトリスルフィド以外のトリグガーの存在を暗示している。1,4-デヒドロベンゼンジラジカル形成に関する一つの合理的な機構は1,5-ジイン-3-エン部位の熱振動による直接的な転位反応である(スキーム6)。1,5-ジイン-3-エンのこのような反応は反応温度に依存して、1,4-デヒドロベンゼンジラジカルを経由することによって進行する事が知られている(49)。また、その転位生成物は1,5-ジイン-3-エン中の二つの三重結合間の距離が化学修飾によって接近させられている化合物の場合、室温でも自発的に進行する事が報告されている(25, 50, 51)。第一章第四節に詳細に述べたように、ESPアグリコンの三重結合間の距離は、Nicolaou等の求めた限界転位距離(24)より0.05



スキーム6 予想されるESPA1の熱活性化機構(1)

~0.16 Å大きく、このためこの抗生物質は室温において安定であると考えられている。しかしながら、更なる高温においてこれらの薬物1,5-ジイン-3-エンのより激しい熱振動の結果としてこのBergman転位反応を達成し得るかも知れない(52~56)。実際に、ESPA1は20°Cにおいてほとんど示さなかったDNA切断活性を高温になるに従って強く発現するようになる(表5)。

第2の可能性としては、トリスルフィド部位以外の分子内官能基を伴ったアグリコン部の活性化が挙げられる(57)。例えば、アグリコン中の-NHCOOCH₃基がトリスルフィドの代わりにトリグガーとして機能するのかも知れない。スキーム7はESPA1によるDNAの熱誘導分解に関する活性ラジカル種形成の可能な機構を示している。ESPA1アグリコ



スキーム7 予想されるESPA1の熱活性化機構(2)

ンにはチオール還元剤活性化系において分子内チオレートアニオンによる付加反応を受ける α,β -不飽和カルボニルが存在する。隣接する-NHCOOCH₃基はこのマイケルアクセプターに対して分子内付加反応を

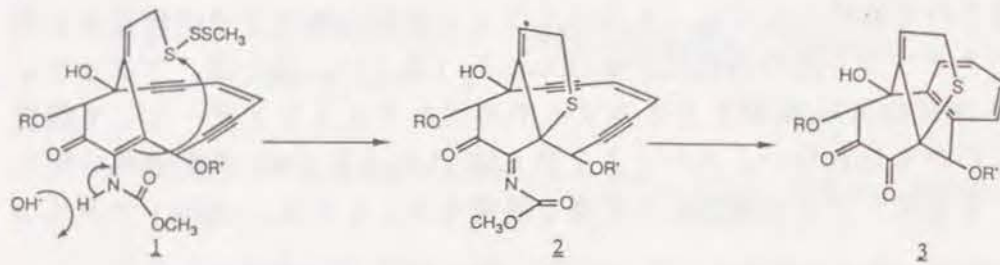
総 括

抗腫瘍性抗生物質 ESP の活性化及び DNA 切断反応の分子機構に関して物理化学的及び分子生物学的手法を用いて種々の実験を行った結果、以下のような結論を得た。

容易に還元され得るメチルトリスルフィド基の存在から推定される通り、単離・精製した DNA と ESPA1 のインビトロでの反応は還元剤の添加によって顕著に促進された。種々の還元剤の作用を比較すると、特にチオール系物質が著しく ESPA1 の活性を増強することが観察された。このときの DNA 切断反応は、メチルトリスルフィド基の還元によって生じるチオレートアニオンの Michael 付加と、引き続いて起こる 1,5-ジイン-3-エン部位の転位反応の結果生じる 1,4-デヒドロベンゼンジラジカルが DNA のデオキシリボースを攻撃することに起因していると考えられる。攻撃される DNA 塩基は 5'-TTT、5'-CTC、5'-TTC 等のオリゴピリミジン領域における T、C 塩基が優先的であり、各塩基の攻撃頻度は T > C > A > G の順であった。ESPA1 による DNA 切断反応は、ディスタマイシンなどの DNA マイナーグループ結合物質によって配列特異的に抑制された。この結果は ESPA1 が DNA のマイナーグループ側で相互作用していることを示している。次に ESPA1 からデオキシフコース-アントラニレート部位を除去した ESPC、及び更にイオウ含有糖部を除去した ESPD を ESPA1 と比較すると、低い切断活性（各々 1/10 及び 1/1000）ながらもほぼ同一の配列特異性を示した。除去された糖鎖部位は DNA との塩基配列非特異的な結合に関与しており、ベンゼンジラジカルを形成し得る ESP アグリコン部は DNA の切断反応の中心であると共に塩基配列認識にも関与している可能性が高い。

