



Title	Poly guanylic acid類似体の酵素的合成とその性質の研究
Author(s)	服部, 征雄
Citation	大阪大学, 1972, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30575
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【6】

氏名・(本籍)	服 部 征 雄
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 2518 号
学位授与の日付	昭和47年3月25日
学位授与の要件	薬学研究科薬品化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Poly guanylic acid 類似体の酵素的合成と その性質の研究
論文審査委員	(主査) 教 授 池原 森男 (副査) 教 授 梶井 雅一郎 教 授 田村 恭光 教 授 上原 喜八郎

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

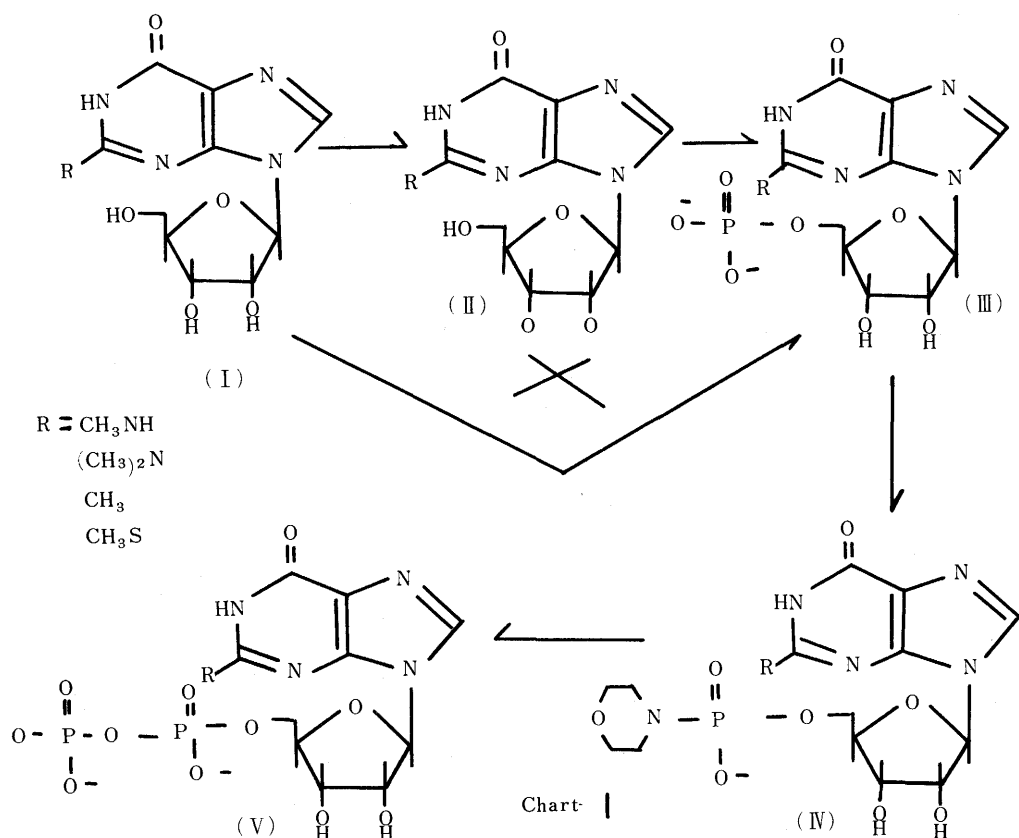
transfer RNA の中には種々な minor component が含まれていることが知られているが、その役割に関しては現在までに、あきらかにされていない。N²-methyl Guanosine (m²G), N²-dimethyl Guanosine (m₂²G) は yeast をはじめとする種々の t-RNA の中に存在する minor component であり、その存在位置も m₂²G は Anticodon の first letter から 9 番目に、m²G は 5' 末端から 9 (or 10) 番目にほぼ共通に存在することが知られている。¹⁻⁸ 又 2-methylthio inosine, 2-methyl-inosine は天然からはまだ発見されていないが、Adenine 核の 2 位が methyl thio-, methyl 基で置換されたものは 2-methylthio N⁶-isopentenyl Adenosine (ms²iA), 2-methyl Adenosine (m²A)⁹ として t-RNA の Anticodon 3' 隣接位に存在することが知られている。そこでこれらの modified base の構造と機能をあきらかにする目的で、m²G, m₂²G, ms²I, m²I, ms₂²·⁶pu* を含む Polymer を酵素的に合成してその物理化学的性質を調べた。

