

—Reviews—

酵素—阻害剤複合体のX線結晶構造解析に基づく薬物設計

—創薬研究への利用を目指して—

松本 慶太

Drug Design based on X-ray Crystal Structure Analysis of Enzyme-Inhibitor Complexes
—Toward Applications for Drug Research—

Keita MATSUMOTO

*Pharmaceutical Business, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., 1-403 Yoshino-cho, Kita-ku, Saitama-shi,
Saitama 331-9530, Japan*

(Received October 3, 2007; Accepted November 28, 2007)

The SBDD (Structure-Based Drug Design) method based on X-ray crystal structure analysis of the protein-inhibitor complex is an indispensable technique especially for drug development research. In order to clarify the role of the 1-substituent of quinazoline derivatives in their inhibitory activity against poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), two novel inhibitors, **1** [8-hydroxy-1-(3-morpholinopropyl)-quinazoline-2,4(1H,3H)-dione] and **2** [8-hydroxy-1-(3-phenoxypropyl)-quinazoline-2,4(1H,3H)-dione] were synthesized and subjected to X-ray crystal analysis in the complex with the PARP C-terminal catalytic domain (PARP-CD), which requires the NAD⁺ coenzyme for its biological function. The quinazoline skeletons of **1** and **2** were both located at the nicotinamide subsite of the NAD⁺-binding pocket in the same manner as previously-reported inhibitors. On the other hand, the *N*-morpholinoprop-3-yl moiety introduced at the 1-position of the quinazoline ring in **1** bridged the large gap between the donor site and the acceptor site through a hydrogen bond, where donor and acceptor sites are classified as the binding sites of NAD⁺ and the ADP moiety of the poly(ADP-ribose) chain, respectively. In contrast, the *N*-phenoxyprop-3-yl moiety in **2** formed hydrophobic interactions close to the adenosine-binding site of NAD⁺, unlike the hydrogen bond as in **1**. As the inhibitory activities of **1** and **2** for PARP were much more potent than those of the unsubstituted nicotinamide analogues, the introduction of a substituent at the 1-position of quinazoline-based inhibitors is very effective for increasing inhibitory activity against PARP. The nearly equal inhibitory activities of **1** and **2**, despite their different binding modes at the active site, indicate that this 1-substituent is promising in improving the bioavailability of the inhibitor without compromising its inhibitory activity.

Key words—1-substituted quinazoline derivative; PARP; X-ray crystal structure; binding mode

1. はじめに

医薬品候補化合物—標的蛋白質複合体のX線結晶構造解析に基づくSBDD(Structure-Based Drug Design)法は、特に医薬品メーカーにおける創薬

研究において不可欠な手法である。本研究の目的は、創薬研究の標的蛋白質として展開してきた①システインプロテアーゼ(骨粗鬆症の標的蛋白質)、及び②ポリ(ADP-リボース)ーポリメラーゼ(脳梗塞の標的蛋白質)に対して、特異的にか

つ強い阻害活性を有する薬物を設計するための構造化学的知見を得ることにある。システインプロテアーゼは、以前から大阪薬科大学・薬品物理化学研究室との間で共同研究を進めてきており、また当研究室からも類似の発表がなされている関係上、本稿ではポリ (ADP- リボース) -ポリメラーゼ (PARP) に絞ってその研究内容を述べる。

ポリ (ADP- リボース) -ポリメラーゼ (PARP, EC 2.4.2.30) は、真核細胞の核に局在する DNA 結合蛋白質であり、DNA 修復¹⁾ 及び組換え²⁾、細胞の分化や癌化³⁾、クロマチン高次構造の形成などを含む遺伝的統合性の維持に寄与している。本酵素は損傷を受けた DNA 鎖に結合することで活性化される^{5), 6)}。この活性化により、PARP 自身とクロマチン高次構造中に含まれる他の核内蛋白質が最初の ADP リボシル化反応を受け、更にこれに続けて蛋

白質に結合した ADP リボース鎖の伸長及び分岐反応が進む。この触媒反応は『 $\text{NAD}^+ + \text{X} \rightarrow \text{ADP-5'-リボース-1'-X} + \text{ニコチンアミド}$ 』という式で示される。上式において、アクセプターである X は反応を受ける蛋白質中のグルタミン酸残基 (開始反応)、ポリ (ADP- リボース) 中の末端のアデニンリボースにおける 2'- 水酸基 (伸長反応)、あるいはポリマー中のニコチンアミドリボースにおける 2'- 水酸基 (分岐反応) を示している。修飾された PARP を認識した DNA 修復酵素が接近すると同時に、PARP は DNA 鎖に対する親和性を失う。Fig. 1 に PARP の反応メカニズムを模式的に示す。PARP は虚血性脳疾患の原因物質であることが知られている。すなわち脳虚血に伴う酸化的な DNA 障害による PARP の異常活性は、 NAD^+ 及び NAD^+ を再生するための ATP 分子の枯渇を進め、

