総 説

エンジン型抗癌抗生物質エスペラ ミシンとカリチェミシン による DNA 認識

上 杉 志 成・杉 浦 幸 雄

京都大学化学研究所 (〒 611 京都府宇治市五ヶ庄)

DNA Recognition by Esperamicin and Calicheamicin

Motonari UESUGI and Yukio SUGIURA

Institute for Chemical Research, Kyoto University (Uji-shi, Kyoto, 〒 611)

Esperamicin and calicheamicin are among the most prominent members of enediyne antibiotics. Combining highly unusual molecular structures, potent biological activities, and fascinating modes of action, these DNA-cleaving compounds elicited extensive research activities in chemistry, biology, and medicine. This review weights the oligo(purine/pyrimidine) recognition by esperamicin and calicheamicin. We begin by consideration of the experimental approaches that have been used to provide insights into the recognition process. Next we summarize the recent interpretations of the sources of the specificity to oligo(purine/pyrimidine) sequences.

1 発見と構造

自然の産物はとうた(淘汰)され洗練されているため、新しい考え方を暗示する場合が多い。その典型的な例がエンジン型抗生物質エスペラミシンとカリチェミシンである。この二つの類似天然物の制がん(癌)活性は驚異的であり、アドリマイシンの数千倍の値を示す。また化学構造自体も全く新しい (Fig.-1)^{1)~5)}。

化学構造上の新しさは三点ある。第一に、心臓部母核として 3-エン-1,5-ジイン構造 (エンジン構造) を備える。その三重結合炭素は ^{13}C -NMR で特異な 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 sp^2 炭素との異核間 2 次元 NMR を解析することでエンジ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珍しいアリルトルスルフィド基を 13 位に備える。この部分は作用開始の起爆装置として機能する⁶⁾。第三に、三つの新規糖を備える。すべて 6-デオキシ糖で疎水性は高く、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は無かった構造である。エスペラミシンとカリチェミシンは画期的な制癌作用と新奇な化学構造を併せ持っている。世界の生化学者や分子生物学者はその作用発現機構の完全解明

連絡者: 杉浦幸雄

Fig.-1 Chemical structures of esperamicin and calicheamicin.

Fig.-2 Mechanism of the sequence-specific DNA cleavage by esperamicin and calicheamicin.

に挑戦し、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競って開始した^{*1)}。

2 興味深い作用発現機構

エスペラミシン、カリチェミシン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かかわっていたのは「遺伝子そのものである DNA の切断」であった。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。DNA を切断へと導く作用発現機構は巧妙である (Fig.-2)。まず、トリスルフィド部分が還元される。生体内に存在するグルタチオンなどのチオール系分子が効率よく還元する。生じるチオレートアニオンは、次の反応に最適な場にある。つまり、橋頭位二重結合へのマイケル付加に最適である (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。これにより三重結合同士は接近し (B)、バークマン型の環化反応が進行する。環化反応の結果、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 鎖を切断する (D)^{11), 12)}。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備えるので、制限酵素のように DNA を二本鎖同時に切断できる。また重要なことに、この

DNA 切断は塩基配列特異的である。つまり、AGGA・TCCT のようなオリゴプリン・オリゴピリミジン領域を認識して切断する^{13)~15)}。

エスペラミシン、カリチェミシン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認識
- (2) 一分子による DNA の二本鎖同時切断
- (3) トリスルフィド部分の引き金としての役割

ここでは特に塩基配列認識の化学に着目する。いかなる様式で塩基配列を認識するのか 1989 年当時全くなぞ (謎) であったが、われわれの研究室とアメリカの多くの化学者による研究の進展とともに、この疑問は水解し始めた。

3 オリゴプリン・オリゴピリミジン領域の認識

エスペラミシン・カリチェミシンは 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、Ellestad らがカリチェミシンの塩基配列特異性を初めて報告している¹³⁾。見いだされた認識塩基配列はすべてオリゴプリン・オリゴピリミジン領域であり、例えば AGGA・TCCT が典型的である。一方、エスペラミシンの塩基配列特異性は 1989 年にわれわれのグループによって報告されている¹⁴⁾。エスペラミシンにおいてもオリゴプリン・オリゴピリミジン領域が認識され切断されるものの、カリチェミシンと比較して認識は弱く、詳しい切断部位も若干異なる。

*1) カリチェミシンの全合成は最も困難な天然物合成の一つとされてきたが、カリフォルニア大学の Nicolaou らのグループが 1992 年に全合成に成功した^{7)~10)}。

Bars represent the relative intensity of cleavage at the indicated sites. However, one can not directly compare the intensity over the derivatives. Cleaving activity of esperamicin D is much lower (about 1/100) than that of the other compound. The 3'-shifted asymmetric cleavage patterns indicate double-strand scission across the minor groove of double helical DNA, because in the minor groove the proximal deoxyriboses on opposite strands are shifted to the 3'-side.

