



| | |
|--------------|---|
| Title | 制癌剤ブレオマイシンによるDNAの分子認識機構に関する分光学的研究 |
| Author(s) | 廣明, 秀一 |
| Citation | 大阪大学, 1992, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.11501/3087920 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

制癌剤ブレオマイシンによるDNAの
分子認識機構に関する分光学的研究

廣 明 秀 一

博士論文題名

制癌剤ブレオマイシンによるDNAの
分子認識機構に関する分光学的研究

学位申請者 廣明 秀一

略語表

| | |
|----------------|---|
| DNA | = deoxyribonucleic acid |
| BLM | = bleomycin |
| A | = adenine |
| G | = guanine |
| C | = cytosine |
| T | = thymine |
| I | = inosine |
| Pu | = purine |
| Py | = pyrimidine |
| GC-12 | = synthetic dodecadoxynucleotides d(CCCCAGCTGGGG) |
| AT-12 | = synthetic dodecadoxynucleotides d(CCCCAATTGGGG) |
| GT-12 | = synthetic dodecadoxynucleotides d(CCACCTAGGTGG) |
| GA-12 | = synthetic dodecadoxynucleotides d(GGGGAGCTCCCC) |
| GA'-12 | = synthetic dodecadoxynucleotides d(GGGAGGCCTCCC) |
| DMTr | = 4,4'-dimethoxytrityl |
| TCA | = trichloroacetic acid |
| DMAP | = 4-dimethylaminopyridine |
| TEAA | = triethylammonium acetate |
| TEAB | = triethylammonium bicarbonate |
| EDTA | = ethylenediamine tetraacetate |
| TBE | = Tris borate-EDTA buffer |
| HPLC | = high performance liquid chromatography |
| UV | = ultraviolet |
| CD | = circular dichroism |
| NMR | = nuclear magnetic resonance |
| 2D | = two dimensional |
| NOE | = nuclear Overhauser effect (or enhancement) |
| NOESY | = 2D nuclear Overhauser (and exchange) spectroscopy |
| COSY | = 2D correlation spectroscopy |
| DQF-COSY | = double quantum filtered - COSY |
| HOHAHA | = homonuclear Hartmann-Hahn polarization transfer |
| 2D-HOHAHA | = 2D homonuclear Hartmann-Hahn polarization transfer spectroscopy |
| DANTE | = delays alternating with nutaion for Tailored excitation |
| J | = coupling constant |
| T _m | = melting temperature |

目次

| | | |
|--|-------|----|
| 序論 | ----- | 1 |
| 本論 | ----- | 7 |
| 第一章 BLM と DNA の相互作用様式 | ----- | 7 |
| 第一節 実験系の開発と DNA 塩基配列の設計 | ----- | 8 |
| 第二節 GpC 部位を有する DNA オリゴマー (GC-12) における BLM 結合の影響 | ----- | 15 |
| 第三節 GpT 部位を有する DNA オリゴマー (GT-12) における BLM 結合の影響 | ----- | 26 |
| 第四節 考察——BLM と DNA の相互作用様式の解明 | ----- | 29 |
| 第二章 BLM の塩基認識機構の解明 | ----- | 36 |
| 第一節 GpT 部位を有する DNA オリゴマー (GT-12) の結合 にみられる BLM 側の変化 | ----- | 37 |
| 第二節 BLM-DNA 複合体の 2 次元 NMR による 詳細な解析 | ----- | 40 |
| 第三節 BLM のマイナーグループ結合による 塩基認識機構の解明 | ----- | 51 |
| 第四節 BLM-DNA 相互作用モデルの構築 | ----- | 57 |
| 第五節 考察 | ----- | 64 |

| | |
|---------------------------------------|-----|
| 第三章 BLM のDNA マイナーグループ結合モデルの検証 | |
| … … DNA の立体構造からのアプローチ | 70 |
| 第一節 GpA 部位で切断を受けるDNA オリゴマー | |
| <u>GA-12</u> の性質 | 71 |
| 第二節 <u>GA-12</u> の2D-NMRによる解析 | 75 |
| 第三節 分子動力学計算の実際 | 84 |
| 第四節 考察と『BLM-DNA マイナーグループ 結合モデル』の検証 | 90 |
| 結論 | 96 |
| 謝辞 | 97 |
| 実験の部 | 98 |
| 一般的手法 | 98 |
| 第一章の実験 | 107 |
| 第二章の実験 | 109 |
| 第三章の実験 | 110 |
| 引用文献 | 112 |

緒論

癌の治療において、化学療法剤……すなわち制癌剤の果す役割は大きい。現在、多数の制癌剤が、単独あるいは放射線療法や手術療法と組み合わせて使用されている。薬学の分野においても、新しい制癌剤の探索や合成は重要なテーマとなっている。

一方既存の制癌剤の作用機序に関する研究も盛んである。こうした研究による知見は、新規活性物質のスクリーニングや合成、分子設計に役立つ一方で、細胞の機能解明やガン細胞の代謝系の研究といった、生化学および分子生物学の分野にも寄与する。

ブレオマイシン(BLM、図1)は、梅沢らによって発見された放線菌 *Streptomyces verticillatus* が産生する分子量約1500の糖ペプチドである。¹⁻³⁾ BLMは抗腫瘍性の抗生物質で、皮膚癌、頭頸部癌、悪性リンパ腫などの治療薬として臨床に広く用いられており、第12改正日本薬局方にも収載されている。BLMは図1に示したように異常アミノ酸を含む糖ペプチドで、末端アミン(R)の異なる多くの分子種が存在する。⁴⁾ 医薬品と

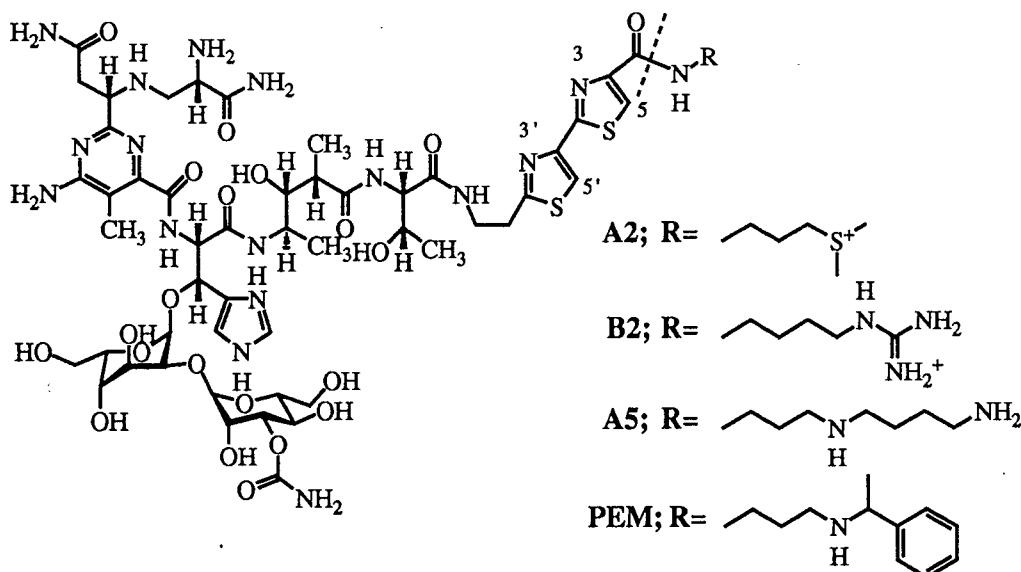


図1 BLMの化学構造

して使用されているのはA₂約60%、B₂約30%、その他約10%の混合物である。また近年、BLMの発酵生産を行う培地中に前駆体を加えて得られる誘導体ペプロマイシン(PEM)も臨床に用いられている。

BLMは腫瘍細胞並びにグラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌などに広く細胞毒性を示すが、その主な作用点は細胞内のDNAであることが知られている。⁵⁾ 1980年代には様々なアプローチによるBLMの作用メカニズムに関する研究が、日本およびアメリカ、ヨーロッパの多くの研究グループによって行われた。その結果、BLMは従来知られていた制癌剤とは異なった、まったく新しいタイプの分子であることが明らかになった。すなわち、BLMはその分子内に、図2のように二つの機能領域を持っていることが示されたのである。³⁾

第一の領域は、配位子部位と呼ばれるピリミジン～ヒドロキシヒスチジン～アミノアラニン残基の領域である。これらが形成するピラミッド型の5座配位子が、Fe²⁺、VO²⁺、Mn²⁺、Co²⁺といったredox-activeな遷移金属イオンと配位して、その酸化還元電位を支配し、空いた第6配位座に溶液中の酸素分子を配位して、それを効率的に活性化する。^{6, 7)} 従ってこの領域は、酸素活性化部位であり、BLMの活性中心である。

第二の領域は末端アミン～ビチアゾール残基の領域である。BLMの分解産物やそれを利用した半合成BLM、光異性化BLM等の研究から、この領域がDNAへの結合部位として機能していることが示唆されている。^{8, 9)}

また、グロース～マンノースの糖部分は、癌細胞への選択的なとり込みや、酸素活性化の際の立体的環境因子として機能しているという説がある。¹⁰⁾

このように、分子内に二つの異なる機能を併せ持つBLMは、あたかも小さな酵素分子のようにふるまい、非常に効率の良いDNA切断活性を示す。

BLMはDNAの二重鎖を、グアニン塩基を特異的に認識して、その3'側の残基の糖部分を攻撃する。とりわけ、Gの3'側塩基がピリミジンである部分で効率よい切断を起こし、その切断性はGC/GT > GA > GGである。¹¹⁾ また、長鎖DNAの切断実験で観察された見かけ上の最適サイトは、Py-G-C-Puである。¹²⁾

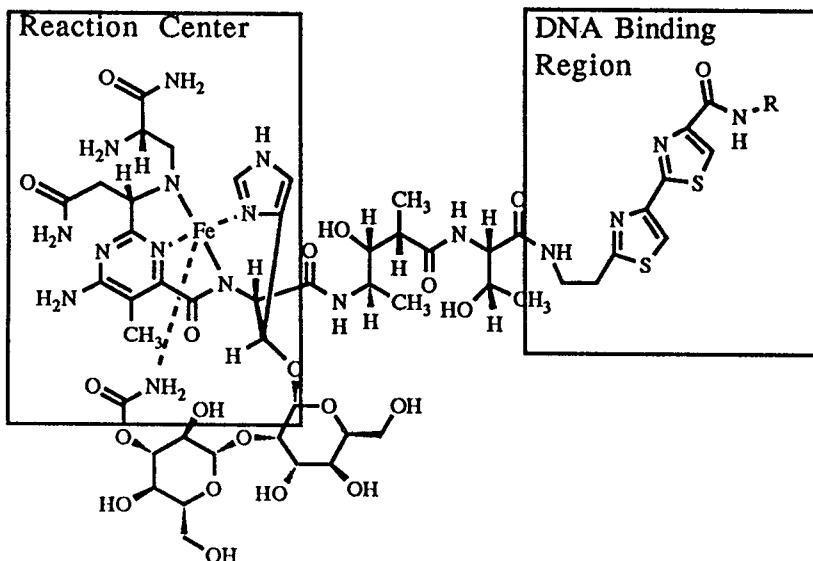


図2 BLM の二つの機能領域

このように構造決定や反応機構などの化学的性質の解明が進み、新たな「人工的DNA 切断分子」研究の端緒ともなったBLM であるが、唯一解明されずに残されている問題点があった。それはBLM とDNA の相互作用についてである。

BLM とDNA の相互作用様式については、これまで相反する二つの仮説がそれぞれ唱えられていた。第一の仮説は、BLM がインターカレーターとして、そのビチアゾール環部分でDNA の二重らせんの塩基対間にインターカレートするという説であり、^{13, 14)} 長い間多くの人々により信じられてきた。一方、1980年代後半になって、第二の仮説～BLM はDNA のマイナーグループに巻きつくように結合する（註）という説が提出された。これは1980年代になって急速に研究の進んだ、他のマイナーグループ結合性薬物か

註）ここでいう「結合」とは主に水素結合と疎水結合による可逆的な分子間相互作用のことであり、共有結合の生成を伴わない。慣例的に薬剤や蛋白質がDNA にbindすることを「結合する」と訳す。そのため bondと訳語が同じになってしまい一部混乱を招く恐れがあるが、他に適した用語がないため、本論文では慣例に従う。

ら得られた知見に基づき、それらの分子構造と比較した結果、Dickerson らによって提案されたものである。^{15, 16)}

しかし、数多くのグループによって研究されているにもかかわらず、BLM と DNA との相互作用様式という基本的な問題点が未解決のまま残されている。これは、分子間の相互作用を直接観測するような物理化学的手法による研究が少ないためである。本研究の目的はこの BLM による DNA の分子認識の機構を、分光学的手法によって解明し、既に提出されている仮説に検討を加え、更に詳細な知見を得ることである。

そこで筆者は、

(1) 化学合成したオリゴヌクレオチドを基質として用いて、

(2) 溶液中で BLM と DNA の相互作用を NMR により直接観測することで、BLM による DNA の分子認識機構を明らかにすることを目的として次の 3 点、すなわち

[1] BLM と DNA の結合様式の問題——インターラーカーターか、マイナーグループ結合性薬物か？

[2] BLM はどのようにしてグアニン塩基を認識しているか？

[3] BLM はどのようにして 2 番目のピリミジン塩基 (C/T) を認識しているか？

について検討を加えた。

その結果、筆者は BLM が DNA のマイナーグループ側に結合して、二組の水素結合によって G-pyrimidine 配列を認識することを明らかにした（第 1 章、第 2 章第 3 節）。さらに筆者は、明らかになった塩基認識機構をもとに、コンピューターグラフィックを利用した分子モデルの構築を行った（第 2 章第 4 節）。

さて、筆者は以上のような戦略に従い BLM-DNA の相互作用の機構を明らかにする過程で、一つの興味深い疑問に行き当たった。それは、今まで

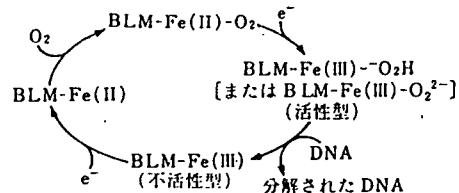


図 3 BLM の活性化機構

に当研究室でBLM を研究する過程で見いだされた、『BLM によって異常な切断を受けるDNA 配列』 d(GGGGAGCTCCCC) (以下GA-12 と略す) についてである。このオリゴヌクレオチド配列は、本来よく切断されるはずのG6pC7 部位よりも、むしろマイナーサイトであると考えられるG4pA5 部位で効率よい切断を受けることが示された。

GA-12 は分子前半にpurine、後半にpyrimidineが連続するという特徴的な配列であるため、立体構造上の何らかの特徴がBLM の塩基特異性を変化させたものと考えられる。このようなDNA の塩基配列特異的な立体構造の差異は、薬物-DNA 相互作用のみならず、蛋白質の結合や、DNA 自身の構造的性質を通じて、複雑な生体内の遺伝子の発現調節を担ううえで重要な役割を果していると考えられる。筆者はGA-12 の溶液中での詳細な立体構造をNMR を使って明らかにするための一連の実験を行った。それによりBL M による2番目の塩基認識機構が明らかになることが期待される。同時に第二章で提出した『モデル』の検証が可能である（第三章）。

その結果、GA-12 はB型のDNA でありながらその塩基平面がらせん軸直交方向に対して角度を持っている、『歪んだB-DNA』であることがわかった。また、筆者の提出したBLM の2組の水素結合による塩基認識のモデルは、GA-12 のようなDNA の局所的異常構造におけるBLM の変化した切断性をも説明することができた。すなわち筆者の提出したBLM のDNA 塩基認識機構およびマイナーグループ結合モデルは、一般的なBLM のDNA 切断における性質を説明できるばかりでなく、GA-12 のような特異な配列における立体環境の異常にも適用可能であることが示され、モデルが正しいことが示された。

本論文では、

- (1) BLM とDNA の相互作用様式、
- (2) BLM によるDNA の塩基認識機構の解明、
- (3) BLM のDNA マイナーグループ結合モデル、
- (4) DNA:d(GGGGAGCTCCCC) のNMRによる立体構造解析、
- (5) 結合モデルの検証、

について述べる。

この機用 AMS は全般の駆動用 AMS の用命式用 AMS

卷之三

四
第五章

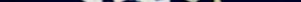
③   6.28.8

Figure 1. A 3D reconstruction of the *Escherichia coli* K12 MG1655 cell. The cell is shown in a 3D perspective view with the cell wall in yellow, the cytoplasm in light blue, and the nucleoid in dark blue. The cell is oriented with the flagella at the top left and the polar region at the top right. The cell is approximately 2.5 micrometers in diameter and 5 micrometers in length.

Chemical structure of a branched polymer chain with substituents. The structure shows a central carbon atom bonded to two methyl groups (Me) and two hydroxyl groups (OH). It is part of a larger branched network where other similar units are connected by single bonds.

卷之三

図4 BLMのマイナーグループ結合モデル

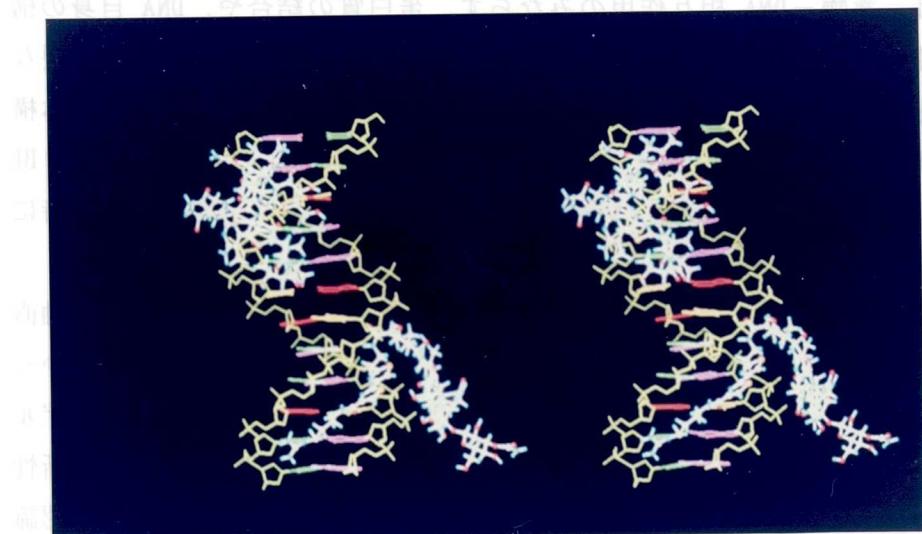


図4 BLM のマイナーグループ結合モデル

本論

第一章 BLM とDNA の相互作用様式

二本鎖DNA を特異的に切断するBLM は、グアニン～ピリミジン配列を認識する機構をその分子内に有している。このBLM-DNA 相互作用については、いまだに解明されていない問題点がいくつか残されている。とりわけ BLM-DNA の相互作用様式——インターカレーターか、マイナーグループ結合か——という基本的な問題に関して、いまだに決着がついていないということは、BLM-DNA 相互作用の研究がいかに困難かを如実に物語っている。

こうした背景には、DNA とBLM の特異的な相互作用を分子レベルで観察するような物理化学的な実験がほとんど行われていないという実情がある。筆者がここで注目したのは、非常に多くの研究グループが取り組んでいるにもかかわらず、BLM-DNA 複合体ばかりかBLM 単体すらそのX線結晶構造解析が得られていないという事実である。これには、次の4つの理由が考えられる。

- [1] BLM には分子内でコンホメーションの自由度の高いテトラペプチドS と呼ばれる部分と二つの糖残基が存在するため、解析に適した結晶が得られにくいこと。
- [2] BLM は分子量が約1500で、結晶構造解析が困難とされている分子の大きさを持つこと。
- [3] DNA の結晶化が比較的困難であること。特にB-DNA は結晶中の配向力や含水率の影響を受けやすく、限られた配列でしか結晶が得られない。
- [4] BLM とDNA の会合定数があまり大きくない ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$) こと。

そこで筆者は、高分解能NMR 法によって、溶液中でBLM-DNA 相互作用を観測することを企図した。高分解能パルスFT-NMRは生体高分子（核酸およ

び蛋白質)の立体構造や相互作用を研究する手段として、ここ数年その進歩が著しい。もちろんX線結晶解析に較べて、一度の実験で得られる構造データの量および確度が低い、あるいは水分子そのものが直接的に観測できない、といった欠点もある。一方相互作用研究におけるNMR法の利点としては、次の4点が考えられる。

- [1] 観測可能なすべての核(^1H , ^{31}P , ^{13}C , ^{15}N)をプローブとして、相互作用について質の高い情報を得ることができる。
- [2] 安定な1:1複合体でなくとも(例えば2系間の平衡のようなものでも)観測し、かつ解析できる。
- [3] 温度、pH等の条件が容易に変えられるため、幅広い情報が得られる。
- [4] (X線結晶解析に比べて)迅速である。

BLMにおいては、今まで合成DNAオリゴマーを用いた残基特異的な相互作用を観測した実験が行われていなかっただけに、こうした手段による分子認識機構の詳細な解明が期待できる。

第一節 実験系の開発とDNA塩基配列の設計

1-1 BLMの配位金属の選択

BLM- Fe^{2+} は、水溶液中の溶存酸素を活性化して、DNAを速やかに切断する。従って、BLM- Fe^{2+} (BLM- Fe^{3+})とDNAの系では相互作用の様子を、そのまま観測することはできない。つまり実験を行うためには、(1)反応条件を変えるなどしてBLMがDNAを切断しないようにするか、(2)DNAと結合するが切断反応は行わない『不活性なBLMアナローグ』を利用するか、(3)BLMが結合するが、それによる切断反応は受けないDNAのアナローグを利用する、等の方策を講じて相互作用を研究するのに適した実験系を構築しなければならない。

ところでBLMは Cu^{2+} 錯体として培地より単離されるが、その活性本体はredox-activeな Fe^{2+} および Fe^{3+} 錯体である。¹⁷⁻¹⁹⁾ BLMは様々な金属イオンと錯体を形成することが知られており、それらについてもDNAの切断活

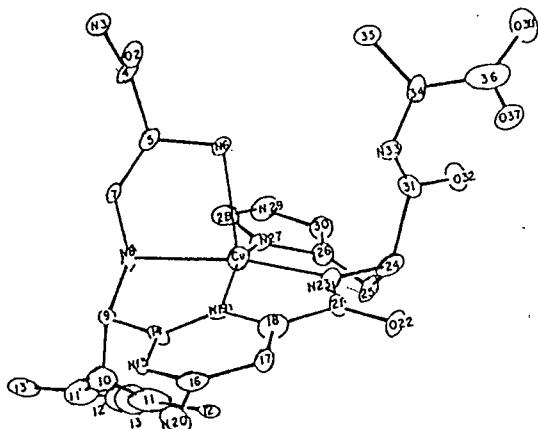


図5 P-3A - Cu^{2+} 錯体の
X線結晶構造解析

性が調べられている。その配位構造については、活性型BLM- Fe^{2+} のX線結晶解析が行われていないため若干の議論の余地はあるものの、図5に示したP-3A - Cu^{2+} 錯体（P-3AはBLMの生合成中間体である）のX線結晶構造解析から類推されている。²⁰⁾

表1に主な遷移金属のイオン半径、配位軌道の形、BLM複合体のDNA切断活性を示した。BLMのDNA切断性には配位軌道が平面4配位あるいは八面体6配位であることが必要で、一方イオン半径についてはかなり範囲

が広いことがわかる。

そこで筆者はBLMの中心金属を置き換えることで、DNAを切断しない『不活性BLMアナログ』を得ることを検討した。そして、NMRの測定に都合の良い磁気的性質を有すると考えられる Ni^{2+} と VO^{3+} の二つの金属種を、BLMの中心金属として使用することにした。

VO^{3+} は反磁性でありNMRスペクトルに影響を与えない。 Ni^{2+} は低スピニ型では反磁性、高スピニ型では常磁性である。実際にNMRを測定したところBLM- Ni^{2+} の中性でのプロトンスペクトルには二本の常磁性シフトしたシグナルが観測され、全体のスペクトルの広幅化も起こっていたが、その影響は今回の実験に支障がないものであった。²¹⁾

一般に常磁性金属は、プロトンの化学シフトを数十ppmも変化させたり（常磁性シフト）、シグナルの線幅を極端にプロード化させる（常磁性緩和）という影響を持っていることが知られている。今回の実験で筆者が企図したのは、BLM-DNA複合体形成における水素結合や疎水的相互作用がそれぞれに及ぼす変化を、 ^1H -及び ^{31}P -NMRで追跡することである。その

| Ion | Radius (Å) | High Spin | | Low Spin | | BLM-metal DNA cleavage |
|------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|---------------------------|
| | | Geometry ¹ | Magn. ² | Geometry ¹ | Magn. ² | |
| VO ²⁺ | (0.58) ³ | o h | p | | | + |
| VO ³⁺ | (0.54) ³ | | | o h | d | - |
| Cr ²⁺ | | o h | p | | | - |
| Cr ³⁺ | 0.615 | o h | p | | | - |
| Mn ²⁺ | 0.83 | o h | p | | | + |
| Fe ²⁺ | 0.78 | o h | p | o h | d | + |
| Fe ³⁺ | 0.645 | o h | p | o h | p | - ⁴ |
| Co ²⁺ | 0.65 | o h | p | o h | d | + ⁵ |
| Co ³⁺ | 0.545 | o h | p | o h | d | - |
| Ni ²⁺ | 0.69 | o h/th | p | s p | d | - |
| Cu ¹⁺ | 0.77 | o h/th | p | | | + |
| Cu ²⁺ | 0.73 | s p/o h | p | | | - |
| Zn ²⁺ | 0.74 | | | th/o h | d | - |

- 1) Coordination Geometries; oh: octahedral, th: tetrahedral, sp: square-planer
- 2) Magnetism of Ions; d: diamagnetic, p: paramagnetic
- 3) The values for V⁴⁺ and V⁵⁺ are presented in parentheses.
- 4) BLM-Fe³⁺ is readily reduced to BLM-Fe²⁺.
- 5) BLM-Co²⁺ is activated with UV light.

表1 第2属金属イオンの性質

場合、BLM の中心金属の常磁性シフトの寄与が大きすぎると結果が解析できぬ恐怕がある。BLM-Ni²⁺およびBLM-VO³⁺は、いずれもそうした危険性が少ないと考えられる。

更にBLM-VO³⁺はDNA の切断を行わないが、BLM-VO²⁺ + H₂O₂の系は実際にDNA を切断する。⁷⁾ 従ってBLM-VO³⁺は切断反応直後の形と考えられるので、より「活性なBLM」に近い形と考えることができる（註）。

1 - 2 合成オリゴDNA の塩基配列の設計

BLM とDNA の相互作用様式が長い間解明されていなかった背景には、長

鎖DNA（生体から抽出してきた長さ、配列不明のDNA混合物）やDNAのホモポリマーを用いた実験のみが主流で、特定の配列を持つオリゴヌクレオチドを用いた実験が行われていなかったことが上げられる。それゆえ、筆者らのグループでは実験にオリゴDNAを用いるという戦略を採用したのであるが、そのためには塩基配列の設計が重要である。すなわち、

[1] DNAとBLMの相互作用が起こる部位を、分子内でただ一か所に限定しなければならない。

ということである。

この考えに基づいて、当研究室の中山らによりGC-12およびGA-12の二つのDNA配列が設計された。これらの配列は分子の中心にただ一か所GpC配列を有する自己相補的なドデカヌクレオチドである（表2）。

| Abbreviation | Sequence |
|--------------|--------------------------|
| GC-12 | d(CCCCA <u>G</u> CTGGGG) |
| AT-12 | d(CCCCA <u>AT</u> TGGGG) |
| GA-12 | d(GGGGAGCTCCCC) |
| GT-12 | d(CCACCTAGGTGG) |

表2 合成DNAの塩基配列

註) NMR実験に都合の良い反磁性であるにもかかわらず、今回の実験にはBLM-Zn²⁺とBLM-Co³⁺を使用しなかった。この二つのBLM錯体について簡単に触れておく。

まずZn²⁺イオンは、蛋白質中や低分子配位化合物中でしばしば四面体4配位を取ることで知られている。そのため、BLMと錯体を形成した時に、その配位子の立体構造が活性型BLMとは異なるのではないかと懸念した。一方Haasnootらは、Zn²⁺の八面体6配位を仮定してBLM-Zn²⁺の配位子部位の推定構造をNMRおよび計算機実験により提出しているが、配位している窒素原子の特定がされていないなど根拠に乏しい。²³⁾

また杉山らが報告しているBLM-Co³⁺は反磁性でそれ自身DNA切断活性を持たない。しかし酸化状態などの異なる三種のiso-formから、単離精製するという操作が必要となるため、実験に用いることができなかった。

GC-12 は分子中心のG6pC7 部位で選択的にBLM により切断されることが示されたので、筆者もこの配列を用いてBLM-DNA 相互作用を検討した。その際negative controlとして、GC-12 のG6pC7 部位をAT塩基対にして、BLM による特異的な切断を受けない配列、AT-12 を設計・合成し、BLM との相互作用を比較検討した（第一章第二節）。またGA-12 はG4pA5 部位という本来ならより切断されにくい部位で効率よく切断されることが明らかになった。これはDNA の配列特異的な立体構造に由来すると考えられる。筆者はさらに、GA-12 の詳細な立体構造を明らかにすることが、BLM の塩基認識機構の解明につながると考え、その溶液構造を明らかにした（第三章）。

しかし後に述べるような理由により、GC-12 ではBLM とDNA の部位特異的な相互作用を観測するには限界があることがわかった。そこで前記〔1〕に加えて、あらたに次の4つの条件を考慮して、GT-12 の配列を設計し合成した。すなわち

- 〔2〕 BLM の結合部位にはGpC 配列よりもGpT 配列のほうが適当である。
- 〔3〕 NMR 実験には自己相補的な12 merが適しているが、BLM-DNA 複合体を形成した時、一つのduplexあたり二分子のBLM が結合する様に設計する。

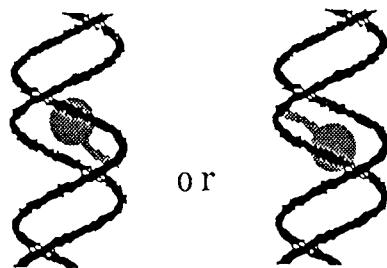
〔4〕 BLM が結合する部位は、DNA の3' 側にする。

〔5〕 DNA 側のシグナル分離をよくするため、繰り返し配列を避ける。

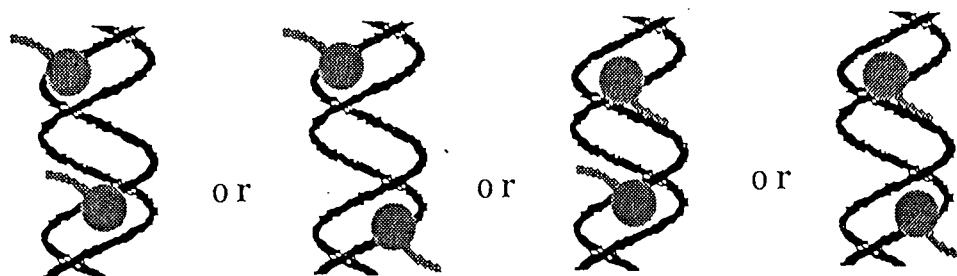
ここで最も重要なのは〔2〕項と〔3〕項である。次節においてGC-12 を用いた実験より明らかになることであるが、BLM はマイナーグループ結合性薬物である。このとき例えば自己相補的12 merの中心にGpC 配列があると（図6 A）、

- (A) 1 duplexあたり（2分子のstrandあたり）1分子のBLM しか結合できない。そのためDNA のシグナルがBLM の2倍の強度で現れることになる、BLM 上に生じた変化の観察が難しい。
- (B) 自己相補的なDNA では、upper strandもlower strandもNMR 的に等

A $5' - \text{XXXXXGCGXXXXX} - 3'$
 $3' - \text{XXXXXCGXXXXX} - 5'$



B $5' - \text{XXGCXXXXGCXX} - 3'$
 $3' - \text{XXCGXXXXCGXX} - 5'$



C $5' - \text{XXACXXXXGTXX} - 3'$
 $3' - \text{XXTGXXXXCAXX} - 5'$

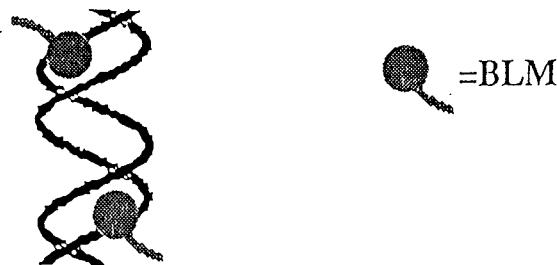


図6 GpT 部位を有するDNA 塩基配列の設計

価であるが、薬物が結合すると非等価になる。このときスペクトル上でそれぞれのシグナルを同定することは事実上困難である。

という二つの問題点が明らかになった。

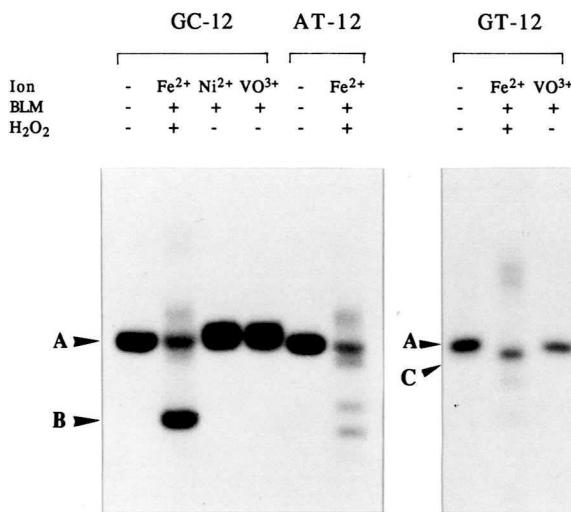
そこでGpC配列を分子の中心から離れたところに配置したらどうかということを考えたのが図6Bである。これはDNAが自己相補的である以上、GpC配列の反対側にもGpC配列ができてしまうため、1 strandあたり1部位の原則に反する。また系が図のような複雑な平衡となるため、実験上不都合が予想される。

そこで筆者はGpT部位をBLMの結合部位とした（図6C）。図6Aのときとは異なりGpT配列の反対側はApCであるため、BLMにより認識・切断される鎖とその反対側の鎖の両方からNMRによる情報が得られる。また、DNAに対しBLMが完全に飽和した状態では、1 duplexあたり2分子のBLMが結合して回転対称な複合体を形成し、このときシグナルの強度はBLM:DNA = 1:1である。したがってBLM、DNA双方の情報を得ることができる。

[4]項は、オリゴDNAを用いた切断実験の場合、DNAの3'側の部位が効率よく切断される例が多いことを考慮した。[5]項は、NMRによる帰属解析に主眼を置いたためである。

このような[1]～[5]の条件を満たすDNA配列の一つが、筆者の設計・合成したGT-12の配列である。このDNAを用いた実験はBLM-DNA相互作用について極めて重要な知見を与えた（第一章第三節、第二章）。

図7（パネル左）はGC-12およびAT-12の、また図7（パネル右）はGT-12のBLMによる切断実験の結果を、20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果である。GC-12、GT-12はそれぞれ予測されたBLM切断部位であるG6pC7およびG9pT10で、選択的に切断されている。一方、AT-12はBLMの認識配列を持たないために、ApT部位あるいはGpG部位といった本来なら切断を受けない箇所で切断を受けている。またGT-12は、初めにG9pT10部位で切断を受けた後、さらにApC部位やGpGで切断を受けることがある。



A: 12 mer, B: d(CCCCCAG)pCH₂COOH,
C: d(CCACCTAGG)pCH₂COOH

図 7 GC-12、AT-12、GT-12 の BLM-金属錯体による切断実験
(7 M尿素入り 20 % ポリアクリルアミド 電気泳動による分析)

GC-12 を BLM-Ni²⁺、BLM-VO³⁺と 1 時間インキュベートしても、切断反応はみられない。同様のことは GT-12 と BLM-VO³⁺についてもいえる。これらのこととは、先に述べた BLM-Ni²⁺や BLM-VO³⁺が NMR による実験に適した『不活性 BLM アナローグ』であることを示している。

第二節 GpC 部位を有する DNA オリゴマー (GC-12) における BLM 結合の影響

2-1 C Dスペクトルによる相互作用の検討

図 7 からも明らかなように、GC-12 は G6pC7 部位で BLM による切断を受けるが AT-12 は受けない。筆者は両者の C Dスペクトルを測定しながら、BLM-Ni²⁺で滴定実験を行った。図 8 はそれぞれ、BLM-Ni²⁺を加えたスペクトルから BLM の C Dを差し引いた差スペクトルで、DNA の変化を示す。

BLM が存在しない時には、GC-12 も AT-12 もよく似たパターンを示す。従って両者は B 型構造のDNA で、中心のG6pC7 部位およびA6pT7 部位を除いて、立体構造はよく似ていると考えられる。ところが、GC-12 にのみ BLM-Ni²⁺の添加に伴うCDの変化が観察された。すなわち、BLM-Ni²⁺は GC-12 のG6pT7 部位に特異的に相互作用をしていることが明らかである。

