

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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



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

廣明 秀一

DNA	=	deoxyribonucleic acid
BLM	=	bleomycin
A	=	adenine
G	=	guanine
С	=	cytosine
T	=	thymine
I	=	inosine
Pu	=	purine
Ру	=	pyrimidine
GC-12	=	synthetic dodecadeoxynucleotides d(CCCCAGCTGGGG)
AT-12	=	synthetic dodecadeoxynucleotides d(CCCCAATTGGGG)
GT-12	=	synthetic dodecadeoxynucleotides d(CCACCTAGGTGG)
GA-12	=	synthetic dodecadeoxynucleotides d(GGGGAGCTCCCC)
GA'-12	=	synthetic dodecadeoxynucleotides 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
2 D	=	two dimentional
NOE	=	nuclear Overhauser effect (or enhancement)
NOESY	=	2D nuclar Overhauser (and exchange) spectroscopy
COSY	=	2D correlation spectroscopy
DQF-COSY	=	double quantum filtered - COSY
НОНАНА	=	homonuclear Hartmann-Hahn polarization transfer
2D-HOHAH	4 =	2D homonuclear Hartmann-Hahn polarization
÷		transfer spectroscopy
DANTE	=	delays alternating with nutaion for Tailored
		excitation
J	=	coupling constant
Tm	=	melting temperature

`

目次

序論			1
本論			7
第一	-章 BLN	A 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(<u>GC-12</u>) 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(<u>GT-12</u>) 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	二章 BLM	И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(<u>GT-12</u>) 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 のマイナーグルーブ結合による	
		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 GA-12 の性質 ------71 <u>GA-12</u>の2D-NMRによる解析 -----第二節 75 第三節 84 第四節 考察と『BLM-DNA マイナーグルーブ 結合モデル』の検証 ------90 結論 96 謝辞 97 98 98 第二章の実験 ----- 109 _____ 110 .

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、単独で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 <u>Streptomyces verticillus</u> 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、<u>BLM がインターカレーターとし</u> 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〜<u>BLM はDNA のマイナーグ</u> ルーブ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19 80年代になって急速に研究の進んだ、他のマイナーグルーブ結合性薬物か

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<u>bind</u>することを「結合する」と訳す。そのため <u>bond</u>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

<u>得ることである。</u>

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



図3 BLM の活性化機構

- [1] BLM とDNA の結合様式の問題――インターカレーターか、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 のマイナーグルーブ側に結合して、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、いままで 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 マイナーグルーブ結合モデル、

(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。



図4 BLM のマイナーグルーブ結合モデル

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 ていない。
- [4] BLM とDNA の会合定数があまり大きくない (~10⁵ 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, ³¹P, ¹³C, ¹⁵N) 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、いままで合成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-Fe²⁺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-Fe²⁺(BLM-Fe³⁺)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Cu²⁺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Fe²⁺およびFe³⁺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 - Cu²⁺ 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-Fe²⁺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 '- Cu²⁺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。BL M 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Ni²⁺とVO³⁺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。

VO³⁺は反磁性でありNMR スペクトルに影響を与えない。Ni²⁺は低スピン 型では反磁性、高スピン型では常磁性である。実際にNMR を測定したとこ ろBLM-Ni²⁺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ブロード化させる(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、'H- 及び³¹P-NMR で追跡することである。その

Ion Radius (Å)		High Sp	Low S	Spin	BLM-metal DNA cleavage		
		Geometry ¹	Magn. ²	Geometry ¹	Magr	1.2	
VO ²⁺	(0.58) ³	o h	р			+	
VO ³⁺	(0.54) ³			o h	d	-	
Cr ²⁺		o h	р			-	
Cr ³⁺	0.615	o h	р			-	
Mn ²⁺	0.83	o h	р			+	
Fe ²⁺	0.78	o h	р	o h	đ	+	
Fe ³⁺	0.645	o h	р	o h	р	_4	
Co ²⁺	0.65	o h	р	o h	d	+5	
Co ³⁺	0.545	o h	р	o h	d.	-	
Ni ²⁺	0.69	oh/th	р	s p	d	-	
Cu ¹⁺	0.77	oh/th	р			+	
Cu ²⁺	0.73	sp/oh	р			-	
Zn ²⁺	0.74			th/oh	d	-	

1) Coordination Geometries; oh: octahetral, th: tetrahedral, sp: square-planer

2) Magnetism of Ions; d: diamagnetic, p: paramagnetic

3) The values for V^{4+} and V^{5+} 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

٦.

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 きない恐れがある。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 (生体から抽出されてきた長さ、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(CCCCAGCTGGGG)
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 はマイナーグルーブ結 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6A)、

- (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





 $_{\mathfrak{s}'}$ - X X $\underline{G C}$ X X X X X $\underline{G C}$ X X - \mathfrak{s}' \mathfrak{s}' - X X C G X X X X C G X X - \mathfrak{s}'

B





 $C \quad {}_{\scriptscriptstyle 3'-}^{\scriptscriptstyle 5'-} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle A} {}^{\scriptscriptstyle C} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle G} {}^{\scriptscriptstyle T} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle -3'} {}^{\scriptscriptstyle 3'-} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle T} {}^{\scriptscriptstyle G} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle G} {}^{\scriptscriptstyle T} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle X} {}^{\scriptscriptstyle -3'} {}^{\scriptscriptstyle -3'} {}^{\scriptscriptstyle -3'}$





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(CCCCAG)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

<u>2-1</u> CD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CD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CD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 [θ] 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 [θ] 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 = 4.0×10^5 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7A)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 かった。

2-3 イミノプロトンNMR による相互作用の検討⁻⁻

C D 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'H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。

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5' – C	Ċ	С	С	А	G	C	Т	G	G	G	G-3'
3' - G	G	G	G	Т	С	G	Α	С	С	С	C-5'
12	11	10	9	8	7	6	5	4.	3	2	1
		図1	1 G	C-12 (のナン	バリ	ングシ	ステ.	Ц		

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-VO³⁺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Ka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-Ni²⁺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、Ni²⁺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-Ni²⁺滴定実験のイミノプロトン領域¹H NMRスペクト ル。[BLM]/[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-Ni²⁺およびBLM-VO³⁺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。



2 1

1.0 (e) 。

リン酸は、核酸の糖ーリン酸骨格として、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、 $-3.5 \sim -4.5$ 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