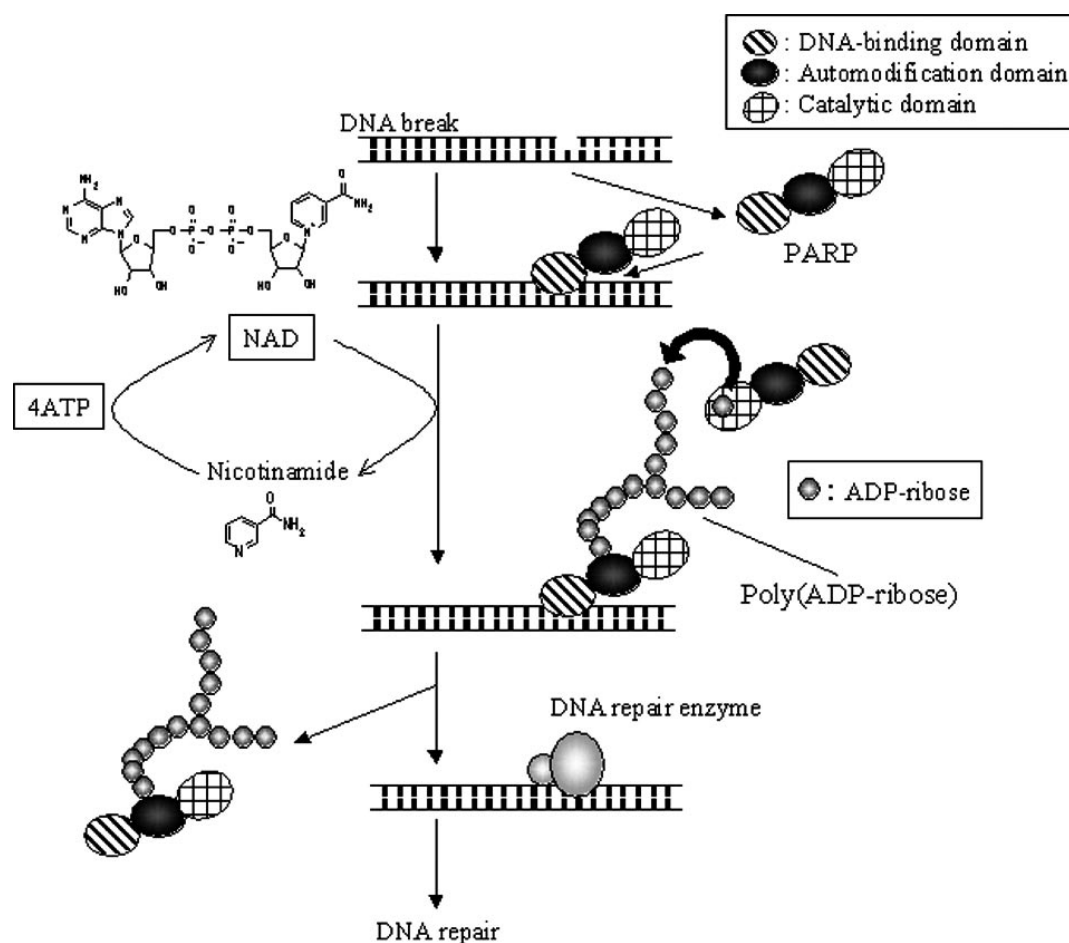


Fig. 1 Schematic diagram of the reaction mechanism of PARP in base excision-repair.

エネルギー枯渇による細胞死を引き起こす^{7), 8)}。更に、PARP 遺伝子のノックアウトにより、グルタミン酸や NO 毒性による虚血性障害が顕著に保護されることや、ラット中大脳動脈閉塞モデルにおいては脳梗塞体積を劇的に減少する⁹⁾。これらの知見は、低分子性の PARP 阻害剤が虚血性脳障害に対して有効な治療薬になる可能性を示唆している。

ヒト PARP は 1014 残基のアミノ酸より構成され、3つの異なる機能のドメイン、すなわち① N 末端 DNA 結合ドメイン、②中央の自己修飾ドメイン、及び③ ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性を担う C 末端触媒ドメイン (PARP-CD) に分け

ることができる¹¹⁾。PARP は触媒活性を損なうことなく、40kDa の PARP-CD に縮小することが可能である¹²⁾。PARP-CD の活性部位は更に 2つのサイト、すなわちアクセプターサイトとドナーサイトに分割することができる^{13, 14)}。酵素反応の際に、ドナーサイトは NAD⁺ 分子により占有され、アクセプターサイトはポリ (ADP-リボース) 鎖における ADP 部分 (AD サイト) により占有される。NAD⁺ のニコチンアミドアナログを含む複数の阻害剤 (Fig. 2) とニワトリ PARP-CD との複合体の X 線構造が、これまでに報告されているが^{13, 15, 16)}、これらニコチンアミドをミミックした阻害剤はドナーサイト中の