筆者は更に、260 nmでの $[\theta]$ 値の変化を BLM 濃度に対してプロット

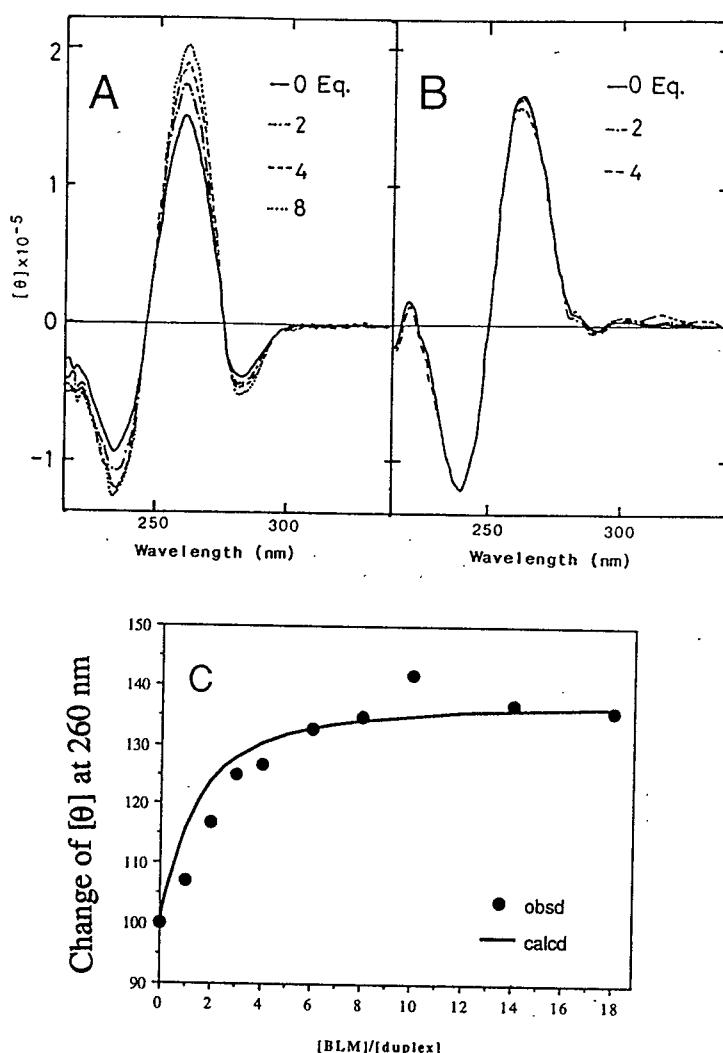


図8 CDスペクトルによるGC-12・AT-12のBLM-Ni²⁺による滴定
(A) GC-12、(B) AT-12、(C) GC-12の260 nmの $[\theta]$ 値の変化

し、非線形最小自乗法を用いたcurve fitting より、BLM-Ni²⁺の部位一か所あたりの結合定数K_aを求めたところ、K_a = 4.0 × 10⁵ M⁻¹ であった。

2-2 蛍光スペクトルによる相互作用の検討

BLM はそのビチアゾール環部分で近紫外部に蛍光を発する。その励起極大波長は280 nm、蛍光の極大は350 nmである。従来よりこの部分の蛍光が、DNA の添加により消光(quenching) することが知られていた。²⁵⁻²⁷⁾ この蛍光の消光現象は BLM がインターカレーターであると主張する重要な根拠の一つでもある。

図9は BLM-Ni²⁺ および BLM-VO³⁺を、それぞれ GC-12 および AT-12 で滴定した時の350 nmの蛍光強度をプロットしたグラフである。どちらの錯体も GC-12 の添加とともに顕著な消光を示している。一方、BLM の認識配列を持たない、AT-12 ではその消光効果は小さい。この結果からも BLM-Ni²⁺ および BLM-VO³⁺ が、GC-12 の GpC 部位と特異的に相互作用していることが示唆される。しかし AT-12 でも BLM の蛍光は消光するので、AT-12 と BLM の間にも何らかの非特異的な相互作用は存在すると考えるのが妥当であろう。切断実験(図7 A)の結果もこの考えを支持する。

またここで注意しなければならないのは、二つの合成DNA には蛍光実験の励起波長領域に紫外部の吸収が重なっていることである。そのため、こ

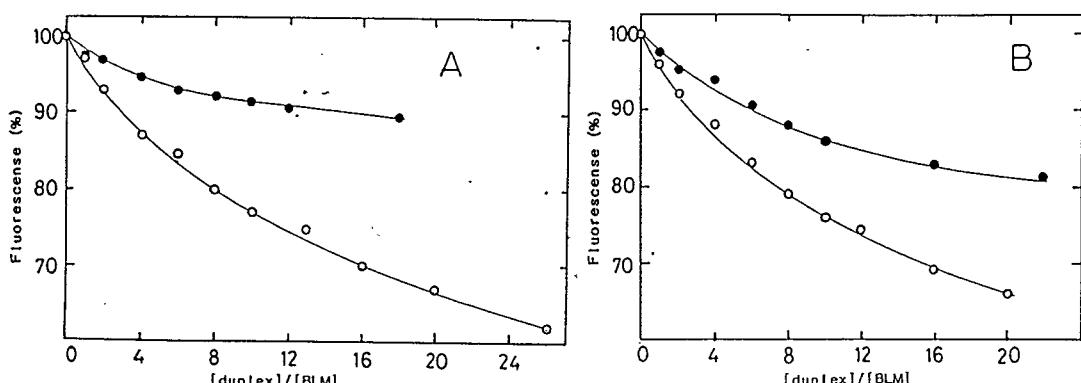


図9 BLM のビチアゾール環部分の蛍光のDNA 添加に伴う消光現象
(A) BLM-Ni²⁺、(B) BLM-VO³⁺。○はGC-12、●はAT-12 でそれぞれ滴定したもの。励起波長300 nm、観測波長350 nm。

うした蛍光滴定実験ではビチアゾール環の励起極大よりもさらに長波長側にずらした300 nmで励起を行っているが、この位置でもDNAに吸収があり、大過剰のDNAを系に加えた場合それは無視できない。いくつかの報告では、天然から取られたhomogeneousでないDNAを実験に用いているうえ、このことには全く触れずにBLM-DNA結合定数を算出しているため、²⁵⁻²⁸⁾ その値には疑問が持たれる。筆者の用いた実験系では、蛍光光度計の原理上補正が困難であるため、この実験からの結合定数の算出は行わなかつた。

2-3 イミノプロトンNMRによる相互作用の検討

CDスペクトルおよび蛍光の消光現象の実験結果は、いずれも、BLM-Ni²⁺やBLM-VO³⁺がGC-12のG6pC7部位に結合していることを示唆している。そこで筆者は、GC-12のイミノプロトン領域のNMRシグナルを指標に、BLM-Ni²⁺およびBLM-VO³⁺による滴定実験を行った。

ここでDNAのイミノプロトンについて説明しておく。図10Aに示したように、DNA分子は溶液中では水素結合により二重らせんを形成し、この

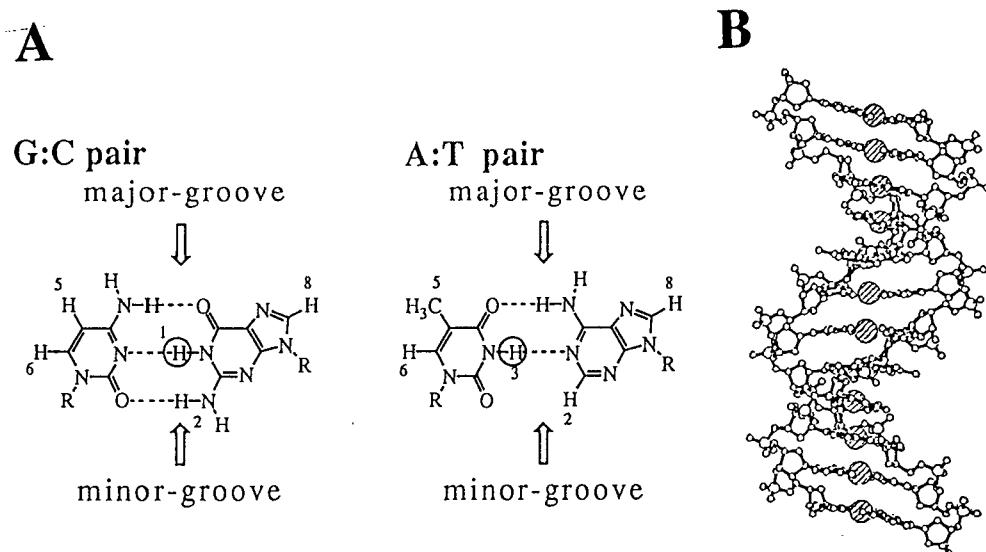


図10 Watson-Crick塩基対の構造 (A) ,
B型DNA中のイミノプロトンの位置 (B)

ときWatson-Crick型と呼ばれる塩基対をつくる。イミノプロトン (A:T 塩基対のT-N3H、G:C 塩基対のG-N1H) は、交換性のプロトンである。溶媒である水分子のプロトンと速い速度で交換しているため、通常観測できない。しかしSS 1-1²⁹⁾ あるいはSS 1-3-3-1³⁰⁾ といった選択励起パルスを用いることで、二重鎖を組んでいるとき、あるいは特殊なループ構造を形成して水のプロトンとの交換が抑えられている時にかぎり観測することができる。

イミノプロトンシグナルは塩基対を形成していない時は、9 ~10.5 ppmに観測される。塩基対を形成している時は、G-N1H が12~13 ppm、T-N3H が13~14.5 ppmにシグナルを与える。このように極端な低磁場で観測され、核酸にのみ特徴的な信号であるため、DNA-薬物相互作用を研究する時に、薬物由来の¹Hシグナルに邪魔されずに追跡できる。さらに、図10B のようにB型DNA では、イミノプロトンはらせん中央に、らせん軸に沿って位置しているため、その化学シフトは塩基対の開裂ばかりでなく、DNA 立体構造の変化にも極めて鋭敏である。したがってBLM のDNA 結合様式を調べる上で、重要な情報を得ることが期待できる。

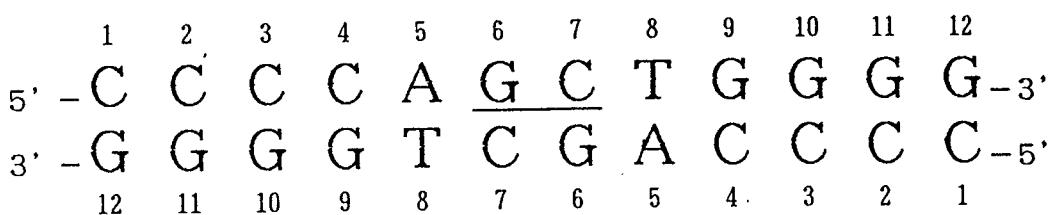


図11 GC-12 のナンバリングシステム

図11にGC-12 の各残基のナンバリングシステムを掲載した。以後の説明はこのナンバリングに従って行う。図12および図13は、GC-12 のイミノプロトンを観測しながら、BLM-Ni²⁺およびBLM-V0³⁺でそれぞれ滴定したスペクトルである。先に求めた、BLM の部位あたりのK_aから、NMR 測定条件の濃度 (2.5 mM strand / 1.25 mM duplex) では1当量 (1.25 mM) のBLM の添加によって、ほぼ90 %以上がBLM-DNA 複合体を形成していることになる。しかし図のようにいずれの場合にもイミノプロトン (およびアミ

ノプロトン・塩基部プロトン)の化学シフトに変化は観察されなかった。BLM- Ni^{2+} を添加した時にシグナルの若干の広幅化とベースラインのうねりが見られるのは、 Ni^{2+} のもつ常磁性効果の影響であると考えられる。

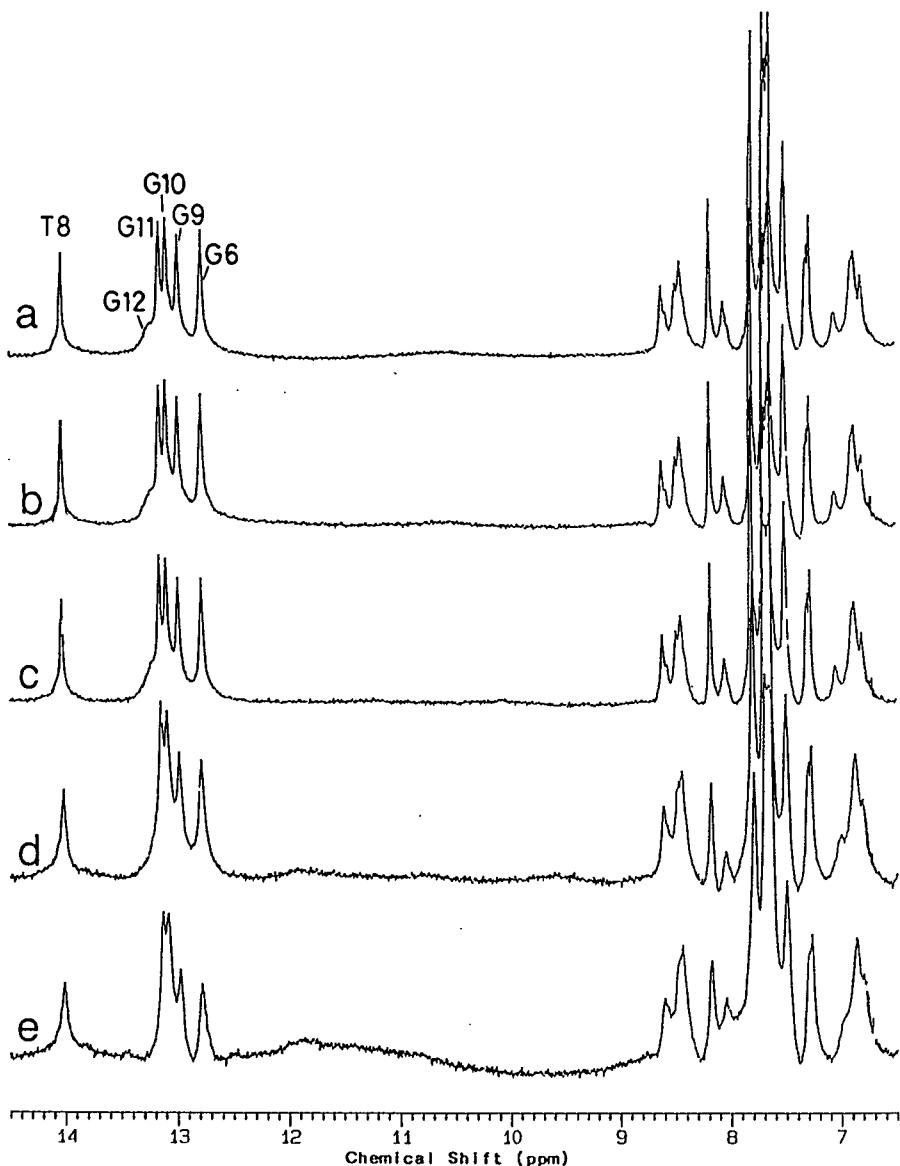


図12 GC-12 の BLM- Ni^{2+} 滴定実験のイミノプロトン領域 ^1H NMRスペクトル。 $[\text{BLM}]/[\text{duplex}] = 0$ (a), 0.1 (b), 0.2 (c), 0.6 (d) and 1.0 (e)。

2-4 リンNMRによる相互作用の検討

同様に筆者はGC-12のリンのNMRシグナルを帰属し、そのシグナルを指標にBLM- Ni^{2+} およびBLM- VO^{3+} で滴定実験を行った。リン原子もまた核酸に特有のものであるため、薬剤由来のシグナルに邪魔されることなく相互作用による核酸側の変化を観察できる。

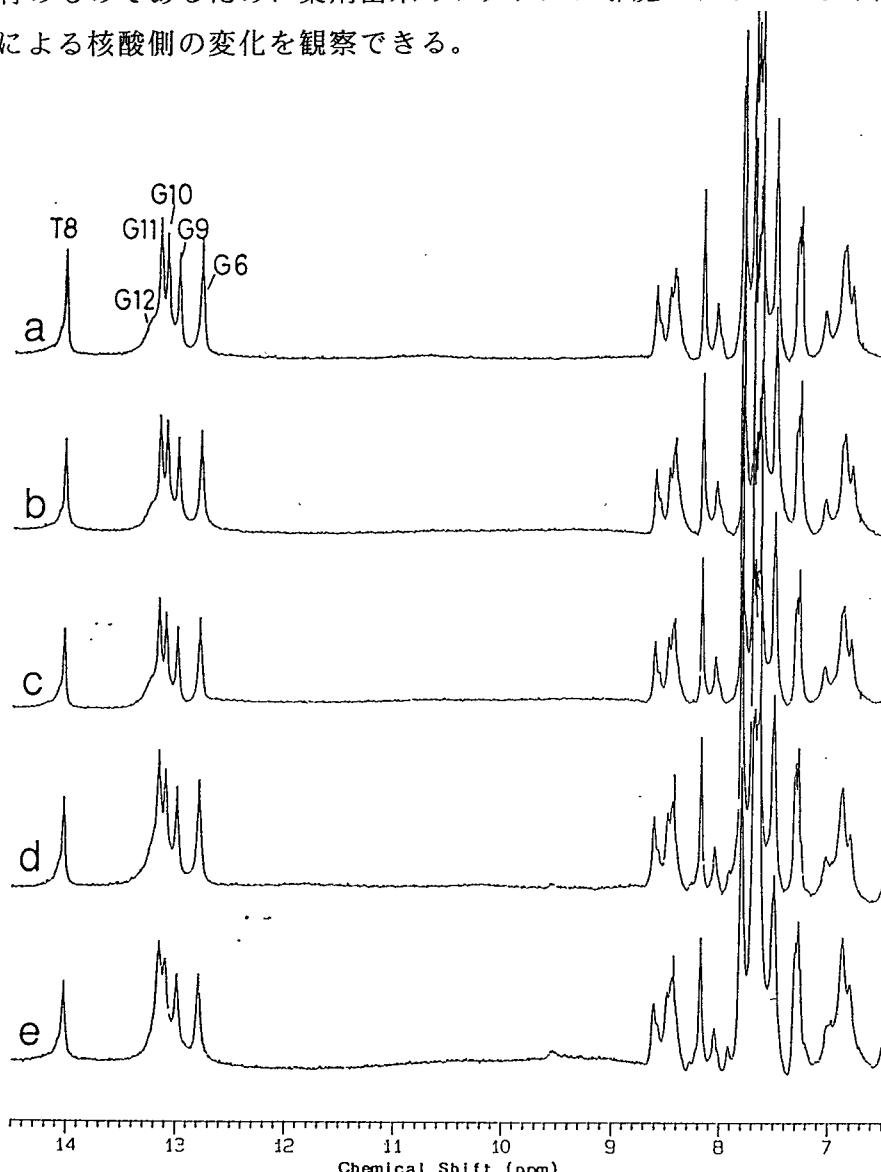


図1-3 GC-12のBLM- VO^{3+} 滴定実験のイミノプロトン領域 ^1H NMRスペクトル $[\text{BLM}]/[\text{duplex}] = 0$ (a), 0.1 (b), 0.2 (c), 0.6 (d) and 1.0 (e)。

リン酸は、核酸の糖-リン酸骨格として、らせん構造の最外郭を取り巻いている（図14B）。Gorensteinらによれば、^{31, 32)} 核酸におけるリンの化学シフトはリン酸ジエステル結合回りの二面角（ α 、 ζ ）に依存する。通常のB型DNAでは（ α 、 ζ ）はそれぞれ（-270°, -300°）の（gauche⁻, gauche⁻）であり、-3.5～-4.5 ppmの範囲で観測される。Z型DNAに見られるようにリンが（gauche⁻, trans）となると、そのシグナルは-2.0 ppm前後の高磁場に観測される様になる。

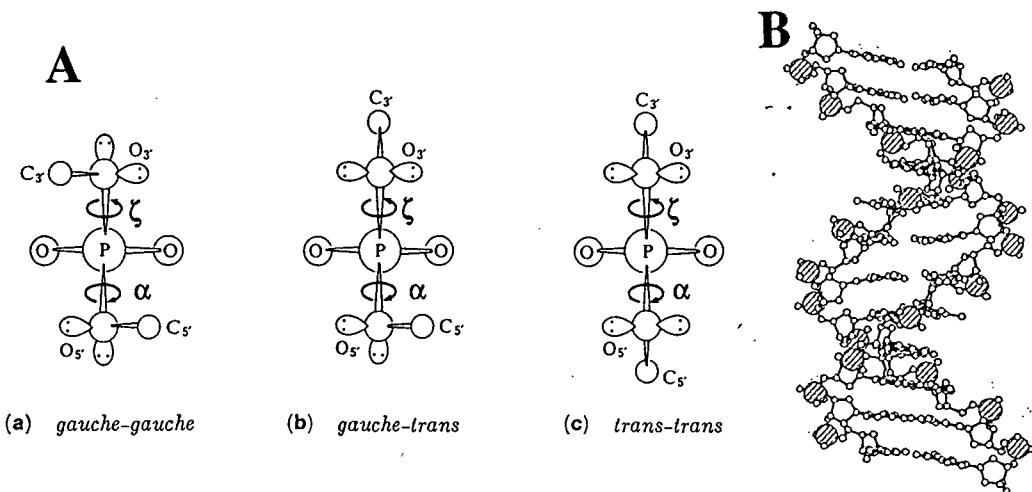


図14 リン酸のtorsion angle (A) と、DNA 中の位置関係 (B)

BLM がDNAに結合するときも、そのリン酸部分に影響を及ぼす可能性がある。BLMペプチド鎖の末端残基には、スルフォニウム基(BLM-A₂)、グアニジニウム基(B₂)、様々なアミノ基(A₅, PeM)といった生理的条件下でプロトン化して正電荷を有する官能基が存在していて（図1参照）、しかもその正電荷はBLMの活性発現に必須である。³³⁾そのため筆者は、BLMの正電荷をもった残基とDNAのリン酸の負電荷との間の静電的相互作用を³¹P NMRで観測することを期待して、BLMでの滴定実験を行った。

図15にその結果を示す。切断部分であるG6pC7のリンのシグナルは他のシグナルと重なっているため少々わかりにくいが、いずれの錯体による滴定でもその化学シフトに変化は見られなかった。切断部位の前後

(A5pG6, C7pT8)においても同様である。

BLM-Ni²⁺、BLM-VO³⁺どちらの錯体でもリンのシグナルはブロード化するが、その程度はBLM-Ni²⁺に顕著である。これはNi²⁺の持つ常磁性緩和の影響であると考えられる。こうしたシグナルのブロード化は、BLM 金属錯体

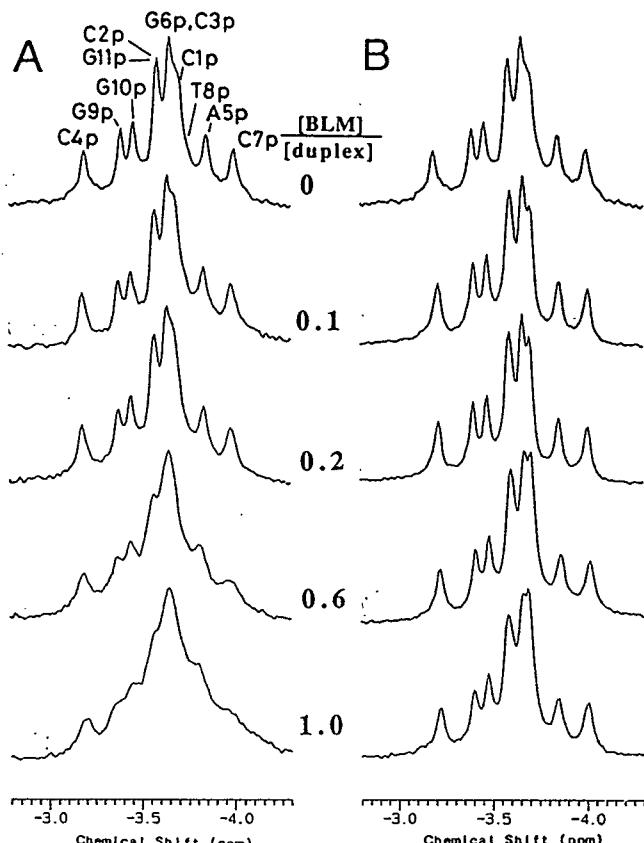


図 15 GC-12 の BLM-Ni²⁺ (A)、BLM-VO³⁺ (B) 滴定実験の³¹P NMR スペクトル

がGC-12 と相互作用していることを示唆する。しかしその変化は、当初期待されたような残基特異的なものではなかった。

2-5 GC-12 の他のプロトンに生じた変化

筆者は更に、GC-12 と BLM-Ni²⁺ (1 : 1) 複合体の2D NMR を解析して、BLM-Ni²⁺が結合した時のDNA 側の他のプロトンの変化を調べた。表3 に、GC-12 のプロトンおよびリンの化学シフト (A) 、 GC-12 に 1 当量 BLM-Ni²⁺ を加えた時の化学シフト (B) 、 およびその際の化学シフト変化 (C) を示した。

BLM-Ni²⁺を添加した時に、相互作用由来あるいはNi²⁺の常磁性由来でいくつかのプロトンシグナルがブロード化したためNOESY 、 DQF-COSYで帰属のできなかったものがある。詳細については筆者修士論文にて議論しているのでここでは割愛する。

表3 Cより明らかのように、GC-12 のプロトン、リンのシグナルはBLM-Ni²⁺の結合によって全く変化しない。唯一変化するのは、末端のC12 残基であるが、それ以外の変化は最大でも0.06 ppmと小さい。

筆者は当初GC-12を用いた実験系でBLM-DNA相互作用を明らかにすることを企図したが、このように全く変化の観察できない系では、その詳細を原子レベルで解明することは事実上困難である。これはGC-12を用いた系の限界であると考えられる。次節において、改良したDNA配列を用いた系による実験について述べる。

Table 3: Proton and Phosphorus Chemical Shifts for Free GC-12 and Its Complex with BLM-VO³⁺, at 30°C, pH 6.8 (ppm)

A: Free GC-12

| base | H8/H6 | H2/H5/ CH ₃ | H1' | H2' | H2" | H3' | H4' | N1H ^C / N3H |
|------|-------|---------------------------|------|------|------|------|------|---------------------------|
| C1 | 7.79 | 5.94 | 5.96 | 2.18 | 2.53 | 4.64 | 4.10 | - |
| C2 | 7.66 | 5.71 | 6.00 | 2.23 | 2.48 | 4.85 | 4.20 | - |
| C3 | 7.57 | 5.64 | 5.94 | 2.12 | 2.41 | 4.83 | 4.17 | - |
| C4 | 7.48 | 5.66 | 5.27 | 2.05 | 2.30 | 4.81 | 4.07 | - |
| A5 | 8.17 | 7.64 | 6.04 | 2.75 | 2.90 | 5.04 | 4.39 | - |
| G6 | 7.64 | - | 5.73 | 2.50 | 2.61 | 4.97 | 4.36 | 12.80 |
| C7 | 7.30 | 5.18 | 5.84 | 1.93 | 2.42 | 4.70 | 4.16 | - |
| T8 | 7.27 | 1.90 | 5.65 | 1.96 | 2.29 | 4.81 | 4.07 | 14.07 |
| G9 | 7.80 | - | 5.49 | 2.61 | 2.62 | 4.93 | 4.27 | 13.03 |
| G10 | 7.67 | - | 5.57 | 2.53 | 2.64 | 4.94 | 4.31 | 13.11 |
| G11 | 7.63 | - | 5.76 | 2.51 | 2.68 | 4.92 | 4.33 | 13.18 |
| G12 | 7.69 | - | 6.11 | 2.43 | 2.33 | 4.60 | 4.17 | 13.27 |

| base | N4H ₂ ^C | 3'-P | H5'/H5" |
|------|-------------------------------|------|---------|
| C1 | a | a | -3.70 |
| C2 | 8.43 | 6.93 | -3.66 |
| C3 | 8.50 | 6.83 | -3.69 |
| C4 | 8.62 | 6.89 | -3.32 |
| A5 | - | - | -3.85 |
| G6 | - | - | -3.68 |
| C7 | 8.06 | b | -4.00 |
| T8 | - | - | -3.73 |
| G9 | - | - | -3.43 |
| G10 | - | - | -3.52 |
| G11 | - | - | -3.60 |
| G12 | - | - | 6.11 |

^a Not assigned because of the terminal freying.

^b Not assigned. ^c Assigned at 10°C.

表3 GC-12のプロトンおよびリンNMRの化学シフト。(A)

B: GC-12 Complexed with BLM-VO³⁺

| base | H8/H6 | H2/H5/ CH ₃ | H1' | H2' | H2" | H3' | N1H ^C / N3H |
|------|-------|---------------------------|------|------|------|------|---------------------------|
| C1 | 7.77 | 5.91 | 5.95 | 2.15 | 2.53 | 4.65 | - |
| C2 | 7.64 | 5.76 | 6.00 | 2.21 | 2.47 | 4.83 | - |
| C3 | 7.50 | 5.64 | 5.93 | 2.08 | 2.38 | 4.81 | - |
| C4 | 7.45 | 5.63 | 5.31 | 2.00 | 2.23 | 4.79 | - |
| A5 | 8.17 | b | 6.05 | 2.73 | 2.90 | 5.04 | - |
| G6 | 7.63 | - | 5.73 | 2.50 | 2.61 | 4.93 | 12.79 |
| C7 | 7.30 | 5.18 | 5.86 | 1.92 | 2.40 | 4.69 | - |
| T8 | 7.26 | 1.53 | 5.67 | 1.95 | 2.27 | 4.81 | 14.07 |
| G9 | 7.79 | - | 5.50 | 2.60 | 2.63 | 4.93 | 13.01 |
| G10 | 7.67 | - | 5.58 | 2.50 | 2.60 | 4.93 | 13.11 |
| G11 | 7.63 | - | 5.73 | 2.50 | 2.55 | 4.93 | 13.15 |
| G12 | 7.67 | - | 6.08 | 2.31 | 2.43 | 4.61 | 13.20 |

C: Chemical Shift Differences ($\delta_{\text{complex}} - \delta_{\text{free}}$) (ppm)

| base | H8/H6 | H2/H5/ CH ₃ | H1' | H2' | H2" | H3' | N1H ^C / N3H |
|------|-------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|---------------------------|
| C1 | -0.02 | -0.03 | -0.01 | -0.03 | 0.00 | 0.01 | |
| C2 | -0.02 | -0.04 | 0.00 | -0.02 | -0.01 | -0.02 | - |
| C3 | -0.07 | 0.00 | -0.01 | -0.04 | 0.03 | -0.02 | - |
| C4 | -0.03 | -0.03 | 0.04 | -0.05 | -0.07 | -0.02 | - |
| A5 | 0.00 | - | 0.01 | -0.02 | 0.00 | 0.00 | - |
| G6 | -0.01 | - | 0.00 | 0.00 | 0.00 | -0.04 | |
| C7 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | -0.01 | -0.02 | -0.01 | - |
| T8 | -0.01 | 0.03 | 0.02 | -0.01 | -0.02 | 0.00 | - |
| G9 | -0.01 | - | 0.01 | -0.01 | 0.01 | 0.00 | |
| G10 | 0.00 | - | 0.01 | -0.03 | -0.04 | -0.01 | |
| G11 | 0.00 | - | -0.03 | -0.01 | -0.13 | 0.01 | |
| G12 | -0.02 | - | -0.03 | -0.12 | 0.10 | 0.01 | |

表3 (続き) BLM-Ni²⁺・GC-12 複合体 (B) 、およびその差 (C)

第三節 GpT サイトを有するDNA オリゴマー (GT-12) に見られるBLM 結合の影響

前節では、GC-12 がBLM とただ一か所で特異的に相互作用するにもかかわらず、そのNMR スペクトルに変化が見られないことが明らかになった。そこで筆者はGC-12 のシステムの欠点を考慮したうえ、よりNMR 法による研究に適していると考えられる新たな配列、GT-12 を設計し合成した。その配列設計の戦略は、第一節に詳述した通りである。

3-1 イミノプロトンによる滴定実験

GC-12 の時と同様に、GT-12 のイミノプロトンを観測しながら、BLM-V0³⁺で滴定実験を行った。GT-12 のナンバリングを図16に、イミノプロトンスペクトルを図17に示す。

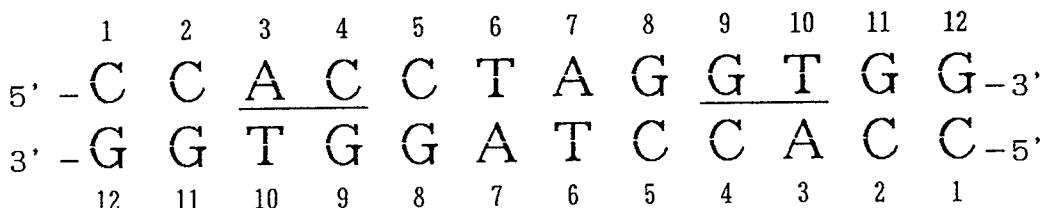


図16 GT-12 のナンバリングシステム

GT-12 の時とは明らかに異なり、BLM-V0³⁺の添加にともない、切断部位であるT10N3Hおよびduplex末端であるG12N1Hの2本のシグナルのみが、ブロード化しつつ特異的な高磁場シフトを示した。これは、BLM がGT-12 のG9pT10部位に特異的に結合していることを示している。

一方、G12 のイミノプロトンの変化は、BLM 結合に伴うduplexの不安定化により、末端で塩基対の開裂 (terminal fraying) が起こっていると考えられる。

またBLM の塩基認識は、G 特異的であるためBLM はGT-12 のG9を認識し

て結合していると考えられるが、T10N3Hには変化が見られたのとは対照的にG9N1H シグナルには全く変化が見られなかったのは、特筆に値する。

3-2 塩基部プロトンおよびチミジンメチルプロトン部分の変化

更に筆者は、GT-12 のBLM- VO^{3+} による滴定実験を D_2O 中で行い、その芳香族プロトン領域に観測される塩基部プロトン (purine H8, adenine H2, pyrimidine H6) の変化を追跡した (図 18)。また同じスペクトルの T-CH_3 についても追跡した (図 19)。

まず図 18において最も顕著な変化は、A-H2由来のシャープなシグナルのうち一方、A3H2のシグナルのみがBLM- VO^{3+} の添加にともない極端なブロード化を示し、最後には他のシグナルと重なって観測できなくなってしまうことである。その際化学シフトの変化はない。なお、図中BLM の当量数が増すにつれて、7.3 ppm と7.8 ppm に現れてくる大きなシグナルは、BLM のヒドロキシヒスチジン残基由来のH2およびH4のシグナルである。

他方メチルプロトン部分にも、同様のシグナルの顕著なブロード化が観測された (図 19)。すなわち切断部位T10- CH_3 のシグナルが若干の高磁場シフトを伴いながら、ブロード化をして最終的にほとんど消失してしまうことである。

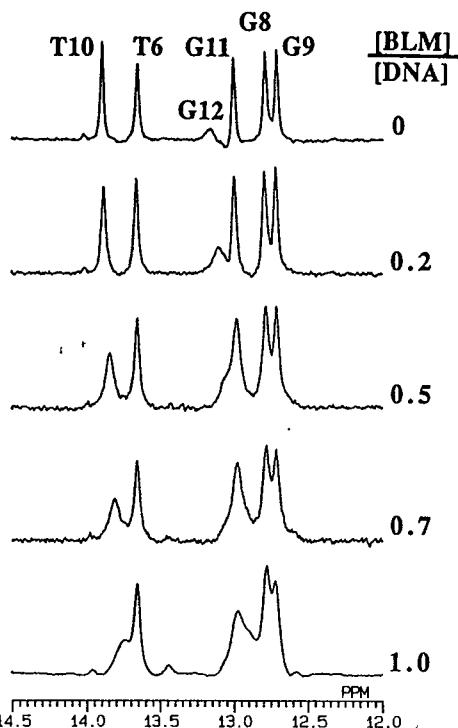


図 17 GT-12 のBLM- VO^{3+} 滴定実験(Ⅱ)プロトン領域)

図16のGT-12のナンバリングから明らかなように、ブロード化の観測されたA3とT10は塩基対を形成している。つまりA3は切断部位であるG9pT10のstrandのちょうど反対側に位置し、同じマイナーグループを共有している。さらにadenineのH2はマイナーグループ側に存在する唯一の非交換性プロトンである（図10参照）。したがってA3H2はBLMの結合していると考えられるG9pT10部位で、もっともBLMに近いと考えられる。

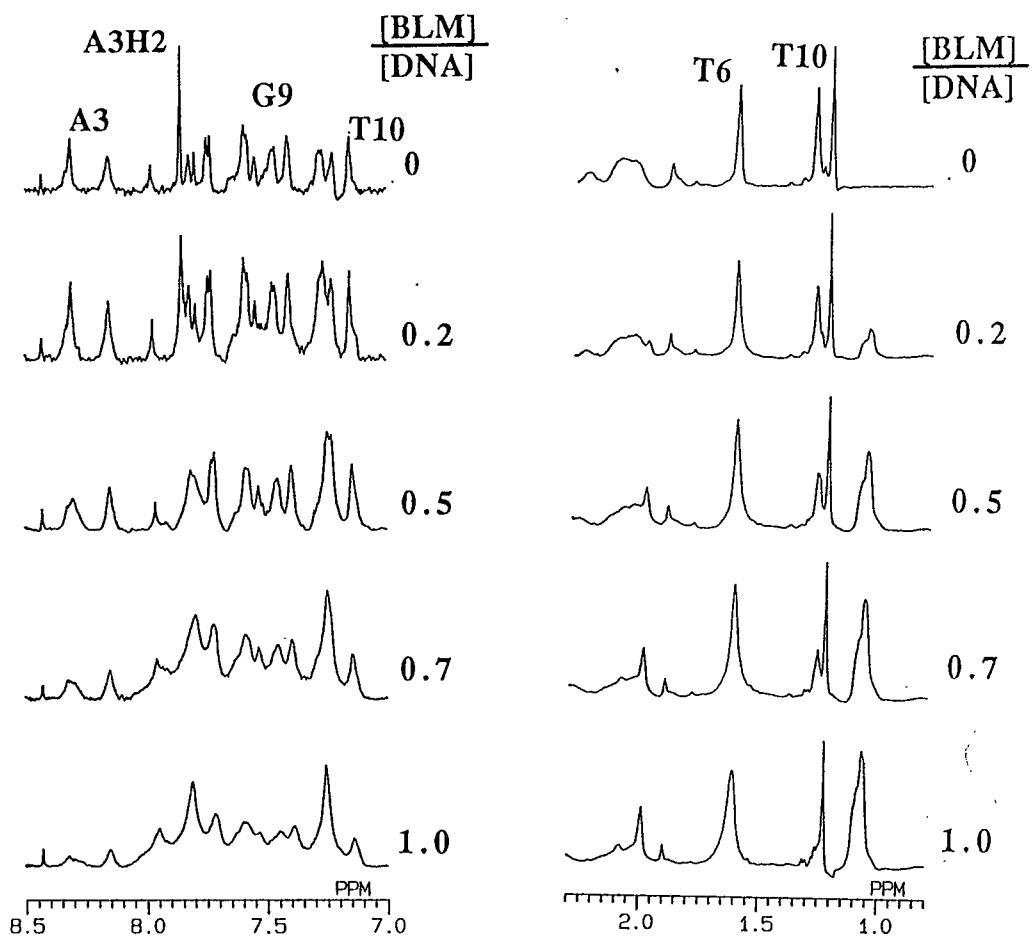


図18 GT-12のBLM-VO³⁺滴定実験の¹H NMRスペクトル（塩基部プロトン領域）

図19 GT-12のBLM-VO³⁺滴定実験の¹H NMRスペクトル（Tのメチルプロトン領域）

このように切断部位T10 を含むA3:T10塩基対にのみ顕著なシフト及びシグナルのブロード化が観測されたことは、BLM-VO³⁺がこの部位の塩基配列を認識して、特異的に結合していることを強く示唆する。

