



Title	核酸特にアデニン関連物質の構造化学的研究 : X線構造解析とそれに基づくコンホメーション解析
Author(s)	藤井, 敏
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32000">https://hdl.handle.net/11094/32000</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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)	藤 井 敏
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 4 1 7 3 号
学位授与の日付	昭和 53 年 2 月 27 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	核酸特にアデニン関連物質の構造化学的研究 —— X線構造解析とそれに基づくコンホメーション解析 ——
論文審査委員	(主査) 教授 富田 研一 (副査) 教授 池原 森男 教授 上原喜八郎 教授 佐々木喜男

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

adenineはATPやcyclic AMPなどの構成成分として生体系における重要な反応に関与し、更に、補酵素 FAD, NAD, CoAの構成成分であることから、adenine関連物質の構造化学的研究はきわめて興味ある課題である。

核酸の塩基と糖とのコンホメーションを決めるグリコシド結合まわりの回転角 $\chi$ (purine nucleosideではC(8)-N(9)-C(1')-O(1'), pyrimidine nucleosideではC(6)-N(1)-C(1')-O(1')のなす角)は、主にX線解析の結果からpurine nucleosideではAnti ( $\chi \approx 0 \sim 60^\circ$ ) High anti ( $\chi \approx 120^\circ$ ), Syn ( $\chi \approx 210 \sim 260^\circ$ )の3つの領域に限定されることが明らかにされている<sup>1)</sup>。池原らは溶液学的実験により、この $\chi$ のとり領域が、polynucleotideのらせん構造特にそのらせんのねじれの方向と深い関係をもつことを明らかにしている<sup>2,3,4)</sup>。そこで著者は、この $\chi$ が種々の領域をとる時の分子構造への影響についてX線解析法によって検討を加えた<sup>5,6)</sup>。又、そのX線解析結果をもとに、溶液学的研究によって興味ある構造をとっていることが明らかにされているpolynucleotideについて、エネルギー計算によるコンホメーション解析を行なった<sup>7,8)</sup>。

上原らはadenine存在下ではriboflavin感受性脱水素酵素などの光化学的失活が増進すること、およびその機構としてadenine riboflavin complexの形成が重要であることを報告している<sup>9)</sup>。又adenineとriboflavinは補酵素FADの構成成分であり、FADの作用機序を解明する上でadenine環とisoalloxazine環との特異的相互作用についての考察は興味ある所である。著者は、adenine riboflavin (1:1) complexの結晶構造をX線解析法によって明らかにし、adenineとisoalloxazineとの相互

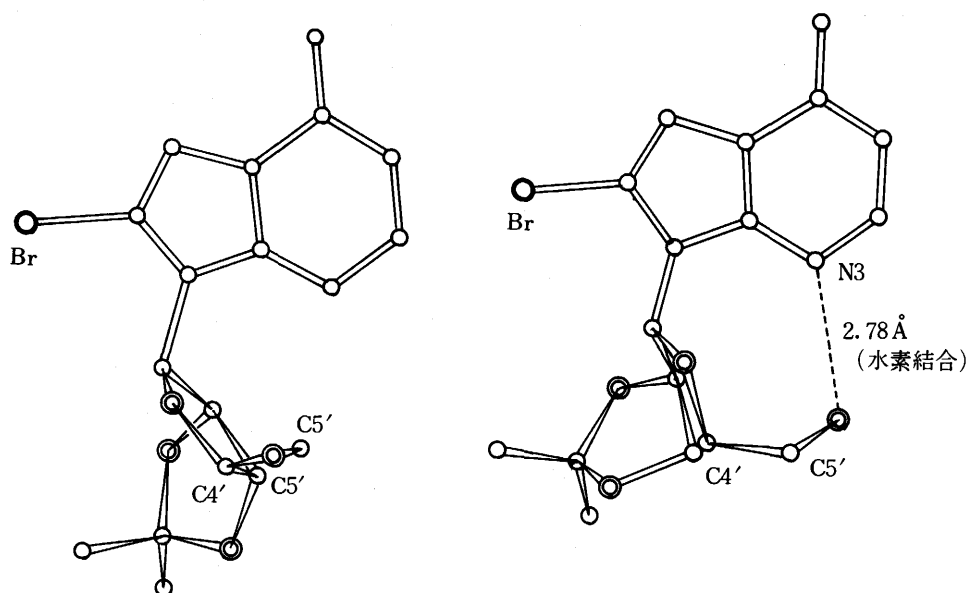
作用についても検討を加えた。<sup>10,11)</sup> 更にこの結晶構造解析結果に基づいたFAD分子のコンホメーション解析を行ない溶液学的知見と比較し、妥当なFADのモデルを得た。<sup>12)</sup>

