

## 《解説》

## 溶液状態でのDNAの構造

明治鍼灸大学・自然科学教室（化学）

小林 和子

要旨：DNAのらせん構造についての、X線解析、NMR、ラマンスペクトル、UV吸収スペクトル、CDスペクトルなどの物理化学的方法による最近の研究報告について簡単に紹介した。また、溶液状態でのポリデオキシヌクレオチドの構造について、二本鎖の融解温度（ $T_m$ ）、酸滴定によるpHの変化に伴うUV吸収スペクトルの変化などについて報告した。

## Structure of DNA in Solution

Kazuko KOBAYASHI

*Department of Chemistry, Meiji College of Oriental Medicine*

Summary: Firstly, studies on conformations of double-helical DNA analyzed by physical-chemical methods were reviewed. Secondly, our results on the structure of DNA in solution were reported. A melting curve and a titration curve for polydeoxyribonucleotide in 0.1 mM NaCl (pH 6.0) was obtained. UV spectra of the nucleotide were measured as a function of pH.

Key words: DNA,  $T_m$ , UV吸収スペクトル UV spectra, 酸滴定 Titration by Acid

## I はじめに

核酸の化学についての研究は、現在のところ、構造に関するもの（核酸塩基の配列順序を決定する一次構造の解析や、らせんの高次構造の解析）、核酸の化学合成に関するもの、DNA、RNAと他の生体有機物質（主としてタンパク質）との相互作用に関するもの、これらの研究を行なう上で有力な手段となる人工酵素や、抗ガン剤の開発を目標とする多官能性分子の合成に関する分野などがある。優れた有機化学的合成能力、ハイレベルの遺伝子操作技術、X線、NMRなどの物理化学的な解析手段を必要とし、共同研究が不可欠な分

野となっている。

ここでは、溶液状態でのDNAのらせん構造に関する物理化学的な研究について、最近の報告と筆者の実験結果の一部を紹介する。

## II DNAのらせん構造

今から約30年前、1953年にWatsonとCrickによってDNAの右巻き2本鎖らせん構造モデルが発表された。その当時は、まだ漠然としていた核酸の一次構造やその遺伝子としての役割が、分析技術や種々の物理化学的解析手段の飛躍的進歩によって次々と解明され、構造遺伝子だけでなく、

いくつかの調節遺伝子の一次構造もわかってきた。しかし巨大分子であるDNAとタンパク質やほかの生体物質との相互作用を分子レベルで解明することは、今後の重要な課題である。

## II-a) DNAの分子構造

DNAのらせん構造について、X線繊維回折研究と、単結晶X線構造解析研究から原子レベルでの分子構造が明らかにされている。これまでに出版されているDNAのらせん構造モデルには、A型、B型、C型、D型、Z型などがある。<sup>5)</sup> B型DNA構造は、DNA構造の基本型であり、溶液中での2本鎖DNAのらせん構造はB型であると考えられていた。1979年にDNAオリゴマー-d(CpG)<sub>3</sub>の単結晶X線解析の結果、このオリゴマーが左巻きのZ型DNA構造をとることが報告されて以来、Z型DNAに関する研究報告が、増大している。<sup>9)</sup>

## II-b) 溶液状態での構造

Z型DNAの溶液状態での構造に関しては、ポリ(dG-dC)あるいは(dG-dC)オリゴマーの高塩濃度および低塩濃度下での<sup>1</sup>Hおよび<sup>31</sup>P-NMRによる研究、<sup>6)</sup> ラマンスペクトルによる研究、<sup>7)</sup> などがある。また、B⇌Z構造の転移について、UV吸収スペクトル、CD(円二色性)スペクトルによる研究も報告されている。<sup>1)</sup> 低塩濃度下のB型構造と高塩濃度下のZ型構造とではCDスペクトルの位相が逆転するし、UV吸収スペクトルでは、295nmの吸光度が増大する。DNAの溶液中での構造に関する物理化学的方法は、現在でもUV吸収、CDスペクトルが最もよく用いられているようである。高分解能NMRの進歩により、NMRも生体有機化合物の溶液状態での構造解析に応用されてはいるが、タンパク質や核酸の<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C-NMRは、化学シフトが同じ領域に多数密集し、シグナルを分離、同定することが困難である。その点、核酸やリン脂質に関しては<sup>31</sup>P-NMRが有利である。