Fig.-3 Cleavage selectivities of calicheamicin and esperamicin derivatives.

Fig.-4 The major and minor groove of Watson-Crick double helical DNA.

エスペラミシンとカリチェミシンの厳密な特異性の相違は何か。様々な合成 DNA オリゴマーを用いた実験が、この疑問に有効に答えた¹⁶⁾。エスペラミシンとカリチェミシンによる選択性の相違の根本は「エスペラミシンは三塩基対を認識するが、カリチェミシン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塩基はずれてしまう (Fig.-3)。エスペラミシン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。

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 (Fig.-4)。エスペラミシンとカリチェミシンはマイナーグループに結合すると考えられた。典型的なマイナーグループ結合分子ネトロブシンによって、切断反応が阻害されるからである^{13), 14)}。言い換えれば、エスペラミシンとカリチェミシンは、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。

4 塩基配列認識に必須な最小構造

オリゴプリン・オリゴピリミジン領域の認識に必須な最小構造は何か。この質問の解答には薬物の誘導体が有用である¹⁶⁾。エスペラミシン C は、エスペラミシンからデオキシフコース-アントラニレート部位を取り除いた誘導体である (Fig.-5)。つまり、カリチェミシンからメトキシラムノース-チオベンゾエート部位を取り除いたものとほぼ同一である。その特異性は、エスペラミシンとカリチェミシンの特異性をたし合わせたものになっている (Fig.-3)。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誘導体である (Fig.-5)。エスペラミシン D の特異性と親和性はエスペラミシン C よりも激減していた (Fig.-3)。Danishefsky らはエンジン部位のみ (1, Fig.-5) を合成し特異性を調べているが、もちろん特異性はなく、DNA への結合能も非常に乏しかった¹⁷⁾。エスペラミシン C から D での劇的な変化は、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、Danishefsky らは三糖部分のみ (2, Fig.-5) 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¹⁸⁾。糖鎖部分だけでは DNA に結合できないのだ。結局、エスペラミシン 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である。

これまで多くの研究者は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

Fig.-5 Chemical structures of esperamicin derivatives.

分だけ、又は糖鎖だけが特異性を決定すると考えるのは誤りであろう。オリゴプリン・オリゴピリミジンへの基本的特異性は、エスペラミシン C の全体構造によっていられる。そして、エスペラミシン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 による特異性を変化させ、さらに特異性を高くしている¹⁶⁾。

5 DNA 構造の再編成

最近、われわれと Kahne らのグループは、エスペラミシン、カリチェミシン、そしてエンペラミシン C が AAAA・TTTT も認識できることを発見した^{16), 19)}。これは驚くべき事実である。特に驚いたのは Schreiber らであったかもしれない。彼らはコンピュータシミュレーションを基に、グアニン塩基の重要性を強調してい

Various amounts of esperamicin were added to a solution containing $2.9 \mu\text{M}$ oligonucleotide, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and 0.1 M NaCl.

Fig.-6 Circular dichroism spectra of d(CAGGA-CGCGTCCT).

たからである²⁰⁾。しかし実際は、オリゴプリン・オリゴピリミジン領域に GC 塩基対を含んでいる必要はない。

プリンまたはピリミジンの連続配列を認識して、しかも AT rich, GC rich 両方のマイナーグループに結合する分子はこれまでになかった。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、エスペラミシンとカリチェミシンにはあてはまらない。ここに重大な意味が隠されている。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が全く異なるからである。X 線結晶構造解析やヒドロキシルラジカル切断解析によると、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^{21), 22)}。いかにして形が異なるマイナーグループに結合できるのか。DNA は様々な要因の中で環境に応じて常に変化している。エスペラミシン・カリチェミシンに対しても DNA は単なる受け身な受容体ではない。エスペラミシン・カリチェミシンの結合という環境変化によって DNA 自体の構造は変化し、薬物にとって最適な場を提供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¹⁶⁾。Fig.-6 はホスト DNA オリゴマーの円二色性スペクトルである。エスペラミシンが存在しないとき、オリゴマーはワトソン・クリック B 型に特徴的なコットン効果を示す。ここへエス

Circles indicate the approximate positions of the calicheamicin rings with respect to the minor groove of the DNA octamer. Each dotted line represents a single NOE between a drug proton and a DNA proton.

Fig.-7 Schematic representation showing the intermolecular NOE between d(CAGGT-CAC) · d(GTGACCTG) and calicheamicin.