### 第1部 核酸関連物質のX線結晶構造解析

#### 第1章 8-Br-2'-3'-O-isopropylideneadenosine (8-Br-2',3'-O-IPD-ado) の2型の結晶構造<sup>9)</sup>

a) 結晶化はn-butanol飽和水溶液より行なった。crystal Iは斜方晶系で $a=10.05$ ,  $b=18.55$ ,  $c=8.20\text{Å}$ , 空間群は $P2_12_12_1$ である。crystal IIは単斜晶系で $a=19.526$ ,  $b=9.212$ ,  $c=9.012\text{Å}$ ,  $\beta=99.37^\circ$  空間群は $C2$ である。強度データはともに全自動4軸型回折計により測定した。解析は重原子法である。

b) 分子構造を次に示す。(プリン平面への投影図で点線は分子内水素結合である。)



c) 得られた分子のconformationを下表に示す。

	crystal I	crystal II
$\chi$	$252^\circ$	$239^\circ$
ribocering	planar	C(2')-endo
4	gauche-trans	gauche-gauche

d) crystal IIでみられたsugar conformationはSyn型をとるnucleosideに多くみられる共通構造である。本化合物のNMRの結果からcrystal Iでみられたconformationが溶液中では多いことが類推された。

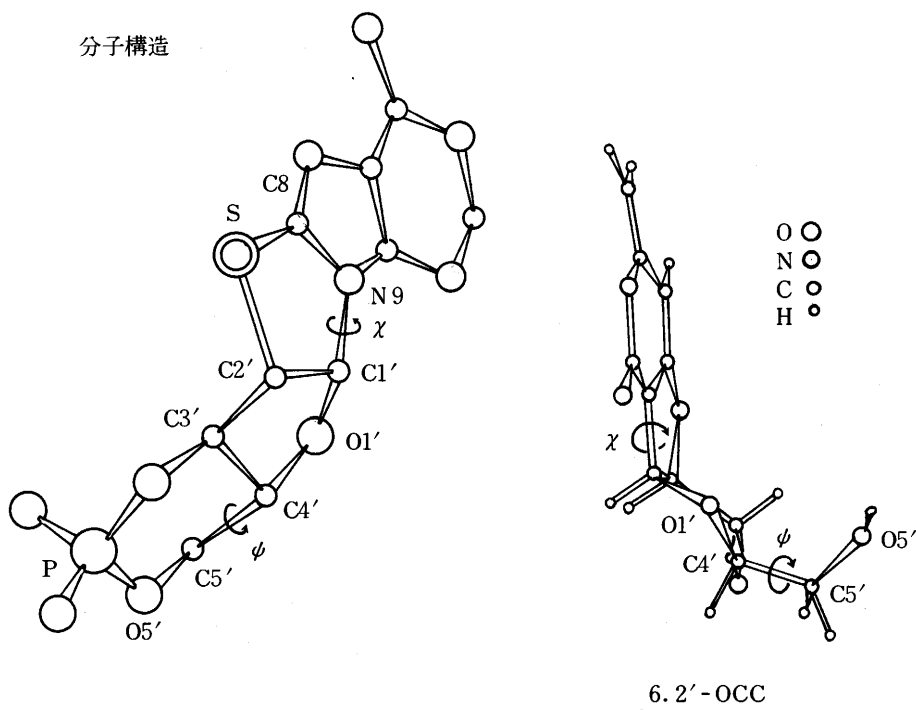
e) crystal IIのcrystal structureにおいて2種類の塩基対様式が認められたことより、Br原子がプリン8位についても塩基対型水素結合能には影響していないことが確かめられた。