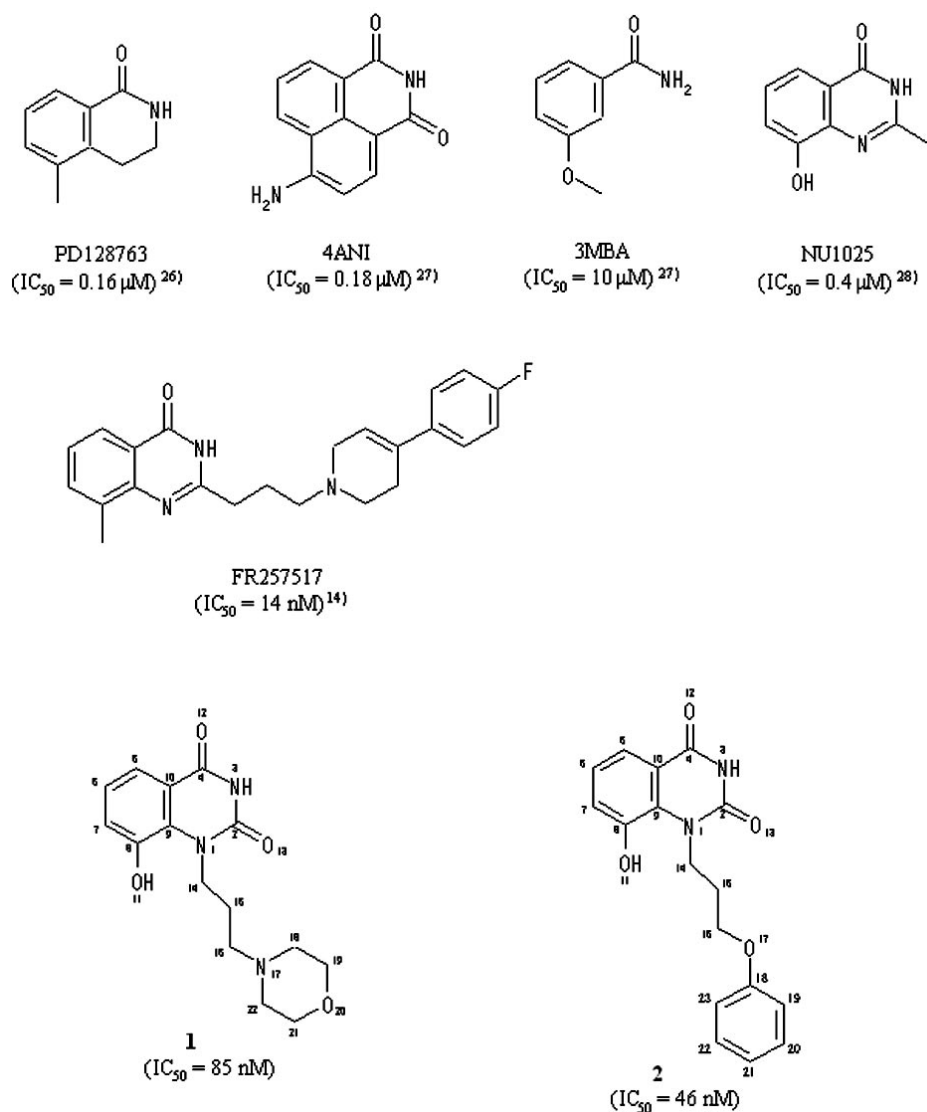


Fig. 2 Chemical structures and IC_{50} values for PARP of PD128763, 4ANI, 3MBA, NU1025, FR257517, **1** and **2**, together with atomic numberings of **1** and **2** used in this work.

ニコチンアミド-リボースサイト (NI サイト) に結合していた。

当社は、PARP 活性の異常亢進に伴う虚血性脳障害 (脳梗塞) の治療薬開発を目的として、ニコチンアミドアナログの誘導体研究を進めてきた。この誘導体研究の中で見出された新規阻害剤 **1** 及び **2** (Fig. 2) は、PARP に対して強力な阻害活性 ($IC_{50} = 85 \text{ nM}$ for **1**, $IC_{50} = 46 \text{ nM}$ for **2**) を示す。構造的には、①ニコチンアミドのミミック部位としてのキナゾリン-2,4(1H,3H)-ジオン骨格と、②キナゾリン環の 1 位に *N*-モルフォリノプロップ-3-イル基 (**1**)、あるいは *N*-フェノキシプロップ-3-イル基 (**2**) を有している。一方、キナゾリン環の 2 位置換型阻害剤である FR257517 (Fig. 2) が、PARP に対する強力な阻害剤として最近報告された¹⁴⁾。FR257517 - PARP-CD 複合体の X 線結晶構造解析によると、キナゾリン環及び 2 位置換基が、それぞれドナーサイト中の NI サイトと AD サイトに結合していることが示された¹⁴⁾。

1 及び **2** の *N*-モルフォリノプロップ-3-イル基、及び *N*-フェノキシプロップ-3-イル基の PARP-CD 活性部位での相互作用様式を解明することで、PARP 阻害活性に対するキナゾリン 1 位置換基と 2 位置換基の機能的な違いを明らかにし、更により阻害活性の強い化合物を設計する指針を得るために、ニワトリ PARP-CD と **1** 及び **2** との複合体 X 線結晶構造解析を行なった。

2. 方法

1 及び 2 の合成、及び阻害活性測定

1 及び **2** は論文¹⁷⁾の方法に従い合成し、その純度 (>95%) は HPLC により確認し、更にその化学構造は ¹H-NMR スペクトル (バリアン社製 GEMINI2000/200 及び UNITY INOVA300)、及び質量分析 (マイクロマス社製 Q-ToF2) により確認

した。**1** と **2** のヒト由来 PARP に対する阻害活性は、Zhang らの方法¹⁸⁾に従い測定した。

ニワトリ PARP-CD のクローニング、発現及び精製

結晶化に必要な組換え PARP-CD 蛋白質は、バキュロウイルス-カイコ発現システムを用いて調製した。まず、PARP-CD をコードした cDNA をトランスファー・ベクター (pYNG: Katakura Industries, Saitama, Japan) に挿入した後、このトランスファー・ベクターとバキュロウイルス (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus; CPd 株)¹⁹⁾ のゲノム DNA を、*Bombyx mori*-培養細胞 (BmN)²⁰⁾ 中で相同組換えした。PARP-CD の cDNA を含む組換えウイルスは、96 穴マイクロプレート上で限界希釈法によりスクリーニングした²⁰⁾。組換えウイルスを BmN 細胞中で増殖後、それらをカイコ蛹に接種した。接種後 6 日目の感染蛹 (20g) を、180ml の磨砕用緩衝液で磨砕・遠心分離し、上清を -80℃ にて保存した。2 回の連続硫酸分画 (40% 及び 65% の飽和) により部分精製した上清を、3-aminobezamide-AffiGel10 カラムを用いたアフニティークロマトグラフィーにより精製した¹²⁾。20g のカイコ蛹から約 19mg の蛋白質が得られ、最後に結晶化用に 13mg/ml まで濃縮した。

PARP-CD - **1** 及び **2** 複合体の結晶化

結晶化は、蒸気拡散平衡法の中のハンギングドロップ法を用い 20℃ で行なった。結晶化条件は Jung らの条件²¹⁾を参考にして検討した。前項で調製した PARP-CD 精製品 (13mg/ml) を 2.5mg/ml の **1** あるいは **2** と混合して結晶化用複合体溶液とした。この複合体溶液 3μl と等量の沈殿剤溶液 (50mM Tris-HCl, pH8.5, 20%(w/v) polyethylene glycol 600, 5%(v/v) methanol) を混合し、更に混合溶液を 1ml の沈殿剤溶液に対して平衡化した結

Table 1 Data collection and refinement statistics for PARP-CD — **1** and — **2** complexes

	1	2
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Cell constant		
<i>a</i> (Å)	58.38	57.65
<i>b</i> (Å)	62.54	63.06
<i>c</i> (Å)	94.86	95.57
Resolution range (Å)	20.0–2.37	20.0–2.37
Unique reflections	14360	14266
Redundancy	3.8	3.6
Completeness	98.7 (96.0)	98.0 (95.8)
$R_{\text{sym}}(I)$ (%)	7.4 (26.7)	8.8 (38.3)
R_{factor} (%)	23.0	23.5
R_{free} (%)	28.1	29.1
Number of atoms	2885	2889
R.M.S. deviation from ideal geometry		
Rmsd bonds (Å)	0.010	0.017
Rmsd angles (°)	1.4	1.97
Average model <i>B</i> -factor (Å ²)	39.9	48.5

Numbers in parentheses refer to the last resolution shell (2.52–2.37 Å).

