



Title	シトシン塩基と種々の金属との相互作用に関するX線構造解析研究
Author(s)	小川, 恵三
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32556
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	小川 恵三
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 4838 号
学位授与の日付	昭和55年3月1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	シトシン塩基と種々の金属との相互作用に関するX線構造解析研究
論文審査委員	(主査) 教授 富田 研一 (副査) 教授 枝井雅一郎 教授 田村 恭光 教授 佐々木喜男

論文内容の要旨

緒論

天然から抽出された核酸には種々の金属が含まれており、また核酸を基質とする酵素には金属イオンを必要とするものが多い。

一般に金属イオンが核酸のリン酸部分に結合すると、その構造を安定化し、塩基部分に結合すると不安定化すると言われている¹⁾。リン酸部、塩基部への結合の強さは金属イオンの種類によって異なり、Eichhorn²⁾、Zimmer³⁾らによると、各金属イオンの塩基部への結合能は次の順序で大きくなる。 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 $\text{Ba}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Fe}^{2+}$ 、 Ni^{2+} 、 $\text{Co}^{2+} < \text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Ag}^+ < \text{Hg}^{2+}$ 一方、リン酸部への結合の強さはこの逆でアルカリ、アルカリ土類金属はリン酸部に、遷移金属は塩基部により強く結合すると言われている。しかし、二重らせん構造をとるApUNa塩の結晶解析結果⁴⁾では、 Na^+ がリン酸部とイオン結合すると共に更に両方の鎖のuracil塩基のO(2)にも結合しており、この Na^+ がApU double helixの構造安定化に寄与しているものと考えられる。

この様に、核酸と金属との相互作用は生体内で大きな役割を担っており、その相互作用を原子レベルで解明することは、金属の核酸への影響を検討する上で重要であると考えられる。

著者は、cytosine塩基の金属イオンとの相互作用に着目して、 $\text{Ca}(\text{cytosine Cl}_2\text{H}_2\text{O}(\text{catena-chloro-}\mu\text{-chloro-}\mu\text{-cytosine aqua-calcium (II)}))$ 、 $[\text{cytosinium}] \frac{1}{2}[\text{ZnCl}_4]\text{-cytosine}(\text{cytosinium hemitetrachlorozincate-cytosine})$ 、 $[\text{cytosinium}]_2\text{CuCl}_4(\text{dicytosinium tetrachlorocuprate})$ のX線結晶構造解析を行ない、得られた構造化学的知見より、cytosineと金属イオンおよびcytosiniumと Cl^- イオンとの相互作用様式およびその特徴について検討を加えた。

本論

X線構造解析に使用した試料は千葉大学薬学部の城武によって作製された。

第1章 Catena-chloro- μ -chloro-cytosine aquacalcium (II) ($\text{Ca}(\text{cytosine})\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) のX線構造解析

実験 cytosine と 5 倍量の $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を水に溶かして, 70°C で数時間加熱後除々に冷却した結果, 無色透明の板状晶が得られた。結晶学的データおよび反射数等を表 1 に示す。解析は重原子法で行ない, 構造の精密化は最小二乗法で行なった。

表 1

Formula	$(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O})[\text{CaCl}_2]\text{H}_2\text{O}$
Formula weight	240.10
Crystal system	Monoclinic
a (Å)	7.410(1)
b (Å)	16.162(2)
c (Å)	8.351(1)
β (°)	107.60 (2)
Space group	$\text{P}2_1/\text{C}$
Z	4
Dm (Mg/m^3)	1.669
Dx (Mg/m^3)	1.674
Radiation	$\text{CuK}\alpha$
$\sin \theta/\lambda_{\text{max}}$ (Å ⁻¹)	0.58
No. of reflections	1274
Final R value	0.070