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。

<u>2-5</u>GC-12のその他のプ 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 側のその他のブ 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3Cより明らかなように、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	н2/н5/ Сн ₃	н1'	Н2 '	H2 "	_ H3'	H4 '	N1H ^C / N3H
C1 C2 C3 C4 A5 G6 C7 T8 G9 G10 G11 G12	7.79 7.66 7.57 7.48 8.17 7.64 7.30 7.27 7.80 7.67 7.63 7.63 7.69	5.94 5.71 5.64 5.66 7.64 - 5.18 1.90 - -	5.96 6.00 5.94 5.27 6.04 5.73 5.84 5.65 5.49 5.57 5.76 6.11	2.18 2.23 2.12 2.05 2.75 2.50 1.93 1.96 2.61 2.53 2.51 2.43	2.53 2.48 2.41 2.30 2.90 2.61 2.42 2.29 2.62 2.64 2.68 2.33	4.64 4.85 4.83 4.81 5.04 4.97 4.70 4.81 4.93 4.94 4.92 4.60	$\begin{array}{r} 4.10\\ 4.20\\ 4.17\\ 4.07\\ 4.39\\ 4.36\\ 4.16\\ 4.07\\ 4.27\\ 4.31\\ 4.33\\ 4.17\end{array}$	- - - 12.80 - 14.07 13.03 13.11 13.18 13.27
base	N4H2	c	3'-P	Н5'/1	H5"			tainen tiinen tiinen t
C1 C2 C3 C4 A5 G6 C7 T8 G9 G10 G11 G12	a 8.43 8.50 8.62 - - 8.06 - - - - -	a 6.93 6.83 6.89 - - b - - - - -	$\begin{array}{r} -3.70 \\ -3.66 \\ -3.32 \\ -3.85 \\ -3.68 \\ -4.00 \\ -3.73 \\ -3.43 \\ -3.52 \\ -3.60 \\ 6.11 \end{array}$	4.08 3.78 b 4.00 4.19 b 4.06 4.12 b 4.13 b	b b 4.12 b 3.97 b b b b b			
a Not b Not	assigned assigned	becaus	e of th signed	e termin at 10°C	nal freg •	ying.		

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 Compi	exed wi	th BLM	-000			
base	Н8/Н6	н2/н5/ Сн ₃	' H1'	H2 '	H2"	НЗ '	N1H ^C / N3H
C1 C2 C3 C4 A5 G6 C7 T8 G9 G10 G11 G12	7.77 7.64 7.50 7.45 8.17 7.63 7.26 7.79 7.67 7.63 7.67	5.91 5.76 5.64 5.63 b 5.18 1.53 - -	5.95 6.00 5.93 5.31 6.05 5.73 5.86 5.67 5.50 5.58 5.73 6.08	$\begin{array}{c} 2.15\\ 2.21\\ 2.08\\ 2.00\\ 2.73\\ 2.50\\ 1.92\\ 1.95\\ 2.60\\ 2.50\\ 2.50\\ 2.50\\ 2.31\end{array}$	$\begin{array}{c} 2.53 \\ 2.47 \\ 2.38 \\ 2.23 \\ 2.90 \\ 2.61 \\ 2.40 \\ 2.27 \\ 2.63 \\ 2.60 \\ 2.55 \\ 2.43 \end{array}$	$\begin{array}{r} 4.65\\ 4.83\\ 4.81\\ 4.79\\ 5.04\\ 4.93\\ 4.69\\ 4.81\\ 4.93\\ 4.93\\ 4.93\\ 4.93\\ 4.93\\ 4.61\end{array}$	- - - 12.79 14.07 13.01 13.11 13.15 13.20
C: Ch	emical S	hift Di	fferen	ces (δ _c	comlex -	- δ _{free})	(ppm)
base	Н8/Н6	н2/н5/ Сн ₃	' H1'	н2'	Н2 "	н3'	N1H ^C / N3H
C1 C2 C3 C4 A5 G6 C7 T8 G9 G10 G11 G12	$\begin{array}{c} -0.02\\ -0.02\\ -0.07\\ -0.03\\ 0.00\\ -0.01\\ 0.00\\ -0.01\\ -0.01\\ 0.00\\ 0.00\\ -0.02\end{array}$	-0.03 -0.04 0.00 -0.03 - - 0.00 0.03 - - -	$\begin{array}{c} -0.01\\ 0.00\\ -0.01\\ 0.04\\ 0.01\\ 0.00\\ 0.02\\ 0.02\\ 0.01\\ 0.01\\ -0.03\\ -0.03\end{array}$	$\begin{array}{c} -0.03 \\ -0.02 \\ -0.04 \\ -0.05 \\ -0.02 \\ 0.00 \\ -0.01 \\ -0.01 \\ -0.01 \\ -0.03 \\ -0.01 \\ -0.12 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.00\\ -0.01\\ 0.03\\ -0.07\\ 0.00\\ 0.00\\ -0.02\\ -0.02\\ 0.01\\ -0.04\\ -0.13\\ 0.10\end{array}$	$\begin{array}{c} 0.01 \\ -0.02 \\ -0.02 \\ -0.02 \\ 0.00 \\ -0.04 \\ -0.01 \\ 0.00 \\ 0.00 \\ -0.01 \\ 0.01 \\ 0.01 \end{array}$	

B: GC-12 Complexed with BLM-VO³⁺

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

. .

2 5

۸.....

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-VO³⁺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。

12 5 6 7 8 9 10 11 4 3 1 2 ${}_{5'}$ - C C A C C T A G G T G G - 3' ${}_{3'}$ - G G T G G A T C C A C C - 5' 6 5 3 2 4 9 8 7 12 11 10

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-VO³⁺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

<u>ジンメチルプロトン部分の変化</u> 更に筆者は、GT-12 のBLM-VO³⁺に よる滴定実験をD₂0 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-CH₃ についても追跡した (図1 9)。

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-V0³⁺の添加にともない極端



図17 GT-12 のBLM-VO³⁺滴定 実験(イミノブロン領域)

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-CH₃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(塩基部フロトン 領域) 図19 GT-12 のBLM-VO³⁺滴定実験 の¹H NMRスペクトル(T のメチルフロト 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-V0³⁺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 は長い間インターカレーターとして DNA 塩基対間にそのビチアゾール環が挟まる(インターカレートする)こ とで、DNA に結合すると考えられてきた。^{7、8、28、35-37)}インターカレータ 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 インターカレータ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。これらインターカレーターの中には、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カ レーター、ethidium bromideとDNA 複合体のX線結晶構造を示した。³⁹⁾ これらインターカレーターは、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 がインターカレーターであるとする説では説明 できない。むしろBLM がDNA のマイナーグルーブ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カレーター 薬物の影響について考察し、ついで従来から『BLM = インターカレータ 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。



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 のマイナーグルーブ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 ³¹P NMR の変化に関する考察

核酸の³¹P 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³'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、マイナーグルーブの間で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。

<u>4-3</u>BLM がインタ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] ビチアゾール環部分の蛍光の消光現象²⁵⁻²⁷⁾

[4] ビ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カレーター 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は核酸塩 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



図21 G 塩基の認識機構

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、いず れも筆者が今回の実験系から得た『BLM はDNA のマイナーグルーブに結合 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。

<u>4-4</u> 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 × 10⁵ M⁻¹であることを明らかにした。この値は長鎖の

<u>Cationic bithiazoles</u>	R ₁	R ₂	
_	CH₃CONHCH₂CH₂ —	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ S ⁺ (CH ₃) ₂	
R ₁ , _CONHR ₂			
	F S	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ S ⁺ (CH ₃) ₂	
	CH ₃ CONHCH ₂ CH ₂ —	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	
-			

