生物活性分子による DNA 認識と機能発現の分子機構

杉浦 幸雄

京都大学化学研究所, 〒611-0011 宇治市五ヶ庄

Molecular Mechanisms of DNA Recognition and Function by Bioactive Compounds

Yukio SUGIURA

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Gokasho, Uji, Kyoto 611-0011, Japan

(Received September 1, 2000)

Molecular mechanisms of DNA recognition and functional expression by bioactive compounds such as bleomycin, enediyne antibiotics, and zinc finger proteins are an important research subject in the pharmaceutical scientific field. Cleavage of cellular DNA by bleomycin substantially contributes to the antitumor activity of this drug. Some physicochemical data have clearly demonstrated that the bleomycin-iron (II) complex forms a dioxygen adduct species. Of special interest is the fact that the bleomycin-iron complex and cytochrome P450 have a similar dioxygen activation cycle. Probably, the site-specific iron-peroxide species of bleomycin accounts for the action mechanism of selective DNA cleavage by bleomycin. The enediyne antibiotics possess an unprecedented chemical structure, potent anticancer activity, and a fascinating mode of biological action. A new compound, C-1027, consists of a carrier apoprotein and an enediyne chromophore. The high-resolution NMR experiments clarified that novel chromophore interacts with DNA through its benzoxazolate and aminosugar moiety, and also with apoprotein through the benzoxazolate and macrocyclic moiety. The results provide a molecular basis for the host-recognition mode, the reaction mechanism, and the drug delivery system of chromoprotein C-1027. In addition, we found unique reactivity of C-1027 chromophore toward a tRNA^{Phe}. RNA as well as DNA might be also a potent biological target of the enediyne antibiotics. On the basis of characteristic DNA binding mode of Cys₂His₂-type zinc finger motif, artificial zinc finger proteins have been created, and new functions such as DNA cleavage, long sequence binding, and DNA bending are produced. The first artificial His₄-type zinc finger protein is also made from Cys→His mutations of the Cys₂His₂-type transcription factor Sp1. Such novel zinc finger proteins may be useful as a gene therapeutic agent and a tool for genetic engineering.

Key words—DNA recognition; DNA cleavage; sequence-specific binding; bleomycin; enediyne; zinc finger protein; DNA binding motif; artificial protein

1. はじめに

DNA に結合して生物活性を発揮する外来性及び内因性物質 (生物活性分子) には, 癌細胞の DNA を攻撃して制癌作用を示す抗腫瘍性抗生物質から, 遺伝情報の転写因子として DNA を認識し, 遺伝子発現を制御する DNA 結合蛋白質まで多種類のものが知られている. 我々の研究室では, 1) プレオマイシン抗生物質による酸素活性化, DNA 切断及び制癌作用の分子機構, 2) エンジン抗腫瘍抗生物質の DNA 切断特異性と作用発現機構, そして 3) 亜鉛フィンガー蛋白質の DNA 認識と機能発現の大きく 3 つの研究課題を遂行しており, これらの研究成果を中心に述べる. このような DNA を標的とする生物活性分子の作用発現機構の分子レベルでの理解は, 学術的にも応用的にも薬学分野に重要な情報を提供している.

2. プレオマイシン抗生物質による酸素活性化, DNA 切断及び制癌作用の分子機構

プレオマイシン抗生物質は, 皮膚癌, 頭頸部及び子宮頸部の癌, 肺の扁平上皮癌, 悪性リンパ腫などの治療に用いられている. プレオマイシンの抗腫瘍効果には, その癌細胞 DNA の切断作用が重大に関与している. ユニークな構造を持つプレオマイシンと DNA との反応においては, 両者の分子認識と結合, 鉄錯体による分子状酸素の活性化, 活性酸素種による DNA のラジカル開裂に至る一連の過程が合理的な反応手順で進行していることが明らかにされた.^{1,2)} 特に, プレオマイシンの DNA 切断には鉄(II)イオンと分子状酸素とが補欠因子として寄与しているが示唆され, これを契機に研究は大きく展開した. すなわち, プレオマイシン分子中の β -アミノアラニン-ピリミジン- β -ヒドロキシヒスチジン部