果, 約 1 週間後に 0.7mm × 0.2mm × 0.1mm のサイズを有する X 線結晶構造解析可能な単結晶を得た。

PARP-CD — **1** 及び — **2** 複合体の X 線データ収集

PARP-CD — **1** 及び — **2** 複合体の回折強度測定は, 大型放射光施設 SPring-8(BL24XU) にて実施した。データ収集は 100K の超低温条件下, リガク社製 R-Axis V 検出器を用いて行なった。測定データはリガク社製のクリスタルクリアプログラム²²⁾を用いて処理した。

PARP-CD — **1** 及び — **2** 複合体の位相決定及び精密化

両複合体ともに, 以前に解析された PARP-CD — PD128763 複合体¹³⁾ ($a = 59.3$ Å, $b = 65.0$ Å, $c =$

96.7 Å, $P2_12_12_1$) と同型であったため, 初期位相の決定には分子置換法を用いた。 **1** 及び **2** の原子位置は差フーリエマップをトレースすることにより確定した。更に CNX2002 プログラム²³⁾を用いたシュミレーティッドアニーリング法により構造を精密化し, 間違った位置にあるアミノ酸残基及び誤ったコンホメーションについては QUANTA2000-X-RAY プログラム (Release 2000, Accelrys) によりマニュアルで修正した。精密化の進行に従い, 0.50 eÅ⁻³ 以上の電子密度を有するピークは溶媒分子として, 徐々に加えていった (Table 1)。

3. 結果及び考察

PARP-CD の全体構造

今回解析したニワトリ由来の PARP-CD はヒト

由来のそれと比べて 87% のアミノ酸ホモロジーを有し、かつヒト由来の PARP は薬物設計の標的になることから、アミノ酸の番号はヒト由来 PARP の番号を使用した (ニワトリ由来 PARP の番号から 3 を引いた番号)。

PARP-CD(40kDa) の ADP- リボースポリメラーゼ活性は、全長酵素 (113kDa) のそれと比べて 500 倍低い^{12, 25)} が、DNA 非存在下では PARP-CD と全長 PARP との間で活性に差がないことが報告されている。^{12, 25)} また PARP-CD の NAD^+ に対する K_m 値 (65 μM) は、全長 PARP の NAD^+ に対するそれ (50 μM) と同等であることも知られている。¹²⁾ 更に PARP-CD は DNA 非存在下においても触媒能を持つ二量体

を形成することが、Mendoza-Alvarez らにより最近証明された。^{24, 25)} これらの事実を考慮して、PARP-CD を酵素-阻害剤複合体の構造化学的研究の対象として用いた。PARP-CD は 654-1014 番のアミノ酸残基より構成されるが、構造解析によって決定できたのは 662-1009 のアミノ酸残基のみであった。N 末側の 8 残基及び C 末側の 5 残基は、温度因子が高いことにより電子密度上では検出されなかった。Fig. 3 に今回解析した PARP-CD - 1 複合体の全体図を示す。今回解析した複合体構造と、ヒト由来 PARP-CD - FR257517 複合体¹⁴⁾ を比較して、全体構造においてほとんど差異は見られなかった。

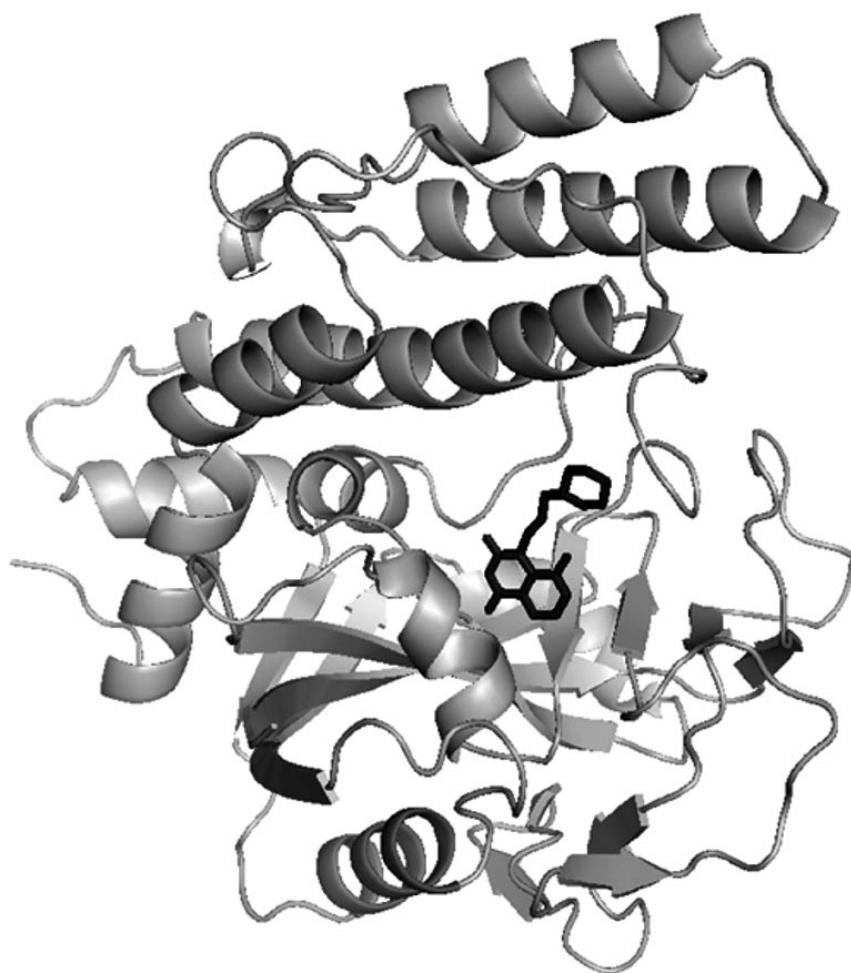


Fig. 3 Overall structure of PARP-CD-1 complex. The protein (ribbon diagram) and the inhibitor (stick form) are shown.

