[薬 学 雑 誌]
YAKUGAKU ZASSHI
119 (9) 625-636 (1999)

核酸合成と分子認識

大塚栄子

北海道医療大学, 〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢 1757

Nucleic Acid Syntheses and Molecular Recognition

Eiko OHTSUKA

*Health Sciences University of Hokkaido, Kanazawa, Tobetsu-cho,
Ishikari-gun, Hokkaido 061-0293, Japan*

(Received April 26, 1999)

Syntheses of nucleic acids are of importance not only in the natural product chemistry but also in the molecular recognition study in biology. This review describes syntheses of RNA and DNA, which were found to be related each other. Deoxyinosine probes were developed for cloning genes with degenerated codons. Synthetic genes for c-Ha-ras and T4 endonuclease V provided new approaches in recognition of nucleic acids by proteins. Antibodies specific for photo-damaged pyrimidines in DNA have been studied by cloning and mutating their genes.

Key words—RNA synthesis; ribozyme; deoxyinosine probe; single gene; damaged nucleobase; single-chain antibody

はじめに

1965年に遺伝暗号が解明され、遺伝子の塩基配列から蛋白質のアミノ酸配列が推定できるようになった。tRNAの一次構造が決定され、コドンとアンチコドンが水素結合によって認識されることがわかり、核酸から蛋白への翻訳機構があきらかとなった。遺伝子の本体である核酸を合成することは天然物合成としての興味ばかりではなく、その機能を探る重要な手がかりとなり得ると考えられる。現在までに自分自身が関わった核酸合成を振り返ってみると、RNA合成を始めることにより、保護基の重要性がわかり、DNA合成にも有用であった。RNA合成とDNA合成を同時に行うことでそれらが相乗効果を持っており、関連したり、役立ったりしているので、分子認識を目的とした核酸合成のいくつかのテーマについて、述べてみたい。

1966年頃のRNA合成は、我々も参加したKhoranaの64トリプレットにみられるようなリン酸ジエステル法による液相合成であった。トランスファーRNA(tRNA)全合成は先が見えないような問題なので、挑戦のしがいのあるテーマであり、機能をもつ小型核酸という意味で興味深い問題であった。tRNAが合成できるようになると、リボザイムという標的が現われて、RNAをめぐる話題は多彩となった。tRNAから派生したデオキシイノシンプローブは、DNA合成が分子生物に不可欠であることを示した一例である。

遺伝子合成ではヒト成長ホルモン遺伝子合成が基礎となって、rasとT4 endonuclease V遺伝

子では遺伝子産物の構造研究にまで発展した。リボザイムは *ras* 遺伝子の発現を特異的に抑制する実験に用いることができた。現在、リボザイムの研究は新しい型のリボザイムへ進展している。T4 endonuclease V の基質であるチミンダイマーや8-オキシグアニンなどの損傷塩基を含む核酸の合成は、*ras* 遺伝子中での変異の研究に役立った。紫外線損傷核酸は、その認識抗体との相互作用の研究が過去3年間の特別推進研究の対象となっており、成果が上がって来た。現在、誘導体の合成も進行中であり、新しい展開が期待できる。

1. RNA 合成からイノシンプローブへ

最初のジヌクレオシドモノリン酸 (TpT) は Todd らによって、1955 年に合成されているが、¹⁾ Khorana らは 1957 年頃チミジル酸をジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) を用いて緩やかな条件で縮合することにより、ポリヌクレオチドを生成させることに成功した。²⁾ それまで我々が合成していた化合物はヌクレオシドポリリン酸で、グアノシンジホスフェートマンノース (GDPM)³⁾ や ATP アナログ⁴⁾ であった。

