総 合 論 文

天然ブレオマイシンの制癌機構解明に寄与する 人工ブレオマイシンの合成研究

大 和 隆 志*・杉 山 亨*・須 賀 亮*・
大 塚 雅 巳*・大 野 雅 二*

Synthetic Study toward Man-made Bleomycins by Deeply Contributing to the Anticancer Mechanism of Natural Bleomycins.

Takashi OWA*, Toru SUGIYAMA*, Akira SUGA*, Masami OTSUKA* and Masaji OHNO*

Bleomycins (BLMs) are antitumor antibiotics of unusual glycopeptide structure. The potent activity of BLM is attributed to the oxygen activation and the DNA cleavage by the formation of iron-chelate of the peptide moiety. *erythro-β*-Hydroxy-L-histidine, a pivotal amino acid for the oxygen activation, is prepared enantioselectively by aldol reaction of (*R*)-3-bromoacetyl-4-isopropyl-1,3-oxazolidin-2-one with 1-triphenylmethylimidazole-4-carbaldehyde. Model ligands for the metal binding site of BLM with 4-methoxypyridine (PYML-6) and 4-dimethylaminopyridine (PYML-8) show oxygen activation up to 97% and 125% of that of BLM, respectively. *cis-β*-Methylstyrene is oxidized either with Fe(III)-H₂O₂ or Fe(II)-O₂ complex systems of BLM and PYML-6 to give the corresponding optically active epoxide. The DNA binding region of BLM is combined with PYML-6 to give the first man-designed BLM, PYML(6)-bleomycin, which shows nucleotide cleavage mode remarkably similar to that of BLM. On the other hand, PYML-6 moiety and distamycin are coupled to afford PYML(6)-(4*R*-APA)-distamycin which shows dramatically altered AT specific mode in the DNA scission.

1. はじめに

ブレオマイシン (BLM) は 1966 年、梅沢らにより放線菌 *Streptomyces verticillus* から単離された抗腫瘍性抗生物質で、ホジキンリンパ腫、扁平上皮癌の治療に用いられている¹⁾。その構造はアミノ酸 6 種、糖 2 種、および末端アミンからなる糖ペプチドで、末端アミン部分を異にする多くの BLM が天然から得られている (図 1)²⁾。はじめは BLM A2 と BLM B2 を主成分とする混合物が臨床治療に用いられたが、その後、第二世代の BLM の開発が進められ、半合成的に生産されるペプロマイシン (PEP) やリプロマイシン (LIB) が用いられるようになってきている^{3,4)}。

BLM の制癌機構に関してはこれまで多くの研究結果から次のようなことが総括的に言われている。しかしこ

れらは今後より定量的に証明してゆくことが重要である。

(1) BLM は Fe(II) や Cu(II) などの遷移金属と結合し、コンパクトに折り畳まれた錯体を形成する (図 2)⁵⁻⁷⁾。

(2) BLM-Fe(II) 錯体は 2-メルカプトエタノールやアスコルビン酸の存在下、触媒的に酸素を活性化し、BLM-Fe(II)-O₂²⁻ に近い活性種を生成する。その活性酸素により DNA がグアニン塩基に隣接する箇所の特異的に切断される⁵⁻⁷⁾。

(3) BLM 金属錯体は B 型 DNA の狭い溝 (minor groove) に結合し、その際ピチアゾール部位によりグアニン塩基の 2-アミノ基が認識されると考えられる⁸⁾。

(4) BLM の糖鎖部位は酸素分子を収納する空隙を形成するための立体的因子となっている⁹⁾。また BLM はある種の癌細胞に集まりそこで蓄積されるが、その際糖鎖部位が膜透過に重要な寄与をしていると推測されている⁷⁾。

* 東京大学薬学部 ()

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo ()

Fig. 1 Structure of bleomycins.

Fig. 2 Proposed structure of BLM-Fe(II)-O₂ complex and the mechanism of action.