更なる活性化系の検討の結果、筆者は ESPA1 が紫外線照射によっても DNA を切断することを見出した。ESPA1 はまた紫外線前照射によってその活性を消失することから、活性発現の機構は不可逆的に進行していくものと考えられる。DNA 切断の塩基配列特異性に関して還元系と紫外線系との間に相違は無かった。この結果は紫外線系と還元系の反応の類似性を示している。実際、ESPA1 の紫外線照射による炭素中心ラジカル形成が ESR 測定によって確認された。エンジン環が芳香環化した ESPZ

起こす可能性がある。このようにして生成する事が予測される化合物 4 は、ブリッジヘッド炭素原子の軌道変化に伴う結合角度の減少のためにその 1,5-ジイン-3-エン部位にストレインがかかっていると考えられる。その結果二つのアセチレン末端間の距離は減少し、Bergman 環化反応によって DNA 切断に直接関与する活性ラジカル種 3 が生成する。もしこの反応経路が真実ならば、ESPA1 による熱誘起 DNA 切断はヒドロキシルアニオンによって触媒されるであろう。これはアルカリ条件が 50℃ における ESPA1 による DNA 分解を促進するという実験結果と一致する。スキーム 6 における 2 のような水素原子引き抜きを担う化学種は非常に不安定な Bredt's 則 ビシクロノン-1-エンであり、スキーム 7 における構造 3 に対応する水素原子を引き抜いた生成物を生じるための環化のような更なる反応を進行することが期待される。一方、スキーム 7 に示した環化メカニズムに加えてウレタンとトリスルフィド（あるいはジスルフィド）の関与している塩基触媒 RAR もまた可能かも知れない（スキーム 8）。



スキーム 8 予想される ESPA1 の熱活性化機構 (3)

液体クロマトグラフィーの手法により、ESPA1 の熱活性化反応は単一の低極性生成物を与えることがわかったが、この化合物の構造の同定は現段階では充分には確立されていない。反応機構を厳密に議論するためにこの生成物の構造に対する今後の検討が待たれるところである。

は紫外線照射による DNA 切断活性を示さなかった。また ESPC には紫外線誘起 DNA 切断活性が観察されないことから、デオキシフコース-アントラニレート部位は紫外線の受容部位としての役割が示唆される。

更に、還元系及び紫外線系を厳密に排除した反応系においても、ESPA1 は 50℃ の加温条件下で DNA を切断することがわかった。この加熱によって誘起される DNA 切断活性は pH に依存し塩基性側で増強された。また ESPA1 分子内のトリスルフィド及びデオキシフコースは熱活性化に本質的には関与していないことが ESP 類縁体を用いた実験により明らかにされた。一方、攻撃塩基特異性は各塩基にほぼ均等な切断が観察された。このような実験事実に基づく可能な熱活性化機構として、(A) 直接的なエンジンの熱環化反応、(B) ESP 分子内官能基である $-NHCOOCH_3$ のトリIGGERとしての作用、あるいは (C) ウレタンとトリスルフィド (またはジスルフィド) の関与を提案した。

以上述べたように、ESPA1 はインビトロにおいてチオール系還元剤の添加、紫外線照射、及び熱処理の三つの活性化系で効率よく DNA を切断することがわかった。ESPA1 分子中に含まれる糖部分は DNA に対する親和性に関与しており、アグリコン部分は DNA 切断反応の中心であると共に塩基配列認識にも関与している可能性がある。また還元系のトリIGGERと考えられるメチルトリスルフィド部分は熱活性化系では直接関与していないと推定される。一方紫外線活性化系において、デオキシフコース部分は光受容部位として作用している。このように ESPA1 分子はそれぞれ固有の役割を担っている種々の原子団から成り立っており、これらの知見は今後のドラッグデザインに対して有益な知見を提供すると考えられる。