## III UV吸収スペクトルによる構造解析

自然な状態(Native, 未変性)のDNAのUV吸収スペクトルは、その構成成分ヌクレオチドに比べると、淡色化されており、DNAを高温にすると、UV吸収は増大し、単量体の値に近づく。この吸収の増大はDNAと実験条件(pH, 塩濃度, 溶媒)によって一定の温度(T<sub>m</sub>)でおこる。この変化は、2本のポリヌクレオチド鎖が連続的に分離することによって生じるもので、T<sub>m</sub>は、変性またはらせん-コイル転移の示標となる。T<sub>m</sub>が高いとそのDNAの核酸の塩基対の水素結合が強いこと、つまりらせん状態の安定性が増すことを示している。実際、アデニン-チミン(A-T)の水素結合より強いと考えられる、グアニン-シトシン(G-C)の含有量が多いとT<sub>m</sub>は高くなっている。

DNAは、通常、中性pH, 塩濃度0.01~1Mという溶媒条件で用いられることが多く、イオン濃度が低いとDNAのらせん構造が不安定化するといわれている。0.1mM以下の極めて低い塩濃度下で、ポリデオキシヌクレオチドの構造に関する基本的な性質をUVスペクトルを用いて調べた。

ポリ(dG-dC)・ポリ(dG-dC)水溶液(pH6.0, 0.1mM NaCl)のUV吸収スペクトルを25°C~90°Cの範囲で測定した。最大吸収波長255nmにおける吸光度(A<sub>255</sub>)と温度との関係を示したのが、図1である。ポリヌクレオチドのT<sub>m</sub>は、イオン強度に依存している。<sup>3)</sup> T<sub>m</sub>とイオン強度との関係は、通常2本鎖ポリヌクレオチドの場合、 $\Delta T_m / \Delta \log[Na^+] = 20^\circ C$ である。ポリ(dG-dC)・ポリ(dG-dC)の場合 $-\log[Na^+] = 3$ のときT<sub>m</sub>は80°Cであるから、この場合約60°Cになるはずである。非常に低い塩濃度下でも二本鎖状態に保たれていることがわかる。

また、DNAの構造は、pHによっても異なる。ポリプリン:ポリピリミジン ポリヌクレオチドは、酸滴定によって、2本のポリピリミジンと1本のポリプリンからなる3本鎖に再配列する。<sup>4)</sup> この時、2本目のポリピリミジンは付加されたプ

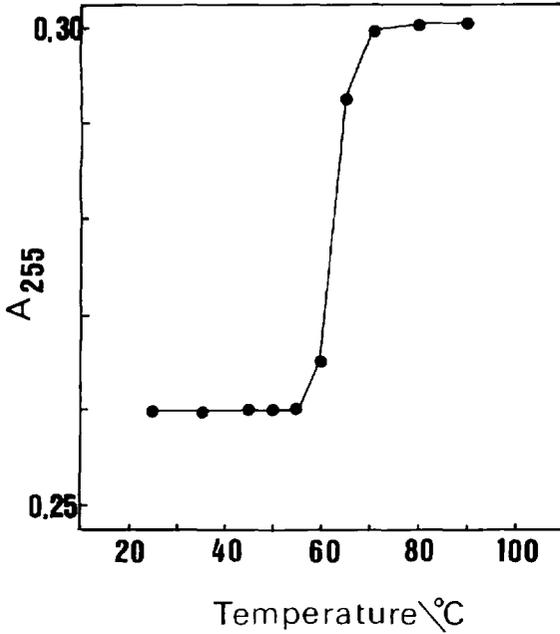
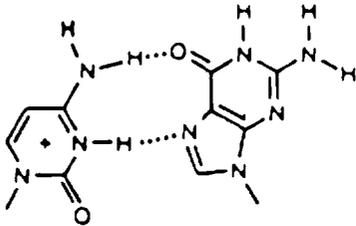


図1 ポリ (dG-dC)・ポリ (dG-dC) (pH6.0, 0.1mM NaCl) の融解曲線



Hoogsteen base pairs

図 2

ロトンによって結合されている。G : CH<sup>+</sup>塩基対,<sup>10)</sup> dG : dCH<sup>+</sup>塩基対<sup>2,4,8)</sup>については、Hoogsteen 型塩基対を持っていると考えられる。

(図2)