(5) (2S,3S,4R)-4-アミノ-3-ヒドロキシ-2-メチルペンタン酸からスレオニンにかけての部位は、金属結合部位とピチアズール部位とを適切な距離と位置関係で結びつける連結部位(リンカー)と考えられる。梅沢らはこの部分の構造と活性の関係を調べ、リンカー部位を(R)-4-アミノペンタン酸(4R-APA)でおきかえた修飾BLMがすぐれたDNA切断活性を示すことを見出した(図3)⁴⁾。リンカー部位は立体的に入り組んでいるので取りうるコンフォメーションが制限され、そのためBLM分子全体のかたちがDNAにうまく適合するように

なるのであろう。

(6) (S)-2,3-ジアミノプロピオンアミド部位のカルバモイル基は組織内に分布する BLM hydrolase という酵素により加水分解を受けてカルボキシル基となり、不活性な deamido-BLM を生ずる¹⁰⁾。deamido-BLM ではアミノ基のかわりにカルボキシル基が鉄に配位するため酸素を活性化しなくなると考えられる¹¹⁾。このように 2,3-ジアミノプロピオンアミド部位は各臓器内の BLM hydrolase の濃度に応じて BLM の *in vivo* 活性を制御するスイッチの役目を果たしていると考えることができ

Fig.3 Modification of the linker moiety of BLM.

る。このスイッチデバイス(転換機能)が分子に含まれている概念は重要なものと筆者らは考えている。

このようにBLMという糖オリゴペプチドは各パーツがそれぞれの役割をもちながら、全体として協奏的な制癌活性を示している。自然によって創られた最も精妙な化合物である。

筆者らははじめBLMの構造決定の一助として合成研究を開始したが、1982年に微生物化学研究所の梅沢浜夫所長を中心とした全合成プロジェクトが完結した後はBLMのユニークな制癌機構に魅せられ、“深は新”に通ずると信じ、新たな人工プレオマイシンを意図して制癌機構解明にも寄与すべく、モデル化合物の研究を積極的に行ってきた。本稿ではその合成的側面に重点をおいて述べる。

2. エリスロ-β-ヒドロキシ-L-ヒスチジンの合成

BLMは通常のパепチドには見られないアミノ酸を4種類含み、それぞれが制癌作用をあらわすうえで重要な役割を担っている。なかでもエリスロ-β-ヒドロキシ-L-ヒスチジン1はBLMの鉄錯体形成と酸素活性化に不可欠であるのみならず、その立体化学は金属結合部位、DNA結合部位、および糖鎖部位の空間的な位置関係を決定するための重要な要素となっている。このアミノ酸を立体選択的に効率よく合成することは、BLMのみならずその構造的特徴を活かしたモデル化合物を合成する

ためにも必須のことと考えられた。しかし化合物1のこれまでの合成法には立体選択性や反応の操作性などの点で改善すべき点があった。

1

さきに斉藤らはピルビン酸とグリシンの Schiff 塩基の銅錯体2を用いる石戸法により、アルデヒド3からエリスロ選択的にβ-ヒドロキシヒスチジンを合成し、これをD-酒石酸により光学分割して化合物1を得ている(式1)¹²⁾。この反応でエリスロ異性体のみが生成するのはイミダゾール環の窒素原子が銅に配位した遷移状態[A]を経由するためと説明されている。この遷移状態[A]においてイミダゾールが銅の下側から配位すればL-エリスロ体が、上側から配位すればD-エリスロ体ができる。従って、銅錯体の配位平面上側を遮蔽し、下側のみからイミダゾールが接近するような工夫をしてやれば、目的とするL-エリスロ異性体が優先的に得られるであろうと筆者らは考えた。

一方, Belokon' らは *N*-ベンジルプロリンを組み込んだ不斉なグリシン銅誘導体とアセトアルデヒドとの反応で光学活性なスレオニンを得ている¹³⁾。しかし Belokon' らの銅錯体はホルミルイミダゾール 3 とは反応せず, これを用いてヒドロキシシスチジンを合成することはできなかった。そこで筆者らはキラルなグリシン銅を自ら開発することとした。種々検討した結果, *D*-フェニルアラニンを導入した銅錯体 4 を作り, これとアルデヒド 3 を反応させたところ, スレオ体は生成せず, エリスロ体の 1 のみが 49% の化学収率で得られた(式 2)¹⁴⁾。キラルな充填剤を用いた高速液体クロマトグラフによれば, この生成物 1 の光学純度は約 50% であった。これを *D*-酒石酸の塩として結晶化させると光学的に純粋な 1 が得られた。この反応では遷移状態[B]において錯体平面の上側に *D*-フェニルアラニン残基がかなり, おおいかぶさっ