解析結果 Ca^{2+} まわりの配位様式は五方両錐型で, 赤道面は cytosine(1) の N(3), O(2), cytosine(2) の O(2), および 2 個の Cl 原子から成り, axial 位は水 (OW) と Cl が占めている。(図 1) Ca の混成軌道は配位様式から $d^5\text{SP}$ と考えられる^{5,6}

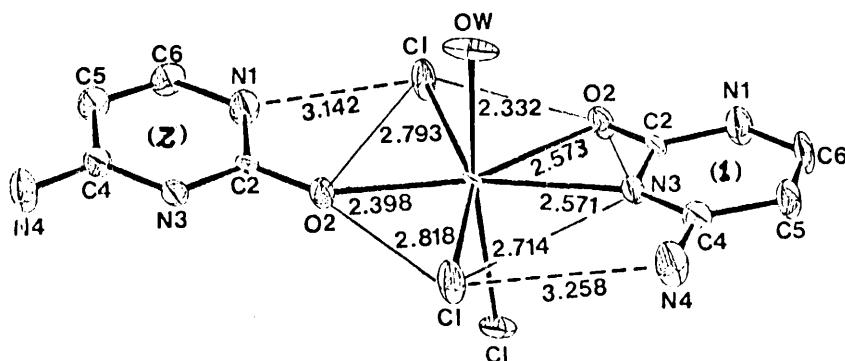


図 1.

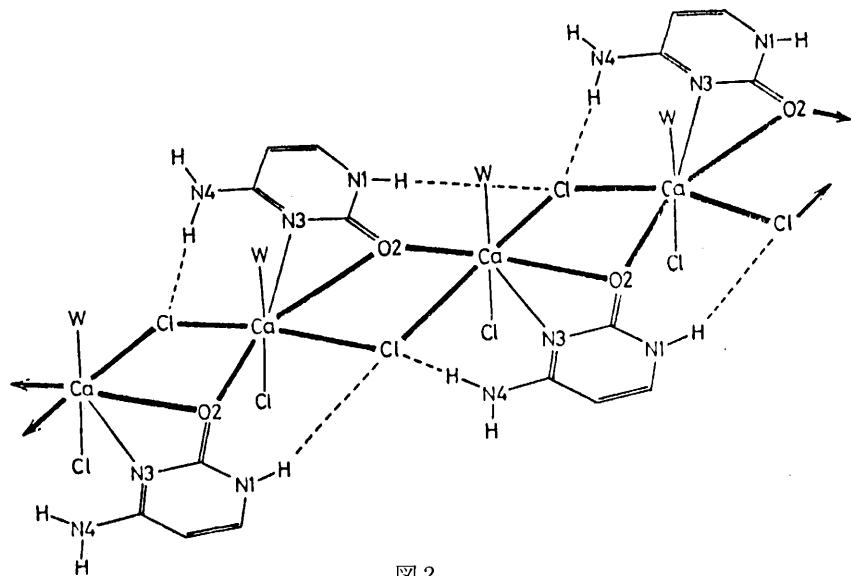


図2.

赤道面上でClとO(2)とがCa²⁺間を架橋して、図2に示す様な、直鎖状に続く錯体を形成している。図3には、これをC軸投影した結晶構造を模式的に示してある。polymer状の錯体間には、cytosine塩基同志のstackingとaxial方向のClと結晶水(W)との間に、水素結合が存在する。本錯体は核酸塩基が直接Ca²⁺に配位した初めての例である。

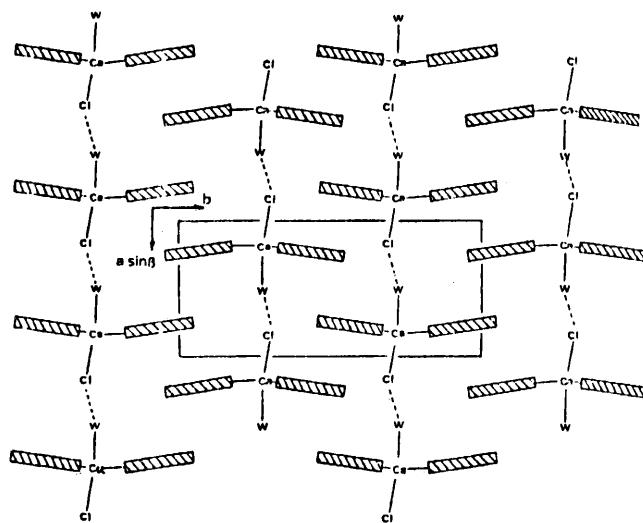


図3.