1963 年頃は遺伝暗号が解読されつつある時代で、Ochoa のポリヌクレオチドポリリナーゼで合成したホモポリマーやコポリマーをメッセンジャー (mRNA) モデルとして使う実験が報告されていた。塩基配列の繰返しのある DNA 断片から、RNA に転写して配列既知の mRNA を調製し、アミノ酸の取込みをみる実験が Khorana 研で行われた。まず、dTTC ブロックを合成しそれらを重合し、⁵⁾ 次に3個の繰返しとか4個の繰返しの DNA 断片 (いずれも鎖長が12程度あれば、相補鎖と対を作り DNA ポリメラーゼで長鎖 DNA になる) も合成し、それらを酵素反応に用いる。⁶⁾ 1964 年のニューヨークの国際生化学会で Nirenberg がリボトリプレットと tRNA のリボゾーム上での結合実験を発表し、急遽、64 種リボトリプレットが必要になった。⁷⁾ この合成については以前にも書いているので詳細は省略するが、リボヌクレオシド 3'-リン酸をピリジンを入れないで (入れ忘れた) 無水酢酸で処理すると 2' アシル化がスムーズに起るという原理を使っている。1965 年の3月の Federation Meeting では、Khorana と Nirenberg がそれぞれ遺伝暗号表を発表し、Holley が酵母アラニン tRNA の一次構造を発表した。アンチコドンでは IGC でコドン3字目は複数の塩基が来ても Wobble 塩基対ができるようになっていた。Khorana は最初に構造決定されていたアラニン tRNA に敬意をあらわしたのか、その遺伝子を最初の合成標的に選んだ。DNA リガーゼは発見されていなかったため、DNA ポリメラーゼのプライマー延長反応のようなもので、遺伝子を構築しようとした。

1967 年に東京で国際生化学会があり、Khorana は遺伝子合成の戦略についても発表した。DNA リガーゼが発見されたので、合成した断片を結合して遺伝子を構築することが可能となった。アラニン tRNA 合成遺伝子の論文は13編以上の論文となり 1972 年の *J. Mol. Biol.* 12 月号一冊に入り切らずに次号にまで及んだ。⁸⁾ 遺伝子の機能を調べるために、チロシンサブレッサー tRNA 遺伝子が合成され、ラムダファージがそれによって生育するという生物活性を指標とする実験に用いられた。⁹⁾ ジェステル法時代の遺伝子合成は以上のような経過をたどったが、その後の進歩についてはよく知られている通りである。

RNA 合成はリボトリプレットから出発して天然物としての tRNA 全合成を 1966 年から目指した。中性条件で除去可能な芳香族リン酸アミデート¹⁰⁾ (Fig. 1) やオルトニトロベンジルエーテル¹¹⁾ (Fig. 2) などの保護基を開発し、RNA リガーゼの発見もあって、全合成は 1979 年に完了した。¹²⁾ tRNA の構造がヒントになった Wobble 塩基対を DNA で作らせるデオキシイノシンプローブは混合プローブでは不可能であったコレシストキニンなどの未知のアミノ酸コドンを持つ遺伝子のクローニングに役立ち、合成 DNA の有用性を示した (Fig. 3).¹³⁾

Fig. 1. Protection of Phosphomonoesters with Aromatic Phosphoramidate
The aromatic phosphoramidates are removed by treatment with isoamyl nitrite.

Fig. 2. Synthesis of *o*-Nitrobenzyl Ethers of Nucleosides
The protecting group can be removed by irradiation of 280 nm UV light.

Fig. 3. Deoxyinosine Probe and Mixed Probe of Cholecystokinin Gene

Fig. 4. Hammerhead Ribozyme and Its Cleavage Site

2. リボザイムの構造と機能

リボザイムは RNA の自己切断と結合活性として発見され, 大型リボザイムと小型リボザイムに分類できる.¹⁴⁾ 小型の中でもハンマーヘッド型とヘアピン型と呼ばれるモチーフを持つものは必須ドメインが 40—50 ヌクレオチドからなり, 合成の標的となった. 特にハンマーヘッド型リボザイムの切断部位は小型でその変異体から必須配列を同定して RNA の制限酵素的な RNA を設計することができた (Fig. 4).¹⁵⁾ また, リボザイムの反応に必要なマグネシウムイオンの関与を調べるために, ホスホロチオエート誘導体の合成を行い, この種のリボヌクレアーゼ RNA が RNase 類と同様に Fig. 5 に示すように in-line 機構で反応することを明らかにした.¹⁶⁾ 次に研究対象としたヘアピン型リボザ

Fig. 5. Cleavage by In-line Mechanism

Fig. 6. Probing the Bent Structure of Hairpin Ribozymes by Alteration of the Primary Structure

イムでは一次構造を変換した誘導体を合成することによって、活性の由来する高次構造を推定した。¹⁷⁾ このような方法は結晶構造が出て来るまでは化学的アプローチとして有力な方法である。長さの異なるリンカーを結合したり、結合箇所を変えることによって、2つのドメインが接近することが活性に必須な構造であることを証明することができた (Fig. 6)。さらに、活性な分子を目指して、改変を行って、標的 RNA を切断する新型リボザイムを合成し、成果が上がっている。最近はループに相補的なオリゴヌクレオチドを加える調節型リボザイムが合成できて、大きな期待が持たれている。