ていると推察される。

ホルミルイミダゾール 3 は有機溶媒に難溶で, またアルデヒドとしての反応性も低いので, グリシン銅誘導体を用いる水溶液中での反応以外を行うことができなかった。そこで化合物 3 のイミダゾール環をトリチル基で保護したところ, 無水有機溶媒中でのアルドール型反応を行うことができ, 光学純度の良好な化合物 1 が得られた(式 3)¹⁵⁾。即ち Evans の不斉反応剤 5 を対応するボロンエノラートに変換した後, トリチルイミダゾール 6 と反応させ成績体 7 を 75% の収率で得た。化合物 7 は殆んど光学的に純粋であることが ¹H NMR (400 MHz) により示された。この場合遷移状態[C]ではイミダゾールは配位せず, かさ高いトリチル基が 6 員環遷移状態を固定化し, 立体選択性を高めるのに寄与していることが推察される。化合物 7 をアジ化リチウムで処理すると C2 の立体化学が反転し, 目的とする絶対配置を持つアジド 8 が 85% の収率で得られた。これは常法に従い光学純度 98.5% の目的物 1 へと良い収率で導くことができた。この方法で 5~10 g の化合物 1 を得ることができるようになり, さきに BLM 全合成の際に得た知見や方法論と相まって, 類縁化合物合成への道が開かれることとなった。

3. プレオマイシンの金属結合部位

オリゴペプチドの鉄キレートが酸素を活性化し DNA を切断するという制癌機構はそれまでに前例のないものであったので、筆者らはそのコンセプトに基づき新しい機能性分子を合成しようと考えた。はじめに酸素活性化に必須な最小部位を求めることを目的とし、モデル配位子 PYML-1 を次のような方針で設計した¹⁶⁾。

- (1) BLM のピリジン核をピリジン核でおきかえる。
- (2) 側鎖から CH_2CONH_2 部分を取り除き単純化する。
- (3) 糖鎖とビチアゾール部分を取り除く。

PYML-1 は BLM の全合成の際の知見を活かし、アルデヒド 9 とアミン 10 から得られる Schiff 塩基 11 を経由する方法で合成した (式 4)¹⁷⁾。PYML-1 の金属錯体は BLM のそれと良く一致した物理化学的性質を示した。なかでも鉄錯体による酸素活性化を ESR スピントラップにより観測することができたことは重要である¹⁸⁾。その酸素活性化能力は BLM の 18% 程度でしかなかったが、合成オリゴペプチドで酸素を活性化した世界で最初の例であり、この結果は BLM の酸素活性化部位が PYML-1 に対応する部分であることを示すものである。そこで筆者らは PYML-1 を基本化合物とし、これに種々の修飾をほどこし、BLM の各置換基の役割や機能を追究することとした。

まず、大きな体積を占める糖鎖部位は BLM 錯体において金属-酸素部分の近傍に位置し、立体的因子として

重要であると推察された。そこで BLM の糖鎖に代わって疎水性空間を形成することを目的として、かさ高い *tert*-ブチル基を導入した PYML-4 を設計し合成した(式 5)^{19,20)}。上述のエリスロ- β -ヒドロキシ-L-ヒスチジン 1 のアミノ基を一旦保護した後、封管中イソブテンで処理するとすみやかに *tert*-ブチル化が進行した。得られた化合物 12 のアミノ基の脱保護に通常の水素添加を行うと分解が進行するが、ギ酸-パラジウム黒を用いることによりきれいに脱保護が進行することを見出した。これはその後一連のモデルを合成する際、筆者らにとって重要な知見であった。ピリジン部位に関しては PYML-1

の場合と同様に化合物 14 を合成し、そのアミノ保護基を容易に除去しうる 3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル (Npys) 基に変換しカルボン酸 15 とした。化合物 13 と 15 のペプチド縮合は塩入試薬 DPPA 法により行うことができ、最後に緩和な条件で *tert*-ブチル基を損なわずに Npys 基のみを除去し、PYML-4 を得た。ESR スピントラップ実験の結果、PYML-4-Fe(II) 錯体の酸素活性化能力は BLM の場合の 71% まで増強されたことが分かった¹⁹⁾。ここに *tert*-ブチル基の導入により酸素との相互作用を改善する効果が現われたといえる。