第2章 cytosinium hemitetrachlorozincate-cytosine ([cytosinium] $\frac{1}{2}$ [ZnCl₄]-cytosine) のX線構造解析

実験 cytosine と 9倍量のZnCl₂を水に溶かし、70°Cで数時間加熱後、室温放置することによって

淡黄色の柱状晶が得られた。

解析は重原子法で行ない、構造の精密化は最小二乗法で行なった。

解析結果 凝似対称心で関係づけられる cytosine (Cyt) と cytosinium (Cyt. H⁺) は塩基対を形成している。この塩基対の水素結合様式は pH < 5.5 の 2 本鎖 poly (c)⁷⁾ で見出された塩基対と同じ型である。また塩基対間に stacking が見られ、その面間隔は 3.26 Å である。cytosinium における protonation の位置は N(3) である。ZnCl₄²⁻ は少し歪んだ四面体構造をしており、1 個の Cl と cytosinium の N(4) との間に N—H···Cl 水素結合が存在する。本結晶では Zn²⁺ イオンと cytosine 塩基との直接の結合ではなく、主としてイオン間相互作用による分子複合体の形をとっている。

第3章 dicytosinium tetrachlorocuprate ($[\text{cytosinium}]_2 \text{CuCl}_4$) の X 線構造解析

実験 cytosine と 15 倍量の CuCl₂ · 2H₂O を 0.1 NHCl に溶かして、70°C で数時間加熱後室温放置し、茶褐色の柱状晶が得られた。結晶学的データおよび反射数等を表 2 に示す。解析は重原子法で行ない、構造の精密化は最小二乗法で行なった。

表 2.

Formula	$[\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2]_2 \text{CuCl}_4$
Formula weight	429.58
Crystal system	triclinic
a (Å)	13.682(2)
b (Å)	9.537(1)
c (Å)	6.936(1)
α (°)	102.93 (2)
β (°)	105.59 (2)
γ (°)	112.24 (2)
Space group	P1
Z	2
D _m (Mg/m ³)	1.875(3)
D _x (Mg/m ³)	1.882
Radiation	MoKa
$\sin \theta / \lambda_{\max}$ (Å ⁻¹)	0.65
No. of reflections	2711
Final R value	0.082

解析結果 非対称単位中に 2 個の cytosinium と 1 個の CuCl₄²⁻ が存在している。2 つの cytosinium はいずれも N(3) が protonation しており、共によく似た構造をしている。また CuCl₄²⁻ は大きく歪んだ四面体構造をしており、これは正方形と正四面体型の中間と考えられる。結晶構造を図 4 に示す。図 4(a) は一方の cytosinium の相互作用を、図 4(b) はもう一つの cytosinium の相互作用を示す。(a) では 2 本の、(b) では 3 本の N—H···Cl 水素結合を形成している。本結晶においても第 2 章で記述した $[\text{cytosinium}] \frac{1}{2} [\text{ZnCl}_4]$ - cytosine の場合と同様 cytosine 塩基と Cu²⁺ イオンとの間に直接の結合ではなく、水素結合とイオン間相互作用によって分子複合体を形成している。