図22 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。通常のインターカレーターはDNA duplexを安定化し て、そのTm(融解温度)を顕著に上昇させる。一方BLM はDNA のTm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Tmが低下した)。これらのことから、『BLM は一般的なインターカレ 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。 BLM は従来より信じられてきたようにインターカレートによって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 ーブに面している。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 ーグルーブ側に突き出している。これらの事実に基づいて、BLM はDNA の マイナーグルーブ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:A3pC4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、いま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 のマイナーグルーブ側における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 ブ結合性薬物では、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	СН3-СН-СН	A ₃ MX	
II	Р	Pymidinylpropionamide	CH2-CH	ABX	
III	v .	Methylvalerate	CH3-CH-CH-CH-CH3	A ₃ MPTX ₃	
IV	н	β-hydroxyhistidine	CH-CH	AX	
v	Α	β-aminoalanine	CH2-CH	ABX	
VI	В	Bithiazole	CH ₂ -CH ₂	AAXX	
VII	G	δ-aminobutylguanidinium	CH2-CH2-CH2-CH2	AA'MM'TT'XX'	
VIII		a-L-gulose	CH-CH-CH-CH-CH-CH2		
IX		α-D-mannose	CH-CH-CH-CH-CH-CH2		

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-VO³⁺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-VO³⁺の芳香族プロトン〜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δaminobutylguanidinium 基(G)のδ位アミドプロトンである。DNAの添加 にともない、著しいブ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 びブ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-VO³⁺の1:1 複合体 (2 drug / 1 duplex)——以下、



図25 BLM・GT-12 複合体のNOESY スヘクトル(15℃)(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。

<u>2-1 DNA 側シグナルの</u>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25Aは、B型DNA 二重鎖に特徴的な"sequential NOE"の領域を 示した。また図25B、Cはdeoxyribose の残基内のNOE を利用した、 sugar proton (H2', H2", H3', H4') 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



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 $M-VO^{3+}$ 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 ($\Delta \delta = \delta_{complex} - \delta_{pree}$)を示した。

<u>2-2</u> BLM 側のシグナルの帰属

BLM ・GT-12 複合体のBLM-VO³⁺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-VO³⁺ 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-VO³⁺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-VO³⁺の化学シフト、BLM ・GT-12 複合体におけ るBLM-VO³⁺の化学シフト、及び両者の化学シフトの差 ($\Delta \delta = \delta_{complex} - \delta_{tree}$)を示した。

Table 5: Proton Chemical Shifts for Free GT-12 and Its Complex with $BLM-VO^{3+}$, at 15°C, pH 6.8 (ppm)

A: Free GT-12

base	H8/H6	н2/н5/ СН ₃	н1 '	H2 '	H2 "	НЗ '	H4'	N1H/ N3H	N4H	2
C1	7.73	5.92	5.96	2.50	2.06	4.65	4.10	-	a .	а
C2	7.57	5.72	5.37	2.39	2.13	4.80	4.11	-	8.60	6.90
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	6.83
C5	7.46	5.45	5.79	2.44	2.03	4.70	4.11	-	8.10	6.63
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	2.51	2.54	4.93	4.34	12.80	-	_
G9	7.51	-	5.89	2.08	2.43	4.95	4.33	13 90	-	-
110	7.13	1.30	5.13	2.20	1.91	4.80	4.13	13.03	-	_
G11 G12	7.80	-	6.15	2.52	2.05	4.64	4.22	13.16	-	-
B: GT-	12 Compl	exed wi	th BLM-	-vo ³⁺						
	U9/U6	H2/H5/	H1 1	H2 ·	Н2 "	НЗ 1	H4'	N1H/	N 4 H	0
base	10/10	H4/H3/	111	112	116					2
		снз						N3H		
C1	7 70	5 97	5 95	2 49	2.04	4.66	4,12	-	ь	Ъ
C1	1.13	5 69	5.90 5 97	2.43	2.14	 C	4,12	-	b	b
C2 A3	1.0/	00.00 d	6 27	2.03	2.78	5.06	4.43	_	_	-
KJ CA	0.JI 7 92	5.29	5.82	2.45	2.04	4.76	4.21	-	Ъ	ъ
04	7.48	5.45	5.80	2.42	2.05	4.70	4.08	-	Ъ	Ъ
τ6 τ6	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	-	-
G 9	7.57	-	5,90	2.69	2.44	с	4.35	12.72	-	-
TIO	7,15	1.29	5.72	2.26	1.90	с	4.08	13.75	-	-
G11	7.83		5.61	2.68	2.60	с	4.32	12.98	-	-
G12	7.79	-	6.12	2.5	2.36	4.65	đ	12.96	-	
C: Che	mical Sh	ift Dif	ferenc	es (δ _{cc}	omlex -	δ _{free})	(ppm)			
base	H8/H6	H2/H5/	' H1'	H2 '	H2"	нз •	H4'	N1H/		
	/	снз						N3H		
<u></u>	0	-0.05	-0.01	-0.01	-0.02	0.01	0.02			
C2	õ	-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	Ō	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		
	0.01	-	-0.03	0.01	0.01	0.01	-	-0.20		

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 ($\delta_{complex} = \delta_{gree}$) (C)

۰.

Frag- ment		Chemical Shifts			Frag- ment		Chemical Shifts		
		free	+DNA	change ^a	ment		free	+DNA	change ^a
т	снз	1.11	1.10	-0.01	B	CαH2	3.23	3.08	-0.15
	CαH	4.22	4.23	0.02		сβн ₂	3.60	3.51	-0.09
	сβн	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
						NH	8.37	8.34	-0.03
Р	CαH	2.69	2.65	0.03					
	сβн	3.97	4.00	0.03	G	CαH ₂	3.23	3.20	-0.03
	ringCH ₃	2.01	2.02	0.01		CβH ₂	1.68	1.60	-0.08
	ringNH ₂	7.01	7.03	0.02		С η H ₂	1.68	1.60	-0.08
	amideNH ₂	6.51	6.51	0.00		СбH ₂	3.42	3.35	-0.07
	U U	ь	ъ	ъ		αNH	7.27	7.33	0.06
					•	δ ΝΗ	8.81	8.54	-0.27
v	αCH3	1.12	1.08	-0.04					
	η CH ₃	1.13	1.12	-0.01	gulos	e			
	CαH	2.46	2.38	-0.08		H1'	5.25	5.30	0.05
	сβн	3.72	3.73	0.01		H2 '	4.04	4.04	0.00
	СηΗ	3.87	3.85	-0.02		НЗ '	4.10	4.10	0.00
	NH	8.39	8.34	-0.05		H4 '	b	Ъ	b
						H6'	3.56	3.55	-0.01
н	CαH	5.07	5.06	-0.01		H6 ''	3.43	3.40	-0.03
	сβн	5.29	5.30	0.01					
	ringC2H	7.82	7.84	0.02	manno	se			
	ringC4H	7.28	7.26	-0.02		Н1 '	5.00	5.01	0.01
	αNH	Ъ	Ъ	-		H2 '	b	4.07	-
						НЗ '	4.71	4.64	-0.07
A	CαH	4.03	4.03	0.00		H4 '	3.92	3.80	-0.12
	сβн	2.96	2.97	0.01		H5 '	3.78	3.80	0.02
	sec.NH	Ъ	ь	-		H6'	Ъ	3.79	-
	prim.NH ₂	ь	ъ	-		Н6 ''	b	3.94	-
	amideNH ₂	7.92	7.97	0.05					
	-	Ъ	b	-					