という報告はなされていなかった。筆者らは β -メチルスチレンが BLM や PYML の金属周囲のキラルな環境の影響を受けやすい基質であり、その酸化反応において不斉誘起が観測されることを見出した。即ち BLM-Fe(III) および PYML-6-Fe(III) 錯体を用い、 H_2O_2 の存在下に *cis*-および *trans*- β -メチルスチレンの酸化反応を行った(表1)²⁴⁾。いずれの系においても *trans*-オレフィンからはラセミ体の *trans*-エポキシドが生成するのに対し、*cis*-オレフィンからは45%前後の光学収率で(-)-*cis*-エポキシドが生成した。BLM も PYML-6 も同様のエナンチオ選択性を示すことは、両者の活性部位が互いに類似した立体環境にあることを示唆している。

次に、生体内での BLM の反応と同じように、PYML-6-Fe(II) 錯体を分子状酸素と還元剤の存在下でオレフィンと反応させた(表2)²⁴⁾。この場合、反応様式は用いる還元剤により左右されることが分かった。即ち2-メルカプトエタノールを用いると、*cis*- β -メチルスチレンは(-)-*cis*-エポキシド(51% e.e.)を与え、*trans*- β -メチルスチレンはラセミ体の *trans*-エポキシドを与えた。これに対して L-アスコルビン酸を還元剤に用いると *cis*, *trans* いずれのオレフィンからもラセミ体の *trans*-エポキシドが得られた。後者の反応では相当量のベンズアルデヒドが生成する。またアスコルビン酸自身も重金属への良きリガンドであることを考えると複雑な系とな

Table 1 Epoxidation of *cis*- and *trans*- β -methylstyrene with the Fe(III)- H_2O_2 complex systems of BLM B4 and PYML-6.

Ligand	Substrate	Product	Yield (%) based on H_2O_2	Ligand	ee (%)
BLM			17.2	500	46
PYML-6			7.0	212	45
BLM			5.6	169	0
PYML-6			4.3	124	0

Table 2 Epoxidation of *cis*- and *trans*- β -methylstyrene with the PYML-6-Fe(II)- O_2 complex system.

Reducing agent	Substrate	Product	Yield (%) based on PYML-6	Reducing agent	ee (%)
2-Mercaptoethanol			87	2	51
		trace		-
		PhCHO	344	7.7	-
2-Mercaptoethanol			104	2.3	0
		PhCHO	334	7.5	-
L-Ascorbate			trace		-
		199	4.5	<5
		PhCHO	142	3.2	-
L-Ascorbate			451	9.8	<5
		PhCHO	101	2.3	-

り、2-メルカプトエタノールがより良いコファクターであると考えられる。またモデル配位子を用いず、(2-メルカプトエタノール)-Fe(III)-O₂のみの対照実験を行ったところ、エポキシドの生成は全くみられず、ベンズアルデヒドのみを与えた。従ってこの条件ではPYML-6-Fe(II)に依存しない酸化反応も同時に起こっていることが示唆される。

これらの結果から、BLMやPYML-6の鉄の周囲は同じような不斉環境にあり、その近傍で活性酸素がオレフィンと反応していることが分かる。

4. DNA切断分子

PYML-6はBLMに匹敵する酸素活性化能力を示したが、DNAを切断する能力は持たなかった(しかし10⁻⁴M程度ではフェントンの試薬もPYML-6も切断能力は

ある)²⁵⁾。一般にBLM様(10⁻⁶Mオーダー)のDNA切断を起こすためには酸素活性化部位のみでは不十分で、DNA結合部位を導入して鉄-酸素部位をDNAの近傍に引き寄せてやるが必要と考えられる。酸素活性化部位とDNA結合部位をあわせ持つ化合物を合成し、それによる人工的なDNA切断を初めて行ったのはP.B. Dervanらである。彼らは鉄キレーターであるEDTAにメチジウムやディスタマイシンのようなDNA親和性化合物を連結し、DNAを塩基配列特異的に切断することに成功した²⁶⁾。それ以降、多くの研究グループでそれぞれ特徴あるデザインによるDNA切断分子が合成されるようになった²⁷⁾。筆者らはPYML-6にBLMのDNA結合部位であるテトラペプチドSを連結したPYML(6)-bleomycinを設計した²⁸⁾。