3. *ras* 遺伝子の合成と活性

ヒト成長ホルモン遺伝子の合成は当時最も大きな遺伝子をターゲットとしたもので、化学合成ばかりではなく発現プロモーターを構築する問題など、非常に多くのことが含まれていた。¹⁸⁾ 1984 年頃、がん遺伝子 *ras* の塩基配列が決定され、がん細胞からの遺伝子での点突然変異が明らかになった。それはアミノ酸 1 残基の変異を意味しており、たった 1 残基のアミノ酸が蛋白の機能に及ぼす影響というものは三次元構造を見なければ理解できないことであった。対がん 10 年テーマとして国立がんセンターの西村らとカリフォルニア大学バークレイ校

Fig. 7. Construction of Gene for c-Ha-ras

の Kim らとの共同研究で、合成遺伝子を用いて三次元構造解析を行うことになった。DNA 断片の合成は現在ほど容易ではなく DNA 合成にもリン酸トリエステル法とホスホルアミダイト法の両方を用い、ヒト成長ホルモン遺伝子の発現に用いたベクターに組み込むことによって、大量の遺伝子産物を得ることができた (Fig. 7).¹⁹⁾ 結晶化と構造解析が成功し、変異を起こす 12 番目、61 番目などのアミノ酸は GTP のリン酸が結合している付近にあることがわかった。²⁰⁾ 変異を起こして 12 番目のグリシンがバリンに変わった遺伝子や 61 番目がロイシンになった合成遺伝子は哺乳動物用のベクターに結合すると、培養細胞中でも活性を示し、NIH3T3 細胞をがん化させることが明らかとなり、遺伝子産物が細胞の中で働いていることを示した。²¹⁾

4. c-Ha-ras 遺伝子のリボザイムによる不活性化

変異を起こして活性化された c-Ha-ras 遺伝子からのメッセンジャー RNA のみをリボザイムにより特異的に切断することができれば、細胞のがん化を制御する実験ができるはずである。Fig. 4 に示すようなリボザイムを用いて、グリシンのコドン GGU とバリンのコドン GUU を識別することを *in vitro* で既に確かめてあるので、このリボザイムの遺伝子を合成し、発現ベクターを構築した。RSV プロモーターと薬剤耐性遺伝子を同時に用い、細胞にベクターがトランスフェクトしたことを薬剤耐性によって確かめた。このベクターを持つ NIH3T3 細胞に 12 番目バリン又は 61 番目ロイシンをコードする 2 つの活性型 c-Ha-ras 遺伝子を導入したところ、12 番目バリンの遺伝子を導入した細胞がリボザイムのない場合に比べてがん化してフォーカスを形成する数が半分以上となった。²²⁾ 61 番目ロイシンの c-Ha-ras 遺伝子による細胞のがん化によるフォーカス形成は抑制されなかった。このことはメッセンジャー RNA 中のバリンコドン GGU が認識され切断されて不活性されたことを示すものである (Fig. 8)。

5. ras 遺伝子における損傷塩基の変異誘発

合成遺伝子の細胞中での活性を利用すると、遺伝子の塩基に起った損傷と変異の関係を解析できる。環境中のアルキル化剤による核酸塩基のアルキル化、水酸ラジカルによる水酸化、紫外線によるチミンダイマーの生成などによって遺伝子が損傷を受け、突然変異の原因となることが知られている。がん遺伝子の点突然変異も DNA 損傷が一因として考えられる。それを証

Fig. 8. Inhibition of the Activated c-Ha-ras Gene by Ribozyme Gene in *in Vivo*

Fig. 9. Damaged Bases in DNA

Fig. 10. Estimated Mechanism for G to T Transversion in *c-Ha-ras* Gene

明するために、*c-Ha-ras* 遺伝子のホットスポットと言われる 12 番目と 61 番目のコドン中に損傷塩基を導入した。12 番目のグリシンをコードする遺伝子の 34—36 番目 GGC 中又は 35G にはグアニン誘導体、61 番目グルタミンをコードする 183—185 番目 CAA 中の 182A にはアデニン誘導体、相補鎖 TT にはチミンダイマーを導入した。²³⁾