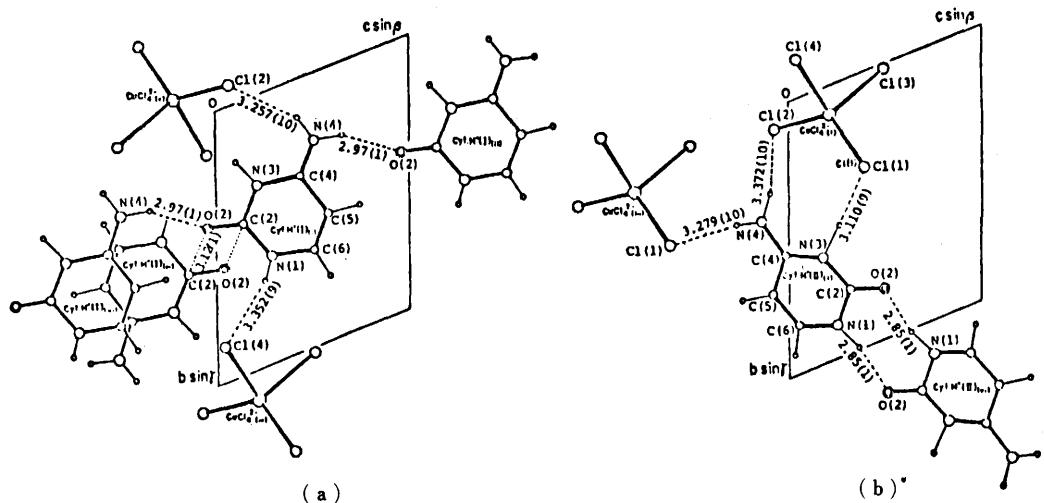


図4.

第4章 cytosine, cytosiniumと Ca^{2+} , CuCl_4^{2-} , ZnCl_4^{2-} との相互作用に関する構造化学的考察

第1節 Cytosine・金属錯体の配位様式による分類

cytosine-金属錯体における配位様式は次の3つのカテゴリーに分けることができる。即ち(i) M-N(3)配位, (ii) M-O(2)配位, (iii) M $\begin{smallmatrix} \text{N(3)} \\ \text{O(2)} \end{smallmatrix}$ 配位 (M: 金属) である。これまでにX線構造解析された cytosine, cytidine, CMPの金属錯体を調べてみるとカテゴリー(ii)に属するのは Ag (1-methyl-cytosine) NO_3^{\pm} , Mn (5'-CMP) H_2O^{\pm} と今回の Ca (cytosine) $\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ の3種で大半はカテゴリー(iii)に属する。カテゴリー(ii)は核酸2重鎖の塩基対に結合できる様式であり, カテゴリー(i), (iii)は1本鎖にしか結合できない様式であると考えられる。

第2節 Cytosineと Ca^{2+} との相互作用に関する考察

Ca^{2+} が結合したDNAが安定であること, およびかたい酸である Ca^{2+} は酸素原子と結合し易いことから考えて, Ca^{2+} と核酸との相互作用において, Ca^{2+} はリン酸部だけではなく, DNAのGC richな領域で両鎖の cytosine のO(2)間を Ca^{2+} が架橋して double helix を安定化すると考えられる。そこで ApUNa 塩の場合と同様に, GpC double helix の両方の鎖の cytosine のO(2)間に O(2)-Ca-O(2)結合をさせ, 今回得られた五方両錐型配位子の残りを全て水分子に置き換えてみると無理なく model を組むことができることから Ca^{2+} による核酸のGC rich領域の構造安定化機構の1つとして O(2)-Ca-O(2)の配位結合による架橋が考えられる。