*ms₂²·⁶pu 2,6 dimethylthiopurine-9-β-D-ribofuranoside

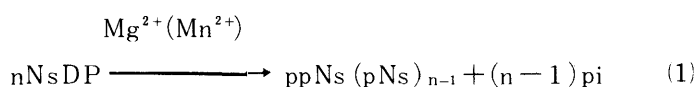
本 論

第一章 Poly m²G, poly m₂²G の合成とその物理化学的性質

Polynucleofide phosphorylase (PNP ase)¹⁰ は Nucleoside 5'-diphosphate を基質として polynucleotide を合成することが知られている。そこで Chart 1 に示す様に種々の Nucleoside (I) を 2', 3' isopropylidene 化した後オキシ塩化リンでリン酸化するか、あるいは直接選択的に 5' リン酸化することにより 5'-monophosphate (II) を得た。これらは Moffatt-Kohorana¹¹ 等の方法にならない morpholidate にした後、無機燐と反応して目的とする Nucleoside 5'-diphosphate を得た。



次にこれら diphosphate を基質として Ochoa 特の方法によって E. Coli・B から調製した PNP ase を用いて重合反応をおこなった。



(1) 式の様に重合反応にともない無機リンの遊離がみられるので Allen 法で無機リンを定量した。 m^2GDP , m^2GDP を基質として Mg^{2+} 存在下 37°C インキュベートする通常の条件下では重合がほとんどおこなわれず、 Mn^{2+} 存在下 60°C でインキュベートする poly G 合成条件を用いて重合反応をおこなった。 m^2GDP は通常用いる Mn^{2+} 濃度では重合反応が著しく低いので Mn^{2+} 濃度をさらに高くすることにより重合反応を改善することができた。

large scale でインキュベートした後 Sephadex G-25 又は G-50 を用いて分離した後、透析をくりかえし poly m^2G , poly m^2G を 7%, 30% の収率で夫々得た。ここに得られた poly m^2G は $\text{S}_{20} = 6$ であり 200 個以上の Nucleotide の結合したものである。

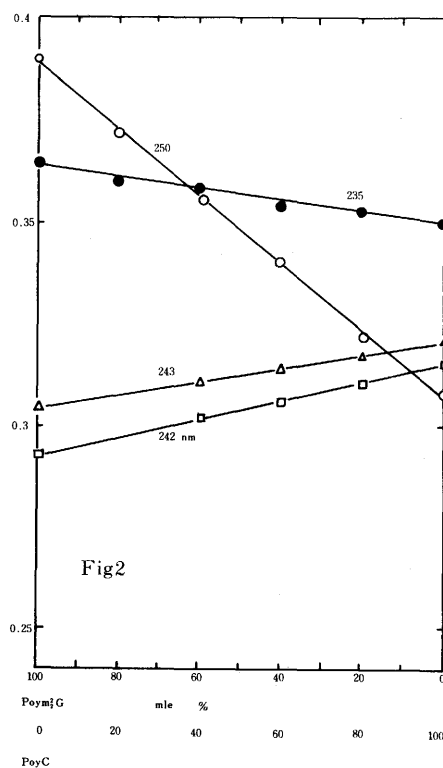
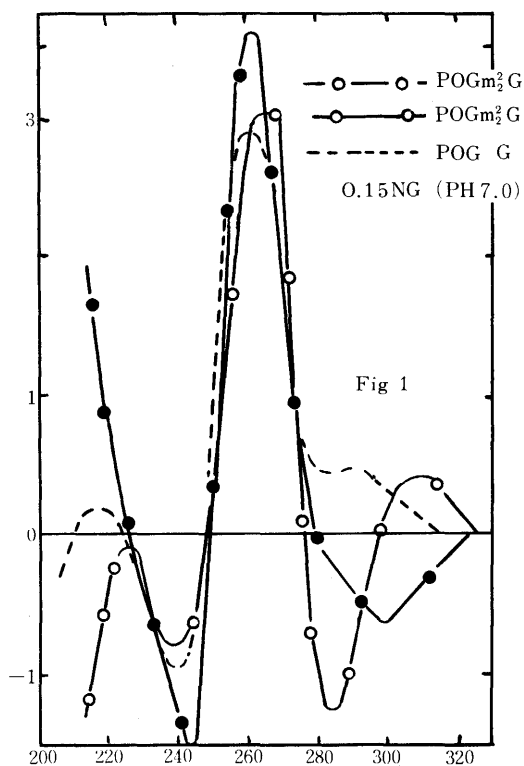
Table 1 UV spectra (in 0.15 M NaCl)