Fig. 9 に示すグアニンの損傷によって生ずる 3 種類の塩基 O⁶-メチルグアニン、7,8-ジヒドロ-8-オキソグアニン (8-オキソ G と略す)、キサンチンをはじめアデニンから生ずるヒポキサンチン及び 8-オキソ A、チミンダイマーをそれぞれのデオキシヌクレオシドを合成し、保護基を導入した後ホスホリアミダイト体としてオリゴヌクレオチド合成に用いた。また、塩基が加水分解した場合にはアベシックサイトが生ずるので、D-デオキシリボースのみを鎖の中に入れたオリゴヌクレオチドを合成した。これは非常に不安定であるので、アナログである 1,4-アンヒドロ-2-デオキシ-D-リビトール (F) についてもそれを含むオリゴヌクレオチドを合成し、変異原性を比較した。

損傷を **RAS** タンパク 12 番目、13 番目、61 番目などのホットスポットに含むオリゴヌクレオチドは両端の制限酵素切断配列を利用する DNA カセット変換法により *c-Ha-ras* 遺伝子に組み込み、発現ベクターを調製した、これらをリン酸カルシウム法によって NIH3T3 細胞にトラ

ンスフェクトした。いずれの場合もフォーカス形成が観察された。フォーカスを形成した細胞から DNA を抽出し、*ras* 遺伝子の塩基配列分析を行った結果、8-オキシ G をコドン 12GGC の 2 字目に導入した場合にはがん化した細胞の DNA から見いだされる T へのトランスヴァージョンが最も多く検出された。²⁴⁾ これは Fig. 10 に示すように 8-オキシ G がアデニンと塩基対を形成することにより、相補鎖に A を取り込み、複製の際に T を取り込んだ結果であると説明できる。このような実験からホットスポットと言われる塩基に損傷が起こった場合にがん遺伝子が活性化される 1 つの機構を説明することができた。

6. T4 Endonuclease V とチミンダイマーの認識

T4 endonuclease V はチミンダイマーの除去修復の初期に働く酵素で関口らにより見いだされ研究されていた。²⁵⁾ グリコシラーゼ活性と DNA 鎖切断活性の 2 つの活性をわずか 138 アミノ酸からなるペプチド中に持っており、大腸菌中での発現にも適した興味深い酵素である。遺伝子合成は *ras* 遺伝子の時よりも一段と機械化が進み、精製が律速段階となった。合成遺伝子はヒト成長ホルモンと同じ発現ベクターを用いて、天然のファージの 500 倍の量を発現させた。²⁶⁾ 森川らとの共同で結晶化と X 線構造解析を行い、1992 年三次元構造を提出することができた。²⁷⁾ 立体構造が明らかになるとアミノ酸配列のみから予想していた触媒活性部位とはかなり違っていたことがわかり、部位特異的変異を導入して変異体の活性を調べた。基質 DNA の円二色性スペクトル (CD) を調べることで、結合活性のみを持つ変異体 *Gle23→Gln* (E23Q) を見つけることができた。²⁸⁾ それを用いて基質との共結晶化を行い、複合体の 3 次元構造解析に成功した。²⁹⁾ これは DNA 修復酵素と基質との最初の複合体であり、これから明らかになった核酸塩基と蛋白質との相互作用は非常に興味深い。この場合は損傷塩基の相補鎖にあるアデニンが蛋白質中に flip out しており、シトシンのメチル化酵素のように反応を受ける塩基が蛋白質と相互作用している様子とは異なった認識機構であった。

7. 紫外線損傷核酸と認識抗体

DNA の紫外線損傷は近年大きな問題となっているが、隣接ピリミジンに生ずる Fig. 11 のような反応がよく知られている。二階堂らの抗紫外線損傷 DNA モノクローナル抗体³⁰⁾ は特異性

Fig. 11. Major Photo-lesions of Pyrimidines in DNA

Fig. 12. Construction of a Single Chain Antibody

Fig. 13. Binding Rates of Fab and Single Chain Antibody Form 64M5 by Surface Plasmon Resonance Measured by BIAcore

が高く、損傷の検出、修復酵素反応の解析に用いられているが、分子認識の問題としても興味深い。損傷 DNA の合成と同時にこれらの抗体の抗原結合部位の遺伝子のクローニングを行い一本鎖抗体を構築することを計画した (Fig. 12)。(6-4) 光産物認識抗体には 64M2, 3, 4, 5 があり、特に 64M5 が強い抗原結合活性を持つので、構造活性相関に興味を持たれた。構造研究のためには抗原結合フラグメント (Fab) が適している。二階堂グループ、抗体の X 線解析の佐藤グループ、NMR の嶋田グループとの共同研究により、64M2 と 6-4 光産物との複合体三次元構造が得られた。抗原結合の向きや広がり情報も NMR から得られている。³¹⁾ 大量の損傷 DNA やスピララベル体の合成という有機化学的アプローチが必要である。一方、可変領域 (Fv) の遺伝子クローニングによる塩基配列決定とそれらの比較によって 64M2-5 の相同性が見いだされた。³²⁾ 64M5 の一本鎖抗体はヒスチジンタグの親和性を利用したリホールディング法により、Fab とほぼ同様の結合活性を持つ分子量的 27000 の蛋白として単離できた。一本鎖抗体の抗原結合活性を表面プラズモン共鳴を測定原理とするバイオセンサー (BIAcore) を用