ポリ (dG-dC)・ポリ (dG-dC) 水溶液 (0.3 A<sub>255</sub>)を0.1M HClで滴定し (pH 7 ~ 3), 滴定曲線を描くと (図3) 3.8付近にpK<sub>a</sub>が存在することがわかる。シトシンのpK<sub>a</sub>は4.1, グアニンは, pK<sub>a1</sub>=2.2, pK<sub>a2</sub>=9.5 (図4), リン酸はpK<sub>a1</sub>=2.1, pK<sub>a2</sub>=7.2, pK<sub>a3</sub>=12.3である。3.8という値は, シトシンのpK<sub>a</sub>=4.1に近い。pK<sub>a</sub>は, 金属イオンや溶媒和, 配位座のひずみのもたらす影響や水素結合の影響によって変化すると考えられるので, pK<sub>a</sub>の変化は, プロトン付加をうけるシトシン (C) のN-3位付近の疎水性の度合による違いと考えられる。

この変化をUV吸収スペクトルで追跡した。

(図5) 275nmの吸光度 (A<sub>275</sub>) はほとんど変化していないが, pHが4以下になると急にスペクトルの形が変化してくる。このスペクトルの形の変化をA<sub>255</sub>とA<sub>275</sub>との比で表わすことにし, pHとの関係を図6に示した。pHが3.7以下に