法によって明らかにされ、DNA 上のその切断部位との関連性が示された。5'-GGC, 5'-GCC, 5'-GCG 部位のような約 3 塩基対のフットプリントが明確に観測され、それらの内部に必ずブレオマイシンによる強い切断部位の存在が認められた。⁸⁾ これらの実験結果を総合すると、1) ブレオマイシン-金属錯体は DNA のマイナーグループに結合する、2) その結合部位のサイズは 5'-グアニン-ピリミジン部位を含む約 3 塩基対である、そして 3) 5'-GC 配列の少なくとも G 塩基を強く認識し、特にグアニンの 2-アミノ基が中心的な役割を果たしていることが分かった。ブレオマイシンは鉄イオンと β -アミノアラニン-ピリミジン- β -ヒドロキシヒスチジン部分の 5 個の窒素原子で 5-5-5-6 員環の五配位四角錐錯体を形成する。ブレオマイシン-金属錯体は比較的大きな分子であるにもかかわらず、その DNA 結合部位のサイズは約 3 塩基対と小さく、それゆえ、金属結合部位と DNA 結合部位とが空間的に近接したコンパクトな分子配置を形成していると考えられる。実際、ブレオマイシン-マンガン(II)錯体のプロトン核磁気緩和実験から、ピチアゾールプロトンは Mn 核から 6-7 Å の近くにあること¹⁰⁾やブレオマイシン-鉄錯体による DNA 切断で引き抜かれる 5'-GC 配列の C 塩基のデオキシリボースの C4' 水素原子と 5' 側の G 塩基の 2-アミノ基とが空間的に近い位置にあることもブレオマイシン-金属錯体の折りたたみ構造を支持している。コンパクトな構造を持つブレオマイシン-金属錯体は 5'-GC 配列のマイナーグループにアイソヘリカルに結合するとともに、ピチアゾール-カルボキシアミド領域の凹型エッジ部分と G 塩基の 2-アミノ基周辺の凸型部分との空間的な適合に加えて、そのエッジ内に並列する 2 個のチアゾール環の窒素原子やカルボキシアミドの酸素原子と DNA の G 塩基の 2-アミノ基との水素結合を介して特異的に G 塩基を認識していると推定される。^{8,11)} ブレオマイシンによるこのような DNA 相互作用モデルは、ブレオマイシン-バナジウム錯体と DNA との高分解能 NMR 解析からも支持されている。¹²⁾ ブレオマイシン-金属錯体による 5'-グアニン-ピリミジン配列の認識において、グアニン塩基の 2-アミノ基とともにブレオマイシン分子中のピリミジン部分のアミノ基の重要性も最近の NMR 研究から指摘されている。¹³⁾ 筆者は現在、ブレオマイシン-金属錯体-DNA 複合体の X 線結晶解析を行っており、この研究が成功したときに、真に“ブレオマイシンは受容体である DNA をいかに構造認識するのか”が解明されるであろう。この他にも、ブレオマイシン-鉄(III)錯体の光による DNA 切断活性を ESR 法とゲル電気泳動法を用いて初めて示した⁷⁾が、これは新しい DNA 切断活性化の手段として国内外で広く使用されている。また、白金錯体(シス-プラチン)を結合させた DNA ではコンフォメー

ション変化が誘発され、ブレオマイシンによる DNA 切断が著しく促進されることを DNA 塩基レベルで見出し、ブレオマイシンと他の抗癌剤との併用による相乗効果の理解に役立つ貴重な知見を得た。¹⁴⁾ さらに、天然ブレオマイシンとは異なって AT 塩基を優先的に切断する人工ブレオマイシンの設計・創製にも成功した。¹⁵⁾ これら一連のブレオマイシンに関する研究成果は、ブレオマイシン抗生物質のユニークな DNA 切断及び制癌作用のメカニズム解明に先駆的かつ重要な貢献を果たした。