In vitro DNA Synthesis

Fig. 14. Inhibition of DNA Syntheses by Single Chain Antibody of 64M5

いて測定したところ、Fab とほぼ同様であることがわかった³³⁾ (Fig. 13). NMR の測定のためには溶解度を大きくする必要があり、さらに工夫が要求される。一本鎖抗体遺伝子の発現ベクターが得られたことから、多数の変異体が構築できて、アミノ酸残基の結合への関与が解析された。³⁴⁾ この一本鎖抗体は *in vitro* の DNA 複製を阻害することがたしかめられた³⁵⁾ (Fig. 14). さらに興味深いことは、三次元構造から得られた情報を基に、(6-4) 光産物隣接のリン酸エステルが結合する付近の相補性決定領域 (CDR) の 1 つをランダム変異させた一本鎖抗体遺伝子を構築し、光感受性大腸菌に導入したところ、紫外線耐性を示したことである。T4 endonuclease V はヒト色素性乾皮症細胞の紫外線照射後の不定期 DNA 合成を回復させることが知られているので、今回の変異型一本鎖抗体の細胞中での活性は期待の持てるものである。これらの蛋白による DNA 分子認識の解明とともに紫外線抵抗性の機構の解析が急がれる。この現象を解析することによって新しい DNA 修復の機構が見いだされる可能性がある。

おわりに

1984 年以降に発表した論文は北海道大学においてこの 15 年に多くの共同研究者や学生諸氏の協力で行われた研究の成果であり、研究を行うには多くの方々のご援助をいただいたことに感謝したいと思います。

引用文献

- 1) Michaelson A. M., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, **1955**, 2632—2638.
- 2) Gilham P. T., Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6212—6222 (1958).
- 3) Ueda T., Ohtsuka E., *Chem. Pharm. Bull.*, **7**, 935—937 (1959).
- 4) Ikehara M., Ohtsuka E., Kitagawa S., Yagi K., Tonomura Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2679—2686 (1961).
- 5) Ohtsuka E., Moon M. W., Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2956—2970 (1965).
- 6) Wells R. D., Ohtsuka E., Khorana H. G., *J. Mol. Biol.*, **14**, 221—240 (1965).