PYML(6)-bleomycinはフラグメントI、II-III、およびIVを順次結合することにより合成した(図4)²²⁾。フラグメントIはすでに合成済みであった。フラグメントIIは、エリスロ-β-ヒドロキシ-L-ヒスチジン1のアミノ基とイミダゾール窒素を順次保護して合成した。一方フラグメントIIIは(2S,3S,4R)-4-アミノ-3-ヒドロキシ-2-メチルペンタン酸の水酸基とアミノ基の保護基を変換して合成した。フラグメントIIとIIIをDCC-HOBt法で縮合した後、イソブテンにてtert-ブチル基を導入し、さらにアミノ保護基をギ酸-パラジウム黒により除去した。得られたフラグメントII-IIIをフラグメントIとDPPA法により縮合し、末端のエステルとアセチル基を加水分解してフラグメントI-II-IIIとした。これをフラグメントIV(トリペプチドS)と連結し、緩やかな酸性条件下で保護基を除去した。得られた粗生成物は銅錯体に導くことによりCM-Sephadex C-25で効果的に精製することができた。これをEDTAで脱銅し、さらにAmberlite XAD-2で精製してPYML(6)-bleomycinを得た。

このPYML(6)-bleomycinは二価鉄、ジチオスレイトールおよび、酸素の存在下にDNAを切断した。φX

174 RF DNAを用いた実験により、PYML(6)-bleomycinのDNA切断活性はBLMの約1/5~1/10の強さであると評価された。またφX 174 RF DNAを制限酵素で切断して調製したフラグメントをPYML(6)-bleomycinで切断し、Maxam-Gilbert法で解析すると、基本的にBLMと同様にグアニン塩基の隣りが高頻度に切断されていることが分かった(図5)²⁹⁾。この結果からBLMによるDNA塩基の認識はピチアゾール部位によっており、糖鎖部位は直接には関与していないことが示唆された。

BLMは実はDNAの各塩基に非特異的に結合しており、活性酸素の攻撃に弱い塩基が高頻度に切断されただけなのかも知れない。筆者らのこれまでの実験結果のみではこの可能性を完全に否定することはできなかった。実際、首藤らにより合成されたヘミンとインターカレーターからなるDNA切断分子は、BLMとは構造的に全く異なるにもかかわらず、そのDNA切断パターンはBLMのそれに非常に近いものであった³⁰⁾。そこでBLMの場合の塩基配列特異性が本当にDNA結合部位に依存しているのかどうかを調べるため、筆者らはモデル化合物に

Fig. 4 Synthesis of PYML(6)-bleomycin.

Fig. 5 Cleavage of ϕ X 174 RF DNA fragment (258 base pairs) by PYML(6)-bleomycin.

Lane 1, DNA blank.
 Lane 2, BLM-Fe(II) (5 μ M), dithiothreitol (100 μ M).
 Lane 3, PYML(6)-bleomycin-Fe(II) (5 μ M), dithiothreitol (100 μ M).
 Lane 4, Fe(II) (5 μ M), dithiothreitol (5 μ M).

修飾を加え、DNA 結合部位の構造を変えるとその切断パターンがどのような影響を受けるかを検討することとした。

ディスタマイシンがDNAのアデニン、チミンに富む箇所には結合することはX線結晶解析やDervanらのDNA切断分子により証明されている²⁶⁾。PYML(6)-bleomycinのピチアゾール部位をディスタマイシンにおきかえれば、そのグアニン特異性をアデニン/チミン特異性へと変化させることができるかも知れないと筆者らは考えた。一方、梅沢らはリンカー部位を(R)-4-アミノペンタン酸(4R-APA)でおきかえた修飾BLMがすぐれたDNA切断活性を示すことを見出している⁴⁾。

Distamycin A

そこで筆者らは、金属結合部位PYML-6とDNA結合部位ディスタマイシンとを、4R-APAで連結した化合物

PYML(6)-(4*R*-APA)-distamycin

物 PYML(6)-(4*R*-APA)-distamycin を設計した³¹⁾。

PYML(6)-(4*R*-APA)-distamycin は次のようにして合成した(図6)³¹⁾。フラグメントⅡ-Ⅲは4*R*-APAを用い、さきの PYML(6)-bleomycin の合成と同様にして得られた。これをフラグメントⅠと結合し、末端のエステルを加水分解してフラグメントⅠ-Ⅱ-Ⅲとした。ディスタマイシン部分は3種類の4-アミノ-1-メチルピロール-2-カルボン酸誘導体Ⅳ、Ⅴ、Ⅵを順次縮合して合成した。フラグメントⅠ-Ⅱ-ⅢとⅣ-Ⅴ-Ⅵの縮合は DPPA 法で行うことができたが、最後の Nps (*o*-ニトロフェルチオ)基の除去を通常の条件で行おうとするとディスタマイシン部分が脱落してしまうことが分かった。種々検討した結果、塩化メチレン中5% トリフルオロ酢酸という条件を用いてはじめてディスタマイシン部分を損な