謝 辞

終わりに臨み、本研究に際し終始御鞭撻を賜りました恩師、京都大学化学研究所・杉浦幸雄教授に慎んで感謝の意を表します。

本研究にあたり御懇篤なるご指導を戴きました京都大学化学研究所・桑原 淳博士に心から感謝申し上げます。また、折に触れ有益な御助言、御激励を戴きました京都大学化学研究所・富士 薫教授、同・田中圭助教授、同・川端猛夫博士に深謝いたします。

本研究における遺伝子操作実験に際し、ご指導、御助言下さいました、京都大学化学研究所・高浪満教授、青山卓史博士、並びに NMR スペクトルを測定された京都大学化学研究所・大嶺恭子学士に感謝の意を表します。

最後に、本研究の実験に御協力して戴きました田中有紀 (旧姓高橋) 学士、並びに種々御討議戴きました京都大学化学研究所抗癌医薬開発研究部門の皆様心より感謝致します。

引用文献

- (1) Golik, J., Dubay, G., Groenewold, G., Kawaguchi, H., Konishi, M., Krishnan, B., Ohkuma, H., Saitoh, K., & Doyle, T. W. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 3461-3464.
- (2) Kiyoto, S., Shibata, T., Kawai, Y., Hori, Y., Nakayama, O., Terano, H., Kohsaka, M., Aoki, H., & Imanaka, H. (1985) *J. Antibiot.* 38, 955-956.
- (3) 小西正隆 (1988) 化学と生物 Vol. 26, No. 2, 90-101.
- (4) Nicolaou, K. C. and Dai, W. M. (1991) *Angew. Chem.* 103, 1453-1481.
- (5) Long, B. H., Golik, J., Forenza, S., Ward, B., Rehfuss, R., Dabrowiak, J. C., Catino, J. J., Musial, S. T., Brookshire, K. W., & Doyle, T. W. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2-6.
- (6) Ellestad, G. A., Hamann, P. R., Zein, N., Morton, G. O., Siegel, M. M., Pastel, M., Borders, D. B., & McGahren, W. J. (1989) *Tetrahedron Lett.* 30, 3033-3036.
- (7) Peden, K. (1983) *Gene* 22, 277-280.
- (8) Maxam, A. M. & Gilbert, W. (1980) *Methods Enzymol.* 65, 499-560.
- (9) Massey, V., William, C. H., & Palmer, G. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 730-738.
- (10) Ganther, H. E. (1971) *Biochemistry* 10, 4089-4098.
- (11) Sugiura, Y., Takita, T., & Umezawa, H. (1985) in *Metal Ions in Biological Systems*, ed. Sigel, H. (Dekker, New York), Vol. 19, pp. 81-108.
- (12) Sauville, E. A., Peisach, J., & Horwitz, S. B. (1978) *Biochemistry* 17, 2740-2746.
- (13) Sauville, E. A., Peisach, J., & Horwitz, S. B. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 814-822.
- (14) Kuwabara, M. D. & Sigman D. S. (1987) *Biochemistry* 26, 7234-7238.
- (15) Kuwabara, M., Yoon, C., Goynes, T. E., Thederahn, T., & Sigman, D. S. (1986) *Biochemistry* 25, 7401-7408.
- (16) Kennard, C. H. L. (1967) *Inorg. Chem. Acta* 1, 347-348.
- (17) Hertzberg, R. P., & Dervan, P. B. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* 104, 313-315.
- (18) Zein, N., Sinha, A. M., McGahren, W. J., & Ellestad, G. A. (1988) *Science* 240, 1198-1201.
- (19) Magnus, P. & Carter, P. A. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110, 1626-1628.
- (20) Stinson, S. (1987) *Chem. & Eng. News* 1987, 17-18.
- (21) Sugiura, Y., Shiraki, T., Konishi, M., & Oki, T. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3831-3835.
- (22) Shiraki, T. & Sugiura, Y. (1990) *Biochemistry* 29, 9795-9798.
- (23) Sugiura, Y., Arakawa, T., Uesugi, M., Shiraki, T., Ohkuma, H., & Konishi, M. (1991) *Biochemistry* 30, 2989-2992.
- (24) Nicolaou, K. C., Ogawa, Y., Zuccarello, G., & Kataoka, H. (1988a) *J. Am. Chem. Soc.* 110, 7247-7248.
- (25) Nicolaou, K. C., Zuccarello, G., Ogawa, Y., Schweiger, E. J., & Kumazawa, T. (1988b) *J. Am. Chem. Soc.* 110, 4866-4868.
- (26) Lee, M. D., Dunne, T. S., Change, C. C., Ellestad, G. A., Siegel, M. M., Morton, G. O., McGahren, W. J., & Borders, D. B. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 3466-3468.
- (27) Zein, N., McGahren, W. J., Morton, G. O., Ashcroft, J., & Ellestad, G. A. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111, 6888-6890.
- (28) Goldberg, I. H. (1986) in *Basic Life Sciences: Mechanisms of DNA Damage and Repair*, eds. Simic M. G., Grossman, L., & Upton, A. C. (Plenum, New York), Vol. 38, pp. 231-244.
- (29) Hatayama, T., Goldberg, I. H., Takeshita, M., & Grollman, A. P. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3603-3606.
- (30) Lee, S. H., & Goldberg, I. H. (1989) *Biochemistry* 28, 1019-1026.
- (31) Myers, A. G. (1987) *Tetrahedron Lett.* 28, 4493-4496.
- (32) Myers, A. G., Proteau, P. J., & Handel, T. M. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110, 7212-7214.
- (33) Hensens, O. D., Giner, J., & Goldberg, I. H. (1989) *J. Am. Chem.*