m^2 GMP				poly m^2 G	
pH	1.1	259.5	(13×10^{-3})	259	(6.5×10^{-3})
pH	7.0	255	(14×10^{-3})	254.5	(6.8×10^{-3})
pH	12.8	259	(11×10^{-3})	259	(5.6×10^{-3})
m_2^2 GMP				poly m_2^2 G	
pH	1.1	265	(16×10^{-3})	264	(9.3×10^{-3})
pH	7.0	261	(16×10^{-3})	256	(7.9×10^{-3})
pH	12.8	262	(12×10^{-3})	266	(8.1×10^{-3})

又 poly m^2 G, poly m_2^2 G は 260 nm でともに 45~50% の hypochromicity を示し 0.15 Na⁺ (pH 7.0) における thermal denaturation を調べると poly m_2^2 G $T_m = 47^\circ\text{C}$ poly m^2 G $T_m = \text{ca. } 70 \sim 80^\circ\text{C}$ であり同条件下、poly G, $T_m = \text{ca. } 100^\circ\text{C}$ であるのでメチル基の導入により ordered structure の安定性は漸次減少していくことがわかる。これら polymer の Circular dichroism は Fig 1 の様に poly G 同様の pattern を示すが main absorption band 付近の peak は m^2 G, m_2^2 G となるにつれて Amplitude の増大の傾向があり、又長波長側及び短波長側は poly G とは著しく異なる。

poly G は poly C と 1 : 1 の Complex を形成する¹²⁾ ことが知られているので各条件下 poly m^2 G, poly m_2^2 G と poly C 間の相互作用を Mixing curve から調べてみたが何ら相互作用はみられなかった。Michelson¹³⁾ 等も独立に同様の結果を報告している。

この様にメチル基の導入は G·C base pair 形成を立体的に unfavourable にするものと思われる。



第二章 m^2G , m^2G と正常塩基を含む Copolymer

これら minor component. の性質を詳しく調べるため正常塩基を含む Copolymer, $\text{poly}(G, m^2G)$, $\text{poly}(G, m^2G)$, $\text{poly}(A, m^2G)$ を合成した。

$\text{poly } m^2G$, $\text{poly } m^2G$ は $\text{poly } C$ と何ら相互作用をしないが $\text{poly}(G_{45}, m^2G_{55})$, $\text{poly}(G_{49}, m^2G_{51})$ は $\text{poly } C$ と 1 : 1 の complex を形成する。一般に copolymer と homopolymer との相互作用においてはすでに Fresco 等が報告しているが unpaired base は bouble helix から Loop out する構造をとることが知られている。今回の実験事実からは odd base m^2G , m^2G は loop out することなく double helical structure を形成しているものと思われる。ところが、さらに m^2G 及び m^2G の含量が増加した $\text{poly}(G_{30}, m^2G_{70})$, $\text{poly}(G_{27}, m^2G_{73})$ は $\text{poly } C$ と何ら相互作用しない。

同様に $\text{poly}(A_{65}, m^2G_{35})$, $\text{poly}(A_{48}, m^2G_{52})$, $\text{poly}(A_{50}, m^2G_{50})$ と $\text{poly } U$ との相互作用を調べてみた。 $\text{poly } A$ は $\text{poly } U$ と 0.15Na⁺(pH 7.0) 条件下 1 : 1 又は 1 : 2 の Complex を作るので unpaired base を含む相互作用の model としては (A), (B), (C), (D) (Fig 4) が考えられる。