第3節 ZnCl_4^{2-} , CuCl_4^{2-} と cytosinium (Cyt., H^+) との相互作用に関する考察

第2章, 第3章に記述した molecular complex においては, Zn^{2+} , Cu^{2+} と cytosine あるいは Cyt. H^+ との間に配位結合はなく, ZnCl_4^{2-} , CuCl_4^{2-} と Cyt. H^+ との間にはイオン間相互作用と, N-H...Cl型水素結合が見出される。これらは一種の cytosinium 塩の構造としてとらえることができる。すでに構造解析されている 1-methylcytosine 噬化水素酸塩⁹⁾の場合と比べてみると, cytosine のN(3)位がプロトネーションされ Cyt. H^+ となり結晶中での Br^- は今回の ZnCl_4^{2-} , CuCl_4^{2-} とほぼ同じ位置

を占ていること、N—H…Cl型に相当するN—H…Br型水素結合が形成されていることは、protonationしたcytosine塩基と陰イオンとの相対配置について、共通性があることを示唆している。

結論

1. 核酸塩基にCa²⁺が直接結合した最初の例として、Ca-cytosine錯体の分子構造を原子レベルで明らかにすることことができた。配位結合に関与しているのはN(3)とO(2)であり、Ca $\langle \begin{smallmatrix} \text{N(3)} \\ \text{O(2)} \end{smallmatrix} \rangle$ とCa—O(2)の2つの配位様式が見出された。
2. Ca-cytosine相互作用において、Ca—O(2)結合は核酸のdouble helixを安定化する1つの因子と考えられる。
3. [cytosinium] $\frac{1}{2}$ [ZnCl₄]-cytosineの結晶構造において、2本鎖poly (C)型の塩基対形成が見られた。即ち、pH 5付近では、この様なcytosine-cytosinium塩基対の形成が容易に起こることを示唆している。またZn²⁺とcytosineあるいはcytosiniumとの直接の結合は見出されない。
4. [cytosinium]₂CuCl₄の結晶構造解析よりCu²⁺とcytosiniumとは直接結合しないことが明らかになった。
5. 今回X線構造解析を行なった3つの結晶に共通して言えることはN(4)—H…Cl水素結合が存在し、結晶構造の安定化の1つの要因であることを示唆している。[cytosinium]₂CuCl₄においてcytosiniumとCuCl₄²⁻との結晶中での相対位置は、1-methylcytosine臭化水素酸塩におけるcytosiniumとBr⁻との相対位置と同様であり、プロトネーションしたcytosine塩基と陰イオンとの相対配置について基礎的知見を得た。

引用文献

- 1) R. M. Izatt, J. J. Christensen and J. H. Rytting, Chem. Rev., **71**, 439 (1971).
- 2) G. L. Eichhorn and Y. A. Shin, J. Amer. Chem. Soc., **90**, 7323 (1968).
- 3) C. Zimmer, G. Luck and H. Triebel, Biopolymers, **13**, 425 (1974).
- 4) N. C. Seeman, J. M. Resenberg, F. L. Suddath, J. J. P. Kim and A. Rich, J. Mol. Biol., **104**, 109 (1976).
- 5) G. H. Duffey, J. Chem. Phys., **18**, 943 (1950).
- 6) G. E. Kimball, J. Chem. Phys., **8**, 188 (1940).
- 7) R. Langridge and A. Rich, Nature, **198**, 725 (1963).
- 8) L. G. Marzilli, T. J. Kistenmacher and M. Rossi, J. Amer. Chem. Soc., **99**, 2797 (1977).
- 9) K. Aoki, J. C. S. Chem. Commun., **1976**, 748.
- 10) R. F. Bryan and K. Tomita, Acta Cryst., **15**, 1174 (1962).

論文の審査結果の要旨

核酸と金属との相互作用に関する研究は、核酸分子構造の安定化のみならず、突然変異誘発や制

ン機構の解明にとって重要な課題である。小川君は、この核酸構成塩基であるシトシンと金属との相互作用について種々のシトシン金属錯体のX線構造解析を行ない多くの新しい知見を得た。とくに、カルシウム錯体は今回はじめてその相互作用様式が明らかになったものである。これらの業績は構造化学、錯体化学、分子生物学に寄与するところ大で、薬学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。