第2章, 第3章 8,2'-anhydro-8-mercapto-9-β-D-arabinofuranosyladenine-3',5'-cyclic monophosphate (8,2'-SCA) の結晶構造, 6,2'-anhydro-6-oxy-1-β-D-arabinofuranosyl cytosine (6,2'-OCC) の結晶構造<sup>6)</sup>

a) 8,2'-SCAは水より再結晶した。結晶は単斜晶系で,  $a=12.68$ ,  $b=11.44$ ,  $c=5.70\text{Å}$ ,  $\beta=92.4^\circ$ ; 空間群は $P2_1$ である。強度データは写真法より, 解析は重原子法で行なった。

6,2'-OCCの結晶は $a=10.491$ ,  $b=7.255$ ,  $c=6.858\text{Å}$ ,  $\beta=103.55^\circ$ の単斜晶系に属し, 空間群は $P2_1$ である。強度データは回折計より解析は最小値関数で決定した。

b) それぞれの分子構造を下に示す。



8,2'-S-cycloadenosine-  
3',5'-cyclic monophosphate

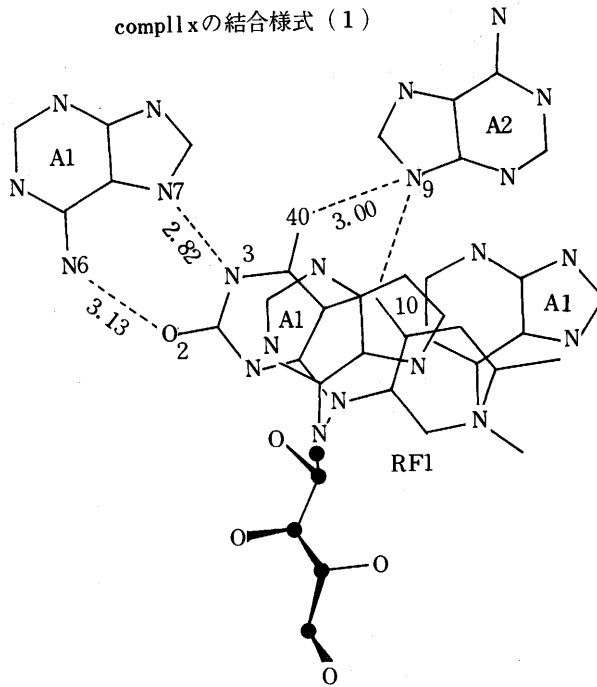
c) それぞれの conformation を下表に示す。

	8,2'-SCA	6,2'-OCC
$\chi$	$126^\circ$	$111^\circ$
sugar ring	C(4')-exo	C(4')-exo
$\psi$	trans-gauche	gauche-gauche

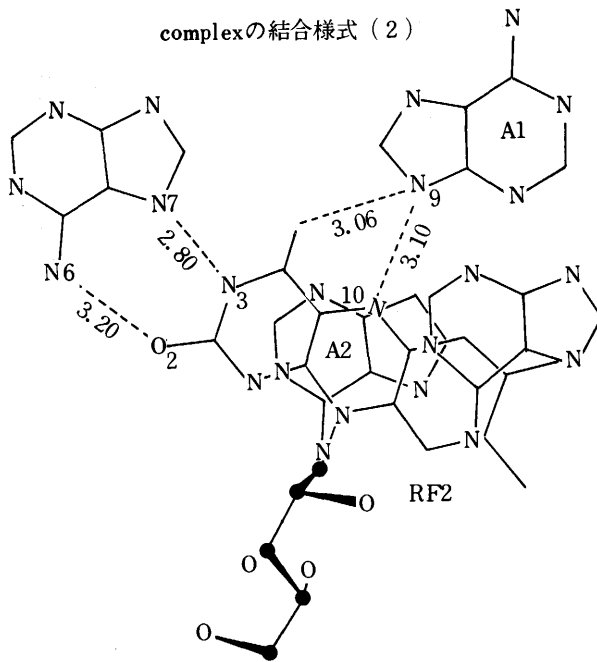
d) 塩基と糖2'位との間の新しい共有結合のため糖の conformation は C(4')-exo と C(4')-endo に限定される。この cyclo 体形成の影響は, 主にねじれ角に見られる。更に, NMR などの溶液学的知見との比較を行なうにより model である。