同時にGpC 配列を持つオリゴDNA 、 GC-12 では観測されなかったNMR での変化が、 GT-12 において初めて観測されたことは、塩基配列設計が成功したと考えることができる。

第四節 考察——BLM とDNA の相互作用様式の解明

緒論において紹介したように、 BLM は長い間インターラーカーとしてDNA 塩基対間にそのビチアゾール環が挟まる（インターラートする）ことで、DNA に結合すると考えられてきた。^{7, 8, 28, 35-37)}インターラーカーとは図20Cに示すように、芳香環を含んだ平面性の高い薬物がDNA の塩基対間ににはまるという相互作用様式である。図20Aには、現在までにインターラーカーとして知られているいくつかの薬物の分子構造式を挙げた。これらインターラーカーの中には、細胞毒性を示すもの、制癌活性のあるもの、および発癌性・変異原性を示すものなどいずれも高い生物活性を示すものが多い。³⁸⁾参考として、図20Bには典型的なインターラーカー、ethidium bromideとDNA 複合体のX線結晶構造を示した。³⁹⁾これらインターラーカーは、歴史的には最初のDNA 結合様式であり、芳香環というわかりやすいpharmacophore が共通点である。そのため構造決定がなされた時点で、BLM のビチアゾール環部分も同様の化合物群に属すると考えられたのであろう。しかし結論から先に述べれば、筆者の観測したデータはいずれも、BLM がインターラーカーであるとする説では説明できない。むしろBLM がDNA のマイナーグループに結合しているというモデルによく一致する。これらのこととを討論するために、まずそれぞれのNMR スペクトルの変化と、それに及ぼす他の一般的なインターラーカー薬物の影響について考察し、ついで従来から『BLM = リンターカラー』説を支持する根拠について筆者のデータと比較検討した。

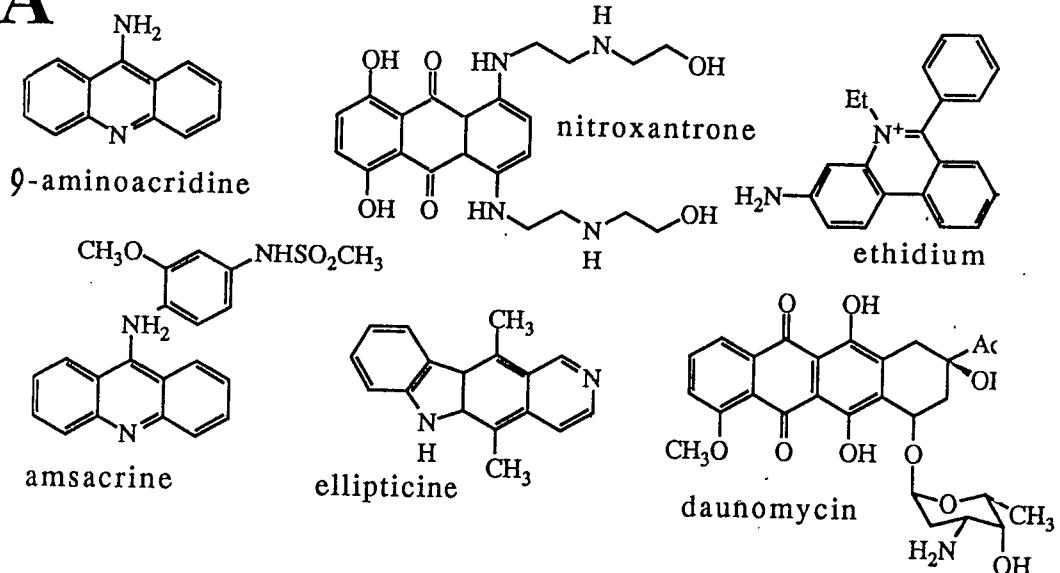
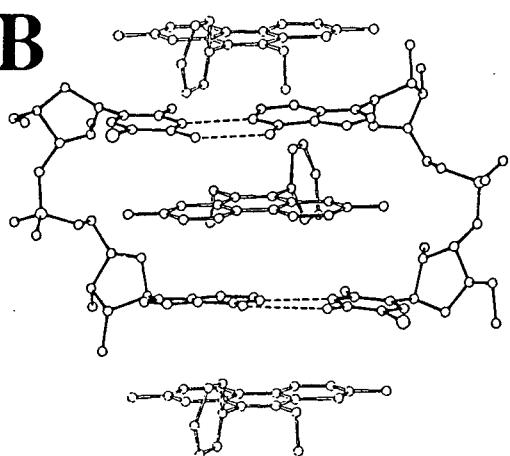
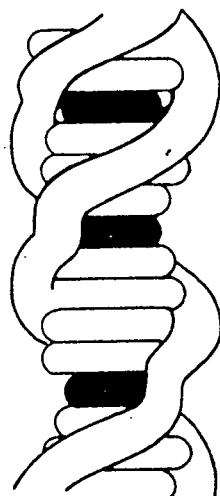
A**B****C**

図 20 インターカレーターの例 (A) 構造式 (B) ethidium bromide の X 線結晶構造 (C) DNA 結合の模式図

4-1 ^1H NMRの変化に関する考察

BLM が結合することにより、GC-12 のすべてのイミノプロトン（第二節）およびGT-12 のT10N3H以外のイミノプロトン（第三節）の化学シフトに基本的には変化が見られなかった。これらのことより、BLM の結合が

DNA の塩基対の開裂を引き起こさない、ということが明らかである。更に、これらイミノプロトンは B 型DNA のらせん軸中心に並んでいるため、(図 10) インターカレーターが塩基対間に結合した場合には、その芳香環の真上あるいは真下に位置することにより、強い遮蔽を受けて 1 ppm 以上に及ぶ高磁場シフトが観察されることが知られている。Feigonらは、70 あまりの様々なDNA 結合性薬物について、DNA との混合実験からそれら薬物のイミノプロトンシグナルに対する影響を報告している。⁴⁰⁾ そこでは 50 種あまりのインターカレーター全てで、イミノプロトンシグナルの大きな高磁場シフトが確認されている。

しかし BLM では、BLM がDNA に結合しているにもかかわらず、そのような変化は観測されなかった。これは、BLM がインターカレーターであるとする従来の仮説を否定する有力な証拠である。

とりわけ GT-12 においては、T10N3H の高磁場シフト (0.15 ppm) はインターカレーションが起こっているとは考えられないような小さな変化であるのに加え、G9N1H に全く変化が見られていない。実際に G9:C4 塩基対と T10:A3 塩基対の間にビチアゾール環がインターカレートしていると仮定すると、G9 に変化が見られなかった今回の実験結果は説明できない。

また BLM のビチアゾール環が塩基対中央から離れた位置に、部分的にインターカレートしている (partial intercalation) という仮説を出しているグループもいるが、⁴¹⁾ その場合には塩基部プロトンが芳香環環電流効果を受ける位置にくる。加えてインターカレーションにより、塩基対どうしの距離並びに相対的位置関係も大きく変わるはずである。

本来 DNA の塩基部 proton の化学シフトは、前後の塩基対とのスタッキングに支配され、その遮蔽の状況に対して鋭敏である。従って、GC-12 や GT-12 でそれらの変化が観察されなかったという筆者の結果は、BLM がインターカレーターであるという説を否定するばかりでなく、BLM がDNA に結合した時に DNA の立体構造には大きな変化を与えないということを併せて示唆する。

これらの現象は BLM が DNA のマイナーグループに添うように結合していると考えると、全て矛盾なく説明できる。

4-2 ^{31}P NMR の変化に関する考察

核酸の ^{31}P NMR の化学シフトが、構造に大きく依存していることは既に紹介した（図14）。インターラーカレーターがDNAの塩基対間に結合した場合、巨視的にはらせんの長い軸方向に伸長され、微視的には糖-リン酸骨格の一部に変化が起きて、そのリン酸のNMRシフトにも変化が観察されることが知られている。⁴²⁾

しかし ^{31}P NMRでも、GC-12及びGT-12ともBLM結合における変化は見られなかった。このこともBLMがインターラーカレーターであるとする説とは矛盾する結果である。

またBLM末端の正電荷を有する残基がその生理活性に必須であることから、筆者はBLMが塩基配列特異的にDNAと結合する際に、その正電荷とリン酸の負電荷の間に特異的な相互作用が起こり、どれか一つのリンのシグナルに変化が見られるのではないかと期待した。

しかし、本実験の結果はそうした予想を裏切るものであった。このことはリン酸の化学シフトが、立体構造の場合とは異なりその周りの静電的相互作用にはあまり敏感でないことに由来していると考えられる。またBLMの末端正電荷は、どれか特定のリン酸と直接相互作用しているのではなく、マイナーグループの間でDNAのリン酸骨格の負電荷の雰囲気と、非特異的な静電的相互作用により、DNAに結合しているBLMを安定化していると考えられる。

4-3 BLMがインターラーカレーターであるとする説の根拠

BLMとDNAの相互作用を研究して、それがインターラーカレーターである可能性を主張している過去の報文からその根拠を列挙すると、

- [1] BLMによるsupercoilのあるplasmid巻き戻しの観測¹³⁾
- [2] 粘度、沈降係数測定によるDNA長軸方向への伸長現象^{25, 36)}
- [3] ピチアゾール環部分の蛍光の消光現象²⁵⁻²⁷⁾
- [4] ピチアゾールアナログとDNAの相互作用のNMRによる観察^{14, 28)}である。

しかし、まず[1]および[2]については、長鎖のDNAにいくつもの

薬物分子が結合した時の様子を、巨視的に観察した結果から推論したに過ぎず、BLM 一分子あたりの挙動を観察しているわけではない。例えばDNA に結合した二分子のBLM がおたがいに反発することによって、DNA の巻き戻しや伸長がおこることもありうる。これらの性質はインターラーカーであることの必要条件ではあっても、十分条件ではないので説得力に欠ける。

また [3] については、ビチアゾール環の蛍光が消光する原因是核酸塩基とのスタッキング相互作用だけではない。水素結合や近傍の電荷との静電的相互作用など、発色団である

ビチアゾール環の π 電子の分布を
変えるような要因は、すべて蛍光
の強度に影響を及ぼす可能性があ
る。例えば図21 のようなビチア
ゾール環の水素結合によるG 塩基
の認識機構でも消光現象は説明で
きる。

また [4] は実験に用いている
アナログ分子が、図22 に示した
ような低分子で、実際のBLM から
巨大な立体障害となるであろう糖
部分及び配位子領域を全て欠いて
しまっている。従って、これらの分子とDNA の相互作用様式と実際のBLM
のDNA 結合様式が異なっていたとしても驚くには当たらない。

以上のように『BLM = インターカレーター』説を主張する根拠は、いざ
れも筆者が今回の実験系から得た『BLM はDNA のマイナーグループに結合
している』という結論を否定するものではないことが明らかになった。

4-4 BLM のDNA に対する結合定数及び交換速度の問題

筆者は実験から、少なくともGC-12 のG6pC7 部位に結合するBLM-Ni²⁺の
結合定数が、 $4.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であることを明らかにした。この値は長鎖の

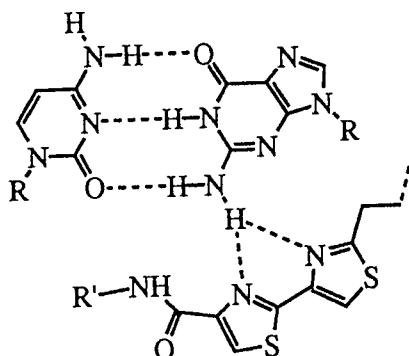


図21 G 塩基の認識機構

Cationic bithiazoles

R₁

R₂

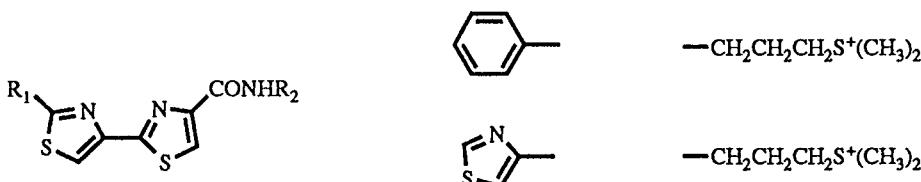


図 2 2 DNA 結合実験に用いられたビチアゾール誘導体^{14, 28)}

DNA の実験から得られた文献値とほぼ一致する。³⁶⁾ しかしこの値は、ethidium bromideなどの一般的なインターラーカレーターとDNA の会合定数より二桁ほど小さい。通常のインターラーカレーターはDNA duplexを安定化して、そのT_m（融解温度）を顕著に上昇させる。一方BLMはDNAのT_mを下げ、その熱安定性を減じる（GC-12の場合20等量のBLM-Ni²⁺存在化、約7度T_mが低下した）。これらのことから、『BLMは一般的なインターラーカレーターとは異なったユニークなDNA 結合ドラッグである』としている論文がある。³⁶⁾ しかし筆者はむしろ、このことをインターラーカレーター説を否定するべき根拠として位置付けたい。

さらにBLMでDNAを滴定した時に、薬物がDNA上で飽和するまでの過程で、シグナルのブロード化は見られたものの、DNAのシグナルの数が増えることはなかった。このことは、BLMが結合しているDNAと、フリーなDNAの間での平衡がNMRによる観測のタイムスケールに比較して速いため、両方の状態でのシグナルが平均化して観測されていることを示している。これはDNAに結合しているBLMのシグナルと、結合していないBLMのシグナルについてもいえることである（第二章第一節）。すなわち、BLMはDNAに対して、速い結合と速い解離を行っているのである。

しかし一方、BLM は細胞内の酸素及び還元剤を巧みに利用して、それ自身リサイクルしながら高効率でDNA に損傷を与えるという高い生理活性を有している。筆者は、このようなBLM のDNA に対するあまり高くない結合定数と速い平衡もまた、BLM の生理活性発現に積極的な寄与を行っている可能性があると考えている。

第二章 BLM の塩基認識機構の解明

BLM は従来より信じられてきたようにインターラートによってDNA と結合しているのではないことが明らかになった。ところで BLM-Fe²⁺-H₂O₂ 系によるDNA の切断が、デオキシリボースのH4' の引き抜きによって開始されることが既に知られている。^{43, 44)} H4' はB型DNA ではマイナーグループに面している。また BLM のDNA 切断効率はG塩基の2位アミノ基の修飾によって顕著に低下するが、^{16, 45, 46)} 図10 のようにG-C2NH₂ はマイナーグループ側に突き出している。これらの事実に基づいて、BLM はDNA のマイナーグループに結合しているという仮説が提出されている。^{15, 16)} この『BLM = マイナーグループ結合』説はこれまでに筆者が観測した BLM-DNA 相互作用における多くの現象をも、合理的に説明しうる。その際、他のマイナーグループ結合型薬物の相互作用機構から類推して、BLM とDNA の間に水素結合が形成されている可能性が高い。

他方、今までDNA と相互作用している BLM の側の変化についても、NMR による詳細な研究はなされていなかった。筆者の設計した実験系およびモデル基質となるDNA 配列、GT-12 は、BLM と strand比で1:1 の複合体となるため、BLM 側のプロトンに見られる変化についても、NMR による追跡を可能にした。

BLM がDNA に結合した際にDNA に生じる変化については、前章で述べた。それでは一方、DNA に結合している時の BLM にはどのような変化が起こっているのであろうか。そのことが解明できなければ BLM-DNA 相互作用の詳細は明らかにならない。したがって BLM の側の変化を明らかにすることは、本研究のもう一つの重要な役目である。

しかしそのためには、DNA の塩基配列に特異的に結合している際の、BLM の状態を観測しなければならない。従来より dA; dT ポリマーや、仔ウシ胸腺DNA のような長鎖DNA を加えた状態での BLM の変化を調べた実験はあった。⁴⁷⁾ しかし第一章第二節の蛍光滴定実験が示すごとく、BLM はG-ピリミジン配列を持たないDNA に対しても非特異的な親和性を有し、ある程

度の相互作用をする。そのためポリマーDNAを用いた実験により得られた知見が、塩基配列に特異的な分子認識を行っているBLM……いいかえればBLMのactive conformer…の性質を直接的に示唆するとは考えにくい。

GT-12 : d(CCACCTAGGTGG) 配列はBLMとG9pT10部位で特異的な相互作用を行い、NMRを用いた実験に適していることが明らかになった（第一章第三節）。また第一章第一節で詳述したように、GT-12配列の特徴は、DNA上のBLM結合部位が全てBLMで飽和した時のDNA:BLM比が1:1であり、BLMのシグナルに生じた変化も観察しやすいことである。少なくとも、NMR測定条件の濃度で、BLM/DNAのモル比が0～1.2の間では、GT-12上で観察された変化はG9pT10:A3pG4という切断サイトにのみ限定されている。これは、このときにBLM側に生じる変化が、GT-12のGpT配列を認識して結合しているときに起こる特有な変化である、ということを保証するものである。

この章ではまずDNAとの相互作用の際に生じる、BLM側の変化について述べる。ついでBLM-DNA複合体の2D NMR解析から、BLMの塩基認識機構について考察する。併せて、筆者の構築したBLMのマイナーグループ結合モデルについて紹介し、今まで提出されている他のBLM-DNA結合モデルと比較検討する。

第一節 GpTサイトを有するDNAオリゴマー(GT-12)の結合に見られるBLM側の変化

筆者は、DNAのマイナーグループ側におけるBLM-DNA間の水素結合の可能性を考慮した。なぜならnetropsinなどのよく知られたマイナーグループ結合性薬物では、アミドNHがDNAと水素結合を形成していることが一般的であるからである（図30参照）。そこでアミドNHプロトンを観測しながら、GT-12で滴定実験を行った。これは第一章第三節の滴定実験にたいして、対をなすものである。

図23に、BLMの各プロトンの名称を示した。BLMはペプチド性の化合物であり、その化学構造はいくつかの小さなフラグメントに分けることが

P. Pyrimidinyl-
propionamide

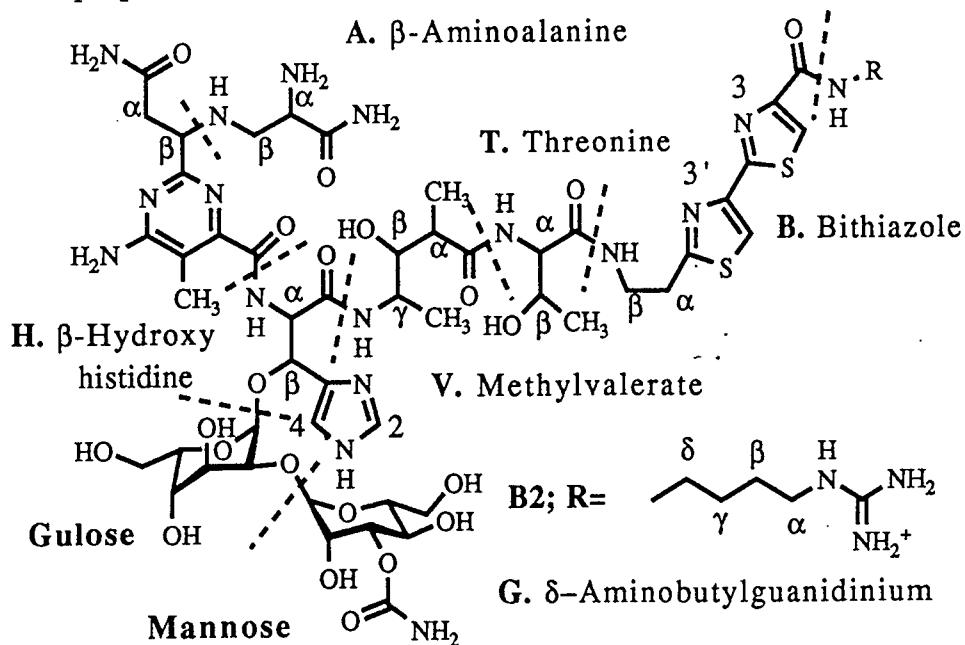


図23 BLM の構造フラグメントとプロトンの名称

| Abbreviation | Fragment | Spin-system | Class |
|--------------|-------------------------|--|----------------------------------|
| I T | Threonine | CH ₃ -CH-CH | A ₃ MX |
| II P | Pyrimidinylpropionamide | CH ₂ -CH | ABX |
| III V | Methylvalerate | CH ₃ -CH-CH-CH-CH ₃ | A ₃ MPTX ₃ |
| IV H | β-hydroxyhistidine | CH-CH | AX |
| V A | β-aminoalanine | CH ₂ -CH | ABX |
| VI B | Bithiazole | CH ₂ -CH ₂ | AAXX' |
| VII G | δ-aminobutylguanidinium | CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ | AA'MM'TT'XX' |
| VIII | α-L-gulose | CH-CH-CH-CH-CH-CH ₂ | |
| IX | α-D-mannose | CH-CH-CH-CH-CH-CH ₂ | |

表4 BLM のspin-system と残基名の略号

できる。筆者は滴定に先立ちHaasnootらの論文を参考に、BLM の各プロトンを帰属した。^{23, 48, 49} (以後、BLM の各プロトンのシグナルは、図に示した残基の略号を用いる。略号についても文献48に従った。) 表4には、それぞれの残基の略号表および、COSYによるスペクトル帰属の際に参考となるspin-system を掲げた。

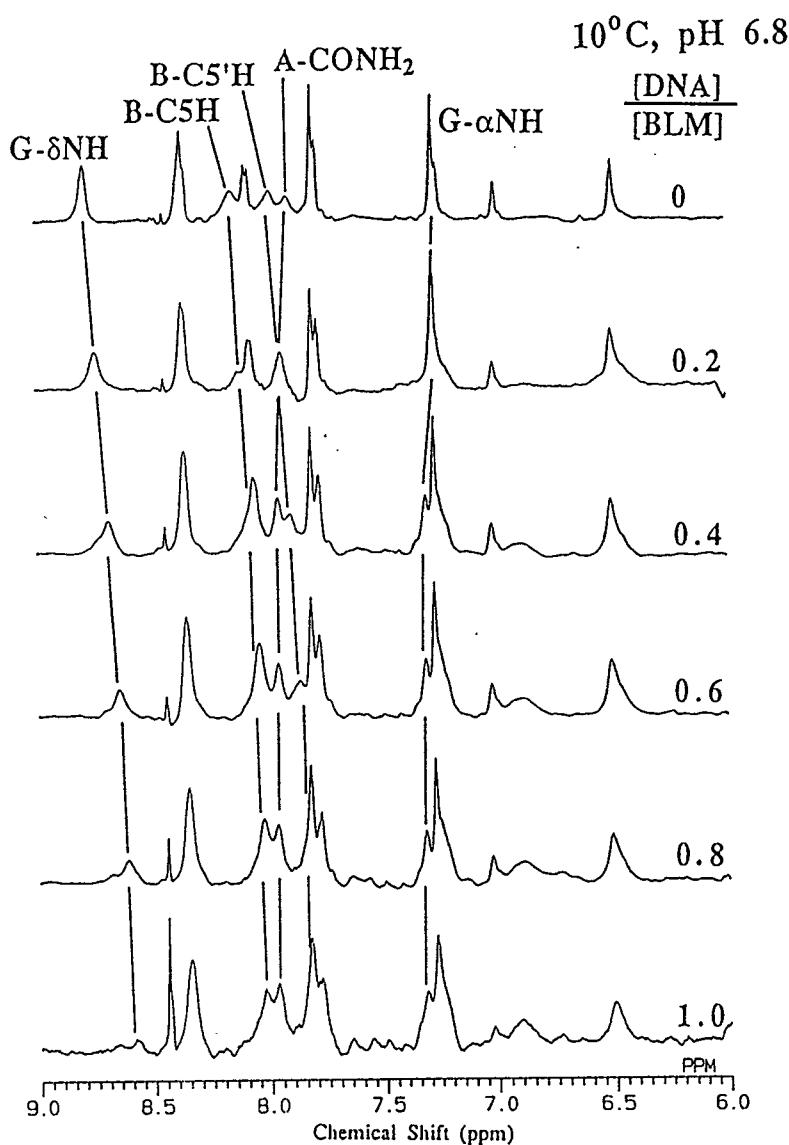


図24 BLM-V0³⁺のアミド・芳香族プロトン領域の¹H NMR

ところで、このようなアミドプロトンは溶媒であるH₂Oのプロトンと速い交換をするため、通常の方法では観測することができない。筆者は、BLMを軽水中(90% H₂O, 10% D₂O)で、核酸のイミノプロトン観測等に用いる選択励起パルス、SS 1-1を用いて観測して滴定実験を行った。

図24に、BLM-V0³⁺の芳香族プロトンへアミドプロトン領域のスペクトルを、GT-12 strandの当量数とともに示した。主なシグナルの帰属はスペクトルの上端に示した。

最も顕著な変化を示したシグナルは、BLM-B₂のN末端残基であるδ-aminobutylguanidinium基(G)のδ位アミドプロトンである。DNAの添加にともない、著しいプロード化を示しながら約0.26 ppm高磁場にシフトした。このG残基は、通称terminal amineと呼ばれているBLMの末端残基で、各分子種によってそれぞれ異なる(図1)。しかし通常用いられているBLM誘導体全てにおいて、この位置のNH基は必ず保存されている。

従って筆者は、このG-δNHがBLMの分子認識において、直接DNAとの水素結合に関与しているのではないかと考えた。

また図24には、従来よりDNA結合領域といわれてきたビチアゾール残基(B)の芳香族プロトン(B-C5H/C5'H)も現れている。これらのプロトンもまた、GT-12添加にともないそれぞれ約0.16 ppm程度の高磁場シフトおよびプロード化が観測された。一方P-CONH₂およびG-αNHは、わずかながら低磁場へのシフトを示した。

第二節 BLM-DNA複合体の2次元NMRによる詳細な解析

前節では、DNAに結合することによりBLM側のプロトンにも顕著な変化が生じることを示した。BLMのそのほかの非交換性プロトンについても興味が持たれる。一方、GT-12についても BLMの活性中心に近いと考えられるデオキシリボースの各プロトンシグナルに生じる変化を明らかにする必要がある。これらCHプロトンの領域は、多くのシグナルが重なっているため、2D-NMRの手法が効果的である。

筆者はGT-12とBLM-V0³⁺の1:1複合体(2 drug / 1 duplex)——以下、

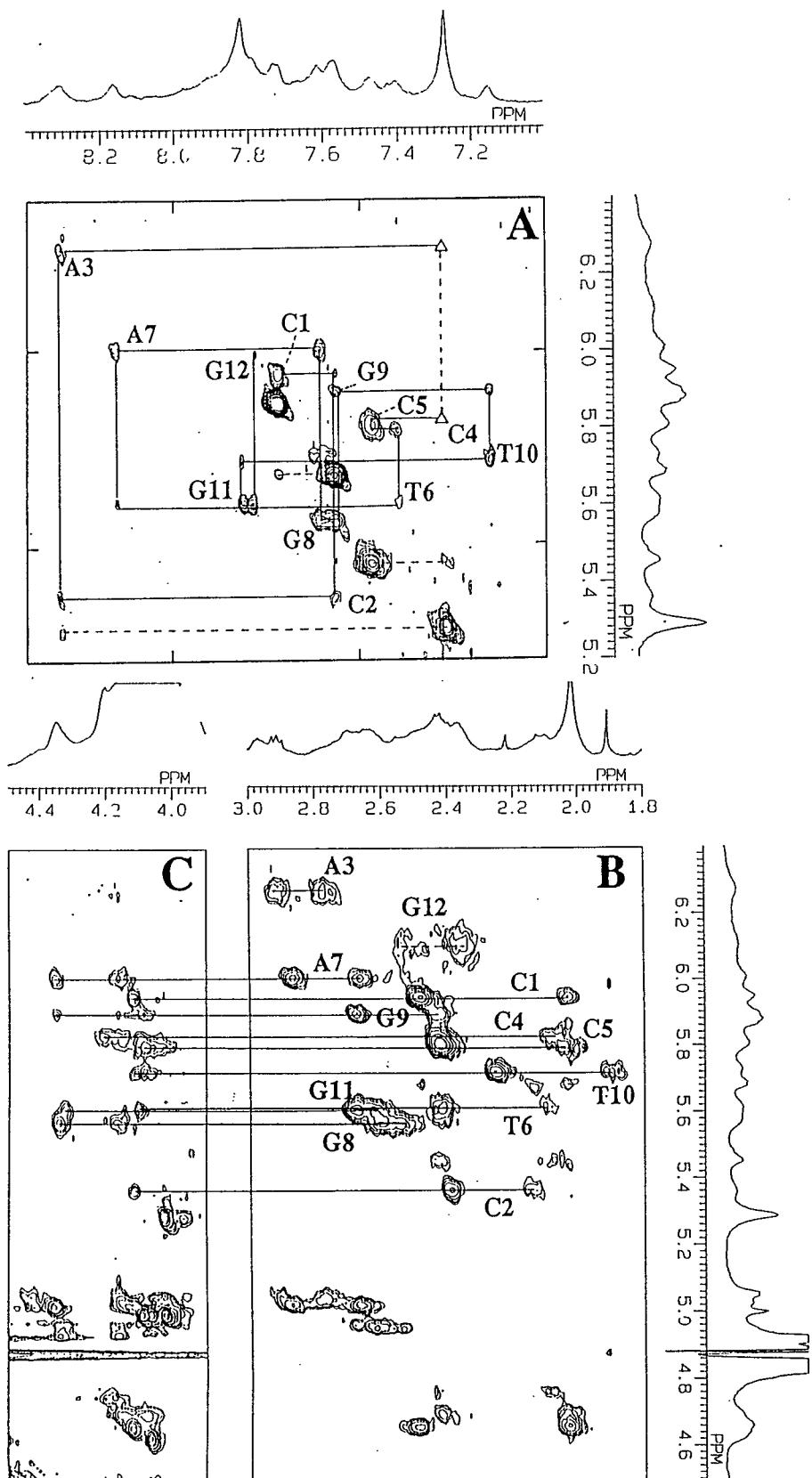


図25 BLM-GT-12複合体のNOESYスペクトル(15 °C) (A) (H6/H8)-(H1')領域 (B) (H2'/H2'')-(H1'/H3')領域 (C) (H4')-(H1'/H3')領域

BLM・GT-12 複合体と呼ぶ——の2D NMRを測定して、両者の非交換性プロトンのほとんど全てを帰属した。

2-1 DNA 側シグナルの帰属

BLM・GT-12 複合体のうち、DNA 由来のプロトンシグナルの帰属は、BLM 非存在下の帰属を参考に、混合時間250 msのNOESY スペクトルから行った。図25 Aは、B型DNA 二重鎖に特徴的な"sequential NOE"の領域を示した。また図25 B、Cはdeoxyribose の残基内のNOE を利用した、sugar proton ($H_{2'}$, $H_{2''}$, $H_{3'}$, $H_{4'}$) の帰属を示した。

BLM-VO³⁺のサンプリング中に混入して来るH₂O の信号の影響で、4.9

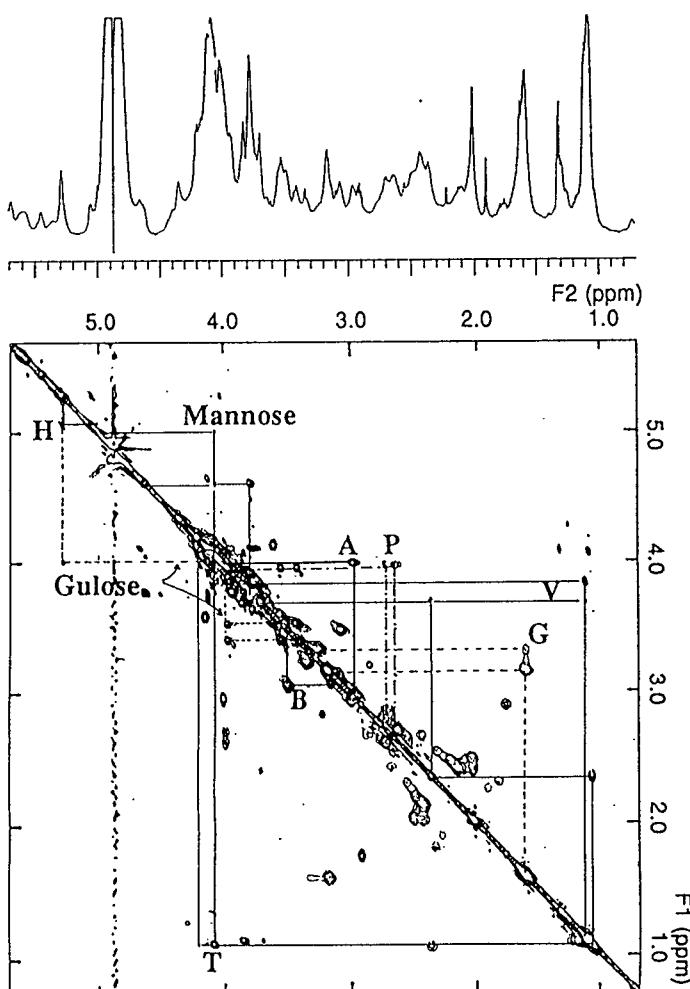


図26 BLM・GT-12 複合体の2D HOHAHA スペクトル

ppm 付近の巨大なHDO シグナルが重なったため、H3' シグナルの一部は帰属できなかった。また、一部のシグナルがブロード化しているため、消失して観測できない残基内NOE 交差ピークがあった。

表6 AにはそれらGT-12 のBLM 非存在下の化学シフトを、表6 BにはBL M-V0³⁺と複合体形成時の化学シフトをそれぞれ示した。また表6 Cにはそれらの差 ($\Delta \delta = \delta_{\text{complex}} - \delta_{\text{free}}$) を示した。

2-2 BLM 側のシグナルの帰属

BLM + GT-12 複合体のBLM-V0³⁺由来のシグナルの帰属は、混合時間 150 msの2D-HOHAHA (TOCSY) を用いて行った (図26)。すなわち、Akkerman らの報告^{48, 49)}を参考にしつつ、独自に行ったDNA 非存在下でのBLM-V0³⁺の2D-HOHAHA スペクトル (data not shown、筆者修士論文参照) と比較することで、容易に行うことができた。図にはBLM + GT-12 複合体のBLM-V0³⁺各残基のスピン系に沿った交差ピークが、実線で示してある。表7には、DNA 非存在下でのBLM-V0³⁺の化学シフト、BLM + GT-12 複合体におけるBLM-V0³⁺の化学シフト、及び両者の化学シフトの差 ($\Delta \delta = \delta_{\text{complex}} - \delta_{\text{free}}$) を示した。

Table 5: Proton Chemical Shifts for Free GT-12 and Its Complex with BLM-VO³⁺, at 15°C, pH 6.8 (ppm)

A: Free GT-12

| base | H8/H6 | H2/H5/ CH ₃ | H1' | H2' | H2'' | H3' | H4' | N1H/ N3H | N4H ₂ |
|------|-------|---------------------------|------|------|------|------|------|-------------|------------------|
| C1 | 7.73 | 5.92 | 5.96 | 2.50 | 2.06 | 4.65 | 4.10 | - | a |
| C2 | 7.57 | 5.72 | 5.37 | 2.39 | 2.13 | 4.80 | 4.11 | - | 8.60 |
| A3 | 8.30 | 7.87 | 6.28 | 2.93 | 2.80 | 5.03 | 4.45 | - | - |
| C4 | 7.26 | 5.29 | 5.81 | 2.45 | 2.08 | 4.72 | 4.23 | - | 8.33 |
| C5 | 7.46 | 5.45 | 5.79 | 2.44 | 2.03 | 4.70 | 4.11 | - | 8.10 |
| T6 | 7.38 | 1.62 | 5.61 | 2.44 | 2.11 | 4.86 | 4.14 | 13.65 | - |
| A7 | 8.14 | 7.25 | 6.02 | 2.88 | 2.67 | 5.02 | 4.37 | - | - |
| G8 | 7.56 | - | 5.57 | 2.61 | 2.54 | 4.93 | 4.34 | 12.80 | - |
| G9 | 7.51 | - | 5.89 | 2.68 | 2.43 | 4.95 | 4.35 | 12.73 | - |
| T10 | 7.13 | 1.30 | 5.73 | 2.26 | 1.91 | 4.80 | 4.13 | 13.90 | - |
| G11 | 7.80 | - | 5.64 | 2.70 | 2.65 | 4.95 | 4.32 | 13.03 | - |
| G12 | 7.78 | - | 6.15 | 2.52 | 2.35 | 4.64 | 4.22 | 13.16 | - |

B: GT-12 Complexed with BLM-VO³⁺

| base | H8/H6 | H2/H5/ CH ₃ | H1' | H2' | H2'' | H3' | H4' | N1H/ N3H | N4H ₂ |
|------|-------|---------------------------|------|------|------|------|------|-------------|------------------|
| C1 | 7.73 | 5.87 | 5.95 | 2.49 | 2.04 | 4.66 | 4.12 | - | b |
| C2 | 7.57 | 5.68 | 5.37 | 2.39 | 2.14 | c | 4.12 | - | b |
| A3 | 8.31 | d | 6.27 | 2.92 | 2.78 | 5.06 | 4.43 | - | - |
| C4 | 7.28 | 5.29 | 5.82 | 2.45 | 2.04 | 4.76 | 4.21 | - | b |
| C5 | 7.48 | 5.45 | 5.80 | 2.42 | 2.05 | 4.70 | 4.08 | - | b |
| T6 | 7.40 | 1.63 | 5.58 | 2.43 | 2.10 | c | 4.10 | 13.67 | - |
| A7 | 8.17 | 7.26 | 6.02 | 2.87 | 2.67 | 5.02 | 4.36 | - | - |
| G8 | 7.61 | - | 5.56 | 2.60 | 2.55 | 4.95 | 4.34 | 12.78 | - |
| G9 | 7.57 | - | 5.90 | 2.69 | 2.44 | c | 4.35 | 12.72 | - |
| T10 | 7.15 | 1.29 | 5.72 | 2.26 | 1.90 | c | 4.08 | 13.75 | - |
| G11 | 7.83 | - | 5.61 | 2.68 | 2.60 | c | 4.32 | 12.98 | - |
| G12 | 7.79 | - | 6.12 | 2.5 | 2.36 | 4.65 | d | 12.96 | - |

C: Chemical Shift Differences ($\delta_{\text{complex}} - \delta_{\text{free}}$) (ppm)

| base | H8/H6 | H2/H5/ CH ₃ | H1' | H2' | H2'' | H3' | H4' | N1H/ N3H |
|------|-------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| C1 | 0 | -0.05 | -0.01 | -0.01 | -0.02 | 0.01 | 0.02 | - |
| C2 | 0 | -0.04 | 0 | 0 | 0.01 | - | 0.01 | - |
| A3 | 0.01 | - | -0.01 | -0.01 | -0.02 | 0.03 | -0.02 | - |
| C4 | 0.02 | 0 | 0.01 | 0 | -0.04 | 0.04 | -0.02 | - |
| C5 | 0.02 | 0 | 0.01 | -0.02 | 0.02 | -0.02 | -0.03 | - |
| T6 | 0.02 | 0.01 | -0.03 | -0.01 | -0.01 | - | -0.04 | 0.02 |
| A7 | 0.03 | 0.01 | 0 | -0.01 | 0 | 0 | -0.01 | - |
| G8 | 0.05 | - | -0.01 | -0.01 | 0.01 | 0.02 | 0 | 0.02 |
| G9 | 0.06 | - | 0.01 | 0.01 | 0.01 | - | 0 | -0.01 |
| T10 | 0.02 | -0.01 | -0.01 | 0 | -0.01 | - | -0.05 | -0.15 |
| G11 | 0.03 | - | -0.03 | -0.02 | -0.05 | - | 0 | -0.05 |
| G12 | 0.01 | - | -0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | - | -0.20 |

a Not observed because of the terminal freying.

b Not assigned. c Not assigned because of overlapping with HDO signal.

d Broadened out.