3. エンジン抗癌抗生物質の DNA 切断特性と作用発現機構

エンジン型抗癌抗生物質は、新奇な化学構造、強い DNA 切断活性、そして極めて高い抗腫瘍効果のため、それらの構造と作用発現との関連性に大きな関心が寄せられていた。筆者らは、特に我が国で発見されたエスペラミシン A₁、ダイナミン A、C-1027 及び N1999A2 を取り上げ、これらエンジン化合物の DNA 認識と切断機構を分子レベルで解明することに成功した。¹⁶⁻¹⁹⁾ 現在までに発見されているエンジン抗癌抗生物質の中でネオカルチノスタチン、C-1027、ケダルシジン、そしてマデュロペプチンはクロモプロテイン系に属し、活性本体であるエンジンクロモホアーがアポ蛋白質に包接されている (Fig. 3)。エンジン抗生物質の高い抗癌作用は、その強い DNA 切断活性に起因していることから、クロモプロテイン系エンジン抗癌抗生物質の活性発現様式を模式的に示すと Fig. 4 のようになる。高分解能 NMR 法によって明らかにされた C-1027 におけるアポ蛋白質-エンジンクロモホアー複合体では、アポ蛋白質がその疎水性ポケット内にエンジンクロモホアーを包接し、エンジン環のベンゾオキサゾリン環部分とチロシン 32 残基との π - π 相互作用などによって非共有結合的にクロモホアーを安定化している。²⁰⁾ 次に DNA-C-1027 クロモホアー複合体の構造を 2 次元 NMR 法を駆使して解明した。すなわち、d(TIG2C3C4A5T6C7)/d(G8A9T10G11G12C13A14)DNA オリゴマーと C-1027 クロモホアーとの複合体について NMR 測定を行い、NOE 距離情報に基づく最適化構造モデルの構築に成功した (Fig. 5)。^{20,21)} 本モデルから、エンジンクロモホアーはベンゾオキサゾリン環部分の C3G12-C4G11 塩基対間へのインターカレーション及びアミノ糖部分の A5T6/A9T10G11 配列のマイナーグループへの静電的相互作用を通して、DNA の C3C4A5T6/A9T10G11G12 配列を認識していることが示された。ここで興味深いことに、エンジン部分の 3 位と 6 位のプロトンが G12 の H1' と A5 の H1' 又は H4' と接近しており、これらの水素を引き抜いて DNA 切断を誘起しているものと予想された。C-1027 クロモホアーの DNA 及びアポ蛋白質両複合体の NMR 構造モデルを詳細に比較

Fig. 3. Natural Enediyne Antibiotics

することにより、エンジイネクロモホアの DNA とアポ蛋白質との認識様式の相違を検討した。C-1027 クロモホアの DNA 認識には、主にベンゾオキサゾリン環とアミノ糖部分が重要な役割を演じているのに対し、マクロサイクリック部分は DNA との顕著な相互作用が認められなかった。他方、C-1027 クロモホアのアポ蛋白質認識には、主にベンゾオキサゾリン環とマイクロサイクリック部分とが重要な役割を果たしていたのに対し、アミノ糖はアポ蛋白質とほとんど相互作用していなかった。この認識様式の相違は、水素引き抜き反応を演じるエンジイネクロモホアの活性や安定性に大きく反映しているものと考えられた。さらに、DNA 結合状態、溶液状態、アポ蛋白質結合状態の 3 状態におけるエンジイネクロモホアの平均最適化構造を重ね合わせた結果、C-1027 クロモホアはクロロフェノールを含むマクロサイクリック部分のコンフォメーションを変化させることにより、アポ蛋白質内よりも DNA 内において反応性を上昇させていることが示唆された。²⁰⁾ C-1027 クロモホアのアポ蛋白質から標的 DNA への移行は、薬物送達系の天然モデルと考えられ、クロモプロテイン系エンジイネ抗癌抗生物質の作用機序を理解する上で極めて興味深い。