第4章 Adenine-Riboflavin (1:1) Complex の結晶構造<sup>12)</sup>

complexの結合様式 (1)



complexの結合様式 (2)



a) 結晶は水-DMSOの蒸気平衡法により得た。結晶は単斜晶系で  $a=8.53$ ,  $b=7.88$ ,  $c=37.82$  Å,  $\beta=97.83^\circ$ , 空間群は  $P2_1$  である。強度データは回折計により集めた ( $\sin\theta/\lambda \leq 0.40$ )。解析はベクトル法を中心とした Patterson関数の解釈によって行なった。

b) 非対称単位に2つの1:1 complexが存在するので、それぞれのriboflavin分子をRF1, RF2, adenine分子をA1, A2と区別している。adenineとriboflavinの相互作用としてはreverse Hoogsteen型の塩基対形成と塩基の重なり (stacking) がみられた。前頁にこの相互作用の様子を示す。

2つのriboflavin分子のconformationについて興味ある知見が得られた (下表参照)。RF1分子のもつR-t-g<sup>-</sup>-tのconformationとRF2分子のもつS-t-g<sup>+</sup>-tのconformationは共に安定構造であることが、他のriboflavinの結晶構造との比較、及びコンホメーション解析によって判明した。

	RF1	RF2
$\chi_f$	R	S
$\tau_{1f}$	t	t
$\tau_{2f}$	g <sup>-</sup>	g <sup>+</sup>
$\tau_{3f}$	t	t

もつR-t-g<sup>-</sup>-tのconformationとRF2分子のもつS-t-g<sup>+</sup>-tのconformationは共に安定構造であることが、他のriboflavinの結晶構造との比較、及びコンホメーション解析によって判明した。

## 第2部 コンホメーション解析

### 第1章 核酸のコンホメーション解析<sup>7,8)</sup>

#### a) 解析法

回転角の名称は第2部第2

章—aの図を参照のこと。

R, S:  $\chi_f$ が $+90^\circ$ をR,  $-90^\circ$ をSとする。

t, g<sup>+</sup>, g<sup>-</sup>: 各回転角が

trans, plus gauche, minus gauche.

ScheragaとScottが蛋白質について行なったSemi-empirical potential energy functionを核酸のらせん構造に適用した。<sup>13)</sup> コンホメーション解析のプログラムは次の要領で作製した。

(1) 化合物の各結合の結合距離, 結合角は固定し, その値はX線解析の結果を用いた。

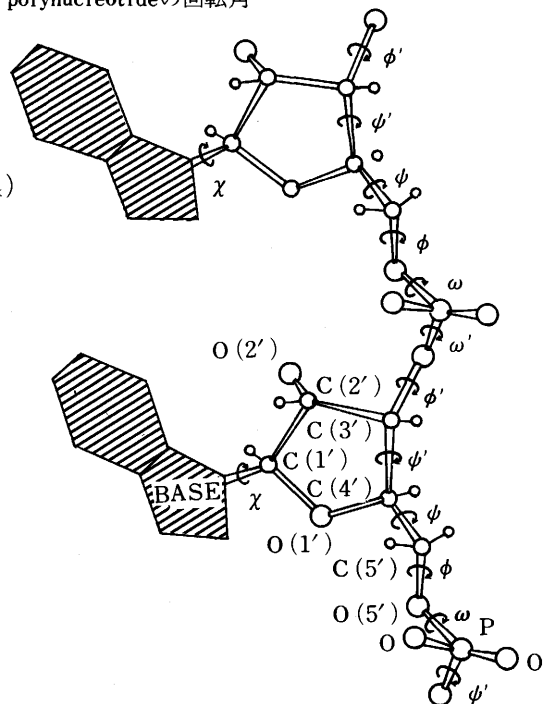
(2) コンホメーションは各結合まわりの回転角によって表現し, 用いる変数・回転角の名称は次に図示する。