表5 GT-12 のプロトンの化学シフト (A)、BLM-VO³⁺・GT-12複合体の化学シフト (B)、および両者の差 ($\delta_{\text{complex}} - \delta_{\text{free}}$) (C)

Table 6: Proton Chemical Shifts for BLM-VO³⁺ and Its Complex with GT-12, at 15°C, pH 6.8 (ppm)

| Frag- ment | | Chemical Shifts | | | Frag- ment | Chemical Shifts | | | |
|---------------|--------------------------|-----------------|------|---------------------|---------------|---------------------------|------|---------------------|-------|
| | | free | +DNA | change ^a | | free | +DNA | change ^a | |
| T | CH ₃ | 1.11 | 1.10 | -0.01 | B | C α H ₂ | 3.23 | 3.08 | -0.15 |
| | C α H | 4.22 | 4.23 | 0.02 | | C β H ₂ | 3.60 | 3.51 | -0.09 |
| | C β H | 4.10 | 4.12 | 0.02 | | ringC5H | 8.18 | 8.03 | -0.15 |
| | NH | 8.10 | 8.0 | -0.07 | | ringC5'H | 8.00 | 7.84 | -0.16 |
| P | | | | | | NH | 8.37 | 8.34 | -0.03 |
| | C α H | 2.69 | 2.65 | 0.03 | G | C α H ₂ | 3.23 | 3.20 | -0.03 |
| | C β H | 3.97 | 4.00 | 0.03 | | C β H ₂ | 1.68 | 1.60 | -0.08 |
| | ringCH ₃ | 2.01 | 2.02 | 0.01 | | C η H ₂ | 1.68 | 1.60 | -0.08 |
| | ringNH ₂ | 7.01 | 7.03 | 0.02 | | C δ H ₂ | 3.42 | 3.35 | -0.07 |
| | amideNH ₂ | 6.51 | 6.51 | 0.00 | | α NH | 7.27 | 7.33 | 0.06 |
| | b | b | b | | | δ NH | 8.81 | 8.54 | -0.27 |
| V | α CH ₃ | 1.12 | 1.08 | -0.04 | | | | | |
| | η CH ₃ | 1.13 | 1.12 | -0.01 | galose | | | | |
| | C α H | 2.46 | 2.38 | -0.08 | | H1' | 5.25 | 5.30 | 0.05 |
| | C β H | 3.72 | 3.73 | 0.01 | | H2' | 4.04 | 4.04 | 0.00 |
| | C η H | 3.87 | 3.85 | -0.02 | | H3' | 4.10 | 4.10 | 0.00 |
| | NH | 8.39 | 8.34 | -0.05 | | H4' | b | b | b |
| H | | | | | | H6' | 3.56 | 3.55 | -0.01 |
| | C α H | 5.07 | 5.06 | -0.01 | mannose | | | | |
| | C β H | 5.29 | 5.30 | 0.01 | | H6'' | 3.43 | 3.40 | -0.03 |
| | ringC2H | 7.82 | 7.84 | 0.02 | | H1' | 5.00 | 5.01 | 0.01 |
| | ringC4H | 7.28 | 7.26 | -0.02 | | H2' | b | 4.07 | - |
| | α NH | b | b | - | | H3' | 4.71 | 4.64 | -0.07 |
| A | C α H | 4.03 | 4.03 | 0.00 | | H4' | 3.92 | 3.80 | -0.12 |
| | C β H | 2.96 | 2.97 | 0.01 | | H5' | 3.78 | 3.80 | 0.02 |
| | sec.NH | b | b | - | | H6' | b | 3.79 | - |
| | prim.NH ₂ | b | b | - | | H6'' | b | 3.94 | - |
| | amideNH ₂ | 7.92 | 7.97 | 0.05 | | | | | |
| | b | b | - | | | | | | |

^a Change represents (δ complex - δ free). ^b Not assigned.

表6 BLM-VO³⁺およびBLM-VO³⁺·GT-12複合体の化学シフトと、複合体形成における化学シフト変化 (δ complex - δ free>)

2-3 BLM 上に見られるDNA 結合の影響……BLM のDNA 結合部位の同定

BLM 、DNA (GT-12) の両方に生じたプロトンの化学シフトの変化を視覚的に比較するために、筆者は図27のようなグラフを作成した。これを見ると、

[1] BLM 上に生じた変化は、DNA 上でのそれに比べて明らかに大きい。

[2] DNA 上の変化は、二つのイミノプロトンシグナルの変化 (T10N3H, G12N1H) が顕著であり、他は高々 0.07 ppm と非常に小さい。

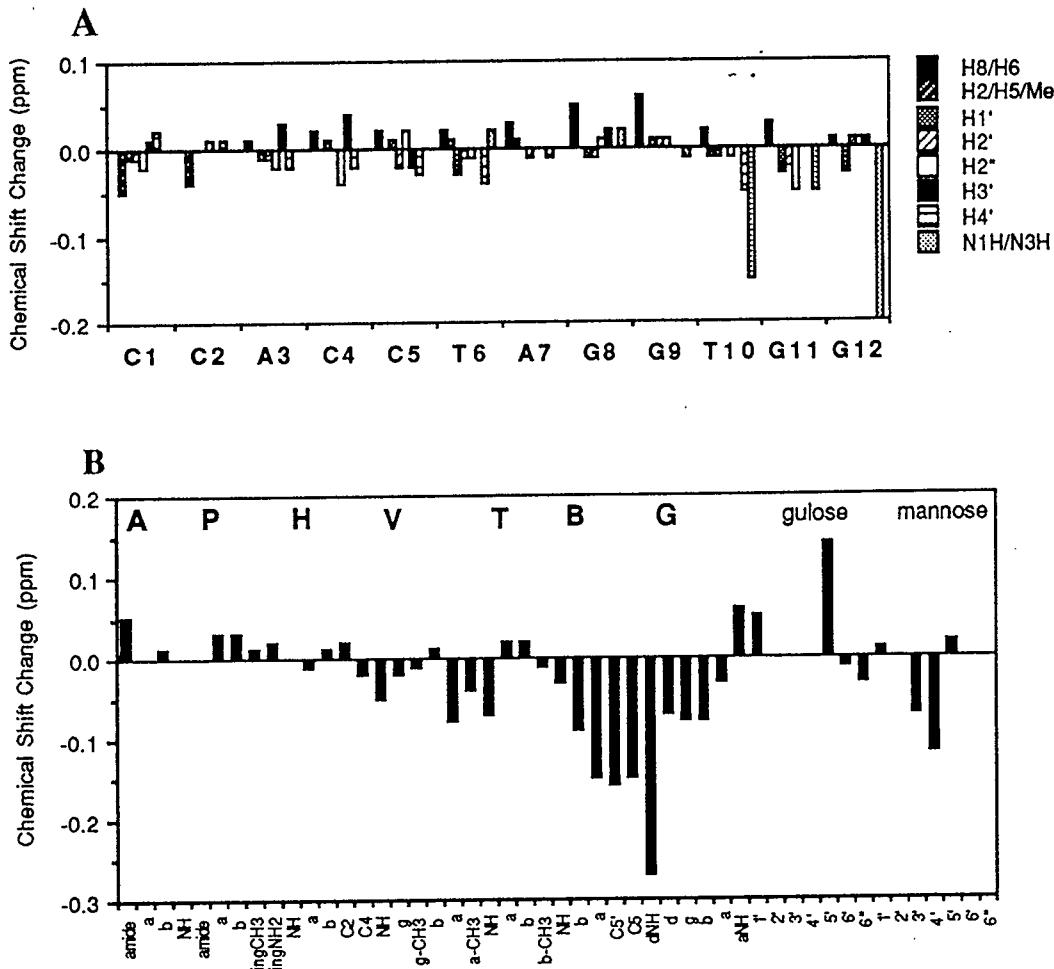


図27 複合体形成時に生じたプロトン化学シフト変化

(A) GT-12 の変化 (B) BLM-VO³⁺の変化

- [3] BLM 上の変化は、bithiazole (B)～ δ aminobutylguanidinium (G) 残基周辺に大きな変化が集中している。またthreonine (T) ～ methylvarelate (V) 残基に、比較的小さな変化が集中している。

- [4] BLM 上に見られる化学シフト変化は、大部分が高磁場シフトである。ことがわかった。

第一章より、BLM 結合に際してのDNA の構造的な変化があまり大きくなかったことが示唆されていたが、上記 [1] 、[2] はそれを裏づける結果といえる。またT10N3Hに見られる高磁場シフトは、周辺の非交換性プロトンの変化が小さく、またシフトの方向にも統一的な傾向が見られないことから、この変化がインターラーカーの遮蔽効果によるものと考えるよりも、むしろT10 残基への水素結合の影響であると考えたほうが合理的である。

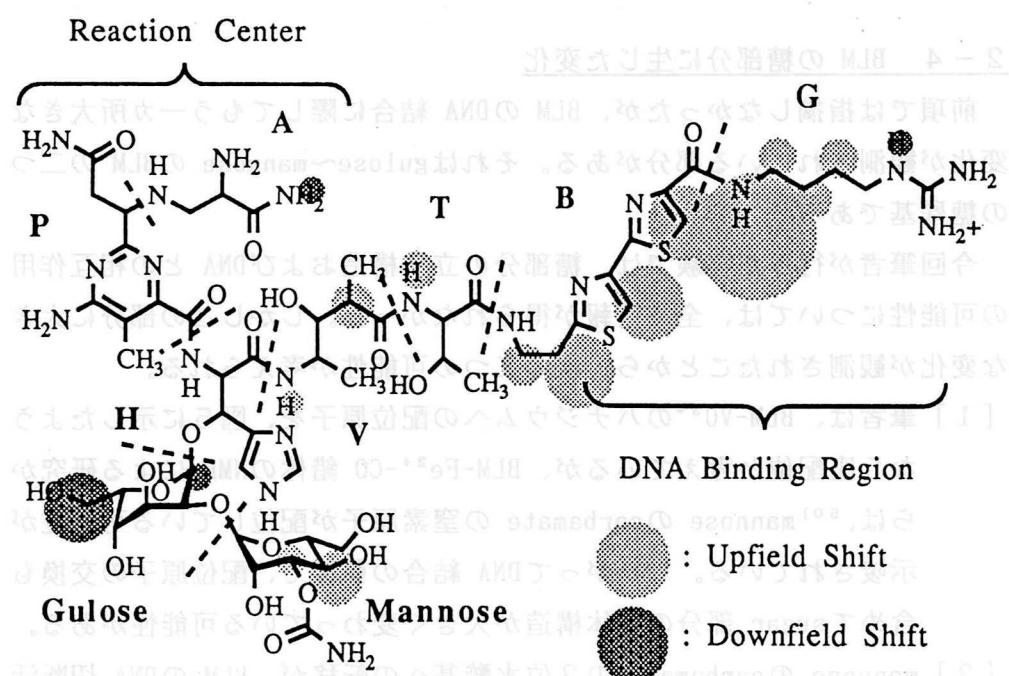


図 28 BLM-V0³⁺に生じたGT-12 結合の影響

一方、BLM に生じた変化については非常に興味深い結果となっている。図28は、GT-12 との複合体形成に見られた化学シフト変化のうち、0.05 ppm 以上の変化を、BLM の化学構造式の上に展開したものである。従来よりDNA の相互作用部位であると信じられてきた、ビチアゾール残基および隣接する末端アミン残基（この場合はブチルグアニジニウム残基）の上にDNA 結合によって生じた大きなシフトが見られた領域が完全に一致した。この結果は実際にG-ピリミジン配列に結合している完全なBLM 分子としては、初めての観測例である。

またビチアゾール環のプロトン (B-C5H / C5'H) の化学シフト変化にくらべてG-δ NHの変化が、倍近くも大きい。このことはビチアゾール環のDNA へのインターラートによりこれらのプロトンがDNA 塩基による遮蔽を受けて高磁場シフトを受けたとは考えにくい。むしろこのG-δ NHが直接DNA と水素結合していると考えるほうが合理的である。

2-4 BLM の糖部分に生じた変化

前項では指摘しなかったが、BLM のDNA 結合に際してもう一ヵ所大きな変化が観測されている部分がある。それはgulose～mannose のBLM の二つの糖残基である。

今回筆者が行った実験では、糖部分の立体構造およびDNA との相互作用の可能性については、全く情報が得られなかった。しかしこの部分に大きな変化が観測されたことから、次の二つの可能性が考えられる。

[1] 筆者は、BLM-V0³⁺のバナジウムへの配位原子を、図5に示したような5座配位と考えているが、BLM-Fe²⁺-CO 錯体のNMR による研究からは、⁵⁰⁾mannose のcarbamate の窒素原子が配位している可能性が示唆されている。したがってDNA 結合の前後で、配位原子の交換も含めてsugar 部分の立体構造が大きく変わっている可能性がある。

[2] mannose のcarbamate の2位水酸基への転移が、BLM のDNA 切断活性を顕著に低下させることから知られている。^{2, 51)} 従ってこの部分が、水素結合によってDNA との相互作用に直接関与している可能性がある。事実、chromomycin などのDNA 結合薬物では、アミノ糖と

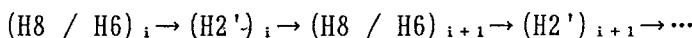
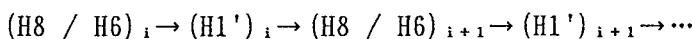
DNA の直接相互作用が観察されている例がある。⁵¹⁾

しかしBLM のsugar 部分については、シグナルが重なっているうえに、6員環の配座がCOSY / HOHAHA によるスピン系のつながりを不連続にしているため、一部帰属できていないプロトンがある。サンプル濃度の関係上¹³C-NMR 、¹⁵N-NMR 等の研究手法を用いることが困難であったので、これ以上詳しいことはいえない。

2-5 DNA 構造の変化

DNA のリン、イミノプロトン、塩基部プロトンの変化が少ないことから、BLM が結合した時のDNA の立体構造変化が小さいことを明らかにした（第一章第二節、第三節および本章前項・表6）。

このことは、BLM のマイナーグループ結合を示唆する一つの傍証でもあった。BLM + GT-12 複合体のNOESY スペクトルは、そのことをさらに直接的に証明する結果である。図29はBLM 非存在下のGT-12 の"sequential NOE"が現れる領域 (A: H6/H8 - H1'， B: H6/H8 - H2'/H2") と複合体における同じ領域 (C, D) を比較したものである。B型DNA が二重らせん構造を形成している場合、塩基BLM プロトン (Pu-H8 / Py-H6) と糖部プロトン (H1'， H2' / H2") の間にはDNA の5'側から3'側まで、鎖にそって残基内NOE と残基間NOE が交互に観測される。そしてそのNOE を順に追っていくことで、i 番目のbase proton から、



と、連続的に帰属できる（詳細は実験の部、DNA の帰属法参照）。

ここで、図29 AとC、BとDをそれぞれ比較して見ると、C4H6がプロードなために一部交差ピークが見えていないところがあるものの（図中△）、G9pT10部位およびその反対側strand、A3pC4 ステップのいずれでも、その前後でNOE の連続性は失われていない。さらに、図中矢印で示した二つの相関ピーク (A3H8-C4H5, G9H8-T10CH₃) は、右巻きのDNA らせん構造に特徴的なNOE である。これらもBLM 結合に際して消失していない。

このことはBLMがインターラーカレーターではないことを、構造的に証明するものである。すなわち、DNA塩基対間にBLMのビチアゾール環が完全にはまり込む『通常のインターラーカレーション』はもちろんのこと、Gamcsikらが提唱している『partial intercalation』⁴¹⁾でもありえない。というのはそれがどのようなモードであっても、インターラーカレーションならば

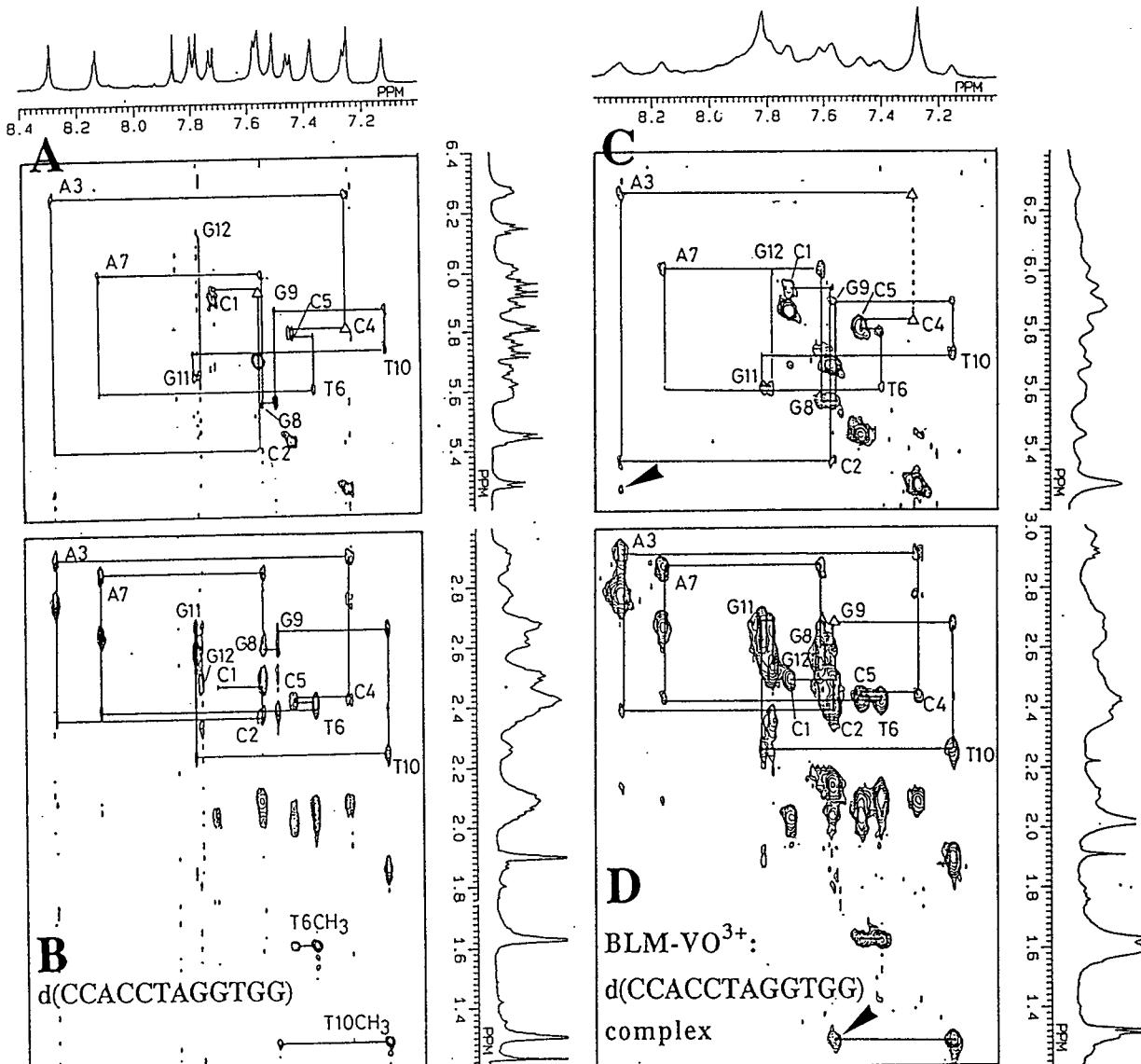


図29 GT-12 (A,B) およびBLM-GT-12複合体 (C,D) のNOESYスペクトル (15°C, 混合時間 250 ms)

二つの塩基対間の距離は最低でも3 Å以上長くなるから、その場合上記のNOEはどれも消失するはずだからである。

長い間続いていた『BLMはインターラーカーであるかどうか?』という議論は、筆者のこのデータによりに解決を見たと考えられる。

第三節 BLMのマイナーグループ結合による塩基認識機構の解明

BLMはマイナーグループからDNAに結合する。そしてグアニン塩基および2番目のピリミジン塩基をそれぞれ認識する。1980年代になり、数々のマイナーグループ結合性薬物のDNAに対する分子認識機構が明らかになるにつれて、BLMもそれらと同様にマイナーグループに結合するのではないかとの考え方方がいくつか提出されたが、それらはいずれも決定的な証拠に欠くものであった。しかし他のマイナーグループ結合性薬物とのアナロジーは、BLMの認識機構解明に大きな役割を果したといえる。ここでは、筆者が観測したNMRのデータをもとに、BLMの塩基認識機構の解明に到った道筋を詳述する。

3-1 BLMのDNA分子認識機構と、他のマイナーグループ結合性薬物との比較

1986年にDickersonは、DNAマイナーグループに結合する薬物に関する総説の中で、ペプチド性のマイナーグループ結合性薬物と、BLMのDNA結合領域に共通する性質を、次の様に述べている。⁵¹⁾

- [1] 分子のサイズ
- [2] 形状——平面上に構造式を書いたとき三日月型に書けること。
- [3] そのとき三日月型の内側に水素結合の可能なプロトンドナーおよびアクセプターがいくつか並ぶこと。
- [4] 末端に正電荷を有する官能基があること。

図30はよく知られているマイナーグループ結合性薬物、netropsin、Hoechst 33258と、今回筆者が実験に用いたBLM-B₂のDNA結合領域について、Dickersonの行ったものと同様に比較した図である。

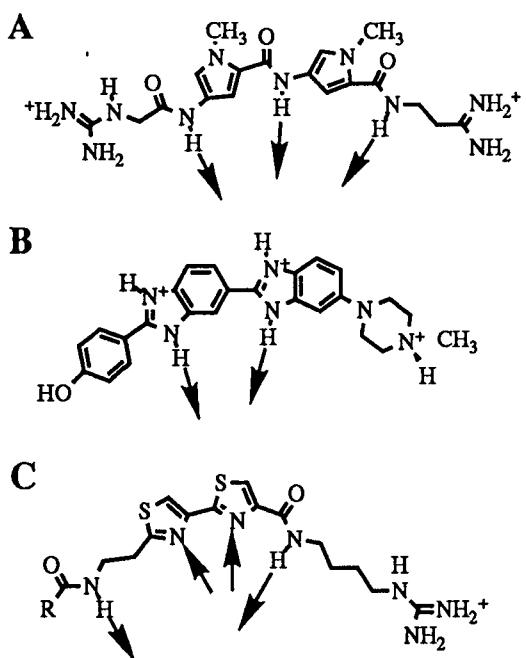


図 3 0 マイナーグループ結合性薬物と BLM-B₂側鎖の比較。A:netropsin
B:Hoechst33258 C:BLM-B₂ 側鎖

このうちnetropsinについては、B型DNAとのX線結晶構造解析が1984年にKopkaらによつて行われた(図31)。⁵²⁾ Netropsinは、A-T tractと呼ばれるA:T塩基対が並んでいる領域に特異的に結合することが知られている。それによると、netropsinのconvex faceに面している三つのNHプロトンが、水素結合のプロトンドナーとしてDNAのマイナーグループ側に水素結合をしている。それらNHはadenine N3およびthymidine C2O(carbonyl oxygen)と、bifurcated hydrogen bondを形成している。その際DNAの構造

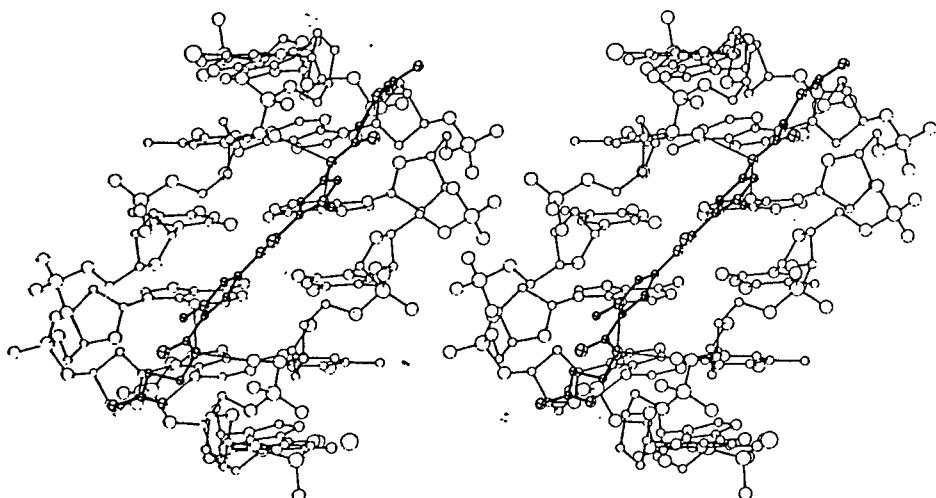


図 3 1 netropsin : DNA複合体のX線結晶構造⁵²⁾

は、極端に歪められることなくB型を保っている。

これらの機構にヒントを得て、筆者は図32に示すような2組の水素結合によるBLMのDNA塩基認識メカニズムを考案した。すなわち

[1] 第一の水素結合。BLMのbithiazole N3/N3' とDNAのG-C2NH₂の間の水素結合で、グアニン塩基を認識する。

[2] 第二の水素結合。BLMの末端アミン残基のamide NH (今回の場合、G-δNH) と、DNAのPy-C2Oの間の水素結合で、2番目のピリミジン塩基を認識する。

[3] BLM末端の正電荷は、DNAのリン酸骨格と静電的に相互作用して、安定化に寄与する。

というものである。

また、BLMとDNAの相互作用には、BLMの配位子部分にFe²⁺、Zn²⁺などの金属イオンが必要であることから、配位子部分全体の正電荷も、DNAとの相互作用に間接的に関与している可能性がある。

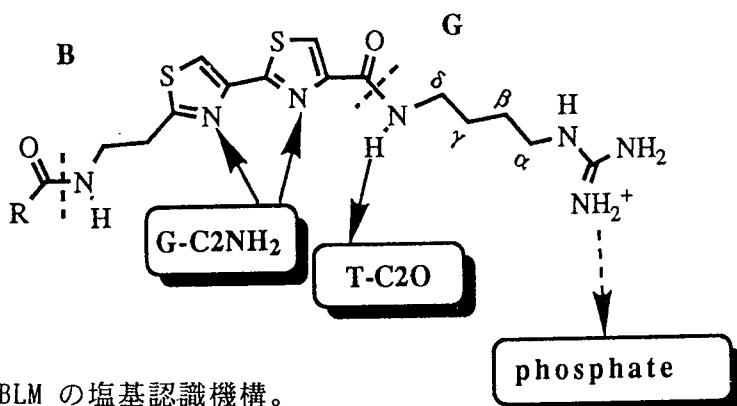


図32 BLMの塩基認識機構。

実線矢印は水素結合を、点線矢印は静電的相互作用を示す。

3-2 BLMによるG塩基の認識機構

筆者はBLMによるG塩基の認識機構として、ビチアゾール環のN3/N3' と G-C2NH₂ 間の水素結合による認識を考えた。この説は現在までに次のような知見から、考察・支持されているものである。

[1] BLMのビチアゾール環部分を光反応により異性化したBLMアナローグ（図33）でも、DNA切断反応の配列特異性に差が見られない

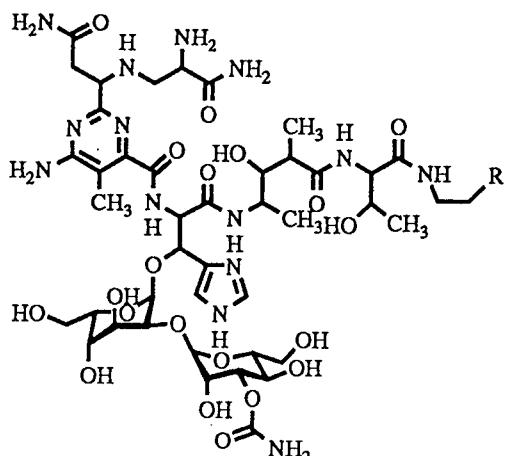
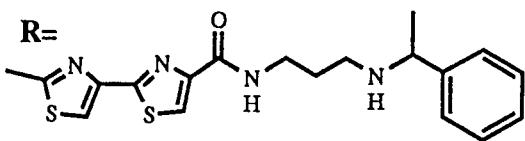


図 3 3 光異性化 BLM ⁵³⁾



PEM

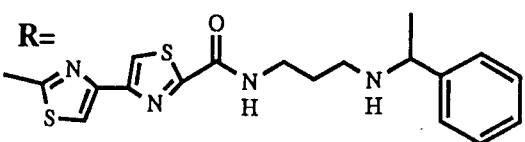
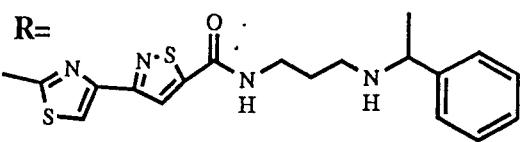


photo PEM



lumi PEM

こと。⁵³⁾

[2] DNA の G 残基を I 残基 (inosine) に置換すると、DNA 切断効率が低下すること (図 3 4 A)。^{45, 46)}

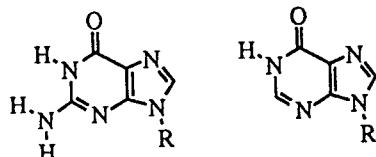
[3] Anthramycin による DNA の G 塩基の修飾 (図 3 4 B) により、BLM の切断が顕著に阻害されること。¹⁶⁾

[4] DNA の A 残基を 2-amino-A に置換すると、それまで切断の見られなかった A-ピリミジン部位で切断が見られるようになること (図 3 4 C)。⁴⁶⁾

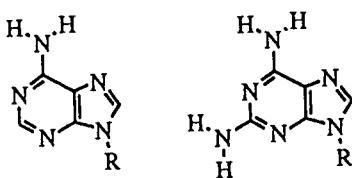
しかし今回筆者が観測した NMR 実験の結果からは、この水素結合の存在を証明することはできなかった。例えば、表 5 C のように、BLM-V0³⁺ が結合した時の GT-12 : G9 のイミノプロトンおよび塩基部プロトンの化学シフトは、ほとんど変化していない。G9H8 には、BLM の添加にともない若干のシグナルのブロード化が見られるが、他のシグナルのブロード化と比較しても、有意な差ではない (図 1 8)。

これについては、次のように説明される。まず最大の原因は、グアニンの 2 位のアミノプロトンが NMR によって直接観測できないことである。通常プリン塩基のアミノ基 (G-C2NH₂ / A-C4NH₂) のプロトンシグナルは、N-C 結合間の回転、および溶媒との交換速度が速いことなどから、SS 1-1

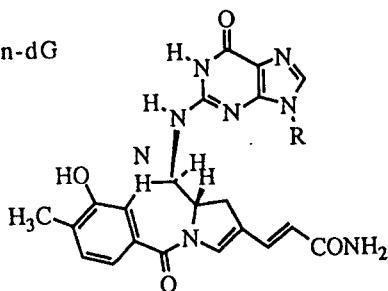
A

Guanosine \Rightarrow Inosine

C

Adenosine \Rightarrow 2-Amino-adenosine

B

Anthramycin-dG
adduct図34 Gの2位アミノ基の重要性を示す実験例。^{16, 46)}

A, BではBLMの切断性が低下する。Cでは上昇する。

のようなパルスを用いたH₂O中の測定でも観測できない。またG塩基上の観測可能なプロトン(G-N1H / G-H8)は、図10から明白なように、問題としているG-C2NH₂から3結合以上離れている上に、マイナーグループに直接面しているわけではないため、G-C2NH₂上での水素結合の影響がそれらの化学シフトにほとんど反映されないことも理解できる（註）。

（註）筆者は、このG-C2NH₂上の水素結合を本質的に証明するためには、グアニンの2位アミノ基を選択的に¹⁵Nで標識したサンプルを用いて、¹⁵N NMRの測定による研究を行うことが最も効果的であると考えている。近年、生体高分子の構造と機能解明のために積極的に¹³C、¹⁵Nで標識を導入したNMRサンプルを用いた手法が急速な進歩を遂げた。事実、蛋白質のNMRの分野では、¹⁵Nでenrichした最小培地で大腸菌を培養して蛋白質を産生させることで大幅なコストダウンが進み、この手法が広く一般化された。一方DNAへの応用は合成コストの問題があるため応用例が少ない。この分野での今後の一層の進歩が望まれる。

3-3 ピリミジン塩基の認識機構

BLM は G- δ NH と、DNA のピリミジン塩基の C20 カルボニル酸素の間で水素結合を形成して、2番目のピリミジン塩基の分子認識を行っている。筆者が、今回の実験で観測したイミノプロトン T10N3H および、BLM のアミドプロトン G- δ NH の大きな化学シフト変化は、この水素結合の生成を強く示唆している。

既に述べた様に、BLM はまず第一に G 塩基を認識して、GpC 配列および GpT 配列を双方とも同程度によく切断する。¹¹⁾ T でも C でも、マイナーグループ側には同じ位置に 2 位の酸素があるので、この機構は BLM の配列特異性をよく説明する。

さらに、BLM は前後の塩基配列の関係次第では、GpA 部位や GpG 部位でも切断を行うことがある。これは BLM の DNA 切断反応は活性酸素種という反応性の高い分子種を活性本体としているため、本来 2 組存在すべき水素結合の一方が不完全であっても、効率は低いが切断は起こりうると考えられる。

ところで、このような薬物側のアミド基（プロトンドナー）と、DNA の T-C20 や A-N3（プロトンアクセプター）との間の水素結合が、いろいろな薬物で実際に確認されていることは既に述べた（図 30）。このうち NMR でもよく研究されている netropsin^{54), 55)}、distamycin⁵⁶⁾、lexitropsin⁵⁷⁾ の例について、それぞれの化学シフトの変化について比較検討して見た（図 35）。

まず T のイミノプロトンについては、これらのマイナーグループ結合性薬物が結合した際に、大部分は大きな低磁場シフトを示すが、一方い

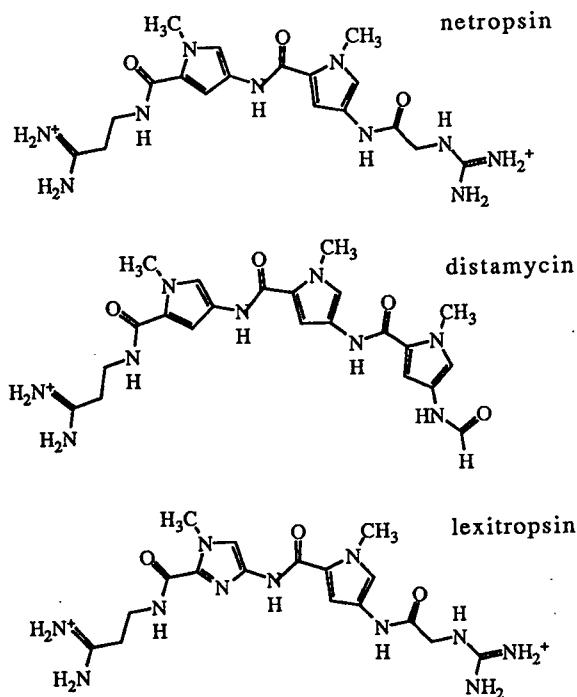


図 35 NMR でよく研究されているマイナーグループ結合性薬物

くつかのプロトンは高磁場シフトを示す。これらのDNA 結合性薬物は、BLM に比べて2オーダー程度DNA との結合定数が大きく、またイミノプロトンのみならず他の非交換性プロトンにもしばしば大きな化学シフト変化が観測されている。これらのことから、DNA の構造変化が起こっているものと思われる。またこれらのマイナーグループ結合性薬物は、いずれもA-T tract に対してbifurcated hydrogen bondを形成している。薬物の結合に対するイミノプロトンの化学シフトの変化の方向に統一性がないのは、これらのことが複雑に影響しているせいであろう。