Table 6: Proton Chemical Shifts for $BLM-VO^{3+}$ and Its Complex with GT-12, at 15°C, pH 6.8 (ppm)

表6 BLM-V0³⁺およびBLM-V0³⁺・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 ($\delta_{complex} = \delta_{rree}$)

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

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。

複合体形成時に生じたプロトン化学シフト変化 図27 (B) BLM-VO³⁺の変化 (A) GT-12 の変化

[3] BLM 上の変化は、bithiazole (B)~δaminobutylguanidinium (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 い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カレータ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-VO³⁺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-ビ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-δNH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 へのインターカレ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-δNH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。

<u>2-4</u> 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カ所大きな 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-VO³⁺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、⁵0⁹ 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、5}) 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 のマイナーグルーブ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"sequencial 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NO E 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、

 $(H8 / H6)_{i} \rightarrow (H1')_{i} \rightarrow (H8 / H6)_{i+1} \rightarrow (H1')_{i+1} \rightarrow \cdots$

(H8 / H6) $_{i} \rightarrow$ (H2'-) $_{i} \rightarrow$ (H8 / H6) $_{i+1} \rightarrow$ (H2') $_{i+1} \rightarrow$...

 $(H8 / H6)_{i} \rightarrow (H2")_{i} \rightarrow (H8 / H6)_{i+1} \rightarrow (H2")_{i+1} \rightarrow \cdots$

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29AとC、BとDをそれぞれ比較して見ると、C4H6がブロ 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℃,混合時間 250 ms)

二つの塩基対間の距離は最低でも3Å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 はインターカレーターであるかどうか?』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 のマイナーグルーブ結合による塩基認識機構の解明

BLM はマイナーグルーブから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 マイナーグルーブ結合性薬物の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ブに結合するのではない かとの考え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ブ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。

<u>3-1</u> 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 マイナーグルーブ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ブ結合性薬物と、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ブ結合性薬物、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30 マイナーグルーブ結合性薬物と BLM-B₂側鎖の比較。A:netrospin 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 らによっ 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 のマイナーグルーブ側に 水素結合をしている。それらNH はadenine N3およびthymidine C20 (carbonyl oxygen) と、 bifurcated hydrogen bondを形 成している。その際DNA の構造



NH

図31 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] <u>第一の水素結合</u>。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] <u>第二の水素結合</u>。BLM の末端アミン残基のamide NH(今回の場合、 G-δ NH) と、DNA の Py-C20 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。

図32

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。



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。

<u>3-2</u> 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





lumi PEM

図33 光異性化BLM ⁵³⁾

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34A)。^{45、46)}
- [3] Anthramycin によるDNA のG塩基の修飾(図34B)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34C)。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5Cのように、BLM-VO³⁺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18)。

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



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H₂0 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、 <u>グアニンの2位アミノ基を選択的に¹⁵N</u>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-δNH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-δNH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 ルーブ側には同じ位置に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 H_{2^N} のT-C20 や A-N3 (プロトンアクセ $_{\rm F}$ 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 H_{2^N} netropsin^{54、55)}、distamycin⁵⁶⁾、 $_{\rm F}$ 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ブ結合 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



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 を切断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扶 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 の配列特異的な切断が可能な立 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-δNHとDNA のT-C20 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、 マイナーグルーブの中で、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 のマイナーグルーブ側にある、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 鎖が切断され、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、Fe²⁺-EDTA-H₂O₂、Cu²⁺-1,10phenanthrorine-H₂O₂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 BLM-Fe²⁺ BLM-Fe²⁺



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。



Methidiumpropyl-EDTA-Fe⁺ Distamycin-EDTA-Fe⁺ 図 3 7 BLM をモデルとした人工DNA 切断分子

<u>4-2 BLM-DNA マイナーグルーブ相互作用モデルの詳細</u>

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"<u>MOLGRAPH</u>"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ブ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 のマイナーグルーブに無理なく 結合し、グルーブ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5 Å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のマイナーグルーブにはまりこみ、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 示された。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 っ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ったからである。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

く… 正対・67 12 辺を休め振るに対しても、エイル・ビー最適とな。 りは行っていない。



図38 BLM のDNA マイナーグルーブ結合モデル(上・全体図)図39 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-Fe²⁺

4-3 他のマイナーグルーブ構造モデルとの比較

BLM は長い間インターカレーターだと信じられていたが、二つのグルー プが早くからBLM がマイナーグルーブ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 のマイナーグルーブに結合している 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3 Oに示したような他のマイナーグルーブとBLM のDNA 結合領域の比較か ら、BLM のマイナーグルーブ結合を予想した。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。





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 ったからであろう。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43 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、いま までの仮説では説明できなかっ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。

<u>5-1</u> 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



図 4 4 BLM のモデルからの抽出図

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 のコンフォーメションがその活性に必要であることを示唆している。

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Δ²-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プ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 単鎖切断活性				
	100	100	100				
н н н н н н н н н н н н н н н н н н н	0	12	20				
H OH OHO H CH3	11	12	20				
	16	13	200				
CH ₃ H H O H H O H H O H O H O H O H O H O H	0	12	20				
	100	29	100				
CH3 CH3 H. H O H H OH H O CH3 CH3 H. H O CH3 CH3 CH3 H. H O CH3 CH3 CH3 H. H O CH3 CH3 CH3 CH3 CH3 CH3 CH3 CH3 CH3 CH3	52	20	100				
	90	70	100				

合成アナログの構造とプレオマイシンに対する相対的活性

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カレータ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ブ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-


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カレーションモデ 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Gamscik 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6 mer 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Tm 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ブ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 のマイナーグルーブ結合モデルの検証

……DNA の立体構造からのアプローチ

筆者の構築したBLM のDNA マイナーグルーブ結合モデルは、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(GGGGGGCCCCCC)(以下G₆C₆と略す)のうち、一カ所だけA:T 塩基対に置換 したアナログである、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。)

6 10 11 12 1 2 4 5 7 3 G G G A G C T C C C C-3' $\mathbf{F}' - \mathbf{G}$ C C C T C G A G G G G-5' 3' – C 8 7 6 5 4 3 2 1 12 11 10 9

図47 GA-12 のナンバリングシステム

<u>1-1</u> 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のある一カ所の部位を基 準にした、相対的な強度を求めることを試みた。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48A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48B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(CCCCAG)p CH₂COOH、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