(3) potential energyは次式より求めた。

$$E = -\sum_{i<j} \sum (a_{ij}/r_{ij}^6 - b_{ij}/r_{ij}^{12}) + \sum_{i<j} \sum 332.0 q_i q_j / \epsilon r_{ij} + \sum_k \frac{V_{ek}}{2} (1 + \cos 3\theta_k)$$

回転角 $\theta_k$ の変化によって原子間距離( $r_{ij}$ )が変化するすべての原子対についてpotential energyを計算する。(この式の第1項はLenard-Jonesの関係式で第2項はCoulomb potential, 第3項はtorsional barrier potentialである。各定数は文献値およびCNDO/2法を用いた値を使用した。) 誘電率 $\epsilon$ は水溶液中でのconformationを求める意味で4.0とした。最適化はPowellのアルゴリズムを用いた。<sup>14)</sup> 各変数の初期値としてはX線解析結果などから

polynucleotideの回転角



得られた知見に基づいた値を採用した。

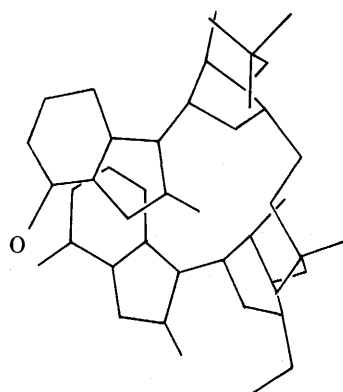
b) 解析結果

(1) poly (rA), poly (dA), poly (U) のらせん構造

(イ) poly (rA) では  $\chi$  が anti 領域の 2 つの安定な一本鎖右まきらせん構造が得られた。(下図) しかし  $\chi$  が High anti, Syn 領域では安定ならせん構造を与えない。