1 及び 2 の化学構造と阻害活性

Fig. 2 に **1**, **2**, 及び以前に構造解析された 5 種類の阻害剤 (PD128763, 4ANI, 3MBA, NU1025, 及び FR257517) の構造式を, IC_{50} 値とともに示す.^{14, 26-28)} これらの阻害剤は全て NAD^+ のニコチンアミド骨格をミミックしたものである. **1** は PARP-CD 活性部位における *N*-モルフォリノプロップ-3-イル基の結合部位 (ドナー or アクセプター) 及び結合様式を明らかにし, 更にモルフォリン環の極性酸素原子の相互作用に対する効果を解明するために合成された. **2** は, 母核であるキナゾリン環と 4 個のリンカー原子を介して結合している末端のベンゼン環の役割を検討するために合成された. **1** と **2** の阻害活性 (IC_{50} 値) が同じオーダー

であり, かつ PD128763, 4ANI, 3MBA, 及び NU1025 の阻害活性と比べて高い値を有していることから, (a)PARP-CD の触媒部位は比較的大きな結合ポケットを有しており, 極性のモルフォリン環や疎水性のベンゼン環などのかさ高い置換基を受け入れる余地があること, 及び (b)**1**, **2**, 及び FR257517 の PARP 活性部位における結合様式を比較検討することで, PARP に対するより効果的な阻害剤を設計するための知見が得られる, ことが予測された.

1 及び 2 の PARP-CD に対する相互作用様式

1 及び **2** の電子密度図を Fig. 4 に, PARP-CD 活性部位におけるこれらの結合様式を Fig. 5 に, 及

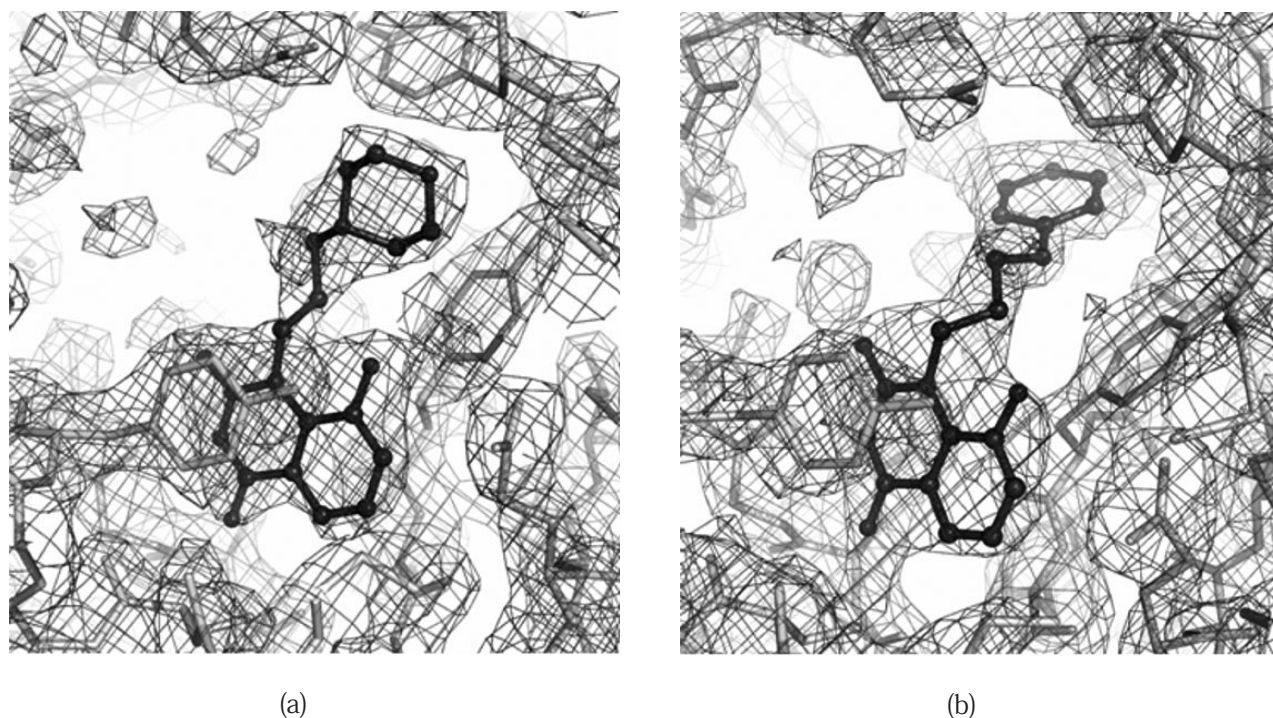


Fig. 4 Electron-density maps of **1** (a) and **2** (b) bound to the PARP-CD active site. The inhibitors and the protein are indicated by ball-and-stick form and stick form, respectively. The (2Fo-Fc) maps were calculated using the phases at the final stage of refinement.