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

図48 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49 CDスペクトル A:20℃、B:80℃、C:20℃ (+ 4 M NaC10₄)

図49は、それらのduplex状態(A、20℃)、一本鎖状態(B、80 ℃)、 および塩濃度を上げた状態(C、20℃、4 M 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 リビ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(GGGGCCCC)(以下G₄C₄と略す)のCDスペクトルを併せて測 定したところ、 λ_{max} = 260 nm, 285 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G₆C₆と同様に、比較的低い塩濃度(~ 4 M 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っ 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、ポリプリンーポリビリミジン接合配 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℃、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℃)の"sequential NOE"領域(A:(塩基部 proton)-(H1'), B:(base proton)-(H2'/H2"))を示す。



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51)。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52A)。

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

base	H8/H6	н2/н5/ Сн ₃	H1'	H2 '	H2 "	НЗ'	H4 '	N1H/ N3H
G1 G2 G3 G4 A5 G6 C7 T8 C9 C10 C11 C12	7.807.777.577.668.017.567.307.447.547.527.597.69	- - 7.70 5.15 1.54 5.65 5.65 5.72 5.85	5.62 5.57 5.84 5.52 6.08 5.68 5.82 6.07 5.92 5.92 6.05 6.23	2.41 2.63 2.55 2.57 2.61 2.48 2.02 2.21 2.21 2.21 2.17 2.21 2.28	2.56 2.71 2.68 2.70 2.88 2.58 2.47 2.54 2.45 2.45 2.45 2.47 2.28	4.77 4.96 4.97 5.04 4.91 4.61 4.81 4.81 4.81 4.82 4.54	$\begin{array}{r} 4.15\\ 4.31\\ 4.33\\ 4.35\\ 4.41\\ 4.35\\ 4.17\\ 4.20\\ 4.16\\ 4.15\\ 4.14\\ 4.04 \end{array}$	12.70 13.15 13.05 12.77 - 12.84 - - - -
base	N4H2	3	Н5 '	/H5"	pucł	kering		
G1 G2 G3 G4 A5 G6 C7 T8 C9 C10 C11 C12	- - 7.95 - 8.40 8.45 8.55 a	- - - - 6.42 - 6.82 6.82 7.01 a	3.70 4.06 3.96 4.10 4.19 4.26 4.05 4.06 b b 5 3.54	3.62 4.00 4.10 b 4.14 4.14 b b b b b b b b b b b b	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	- endo - endo - endo - endo - endo - endo - exo - exo - exo - exo		

^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"を形作り、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'-<u>endo</u> / C1'-<u>exo</u>コンホメー 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'-<u>endo</u>のコンホメーションをとっていると考えら

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
Cl'-exo	9.0	6.0	8.5	0.0	3.0	-14.0
04'-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

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

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<u>SPHINX</u>を用いて行っている が、⁷⁶⁾ 筆者の結果はそれら文献値ともよく一致する。

また、<u>C2'-endo</u>と<u>C1'-exo</u>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'-<u>exo</u>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っ 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, およびプロトン間距離r, 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、roおよびIoに対して、

$$\mathbf{r}_{i,j}^{6} = \left(\frac{\mathbf{I}_{0}}{\mathbf{I}_{i,j}}\right) \quad \mathbf{r}_{0}^{6} \tag{1}$$



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。)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2.46Å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ることで行った。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 ℃、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 た。

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 得られなかったので、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。

A: Intranuc	leoside						. • .					
						rij	(A)					
proton	G1	G2	G3	G4	A5	G6	C7	Т8	C9	C10	C11	C12
sugar-sugar												i
н1'-н2'	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
НЗ'-Н8/Н6	4.20	4.20	4.20		4.20	4.20	4.20	4.20	3.71	3.71	3.55	4.20
B: Internucl	leoside	(Intra	astrand)								
	residue		*			^r ij	(Å)					
	(i)	G1	G2	G3	G4	A5	G6	C7	т8	C9	C10	C11
i-(i+1) ^a	(i+1)	G2	G3	G4	A5	G6	C7	Т8	C9	C10	C11	C12
			4 20	4 00	4 00	4 80						
42'-48/46		1 20	1.20	4.20	4.20	4.20	3.54	4.20	4.20		4.20	
U2"_U0/U6		4.20	,	4.40	4.20	4.20	3.10	3.09	2.00	• • • •	2.93	3.59
H3'-H8/H6		4 20	า	1 20	1 20	3.03	4 20	3.09	2.44	2.44		2.41
H1'-H5/M5		4.20	,	4120	4.20		4.20	1 20				
H2'-H5/M5							1 20	7 9 9 9		4 20	1 20	
H2"-H5/M5							4 20	3 79		4.20	4.20	
H3'-H5/M5							-1.00	4 28				
H8/H6-H5/N	15							2 90				
H5/M5-H5/M	15							3.83				
C: Exchangea	able Pro	tons	Intern	ucleos	ide) ^b							
protor	n pair	r _{ij}	proton	pair	r _{ij}	protor	n pair	r _i	prot	ton pa	ir r	ij
(Intrastrand	1)										•	
G2H1-0	G3H1	m	G3H1-G4	4H1	1	G4H1-4	A5H2	1	A5H	2-6681	۱	
(Interstrand	i)c							-			-	
G2H1-0	C11H41	1	G2II1-C	11H42	s	G3H1-0	C10H41	1	G3H	1-C10H	42 s	
G4H1-0	с9н41	1	G4H1-C	9H42	S	G4H1-1	г8н3	1	A5H	2-т8нз	S	
G6H1-1	г8н3	1										
a M5 means (CH ₃ prote	on of	the th	ymine	residu	e.					· · · · ·	

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

^b Distances are classified into three categories. (1 = long, m = medium, s = short).

 $^{\rm c}$ H41 and H42 of cytosine are a free and a hydrogen-bonded NH₂ proton, respectively.

表11 NOESY から求めたGA-12 のプロトン間距離

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 の扶けを借りて最適構造を求めることになり、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。

<u>XPLOR</u> 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<u>CHARMM</u>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<u>AMBER</u>、⁸³⁾ de Vliegらの<u>GROMOS</u>⁸⁴⁾ 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<u>AMBER</u> が用いら れた。直接比較は行っていないものの、<u>XPLOR</u> 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、<u>DSPACE</u> (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<u>AMBER</u>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: To	rsion Ang	gle Const	raints d	for the S	Sugar Puc	kerings	(<u>+</u> 5°)
puckering	δ	v ₀	v ₁	^v 2	v 3	^v 4	
C2'-endo C1'-exo O4'-endo	154.0 121.0 95.0	-21.7 -35.2 -35.2	35.2 35.2 21.7	-35.2 -21.0 0	21.7 0 -21.7	0.0 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(ε = 180 ± 50°、ζ = -85 ± 50°、α = -70 ± 50°、β = 180 ± 50°、γ=60 ± 35°)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(<aini>、<bini>) 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。その最後の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(<arma>、<brma>)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〈arma〉と〈brma〉の二つの構造の、atomic root mean difference