ネオカルチノスタチン、エスペラミシン、ダイナミシンなどの他のエンジイネ抗生物質による DNA 切断にはチオール化合物のような還元剤が必要であ

るのに対し、C-1027 は還元剤の非存在下でもバーグマン反応を引き起こして DNA を切断する。¹⁸⁾ C-1027 による DNA 切断は AT 塩基に優先的に起こり、また DNA 切断の塩基配列選択性を注意深く検討してみると、5'-TAT, 5'-AGA, 5'-ATA のような配列で強い切断が認められた。さらに、C-1027 クロモホアによる DNA 切断では、2 本鎖同時切断が顕著に観測され、例えば次のような塩基配列での 2 本鎖同時切断が未変性ゲル電気泳動法の使用で確認された。

この 2 本鎖同時切断は反応論的には、エンジイネ骨格が芳香環化する際に生成する芳香環ピラジカルによる 5' 及び 3' 鎖デオキシリボースからの水素原子の同時引き抜きに起因しており、このような 2 本鎖同時切断の活性によりエンジイネ型抗生物質は強い抗癌作用を発揮する。²²⁾ DNA 切断の反応生成物の分析から、C-1027 による DNA 切断はデオキシリボースの C4' 位の水素引き抜きによって開始されるが、5'-GTTA₁T/3'-CA₃A₂TA のような配列においては、A₁ 塩基では C4' 位が攻撃され、他方 A₂ と A₃ 塩基ではそれぞれ C1' 及び C5' 位のプロトン引き抜きが優先することが実験的に示された。従来、エンジイネ抗癌抗生物質は DNA を標的とし、RNA は全く攻撃しないと考えられていた。しかし、C-1027 クロモホアがある種の RNA に対して DNA と同様の切断反応を引き起こすことを見出し

Fig. 4. Action Mode of Chromoprotein-Type Eneidyne Antibiotic

Fig. 5. NMR Structures of Chromophore-DNA Complex (left), Chromophore only (middle), and Chromophore-Apoprotein Complex (right)

た.^{23,24)} 特に興味ある結果は、高次構造を形成した tRNA^{Phe} においては、C-1027 クロモホアがそのアンチコドンループ部分の G と A 塩基を特異的に攻撃することである。エンジン抗生物質は RNA に対しても高い反応性を有し、しかも RNA のコンフォメーションに大きく依存していることが強く示唆された。コンフォメーション特異的切断に関しては、ダイナミシンによる B-Z 接合領域やバルジ近傍での DNA 切断の著しい増強も観察されている。²⁵⁻²⁷⁾ この現象は、ダイナミシン分子中のアンスラキノン環が DNA のマイナーグループでプリン塩基とインターカレーションし、他方アンスラキノン環に対し垂直に位置したエンジン環がその近傍の塩基を優先的に攻撃するためと考えられる。これらの研究の意義は、特異な薬物の作用メカニズムの解明にとどまらず、低分子薬物と標的高分子との間の分子認識と作用発現を分子レベルで解明するという現在の大きな研究の流れに先導的役割を果たしたことにある。

4. 亜鉛フィンガー蛋白質の DNA 認識と機能発現

真核生物の転写因子などに見られる亜鉛フィンガーは、金属イオンがそのドメインの 2 次構造形成に重大に関与し、蛋白質に DNA 認識能を賦与する全く新しいタイプの DNA 結合モチーフである。中でも C₂H₂ 型亜鉛フィンガーは 2 つのシステインチオールと 2 つのヒスチジンイミダゾールを介して亜鉛(II)が結合することによって、アミノ末端側の逆平行 β シート、カルボキシル末端側の α ヘリックス (DNA 認識ヘリックス) がコンパクトに折りたたまれ、球状モチーフを形成している。C₂H₂ 型亜鉛フィンガーを 3 個有するヒト転写因子 Sp1 を取り上げ、亜鉛フィンガードメインの 2 次構造形成と DNA 結合が金属に依存していること、及び 3 個の亜鉛フィンガードメインの非等価的な DNA 塩基認識様式を先駆けて明らかにした (Fig. 6).²⁸⁻³⁰⁾ 一般に、C₂H₂ 型亜鉛フィンガーによる DNA 認識の特徴として、次のような性質があげられる。