一方、薬物側のNHプロトンの変化については、あまりよくわかっていない。これはとりわけDNA の結合していない状態での、薬物のアミドプロトンが、DNA との結合を見る時と同じ条件で測定されていないため、比較できないからである。

第四節 BLM-DNA 相互作用モデルの構築

前節において、筆者は二組の水素結合によるBLM の塩基認識機構を提案した。しかしこの機構によるBLM-DNA 相互作用が（1）立体化学的に無理がないか、（2）実際にBLM がDNA を切斷することを説明できるか、（3）今までに知られているBLM のさまざまな性質を説明できるか、ということを検討する必要がある。筆者はコンピューターグラフィックスの助けを借りて、BLM-DNA マイナーグループ結合の3次元モデルを構築したところ、こうした条件を満足するモデルを得ることができた。

4-1 モデル構築の根拠

今回の分子モデル構築の目的は、単にBLM-DNA 結合領域のみならず、活性中心である配位子部位についても、DNA の配列特異的な切斷が可能な立体的条件を満たすかどうか、調べることにある。そこで筆者は、モデル構築の際に満たすべき条件として、次の4つの条件を設定した。

- [1] BLM のB-N3/N3' とDNA のG-C2NH₂ は水素結合している。
- [2] BLM のG-δ NHとDNA のT-C2O は水素結合している。

[3] BLM の末端アミン残基（今回は δ -aminobutylguanidinium 基）は、マイナーグループの中で、DNA のリン酸と静電的に相互作用している。

[4] BLM の配位金属は、切断を受けるTのH4'の近傍に位置している。これらの条件のうち、[1]、[2]は前節で、[3]は第二章第四節で詳述した。ここでは[4]の条件について説明する。

BLM のDNA 切断は、スーパーオキサイドラジカルによるH4' 引き抜きにより開始されることが知られている。^{43, 44)} すなわち図36に示したように、BLM が発生した活性酸素種がDNA のマイナーグループ側にある、デオキシリボースH4' を引き抜き、その後酸素分子の付加などを経て、最終的にDNA 鎮が切断され、3'末端にグリコール酸リン酸エステルを持つ精製物が観察される。ところで通常のラジカル分子種によるプロトンの引き抜きは、そのプロトンの酸性度の順に、より酸性度の高いプロトンが引き抜かれやすい。DNAにおいては、H1' が酸性度が高いことがしられていて、実際、 Fe^{2+} -EDTA- H_2O_2 、 Cu^{2+} -1,10phenanthroline- H_2O_2 といった試薬ではH1' 引き抜きによる切断生成物が観測されている。

またこれらの系では、radical diffusion が観察される。例えばDervanらが設計した図 37 のような分子では、二本鎖DNA の両側のstrandで薬物

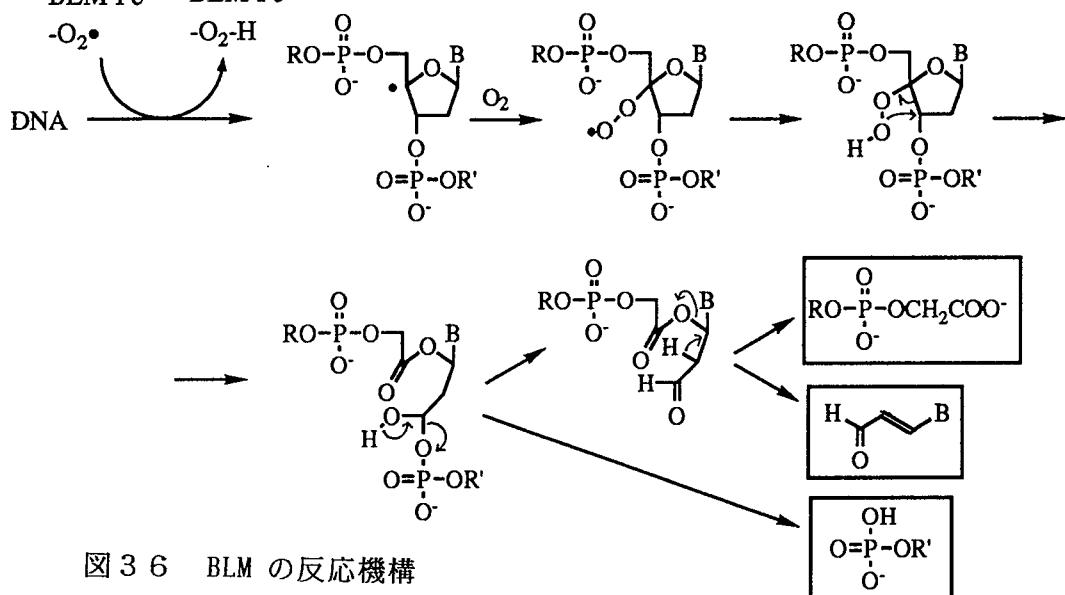


図36 BLMの反応機構

が結合した部位の前後 2~3 塩基にわたって切断が見られる。⁵⁸⁾ これは BLM の活性化した活性酸素種が、その発生源から拡散したためと考えられる。

これらを考慮すると、BLM の H4' 引き抜きによる切断は特殊である。また BLM では radical diffusion は見られない。これらの現象は、BLM から発生した活性酸素が、ほかの部分に拡散する前に DNA と反応する、いいかえれば BLM の活性中心が DNA の H4' の近傍にあると考えるとよく説明できる。これが筆者がモデル構築に際し、[4] の条件を加味した理由である。

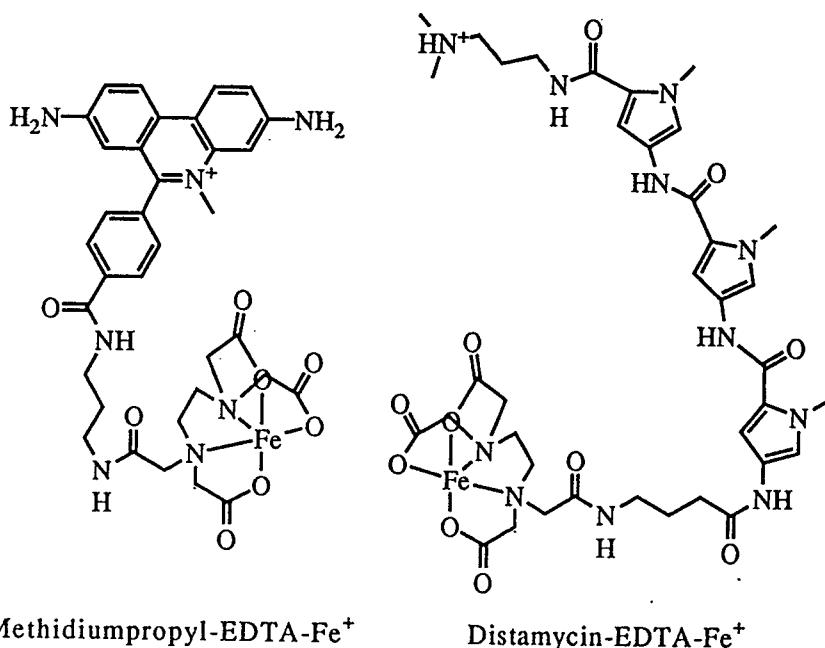


図 37 BLM をモデルとした人工DNA 切断分子

4-2 BLM-DNA マイナーグループ相互作用モデルの詳細

筆者は前記 4 つの条件を満たす BLM の DNA マイナーグループ結合モデルを、ワークステーション TITAN 上で、プログラム "MOLGRAPH" を使用して作成した。

BLM の結合する DNA としては、NMR 実験に用いた GT-12 配列をもつ理想的な B 型 DNA 構造を、Arnott らのパラメーターを用いて作成した。⁵⁹⁾

図 38 には、BLM-DNA 相互作用モデルの全体像を示した。GT-12 の B 型

DNA（緑色の分子）にBLM（水色の分子）が2分子結合している。それぞれの部位に結合したBLM分子同士は互いにduplexの反対側を向いているため、立体的な反撥はおこらないと考えられる。また前節で考察したように、BLMのDNA結合領域は他のマイナーグループ結合性薬物と分子の大きさ、形状が似通っていて、実際のB型DNAのマイナーグループに無理なく結合し、グループ内で疎水的にも安定化されていることがわかる（なお同じ方向から描いたball and stickモデルの立体図を、図4に掲載した）。

図39は、DNA結合領域および配位子領域の周辺を拡大して、2組の水素結合による塩基認識機構の詳細を示した図である。図中にはBLMにより特異的に認識されるG9および、切断部位であるT10の塩基が示してある。またBLMとDNAの分子間の二組の水素結合は点線で示した。Fe²⁺原子およびBLMによって攻撃されるT10のC4'原子は、それぞれ矢印で示した。筆者のモデルでは、図のようにBLMの配位子部位が、酸素を配位する第6座の配位座をDNA側にむけて、C4'のほぼ正面約5Åのところに位置させてある。このような位置関係であれば、BLMが発生した活性酸素種は、他の位置に拡散することなくH4'のみを攻撃すると考えられる。

図40は、GT-12分子に、BLMが1分子だけ結合した状態の図を、DNAのらせん軸の方向から見下ろしたものである。図中、BLM分子を太線で描いてある。BLMのビチアゾール環～ブチルグアニジニウム残基の領域が、DNAのマイナーグループにはまりこみ、一方非常に立体的にかさ高い配位子部分はDNA糖～リン酸骨格のすぐ外側に位置していることがわかる。

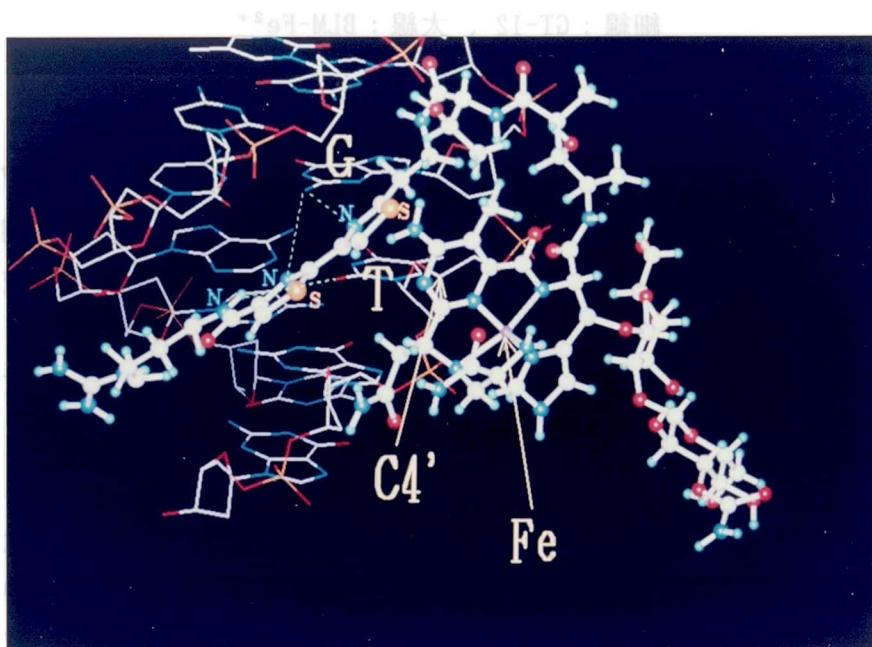
このように、BLM分子はB型DNAに立体的に無理なく結合できることができた。これはBLMが結合した際にDNA側の構造変化が全く見られなかつたという筆者の実験結果ともよく合う。

なおこのモデルでは、BLMの二つの糖残基を、DNAとの相互作用に邪魔にならないような位置に配置した。なぜなら糖のコンフォーメーションに関する構造的な情報が、モデル構築に際して得られなかつたからである。またペプチド部分、とりわけビチアゾール環と配位子部分をつなぐ『リンカ一部分』、methylvalerate(V)残基とthreonine(T)残基のいくつかの結合角には、ある程度の自由度がある。しかし現段階ではBLMのみの構造に対



図 3 8 BLM の DNA マイナーグループ結合モデル（上・全体図）

図 3 9 塩基認識機構の拡大図（下）



しても、BLM・GT-12 複合体の構造に対しても、エネルギー最適化などの計算は行っていない。

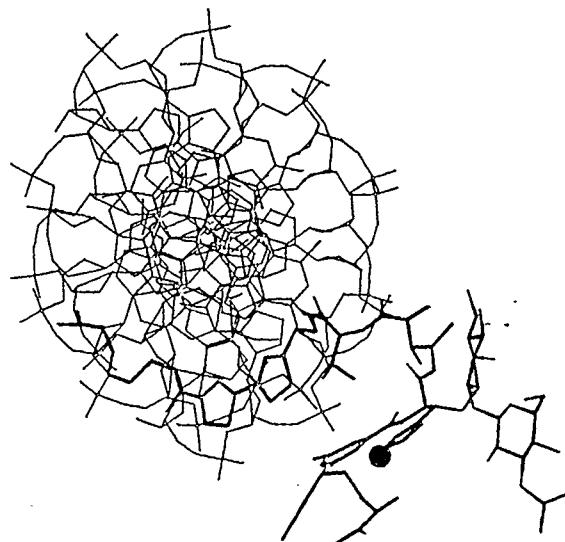


図40 BLM-DNA 結合モデルをらせん軸方向に見下ろした図
細線：GT-12、太線：BLM- Fe^{2+}

4-3 他のマイナーグループ構造モデルとの比較

BLM は長い間インターラーカーだと信じられていたが、二つのグループが早くから BLM がマイナーグループに結合する可能性を指摘し、相互作用モデルを提出している。ここでは筆者の提出したモデルとの比較を行う。

Dickerson は、1986年に BLM が DNA のマイナーグループに結合している予想図を、文献 15 の中で発表している（図41）。

Dickerson は netropsin-DNA 複合体の X 線結晶構造解析を根拠に、図30 に示したような他のマイナーグループと BLM の DNA 結合領域の比較から、BLM のマイナーグループ結合を予想した。しかし文献 15 の中では BLM-DNA 間の水素結合による分子認識機構についてはなんら言及していない

い。

一方、国内では京都大学の杉浦らのグループがBLMの化学的および分光学的研究から、1987年に図42のようなモデルを発表した。¹⁶⁾彼らのモデル構築は、[1] グアニンの2位アミノ基のanthramycinによるアルキル化によるBLM切断効率の低下（前節3-2を参照）と、[2] BLM錯体のESR測定から、配位金属とピチアゾール環部分の相対距離が近いという知見から、⁶⁰⁾ BLM構造中に何らかの折れ曲がり構造が存在すること、の2つの根拠に基づいている。またBLMとDNAの分子認識機構についてはBLMのG-N3/N3' と G-C2NH₂ の水素結合を提案している。一方二組目の水素結合——すなわちピリミジン塩基の認識機構については言及していない。

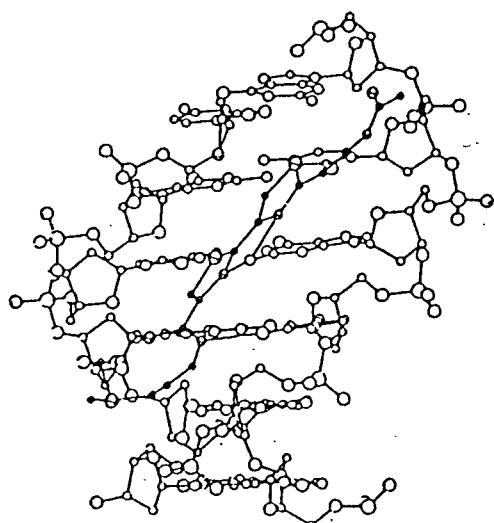


図41 Dickersonのモデル

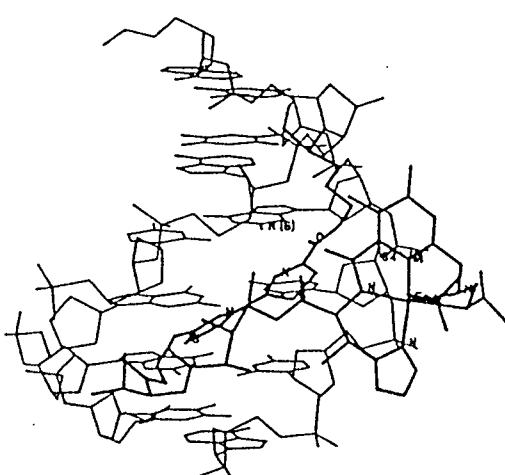


図42 杉浦らのモデル

図43には筆者のモデルの同じ方向からの書き出しを示した。図中太線がBLMであり、Fe²⁺、切断部位T10のC4'を矢印で、二組の水素結合を点線で示してある。

DNA結合部位に限っていえば、Dickersonの予測したモデルは筆者のモデルとよく似ている。特にDNAに相互作用するときのペプチド鎖の分子の方向は同じである。

一方杉浦らのモデルでは、G塩基の認識機構は同じであるが、DNAの切

断部位（2番目のピリミジン）に対するBLMの分子の方向が正反対となっている。これは杉浦らが2番目の塩基の認識機構について、実験的なデータを持ちあわせなかつたからであろう。しかし細部における違いはあるものの、BLM分子がV残基、T残基の部分で大きく折れ曲がるということは筆者のモデルとも共通する特徴である。なお彼らは、このコンパクトに折れ曲がった構造を「U-form」構造と命名している。この折れ曲がり構造については、次節で検討する。

第五節 考察

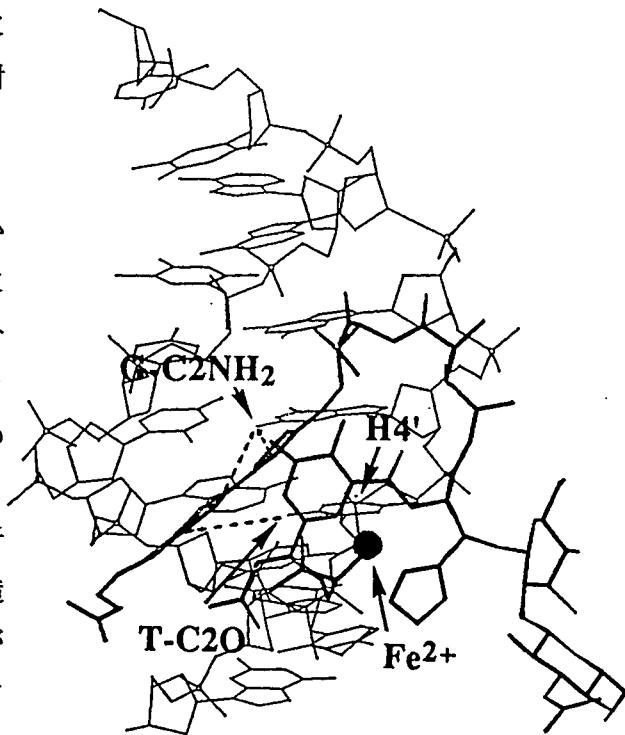


図4 3 筆者のモデル

筆者が構築したBLM-DNA結合モデルは、BLMの塩基特異性や4'プロトンの引き抜き反応といった化学的性質や、筆者の得たNMR等の分光学的データに見られるような物理化学的性質を、合理的に説明する。同時に、今までの仮説では説明できなかつたいくつかの問題点についても光を当てるものとなった。ここではそれらについて考察する。

5-1 BLMの折れ曲がり構造

モデル構築の過程で、BLMがG-ピリミジン配列をそのビチアゾール～末端アミン部分で認識して、ピリミジン残基のH4'を攻撃するためには、そのペプチド鎖がmethylvarelate(V)～threonine(T)残基部分でコンパクトに折れ曲がる（U-Form構造）必要性が明らかにされた。筆者はこのことを念頭に、もう一度BLM-DNAの相互作用におけるNMR実験の結果を検討し

た。

図44はモデルからBLM部分のみを抽出した図である。BLMがDNA(GT-12)と結合する際に生じた、BLM由来のプロトンの化学シフト変化(図27および図28)から、DNA結合領域とは別に、V残基～T残基のペプチド主鎖周辺に、小さな変化が集中していることがわかる。これは、図45でBLMがU-Form構造をとったときの「曲がり」の部分にちょうど対応している。筆者は、この部分に生じた化学シフトの変化が、BLMがDNAに結合した際のBLMのコンフォメーション変化を反映しているものと考えた。

表7には、合成BLMアナローグによる、V～T残基部分の変換体の構造活性相関を示した。⁵⁾この結果はDNAとの結合定数を直接観察したものではないが、V～T領域の3つのメチル基や水酸基が、BLMのDNA切断活性に少なからぬ影響を持つことがわかる。一方、立体障害が少なく分子の自由度が高いと思われるアナローグのDNA切断活性が低いことは、BLMのV～T残基部分の、ある特定のコンフォーメーションがその活性に必要であることを示唆している。

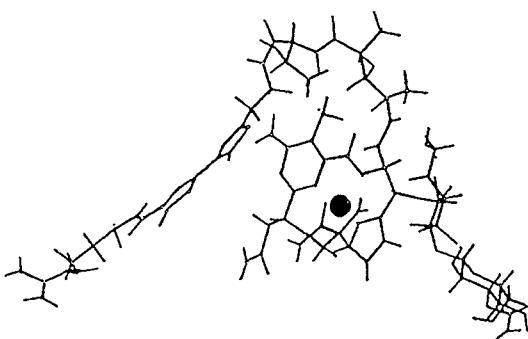


図44 BLMのモデルからの抽出図

5-2 BLM系抗生物質に属する他の薬物の性質

BLMと構造が極めて類似した他の抗生物質としてはphleomycin(PhLM)および、tallysomycin(TLM)が知られている(図45)。⁶¹⁻⁶⁷⁾

PhLMは、BLMと全く共通の母核構造を有しておりBLMのビチアゾール環が Δ^2 -thiazolin-4-yl-thiazoleに還元された形となっているのが特徴である。PhLMは、BLMとほぼ同じ塩基特異性でグアニン塩基特異的にDNAを切断する。^{62、63)}またその生物活性も、グラム陽性菌、グラム陰性菌に対

合成アナログの構造とブレオマイシンに対する相対的活性

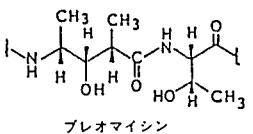
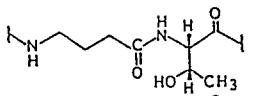
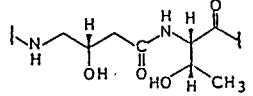
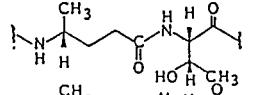
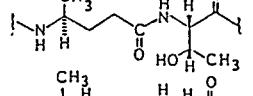
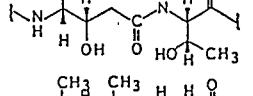
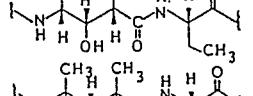
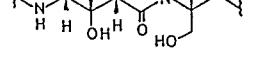
| | 枯草菌に対する活性 | HeLa 細胞に対する活性 | DNA 单鎖切断活性 |
|--|-----------|---------------|------------|
|  | 100 | 100 | 100 |
|  | 0 | 12 | 20 |
|  | 11 | 12 | 20 |
|  | 16 | 13 | 200 |
|  | 0 | 12 | 20 |
|  | 100 | 29 | 100 |
|  | 52 | 20 | 100 |
|  | 90 | 70 | 100 |

表7 合成BLMの構造活性相関

し細胞毒性を持ち、抗腫瘍作用もあることが報告されている。⁶⁴⁾

PhLMは構造的にインターラーカーーとは考えにくいので、従来説である『BLM = インターカレーター』説では、両者の塩基特異性が同じであることは説明できない。

筆者の提案したマイナーグループ側からの水素結合による塩基認識機構は、PhLMの塩基特異性についても同じメカニズムで合理的に説明できる。なぜならPhLMでも還元されたthizolinyl-thiazole部分は、若干の親和性の低下はあるにせよ、プロトンアクセプターとして機能しうると考えられるからである。

またTLMも母核構造はBLMとほぼ同じである。V残基(4-amino-3-

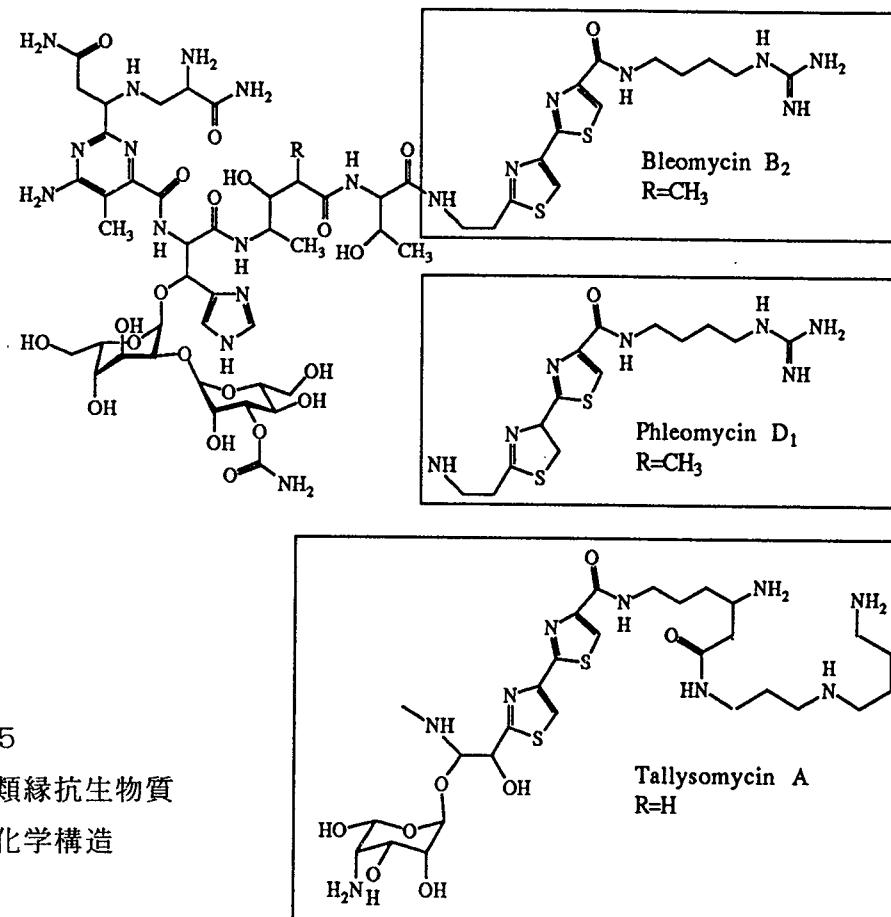


図 4 5
BLM 類縁抗生物質
の化学構造

hydroxy-2-methyl-n-valeric acid)の2-methyl基がなくなり、またB 残基の2-aminoethyl基部分が、2-amino-1,2-dihydroxyethyl基となっている。さらにその2位水酸基に付加的に、4'-amino-4',6'-dideoxy-L-talose が結合している。TLM のin vitroでのDNA 切断効率はBLM の10~30% 程度であるが、⁶²⁾一方in vivo 活性はBLM よりも1オーダーほど高い（これは細胞へのとり込み効率によると考えられる）。さらにDNA 切断の塩基特異性は、BLM とほぼ同様にG-pyrimidine部位を効率よく切断する。⁶⁷⁾

黒田らが提案しているビチアゾール誘導体のインターラーションモデルは、TLM のtaloseのような大きな立体障害のあるビチアゾール環には適用できない。一方、筆者のモデルでは、taloseが付加する位置は、BLM の「U-Form」構造のターン部分に位置して、DNA のマイナーグループの外側

を向く。従ってこの位置に、親水性の高いアミノ糖が結合することで、曲がり構造が安定化される可能性がある。あるいはアミノ糖とDNAの糖リン酸部分の静電的相互作用や水素結合も考えられる。このように、TLMとBLMが同じ塩基特異性を持っていることも、筆者のモデルでは矛盾なく説明できる。

5-3 「BLM = partial intercalation 説」についての考察

ところで、筆者とほぼ同様の実験の戦略を用いて、BLMとDNAオリゴマーの相互作用を研究しているGamcsikらの報告についてここで考察する。⁴¹⁾

彼らはBLMのビチアゾール環プロトン(C5H / C5'H)の高磁場シフトを観測しているが、そこから「BLM = partial インターカレーター」という、筆者とは異なる結論を導いている。

ところで、彼らの使用した実験系と筆者の実験系では、次の点が本質的に違っている。

- [1] BLM-Zn²⁺を使用している。
- [2] DNAにd(CGCGCG)という6merを使用している。
- [3] DNAのイミノプロトン、BLMのアミドNHプロトンなどの、交換可能なプロトンの変化を観測していない。

これらの実験から、DNA側の塩基部プロトン、H1'およびBLM側のビチアゾール環プロトン(C5H / C5'H)の最大0.24 ppm程度の高磁場シフトを観測している。またG:C塩基対の環電流効果を計算して、図46のようなpartial intercalationモデルを提出している。しかしこの実験にはいくつかの問題がある。

まず筆者が今回BLM-Zn²⁺を実験に使用しなかった理由は既に述べた(第一章第一節脚註)。またGamcsikが使用したヘキサヌクレオチドは、以前当研究室志田らが明らかにしたように、⁴⁴⁾2カ所のGpCサイトでそれぞれ切断を受ける。従って、BLM-DNAの相互作用を見る時に両者のstoichiometryが確定できないため、BLMの塩基特異的な結合に関して議論できない。

またd(CGCGCG) duplexは、BLM 分子の大きさに比較して小さく、そのT_mも低い。彼らがモデル構築の根拠としているG2、C5、G6のプロトンの大きな化学シフト変化は、BLM-DNA 相互作用の影響というよりもむしろ、BLM 添加に伴うDNA のduplex末端での不安定化に起因する実験的なartifactであると考えられる。

さらに最大の問題点は、彼らの計算結果（図46）と彼らのが主張している結論（BLM = partial intercalation）が一致していないことである（図からはマイナーグループ結合にしか見えないのである）。

これらの事情から、筆者のデータおよびBLM・GT-12 複合体モデルは、Gamcsik らの議論に対して十分反論することができ、彼らの導いた結論を覆すことができると確信している。同時に、BLM-DNA 相互作用を研究する上で、実験系を構築することの重要性が、あらためて明らかにされたといえる。

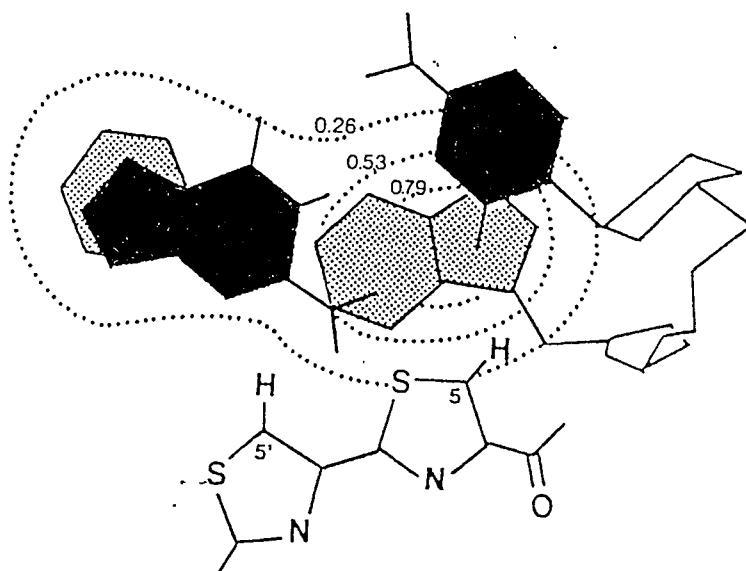


図46 Gamcsik らの"partial intercalation" モデル⁴¹⁾

第三章 BLM のマイナーグループ結合モデルの検証 ……DNA の立体構造からのアプローチ

筆者の構築したBLMのDNAマイナーグループ結合モデルは、既知のBLMの性質のほとんどを矛盾なく説明できる。ところで、当研究室の中山らは、BLMのモデル基質となるDNAオリゴマーの配列を探索する過程で、一つの興味深い配列を発見している。それはd(GGGGAGCTCCCC) (以下GA-12と略す) という配列で、BLMにより本来よく切断されるはずのG6pC7部位よりも、むしろマイナーサイトであると考えられるG4pA5部位で、効率よく切断されることが示されたのである。

ここで筆者は、GA-12が分子前半にプリン塩基、後半にピリミジン塩基が連続するという特徴的な配列であることに注目して、このBLMによる切断性の異常がDNA:GA-12の持つ何らかの立体構造上の特徴に由来するのではないかという仮説を立てた。第二章までで明らかにしたように、BLMがDNAに結合する際にはDNAの立体構造はほとんど変化しないので、この仮説は妥当である。そのうえで、このDNAの詳細な立体構造を検討すれば、BLMによる2番目の塩基-ピリミジン塩基の認識機構を解明できると考え、実験を行った。

他方、GA-12のもつ特殊な性質は、DNAの塩基配列に依存した立体構造の差異という観点からも興味深い。近年、分子生物学および生物物理学の進歩により、生体内のさまざまな機能は、DNAとその塩基配列を厳密に認識して結合する蛋白質によって調節されていることが広く明らかになった。⁶⁸⁾ 塩基配列に依存したDNAの構造（動的構造も含めて）は、薬物-DNA相互作用のみならず、このような遺伝子の機能調節を担う分子論的な基礎となるものである。

筆者は、GA-12の溶液中の立体構造を、2次元NMRの解析および束縛分子動力学計算(restrained molecular dynamics)の手法で明らかにするというアプローチを用いた。そして前章で構築した筆者の『BLM-DNAマイナーグループ結合モデル』が、GA-12で観察されたG4pA5部位における効率

の良い切断を説明できるかどうかについて検討した。これは、筆者の提出したモデルが正しいかどうかを、新たに検証することにほかならない。

第一節 GpA 部位で切断を受けるDNA オリゴマー(GA-12) の性質

中山によって初めて合成されたDNA配列、GA-12 : d(GGGGAGCTCCCC) が BLM によって、本来ならばマイナーであるはずのG4pA5 部位で優先的に切断を受けることは既に述べた。ところで、この配列は見方を変えれば、d(GGGGGGCCCGCC) (以下G₆C₆と略す) のうち、一カ所だけA:T 塩基対に置換したアノログである、と考えることができる。このG₆C₆という配列は、通常は溶液中ではB型として存在するが、塩濃度を徐々に上げていくと、比較的低い塩濃度でB型DNA からA型DNA に転移することが知られており、『B^Atype』というサブファミリーに分類されている。⁶⁹⁾

筆者はまず、BLM による異常な切断性がGA-12 およびG₆C₆に共通な配列のモチーフに由来し、通常のB型とは異なった立体構造に起因すると考えた。そこで、GA-12 と塩基組成の等しい配列でやはりG₆C₆配列に1カ所だけA:T 塩基対を導入したGA'-12 : d(GG-GAGGCCTCCC) というDNA を合成して、BLM による切断性を行った。表8には、それらの配列および略号を示した。また図47には、GA-12 のナンバリングシステムを示す。

| Abbreviation | Sequence |
|--------------|-----------------|
| GC-12 | d(CCCCAGCTGGGG) |
| GA-12 | d(GGGGAGCTCCCC) |
| GA'-12 | d(GGGAGGCCTCCC) |

表8 合成DNA の塩基配列 (太字はBLM で切断される部位を、中ヌキ文字は切れにくくなった部位を示す。)

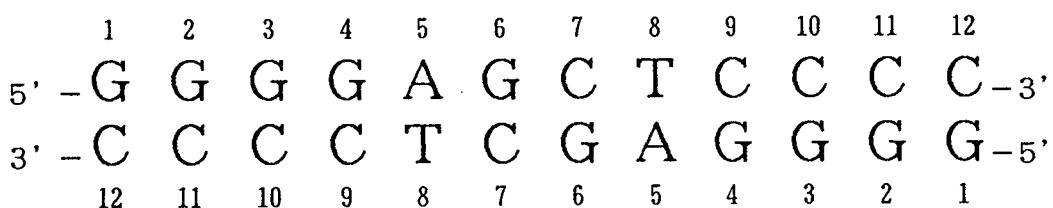


図 4 7 GA-12 のナンバリングシステム

1 - 1 切断実験

筆者は、切断実験を行うに当たって、GA-12、GA'-12 それぞれ単独での切断性を定量するだけではなく、標準的なDNAのある一ヵ所の部位を基準にした、相対的な強度を求めるなどを試みた。そして第一章で用いた GC-12 の G6pC7 部位における切断強度を基準にした、相対的切断性を調べる実験系を確立した。

一般に、一種類のDNA オリゴマーとBLM だけが入っている系での切断反応では、通常ではBLM の切断が起こりにくいマイナーサイトでの切断が強調された結果が得られることが多い。これはBLM の発生する活性酸素の反応性が高いためである。そこで筆者は、切断性を調べるDNA (GA-12, GA'-12) と、基準となるDNA (GC-12) を等モルずつ含む系での切断実験を併せて行い、それぞれのDNA の一方のみを選択的に標識することでGA-12 およびGA'-12の相対的な「切れやすさ」を定量した。

図 4 8 A には切断実験のポリアクリルアミド電気泳動による分析結果を示し、図 4 8 B には定量した各サイトの切断性を図解した。GC-12 およびGA-12 の主切断生成物については、中山によってそれぞれ d(CCCCAAG) pCH₂COOH 、 d(GGGG) pCH₂COOH が同定されている。他の切断サイトについてはゲル上の移動度から推定したものである。GA-12 単独での切断実験では (A: Lane 4) G4pA5 部位での切断は、GA-12 の G6pC7 部位より約4 倍切れやすくなっている。相対的な切れやすさでは、標準的な B 型DNA 基質である GC-12 の G6pC7 部位と比較しても1.3 倍程度切れやすいことが明らかになった (A: Lane 7, 8) 。