ペラミシンを加えるとこのコットン効果は変わり、ホストDNAの構造は変化する。ごく最近、Kahneらはカリチェミシン・DNA複合体のNMRを測定し、ピリジン鎖がより構造変化を受けていることを明らかにした(Fig.-7)²³⁾。

エスペラミシンやカリチェミシンの結合はDNAの構造変化を本当に必要とするのだろうか。もしもホストDNAの構造変化がエスペラミシンの結合に必要なならば、構造的に「硬い」DNAに対してはエスペラミシンの結合が困難で、低い切断活性をもつはずである。逆に、「柔らかい」DNAに対してはエネルギー的に有利なので結合が容易となり、高い切断活性をもつはずである。そこで構造の「硬さ」が異なるDNAオリゴマーが設計され、エスペラミシンの基質として用いられた²⁴⁾。Fig.-8に示す3~5のDNAオリゴマーは、典型的な標的塩基配列5'-GGA・TCCを含んでいる。しかし、そのヘリックスの「硬さ」はそれぞれ異なる。3は自らを折り畳んだヘアピン構造を形成し、構造が変化しにくい。3の「硬さ」を低下させるために二種の方法が採用された。4では、3の3'末端にある二つのヌクレオチドが除去されている。5では、3のループ部分の東

T_m (°C)	64	60	20
ΔH_{H} (kcal/mol)	94	66	50

The binding sequence in each duplex is distinguished by a bracket. Arrowheads point to the nucleotides cleaved by esperamicin. T_m values were taken in 2.5 μ M duplex, 10 mM Tris-HCl, and 0.1 mM NaCl at pH 8.0.

Fig.-8 Design of DNA duplexes 3-5.

縛が放たれている。これら4と5は末端のほぐれのために、ヘリックスの自由度が高まる。3~5に対するエスペラミシンによる切断効率を求めると、予想どおり、ヘリックスの「硬さ」が増加するにつれて切断効率は低下していた。DNA構造の再編成は確かに必要とされていると考えられる。

6 疎水性結合の重要性

エスペラミシンとカリチェミシンの構造の特徴は何か。一つには、その疎水性の高さがある。糖はすべて6-デオキシで、全構造中に四つしかヒドロキシル基がない。DNAとの結合には疎水的な結合が重要だろう。DNA切断効率に対する無機塩の影響を調べると、塩の種類によって様々である^{16), 25)}。水和力の弱い塩ほどエスペラミシンやカリチェミシンによるDNA切断を阻害する。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。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。ここでわれわれはDNAを構成する重要な要素について考えなければならない。一見、DNAは三つの成分から成るように見える。デオキシリボース、リン酸、塩基である。しかし実際には、もう一つの水和分子があり、疎水性結合においてはこの水和分子を考慮する必要がある。

50%エタノール又は80%エチレングリコール溶液中でDNAの円二色性スペクトルを測定すると、エスペラミシンを加えたときと同じようなコットン効果の変化が観察される¹⁶⁾。このような有機溶媒中ではDNAから水和分子がグループから遊離し、DNAに構造変化が起こることが知られている。この水和分子遊離による

構造変化がどのようなものかについては、現在のところ良く理解されていない。しかし、エスペラミシンの結合による構造変化と類似するものだろう。それゆえ、疎水性のエスペラミシンが DNA のマイナーグループと結合すると水和分子がマイナーグループから遊離し、それが一つの引き金となってホスト DNA の構造は再編成すると思われる。

もしもこの考え方が正しいのなら、有機溶媒の存在下ではエスペラミシンは DNA と結合しやすいはずである。なぜなら、結合に先だって水和分子が幾分か遊離し、DNA 構造がある程度「preorganize」されるからである。エネルギー的に有利で、結合が容易になる²⁶⁾。われわれは典型的な認識配列からなる d(AGGCCT)を合成し、有機溶媒の濃度を変えてエスペラミシンとの結合定数を求めた²⁴⁾。予想どおり、10 % エタノール中では $1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ であるのに対し、30 % エタノール中では $3.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ との結果が得られた。

これまでの考え方では、マイナーグループは空虚な溝で、その溝の形と相補的な薬物がはまり込むとされてきた。しかし、一見何もない溝のように感じられる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。水和分子と DNA が影響しあい、マイナーグループに複雑な場をつくりだしているといえる。

7 特異性の起源

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。AT の連続する DNA と GC を含む DNA とではマイナーグループの構造が全く異なる。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。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^{27),28)}。同じことがエスペラミシンやカリ

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、エスペ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^{23),24)}。

(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、エスペラミシン C の全体構造、つまりエンジイ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。

エスペラミシン・カリチェミシンとの疎水性結合が DNA の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もった、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。エスペラミシン C の中からある一部だけを取り出して、「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、今やエスペラミシン 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。エスペラミシン C は実際に「硬い」構造なのか。分子力場計算によると、エスペラミシン 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に強い NOE が観察されることも証拠の一つである²⁹⁾。「硬い」構造の原因は二つ挙げられる。一つは、エスペラミシン 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³⁰⁾。

複雑なエスペラミシン・カリチェミシンによる DNA 塩基配列認識は、かなり化学の目でとらえられるようになってきた。構造・活性の両面から極めて興味深いこれらエンジイン型抗生物質の DNA 認識に関する研究がさらに発展すれば、生物学や医学の分野で有用な新規化合物の設計・創製にも価値ある情報を提供するものと考えられる。

[平成 6 年 (1994 年) 3 月 22 日受理]

文 献

- 1) J. Golik, J. Clardy, G. Dubay, G. Groenewold, H.