- 7) Lohrmann R., Soll D., Hayatsu H., Ohtsuka E., Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 819—829 (1966).
- 8) Khorana H. G., Agarwal K. L., Buchi H., Caruthers M. H., Gupta N. K., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., RajBhandary U. L., van de Sande J. H., Sgaramella V., Terao T., Weber H., Yamada T., *J. Mol. Biol.*, **72**, 209—217 (1972).
- 9) Khorana H. G., *Science*, **203**, 614—625 (1979).
- 10) Ohtsuka E., Murao K., Ubasawa, M., Ikehara M., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 3441—3445 (1970).
- 11) Ohtsuka E., Tanaka S., Ikehara M., *Nucleic Acid Res.*, **1**, 1351—1358 (1974); Ohtsuka E., Tanaka T., Tanaka S., Ikehara M., *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 4580—4584 (1978).
- 12) Ohtsuka E., Tanaka T., Tanaka S., Miyake T., Markham A. F., Nakagawa E., Wakabayashi T., Taniyama Y., Nihsikawa S., Fukumoto R., Uemura H., Doi T., Tokunaga T., Ikehara M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 5493—5497 (1981).
- 13) Ohtsuka E., Matsuki S., Ikehara M., Takahashi Y., Matsubara K., *J. Biol. Chem.*, **260**, 2605—2608 (1985).
- 14) 大塚栄子, 川上純司, 蛋白核酸酵素, **40**, 1400—1407 (1995).
- 15) Koizumi M., Hayase Y., Iwai S., Kamiya H., Inoue H., Ohtsuka E., *Nucleic Acid Res.*, **17**, 7059—7071 (1989).
- 16) Koizumi M., Ohtsuka E., *Biochemistry*, **30**, 5145—5150 (1991).
- 17) Komatsu Y., Koizumi M., Nakamura H., Ohtsuka E., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 3692—3696 (1994); Komatsu Y., Kanzaki I., Koizumi M., Ohtsuka E., *J. Mol. Biol.*, **252**, 296—304 (1995); Komatsu Y., Kannzaki I., Ohtsuka E., *Biochemistry*, **35**, 9815—9820 (1996).
- 18) Ikehara M., Ohtsuka E., Tokunaga T., Taniyama Y., Iwai S., Kitano, K., Miyamoto S., Ohgi T., Sakuragawa Y., Fujiyama K., Ikari T., Kobayashi M., Miyake T., Shibahara S., Ono A., Ueda T., Tanaka T., Baba H., Miki T., Sakurai A., Oishi T., Chisaka O., Matsubara K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 5956—5960 (1984).
- 19) Miura K., Inoue Y., Nakamori H., Iwai S., Ohtsuka E., Ikehara M., Noguchi S., Nishimura S., *Jpn. J. Can. Res.*, **77**, 45—51 (1986).
- 20) Tong L., de Vos A. M., Milburn M. V., Jancarik J., Noguchi S., Nishimura S., Miura K., Ohtsuka E., Kim S.-H., *Nature* (London), **337**, 90—93 (1989).
- 21) Kamiya H., Miura K., Ohtomo N., Koda T., Kakinuma M., Nishimura S., Ohtsuka E., *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 200—203 (1989).
- 22) Koizumi M., Kamiya H., Ohtsuka E., *Gene*, **117**, 179—184 (1992).
- 23) Kamiya H., Miura K., Kato H., Nishimura S., Ohtsuka E., *Cancer Res.*, **52**, 1836—1839 (1992); Kamiya H., Murata N., Murata T., Iwai S., Matsukage A., Masutani C., Hanaoka F., Ohtsuka E., *Nucleic Acids Res.* **21**, 2355—2361 (1993).
- 24) Kamiya H., Miura K., Ishikawa H., Inoue H., Nishimura S., Ohtsuka E., *Cancer Res.*, **52**, 3483—3485 (1992).
- 25) Nakabeppu Y., Yamashita K., Sekiguchi M., *J. Biol. Chem.*, **257**, 2556—2562 (1982).
- 26) Inaoka T., Ishida M., Ohtsuka E., *J. Biol. Chem.*, **264**, 2609—2614 (1989).
- 27) Morikawa K., Matsumoto O., Tsujimoto M., Katayanagi K., Ariyoshi M., Doi T., Ikehara

- M., Inaoka T., Ohtsuka E., *Science*, **256**, 523—526 (1992).
- 28) Doi T., Recktenwald A., Karaki Y., Kikushi M., Morikawa K., Ikehara M., Inaoka T., Hori N., Ohtsuka E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 9420—9424 (1992).
- 29) Vassylev D. G., Kashiwagi T., Mikami Y., Ariyoshi M., Iwai S., Ohtsuka E., Morikawa K., *Cell*, **83**, 773—782 (1995).
- 30) Mori T., Nakane M., Hattori T., Matsukaga M., Ihara M., Nikaido O., *Photochem. Photobiol.*, **54**, 225—232 (1991); Matsukaga M., Hatakeyama Y., Ohta M., Mori T., Nikaido O., *ibid.*, **57**, 934—940 (1993).
- 31) Torizawa T., Kato K., Kimura Y., Asada T., Kobayashi, H., Morioka H., Nikaido O., Ohtsuka E., Shimada I., *FEBS Lett.*, **429**, 157—161 (1998).
- 32) Morioka H., Miura H., Kobayashi, H., Koizumi T., Fujii K., Asano K., Matsunaga T., Nikaido O., Ohtsuka E., *Biophys. Biochim. Acta*, **1385**, 17—32 (1998).
- 33) Kobayashi H., Morioka H., Torizawa T., Kato K., Shimada I., Nikaido O., Ohtsuka E., *J. Biochem.*, **123**, 182—188 (1998).
- 34) Kobayashi H., Morioka H., Tobisawa K., Torizawa T., Kato K., Shimada I., Nikaido O., Stewart J. D., Ohtsuka E., *Biochemistry*, **38**, 532—539 (1998).
- 35) Kobayashi H., Sato K., Komatsu Y., Morioka H., Stewart J. D., Tsurimoto T., Ohtsuka E., *Photochem. Photobiol.*, **69**, 226—230 (1999).