また筆者の予想通り、GA'-12においても、その中心のG6pC7 部位よりも

A

Lane 1-6:
単独での切断実験

Lane 7-10:
相対的切断強度の
定量

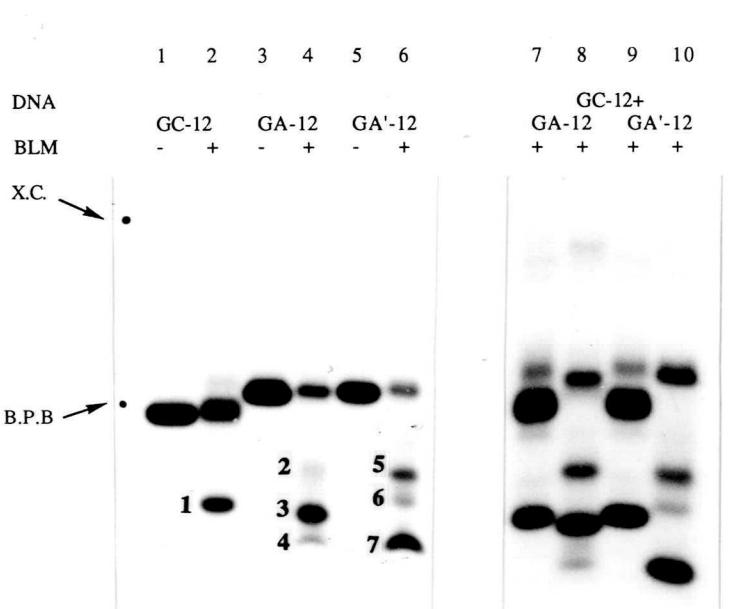
Lane 1, 2: GC-12

Lane 3, 4: GA-12

Lane 5, 6: GA'-12

Lane 7, 8:
GC-12 + GA-12,

Lane 9, 10:
GC-12 + GA'-12

**B**

GC-12: d (C C C C C A G C T G G G G)

4 3 2

↓ ↓ ↓

GA-12: d (G G G G A G C T C C C C)

7 6 5

↓ ↓ ↓

GA'-12: d (G G G A G G C C T C C C)

| 切断部位 | 単独での切断 | GC-12 + GA-12 | GC-12 + GA'-12 |
|------|--------|----------------|----------------|
| 1 | 51.1 % | 38.6 % (100) | 48.6 % (100) |
| 2 | 11.5 % | 25.6 % (63.6) | — |
| 3 | 45.3 % | 51.2 % (132.6) | — |
| 4 | 12.3 % | 18.1 % (46.8) | — |
| 5 | 20.6 % | — | 18.3 % (38.1) |
| 6 | 14.5 % | — | 13.6 % (28.0) |
| 7 | 42.6 % | — | 43.1 % (88.6) |

図 4.8 GA-12, GA'-12 の BLM による切断実験 A: 20 % PAGEによる分析

B: 各切断部位の定量結果 (括弧内は部位 1 に対する相対的切断強度)

G3pA4 部位での切断が優先した。GA-12、GA'-12 のG6pC7 部位は、どちらもGC-12 のG6pC7 部位に比べて、有意に切れにくくなっている。

この結果は、BLM の塩基認識が、DNA の配列特異的な立体構造によって変化しうることを系統的に示した最初の例である。GA-12 とGA'-12の二つの配列は構造的にも同じ特徴を有していることが強く示唆された。

1-2 CDスペクトルの比較

そこで筆者は、GA-12、GA'-12のCDを測定し、duplexの巨視的構造を検討した。DNA 分子において CDスペクトルは各塩基対間のstacking相互作用の累積として表されるため、A型、B型やZ型といったらせん構造の大きなファミリーを知る上で便利である。⁷⁰⁾

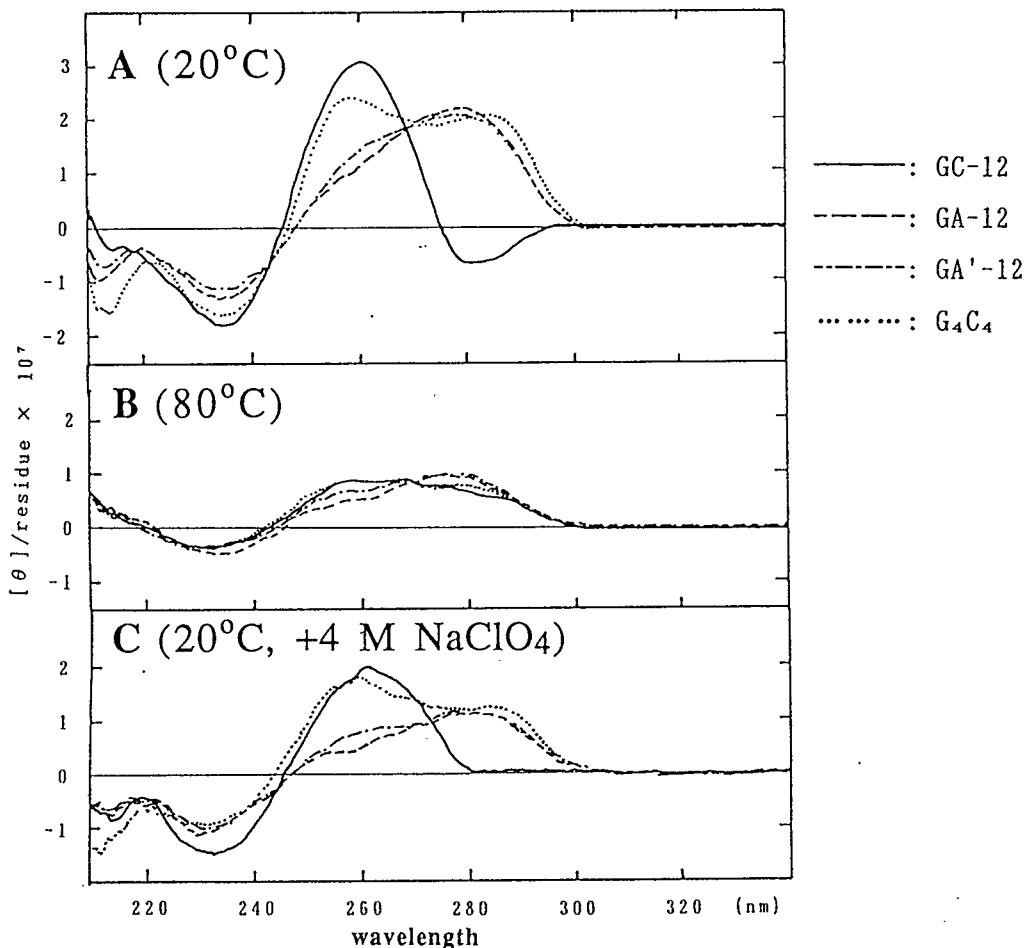


図 4.9 CDスペクトル A:20°C、B:80°C、C:20°C (+ 4 M NaClO₄)

図49は、それらのduplex状態(A、20°C)、一本鎖状態(B、80°C)、および塩濃度を上げた状態(C、20°C、4M NaClO₄)のCDスペクトルを示した。GC-12、GA-12、GA'-12は塩基組成が等しいため、一本鎖状態ではスペクトルのパターンはほぼ一致する。しかし二重鎖状態ではGC-12がほぼ標準的なB型構造のパターンを示すのに対して、GA-12、GA'-12は280 nmに極大を持つよく似た独特のパターンを示した。これは、ポリプリンーポリピリミジン接合部を有するDNAの特徴と考えられる。

参考までにd(GGGGCC) (以下G₄C₄と略す)のCDスペクトルを併せて測定したところ、 $\lambda_{\max} = 260\text{ nm}, 285\text{ nm}$ の二つの極大を持つ特徴的なスペクトルを示した。正のコットンバンドが260 nm～300 nmの広い領域にわたっているという点で、G₄C₄はGA-12、GA'-12によく似ている。G₄C₄は、溶液中ではB型、結晶中ではA型をとるDNAとして知られている。^{71, 72)}

当初筆者は、GA-12、GA'-12もG₄C₄と同様に、比較的低い塩濃度(～4M NaClO₄)でA型のDNAに転移するのではないかと予測した。しかし図49Cが示すように、このような条件ではB→A転移は観測されなかつた。

以上の結果より、

- [1] GA-12およびGA'-12は、duplex状態でB型構造のバリエーションのなかで、ある特徴的な立体構造をとっていること、
 - [2] その特徴的な立体構造は、この二つのDNAがBLMによって、
 - (a) 中心のG6pC7部位が切断されにくくなり、
 - (b) それぞれのGpA部位が切断されやすくなる、ことの原因となっていること、
 - [3] こうした特徴的な立体構造は、ポリプリンーポリピリミジン接合配列に由来するものであること、
- が強く示唆された。

第二節 GA-12の2D-NMRによる解析

筆者はGA-12およびGA'-12の詳細な立体構造を調べるために、それらの

オリゴマーを大量に合成し、2D-NMRによるプロトンスペクトルの帰属を行った。その結果、GA-12については一部の $5'/5''$ プロトンを除くすべての交換性、非交換性プロトンを帰属できた。一方、GA'-12については、水溶液中で少なくとも2系の異なる立体構造の間での平衡状態になっていることがわかった。この現象は、核酸の動的な挙動を研究するうえでは非常に興味深いが、スペクトルが複雑なため相関ピークを帰属することができなかった。

ここでは、GA-12のNMRスペクトルの解析について詳述する。

図50 GA-12 のNOESYスペクトル (30°C、混合時間 250 ms)

A: (H6/H8)-H1'領域 B: (H6/H8)-(H2'/H2'')領域

2-1 帰属

GA-12 のイミノプロトンおよび、cytosineのN4アミノプロトンは、観測パルスにSS11を用いた1D-NOE差スペクトル実験によって、定法に従い帰属した。またGA-12 の非交換性プロトンは、NOESY およびDQF-COSYのスペクトルを組みあわせることで、前述した「核酸の連鎖帰属法」を用いて帰属した（実験の部、一般的手法を参照）。^{54a, 73} 図50にはNOESY スペクトル（混合時間250 ms, 30°C）の"sequential NOE"領域（A : (塩基部 proton)-(H1')，B: (base proton)-(H2'/H2'')）を示す。

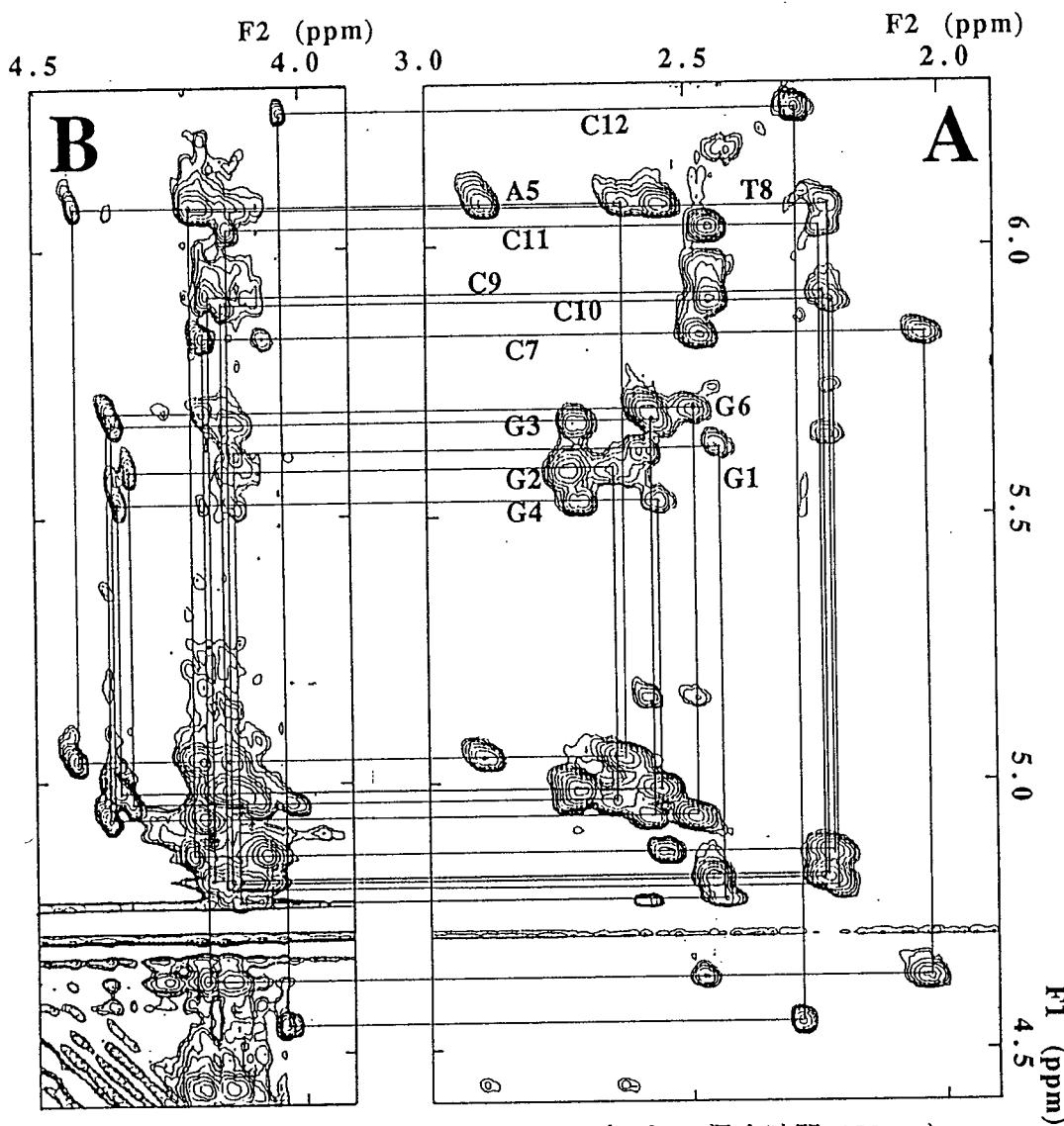


図51 GA-12 のNOESY スペクトル (30°C、混合時間 250 ms)

A: (H2/H2'')-(H1'/H3') 領域、B: H4'-(H1'/H3') 領域

1 duplex中に、G が 5 残基、C が 5 残基含まれる配列のため、とりわけ H2'/H2" 部分のシグナルの重なりが深刻であるが、両方の領域を併せて用いることで、問題なく帰属できた。図中には「連鎖帰属」の道筋を直線で示してある。

また deoxyribos の H3' および H4' は、H1' および H2'/H2" との糖の残基内 NOE を利用して、帰属した (図 5 1)。これらの帰属が正しいことは、同じ領域の残基内のスピン系の連なりを利用した、DQF-COSY スペクトルにより確認した (図 5 2 A)。

Table 9: Proton Chemical Shifts and Puckering Conformations of Deoxyribofuranose Rings for GA-12, at 30°C, pH 6.8 (ppm)

| base | H8/H6 | H2/H5/ | H1' | H2' | H2" | H3' | H4' | N1H/ N3H |
|------|-------|-----------------|------|------|------|------|------|-------------|
| | | CH ₃ | | | | | | |
| G1 | 7.80 | - | 5.62 | 2.41 | 2.56 | 4.77 | 4.15 | 12.70 |
| G2 | 7.77 | - | 5.57 | 2.63 | 2.71 | 4.96 | 4.31 | 13.15 |
| G3 | 7.57 | - | 5.84 | 2.55 | 2.68 | 4.97 | 4.33 | 13.05 |
| G4 | 7.66 | - | 5.52 | 2.57 | 2.70 | 4.97 | 4.35 | 12.77 |
| A5 | 8.01 | 7.70 | 6.08 | 2.61 | 2.88 | 5.04 | 4.41 | - |
| G6 | 7.56 | - | 5.68 | 2.48 | 2.58 | 4.91 | 4.35 | 12.84 |
| C7 | 7.30 | 5.15 | 5.82 | 2.02 | 2.47 | 4.61 | 4.17 | - |
| T8 | 7.44 | 1.54 | 6.07 | 2.21 | 2.54 | 4.81 | 4.20 | 13.90 |
| C9 | 7.54 | 5.65 | 5.92 | 2.21 | 2.45 | 4.81 | 4.16 | - |
| C10 | 7.52 | 5.65 | 5.89 | 2.17 | 2.45 | 4.80 | 4.15 | - |
| C11 | 7.59 | 5.72 | 6.05 | 2.21 | 2.47 | 4.82 | 4.14 | - |
| C12 | 7.69 | 5.85 | 6.23 | 2.28 | 2.28 | 4.54 | 4.04 | - |

| base | N4H ₂ ^a | H5'/H5" | puckering |
|------|-------------------------------|---------|-----------|
| G1 | - | 3.70 | c |
| G2 | - | 4.06 | C2'-endo |
| G3 | - | 3.96 | C2'-endo |
| G4 | - | 4.10 | C2'-endo |
| A5 | - | 4.19 | C2'-endo |
| G6 | - | 4.26 | C2'-endo |
| C7 | 7.95 | 6.42 | 4.05 |
| T8 | - | 4.06 | b |
| C9 | 8.40 | 6.82 | b |
| C10 | 8.45 | 6.82 | b |
| C11 | 8.55 | 7.01 | b |
| C12 | a | 3.54 | c |

^a Not observed because of terminal freying. ^b Not assigned.

^c Not determined.

表9 GA-12 のプロトン化学シフト

表9には、それらの帰属の結果を示した。

2-2 糖部パッカリングの解析

核酸の二重らせん構造において、その糖残基は”糖-リン酸骨格”を作り、らせん構造の全体を特徴づける重要な要素となる。一般に5員環であるデオキシリボースのフラノース環は、安定構造としてエンベロープ型コンホーメーションをとることが知られているが、B型DNAではC2'-endo / C1'-exoが、A型DNAおよびRNAではC3'-endoが一般的であり、その構造を規定している。³⁸⁾

図52Aは、GA-12のDQF-COSYの拡大領域を示した。また図52CにはGovilらの文献から、それぞれのパッカリングと対応するCOSYの交差ピーク観測のパターンを示した。

図中にワクで囲っているように、通常のC2'-endo / C1'-exoコンホーメーションでは観測されないH3'-H2"の相関ピークが、C7とC9の二つの残基で中程度の強度で観測された。

筆者が測定した2D-NMRのデジタル分解能(point resolution)はF2軸に対して4.88 Hz、F1軸に対して9.76 Hzである。糖部プロトンシグナルの線幅(約10 Hz)を考えると、このDQF-COSYスペクトル上で交差ピークが観測可能となる条件は、プロトン間のカップリング定数が約3 Hz以上となることである。⁷⁴⁻⁷⁶⁾ 従って、このC7およびC9の二つのデオキシリボースのパッカリングは、O4'-endoのコンホーメーションをとっていると考えら

Table 10: Theoretically Estimated Intrasugar Interproton Coupling Constants (J) for the Sugar Puckering (Hz)

| puckering | H1'-H2' | H1'-H2" | H2'-H3' | H2"-H3' | H3'-H4' | H2'-H2" |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| C2'-endo | 9.0 | 6.0 | 6.0 | 0.0 | 0.0 | -14.0 |
| C1'-exo | 9.0 | 6.0 | 8.5 | 0.0 | 3.0 | -14.0 |
| O4'-endo | 7.0 | 8.0 | 9.5 | 3.0 | 7.0 | -14.0 |
| C3'-endo | 0.0 | 7.2 | 6.0 | 9.5 | 9.0 | -14.0 |

表10 各パッカリングに対応するJの計算値

れる。表10には、計算により求められたそれぞれのパッカリングを持つデオキシリボースのプロトン間の結合定数を示した。⁷⁷⁾ Jamesらは、DNAのデオキシリボースのパッカリングと、対応するCOSYのスペクトルパターンのシミュレーションによる解析をプログラムSPHINXを用いて行っているが、⁷⁸⁾ 筆者の結果はそれら文献値ともよく一致する。

また、C2'-endoとC1'-exoのコンホメーションの区別は、図52Bに示した(H4')-(H3')の相関の有無を指標にして行った。C1'-exoのコンホメーションは通常、B型DNA中のピリミジン残基がとることが知られているが、³⁸⁾ GA-12ではC7、C9を除くピリミジンがこれに該当することがわかつた。表9には、これらの糖パッカリングの解析結果も併せて示した。

2-3 NOE の定量

一般にNOE情報に基づいた計算機による構造決定は、①NOEによるプロトン間距離情報と②カップリング定数から得られた結合の2面角の情報を用いて行われる。筆者はGA-12の非交換性プロトンのNOESYスペクトルから、NOE相関の距離の定量を行った。

NOEからの距離の算出には、混合時間100 msのNOESYスペクトルを使用した。これは、通常プロトンが近距離間に集まっている場合には、i番目のプロトンからi+1番目のプロトンを経由して、i+2番目のプロトンまで磁化が移動して、(i)-(i+2)プロトン間でNOEが観測されたり、一方(i)-(i+1)間のNOEが弱くなったりするという、スピン拡散(spin diffusion)が起こることを考慮したものである。このスピン拡散はとりわけ混合時間の長いNOESYでは頻繁に観察される。筆者は、このことに起因する距離算出の誤差を押さえるため、100 msの混合時間を選んだ。

ところで、NOEの強度は、プロトン間の距離の6乗分の1に比例することが知られている。二つのプロトン(i,j)間のNOESYの交差ピークの強度 $I_{i,j}$ およびプロトン間距離 $r_{i,j}$ の関係は、分子内で距離の固定されているプロトン間の距離およびNOE強度、 r_0 および I_0 に対して、

$$r_{i,j}^6 = \left(\frac{I_0}{I_{i,j}} \right) r_0^6 \quad (1)$$

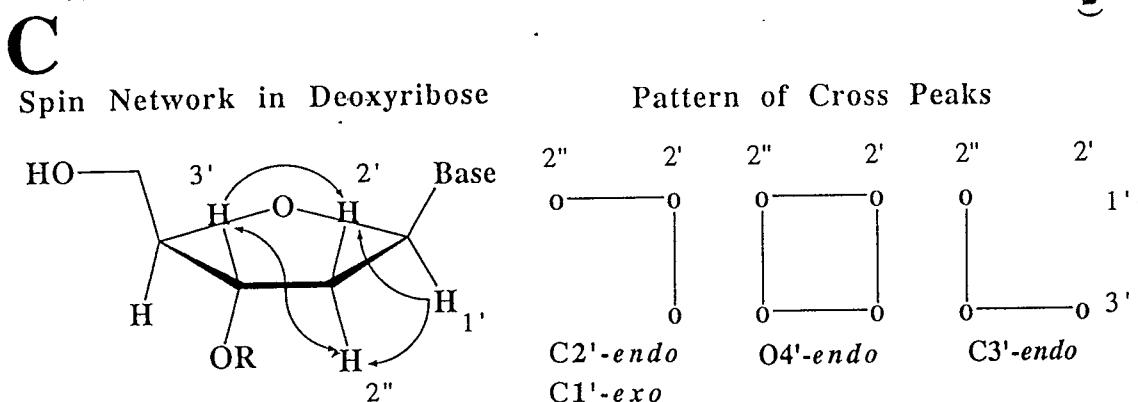
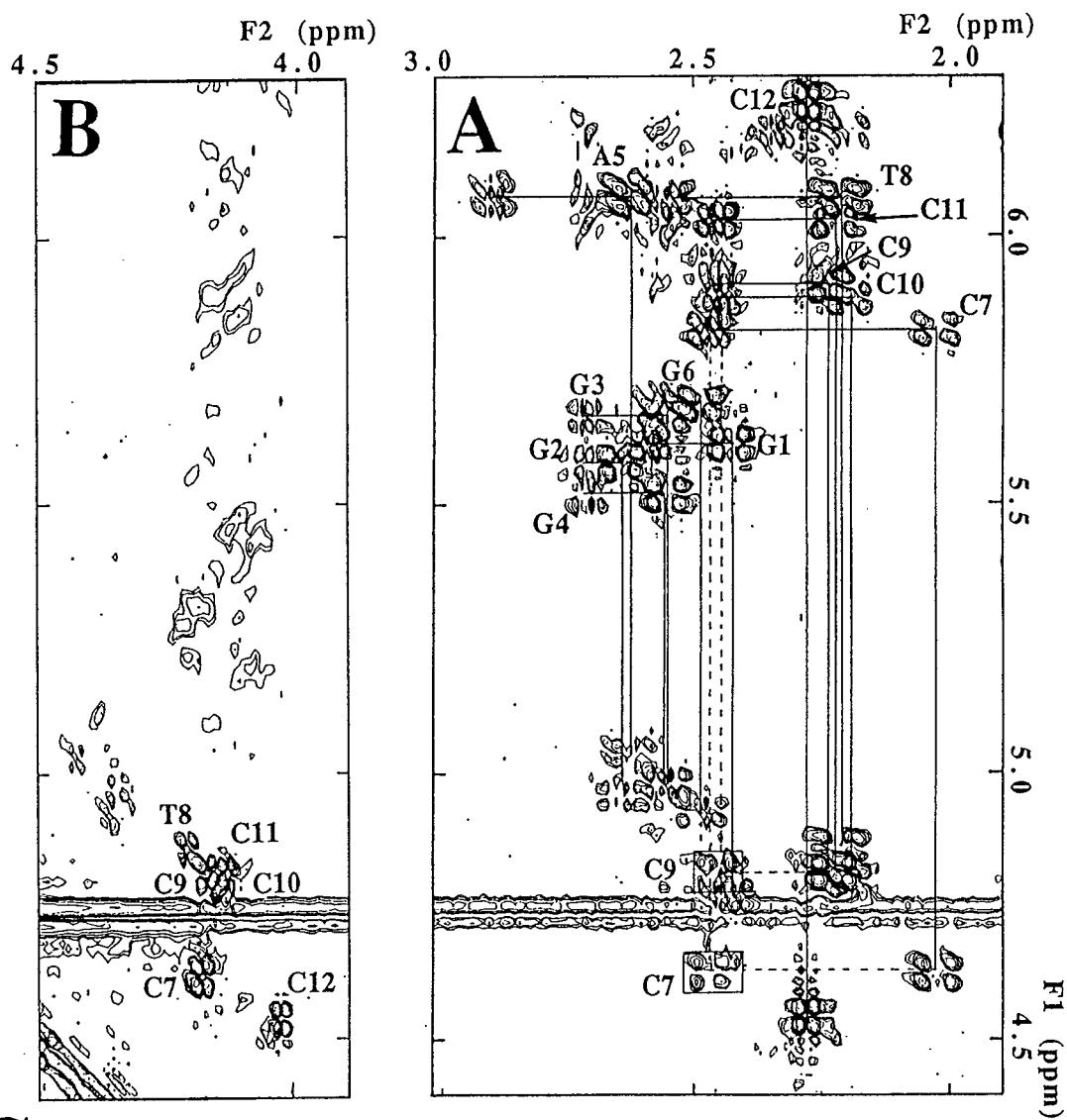


図52 GA-12 のDQF-COSYスペクトル (A: $(H2'/H2'') - (H1'/H3')$ 領域、
B: $(H4') - (H3')$ 領域) とデオキシリボースのスピン系 (C)

で表すことができる。^{77a)} この式は、DNAの分子内でのそれぞれのプロトンの運動性（および分子相関時間 τ_c ）がほぼ等しいとした時の近似式である。二重鎖DNAが一様に塩基対を形成している場合には、この仮定は妥当であると考えられる。

筆者は片平らの方法に準じて、①Tのメチルプロトンを含むNOEについては(T-H6)-(T-CH₃)間のNOE強度を、②他のプロトンに関しては、(C-H5)-(C-H6)間のNOE強度を、それぞれ距離2.8 Åおよび2.46 Åに対応する内部標準として使用した。NOE強度は、2次元NMRのチャート上から交差ピークの体積を求めて行った。⁷⁴⁾

また混合時間250 msのNOESYスペクトル上では観測されるが、100 msのNOESYでは交差ピークを与えないプロトン間の距離については、NOEが観測される限界と考えられる距離として一様に4.2 Åを見積もった。

交換性のイミノプロトンおよびアミノプロトンをふくむプロトン間の距離については、1次元のNOE差スペクトル(10 °C、混合時間300 ms)の積分値を、強・中・弱の三段階に分類して、それぞれ2.3～2.8 Å、2.8～3.6 Å、3.6～4.4 Åの三段階の距離に、誤差を含めた値として割り当てる。

このような段階的な値を用いる方法は、蛋白質の立体構造を計算する際によく用いられる方法である。本来ならば、非交換性プロトンの場合と同様に、NOESYから距離を定量するほうが信頼性が高く、このような非統一的な方法は好ましくない。しかし、分子動力学計算で構造が収束するためには、イミノプロトン間、あるいはstrand間のNOE情報が多いほどよいと考えられる。

ここで、核酸の交換性プロトンの場合には通常の方法ではNOESYが測定できないため、jump and return法、⁷⁸⁾ 1-1 echo法、⁷⁹⁾ SR 1331法⁸⁰⁾といった特殊なパルスを用いて、H₂O中で測定する必要がある。筆者もいくつかのパルスの応用を試みたが、ハードウェアの性質上よいスペクトルが得られなかつたので、使用を断念した。

以上のようにして求めたプロトン間距離を表11にまとめた。

Table 11: Interproton Distances of GA-12 Derived from the NOESY Spectra at 30°C

A: Intranucleoside

| proton | G1 | G2 | G3 | G4 | A5 | G6 | C7 | T8 | C9 | C10 | C11 | C12 | r_{ij} (Å) |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|--------------|
| sugar-sugar | | | | | | | | | | | | | |
| H1'-H2' | 4.20 | 3.96 | 3.35 | 3.59 | 4.20 | 3.54 | 4.15 | 3.82 | 4.20 | 4.20 | | | 2.80 |
| H1'-H2" | 3.03 | 2.61 | 2.84 | 2.56 | 2.65 | 2.64 | 2.28 | 2.62 | 2.45 | 2.45 | 2.72 | | 2.80 |
| H2'-H3' | 3.05 | | | | 2.54 | 2.73 | 3.35 | 2.71 | | | | | 3.53 |
| H2"-H3' | 3.05 | | | | 3.14 | 2.86 | 4.20 | 3.38 | | | | | 3.53 |
| H1'-H4' | | 4.04 | 3.83 | 4.20 | 3.70 | 3.71 | 3.16 | 2.91 | 3.53 | 3.03 | 3.64 | | 4.20 |
| H3'-H4' | 3.14 | 3.31 | 2.58 | 2.58 | 2.60 | 2.65 | 2.77 | 2.58 | 3.09 | 2.90 | 2.90 | | 3.40 |
| sugar-base | | | | | | | | | | | | | |
| H1'-H8/H6 | 4.20 | 4.20 | 4.20 | 4.20 | 4.20 | 3.51 | 4.20 | 4.20 | 4.20 | 4.04 | | | 4.20 |
| H2'-H8/H6 | | 2.42 | 2.45 | 2.45 | 2.39 | 2.88 | 2.70 | 2.33 | 2.44 | | 2.41 | | 3.07 |
| H2"-H8/H6 | | 3.45 | 3.38 | 3.38 | 3.78 | 3.17 | 2.99 | 3.13 | 2.88 | 2.88 | 2.93 | | 3.07 |
| H3'-H8/H6 | 4.20 | 4.20 | 4.20 | | 4.20 | 4.20 | 4.20 | 4.20 | 3.71 | 3.71 | 3.55 | | 4.20 |

B: Internucleoside (Intrastrand)

| residue | | | | | | | | | | | | | r_{ij} (Å) |
|----------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|------|--------------|
| | (i) | G1 | G2 | G3 | G4 | A5 | G6 | C7 | T8 | C9 | C10 | C11 | |
| i-(i+1) ^a | (i+1) | G2 | G3 | G4 | A5 | G6 | C7 | T8 | C9 | C10 | C11 | C12 | |
| H1'-H8/H6 | | | 4.20 | 4.20 | 4.20 | 4.20 | 3.54 | 4.20 | 4.20 | | | | 4.20 |
| H2'-H8/H6 | | 4.20 | | 4.20 | 4.20 | 4.20 | 3.10 | 3.09 | 2.65 | | | 2.93 | 3.59 |
| H2"-H8/H6 | | | 3.38 | 3.22 | 3.83 | 2.72 | 3.09 | 2.44 | 2.44 | | | | 2.41 |
| H3'-H8/H6 | | 4.20 | | 4.20 | 4.20 | | 4.20 | | | | | | |
| H1'-H5/M5 | | | | | | | | 4.20 | | | | | |
| H2'-H5/M5 | | | | | | | | 4.20 | 2.82 | | | 4.20 | 4.20 |
| H2"-H5/M5 | | | | | | | | 4.20 | 3.78 | | | | |
| H3'-H5/M5 | | | | | | | | | 4.28 | | | | |
| H8/H6-H5/M5 | | | | | | | | | 2.90 | | | | |
| H5/M5-H5/M5 | | | | | | | | | 3.83 | | | | |

C: Exchangeable Protons (Internucleoside)^b

| proton pair | r_{ij} | proton pair | r_{ij} | proton pair | r_{ij} | proton pair | r_{ij} |
|----------------------------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| (Intrastrand) | | | | | | | |
| G2H1-G3H1 | m | G3H1-G4H1 | l | G4H1-A5H2 | l | A5H2-G6H1 | l |
| (Interstrand)^c | | | | | | | |
| G2H1-C11H41 | l | G2H1-C11H42 | s | G3H1-C10H41 | l | G3H1-C10H42 | s |
| G4H1-C9H41 | l | G4H1-C9H42 | s | G4H1-T8H3 | l | A5H2-T8H3 | s |
| G6H1-T8H3 | l | | | | | | |

^a M5 means CH_3 proton of the thymine residue.^b Distances are classified into three categories. (l = long, m = medium, s = short).^c H41 and H42 of cytosine are a free and a hydrogen-bonded NH_2 proton, respectively.