- 1) 1 つの亜鉛フィンガーがほぼ 3 塩基を認識する。
- 2) 複数の亜鉛フィンガーが直列につながった構造をとって DNA を認識する。
- 3) 蛋白質として単量体で DNA に結合し、非対称塩基配列を認識する。
- 4) 亜鉛フィンガー部分のみで DNA に結合できる。このような C₂H₂ 型亜鉛フィンガー DNA 結合モチーフはその繰り返し構造ゆえに約 3 塩基ずつ認識するモジュールの連結体としてみる事ができ、この単純な構図は従来の DNA 結合モチーフにはない特徴であり、任意の塩基数と塩基配列を認識する新しい機能をもった人工亜鉛フィンガー蛋白質の設計・創製に対して極めて魅力的なモチーフを提供していると考えられる。^{31,32)} 染色体遺伝子の特定の位置を自在に切断したり、特定塩基配列部位に結合するような分子の開発は、ゲノム遺伝子解析や DNA 結合蛋白質の機能解析に不可欠であるばかりでなく、アンチセンス分子や人工リプレッサーを用いる遺伝子治療の観点からも重要な課題である。例えば、天然制限酵素は分子ハサミとして非常に優れた

Fig. 6. DNA Recognition Mode of Zinc Finger in Transcription Factor Spl

(A)

(B)

Fig. 7. Zinc Finger-Type Restriction Enzyme (A) and Its DNA Cleavage Site (B)

特性を有しているが、ほとんどの認識配列は4—6塩基対であり、また多くの場合2回対称な配列である。それゆえ、遺伝子工学分野で特定の位置での自由な核酸切断が要求される場合、大きな障壁となる。10—20塩基対近くの非対称配列を認識する人工制限酵素の設計には亜鉛フィンガーが最適である。既に、筆者らは転写因子Sp1の3個の亜鉛フィンガーのアミノ末端側に7つのアミノ酸残基のリンカーを介して新たにグリシルグリシルヒスチジン(GGH)を導入したSp1GGHを構築した。³³⁾ GGHドメインは銅(II)又はニッケル(II)と正方平面型の錯体を作り、酸化剤存在下DNAをラジカル的に切断する。このSp1GGHはSp1が認識する約10塩基対のGCボックス近傍の1カ所でDNAを特異的に切断した(Fig. 7)。その後、DNA認識部位として亜鉛フィンガー蛋白質Sp1を、そして切断部位としてGGHのかわりに酵素*FokI*の切断ドメインを用いたキメラ蛋白質による人工制限酵素の構築も報告されている。³⁴⁾ これらの事実は、亜鉛フィンガーモチーフが人工制限酵素の基本骨格と成りうることを明確に示したものであり、将来のオーダーメイド型制限酵素のデザインに大きな道を開いた。

4つの塩基から成るDNAにおいては、1000万

—1億のユニークな配列が存在し、それによって多くの分子を作り出している。したがって、遺伝子レベルで特異的であるためには、少なくとも16—18塩基対以上のDNA配列を認識する必要がある。この長鎖DNA配列の認識に対しても、亜鉛フィンガーの数を増やすことにより実現されうる。特に、フィンガー数の増加に伴いDNAとの親和性・選択性が増し、フィンガーを繋ぐリンカーの最適化によって、fMオーダーの結合定数を示すことが可能である。最近、筆者らは9つの亜鉛フィンガーを連結することにより30塩基対の配列を特異的に認識することに成功した。³⁵⁾ この9フィンガー蛋白質Sp1ZF9はヒト由来の転写因子Sp1の3つの亜鉛フィンガー領域を3ユニット直列に繋げたものであり、Sp1の結合配列である10塩基対から成るGCボックスを3個繋げたGC3ボックスに特異的に結合する(Fig. 8)。Sp1ZF9とDNAとの複合体形成に関わる時間は約72時間であり、3フィンガー蛋白質の約30分とは約140倍の違いがある。詳細な解析の結果、Sp1ZF9はまずアミノ末端側の3つの亜鉛フィンガーによりGC3ボックスの末端においてDNAのメジャーグループに巻き付いて塩基を認識することが判明した。天然に存在する転写因子