わずに Nps 基を除去することができ、PYML(6)-(4*R*-APA)-distamycin が得られた。

PYML(6)-(4*R*-APA)-distamycin による切断実験はアデニン、チミンを比較的多く含む G4 ファージ DNA (100 base pairs) を用いて行われた。BLM によっては切断されないアデニン、チミンの多い箇所が PYML(6)-(4*R*-APA)-distamycin によって優先的に切断されるという結果が得られた(図7)³¹⁾。その劇的に変化した DNA 切断パターンは、むしろ Dervan らの DNA 切断に近いと言ってよいかも知れない。この結果は BLM の塩基配列特異性が本当に DNA 結合部位の特異性に依存していることを示したもののといえる。

Fig. 6 Synthesis of PYML(6)-(4*R*-APA)-distamycin.

Fig. 7 Cleavage of G4 phage DNA fragment (100 base pairs) by PYML(6)-(4R-APA)-distamycin.

Lane 1, DNA blank.

Lane 2, A+G.

Lane 3, C+T.

Lane 4, PYML(6)-(4R-APA)-distamycin-Fe(II) (1 μM), dithiothreitol (1 mM).

Lane 5, BLM-Fe(II) (1 μM), dithiothreitol (1 mM).

5. おわりに

以上をまとめると次の重要な結論ができる。即ち効果的塩基特異的 DNA 切断分子の一つの設計は図 8 に示すように DNA 結合部位と酸素活性化部位を適当に連結する部位があれば良いことになる。しかしこれだけでは *in vitro* でのゲノム DNA の操作や染色体上の位置づけ等に寄与できるだろうが、制癌剤になり得るかどうかは不明である。BLM のおしえところは、糖鎖部位の存在によってはじめて *in vitro* でも活性となる、即ち DNA 合成を阻害できることとなることである。しかし現段階では癌細胞と正常細胞を本質的に区別することが未解決である。この点はモノクロナル抗体と DNA 切断分子との連絡による標的細胞への誘導も最重要な問題である。さらにまた BLM の有しているスイッチデバイスについてはこれから解明を行う予定であり、興味の尽きないところである。本研究が今後の一つの制癌剤設計に役立つことを願っている。

謝辞 この魅力溢れる研究領域に筆者らを導いてくださった故梅沢浜夫先生(微生物化学研究所所長)に心より感謝いたします。また終始本研究の重要性を指摘され、推進して下さった前田謙二博士(微生物化学研究所副所長)に深く感謝いたします。ESR の測定と DNA 切断実験を行っていただいた杉浦幸雄教授(京都大学化学研

Fig. 8

究所)に深く感謝いたします。最初の全合成研究から、次の人工 BLM 研究過程でも貴重な検討をいただいた小林進助教授に深く感謝いたします。また本研究を遂行するにあたり引用文献に記載した多くの有能な共同研究者、大学院学生、およびポストドクトラルの方々に深く感謝いたします。また本研究は文部省特定研究「生体機能解明のための化学合成」、文部省重点領域研究「有機化学における複合系の高次制御」、三菱財団自然科学研究助成金、および上原記念生命科学財団研究助成金などによって行われました。

(平成元年 11 月 17 日受理)

文 献

- 1) H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi, Y. Okami, *J. Antibiot., Ser. A*, 19, 20 (1966)
- 2) T. Takita, Y. Muraoka, T. Nakatani, A. Fujii, Y. Umezawa, H. Naganawa, H. Umezawa, *J. Antibiot.*, 31, 801 (1978)
- 3) W. Tanaka, *Jpn. J. Antibiot.*, 30 (Suppl.), S-41 (1977)
- 4) H. Umezawa, T. Takita, S. Saito, Y. Muraoka, K. Takahashi, H. Ekimoto, S. Minamide, K. Nishikawa, T. Fukuoka, T. Nakatani, A. Fujii, A. Matsuda, "Bleomycin Chemotherapy", ed. by B.I. Sikic, M. Rozenweig, S.K. Carter, Academic Press, Orlando, p.289 (1985)
- 5) Y. Sugiura, T. Takita, H. Umezawa, "Metal Ions in Biological Systems", Vol.19, ed. by H. Sigel, Marcel Dekker, New York, p.81 (1985)
- 6) S.M. Hecht, *Acc. Chem. Res.*, 19, 383 (1986)
- 7) J. Stubbe, J.W. Kozarich, *Chem. Rev.*, 87, 1107 (1987)
- 8) J. Kuwahara, Y. Sugiura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 2459 (1988)