(A), (B) は unpaired base が helix から loop out した構造をもつが (A) では double strand, (B) では triple strand を形成している場合であり (C), (D) はこれら odd base は loop out することなく helix の中に入りこみ (C), (C) の様に double あるいは triple strand を形成している。そこで各塩基組成の polymer において (A), (B), (C), (D) の model を仮定した場合にみられる $\text{poly}(A, m^2G)$ と $\text{poly } U$ の mole stoichiometry と実際 Mixing curve から観測される値を比較すると Table 2 の様になり、 $\text{Poly}(A, m^2G)$ と $\text{poly } U$ の Complex 形成は model (C) と良く一致している。

$\text{poly}(G_{57}, m^2G_{43})$ と $\text{poly } C$ の相互作用

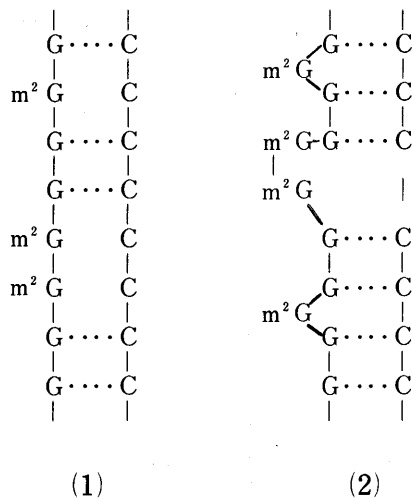
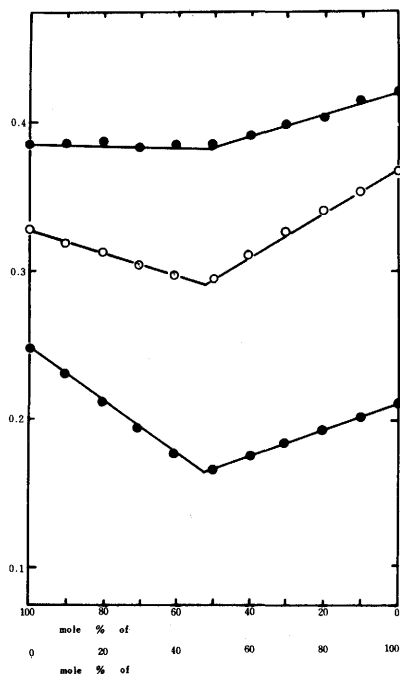


Fig 4

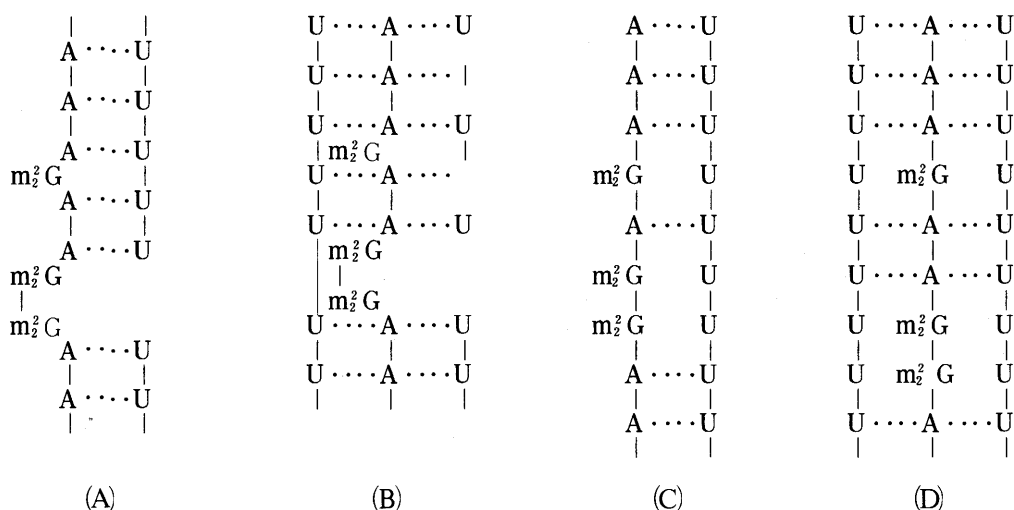
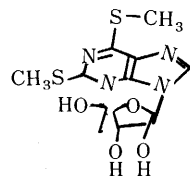