Fig. 8. Long Sequence-Binding Zinc Finger Protein (A) and Its DNA Binding Mode (B)

TFIIIA も 9 フィンガー蛋白質であるが、9 つの亜鉛フィンガーがすべてメジャーグループにはまりこみ塩基を認識しているわけではない。³⁶⁾したがって、今回創製された Sp1ZF9 において、すべての亜鉛フィンガーが DNA メジャーグループにはまりこんで 30 塩基対もの長い配列を認識しているという事実は注目すべきことである。また、Liu らも 3 個の亜鉛フィンガーを持つ転写因子 Zif268 を基に創製した 6 個のフィンガーを有する新規亜鉛フィンガー蛋白質が DNA に対する親和性と選択性を顕著に上昇させ、しかも HeLa 細胞中で転写を制御できることを示した。³⁷⁾これらの事実は亜鉛フィンガーによる認識配列の拡張という手法の有効性を強く支持している。マルチ亜鉛フィンガー蛋白質による DNA 認識に基づく新反応として、筆者らは遺伝子転写制御を視野に入れた DNA 湾曲化反応に成功している。DNA の種々の高次構造が遺伝子発現に重要な役割を担っていることはよく知られているが、中でも DNA の湾曲は近年注目を集めている。ある遺伝子の転写の際、転写因子の結合により湾曲が引き起こされた DNA 部位を元来湾曲している DNA に置き換えても転写が進行する事実は、DNA 湾曲が遺伝子の転写反応に大きく関与していることを示

唆している。したがって、DNA の湾曲を人為的にコントロールすることは極めて重要な意義を持ち、このような分子の創製そのものが新規転写制御反応の構築に結びつく。これまでに、3 本鎖形成や DNA バックボーンりん酸残基の負電荷の中和による DNA 湾曲が達成されている。^{38,39)}これに対し、亜鉛フィンガーモチーフによる DNA 湾曲化は、亜鉛フィンガー間を繋ぐリンカーを通常よりも柔軟で長いリンカーにすることによって、亜鉛フィンガーの離れた 2 つの結合部位間で DNA を湾曲化するのである (Fig. 9)。⁴⁰⁾実際、7 残基から成るポリグリシンリンカーにより、2 ユニットの Sp1 由来亜鉛フィンガーを連結した 6 フィンガー蛋白質は、2 ヶ所の離れた GC ボックスを介して DNA に結合し、DNA の湾曲を引き起こした。リンカーのポリグリシンの数が 4 残基の場合には、1 つの DNA 部位にしか結合できないために、ほとんど DNA の湾曲は起こらず、またポリグリシンの数が 10 残基の場合には、2 つの GC ボックス部位に結合するが、グリシン 7 残基のものに比較して DNA 湾曲の度合いは小さかった。

天然に存在する亜鉛フィンガータイプとして、Cys₂His₂ 型、Cys₃His 型、Cys₄ 型、及び Cys₆ 型が

Fig. 9. DNA Bending Induction by Zinc Finger (A) and Artificial DNA Bending Finger (B)

Fig. 10. NMR Structures of C_2H_2 -Type Zinc Finger (left) and H_4 -Type Zinc Finger (right)