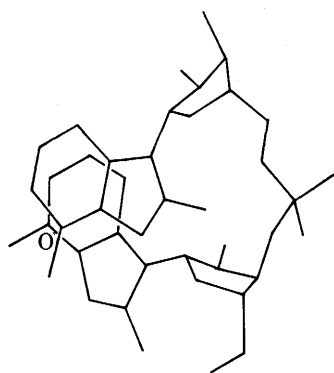
(ロ) poly (dA) では安定な一本鎖らせん構造は得られなかった。

(ク) poly (U) では安定な一本鎖らせん構造を与えないが, poly (rA) と二本鎖・三本鎖の右まきらせん構造を形成する可能性が示唆された。



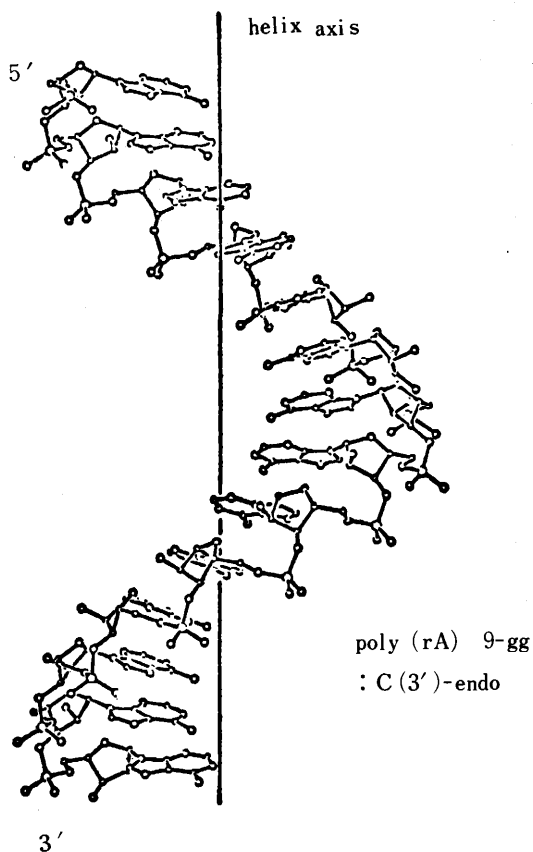
poly (rA) 9-gg : C (3')-endo

$\chi$	$\phi'$	$\omega'$	$\omega$	$\phi$	$\psi$
21°	199°	297°	288°	178°	65°



poly (rA) 8-gt : C (2')-endo

$\chi$	$\phi'$	$\omega'$	$\omega$	$\phi$	$\psi$
47°	182°	253°	185°	181°	160°



(2) A<sup>s</sup>pA<sup>s</sup>, poly(A<sup>s</sup>), poly(U<sup>0</sup>)

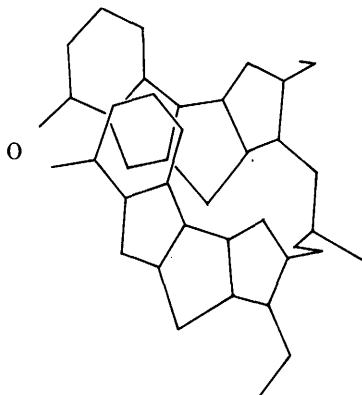
(イ) A<sup>s</sup>pA<sup>s</sup> 及び poly(A<sup>s</sup>) はほぼ同様な conformation となり, 次に示す様に安定な一本鎖の左まきらせん (左まきの塩基の重なり) 構造が得られた。