表 11 NOESY から求めたGA-12 のプロトン間距離

第三節 分子動力学計算の実際

3-1 分子動力学計算の特長

核酸や蛋白質のような巨大分子について、NMR から得られた情報を忠実に反映する分子モデルを手作業で構築することは、事実上不可能である（GA-12 はduplexで分子量が約7300である）。そのため通常は計算機の扶助を借りて最適構造を求めるうことになり、以下に掲げる4つの方法が知られている。

[1] 束縛条件に基づく構造計算 (restrained molecular mechanics)

または、エネルギー最適化計算 (energy minimization)

[2] 束縛分子動力学計算 (restrained molecular dynamics)

[3] 距離情報に基づく幾何学的計算 (distance geometry)

[4] NOESY スペクトルの再計算 (back calculation of NOESY spectra)

従来は、[1]のエネルギー最適化プログラムを用いて、NOE および角度情報を擬エネルギー項として加えて、構造計算を行う方法が一般的であった。しかしこの方法では、計算により求められた構造と、実験的にNMR から得られたデータの誤差 (violation) が小さくならないこと、計算結果がしばしば局所的な安定構造 (local minimum) に捕まってしまい真の安定構造に収束しないこと等の欠点があった。

その一つの解決法として考案されたのが、[2]の方法である。これは各原子についてNewton方程式（＝運動方程式）を解くことで、分子をある束縛エネルギーの場の中で運動させるという分子動力学計算を用いた方法である。Clore と Gronenbornらにより、1987年にはDNA およびRNA の6 mer が、1989年には修飾塩基を含むDNA 12 merのduplex構造が決定され、2D-NMRと束縛分子動力学計算の組み合わせが、核酸の溶液構造を解明するのに有用であることが実証された。^{77, 81)} 筆者らも、Gronenbornらと同じBrunger のXPLOR (ver 1.5) ⁸²⁾ を使用して解析を行った。

XPLOR は、同じく分子動力学計算用プログラムとして蛋白質の構造解析に広く用いられてきたCHARMMをもとに、より簡便にNMR やX線結晶構造解析のデータが取り扱えるように改良されたプログラムである。例えば動力

学計算中に温度を段階的に変化させたり(simulated annealing)、NOE 束縛条件の重みを変化させることができるなど、優れた機能を持っているため、GA-12 の立体構造決定にも適していると考えられる。

なお、他の分子動力学計算のプログラムとしてはKollman のAMBER⁸³⁾ de VliegらのGROMOS⁸⁴⁾ などが核酸の溶液構造の計算に用いられている。本学でも、藤井、片平らによるDNA 10 merの構造決定にはAMBER が用いられた。直接比較は行っていないものの、XPLOR のほうが若干計算時間が短いようである。

[3] のdistance geometry 法は、Crippen 法と呼ばれるアルゴリズムに従い、2点間の距離情報を積み重ねて全体構造を幾何学的に計算するという方法で、DSPACE (Hare, et al) というプログラムがよく用いられている。⁸⁵⁾

[4] のback calculationは[2] や[3] の方法と組みあわせて、さらにその構造の精度を上げるために用いられる。原理は、一度計算から求められた立体構造から、2D-NMRのスペクトルをsimulationして実験値と比較し、次の構造計算の際に用いる情報にフィードバックするというものである。これは特に、核酸の構造ではスピン拡散(=交差緩和)によりNOE の強度の定量性が失われることを補う目的で用いられた。実際にはBloch 方程式の空間積分を行うことで、全プロトンの完全緩和行列を解き、個々のNMR 測定条件に対応したfilterをかけることで、2次元スペクトルの再構築を行うものである。

[2] と[4] の組みあわせはPardi らが、⁸⁶⁾ [3] と[4] の組みあわせはReidらが⁸⁷⁾ DNA duplexの構造を求めるのに応用している。

3-2 束縛条件の検討

筆者は、実際の分子動力学計算を始める前に、前節により求められたNMR からの構造情報に対応する束縛条件を、つぎの2種類に分類して用いることにした。

[1] デオキシリボースの内部のプロトン同士については、NOE から求められた距離情報による束縛を行わない。

[2] デオキシリボースのコンホメーションはDQF-COSYから得られたパッカリングの情報を、C-C 結合まわりの二面角の束縛条件として与える。

[3] それ以外のプロトンに関しては、NOE によるプロトン間距離を束縛条件として与える。

先にも述べたが、DNA のデオキシリボースについてはNOE のスピン拡散の影響が深刻であり、距離を過小評価する危険性が高い。しかし系統的な誤差を多く含む情報に基づいた束縛エネルギーは、分子動力学計算中の全 empirical energyのバランスを崩し、正しい計算結果を与えない危険性がある。

他方、Govil 、Hosur らのグループは従来よりCOSYから得られた二面角の情報を、核酸の構造決定に積極的に用いる戦略を打ち出している。^{75, 88)} しかし核酸の構造においては、(1) H5'/H5" の位置選択的な帰属や、H4'-(H5'/H5") のカップリング定数の見積もりが困難なこと、(2) リン酸のまわりの結合角に関してNMR で得られる構造情報が乏しいこと、などの理由から二面角の情報だけでは核酸の構造を構築することは難しい。

筆者は、NOE による距離情報をもとにした束縛分子動力学計算に、DQF-COSYから得た二面角の情報も盛り込んでやることで、こうした欠点を補えると考えた。実際、片平、藤井らの実験でプログラムAMBER を用いた同様の戦略が有効であることが示されている。⁷⁴⁾

表12にはデオキシリボフラノース環の二面角の束縛条件を示した。

Table 12: Torsion Angle Constraints for the Sugar Puckerings ($\pm 5^\circ$)

| puckering | δ | v_0 | v_1 | v_2 | v_3 | v_4 |
|-----------|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| C2'-endo | 154.0 | -21.7 | 35.2 | -35.2 | 21.7 | 0.0 |
| C1'-exo | 121.0 | -35.2 | 35.2 | -21.0 | 0 | 21.7 |
| O4'-endo | 95.0 | -35.2 | 21.7 | 0 | -21.7 | 35.2 |

表12 デオキシリボース環の二面角束縛条件

3-3 計算の手順

実際の分子動力学計算の手順ならびに用いた束縛条件の擬エネルギー項の関数等は、1987年および1988年のGronenbornとCloreの方法を一部改良して用いた。

Newton方程式の積分法としてはVerlett (1971)のアルゴリズムを用いて、⁸⁹⁾ time step を1 fsとした。分子動力学計算を行っている間の温度は、0.1 psごとに各原子の速度をMaxwell 分布に従い再配分し直す(rescaling) ことで一定に保った。各原子間のnon-bonded interactionについては、25 fs ごとにその距離を検討してリストを更新した。

水素原子を含む距離については、分子動力学計算を行っている間、SHAKE アルゴリズムを用いて一定に保った。⁹⁰⁾

計算中、構造情報による束縛の少ないリン酸まわりの結合角に関しては、"mirror image"が生じることを避けるため、一般的な右巻きらせんの条件 ($\epsilon = 180 \pm 50^\circ$ 、 $\zeta = -85 \pm 50^\circ$ 、 $\alpha = -70 \pm 50^\circ$ 、 $\beta = 180 \pm 50^\circ$ 、 $\gamma = 60 \pm 35^\circ$) を、50 kcal/mol の束縛条件として加味した。⁸¹⁾

初期座標には、Arnottの座標に従って作成した古典的なA-DNA およびB-DNA の構造 ($\langle a_{ini} \rangle$, $\langle b_{ini} \rangle$) を用いて、それぞれを束縛条件を与えない状態で400 cycle のエネルギー最適化を行ったものを使用した。⁵⁹⁾

それらの初期座標について、まず400 K で4 psの間分子動力学計算を行った。その間、NOE 束縛条件の重みを、0.1 psごとに0.477 Kcal/molから $10^{0.2}$ 倍ずつして、最終的に200 kcal/molとなるようにした。二面角の束縛条件の重みは50 kcal/mol で一定とした。

さらに温度を300 K として、10 ps の分子動力学計算を行った。その後の6 psの計算のtrajectoryから、25 fs ごとに計240の座標を抽出して平均した。その平均構造に対して、を400 cycle のエネルギー最適化を行い、最終的な構造 ($\langle a_{rms} \rangle$, $\langle b_{rms} \rangle$) を得た。これらの構造はいずれも与えた束縛条件をよく満たすものであった。

3-4 計算法の改良

筆者は $\langle a_{rms} \rangle$ と $\langle b_{rms} \rangle$ の二つの構造の、atomic root mean difference

(以下rmsd) を検討したところ、5.2 Å² であった。これは二つの初期構造($\langle a_{ini} \rangle$ と $\langle b_{ini} \rangle$) の間 (6.5 Å²) よりは小さいものの、依然として構造計算中に local な極小構造が存在していて、計算結果が初期構造に依存していることを意味する。そこで二つの計算結果を再びNOESY スペクトルと照らし合わせて検討したところ、チャート上ではNOE 相関ピークが全く観測されないものの、プロトン間距離が3.8 Å以下となっているプロトンの組みを見いだした(表13)。筆者はこれらのプロトン間について、距離が3.8 Å以内のときには斥力が生じ、3.8 Å以上でエネルギーが0となるような関数を新たに設けて、擬NOE として分子動力学計算の束縛条件に加えた。

Table 13: Proton Pairs for "Pseudo NOE Restraints" (see text)

| | | | | |
|----------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| (inter strand) | | | | |
| G1H2'-C12H4' | A5H2-T8H1' | A5H2-C9H1' | G3H1'-C12H4' | G3H4'-C12H1' |
| (intra strand) | | | | |
| G1H2"-G2H2' | G2H2"-G3H2' | G3H2"-G4H2' | A5H2"-G6H2' | A5H2-G6H1' |
| G6H8-C7H6 | G6H1'-C7H1' | C7H1'-T8H1' | C7H1'-T8H4' | C7H2"-T8H2' |
| T8H2'-C9H2' | T8H2"-C9H1' | T8H2"-C9H2' | T8H2"-C9H3' | T8H2"-C9H4' |
| T8H3'-C9H6 | T8H6-C9H6 | C9H6-C10H6 | C9H5-C10H5 | C9H2"-C10H4' |
| C9H2"-C10H1' | C9H2"-C10H2' | C10H5-C11H5 | C11H1'-C12H6 | C11H3'-C12H6 |
| C11H6-C12H5 | | | | |

表13 擬NOE 情報を与えたプロトンの組

この操作は、前項3-1で述べた[4]の方法の利点を、手作業で取り入れたものである。なぜなら、NOEに基づいたプロトン間距離による束縛分子動力学計算では、その原理上二つのプロトンが『近い』という情報は計算に盛り込むことができるが、二つのプロトンが『遠い』という情報は全く反映されていないからである。もちろん完全緩和行列を解くという方法に比べて、精度はよばないものの、NMRで得られた情報を可能な限り反映させるという観点から、必要な操作であると考えた。

この新たな束縛条件下、 $\langle a_{rmsd} \rangle$ $\langle b_{rmsd} \rangle$ の二つの新たな計算構造を得た。両者の間のrmsdは4.0 Åである。計算の初期構造依存性を解消すると

いう点ではまだ十分な収束とはいえないが、改良前の値に比べて明らかに小さい。このことは、筆者の改良法が有用であることを示唆している。同

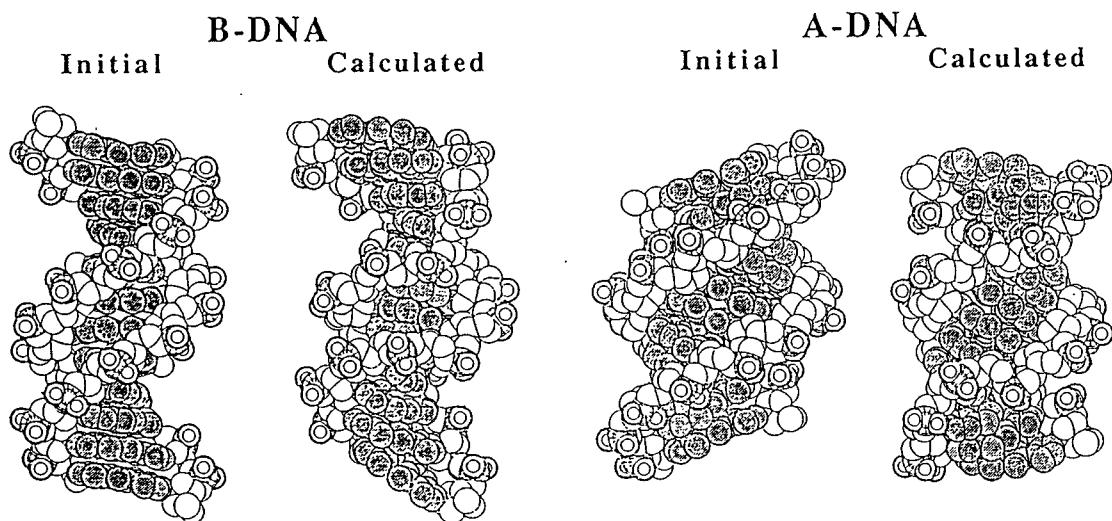


図53 GA-12 の構造

Table 14: Empirical Energies of Initial and Calculated Structures.
(kcal / mol)

| structure | A_{ini} | A_{rmd} | B_{ini} | B_{rmd} |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| empirical energies | | | | |
| bond | 15.092 | 26.630 | 11.291 | 25.633 |
| angle | 207.700 | 295.278 | 193.156 | 298.838 |
| dihedral | 299.200 | 322.140 | 295.456 | 330.027 |
| improper | 11.791 | 26.124 | 5.985 | 25.367 |
| V.D.W. | -361.325 | -351.822 | -397.984 | -376.677 |
| electrostatic | -548.617 | -584.113 | -555.589 | -565.649 |
| hydrogen bond | -84.225 | -83.794 | -82.101 | -80.491 |
| total | -460.384 | -349.556 | -529.787 | -342.953 |
| constrain energies | | | | |
| dihedral | - | 6.375 | - | 6.836 |
| NOE | - | 52.871 | - | 52.515 |
| total | -460.384 | -290.310 | -529.787 | -283.02 |
| rms difference from NOE constraints (A²) | | | | |
| | 0.452 | 0.032 | 0.308 | 0.032 |

表14 初期構造および計算された構造のempirical energyの内訳

時にプログラムCORMAなどの完全緩和行列を解く方法で行った詳細なback calculationが、本法の改良に役立つ可能性を示したといえる。

図53には、初期構造および改良後の計算構造を、また表14にはそれらの構造のempirical energyの内訳を示した。束縛条件による擬エネルギー一項を除いたエネルギーでは、 $\langle a_{rma}' \rangle$ も $\langle b_{rma}' \rangle$ もほぼ同じくらい安定である。しかしCDスペクトル(図49)からも示されたように、GA-12はB型構造のバリエーションとしての右巻き構造をとっていると考えられる。従って、筆者はこの構造をGA-12の溶液中の構造として、以下の議論を行った。

..

第4節 考察と『BLM-DNAマイナーグループ結合モデル』の検証

ここでは、得られたGA-12の構造について詳細に検討し、更に第二章で提出したBLMのDNA塩基認識機構がGA-12の構造においても適用可能かどうかについて考察する。

4-1 GA-12の構造の特徴

図54はGA-12の立体構造と、出発構造である標準的なB型構造 $\langle b_{ini} \rangle$ を比較したものである。まず最大の特徴は、 $\langle b_{rma}' \rangle$ では塩基対平面がduplex全体のらせん軸に対して直交せず、ある角度を持っていることである。duplex全体としては、らせん軸方向が縮められている。

表15にはGA-12の各塩基対間におけるらせんのパラメーターを掲げた。計算の過程で対称なGA-12 duplexが非対称となっているが、これは核酸の分子構造がある程度の自由度を持っていることの現われである。長時間にわたり分子動力学計算を行うこと、あるいは計算に用いる乱数発生の『種』を変えて、何回も計算を行い平均化することで、より収束するものと考えられる。

中心の5つの塩基対に注目すると、表15から明らかになったGA-12構造の特徴は以下の2点である。

- [1] 中心の (G6pC7) : (C7pG6) ステップでは約 5° のらせんの巻き戻しが、またその両側の前後 2 塩基対 (G4pA5) : (C9pT8)、(A5pG6) : (T8pC7) では約 4~5° のらせんの巻き過ぎが観測された。
- [2] らせんの進み (helix rise) は通常の B-DNA に比べて、約 0.5 Å 短い。

こうした特徴は、プリン塩基が連続している部分で、プリン環同士の塩基の重なり (スタッキング) が増大するような局所構造をとった結果である (図 5-4 参照)。同時に、G1~G4 のグアニン塩基の並びでは、G の 2 位のアミノ基がマイナーグループ側で接触を避ける方向に、静電的に反発しあった結果、らせんの巻き過ぎ (overwind) が起こっていると考えられる。反対に、塩基対を形成するピリミジン塩基同士のスタッキングは弱くなっている。これはプリン塩基がより良くスタッキングすることで補われて、全体的には安定性が増していると考えられる。

プリン塩基が連続することで、こうした塩基対間の個々の構造的な特徴が系統的に累積される。その歪みはスタッキングの弱い G6pC7 のステップ

Table 15: Helical Parameters for the Calculated Structure of GA-12

| Step | 1st. base-pair | 2nd. base-pair | helix rise (Å) | helical rotation | roll (°) | tilt (°) |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
| 1 | G1:C24 | G2:C23 | 3.629 | 41.5 | 6.50 | 0.08 |
| 2 | G2:C23 | G3:C22 | 3.988 | 36.3 | 11.53 | 5.92 |
| 3 | G3:C22 | G4:C21 | 3.664 | 36.8 | -15.41 | 10.55 |
| 4 | G4:C21 | A5:T20 | 3.450 | 36.0 | -6.80 | -7.82 |
| 5 | A5:T20 | G6:C19 | 2.815 | 42.4 | -12.09 | 6.87 |
| 6 | G6:C19 | C7:G18 | 2.927 | 30.5 | 6.78 | -1.77 |
| 7 | C7:G18 | T8:A17 | 2.882 | 39.2 | 0.40 | -7.02 |
| 8 | T8:A17 | C9:G16 | 3.087 | 41.8 | -1.96 | -1.97 |
| 9 | C9:G16 | C10:G15 | 3.518 | 38.3 | -2.16 | -4.14 |
| 10 | C10:G15 | C11:G14 | 3.454 | 33.4 | 4.59 | -7.59 |
| 11 | C11:G14 | C12:G13 | 3.094 | 30.8 | 0.50 | 5.36 |
| average of 1-11 | | | 3.319 | 34.3 | -0.74 | -0.14 |
| average of 5-7 | | | 2.874 | 37.6 | -1.63 | 1.36 |
| Standard A-DNA | | | 2.56 | 32.7 (30.9) ^a | 0.0 (10.70) ^a | 0.0 |
| Standard B-DNA | | | 3.37 | 36.0 (32.7) ^a | 0.0 (-3.60) ^a | 0.0 |

^a Values for local helix system.

表 15 GA-12 溶液構造のらせんのパラメーター

において解消されようとするため、この部分では約5°というらせんの巻き戻しが見られたのであろう。

なお、このように同じ塩基が連続する配列で、各ステップでの構造的な特徴が累積されて連続配列の前後でらせん構造に大きな変化をもたらす例としては、「曲がるDNA」配列として知られているd(CGCAAAAAAGCG)の構造がある。^{9,1)}

4-2 BLMのDNAマイナーグループ結合モデルの検証

図5-4には、GA-12の構造と標準的なB型構造**(b_{1n₁})**のA5～T7部位のマイナーグループ側の図と、G4～C7までの各塩基対ステップの塩基のスタッキングの様子を示した。

前項で述べたような構造上の特徴のため、GA-12の中心のG6pC7部位周辺ではマイナーグループの形がかなり変わっている。すなわちG6pC7部位ではマイナーグループが広くなっているものの、そのすぐ前後では逆に狭く、ねじれた形になっている(図5-4 A、E)。第二章で構築した筆者のマイナーグループ結合モデルでは、BLMのDNA結合ドメインが3ないし4塩基対を覆う形でマイナーグループに沿う。しかしGA-12のG6pC7部位では、そのような結合は立体的に無理であると考えられる。すなわち、GA-12の立体構造およびBLM-DNAマイナーグループ結合モデルは、GA-12がG6pC7部位でBLMの切断を受けにくいという実験事実とよく一致する。

さらに筆者は、BLMによる二組の水素結合によるG-C2NH₂とPy-C2Oの認識機構を提出した(第二章第3節)。BLMにより効率よく切断される通常のB型構造のG6pC7部位と、GA-12のG6pC7部位でそれぞれの位置関係を比較した(図5-4 D、H)。DではG6N2はC7O2のほぼ真上に位置しており、二つの原子を結ぶベクトルはらせん軸と平行である。一方Hでは、らせんの巻き戻しのためC7O2の位置がグループの外側方向に大きくはずれていて、二つの原子を結ぶベクトルもらせん軸方向ではない。

G6N2HとC7O2の距離を比較して見ると、標準的なB型構造では3.10Å、GA-12の構造中では2.93Åであり、ほとんど差がない。しかしBLMが一次的に攻撃するC7H4'に着目すると、G6N2～C7H4'間の距離はB型構造の

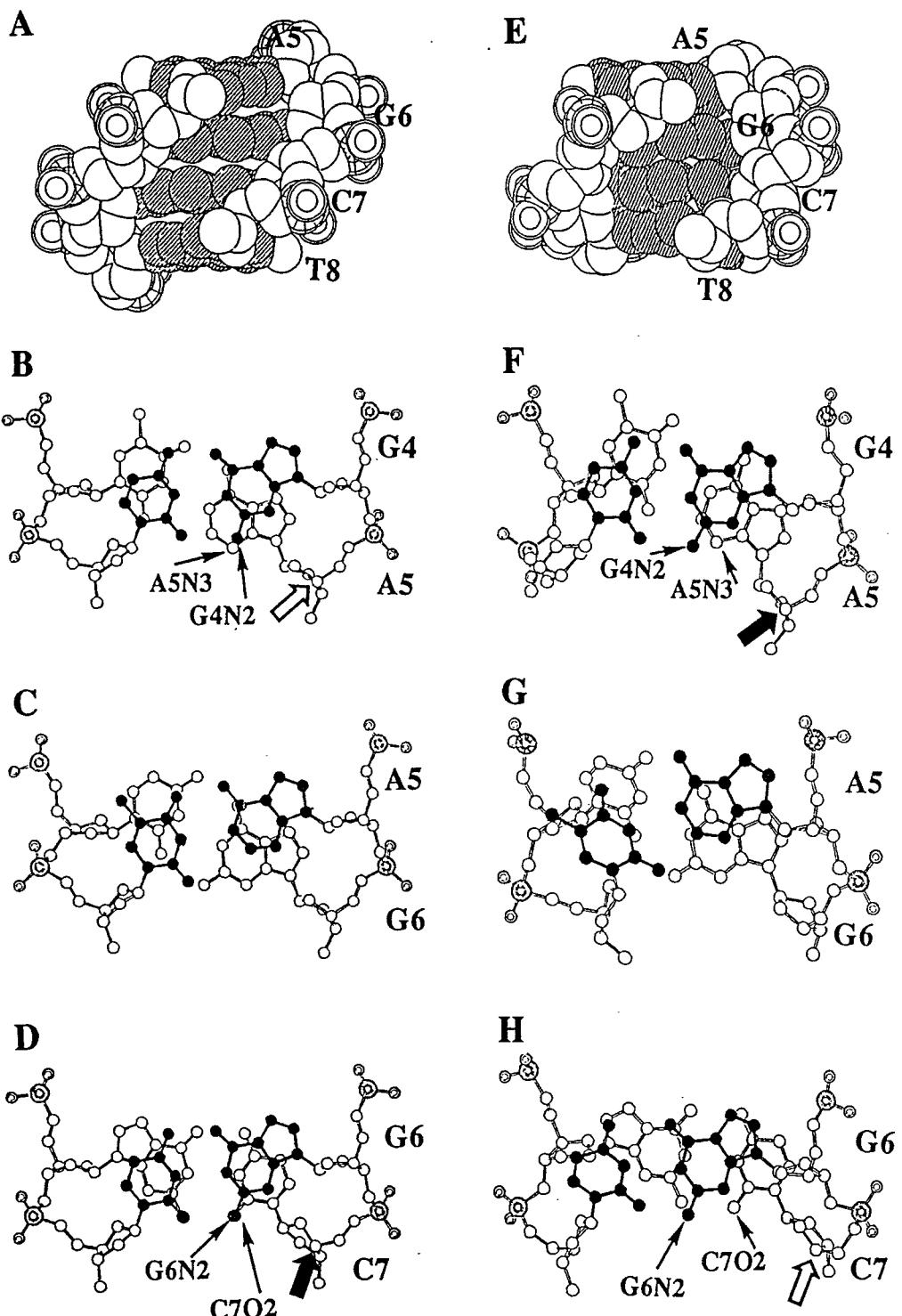


図5-4 GA-12の構造。左側(A-D):標準的なB型構造。

右側(E-H):計算された溶液構造。A,E:マイナーグループ

B,F: (G4:C9) - (A5:T8) ステップ、C,G: (A5:T8) - (G6:C7) ステップ、

D,H: (G6:C7) - (C7:G6) ステップ、図中→はBLMの切断部位を示した。

3.60 Å に対してGA-12 では5.26 Å と、明らかに長くなっている。

以上の結果より、筆者はBLM がGA-12 のG6pC7 部位に結合しにくいため、そこでの切断が起こりにくくなつたものと考えている。また仮に結合が起こつたとしても、BLM の活性中心である配位子部位がラジカルによるプロトン引き抜きに適當な距離または方向をもつた、『正しい』位置にくるとは考えにくい。従つてBLM はC7H4' での切断反応を起こしにくいものと考えられる。

他方、BLM によって本来よりも切断を受けやすくなつてゐるG4p A5についてはどうであろうか？筆者はここで、アデニンの3位の窒素に着目した。A-N3はマイナーグループ結合性薬物との相互作用においてよい水素結合アクセプターであることが知られている。⁵³⁻⁵⁷⁾ 筆者は、Py-02 の代わりにA-N3が水素結合に関与することにより、BLM がDNA のGpA 部位とも結合することが可能であると考えている。実際、計算により得られたGA-12 の溶液構造では、図54F のようにA5N3が通常のB型DNA G6pC7 部位のC7 O2に替わりうる位置にきていることがわかる。その相対的な位置関係は、GA-12 のG6pC7 部位に比べて、BLM による認識により適していると考えられる（図54F、H）。しかしBのよう、通常のB型DNA ではG4N2がA5 N3の完全に真上に位置しているにもかかわらず、切断はGpC 部位よりも起つたににくい。これは、Py-02 とA-N3では不対電子の方向……あるいは形成される水素結合の方向が、異なつてゐるためと考えている。

以上のように、第二章で構築したBLM のDNA 塩基認識機構およびマイナーグループ結合モデルは、一般的なBLM のDNA 切断における性質を説明できるばかりでなく、GA-12 のような特異な配列における立体環境の異常にも適用可能であることが示された。同時に、筆者の提出したモデルが正しいことが検証された。

4-3 ポリプリン-ポリピリミジン接合部を有するDNA の構造

CDおよびNMR による構造研究の結果、GA-12 に見出されたB型らせんのバリエーションとしての特異な構造は、BLM の塩基認識を変化させることができ明らかになった。CDスペクトルのパターンのよい一致から、GA'-12にお

いても同様の議論が可能である。

片平、京極らのグループは、NMR によって解析したd(GGAAATTTCC),⁷⁴⁾ d(GGGGCCCC)⁷²⁾ のDNA に含まれるいくつかのC 残基のデオキシリボースが、04'-endoをとっていることを報告している。これらのDNA がいずれもポリプリンーポリピリミジン接合部を有する配列であることは非常に興味深い。さらに同じグループの児嶋は、酵母のgalactose 代謝系オペロンのプロモーター領域に含まれる転写調節因子GAL4の結合する配列(UAS_G)を含む17 mer DNAについて研究している。UAS_G [d(CGGAAGACTCTCTCCG) : d(CGGAGGGAGAGTCTTCCG)] にも、ポリプリンーポリピリミジン接合配列が含まれている。完全な帰属および立体構造の計算には至っていないものの、UAS_Gの2D- および3D-NMRの解析からは、その接合部周辺で少なくとも一つのC 残基が04'-endoのコンホメーションをとっていることが示唆されている。⁹²⁾

筆者はこれらの報告および筆者の得たNMR のデータを考えあわせて、『ポリプリンーポリピリミジン接合部を持つDNA 配列は、その接合部付近でC 残基のデオキシリボフラノース環が、04'-endoのコンホメーションをとりやすくなるという一般的な傾向がある』という仮説を立てた。一概にポリプリンーポリピリミジン接合部といったところで、立体構造が同じというわけではない。G:C 塩基対とA:T 塩基対の組みあわせに応じて、その立体構造はそれぞれの配列に特徴的なバリエーションを示すものと考えられる。しかしこうしたポリプリンーポリピリミジン接合部が、DNA の構造中に局所的な特異性をもたらすということは、遺伝子の機能の発現調節に、なんらかの重要な役割を果している可能性がある。

結論

1. ブレオマイシン (BLM) のDNA 結合様式を解明した。

- A. DNA オリゴマー: d (CCCCAGCTGGGG) (GC-12), d (CCACCTAGGTGG) (GT-12) は BLM とただ 1 カ所で特異的に相互作用する。
- B. BLM-Ni²⁺とDNA の結合定数は $4.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ である。
- C. BLM はインターカレーターではなく、マイナーグループ結合性薬物である。

2. BLM のDNA 塩基認識機構を解明した。

- A. BLM は 2組の水素結合、すなわち
 - (1) ピチアゾール環のN3/N3' と G-C2NH₂との間の水素結合で G 塩基を、また
 - (2) ブチルグアニジニウム基のδ NHとピリミジン-C20との間の水素結合でピリミジン塩基を、それぞれ認識して結合している。
- B. BLM はDNA に結合しているとき、スレオニン～メチル吉草酸の部位で折れ曲がり構造 (U-Form) をとっている。
- C. BLM-DNA 複合体のマイナーグループ結合モデルを構築した。

3. BLM-DNA マイナーグループ結合モデルを検証した。

- A. BLM により異常な切断を受けるDNA オリゴマー: d (GGGGAGCTCC-CC) (GA-12) の溶液中の立体構造を、NMR の構造情報に基づいた束縛分子動力学計算により決定した。GA-12 は分子中央でマイナーグループが拡がった歪んだ B 型構造をしている。
- B. 得られたGA-12 の立体構造と筆者の結合モデルは、GA-12 の異常な切断性を矛盾なく説明する。

謝 辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学薬学部
今西武教授、横浜国立大学工学部 上杉晴一教授に心から感謝致します。

計算機実験に際し、御便宜、御指導頂きました大阪大学薬学部
畠田研一教授、藤井敏助教授に深く感謝致します。

NMR を用いた滴定実験にあたり、御指導いただきました蛋白工学研究所
小田康司博士に感謝致します。

ブレオマイシンを御供与頂きました日本化薬 滝田智久博士に感謝致します。
また蛍光スペクトルの測定に際し御便宜を計って頂きました
大阪大学蛋白質研究所 中村正彦博士、分子モデル構築に際し御便宜を計
って頂きました蛋白工学研究所 中村春木博士、ブレオマイシンの初期座
標を構築して頂きました日本チバガイギー国際研究所 合田圭吾氏、貴重
な未発表データをご供与下さいました京都大学工学部 杉山弘博士に、そ
れぞれ厚く御礼申し上げます。

本研究の一部に御協力頂きました、江端智彦氏、小玉啓文氏、
田中好幸氏、小林直之氏をはじめとして、薬化学教室の皆様に感謝致します。

末筆となりましたが、研究上の討論に加わり有益な御助言をいただきました
蛋白工学研究所 田中俊樹博士、通産省工業技術院微生物工学研究所
西川諭博士、阪大薬学部 土井健史助教授、宮下和之博士、大阪大学蛋白
質研究所 京極好正教授、白川昌宏博士に、それぞれ深謝致します。

実験の部

一般的手法

1. 溶媒および試薬

通常のカラムクロマトグラフィーや抽出操作などに用いる溶媒（アセトニトリル、アセトン、エーテル、エタノール、ジクロロメタン、酢酸エチル、メタノール、テトラヒドロフラン(THF)）は、それぞれ特級の試薬を用いた。

無水反応に用いるアセトニトリルは、CaH₂を加えて一晩還流し、使用する直前に蒸留した。無水反応に用いるジクロロメタンは、CaH₂を加えて一晩還流し、蒸留した。モレキュラーシーブ(4A)を入れて保存した。またピリジンは、KOHを加えて一晩還流し、蒸留した。モレキュラーシーブ(4A)を入れて保存した。

TLCはDC-Fertiglatten Kieselgel 60F₂₅₄ (MERCK)を用いて、特別の場合を除いてクロロホルム-メタノール(10:1, v/v)により展開した。ヌクレオチドあるいはヌクレオシドのスポットは、水銀紫外線ランプ(254 nm)により検出した後、10%硫酸(v/v)を噴霧して、ジメトキシトリチル基の有無を確認し、更に過熱して糖の有無を確認した。

カラムクロマトグラフィーは、担体にKieselgel 60, 60H (MERCK)を場合により使い分けた。溶出は特別の場合を除きクロロホルム中のメタノール濃度を1～10%まで段階的に増加させることにより行った。

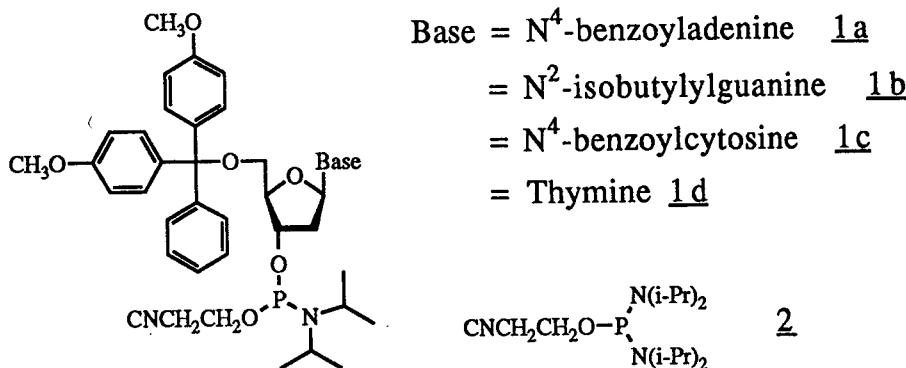
7 M 尿素入り20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)は、あらかじめ40%アクリルアミド:ビスマチレンアクリルアミド(29:1)溶液20 mlに5×TBE緩衝液8 mlを加えて、尿素28 gをよくとかしたものに、過硫酸アンモニウム少量、TEMED 20 μlを加えて、20 cm × 20 cmのゲル(ゲル厚1 mm)を作成したものを、定電圧(300～400 V)で泳動した。電源にはマリソルパワーサプライKS-7510および相当品を用いた。泳動バッファーは1×TBE緩衝液(0.09 M Tris-borate, 4 mM EDTA, pH 8.5)を使用した。

2. ブレオマイシン

本実験で用いたBLMは、すべて単離されHPLC等にて高度に精製された脱銅体のBLM-B2(2塩酸塩)であり、日本化薬より供与されたものである。

3. DNA の合成

本実験で用いたDNAは、全て5'-dimethoxytrityl-N'-protected-nucleoside-3'- β -cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidite (1a~1d) (以下ヌクレオシド亜リン酸アミド体と略す)を縮合ユニットに用いた、固相リン酸アミダイト法により、合成した。以下にDNA、および主な中間体の合成法を簡単に示す。



3. 1 亜リン酸化剤 (β -cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphoramidite (2) の合成

蒸留した三塩化リン (2.0 mol, 175 ml) をアセトニトリル (200 ml) に溶かし、ナスコルベン中で攪拌しながら2-シアノエタノール (0.4 mol, 27 ml) を滴下して室温で30分攪拌する。その後未反応の過剰の三塩化リンをアスピレーター減圧下エバボレーターで留去した。アメ状の白色残渣を真空ポンプ減圧下エヴァポレーターで濃縮した。油状残渣 (ほぼ純粋なCNCH₂CH₂OPCl₂) にエーテル (300 ml) を加えて-10°Cでジイソプロピルアミンを滴下した。滴下後、ゆっくりと室温に戻し、一晩攪拌をつづけた。その後0°Cで400 mlの飽和重曹水を加えて有機層を分液し、水層を250 mlのジクロロメタンで抽出した。有機層を合わせて硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。油状の残渣に、CaH₂ 1 gを加えて減圧蒸留を行った (bp. 148-152°C, 4-5 mmHg)。得られた本留をもう一度減圧蒸留を行い、約20 mlの(2)を得た。収率: 約30% (分子量: 301.4) bp. 105-107°C (0.4 mmHg)

³¹P NMR: 123.2 ppm (CDCl₃)

3. 2 Diisopropylammonium tetrazolide (3) の合成

テトラゾール 1 g (14.2 mmol) をアセトニトリル (25 ml) に溶かし、氷冷下攪拌しジイソプロピルアミン (2.38 ml, 17 mmol) を滴下後、15分間攪拌した。析出

してきた結晶を濾取し、減圧下乾燥させて、2.2 g (12.9 mmol) を得た。

収率：92% (分子量：171.19)

3. 3 ヌクレオシド亜リン酸アミド体 (1a~1d) の合成

保護したヌクレオシド (1 mmol) を無水のピリジン (2 ml) に溶かして、真空ポンプ (~5 mmHg) で減圧留去した (ピリジン共沸)。ピリジン共沸は2~3回行った。残渣を窒素ガス気流下、(3) (86 mg, 0.5 mmol) を加えて無水のジクロロメタンで完全に溶かした。亜リン酸化剤 (2) (361 mg, 381 μ l, 1.2 mmol) をシリングで滴下し、室温で30分間振とう攪拌した。反応をTLC (展開溶媒は酢酸エチル/トリエチルアミン 3%, v/v) で確認した。反応混合物にジクロロメタンを30 ml 加え、等量の飽和重曹水で2回、水で2回それぞれ有機層を分液洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。カラムクロマトグラム (平衡化溶媒および移動相は酢酸エチル/トリエチルアミン (3%, v/v)) で短時間で溶出、精製した (フラッシュカラム)。目的物のみを含む分画を集めて溶媒を留去し、アメ状の残渣をさらに真空ポンプで減圧乾燥した。-20°C で保存した。

dA, dC, dT誘導体 (1a, 1c, 1d) の平均収率が90% であるのに対して、dG誘導体 (1b) は65% 前後であった。

3. 4 オリゴヌクレオチドの合成 (縮合 10 μ mol スケール)

| | |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| [試薬] ヌクレオシド化 CPG | 10 μ mol |
| 0.2 M テトラゾール/アセトニトリル溶液 | 2 ml / サイクル |
| 無水酢酸 | 0.2 ml / サイクル |
| 0.1M DMAP /ピリジン溶液 | 1.8 ml / サイクル |
| ヨウ素溶液 (0.5 M ヨウ素/(THF-ルチジン-水 = 8:1:1) | |
| | 2 ml / サイクル |
| TCA 溶液 (3%トリクロロ酢酸/ジクロロメタン) | |
| | 15 ml / サイクル |
| 亜リン酸アミダイト体 (1) | 70 μ mol (50-60 mg) / サイクル |

[縮合の流れ]

縮合は、グラスフィルター上のヌクレオシド化 CPG にたいして、以下の4つの操作を繰り返すことによって、DNAの鎖長を3'側から一残基ずつ伸長することにより行なった。

| | 操作 | 試薬及び条件 |
|-----|--------------------|--------------------------------------|
| [1] | 5' 保護基の脱保護（脱トリチル） | TCA溶液 15ml 3分間 |
| [2] | 縮合 | 亜リン酸アミダイト体 7等量 テトラゾール 30等量 3分間 |
| [3] | 未反応の水酸基の保護（キャッピング） | 無水酢酸 0.2ml DMAP溶液 1.8ml 1分間 |
| [4] | 酸化 | ヨウ素溶液 2ml 1分間 |

[各操作の説明]

ヌクレオシド化CPGの準備

- 1) ヌクレオシド化CPG（以下、単に樹脂と呼ぶ）を縮合用グラスフィルター上で、DMAP溶液1.8ml、無水酢酸 0.2mlに懸濁し、1分後、加圧して液を排出した。
- 2) 樹脂をアセトニトリル2mlで、3回洗浄する。すなわちピペットで溶媒を加え、樹脂を数秒間懸濁させ、加圧して液を排出する。この操作を3回行なう。なおこの操作は、固相合成法における基本的な操作であるので、以下の説明では単に「洗浄する」と書く。

縮合

以下の【脱トリチル】→【縮合】→【キャッピング】→【酸化】の一連の操作を、鎖長マイナス1回の間繰り返すことにより、鎖長の延長を行った。

【脱トリチル】

- 1) 樹脂をジクロロメタン2mlで3回洗浄する。
- 2) 樹脂にTCA溶液2mlを加え、30秒間よく懸濁して、液を排出する。液は脱保護されたトリチルの赤色を呈する。この操作を赤い色が出なくなるまで繰り返す。
- 3) 樹脂をジクロロメタン、ピリジン、アセトニトリルで順次洗浄する。

【縮合】

- 1) 無水アセトニトリル10mlで樹脂をよく洗浄する。
- 2) 4分間窒素ガスを送って、樹脂を乾燥させる。
- 3) 亜リン酸アミダイト体を固体のまま加えて、更に3分間窒素ガスを送る。

4) テトラゾール溶液1.5ml を樹脂に加え、3分間振とうする。

5) 液を排出して、樹脂をアセトニトリルで洗浄する。

[キャッピング]

1) 樹脂に無水酢酸0.2ml 、DMAP溶液1.8ml を加えて、1分間懸濁する。液を排出する。

2) 樹脂をアセトニトリルで洗浄する。

[酸化]

1) 樹脂にヨウ素溶液2ml を加えて、1分間懸濁する。液を排出する。

2) 樹脂をアセトニトリルで、よく洗浄する。

後処理

1) 樹脂をエーテルで洗浄し窒素ガス気流下で乾燥させる。

4. DNA の脱保護と精製

4. 1 樹脂からの切り出しと、アミノ基およびリン酸の脱保護

乾燥させた縮合後の樹脂を、ピリジン(2 ml)、濃アンモニア水(8 ml)に懸濁を加えて、湯浴で55 °C, 3 h 以上放置した。綿栓濾過で樹脂を除き、濾液を等量の酢酸エチルで2回洗浄し、水層を濃縮した。

4. 2 C-18逆相オーブンカラムによる精製

カラム(ϕ 10 mm x 120 mm, C-18 シリカゲル, Waters, 55-105 μ)

溶媒 A液 5 % アセトニトリル, 50 mM TEAA緩衝液 (pH 7.0)