知られているが、現在までのところ His_4 型は見つけられていない。筆者らは、Sp1 の DNA 結合ドメインを担っている Cys_2His_2 型亜鉛フィンガーモチーフを基に、金属配位子としてよく機能するヒスチジンだけで亜鉛と結合する天然には存在しない人工 His_4 型亜鉛フィンガー蛋白質を構築し、新規 DNA 認識金属モチーフとして機能しうるかを検討した。⁴¹⁾ Sp1 の 3 つの亜鉛フィンガードメインのうち 2 番目のフィンガーに相当する C_2H_2Sp1f2 とその $Cys \rightarrow His$ 置換体である H_4Sp1f2 を Fmoc 固相合成法により合成し、円二色性及び核磁気共鳴スペクトルにより蛋白質のフォールディングや亜鉛フィンガーの高次構造を追究した。さらに、天然 Sp1 の 3 個の亜鉛フィンガードメインを有する C_2H_2Sp1 及びその His 置換体 H_4Sp1 を大腸菌で発現後、精製した蛋白質を得、 C_2H_2Sp1 と H_4Sp1 の DNA 結合能・認識様式を検討した。その結果、 His_4 置換体においては、 α -ヘリックスの若干の歪みが亜鉛配位によって生じているものの亜鉛フィンガーは天然 Cys_2His_2 型と類似の $\beta\beta\alpha$ 構造を保持していること (Fig. 10)、そして GC ボックス配列を認識して DNA に特異的に結合することが確認された。この事実、核酸を認識する新しい金属フィンガーモチーフの開発に有用な知見を与えるだけでなく、天然にも His_4 型の亜鉛フィンガー蛋白質が存在するかも知れないことを暗示している。人工亜鉛フィンガー蛋白質の創製は、今後、人工リプレッサーのような遺伝子制御分子としての展開が大いに期待される。⁴²⁾

5. おわりに

筆者らは水溶性を付与したフラレーンが光の存在下、DNA 切断と細胞毒性を示し、フラレーンの化学反応性が生物活性発現に関与できることを初めて発見した。⁴³⁾ また、ワラビの発癌物質プタキロサイドによる DNA のプリン塩基へのアルキル化反応と

切断反応の機構を構造式レベルで解明し、このような DNA 修飾がワラビによる化学発癌の第一段階の反応であることも明確に示した。⁴⁴⁾ 生物活性分子による DNA 認識と機能発現の研究は、医薬分子機能学領域において新境地を開拓したものと考えられ、さらなる進展が 21 世紀に期待される。

謝辞 本研究を実施するにあたり終始、暖かい激励を給った京都大学名誉教授田中 久先生に厚くお礼申し上げます。本研究は、京都大学薬学部放射性薬品化学教室並びに京都大学化学研究所抗癌医薬開発研究部門・生体反応設計研究部門において実施されたものであり、本研究にご協力いただいた多くの教室員並びに共同研究者に深く感謝致します。

REFERENCES

- 1) Sugiura Y., Takita T., Umezawa H., "Metal Ions in Biological Systems, Vol. 19," ed. by Siegel H., Dekken, New York, 1985, pp. 81-108.
- 2) Stubbe J., Kozarich J. W., *Chem. Rev.*, **87**, 1107-1136 (1987).
- 3) Sugiura Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5208-5215 (1980).
- 4) Sugiura Y., Suzuki T., Kawabe H., Tanaka H., Watanabe K., *Biochim. Biophys. Acta*, **716**, 38-44 (1982).
- 5) Sugiura Y., Suzuki T., Kuwahara J., Tanaka H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 1511-1518 (1982).
- 6) Wu J. C., Kozarich J. W., Stubbe J., *Biochemistry*, **24**, 7562-7568 (1985).
- 7) Suzuki T., Kuwahara J., Sugiura Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 916-922 (1983).
- 8) Kuwahara J., Sugiura Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 2459-2463 (1988).
- 9) Sugiura Y., Suzuki T., *J. Biol. Chem.*, **257**, 10544-10546 (1982).
- 10) Sheridan R. P., Gupta R. K., *J. Biol. Chem.*, **256**, 1242-1247 (1981).
- 11) Morii T., Saito I., Matsuura T., Kuwahara J., Sugiura Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 938-939 (1987).
- 12) Hiroaki H., Nakayama T., Ikehara M., Uesugi S., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2780-2786 (1991).
- 13) Wu W., Vanderwall D. E., Turner C. J., Kozarich J. W., Stubbe J., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1281-1294 (1996).
- 14) Maschark P. K., Sugiura Y., Kuwahara J., Lippard S. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 6795-6798 (1983).
- 15) Otsuka M., Masuda T., Haupt A., Ohno M.,