Table 2

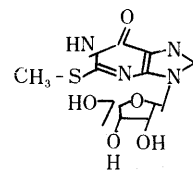
	poly (A_{65}, m^2G_{35}) copolymer : poly U	poly (A_{53}, m^2G_{47}) copolymer : poly U	poly (A_{50}, m^2G_{50}) copolymer : poly U
model A	60.6 : 39.4	66.7 : 33.4	65.5 : 34.5
B	43.5 : 56.5	50 : 50	48.5 : 51.5
C	50 : 50	50 : 50	50 : 50
D	33.3 : 66.7	33.3 : 66.7	33.3 : 66.7
observed	52 : 48	48 : 52	50 : 50

この様に Guanosine, Adenosine との Copolymer が Fresco model と異なり loop out することなく 1 : 1 の double helix を形成するものと思われる。あることであり Leonard¹⁴⁾ 等の指摘する様に Guanosine のアミノ基にメチル基の導入は base stacking を非常に強めるため、これを含む Copolymer も又強い vertical stacking する特性をもち、homopolymer との interaction においても loop out することなく double helix を形成するものと思われる。

そこで、このことの実証として poly (ms^2_6pu, G) と poly C との相互作用を調べてみた。poly ms^2_6pu は 261.5, 228, 311nm に λ_{max} をもち、RNase M による水解で A_{260} 42%, A_{300} 83% の非常に大きな hyperchromicity をもつ single stranded high stacked polymer であり、この base は正常塩基と水素結合の可能性は全くないので Copolymer の model には都合の良い化合物である。homopolymer 同様 poly ($ms^2_6 G_{60}, G_{50}$) も又 RNase M による水解で A_{260} 37%, A_{300} 56% の hyperchromicity を示し、非常に強く stack した polymer であることがわかる。このものも又 poly C と 1 : 1 の Complex を形成することを示す。この様に m^2G , m^2G を含む Copolymer の実験事実と同様 vertical stacking の強い Copolymer においては odd base が loop out することなく helix の中に入りこんでいるものと思われる。この時 C, D では 323nm の peak



が327(+2800)と305nm(−2000)とにsplittingした様な Spectra を与える。これは $ms^2 \cdot 6pu$ base が Complex 形成により helix の中に入りこんで rigid な double stranded structure を形成したことに
よるものと思われる。

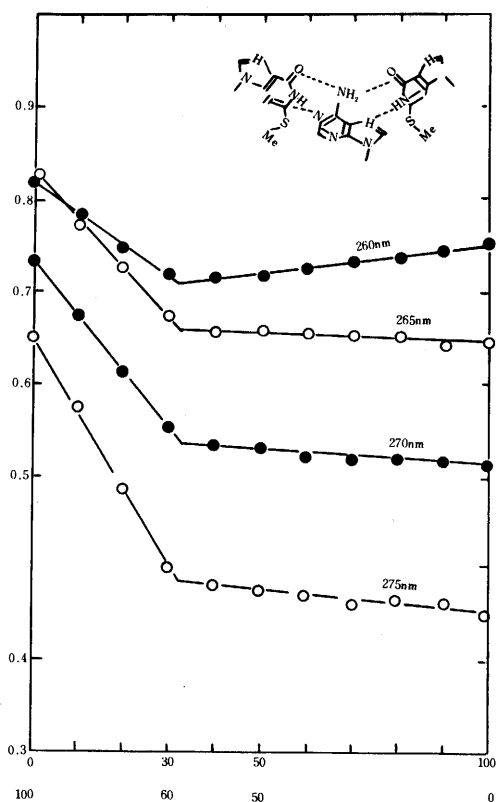
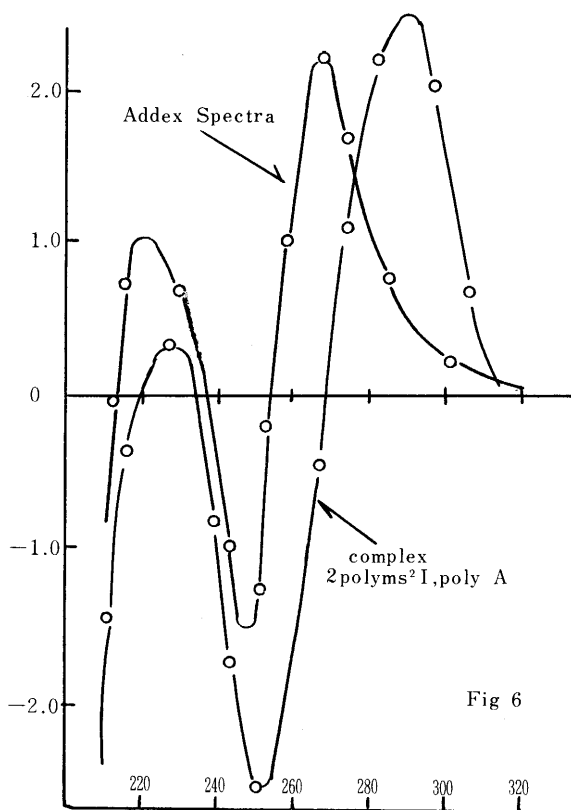