(ロ) poly(U<sup>0</sup>) では安定な一本鎖らせん構造を与えないが, poly(A<sup>s</sup>) と二本鎖・三本鎖の左ま

きらせん構造を形成する可能性が示唆された。

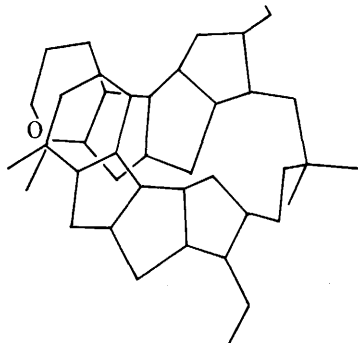
(3) poly (8-BrA) のらせん構造

安定な一本鎖らせん構造を与えない。



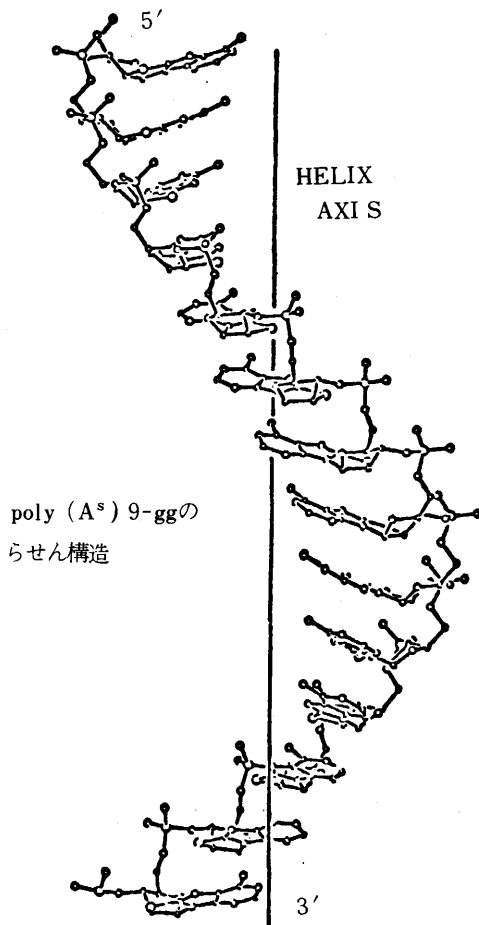
poly (A<sup>s</sup>) 8-gt : C (4')-exo

$\chi$	$\phi'$	$\omega'$	$\omega$	$\phi$	$\psi$
126°	181°	279°	168°	188°	152°



poly (A<sup>s</sup>) 9-gg C (4')-exo

$\chi$	$\phi'$	$\omega'$	$\omega$	$\phi$	$\psi$
126°	179°	281°	278°	173°	59°



第2章 Flavin-adenine dinucleotide (FAD) のコンホメーション解析<sup>12)</sup>

(a) 解析方法

- (1) 第2部第1章—(a)に準じて行なった。
- (2) 変数として取扱う回転角の名称を次頁に示す。又、併せて甲斐荘と京極らのNMRの知見もまとめている。<sup>15)</sup>
- (3) riboflavinのribitol部分のconformationとしては、riboflavin, FMN(flavin mononucleotide) についてコンホメーション解析を行ない、25組の初期角度の組合せ構造に限定した。一方 adenosine部分の $\chi_a$ はanti, ribose ringはC(3')-endo,  $\phi_a$ はgauche-gauche,  $\phi_a$ はtransの構造とした。pyrophosphate部分の4つのP-O結合まわりの回転角度として $\pm 30^\circ$ ,  $\pm 90^\circ$ ,  $\pm 150^\circ$ の6通りを考えた。その結果32400組の初期モデルが考えられるが、folded formを形成し、



FADの回転角	NMR studies	Conformational analysis
isoalloxazine		
N <sub>9f</sub>	$\chi_f$	?
C <sub>1'f</sub>	$\tau_{1f}$	trans
C <sub>2'f</sub>	$\tau_{2f}$	{ gauche <sup>-</sup> gauche <sup>+</sup>
C <sub>3'f</sub>	$\tau_{3f}$	trans
C <sub>4'f</sub>	$\tau_{4f}$	gauche
C <sub>5'f</sub>	$\tau_{5f}$	(trans)
O <sub>5'f</sub>	$\omega_{1f}$	trans
P <sub>f</sub>	$\omega_{2f}$	?
O	$\omega_{2a}$	??
P <sub>a</sub>	$\omega_{1a}$	?
O <sub>5'a</sub>	$\phi_a$	±30°, ±90°, ±150°
C <sub>5'a</sub>	$\phi_a$	±30°, ±90°, ±150°
C <sub>4'a</sub>	$\phi_a$	±30°, ±90°, ±150°
HO-C <sub>3'a</sub>		trans
HO-C <sub>2'a</sub>		gauche-gauche
C <sub>1'a</sub>	$\chi_a$	180°
N <sub>9a</sub>		60°
adenine		

25 x 6 x 6 x 6 x 6 x 1 = 32,400 sets

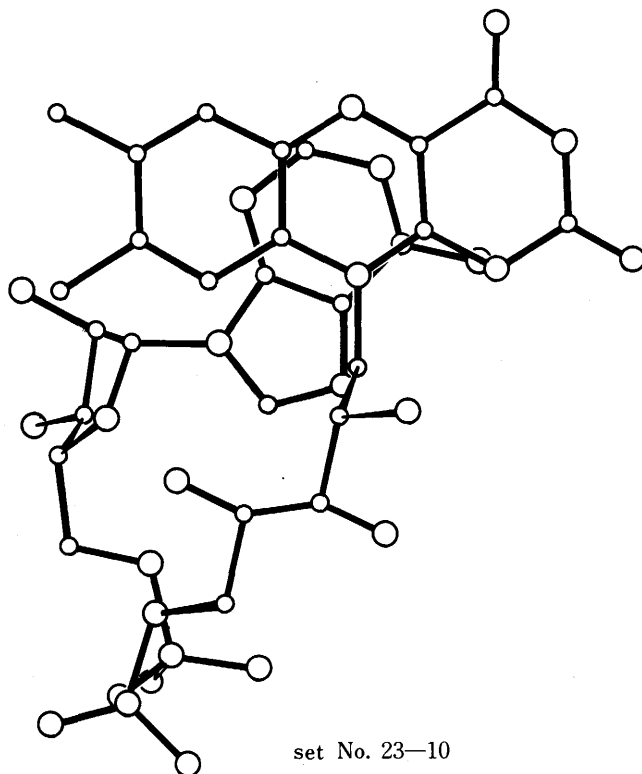
short contactが少ないモデルを選びだしたところ64組が残り、試行錯誤法より得た10組とともに最適化を行なった。