1

(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(<aini>と<bini>)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31組見いだした(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。

(inter strand G1H2'-C12H4') A5H2-T8H1'	А5Н2-С9Н1'	G3H1'-C12H4'	G3H4'-C12H1'
(intra strand G1H2"-G2H2' G6H8-C7H6 T8H2'-C9H2' T8H3'-C9H6 C9H2"-C10H1' C11H6-C12H5) G2H2"-G3H2' G6H1'-C7H1' T8H2"-C9H1' T8H6-C9H6 C9H2"-C10H2'	G3H2"-G4H2' C7H1'-T8H1' T8H2"-C9H2' C9H6-C10H6 C10H5-C11H5	A5H2"-G6H2' C7H1'-T8H4' T8H2"-C9H3' C9H5-C10H5 C11H1'-C12H6	A5H2-G6H1' C7H2"-T8H2' T8H2"-C9H4' C9H2"-C10H4' C11H3'-C12H6

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

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、精度はおよばないものの、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、<arma'> <brma'> 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 energi	es			
bond	15.092	26,630	11.291	25.633
	207.700	295.278	193.156	298.838
dibodrol	299 200	322,140	295.456	330.027
dineurar impropon	11 791	26.124	5,985	25.367
Improper	-261 225	-351 822	-397.984	-376.677
V.D.W.	- JUI . J2J	-594 113	-555 589	-565.649
electrostatic	-040,017	- 384 . 113	-82 101	-80.491
hydrogen bond	-84.225	-03.134	500 707	-342 953
total	-460.384	-349.000	-529.707	-042,000
constrain energi	ies			
dihedral	-	6.375	-	6.836
NOE	-	52.871	-	52.515
total	-460.384	-290.310	-529.787	-283.02
una difference :	from NOF cor	estraints (Δ^2)		
rms difference .	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<u>CORMA</u> 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 ー項を除いたエネルギーでは、<arma'> も<brma'> 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 マイナーグルーブ結合モデル』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

1

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

を比較したものである。まず最大の特徴は、

くbrma'>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):(T8p

C7) 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 A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54参照)。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ブ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、塩基対を形成するビ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

Step	lst.	2nd.	helix	helical	roll	tilt
	base-pair	ba se-pair	rise (A)	rotation	(*)	(°)
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
averag	e of 1-11		3.319	34.3	-0.74	-0.14
averag	e of 5-7		2.874	37.6	-1.63	1.36
Standa	rd A-DNA		2.56	32.7	0.0	0.0
Standa	rd B-DNA		3.37	36.0 (32.7) ^a	0.0 (-3.60) ^a	0.0

表15 GA-12 溶液構造のらせんのパラメーター

9 1

×.

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。⁹¹⁾

4-2 BLM のDNA マイナーグルーブ結合モデルの検証

図54には、GA-12の構造と標準的なB型構造<bini>のA5~T7部位のマ イナーグルーブ側の図と、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ブ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ブ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54A、E)。第二章で構築した筆者の マイナーグルーブ結合モデルでは、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ブに沿う。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 マイナーグルーブ結合モデルは、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-C20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54D、H)。DではG6N2はC702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C702の位置がグルーブ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C702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54 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:マイナーグルーブ 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。 3.60Åに対してGA-12 では5.26Å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ったものと考えている。また仮に結合 が起こったとしても、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当な距離または方向をもった、『正しい』位置にく るとは考えにくい。従って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っている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はマイナーグルーブ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 02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のように、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 こりにくい。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、異なってい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 ーグルーブ結合モデルは、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。

<u>4-3 ポリプリン-ポリピリミジン接合部を有するDNA</u>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'-<u>endo</u>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(CGGAAGACTCTCCTCCG): d(CGGAGGAGAGTCTTCCG)] 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'-<u>endo</u>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。

- 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 × 10⁵ M⁻¹である。
 - C. BLM はインターカレーターではなく、マイナーグルーブ結合性薬 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) ビチアゾール環の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δNH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ブ結合モデルを構築した。
- 3. BLM-DNA マイナーグルーブ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ブが拡がった歪んだ 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 冨田研一教授、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 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 $60F_{254}$ (MERCK)を用いて、特別の場合を除 いてクロロホルムーメタノール(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:ビスメ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 20μ1 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 (<u>la~ld</u>) (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。



<u>3.1 亜リン酸化剤(β-cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphor-</u> <u>diamidite(2)</u>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 スコルベン中で撹拌しながら2-シアノエタノール(0.4 mol, 27 ml)を滴下して室 温で30分撹拌する。そののち未反応の過剰の三塩化リンをアスピレーター減圧下 エバポ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 晩撹拌をつづけた。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、CaH₂1 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)

<u>3.2 Diisopropylammonium tetrazolide (3) の合成</u>

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、氷冷下撹拌 しジイソプロピルアミン (2.38 ml, 17 mmol)を滴下後、15分間撹拌した。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 (la~ld) の合成

保護したヌクレオシド(1 mmol)を無水のビリジン(2 ml)に溶かして、真空ポンプ (~5 mmHg) で減圧留去した(ビリジン共沸)。ビリジン共沸は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 1,1.2 mmol) をシリンジで滴下 し、室温で30分間振とう撹拌した。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 (<u>1a</u>, <u>1c</u>, <u>1d</u>) の平均収率が90% であるのに対して、dG誘導体 (<u>1b</u>) は65% 前後であった。

 3.4 オリゴヌクレオチドの合成(縮合 10μmol スケール)

 [試薬] ヌクレオシド化CPG
 10μmol

 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

 0.1 M DMAP /ビリジン溶液
 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 μmol (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。

1 0 0

	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 15m1 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 0.2m1 DMAP溶液 1.8m1 1分間
[4]	酸化	ヨウ素溶液 2ml 1分間

[各操作の説明]

<u>ヌクレオシド化CPGの準備</u>

- 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10m1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。

1`0 1

- 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0.2m1、DMAP溶液1.8m1 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,3h 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逆相オープンカラムによる精製
 - カラム(φ10 mm x 120 mm, C-18 シリカゲル, Waters, 55-105μ)
 - 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。

$1 \ 0 \ 2$
4. 4 脱塩をかねたイオン交換による精製

カラム(φ35 mm x 40 mm, Whatman DEAE セルロース DE-23, HCO₃⁻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、溶媒を留去した。TEA をエタノールで共沸し除去した。 4.5 ゲル濾過(脱塩)

カラム(φ20 mm x 80 cm, Sephadex G-10などの排除分子量が1万程度のもの) ゲル濾過のカラムを水で平衡化しておき、DNA を0.5m1 の水に溶かしてアプライ し、水で溶出した。

<u>4.6 カウンターイオンの交換 (3段カラム)</u>

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

中段 *〃 〃* Na⁺型 (2 ml)

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

カラムは予め20m1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10m1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℃に過熱して分析した。