- 9) Y. Sugiura, J. Kuwahara, T. Suzuki, *FEBS Lett.*, **128**, 39 (1985)
- 10) H. Umezawa, S. Hori, T. Sawa, T. Yoshioka, T. Takeuchi, *J. Antibiot.*, **27**, 419 (1974)
- 11) Y. Sugiura, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5208 (1980)
- 12) S. Saito, Y. Umezawa, T. Yoshioka, T. Takita, H. Umezawa, Y. Muraoka, *J. Antibiot.*, **36**, 92 (1983)
- 13) Y.N. Belokon', I.E. Zel'tzer, M.G. Ryzhov, M.B. Saporovskaya, V.I. Bakhmtov, V.M. Belikov, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1982**, 180
- 14) T. Owa, M. Otsuka, M. Ohno, *Chem. Lett.*, **1988**, 83
- 15) T. Owa, M. Otsuka, M. Ohno, *ibid.*, **1988**, 1873
- 16) M. Otsuka, M. Yoshida, S. Kobayashi, M. Ohno, Y. Sugiura, T. Takita, H. Umezawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6986 (1981)
- 17) H. Umezawa, T. Takita, Y. Sugiura, M. Otsuka, S. Kobayashi, M. Ohno, *Tetrahedron*, **40**, 501 (1984)
- 18) Y. Sugiura, T. Suzuki, M. Otsuka, S. Kobayashi, M. Ohno, T. Takita, H. Umezawa, *J. Biol. Chem.*, **258**, 1328 (1983)
- 19) A. Kittaka, Y. Sugano, M. Otsuka, M. Ohno, Y. Sugiura, H. Umezawa, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 3631 (1986)
- 20) A. Kittaka, Y. Sugano, M. Otsuka, M. Ohno, *Tetrahedron*, **44**, 2811 (1988)
- 21) Y. Sugano, A. Kittaka, M. Otsuka, M. Ohno, Y. Sugiura, H. Umezawa, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 3635 (1986)
- 22) A. Kittaka, Y. Sugano, M. Otsuka, M. Ohno, *Tetrahedron*, **44**, 2821 (1988)
- 23) A. Suga, T. Sugiyama, Y. Sugano, A. Kittaka, M. Otsuka, M. Ohno, Y. Sugiura, K. Maeda, *Synlett*, **1989**, 70
- 24) Y. Kaku, M. Otsuka, M. Ohno, *Chem. Lett.*, **1989**, 611
- 25) 杉浦幸雄, 私信
- 26) P.B. Dervan, *Science*, **232**, 464 (1986)
- 27) 大塚雅巳, 大野雅二, 化学, **44**, 628 (1989)
- 28) M. Otsuka, A. Kittaka, M. Ohno, T. Suzuki, J. Kuwahara, Y. Sugiura, H. Umezawa, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 3639 (1986)
- 29) M. Ohno, M. Otsuka, A. Kittaka, A. Sugano, Y. Sugiura, T. Suzuki, J. Kuwahara, K. Umezawa, H. Umezawa, *Int. J. Clin. Chemoth.*, **1**, 12 (1988)
- 30) Y. Hashimoto, H. Iijima, Y. Nozaki, K. Shudo, *Biochemistry*, **25**, 5103 (1986)
- 31) M. Otsuka, T. Masuda, A. Haupt, M. Ohno, T. Shiraki, Y. Sugiura, K. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 838 (1990)

本 誌 広 告 料 金

表 紙 2	1 頁	80,000 円	後 付 1 頁	50,000 円
表 紙 3	1 頁	60,000 円	〃 1 / 2 頁	30,000 円
表 紙 4	1 頁 (2 色)	100,000 円	綴 込 (1 枚)	100,000 円現物持込
英文目次下	1 / 2 頁	35,000 円		(62. 1. 改訂実施)

詳細は下記一手取り扱い社へご照会下さい。

(株) 共 栄 通 信 社

本 社 〒 104 東京都中央区銀座 8-2-1 (新田ビル) Tel. 03-572-3381 (代)
大阪支社 〒 530 大阪市北区西天満 3-6-8 (笹屋ビル) Tel. 06-362-6515 (代)