び相互作用の模式図を Fig. 6 に示す。1 及び 2 と PARP-CD の活性部位付近におけるアミノ酸との間で形成される水素結合距離を Table 2 に示す。

これまでに解析された PARP-CD-PD128763,^{15, 16)}
- 4ANI,¹⁶⁾ - 3MBA,¹⁶⁾ 及び - NU1025¹⁶⁾ 複合体の構造と同様に、1 と 2 のキナゾリン -2,4(1H,3H)- ジオ

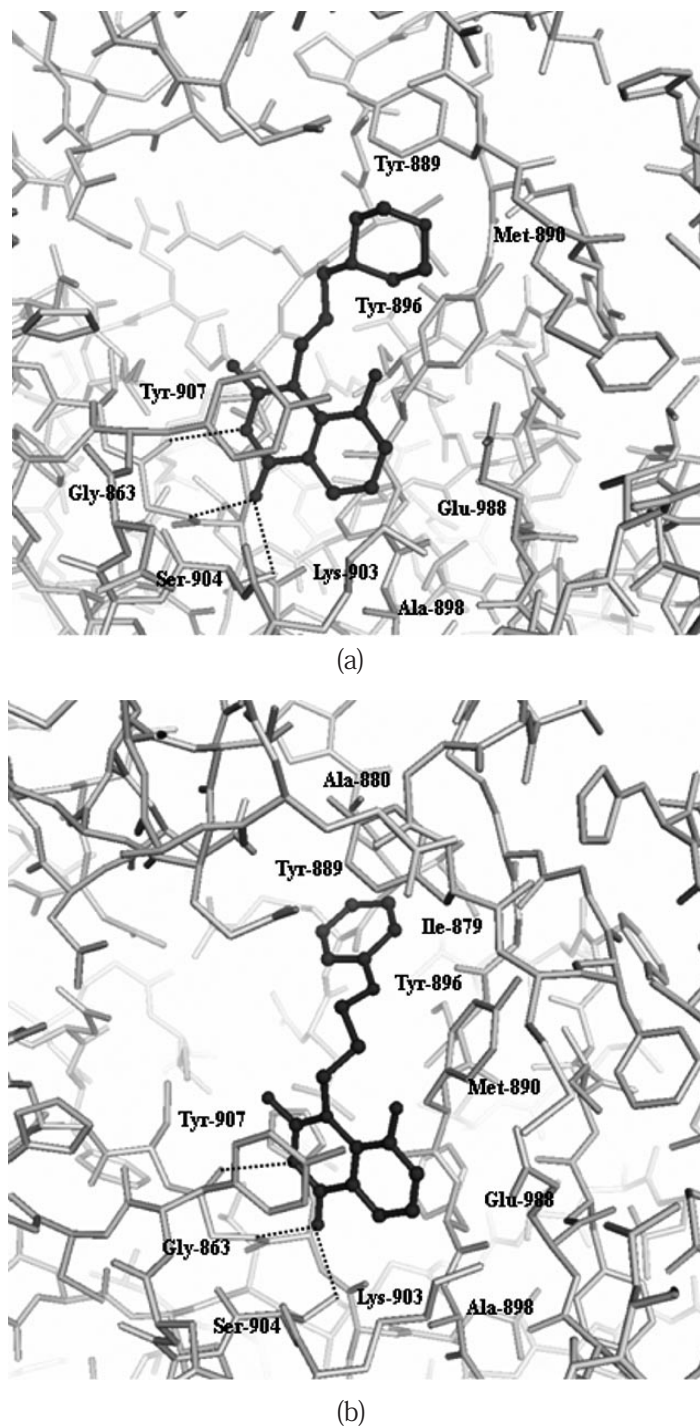


Fig. 5 Binding modes of 1 (a) and 2 (b) with PARP-CD active site. The inhibitors and the protein are indicated by ball-and-stick form and stick form, respectively. Possible hydrogen bonds are shown by dotted lines. Respective amino acids composing the PARP-CD active site are also labeled.

ン骨格は、NAD⁺ 結合ポケット中の NI サイトに埋もれる様に相互作用していた。この NI サイトは、

His-862, Gly-863, Tyr-896-Ala-898, Lys-903, Ser-904, Tyr-907, 及び Glu-988 アミノ酸残基に

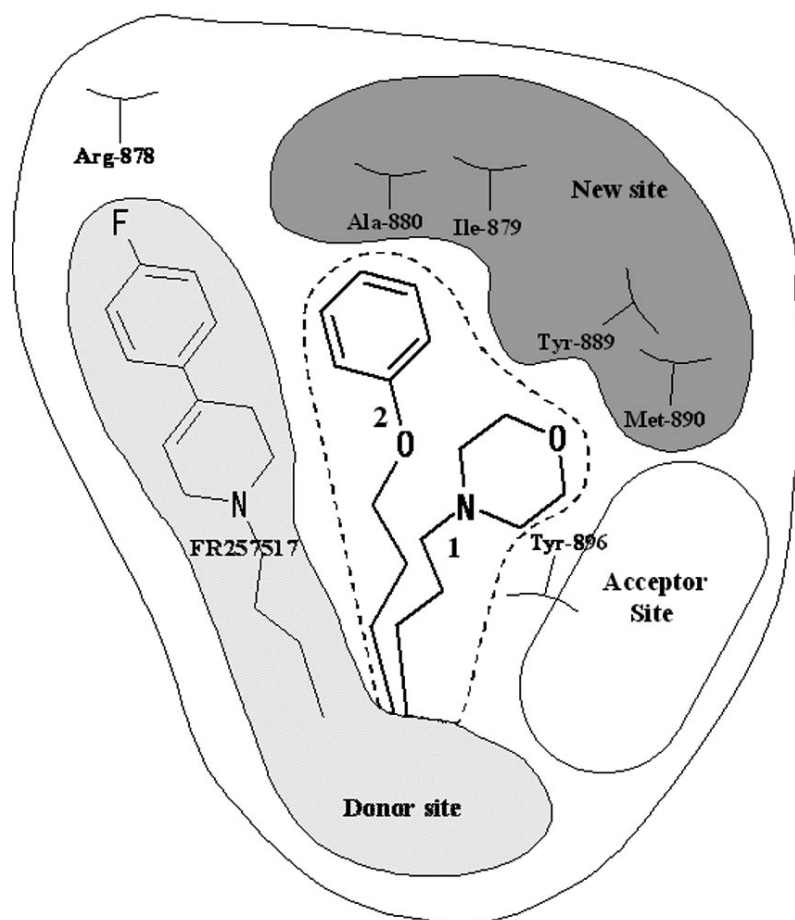


Fig. 6 Schematic diagram of the interaction of **1**, **2**, and FR257517 within the active site of PARP-CD. The substituents are *N*-morpholinoprop-3-yl for **1**, *N*-phenoxyprop-3-yl for **2**, and 3-[4-(4-fluorophenyl)-3,6-dihydro-1(2H)-pyridinyl]propyl for FR257517, respectively. The acceptor site (white), the donor site (light gray), and the new site (dark gray) were shown. The inside of the dotted line represents the large gap between the donor and the acceptor site.