 B液 40 % アセトニトリル, 50 mM TEAA緩衝液 (pH 7.0)

カラムを、予めA液で平衡化しておき、DNA を3 mlのA液に溶かしてカラムにアプライした。A, B液それぞれ80 ml の直線濃度勾配で溶出した。後ろに溶出されたピークを集めて、溶媒を留去し水でアミン臭が無くなるまで共沸した。

4. 3 5'水酸基の脱保護

DNA に30 ml 80 % 酢酸を加えて、30分室温に放置した。溶媒を留去して、共沸し、残渣を少量の水によく溶かして数mlのエーテルで洗浄した。ここでHPLCによる分析を行って、この後の精製の戦略を決める。ほとんどの場合は、この時点で95%以上の純度のDNA が得られるので、この後は簡単な脱塩の操作のみで物理化学的な実験に用いることのできるサンプルが用意できた。

4. 4 脱塩をかねたイオン交換による精製

カラム (ϕ 35 mm x 40 mm, Whatman DEAE セルロース DE-23, HCO_3^- 型)

溶媒 A液 0.2 M TEAB緩衝液 (pH 7.5), 10 % アセトニトリル

B液 0.9 M TEAB緩衝液 (pH 7.5), 10 % アセトニトリル

カラムを水で平衡化しておき、DNA をアプライして水500 mlで洗浄した。その後 A, B液をそれぞれ100ml 用いた直線濃度勾配でDNA を溶出した。メインピークを集めて、必要に応じてHPLCで各フラクションの純度を確認した。十分な純度のフラクションのみを集めて、溶媒を除去した。TEA をエタノールで共沸し除去した。

4. 5 ゲルfiltration (脱塩)

カラム (ϕ 20 mm x 80 cm, Sephadex G-10などの排除分子量が1万程度のもの)

ゲルfiltrationのカラムを水で平衡化しておき、DNA を0.5ml の水に溶かしてアプライし、水で溶出した。

4. 6 カウンターアイオンの交換 (3段カラム)

カラム 上段 DOWEX 50W-X2, mesh 100-200, ピリジニウム型 (2 ml)

中段 ツ ツ Na^+ 型 (2 ml)

下段 Biorad Chelex 100, mesh 100-200, Na^+ 型 (2 ml)

カラムは予め20ml程度の水でよく洗っておく。DNA を0.5ml の水に溶かして、カラムにアプライし、水で溶出した。DNA は最初の10mlに95% 以上が溶出される。UV で定量して、濃縮した。

4. 7 HPLCによるDNA の純度の確認

DNA の純度は、C18 HPLCまたは陰イオン交換HPLCにより分析した。

逆相C18 HPLCは0.1 M TEAA緩衝液 (pH 7.0) 中で、アセトニトリル濃度9 % から14 % または15 % (v/v) 、30分の直線濃度勾配で、流速0.7 ml/minで分析した。

陰イオン交換HPLCは20 % アセトニトリル (v/v) 中、ギ酸アンモニウム濃度0.2 M から0.8 M 、30分の直線濃度勾配で、流速0.5 ml/minで分析した。

いずれの場合もピークは254 nmの紫外外部吸収で観測した。また、カラム中での高次構造形成によるピークの多型を防ぐため、逆相C18 HPLCはカラムヒーターによりカラムを50°Cに過熱して分析した。

4. 8 DNA の分子吸光係数 (ε) の決定

以上の様にして、合成、精製したDNA オリゴマーの260 nmの分子吸光係数を、

Nuclease P1 (ヤマサ) またはVenom phosphodiesterase (ベーリンガー) による完全分解によって決定した。

GC-12 : 107400、 AT-12 : 106700、 GT-12 : 95800。
GA-12 : 107300。 GA'-12については決定していない。

5. 分析機器

UVスペクトルは、日本分光UVIDEC-610C 型分光光度計あるいは島津UV-2100 型分光光度計を用いて測定した。CDスペクトルは、日本分光J-500A型分光計を用いて測定を行った。NMRスペクトルは、日本電子GX500 型パルスフリエ核磁気共鳴装置 (500 MHz for ^1H and 202 MHz for ^{31}P) を用いて測定した。データ処理は付属のDEC 11/23 32bit Micro-processor およびプログラムPLEXUS (Ver. 1.5) を使用した。蛍光スペクトルは日立のMPF-4A蛍光光度計を用いて測定した。

HPLCはGILSONのMODEL 302 およびTOSOのSP 2800 型HPLCシステムを使用した。カラムは、逆相C18 シリカゲルカラムとして、Φ8 mm×250 mmのカラム管にNagel 社のNucleosil C18 (5 μ) を充填したもの、陰イオン交換カラムとしてTOSOのTSK-gel DEAE2SW (Φ5 mm×300 mm) をそれぞれ使用した。

6. BLM による切断実験

オリゴDNA の5'末端に ^{31}P リン酸をT4 polynucleotid kinase (New England Biolabs)、 γ - ^{31}P -ATPを用いて導入した。過剰の γ - ^{31}P -ATPは逆相C18 カラム (Waters, SEP-PAK) で除去した。

5'標識DNA (50 μM) およびBLM- Fe^{2+} (50 μM) を10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.1) に溶かして、最終濃度0.2 mMの H_2O_2 を加えた。反応は0 °C、15分である。その後、等量の10 mM EDTAを加えて反応を止めコンセントレーターで乾固した。

7 M 尿素入り20 % PAGE で分析し、スポットを液体シンチレーションカウンター (Aloka LS-621) で定量した。

7. NMR 測定の一般的手法

7. 1 NMR サンプルの調製

DNA はあらかじめ必要量の緩衝液 (0.1M NaCl, 10mM Sodium Phosphate Buffer (pH 6.8)) を加えて凍結乾燥したものを、軽水 ($\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$ 、9:1 v/v または 8:1 v/v) あるいは重水 (99.98 % D_2O) に溶かして用いる。但し重水中で測定する場合は

サンプルをD₂Oで何回か凍結乾燥して、交換性プロトンをすべてDに置換しておいたものを用いた。

ただし、BLM及びBLM-金属複合体、および滴定実験のサンプルはリン酸バッファーを用いず、水から凍結乾燥したものを軽水及び重水に溶かした。その後、NaOD及びDCIの希薄溶液を用いて、目的のpHに調製した。

7. 2 ¹H-NMRスペクトル

5mmのプロトン専用プローブを用いて、通常のシングルパルスを用いて測定した。パルス幅は6.0 μs (60°)、デジタル分解能は0.6 Hzである。化学シフトはtBuODを内部標準(1.23ppm)として用いた。

イミノプロトンの測定はSS 1-1パルス²⁹⁾を使用して、H₂Oのシグナルから約5000Hz低磁場側を中心に励起して、H₂Oの信号を抑制した。

7. 3 ³¹P-NMRスペクトル

³¹P-NMRの測定は5mmのリン専用プローブを用いて、プロトン側完全デカップリングに於けるシングルパルスを用いた。用いたパルス幅は約6.0 us(60°)である。リンの化学シフトはTrimethyl Phosphate(5% in EtOH)をガラスキャピラリー中に封管して、外部標準(0.0 ppm)にして表示した。

7. 4 2次元NMRの測定

2次元NMRの測定は、すべてPLEXUSに標準仕様の純吸収モードパルスで行なった(States, et al.)。⁹³⁾観測ポイントは2048(F2) × 256(F1)ポイントで、いずれのスペクトルも最低80回以上の積算を行った。

軽水中でのDQF-COSYは、DANTEパルスによりH₂Oシグナルを選択飽和して、サブレッショニングを行っている。2D-HOHAHAの測定には、スピンロッキングにMLEV-17パルストレインを出力約2Wで用いた。⁹⁴⁾

全ての2次元データは、F1側のカラムポイントを4倍にzero fillingしたのちフーリエ変換を行った(2048 × 1024 ポイント)。ウインドウ関数は、DQFでは両側ともExponential関数を用いた。NOESY、HOHAHA、2D-INEPTでは両者にそれぞれ、若干シフトさせたGaussian関数のウインドウを用いた。

8. NMRによるDNAの一般的帰属法(連鎖帰属法)^{54a, 73)}

DNAのプロトンシグナルはNOE(nuclear Overhauser effect)を利用した"連鎖



帰属法(sequential assignment) "により帰属することができる(図55)。この方法は、DNAの構造を巧みに利用したみごとな帰属方法であるが、以下その概略を述べる。

8. 1 交換性プロトン(exchangeable protons)

はじめに、イミノおよびアミノプロトンシグナルの帰属方法について説明する。

イミノプロトンの帰属は、先に述べた様にNOEを利用する。

まず塩基対内のNOEから、そのイミノプロトンがA:T, G:C塩基対のどちらに由来するものかを区別する。Tのイミノプロトンは、近接したA-H2プロトンとの強いNOEが観察される(図11参照)。GのイミノプロトンではC-C4NH₂プロトンとのプロードな二本一組のNOEが観察される。通常、A-C4NH₂とG-C2NH₂のアミノ基プロトンは溶媒との交換が速いため観測/帰属できない。

以上のようにしてA:T対, G:C対の区別をした後、隣り合った塩基対間の(イミノ)-(イミノ)プロトン間、あるいは(イミノ)-(A-H2)プロトン間のNOEを連続的に追跡して、それらがどの様な順番で並んでいるかを決定する。

8. 2 非交換性プロトン(nonexchangeable protons)の帰属

次に、C-Hプロトンの帰属方法について説明する(これらのプロトンは非交換性プロトン(nonexchangeable protons)と呼ばれる)。

DNAは、図55に示す様に、デオキシヌクレオシド残基がリン酸ジエステル結合によりつながれた構造を持っている。そこで帰属は、このヌクレオシド残基内のプロトンシグナルの組みを同定し、それぞれの残基がDNA鎖上でどのような順番で並んでいるかを決める(sequential assignment)と言う手順をとる。

ヌクレオシド残基内の糖部プロトンは、H1'-H2'/H2"-H3'-H4'-H5'/H5"と、すべてスピン結合により結ばれているので、スピン結合による相関を示すCOSYスペクトルで同定できる。しかし、このヌクレオシド残基間にはリン酸基が存在し、プロトンのスピン結合のネットワークが途切れてしまうため、隣接した残基間のNOEを利用したシーケンシャルな帰属法が一般に用いられている。^{54a, 73}

この方法では、DNAが右巻二重らせん構造をとる時、塩基部プロトン(H8/H6)が同じ残基(n)の糖部H1', H2'/H2"及び5'側残基(n-1)のH1', H2'/H2"と近接することを利用する(図55)。この塩基部と糖部プロトン間の残基間のNOEによる配列に沿ったつながり(sequential NOE connectivity)から、残基の並びを知ることができる。以上のように、非交換性プロトン(nonexchangeable protons)シグナルは、高次構造を利用したNOE情報(NOESY)にスピン結合情報(COSY)を組み

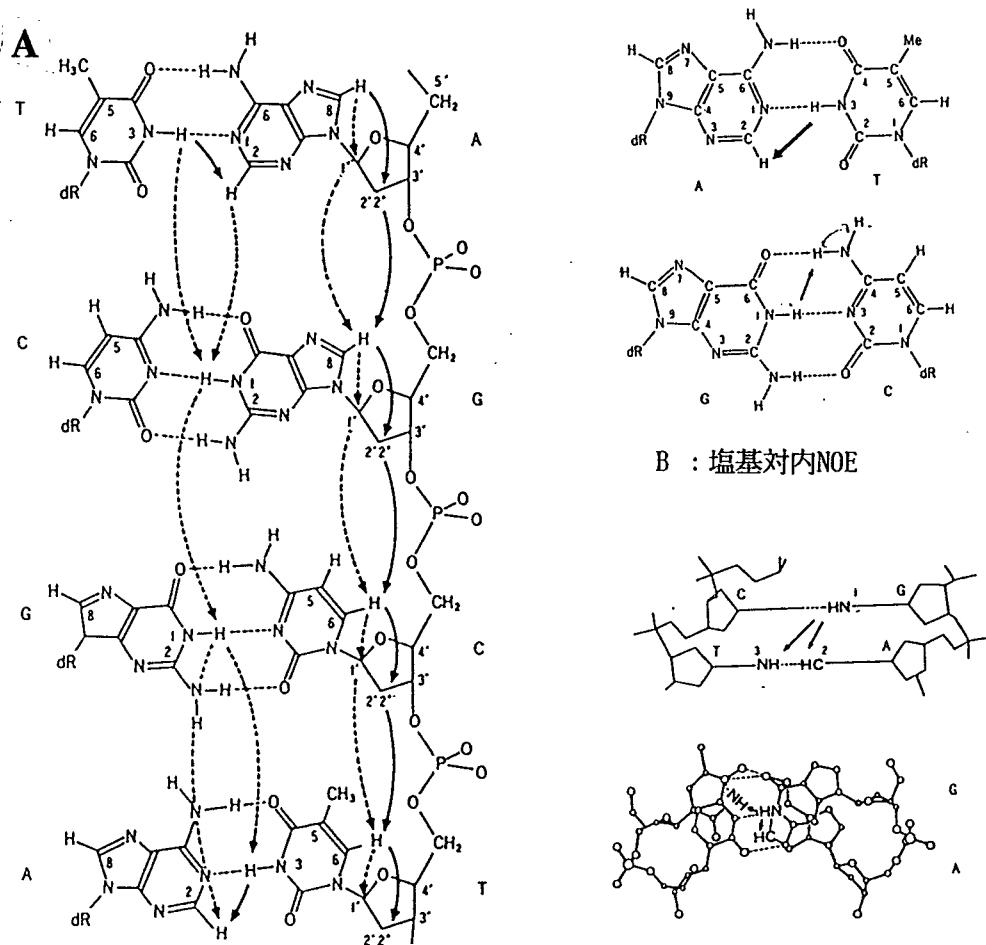


図55 Sequential NOE の道筋とイミノプロトンシグナルのNOE

合わせることにより帰属した。

帰属の結果は、本文中の表（表3、表6、表9）にそれぞれ示した。

第一章の実験

1. CDによる滴定実験

GC-12 およびAT-12 : 20nmolをそれぞれ緩衝液(0.1M NaCl, 10mM Tris-HCl(pH 7.5)) 3ml に溶解した。スピッツごと熱湯につけ一晩かけて放冷したものを、光路長10mmのセルで測定しながら、BLM-Ni²⁺の溶液(4mM)で滴定した。

GC-12 と BLM-Ni²⁺の結合定数は、260 nmでの [θ] 値の変化を BLM 濃度に対して

プロットして、非線形最小二乗法によるカーブフィッティングにより求めた。

2. 蛍光による滴定実験

BLM-金属錯体 6.7 nmol を前述の緩衝液2 mlに溶かしたもの光路長10mmの四面研磨無蛍光セルで測定した。

DNA は予め4 mMに調製し、一晩かけて上記同様アニーリングしたものを用いて滴定実験を行った。その際蛍光は励起光の波長を300 nmとしてシャッターを開けた直後の350 nmの蛍光強度を記録した。シャッターを閉じてから次の測定を行なうまでに最低5分の間隔を置いて、蛍光の飽和現象に留意した。

3. GC-12 のNMRによる滴定実験

GC-12 1 μ mol を 0.1M NaCl 400 μ l を加えて凍結乾燥し、その後400 μ l のH₂O-D₂O (8:2, v/v) を加えてNMR サンプルチューブ内でpHを7.2 に合わせた。その後アニーリングを行い、5mm のリン専用プローブ中で10°Cで滴定を行った。BLM-金属錯体は、0.5 μ mol を予め凍結乾燥した後、48 μ l のH₂O-D₂O (8:2, v/v) に溶かして滴定に用いた。測定は先述した方法でリンを観測し、次にイミノプロトンのシグナルをSS 1-1パルスで観測した。

pHはBLM-金属錯体を加える度に、NaOD、DCl の希薄溶液で中性付近 (pH6.9 ~ 7.2) にコントロールした。

4. GC-12 + BLM-Ni²⁺複合体の2次元NMR

GC-12 1 μ mol を 0.1M NaCl 400 μ l を加えて凍結乾燥し、その後200 μ l の99.96 % D₂O に溶解した。BLM-Ni²⁺は1 μ mol を凍結乾燥した後、99.96 % D₂O 100 μ l に溶解してpHを7.2 に合わせ、NMR サンプルチューブ中のDNA に加えた後、pHを確認した。pHを7.2 に調整した後D₂O を加えて容量を400 μ l とした。

このサンプルを、30°Cで混合時間250 msのNOESY およびDQF-COSY (いずれも純吸収モード) を測定した。

5. GT-12 のNMRによる滴定実験

GT-12 1.0 μ mol を 0.1 M NaCl 400 μ l を加えて凍結乾燥し、その後400 μ l のH₂O-D₂O (9:1, v/v) または99.98 % D₂O に溶解して、NMR サンプルチューブ内でpHを6.8 に合わせた。その後アニーリングを行い、5 mmの高感度プロトン専用プローブ中で10°Cで滴定を行った。BLM-Vo³⁺は、1.2 μ mol を予め凍結乾燥した後、

48 μ l のH₂O-D₂O (9:1, v/v) または99.98 % D₂O に溶かして滴定に用いた。イミノプロトンの測定はSS 1-1パルスで観測した。塩基部プロトンおよびメチルプロトンはD₂O 中で通常のシングルパルスをもちいて観測したが、滴定にともない増大するHOD のプロトンシグナルをホモゲート照射により抑制した。

pHはBLM-金属錯体を加える度に、NaOD、DC1 の希薄溶液でpH6.7 ~6.9 の範囲内に調整した。

第二章の実験

1. BLM-VO³⁺の非交換性プロトンの帰属

BLM-VO³⁺ (2 μ mol) を凍結乾燥して、0.1 M NaCl / 99.98 % D₂O 400 μ l に溶解して、pH 6.8に調整した。DQF-COSY、および2D-HOHAHA (MLEV-17, 混合時間 80 ms, 30 ms) を30°Cと15°Cで測定して、それぞれのスピン系を明らかにし、Akkermanらの文献(23, 49) に従い帰属を行った。

2. BLM-VO³⁺の交換性プロトンの帰属

BLM-VO³⁺ (2 μ mol) を凍結乾燥して、0.1 M NaCl / H₂O-D₂O (9:1, v/v) 400 μ l に溶解して、pH 6.8に調整した。溶媒信号をDANTE で抑制したDQF-COSYを30°Cで測定して先に決定した非交換性プロトンとの相関からいくつかのNHは帰属できたが、照射により信号強度が小さくなり、帰属できないものもあった。それらは観測パルスに1-1 echoを用いたNOESY を15°Cで測定し、隣接する非交換性プロトンとのNOE より決定した。

3. BLM-VO³⁺のGT-12 による滴定実験

BLM-VO³⁺ (1.0 μ mol) を0.1 M NaCl / H₂O-D₂O (9:1, v/v) 400 μ l に溶解して、pH 6.8に調整した。GT-12 (1.5 μ mol) を一度99 % D₂O (100 μ l) に溶解して、80°Cで10時間incubateする。この操作でDNA のプリンH8はおよそ90 %以上が重水素に置換されるので、滴定の解析が容易になった。DNA はその後凍結乾燥して、0.1 M NaCl / H₂O-D₂O (9:1, v/v) (45 μ l) に溶解して滴定実験に用いた。10°Cで1-1 パルスを用いて、アミドプロトンを観測しながらGT-12 を滴下した。

pHはBLM-金属錯体を加える度に、NaOD、DC1 の希薄溶液でpH6.7 ~6.9 の範囲内に調整した。

4. GT-12 + BLM-VO³⁺複合体の2次元NMR

GC-12 1 μmol を 0.1M NaCl 400 μl を加えて凍結乾燥し、その後200 μl の 99.98 % D₂O に溶解した。BLM-VO³⁺は1 μmol を凍結乾燥した後、99.98 % D₂O 100 μl に溶解してpHを6.8 に合わせ、NMR サンプルチューブ中のDNA に加えた後、pHを確認した。pHを6.8 に調整した後D₂O を加えて容量を400 μl とした。

このサンプルを、15°CでNOESY(混合時間150、250、および400 ms) および2D-HOHAHA (MLEV-17, 混合時間 30 ms) を15°Cで測定した。

5. モデルの構築

モデル構築に用いたBLM の初期座標は、チバガイギー国際研究所の合田圭吾氏にご供与頂いたものを使用した。B 型DNA (GT-12) は大型計算機ACOS 930 (NEC) 上でプログラムMOLCON (藤井、1984) を用いて作成した。両者の座標を結合して、グラフィクスコンピューターTITAN (久保田製作所) 上でプログラムMOLGRAPHを用いてモデル構築を行った。

第三章の実験

1. 計算機実験

計算は全て、大阪大学蛋白研究所結晶解析センターの大型計算機ACOS 930 (NEC) を用いて行った。

分子動力学計算はXPLOR ver 1.5⁸²⁾ を用いて行った。立体図の作成は、PLUTO を用いた。またせんのパラメーターの計算は、BIOCON89 (藤井、1989) で行った。

2. 分子動力学計算に用いたエネルギー関数および主要パラメーター

実際にプログラムXPLOR を使用するにあたって、本論ではふれなかつたいくつかのエネルギー関数およびパラメーターについてここに列記する。

リンの全体の電荷は、-0.32 e とした。⁹⁵⁾ これは溶媒和の効果を1/r スクリーニング関数によって近似したものである。⁹⁶⁾

プロトン間距離 (表11) には、それぞれの距離(r_{ij}) に従い、誤差を含んだ値として上限(r_{ij}^u)と下限(r_{ij}^l)を次のように見積もった。

| r_{ij} | r_{ij}^{-1} | r_{ij}^u (Å) |
|-----------|-----------------|-----------------|
| ~ 3.0 | $r_{ij} = 0.20$ | $r_{ij} + 0.25$ |
| 3.0 ~ 3.5 | $r_{ij} = 0.25$ | $r_{ij} + 0.30$ |
| 3.5 ~ 4.0 | $r_{ij} = 0.30$ | $r_{ij} + 0.35$ |
| 4.0 ~ | $r_{ij} = 0.60$ | $r_{ij} + 0.25$ |

上記のような、誤差を含んだ距離にたいして、square-well 関数による擬似エネルギー項（式2）で表される束縛をかけた。

$$\begin{aligned}
 E_{NOE} &= k_{NOE} (r_{ij}^{cal} - r_{ij}^u)^2 & \text{if } r_{ij}^{cal} > r_{ij}^u \\
 &= 0 & \text{if } r_{ij}^u \geq r_{ij}^{cal} \geq r_{ij}^u \\
 &= k_{NOE} (r_{ij}^{cal} - r_{ij}^{-1})^2 & \text{if } r_{ij}^{cal} < r_{ij}^{-1}
 \end{aligned} \quad (2)$$

また二面角に関する束縛条件も同様に行つた（3）。

$$\begin{aligned}
 E_{CDIH} &= k_{CDIH} (\phi_{ij}^{cal} - \phi_{ij}^u)^2 & \text{if } \phi_{ij}^{cal} > \phi_{ij}^u \\
 &= 0 & \text{if } \phi_{ij}^u \geq \phi_{ij}^{cal} \geq \phi_{ij}^u \\
 &= k_{CDIH} (\phi_{ij}^{cal} - \phi_{ij}^{-1})^2 & \text{if } \phi_{ij}^{cal} < \phi_{ij}^{-1}
 \end{aligned} \quad (3)$$

以上

引 用 文 献

- 1 Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T. and Okami, Y. (1966) *J. Antibiot.* 19A, 200-209.
- 2 Hecht, S.M. (1979) *Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects*, Springer-Verlag, New York.
- 3 Stubbe, J. and Kozarich, J.W., (1987) *Chem. Rev.* 87, 1107-1136.
- 4 Umezawa, H., Suhara, Y., Takita, T. and Maeda, K. (1966) *J. Antibiot.* 19A, 210-218.
- 5 Suzuki, H., Nagai, K., Yamaki, H., Tanaka, N. and Umezawa, H. (1971) *J. Antibiot.* 22, 446-448.
- 6 D'Andrea, A.D. and Haseltine, W.A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 3608-3612.
- 7 鈴木匡 博士論文 (1986) 京都大学
- 8 Kross, J., Henner, D., Haseltine, W.A., Rodriguez, L., Levin, M.D. and Hecht, S.M. (1982) *Biochemistry* 21, 3711-3721.
- 9 Fisher, L.M., Kuroda, R. and Sakai, T.T. (1985) *Biochemistry* 24, 3199-3207.
- 10 DeRiemer, L.H., Meares, C.F., Goodwin, D.A. and Diamanti, C.I. (1979) *J. Med. Chem.* 22, 1019-1023.
- 11 Takeshita, M., Grollman, A.P., Ohtsubo, E. and Ohtsubo, H. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 5983-5987
- 12 Mirabelli, C.K., Ting, A., Huang, C.H., Mong, S. and Crooke, S.T. (1982) *Cancer Res.* 42, 2779-2785.
- 13 Levy, M.J. and Hecht, S.M. (1988) *Biochemistry* 27, 2647-2650.
- 14 Kuroda, R., Neidle, S., Riordan, J.M. and Sakai, T.T. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 4753-4763.
- 15 Dickerson, R.E. (1986) In Smi, M.G. and Grossman, L. (eds.), *Mechanism of DNA Damage and Repair: Implications for Carcinogenesis and Risk Assessment in Basic Life Sciences*. Plenum, New York, Vol. 38, p. 245-255.
- 16 Kuwahara, J. and Sugiura, Y. (1988) *Proc. Acad. Natl. Sci. U.S.A.* 85, 2459-2463.
- 17 Sausville, E.A., Peisach, J., and Horwitz, S.B. (1978) *Biochemistry* 17, 2740-2746.
- 18 Sausville, E.A., Stein, R.W., Peisach, J., and Horwitz, S.B. (1978) *Biochemistry* 17, 2746-2754.
- 19 Sausville, E.A., Peisach, J., and Horwitz, S.B. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 814-822.
- 20 Iitaka, Y., Nakamura, H., Nakatani, T., Muraoka, Y., Fujii, A., Takita, T. and Umezawa, H., (1978) *J. Antibiot.* 31, 1070-1072.
- 21 Hiroaki, H., Nakayama, T., Ikehara, M. & Uesugi, S. (1991) *Chem. Pharm. Bull.* 39, 2780-2786.

- 22 コットン・ウィルキンソン 基礎無機化学 (1979) 培風館
- 23 Akkerman, M.A.J., Haasnoot, C.A.G. and Hilbers, C.W. (1988)
Eur. J. Biochem. 173, 211-225.
- 24 Sugiyama, H., Kilkuskie, R.E., Chang, L.H., Ma, L.T., Hecht, S.M.,
van der Marel, G.A. and van Boom, J.H. (1986) J. Am. Chem. Soc. 108,
3852-3854.
- 25 Chien, M., Grollman, A.P. and Horwitz, S.B. (1977) Biochemistry 16,
3641-3647.
- 26 Huang, C.H., Galvan, L. and Crooke, S.T. (1980) Biochemistry 19,
1767-1767.
- 27 Kasai, H., Naganawa, H., Takita, T. and Umezawa, H. (1978) J. Antibiot.
31, 1316-1320.
- 28 Sakai, T.T., Riordan, J.M. and Glickson, J.D. (1982) Biochemistry 21,
805-816.
- 29 Clore, G.M., Kimber, B.J. and Gronenborn, A.M. (1983) J. Magn. Reson.
54, 170-174.
- 30 Takegoshi, K., Tsuda, S. and Hikichi, K. (1990) J. Magn. Reson. 89,
399-405.
- 31 Gorenstein, D.G. and Kar, D. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun.
65, 1073-1080.
- 32 Gorenstein, D.G., Luxon, B.A., Goldfield, E.M., Lai, K. and
Vegeais, D. (1982) Biochemistry 21, 580-589.
- 33 Asakura, H., Hori, M. and Umezawa, H. (1975) J. Antibiot. 28, 537-542.
- 34 廣明秀一 修士論文 (1989) 大阪大学
- 35 Waring, M.J. (1981) Ann. Rev. Biochem. 50, 159-192.
- 36 Povirk, L.F., Hogan, M. and Dattagupta, N. (1979) Biochemistry
18, 96-101.
- 37 Booth, T.E., Sakai, T.T. and Glickson, J.D. (1983) Biochemistry
22, 4211-4217.
- 38 Saenger, W. (1983) Principles of Nucleic Acid Structure.
Springer-Verlag, New York.
- 39 Tsai, C.C., Jain, S.C. and Sobell, H.M. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A. 72, 628-632.
- 40 Feigon, J., Denny, W.A., Leupin, W. and Kearns, D.R. (1984) J. Med.
Chem. 27, 450-465.
- 41 Gamcsik, M.P., Glickson, J.D. and Zon, G. (1990) J. Biomol.
Struct. Dynam. 7, 1117-1133.
- 42 Wilson, W.D. and Jones, R.L. (1982) Nucleic Acid Res. 10, 1399-1410.
- 43 Hecht, S.M. (1986) Acc. Chem. Res. 19, 383-391.
- 44a Uesugi, S., Shida, T., Ikehara, M., Kobayashi, Y. and Kyogoku, Y.
(1982) J. Am. Chem. Soc. 104, 5494-5495.
- b Uesugi, S., Shida, T., Ikehara, M., Kobayashi, Y. and Kyogoku, Y.
(1984) Nucleic Acid Res. 12, 1581-1592.

- c Uesugi,S., Shida,T., Miyashiro,H., Ikehara,M., Kobayashi,Y. and Kyogoku,Y. (1984) In Zalewski,R.I. and Skolik,J.J. (eds.), *Natural Products Chemistry 1984*. Elsevier, Amsterdam. p.559-574.
- 45 Nakayama,T. and Uesugi,S. unpublised results.
- 46 Sugiyama,H. personal communication.
- 47 Glickson,J.D., Pillai,R and Sakai,T.T. (1981) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 78, 2967-2971.
- 48 Haasnoot,C.A.G., Pandit,U.K., Kruk,C. and Hilbers,C.W. (1984) *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2, 449-467.
- 49 Akkerman,M.A.J., Haasnoot,C.A.G., Pandit,U.K. and Hilbers,C.W. (1988) *Magn. Reson. Chem.* 26, 793-802.
- 50 Akkerman, M.A.J., Neijman, E. W. J. F., Wijmenga, S.S., Hilbers, C.W. and Bermel, W. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 7462-7474.
- 51a Gao,X. and Patel,D.J. (1989) *Biochemistry* 28, 751-762.
- b Gao,X. and Patel,D.J. (1990) *Biochemistry* 29, 10940-10956.
- 52 Kopka,M.L., Yoon,C., Goodsell,D., Pjura,P. and Dickerson, R.E. (1985) *Proc. Acad. Natl. Sci. U.S.A.* 82, 1376-1380.
- 53 Morii,T., Saito,I., Matsuura,T., Suzuki,T., Kuwahara,J. and Sugiura,Y. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 108, 7089-7094 (also see ref 63.)
- 54a Patel,D.J. and Canuel,L.L. (1979) *Eur. J. Biochem.* 96, 267-276.
- b Patel,D.J. (1979) *Eur. J. Biochem.* 99, 369-378.
- c Patel,D.J. and Shapiro,L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 1230-1240.
- 55a Patel,D.J., Shapiro,L. and Hare,D. (1986) *Biopolymers* 25, 693-706.
- b Patel,D.J. and Shapiro,L. (1986) *Biopolymers* 25, 707-727.
- 56a Klevit,R.E., Wemmer,D.E. and Reid,B.R. (1986) *Biochemistry* 25, 3296-3303.
- b Pelton,J.G. and Wemmer,D.E. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 1393-1399
- 57a Lee,M., Chang,D.K., Hartley,J.A., Pon,R.T., Krowicki,K. and Lown,J.W. (1988) *Biochemistry* 27, 445-455.
- b Lee,M., Hartley,J.A., Pon,R.T., Krowicki,K. and Lown,J.W. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 665-684.
- C Lee,M., Krowicki,K., Hartley,J.A., Pon,R.T., and Lown,J.W. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110, 3641-3649.
- 58a Dervan,P.B. (1986) *Science* 232, 464-469.
- b Hertzberg,R.P. and Dervan,P.B. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* 104, 313-314.
- c Schultz,P.G. and Dervan,P.B. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 6834-6838.
- 59 Arnott,S. and Hukins,D.W.L. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 1504-1509.
- 60 Sheridan,R.P. and Gupta,R.K. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 1242-1247.

- 61 Maeda, K., Kosaka, H., Yagishita, H. and Umezawa, H. (1956) *J. Antibiot.* 9A, 82-86.
- 62 Kross, J., Henner, D., Hecht, S.M. and Haseltine, W.A. (1982) *Biochemistry* 21, 4310-4318.
- 63 Morii, T., Saito, I., Matsuura, T., Kuwahara, J. and Sugiura, Y. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 938-939.
- 64 Ikekawa, T., Iwami, F., Hiranaka, H. and Umezawa, H. (1964) *J. Antibiot.* 17A, 194-198.
- 65 Kawaguchi, H., Tsukiura, H., Tomita, K., Konishi, M. and Umezawa, H. (1977) *J. Antibiot.* 30, 779-784.
- 66 Mirabbeli, C.K., Huang, C.H. and Crooke, S.T. (1983) *Biochemistry* 22, 300-306.
- 67 Mirabbeli, C.K., Beatti, W.G., Huang, C.H., Prestayko, A.W. and Crooke, S.T. (1982) *Cancer Res.* 42, 1399-1404. (also see ref. 12)
- 68a Ohlendorf, D.H. and Mathews, D.W. (1983) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 12, 259-284.
- b Caruthers, M.H. (1980) *Acc. Chem. Res.* 13, 155-174.
- 69 Nishimura, Y., Torigoe, C., Katahira, M., Tate, S., Tanaka, K., Tsuboi, M., Matsuzaki, J., Hotoda, H., Sekine, M. and Hata, T. (1986) *Nucleic Acids Symposium Series*, 17, 195-198.
- 70 Ivanov, V.I., Minchenkova, L.E., Schyolkina, A.K. and Polestayev, A. (1973) *Biopolymers* 12, 89-100.
- 71 Heineman, U., Lauble, H., Frank, R. and Blocker, H. (1987) *Nucleic Acids Res.* 16, 9531-9551.
- 72 Sakaguchi, R., Katahira, M., Kyogoku, Y. and Fujii, S. (1991) *J. Biochem.* 109, 317-327.
- 73 Wuethrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, New York.
- 74 Katahira, M., Sugeta, H., Kyogoku, Y. and Fujii, S. (1990) *Biochemistry* 29, 7214-7222.
- 75a Chary, K.V.R., Hosur, R.V., Govil, G., Zu-kun, T. and Miles, H.T. (1987) *Biochemistry* 26, 1315-1322.
- b Chary, K.V.R., Sandeep, M., Hosur, R.V., Govil, G., Chen, C.Q. and Miles, H.T. (1988) *Biochemistry* 27, 3858-3867.
- 76a Gochin, M., Zon, G. and James, T.L. (1990) *Biochemistry* 29, 11161-11171.
- b Schmitz, U., Zon, G. and James, T.L. (1990) *Biochemistry* 29, 2357-2368
- 77a Nilges, M., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Brunger, A.T., Karplus, M. and Nilsson, L. (1987) *Biochemistry* 26, 3718-3733.
- b Happ, C.S., Happ, E., Nilges, M., Gronenborn, A.M. and Clore, G.M. (1988) *Biochemistry* 27, 1735-1743.
- 78 Otting, G., Grutter, R., Leupin, W., Gait, M.J. and Wuethrich, K. (1987) *Eur. J. Biochem.* 166, 215-220.

- 79 Sklenar, V., Brooks, B., Zon, G. and Bax, A. (1987) FEBS Lett. 216, 249-252.
- 80 Takegoshi, K., Tsuda, S and Hikichi, K. (1989) J. Magn. Reson. 85 198-202. (also see ref. 30)
- 81a Clore, G.M., Oschkinat, H., McLaughlin, L.W., Benseler, F., Happ, C.S., Happ, E. and Gronenborn, A.M. (1988) Biochemistry 27, 4185-4197.
- b Gronenborn, A.M. and Clore, G.M. (1989) Biochemistry 28, 5978-5984.
- 82 Brunger, A.T. (1988) X-PLOR 1.5 Manual, Yale University, New Heaven, CT.
- 83 Weiner, P., and Killman, P.A. (1981) J. Comput. Chem. 2, 287-303.
- 84 de Vlieg, J., Boelens, R., Scheek, R.M., Kaptein, R. and van Gunstern, W.F. (1986) Israel J. Chem. 27, 181-188.
- 85 Hare, D.R., Wemmer, D.E., Chou, S.H., Drobny, G. and Reid, B.R. (1983) J. Mol. Biol. 171, 319-336.
- 86 Metzler, W.J., Wang, C., Kitchen, D.B., Levy, R.M. and Pardi, A. (1990) J. Mol. Biol. 214, 711-736.
- 87 Banks, K.M., Hare, D.R. and Reid, B.R. (1989) Biochemistry 28, 6996-7010.
- 88 Chary, K.V.R., Hosur, R.V., Govil, G., Chen, C.Q. and Miles, H.T. (1988) Biochemistry 27, 3858-3867. (also see ref. 75)
- 89 Verlet, L., (1967) Phys. Rev. 159, 98-105.
- 90 Rychaert, J.P., Cicotto, G. and Berendsen, H.J.C. (1977) J. Comput. Phys. 23, 327-337.
- 91 Katahira, M., Sugeta, H. and Kyogoku, Y. (1990) Nucleic Acids Res. 18, 613-618.
- 92 Kojima, C., Ohkubo, T. and Kyogoku, Y. (1991) Nucleic Acids Symp. Ser. 25, 177-178.
- 93 States, D.J., Haberkorn, R.A. and Rubern, D.J. (1982) J. Magn. Reson. 48, 286-292.
- 94 Bax, A., and Davis, D.G. (1985) J. Magn. Reson. 65, 355-360.
- 95 Tidor, D.H., Irikura, K., Brooks, B.R., and Karplus, M., (1983) J. Biomol. Struct. Dyn. 1, 231-252.
- 96a Gelin, G.R. and Karplus, M., (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2002-2006.
- b Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S. and Karplus, M. (1983) J. Comput. Chem. 74, 187-217.

以上