第三章 poly m^2I , poly ms^2I の合成とその性質

Guanosine のアミノ基をメチルアミノ、ジメチルアミノ基に置換

した methyl Guanosine, dimethyl Guanosine よりなる homopolymer は poly C と相互作用しないことは第一章ですでにあきらかにしたが、この様に Hypoxanthine の2位を種々な置換基で置換した base をもつ核酸の諸性質をあきらかにすることは非常に興味あることであり、以下、その合成と物理化学的性質をのべる。ポリメチルチオイノシン酸(poly ms^2I)は chart 1 の様にして化学的に合成された ms^2IDP を基質として PNP ase の重合反応で合成することができた。この polymer は常温では ordered structure をとっておらず温度をあげると broad な melting を示す。

$PKa = 10.90 \pm 0.05$ (0.15M NaCl), RNase M, RNase T_1 により完全に水解され 280nm に 31% の hyperchromicity がみられる。poly C とは Complex を形成しないが poly A, poly 7-deaza A と 2 : 1 あるいは 1 : 1 の C o m を作る。



2·poly ms²I, poly A Complex は 2·poly I, poly A より高い T_m 値を示す。又 Complex 形成により circular dichroism に component polynucleotide のそれより著しい差異がみられる。ところが、同様にして合成されたポリ 2-メチルイノシン酸(poly m²I)は poly I 同様低濃度(0.15M Na⁺pH 7.0)では ordered structure をとっておらず broad な melting を示す。又 RNase M, RNase T₁ で完全に水解され 275nm に 20~25% の hypochromicity を示す。pK_a = 10.82 (0.15M NaCl)

この polymer の CD から poly I より stack しておらず、poly ms²I 同様 poly C と Complex を形成しない。さらに poly A と何ら相互作用しない。これは hypoxanthine の 2 位にメチル基の導入により pK_a が高くなり N¹プロトンの酸性度が減少し、A·m²I 又は A·2m²I の base pair 形成がおこなわれないためと思われる。

結 論

(1) Guanosine のアミノ基をメチルアミノ、ジメチルアミノ基に置換した poly m²G, poly m₂²G は poly G 同様中性で ordered structure をとるが、その安定性は poly G, poly m²G, poly m₂²G の順にメチル基の導入に従って減少する。

(2) poly m²G, poly m₂²G は poly C と相互作用しないが poly (G, m²G), poly (G, m₂²G) (G content 100~50%) は poly C と 1 : 1 の Complex を形成する。ところがさらに m²G あるいは m₂²G の含量が増加した copolymer は何ら相互作用しない。

(3) poly (G, m²G), poly (G, m₂²G), poly (A, m₂²G) が poly C 又は poly U と夫々 Fresco model と異なった unpaired base が loop out していない 1 : 1 の Complex を形成することは copolymer の vertical stacking 作用が重要な働きをなしておるためと思われ、このことは poly (ms₂² Pu₅₀, G₅₀) と poly C に於ても 1 : 1 の Complex 形成がみられることからあきらかである。

(4) hypoxanthine の 2 位のメチルアミノ、ジメチルアミノ、メチル、メチルチオ基で置換したものは poly C と相互作用しない。これは、これらの置換基と Cytosine base の 2 位の酸素原子との立体障害によるものと思われる。

(5) poly ms²I は poly I と同様 poly A, poly Tu と 1 : 2、1 : 1 の夫々安定な Complex を形成するが、poly G, poly m²G, poly m₂²G, poly m²I は poly A とは何ら相互作用しない。これはメチルアミノ、ジメチルアミノ、メチル基の導入による立体的障害、あるいは N¹プロトンの Acidity の減少により Complex 形成ができないためであろう。