<u>4.8</u> 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 phosphodeiesterase(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 型パルスフーリエ核磁気共鳴装置 (500 MHz for ¹H and 202 MHz for ³¹P)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 (5µ) 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³P リン酸をT4 polynucleotid kinase (New England Biolabs)、γ-³P-ATPを用いて導入した。過剰のγ-³P-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-Fe²⁺(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H₂O₂を加えた。反応は0 ℃、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(H₂0-D₂0、9:1 v/v または 8:1 v/v)あるいは重水(99.98 % D₂0) 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D₂0 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DC1 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、H₂0 のシグナルから約 5000Hz低磁場側を中心に励起して、H₂0 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。

<u>7.4_2次元NMR の測定</u>

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、サプ レッションを行っている。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)^{548,73)}

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

1 0 5

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 ブ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。^{544、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





B : 塩基対内NOE





C : 塩基対間NOE

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 NaC1, 10mM Tris-HC1(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に溶かしたものを光路長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 1 を加えて凍結乾燥し、その後400 μ 1 の H₂0-D₂0 (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℃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 1 のH₂0-D₂0 (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、DC1 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 μmol を 0.1M NaCl 400μ1 を加えて凍結乾燥し、その後200 μ1 の 99.96 % D₂0 に溶解した。BLM-Ni²⁺は1 μmol を凍結乾燥した後、99.96 % D₂0 100 μ1 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D₂0 を加えて容量を400 μ1 とした。

このサンプルを、30℃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 µmol を 0.1 M NaCl 400 µ1 を加えて凍結乾燥し、その後400 µ1 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℃で滴定を行った。BLM-VO³⁺は、1.2 µmol を予め凍結乾燥した後、

48 μ 1 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

BLM-V0³⁺の非交換性プロトンの帰属

BLM-VO³⁺(2µmol)を凍結乾燥して、0.1 M NaCl / 99.98 % D₂O 400µ1 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℃と15℃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-V0³⁺の交換性プロトンの帰属

BLM-V0³⁺(2 μ mol)を凍結乾燥して、0.1 M NaCl / H₂O-D₂O (9:1, v/v) 400 μ 1 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℃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℃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-V0³⁺のGT-12 による滴定実験

BLM-VO³⁺(1.0 μ mol)を0.1 M NaC1 / H₂O-D₂O (9:1, v/v) 400 μ 1 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 1)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 NaC1 / H₂O-D₂O (9:1, v/v) (45 μ 1)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 μ mol を 0.1M NaCl 400 μ 1 を加えて凍結乾燥し、その後200 μ 1 の 99.98 % D₂0 に溶解した。BLM-VO³⁺は1 μ mol を凍結乾燥した後、99.98 % D₂0 100 μ 1 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D₂0 を加えて容量を400 μ 1 とした。

このサンプルを、15℃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℃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<u>MOLCON</u> (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<u>MOLGRAPH</u>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<u>XPLOR</u> ver 1.5⁸²⁾ を用いて行った。立体図の作成は、<u>PLUTO</u> を用いた。またらせんのパラメーターの計算は、<u>BIOCON89</u>(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、本論ではふれなかっ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($\mathbf{r}_{i,j}$)に従い、誤差を含んだ値 として上限($\mathbf{r}_{i,j}$ ^u)と下限($(\mathbf{r}_{i,j}$ ⁱ)を次のように見積もった。

r _{ij}	r _{ij} ¹	r _{ij} u (Å)
$\begin{array}{c} \sim & 3.0 \\ 3.0 \sim & 3.5 \\ 3.5 \sim & 4.0 \\ 4.0 \sim \end{array}$	r _{ij} - 0.20 r _{ij} - 0.25 r _{ij} - 0.30 r _{ij} - 0.60	$r_{ij} + 0.25r_{ij} + 0.30r_{ij} + 0.35r_{ij} + 0.25$

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。

以上

- 1 Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T. and Okami, Y. (1966) J. Antibiot. <u>19A</u>, 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. <u>87</u>, 1107-1136.
- 4 Umezawa, H., Suhara, Y., Takita, T. and Maeda, K. (1966) J. Antibiot. <u>19A</u>, 210-218.
- 5 Suzuki, H., Nagai, K., Yamaki, H., Tanaka, N. and Umezawa, H. (1971) J. Antibiot. <u>22</u>, 446-448.
- 6 D'Andrea, A.D. and Haseltine, W.A. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. <u>75</u>, 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 <u>21</u>, 3711-3721.
- 9 Fisher, L. M., Kuroda, R. and Sakai, T. T. (1985) Biochemistry <u>24</u>, 3199-3207.
- 10 DeRiemer, L.H., Meares, C.F., Goodwin, D.A. and Diamanti, C.I. (1979) J. Med. Chem. <u>22</u>, 1019-1023.
- 11 Takeshita, M., Grollman, A.P., Ohtsubo, E. and Ohtsubo, H. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. <u>75</u>, 5983-5987
- 12 Mirabelli, C. K., Ting, A., Huang, C. H., Mong, S. and Crooke, S. T. (1982) Cancer Res. <u>42</u>, 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. <u>10</u>, 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. <u>85</u>, 2459-2463.
- 17 Sausville, E. A., Peisach, J., and Horwitz, S. B. (1978) Biochemistry <u>17</u>, 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. <u>73</u>, 814-822.
- 20 Iitaka, Y., Nakamura, H., Nakatani, T., Muraoka, Y., Fujii, A., Takita, T. and Umezawa, H., (1978) J. Antibiot. <u>31</u>, 1070-1072.
- 21 Hiroaki, H., Nakayama, T , Ikehara, M. & Uesugi, S. (1991) Chem. Pharm. Bull. <u>39</u>, 2780-2786.