- Shiraki T., Sugiura Y., Maeda K., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 838–845 (1990).
- 16) Sugiura Y., Uesawa Y., Takahashi Y., Kuwahara J., Golik J., Doyle T. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 7672–7676 (1989).
- 17) Sugiura Y., Shiraki T., Konishi M., Oki T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 3831–3835 (1990).
- 18) Sugiura Y., Matsumoto T., *Biochemistry*, **32**, 5548–5553 (1993).
- 19) Ando T., Ishii M., Kajiura T., Kameyama T., Miwa K., Sugiura Y., *Tetrahedron Lett.*, **39**, 6495–6498 (1998).
- 20) Okuno Y., Iwashita T., Sugiura Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6848–6854 (2000).
- 21) Okuno Y., Iwashita T., Otani T., Sugiura Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 4729–4730 (1996).
- 22) Smith A. L., Nicolaou K. C., *J. Med. Chem.*, **39**, 2103–2117 (1996).
- 23) Totsuka R., Aizawa Y., Uesugi M., Okuno Y., Matsumoto T., Sugiura Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 168–173 (1995).
- 24) Sugiura Y., Totsuka R., Araki M., Okuno Y., *Bioorg. Med. Chem.*, **5**, 1229–1234 (1997).
- 25) Ichikawa A., Kuboya T., Aoyama T., Sugiura Y., *Biochemistry*, **31**, 6784–6787 (1992).
- 26) Kusakabe T., Maekawa K., Ichikawa A., Uesugi M., Sugiura Y., *Biochemistry*, **32**, 11669–11675 (1993).
- 27) Kusakabe T., Uesugi M., Sugiura Y., *Biochemistry*, **34**, 9944–9950 (1995).
- 28) Kuwahara J., Yonezawa A., Futamura M., Sugiura Y., *Biochemistry*, **32**, 5994–6001 (1993).
- 29) Nagaoka M., Sugiura Y., *Biochemistry*, **35**, 8761–8768 (1996).
- 30) Yokono M., Saegusa N., Matsushita K., Sugiura Y., *Biochemistry*, **37**, 6824–6832 (1998).
- 31) Pavletich N. P., Pabo C. O., *Science*, **252**, 809–817 (1991).
- 32) Elrod-Erickson M., Rould M. A., Nekludova L., Pabo C. O., *Structure*, **4**, 1171–1180 (1996).
- 33) Nagaoka M., Hagihara M., Kuwahara J., Sugiura Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 4085–4086 (1994).
- 34) Kim Y.-G., Cha J., Chandrasegaran S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 1156–1160 (1996).
- 35) Kamiuchi T., Abe E., Imanishi M., Kaji T., Nagaoka M., Sugiura Y., *Biochemistry*, **37**, 13827–13834 (1998).
- 36) Nolte R. T., Conlin R. M., Harrison S. C., Brown R. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 2938–2943 (1998).
- 37) Liu Q., Segal D. J., Ghiara J. B., Barbas III C. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 5525–5530 (1997).
- 38) Liberles D. A., Dervan P. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 9510–9514 (1996).
- 39) Strauss J. K., Roberts C., Nelson M. G., Switzen C., Maher III L. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 9515–9520 (1996).
- 40) Imanishi M., Hori Y., Nagaoka M., Sugiura Y., *Biochemistry*, **39**, 4383–4390 (2000).
- 41) Hori Y., Suzuki K., Okuno Y., Nagaoka M., Futaki S., Sugiura Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7648–7653 (2000).
- 42) Nagaoka M., Sugiura Y., *J. Inorg. Biochem.*, in press.
- 43) Tokuyama H., Yamago S., Nakamura E., Shiraki T., Sugiura Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7918–7919 (1993).
- 44) Kushida T., Uesugi M., Sugiura Y., Kigoshi H., Tanaka H., Hirakawa J., Ojika M., Yamada K., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 479–486 (1994).