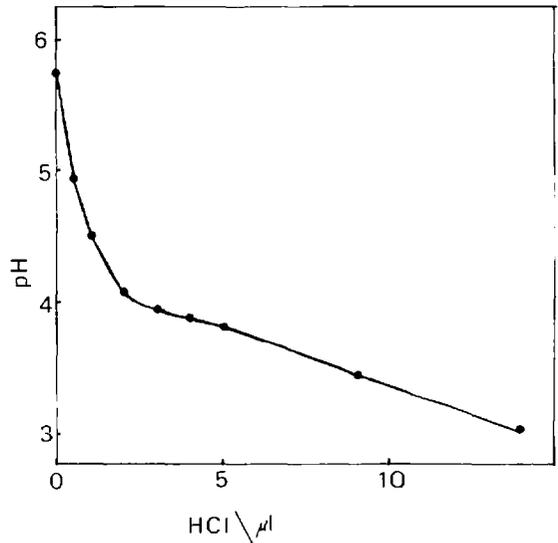


図3 ポリ (dG-dC)・ポリ (dG-dC) の酸滴定曲線

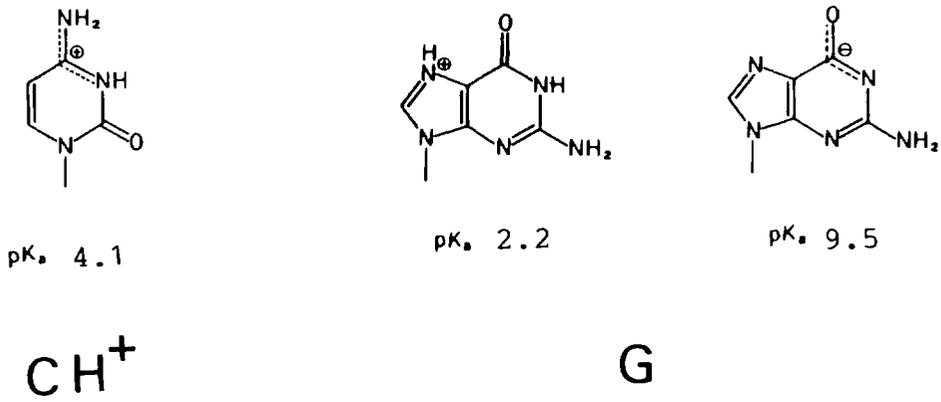


図4 原図を修正した

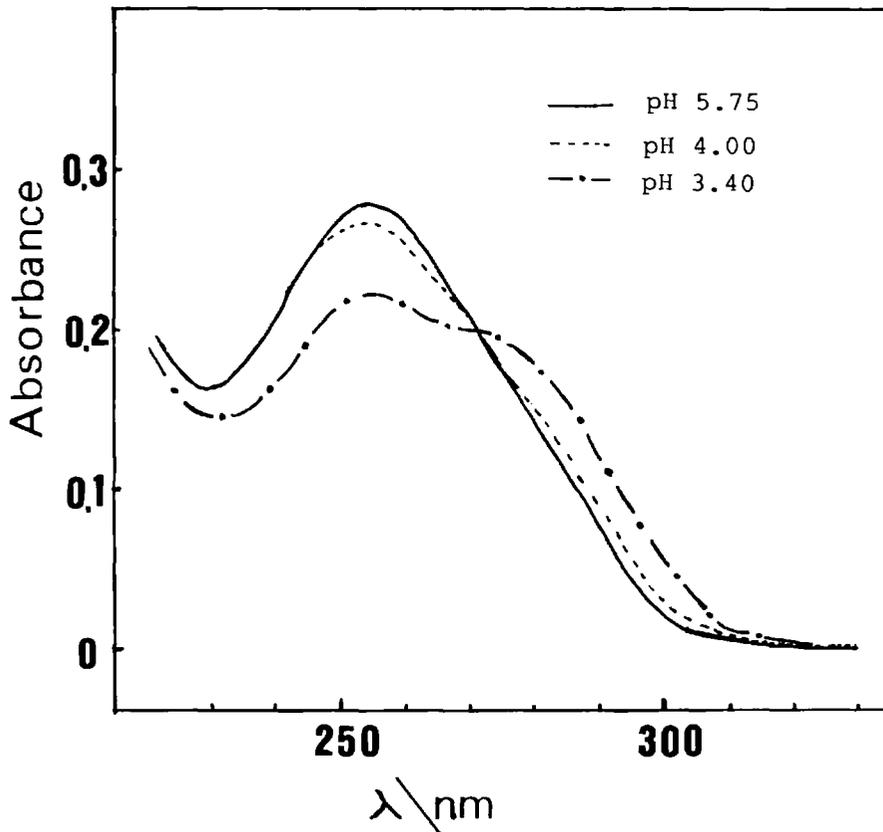


図5 ポリ(dG-dC)・ポリ(dG-dC)のUV吸収スペクトル

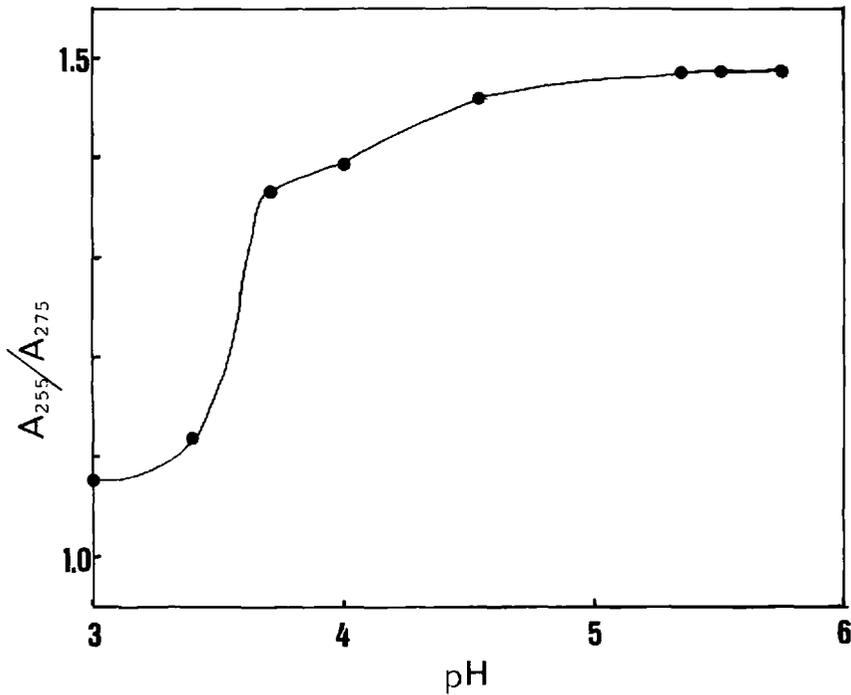


図6 ポリ (dG-dC)・ポリ (dG-dC) の  $A_{255}/A_{275}$  と pH との関係

なると急に  $A_{255}/A_{275}$  の値が変化していることがわかる。シトシンがプロトン付加を受け、dG-dCH<sup>+</sup>塩基対となり、Hoogsteen型構造をとるため、スペクトルの形が変化したものと考えられる。

#### 謝 辞

本解説で紹介した内容は、京大医学部・上田助教授との共同研究の成果である。深謝する。

#### 文 献

- 1) a) Behe, M., Felsenfeld, G. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78 : 1619~1623, 1981.
- b) Quadrifoglio, F., Manzini, G., Vasser, M., Dinkelspiel, K., Crea, R. : Nucleic Acids Res. 9 : 2195~2206, 1981.
- c) Sutherland, J. C., Griffin, K. P., Keck, P. C., Takacs, P. Z. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78 : 4801~4804, 1981.
- d) Sutherland, J. C., Griffin, K. P. : Biopolymers. 22 : 1445~1448, 1983.
- e) DiCapua, E., Stasiak, A., Koller, T., Brahm, S., Thomae, R., Pohl, F. M. : EMBO J. 2 : 1531~1535, 1983.
- f) Pohl, F. M., Jovin, T. : J. Mol. Biol. 67 : 375~396, 1972.