Table 2 Hydrogen bond (Å) between the inhibitor (**1** and **2**) and the active site of PARP-CD

Atom of inhibitor	Residue of PARP-CD	1	2
O12	N (Gly-863)	2.84	2.98
O12	O ^γ (Ser-904)	2.71	2.51
N3	O (Gly-863)	2.89	2.78
O20	N (Met-890)	2.98	—

よって深い結合ポケットを形成している。1と2のO12原子は、Gly-863アミドのNHとSer-904のOHとの間で各々2本の水素結合を形成しており、また1と2のN3Hは、Gly-863アミドのOとの間で1本の水素結合を形成していた。1と2の二環性のキナゾリン環はTyr-907のフェノール基及びTyr-896の主鎖との間でスタッキング相互作用しており、この疎水性相互作用を通してニコチンアミド結合ポケットの空間に壁を形成していた。

注目すべき点として、1のキナゾリン環の1位に導入した*N*-モルフォリノプロップ-3-イル基はドナー及びアクセプターサイト間のギャップに位置していた (Fig. 6, 点線の内側)。これは以前に解析されたヒト PARP-CD - FR257517 複合体における阻害剤の結合位置とは著しく異なる。すなわち、阻害剤 FR257517 のキナゾリン環上の2位置換基は、ドナーサイト中のADサイトに正確に位置しており、アクセプターサイト方向には向いていなかった (Fig. 6)。更に、*N*-モルフォリノプロップ-3-イル基とPARP-CD活性部位の対応するアミノ酸残基との間で、有意な相互作用が見られた。すなわち、1のO20原子がMet-890アミドのNとの間で水素結合を形成しており (Table 2)、更に1のモルフォリン環がTyr-889及びTyr-896との間の疎水性相互作用に参与していた。

一方、2の*N*-フェノキシプロップ-3-イル基のPARP-CDへの結合の方向性及び結合様式ともに、1の*N*-モルフォリノプロップ-3-イル基におけるそれらとは明確な違いが見られた。キナゾリン環と末端の環 (1ではモルフォリン環、2ではベンゼン環) をつなぐリンカーのコンホメーションは、1(-CH₂-CH₂-CH₂-)と2(-CH₂-CH₂-CH₂-O-)の間で著しく異なっていた。このコンホメーションの違いにより、2の末端のベンゼン環は、Ile-879とAla-880から構成されるドナーサイトに近接した別の疎水性領域に位置していた (Fig. 6)。1と2の

間のPARP-CDに対する結合様式のこの違いは、各阻害剤のリンカー原子数の違いによるものと思われる (1は-CH₂-CH₂-CH₂-の3原子、2は-CH₂-CH₂-CH₂-O-の4原子)。1及び2のIC₅₀値と、以前に報告された置換基のない阻害剤^{13, 15, 16)}のそれらとの比較から、Ile-879, Ala-880, Tyr-889, 及びMet-890より構成されるPARP-CDの『新しい結合サイト (Fig. 6, 濃い灰色)』と1位置換基との相互作用 (水素結合及び疎水性相互作用) が、キナゾリン骨格をベースにした阻害剤の阻害活性増強に非常に重要であることを示唆している。これに対してFR257517の場合には、2位置換基における末端のフルオロフェニル基は、Arg-878近傍のドナーサイト (ADサイト) に正確に位置しており (Fig. 6, 薄い灰色)、更にこの際Arg-878残基が阻害剤の結合に伴うコンホメーション変化を起こしていた¹⁴⁾。このように、FR257517の置換基はドナーNAD⁺サイト全体を完全に占有しており、これによってFR257517の阻害活性が、1あるいは2のそれよりも幾分高くなったものと思われる。1, 2, 及びFR257517の三者間で、PARP活性部位における結合様式に有意な差があるにもかかわらず、ほぼ同じオーダーの阻害活性を有していることから以下のことが示唆される。すなわち (a) PARP-CDのドナー及びアクセプターサイトの間のギャップが大きな空間を形成しているため、このギャップはFig. 6に示すような『新しい結合サイト』として定義できること、及び (b) この空間は各々の阻害剤のコンホメーション変化を伴いながら、多様なタイプの置換基を受け入れる余地があるものと思われる。

今回の解析結果から、①キナゾリンをベースにした阻害剤の1位置換基の導入が、PARPに対する阻害活性の増強に非常に効果的であること、及び②置換基の構造が変化しても、それらのコンホメーションを柔軟に変えることで、これまでには報告されていない未知の酵素活性サイトに結合で

きることが明らかとなった。このように、1 位置換基の導入は、溶解性、安定性、及びその他の薬物動態的パラメーターを変えることによる阻害剤のバイオアベイラビリティ改善に向けた有力なターゲットとなりうる。更に、**1**と**2**の構造的特徴を適切に組み合わせることで、PARP に対するより効果的な阻害剤を設計することが期待できる。