- Kawaguchi, M. Konishi, B. Krishnan, H. Ohkuma, K. Saitoh, T.W. Doyle, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3461 (1987)
- 2) J. Golik, G. Dubay, G. Groenewold, H. Kawaguchi, M. Konishi, B. Krishnan, H. Ohkuma, K. Saitoh, T.W. Doyle, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3462 (1987)
- 3) M.D. Lee, T.S. Dunne, M.M. Siegel, C.C. Chang, G.O. Morton, D.B. Dorders, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3464 (1987)
- 4) M.D. Lee, T.S. Dunne, T.S. Chang, G.A. Ellestad, M.M. Siegel, G.O. Morton, W.J. McGahren, D. B. Borders, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3466 (1987)
- 5) M.D. Lee, T.S. Dunne, C.C. Chang, M.M. Siegel, G.O. Merton, G.A. Ellestad, W.J. McGahren, D.B. Borders, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 985 (1992)
- 6) J.J. DeVoss, J.J. Hangeland, C.A. Townsend, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 4554 (1990)
- 7) K.C. Nicolaou, C.W. Hummel, E.N. Pitsinos, M. Nakada, A.L. Smith, K. Shibayama, H. Saimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10082 (1992)
- 8) R.D. Groneberg, T. Miyazaki, N.A. Stylianides, T.J. Schulze, W. Stahl, E.P. Schreiner, T. Suzuki, Y. Iwabuchi, A.L. Smith, K.C. Nicolaou, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7593 (1993)
- 9) A.L. Smith, E.N. Pitsinos, C. Hwang, Y. Mizuno, H. Saimoto, G.R. Scarlato, T. Suzuki, K.C. Nicolaou, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7612 (1993)
- 10) K.C. Nicolaou, C.W. Hummel, M. Nakada, K. Shibayama, E.N. Pitsinos, H. Saimoto, Y. Mizuno, K. Baldenius, A.L. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7625 (1993)
- 11) J.J. DeVoss, C.A. Townsend, W. Ding, G.O. Morton, G.A. Ellestad, N. Zein, A.B. Tabor, S.L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9669 (1990)
- 12) J.J. Hangeland, J.J. DeVoss, J.A. Heath, C.A. Townsend, W. Dind, J.S. Ashcroft, G.A. Ellestad, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9200 (1992)
- 13) N. Zein, A.M. Sinha, W.J. McGahren, G.A. Ellestad, *Science*, **240**, 1198 (1988)
- 14) Y. Sugiura, Y. Uesawa, Y. Takahashi, J. Kuwahara, J. Golik, T.W. Doyle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7672 (1989)
- 15) N. Zein, M. Poncin, R. Nilakantan, G.A. Ellestad, *Science*, **244**, 697 (1989)
- 16) M. Uesugi, Y. Sugiura, *Biochemistry*, **32**, 4622 (1993)
- 17) J. Drak, N. Iwasawa, S.J. Danishefsky, D.M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7464 (1991)
- 18) J. Aiyar, S.J. Danishefsky, D.M. Crothers, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7552 (1992)
- 19) S. Walker, R. Landovitz, W. Ding, G.A. Ellestad, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4608 (1992)
- 20) R.C. Hawley, L.L. Kiessling, S.L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1105 (1989)
- 21) H.R. Drew, R.M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R.E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2179 (1981)
- 22) A.M. Burkhoff, T.D. Tullius, *Cell*, **48**, 935 (1987)
- 23) S. Walker, J. Murnick, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7954 (1993)
- 24) M. Uesugi, T. Kusakabe, Y. Sugiura, *Biochim. Biophys. Acta*, in press, "Hydrophobic DNA binding of esperamicin requires conformational distortion of the host DNA".
- 25) W. Ding, G.A. Ellestad, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 6617 (1991)
- 26) D.J. Cram, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 1009 (1988)
- 27) G.B. Koudelka, S.B. Harrison, M. Ptashne, *Nature*, **326**, 886 (1987)
- 28) G. B. Koudelka, P. Harbury, S. C. Harrison, M. Ptashne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4633 (1988)
- 29) S. Walker, K.G. Valentine, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6428 (1990)
- 30) S. Walker, D. Gange, V. Gupta, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 3197 (1994)