- 2) a) Bugg, C. E., Thewalt, U. T. and Marsh, R. E. : *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 33 : 436~440, 1968.  
 b) Cruze, W. B. T., Egert, E., Kennard, O., Sala, G. B., Salibury, S. A. and Viswamitra, M. A. : *Biochemistry*, 22 : 1833~1839, 1983.
- 3) Guschlbauer, W. *Nucleic Acid Structure*, (訳) 池田森男, 富田研一 : 核酸の構造と機能. 広川書店.
- 4) Morgan, A. R. and Well, R. D. : *J. Mol. Biol.* 37 : 63~80, 1968.
- 5) 日本化学会編 : 核酸の化学と分子生物学.
- 6) a) Patel, D. J., Canuel, L. L., Pohl, F. M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 : 2508~2511, 1979.  
 b) Patel, D. J., Kozlowski, S. A., Nordheim, A., Rich, A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79 : 1413~1417, 1981.  
 c) Cohen, J. S., Wooten, J. B., Chatterjee, C. L. : *Biochemistry*, 20 : 3049~3055, 1981.  
 d) Jovin, T. M., McIntosh, L. P., Arndt-Jovin, D. J., Zarling, D. A., Robert-Nicoud, M., van de Sande, J. H., et al. : *J. Biomol. Struct. Dynamics*, 1 : 21~57, 1983.  
 e) Chen, C.-W., Cohen, J. S., Behe, M. : *Biochemistry*, 22 : 2136~2142, 1983.  
 f) Hartmann, B., Thuong, N. T., Pouyet, J., Ptak, M., Leng, M. : *Nucleic Acids Res.* 11 : 4453~4466, 1983.  
 g) Feigon, J., Wang, A. H.-J., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Rich, A. : *Nucleic Acids Res.* 12 : 1243~1263, 1983.  
 h) Mitra, C. K., Sarma, M. H., Sarma, R. H. : *Biochemistry*, 20 : 2036~2041, 1981.
- i) Tran-Dinh, S., Thiboury, J., Neumann, J.-M., Huynh-Dinh, T., Genissel, B., et al. : *FEBS Lett.* 154 : 407~410, 1983.
- 7) a) Pohl, F. M., Ranade, A., Stockburger, M. : *Biochim. Biophys. Acta.* 335 : 85~92, 1973.  
 b) Thamann, T. J., Lord, R. C., Wang, A. H.-J., Rich, A. : *Nucleic Acids Res.* 9 : 5443~5457, 1981.  
 c) Wartell, R. M., Klysik, J., Hillen, W., Wells, R. D. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79 : 2549~2553, 1982.  
 d) Wartell, R. M., Harrell, J. T., Zacharias, W., Wells, R. D. : *J. Biomol. Struct. Dynam.* 1 : 83~95, 1983.  
 e) Benevides, J. M., Thomas, G. J. Jr. : *Nucleic Acids Res.* 11 : 5747~5761, 1983.  
 f) Benevides, J. M., Thomas, G. J. Jr., van der Marel, G., van Boom, J. H., Wang, A. H.-J., Rich, A. : *Nucleic Acids Res.* In press, 1984.  
 g) Brahms, S., Vergne, J., Brahms, J. G., DiCaapua, E., Bucher, P., Koller, T. : *J. Mol. Biol.* 162 : 473~493, 1982.  
 h) Brahms, S., Vergne, J., Brahms, J. G., DiCapua, E., Bucher, P., Koller, T. : *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47 : 119~124, 1983.
- 8) Pulleyblank, D. E., Haniford, D. B. and Morgan, A. R. : *Cell.* 42 : 271~280, 1985.
- 9) Rich, A., Nordheim, A. and Wang A. H.-J. : *Ann. Rev. Biochem.*, 53 : 791~846, 1984.
- 10) Voet, D. and Rich, A. : *Prog. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.* 10 : 183~260, 1970.