謝辞 本研究において、終始御指導と御鞭撻を賜りました大阪薬科大学薬品物理化学教室 石田寿昌教授、ならびに故井上正敏名誉教授に深く感謝の意を表します。

本研究の機会を与えて頂きました大正製薬株式会社副社長 大平明氏、同取締役 北村一泰博士、同執行役員医薬研究所所長 森本繁夫博士、ならびに同研究所リード探索研究室室長 川嶋朗博士に厚く御礼申し上げます。また、入社以来直接御指導を頂き、数多くの有益な御助言を頂きました大正製薬株式会社研究推進室参与 横尾千尋博士、同人事部参与 川島豊博士、同医薬事業企画部参事 溝上一敏博士、ならびに参事 中川純一博士に心より感謝致します。

また、本研究で共同研究者として、多大な御助言や御協力を頂きました元オタワ大学 Carol P. Huber 教授、大正製薬株式会社リード探索研究室次席研究員 角谷重幸氏、主任研究員 近藤和行博士、同創薬化学第2研究室室長 太田知己博士、同創薬化学第1研究室 GM 村田充男氏、ならびに同元リード探索研究室研究員 楠瀬香織氏に深謝致します。

PARP - 阻害剤複合体の構造化学的研究において、精力的に実験に協力頂きました片倉工業株式会社 柿宏樹氏、ならびに株式会社東レリサーチセンター 鳥海美晴氏に深く感謝致します。

最後に、数々の有益な御助言を頂きました大阪薬科大学 土井光暢教授、大石宏文講師、尹康子助手、友尾幸司准教授、ならびに薬品物理化学教室員一同に心より感謝致します。

REFERENCES

- 1) Ménissier-de Murcia, J., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F. J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., Walztinger, C., Chambon, P., de Murcia, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 7303–7307 (1997).
- 2) Satoh, M. S., Poirier, G. G., Lindahl, T., *Biochemistry*, **33**, 7099–7106 (1994).
- 3) Farzaneh, F., Meldrum, R., Shall, S., *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3493–3502 (1987).
- 4) Realini, C. A., Althaus, F. R., *J. Biol. Chem.*, **267**, 18858–18865 (1992).
- 5) D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., Poirier, G. G., *Biochem. J.*, **342**, 249–268 (1999).
- 6) Virág, L., Szabó, C., *Pharmacol. Rev.*, **54**, 375–429 (2002).
- 7) Szabó, C., Dawson, V. L., *Trends Pharmacol. Sci.*, **19**, 287–298 (1998).
- 8) Love, S., Barber, R., Wilcock, G. K., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **25**, 98–103 (1999).
- 9) Eliasson, M. J. L., Sampei, K., Mandir, A. S., Hurn, P. D., Traystman, R. J., Bao, J., Pieper, A., Wang, Z.-Q., Dawson, T. M., Snyder, S. H., Dawson, V. L., *Nat. Med.*, **3**, 1089–1095 (1997).
- 10) Mendoza-Alvarez, H., Alvarez-Gonzalez, R., *Biochemistry*, **38**, 3948–3953 (1999).
- 11) de Murcia, G., Ménissier de Murcia, J., *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 172–176 (1994).
- 12) Simonin, F., Höfferer, L., Panzeter, P. L., Muller, S., de Murcia, G., Althaus, F. R., *J. Biol. Chem.*, **268**, 13454–13461 (1993).
- 13) Ruf, A., Rolli, V., de Murcia, G., Schulz, G. E., *J. Mol. Biol.*, **278**, 57–65 (1998).
- 14) Kinoshita, T., Nakanishi, I., Warizaya, M., Iwashita, A., Kido, Y., Hattori, K., Fujii, T., *FEBS Lett.*, **556**, 43–46 (2004).

- 15) Ruf, A., Ménissier de Murcia, J., de Murcia, G. M., Schulz, G. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 7481–7485 (1996).
- 16) Ruf, A., de Murcia, G., Schulz, G. E., *Biochemistry*, **37**, 3893–3900 (1998).
- 17) Ota, T., Kondo, K., Tanaka, H., JP Patent Application No. 2005-333411 (2005).
- 18) Zhang, J., Lautar, S., Huang, S., Ramsey, C., Cheung, A., Li, J.-H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **278**, 590–598 (2000).
- 19) Suzuki, T., Kanaya, T., Okazaki, H., Ogawa, K., Usami, A., Watanabe, H., Kadono-Okuda, K., Yamakawa, M., Sato, H., Mori, H., Takahashi, S., Oda, K., *J. Gen. Virol.*, **78**, 3073–3080 (1997).
- 20) Maeda, S., Gene transfer vectors of a baculovirus, *Bombyx mori*, and their use for expression of foreign genes in insect cells, in: Mitsuhashi, J. (Ed.), *Invertebrate Cell System Applications*, CRC Press, Boca Raton, Fla, 167–181 (1989).
- 21) Jung, S., Miranda, E. A., Ménissier de Murcia, J., Niedergang, C., Delarue, M., Schulz, G. E., de Murcia, G. M., *J. Mol. Biol.*, **244**, 114–116 (1994).
- 22) Pflugrath, J. W., *Acta Crystallogr.*, **D55**, 1718–1725 (1999).
- 23) Brunger, A. T., Accelrys Inc., Crystallography and NMR explorer (CNX) Version 2002, Yale University, New Haven, CT (2002).
- 24) Mendoza-Alvarez, H., Alvarez-Gonzalez, R., *J. Biol. Chem.*, **268**, 22575–22580 (1993).
- 25) Mendoza-Alvarez, H., Alvarez-Gonzalez, R., *J. Mol. Biol.*, **336**, 105–114 (2004).
- 26) Suto, M. J., Turner, W. R., Werbel, L. M., Arundel-Suto, C. M., Sebolt-Leopold, J. S., *Anti-cancer Drug Des.*, **7**, 107–117 (1991).
- 27) Banasik, M. K., Ueda, K., *Mol. Cell. Biochem.*, **138**, 185–197 (1994).
- 28) Boulton, S., Pemberton, L. C., Porteous, J. K., Curtin, N. J., Griffin, R. J., Golding, B. T., Durkacz, B. W., *Br. J. Cancer*, **72**, 849–856 (1995).