#### (b) 解析結果

もっとも安定な構造を次頁に示す。これらはNMRの結果と矛盾せず、特に甲斐荘と京極が提唱したモデルとよく似ており、水溶液中での妥当な構造であると考えられる。<sup>15)</sup>

#### 結 論

1. 著者はadenine関連物質の構造化学的研究をX線解析とコンホメーション解析を用いて行なった。
2. X線解析には重原子法・最小値関数法・ベクトル法など種々の方法を適用した。
3. 8-Br-2',3'-IPD-ado, 8,2'-SCA, 6,2'-OCCの分子構造をX線解析法によって決定し、分子のconformationについて多くの新しい知見を得た。またadenine・riboflavin 1:1 complexの結晶構造よりadenineとriboflavinとの相互作用について興味ある知見を得た。
4. コンホメーション解析は、従来とは違った新しいプログラムを作製し、有用な結果を導くことが出来た。
5. 核酸においてグリコシド結合まわりの回転 $\chi$ と分子構造及びらせん構造との関係について新しい



知見を得た。又、溶液状態での知見と矛盾しない妥当な構造モデルを得た。更に、FAD分子のNMRの結果と矛盾しない妥当なモデルを得た。

#### References

1. M. Sundaralingam (1969) *Biopolymers*, **7** : 821.
2. M. Ikehara, I. Tazawa & T. Fukui (1969) *Biochemistry*, **8** : 736.
3. S. Uesugi, J. Yano, E. Yano & M. Ikehara (1977) *J. Am. Chem. Soc.*, **99** : 2313.
4. S. Uesugi, T. Tezuka & M. Ikehara (1975) *Biochemistry*, **14** : 2903.
5. S. Fujii, T. Fujiwara & K. Tomita (1975) *Nucleic Acids Res.*, **3**, 1985.
6. Y. Kashitani, S. Fujii & K. Tomita (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69** : 1028.
7. S. Fujii & K. Tomita (1976) *Nucleic Acids Res.*, **3**, 1973.
8. S. Fujii & K. Tomita (1976) *Nucleic Acids Res. special publication*, No.2, s113.
9. K. Uehara, N. Yonezawa, T. Mizoguchi, S. Hosomi & R. Hayashi (1966) *J. Biochem. (Tokyo)*, **60** : 721.
10. K. Uehara, T. Mizoguchi, S. Hosomi, T. Fujiwara & K. Tomita (1968) *J. Biochem. (Tokyo)*, **64** : 589.
11. S. Fujii, K. Kawasaki, A. Sato, T. Fujiwara & K. Tomita (1977) *Arch. Biochem. Biophys.*, **181** : 363.
12. S. Fujii & K. Tomita (in preparation) (日本生物物理学会・第15回年会 (1976) 講演予稿集

pp 117)

13. R. A. Scott & H. A. Scheraga (1964) *J. Chem. Phys.*, **42**: 2209.
14. J. D. Powell (1964) *Computer J.*, **7**: 155.
- 15) M. Kainosho & Y. Kyogoku (1972) *Biochemistry*, **11**: 741.

### 論文の審査結果の要旨

本研究は生体高分子として重要な役割をもつ核酸の構成成分の中、特にアデニン関連物質をとりあげ、その分子構造をX線結晶構造解析法で決定するとともに、得られた構造化学的知見をもとに半経験的ポテンシャルエネルギー関数によって種々の合成核酸および補酵素FADのコンホメーション解析を行なったもので、特にFADの構造モデル、Poly (rA) の安定な一本鎖右まきラセン構造モデル、およびPoly (8,2'-cyclo A) の安定な1本鎖左まきラセン構造モデルはいずれも溶液実験から得られた結果をよく説明できる妥当なものであった。

以上の知見は構造化学、分子生物学に寄与するところ大で学位論文に値するものと認める。