 $1 \ 1 \ 2$

- 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. <u>108</u>, 3852-3854.
- 25 Chien, M., Grollman, A.P. and Horwitz, S.B. (1977) Biochemistry <u>16</u>, 3641-3647.
- 26 Huang, C.H., Galvan, L. and Crooke, S.T. (1980) Biochemistry <u>19</u>, 1767-1767.
- 27 Kasai, H., Naganawa, H., Takita, T. and Umezawa, H. (1978) J. Antibiot. <u>31</u>, 1316-1320.
- 28 Sakai, T.T., Riordan, J.M. and Glickson, J.D. (1982) Biochemistry <u>21</u>, 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. <u>89</u>, 399-405.
- 31 Gorenstein, D. G. and Kar, D. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commn. <u>65</u>, 1073-1080.
- 32 Gorenstein, D. G., Luxon, B. A., Goldfield, E. M., Lai, K. and Vegeais, D. (1982) Biochemistry 21, 580-589.
- Asakura, H., Hori, M. and Umezawa, H. (1975) J. Antibiot. <u>28</u>, 537-542.
 廣明秀一 修士論文 (1989) 大阪大学
- 35 Waring, M.J. (1981) Ann. Rev. Biochem. <u>50</u>, 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. <u>72</u>, 628-632.
- 40 Feigon, J., Denny, W.A., Leupin, W. and Kearns, D.R. (1984) J. Med. Chem. <u>27</u>, 450-465.
- 41 Gamcsik, M. P., Glickson, J. D. and Zon, G. (1990) J. Biomol. Struct. Dynam. <u>7</u>, 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. <u>26</u>, 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. <u>112</u>, 7462-7474.
- 51a Gao, X. and Patel, D.J. (1989) Biochemistry <u>28</u>, <u>751-762</u>.
- b Gao, X. and Patel, D.J. (1990) Biochemistry <u>29</u>, 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. <u>108</u>, 7089-7094 (also see ref 63.)
- 54a Patel, D.J. and Canuel, L.L. (1979) Eur. J. Biochem. <u>96</u>, 267-276.
 b Patel, D.J. (1979) Eur. J. Biochem. <u>99</u>, 369-378.
- c Patel, D. J. and Shapiro, L. (1986) J. Biol. Chem. <u>261</u>, 1230-1240.
- 55a Patel, D.J., Shapiro, L. and Hare, D. (1986) Biopolymers <u>25</u>, 693-706.
 b Patel, D.J. and Shapiro, L. (1986) Biopolymers <u>25</u>, 707-727.
- 56a Klevit, R.E., Wemmer, D.E. and Reid, B.R. (1986) Biochemistry <u>25</u>, 3296-3303.
 - b Pelton, J.G. and Wemmer, D.E. (1990) J. Am. Chem. Soc. <u>112</u>, 1393-1399
- 57a Lee, M., Chang, D.K., Hartley, J.A., Pon, R.T., Krowicki, K. and Lown, J.W. (1988) Biochemistry <u>27</u>, 445-455.
 - b Lee, M., Hartley, J.A., Pon, R.T., Krowicki, K. and Lown, J.W. (1988) Nucleic Acids Res. <u>16</u>, 665-684.
 - C Lee, M., Krowicki, K., Hartley, J.A., Pon, R.T., and Lown, J.W. (1988) J. Am. Chem. Soc. <u>110</u>, 3641-3649.
- 58a Dervan, P.B. (1986) Science 232, 464-469.
 - b Hertzberg, R.P. and Dervan, P.B. (1982) J. Am. Chem. Soc. <u>104</u>, 313-314.
 - c Schultz, P.G. and Dervan, P.B. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. <u>80</u>, 6834-6838.
- 59 Arnott, S. and Hukins, D. W. L. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>47</u>, 1504-1509.
- 60 Sheridan, R.P. and Gupta, R.K. (1981) J. Biol. Chem. <u>256</u>, 1242-1247.

- 61 Maeda, K., Kosaka, H., Yagishita, H. and Umezawa, H. (1956) J. Antibiot. <u>9A</u>, 82-86.
- 62 Kross, J., Henner, D., Hecht, S.M. and Haseltine, W.A. (1982) Biochemistry <u>21</u>, 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. <u>17A</u>, 194-198.
- 65 Kawaguchi, H., Tsukiura, H., Tomita, K., Konishi, M. and Umezawa, H. (1977) J. Antibiot. <u>30</u>, 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. <u>13</u>, 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 <u>12</u>, 89-100.
- 71 Heineman, U., Lauble, H., Frank, R. and Blocker, H. (1987) Nucleic Acids Res. <u>16</u>, 9531-9551.
- Sakaguchi, R. Katahira, M. Kyogoku, Y. and Fujii, S. (1991)
 J. Biochem. <u>109</u>, 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 <u>26</u>, 1315-1322.
 - b Chary, K. V. R., Sandeep, M., Hosur, R. V., Govil, G., Chen, C. Q. and Miles, H. T. (1988) Biochemistry <u>27</u>, 3858-3867.
- 76a Gochin, M., Zon, G. and James, T.L. (1990) Biochemistry <u>29</u>, 11161-11171.
 - b Schmitz, U., Zon, G. and James, T.L. (1990) Biochemistry 29, 2357-2368

ì.

- 77a Nilges, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Brunger, A. T. Karplus, M. and Nilsson, L. (1987) Biochemistry <u>26</u>, 3718-3733.
 - b Happ, C.S., Happ, E., Nilges, M., Gronenborn, A.M. and Clore, G.M. (1988) Biochemistry <u>27</u>, 1735-1743.
- 78 Otting, G., Grutter, R., Leupin, W., Gait, M.J. and Wuethrich, K. (1987) Eur. J. Biochem. <u>166</u>, 215-220.

- 79 Sklenar, V., Brooks, B., Zon, G. and Bax, A. (1987) FEBS Lett. <u>216</u>, 249-252.
- 80 Takegoshi, K., Tsuda, S and Hikichi, K. (1989) J. Magn. Reson. <u>85</u> 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 <u>27</u>, 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. <u>2</u>, 287-303.
- de Vlieg, J., Boelens, R., Scheek, R.M., Kaptein, R. and van Gunstern,
 W.F. (1986) Israel J. Chem. <u>27</u>, 181-188.
- 85 Hare, D.R., Wemmer, D.E., Chou, S.H., Drobny, G. and Reid, B.R. (1983) J. Mol. Biol. <u>171</u>, 319-336.
- 86 Metzler, W.J., Wang, C., Kitchen, D.B., Levy, R.M. and Pardi, A. (1990) J. Mol. Biol. <u>214</u>, 711-736.
- 87 Banks, K. M., Hare, D. R. and Reid, B. R. (1989) Biochemistry <u>28</u>, 6996-7010.
- 88 Chary, K. V. R., Hosur, R. V., Govil, G., Chen, C.Q. and Miles, H.T. (1988) Biochemistry <u>27</u>, 3858-3867. (also see ref. 75)
- 89 Verlet, L., (1967) Phys. Rev. <u>159</u>, 98-105.

t

- 90 Rychaert, J.P., Cicotto, G. and Berendsen, H.J.C. (1977) J. Comput. Phys. <u>23</u>, 327-337.
- 91 Katahira, M., Sugeta, H. and Kyogoku, Y. (1990) Nucleic Acids Res. <u>18</u>, 613-618.
- 92 Kojima, C., Ohkubo, T. and Kyogoku, Y. (1991) Nucleic Acids Symp. Ser. <u>25</u>, 177-178.
- 93 States, D. J., Haberkorn, R.A. and Rubern, D. J. (1982) J. Magn. Reson. <u>48</u>, 286-292.
- 94 Bax, A., and Davis, D.G. (1985) J. Magn. Reson. <u>65</u>, 355-360.
- 95 Tidor, D. H., Irikura, K., Brooks, B. R., and Karplus, M., (1983) J. Biomol. Struct. Dyn. <u>1</u>, 231-252.
- 96a Gelin, G.R. and Karplus, M., (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. <u>72</u>, 2002-2006.
 - Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J.,
 Swaminathan, S. and Karplus, M. (1983) J. Comput. Chem. <u>74</u>, 187-217.

以上