以上、tRNA の minor component を含む homopolymer 及び copolymer の実験から Guanosine のアミノ基のメチル化は base pair 形成を阻害するが、vertical stacking を強める作用のあることがあきらかになった。このことから tRNA に時として存在する unpaired base は必ずしも Fresco model の様に loop out するとは限らず helix の中に入りこんで t-RNA の安定性に寄与していることが示唆される。

引用文献

- 1) R. W. Holly, J. Apgar., G. A. Everett, J. T. Madison, M. Marquisser, S. H. Merrill, JR, Penswick and A. Zamir, Science, 147 1462 (1965)

- 2) M. Leviff, Nature 224 759 (1969)
- 3) RajBhandary, S. H. Chang, A. Stuart, R. D. Faulkner, R. M. Hoskinson and H. G. Khorana, Pro. Nat. Acad. Sci 57 751 (1967)
- 4) H. G. Zachau, D. Diitleng, H. Feldman, F. Melechers and W. Karau, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative. Biology. vol 31 (1966) p.417
- 5) Takemura S, M., Murakami and M. Miyazaki, J. Biochem(Tokyo) 65 489 (1969)
- 6) J. T. Madison and H. K. Kung, J. Biol. Chem 242 1324 (1967)
- 7) Madison J. T, G. A Everett and H-K Kung, J. Biol chem 242 1318 (1967)
- 8) M. Staehelin, H. Rogg, B. C. Baguley, T. Ginsberg and W. Wehrli Nature, 217 1363 (1969)
- 9) Z. Ohasi, M. Saneyoshi, F. Harada, H. Harada, S. Nishimura B. B. R. C, 40 866 (1970)
- 10) M. Grunberg-Manago, P. J. Ortiz and S. Ochoa, B. B. A 20 269 (1956)
- 11) J. G. Moffatt and H. G. Khorana, J. A. C. S 83 649 (1961)
- 12) F. Pochon and A. M. Michelson, Pro. Nat. Acad. Sc. U. S. 53 1425 (1965)
- 13) F. Pochon, A. M. Michelson, B. B. A 182 17 (1969)
- 14) H. Iwamura, N. J. Leonard and J. Eisenger, Pro. Nat. Acad. Sc. U. S. 65 1025 (1970)

研究発表

- 日本薬学会89年会(名古屋)要旨集 p574 ('69)
- 日本薬学会90年会(札幌)要旨集Ⅲ p187 ('70)
- 日本生物物理学会(福岡)要旨集

報告論文

○Synthesis and Properties of Polyribonucleolides Containing N² methyl and N² dimethyl Guanylic Acid in Polyguanylic acid.

M. Ikehara and M. Hattori, Biochemistry, 10 3585 (1971)

○Synthesis and Properties of Poly 2-methylthio inosinic Acid

M. Ikehara and M. Hattori, Biochim, Biophys. Acta, 269, 27 (1972)

○Synthesis and Properties of poly 2-methyl inosinic Acid

M. Ikehara and M. Hattori, Biochim, Biophys. Acta, 272, 27 (1972)

論文の審査結果の要旨

リボ核酸に含まれる稀出塩基を含むポリリボヌクレオチドを polynucleotide phosphorylase により合成し、その性質を紫外吸収、円二色性、熱変性、他の相補的ポリヌクレオチドとの混合等によ

り調べ次の様な事実を発見した。

1) イノシンの2位に methylamino (m^2G), dimethylamino (m_2^2G), methyl (m^2I), methylthio (ms^2I)等を含むポリマーは poly C と2本螺旋 complex を形成しない。

2) 如上の塩基及び dimethylthiopurine ($ms^{2,6}Pu$)を50%以下に含む正常塩基との copolymer に於ては、夫々正常塩基に相補的な塩基を含む homopolymer と1:1の complex を形成し、これらの稀出塩基が double helix 内に位置していることが判明した。

3) これらの事実から転位RNA中に含まれる稀出塩基は vertical な stacking によって夫等分子の安定性に寄与しているものと推定した。

以上の研究は、polynucleotide の性質に一新知見を加えるものであり、博士論文に該当するものと認める。