- Soc. 111, 3295-3299.
- (34) Goldberg, I. H. (1987) *Free Radical Biol. Med.* 3, 41-54.
- (35) D'Andrea, A. D. & Haseltine, W. A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3608-3612.
- (36) Edo, K., Iseki, S., Ishida, N., Hotie, T., Kusano, G., & Nozoe, S. (1980) *J. Antibiot.* 33, 1586-1589.
- (37) Koide, Y., Ito, A., Edo, K., & Ishida, N. (1986) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 34, 4425-4428.
- (38) Stubbe, J. & Kozarich, J. W. (1987) *Chem. Rev.* 87, 1107-1136.
- (39) Kuwahara, J. & Sugiura, Y. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2459-2463.
- (40) Giloni, L., Takeshita, M., Johnson, P., Iden, C., & Grlooman, A. P. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 8608-8615.
- (41) Coll, M., Fredrick, C. A., Wang, A. H.-J., & Rich, A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8385-8389.
- (42) Takusagawa, F., Dabrow, M., Neidle, S., & Berman, H. M. (1982) *Nature (London)* 296, 466-469.
- (43) McClarin, J. A., Fredrick, C. A., Wang, B. C., Greene, P., Boyer, H. W., Grable, J., & Rosenberg, J. M. (1986) *Science* 234, 1526-1541.
- (44) Burger, R. M., Berkowitz, A. R., Peisach, J., & Horwitz, S. B. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11832-11838.
- (45) Goyne, T. E. & Sigman, D. S. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 2846-2848.
- (46) Kappen, L. S., Ellenberger, T. E., & Goldberg, I. H. (1987) *Biochemistry* 26, 384-390.
- (47) Williams, I. A. & Bladon, P. (1964) *Tetrahedron Lett.* 5, 257-262.
- (48) Walker, D. L. & Fraser-Reid, B. (1975) *J. Am. Chem. Soc.* 97, 6251-6253.
- (49) Lockhart, T. P., Comita, P. B., & Bergman, R. G. (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103, 4082-4090.
- (50) Snyder, J. P. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111, 7630-7632.
- (51) Snyder, J. P. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 5367-5369.
- (52) Tomioka, K., Fujita, H., & Koga, K. (1989) *Tetrahedron Lett.* 30, 851-854.
- (53) Magnus, P., Lewis, R. T., & Huffman, J. C. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110, 6921-6923.
- (54) Magnus, P., Fortt, S., Pitterna, T., & Snyder, J. P. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 122, 4986-4987.
- (55) Nagata, R., Yamanaka, H., Okazaki, E., & Saito, I. (1989) *Tetrahedron Lett.* 30, 4995-4998.
- (56) Mantlo, N. B. & Danishefsky, S. J. (1989) *J. Org. Chem.* 54, 2781-2783.
- (57) Haseltine, J. N. & Danishefsky, S. J. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111, 7638-7640.