

Title	5-メチルシトシンを含むDNAの構造に関する研究
Author(s)	宮代, 博継
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35137
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"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【1】

氏名：(本籍)	みやしろひろつぐ 宮代博継
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 6959 号
学位授与の日付	昭和 60 年 7 月 27 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	5-メチルシトシンを含む DNA の構造に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 池原 森男 (副査) 教授 佐々木喜男 教授 富田 研一 教授 栢井雅一郎

論文内容の要旨

DNA 中のシトシン塩基の 5 位のメチル化は、真核生物における唯一の塩基修飾であり、細胞の分化や突然変異、癌化など、遺伝子発現の制御に関係していると考えられ、また、原核生物においては制限酵素による切断からの保護などの役割を果たしていることが知られている。しかし、この 5-メチルシトシン (m^5C) の DNA 二重らせん構造に及ぼす影響についての研究はほとんどなされておらず、DNA のメチル化の生物学的機能とその静的および動的構造との関連についての研究は非常に興味もたれる。

そこで著者は、同じ塩基配列で、シトシン(C)の 5 位がメチル化されていないもの、 $d-ATACGCGTAT$ (1)、6 番目の C を m^5C に換えたもの、 $d-ATACGm^5CGTAT$ (2)、4 番目と 6 番目の両方の C を m^5C に換えたもの、 $\alpha-ATAm^5CGm^5CGTAT$ (3) の 3 種の自己相補的なデカデオキシリボヌクレオチドを化学合成し、これらの二重鎖複合体の水溶液中での立体構造および物理化学的性質を、UV、CD、NMR の分光学を用いて調べた。

DNA オリゴマーの化学合成は、高純度かつ大量の試料の必要性から、液相中、リン酸トリエステル法、ブロック縮合により行った。末端リン酸の 2 つ目の保護基としては、酸および塩基に対し安定で、亜硝酸イソアミルで選択的に除去することのできる、パラアニシド基を利用した。オリゴマーブロックの精製は、シリカゲルまたは逆相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより行い、脱保護後のデカマーの精製は、7M尿素を含むイオン交換セルロースカラム、または逆相のカラムクロマトグラフィーにより行った。純度検定は、逆相またはイオン交換の高速液体クロマトグラフィーにより行い、塩基配列の確認は、ホモクロマトグラフィーを利用したモビリティシフトアナリシスにより行った。

UVによる研究から、通常の右巻き二重ラセン状態においては、シトシンのメチル化により、二重鎖複合体の融解温度 (T_m) が少し上昇すること、融解過程の協同性が減少することがわかった。

CDによる研究から、測定した水溶液の塩の種類や濃度の違いにより、DNA二重ラセンのコンホメーションをいくつかのグループに分類することができた。その中で、8M NaClO_4 、10mMカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) という条件下、 -20°C において、デカマー(2)と(3)とは左巻き二重ラセン構造形成を示唆するCDスペクトルを与えた。このことはUVスペクトルの実験からも支持され、シトシンの5位のメチル化により、明らかに、DNA二重ラセンの動的な性質(構造変化)に違いが生ずることがわかった。

次に、標準的な右巻き二重ラセンを形成すると考えられる0.1M NaCl 、10mMカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pD 7.4) 中、デカマー濃度、約15mMにおいて種々のNMRの測定を行った。

^{31}P -NMRを測定し、3種デカマーの9個のシグナルの化学シフトの比較、化学シフトの温度依存性の比較から、デカマー(2)と(3)におけるリン酸ジエステル結合したリン原子核の磁気的環境は互いによく似ているが、デカマー(1)のそれとはかなり異なっていることがわかった。すなわち、シトシンの5位のメチル化により、糖-リン酸骨格のコンホメーションが変化すると考えられる。

軽水 (H_2O) 中において、塩基対水素結合に関与したイミノプロトンのシグナルをすべて帰属し、その化学シフトの温度依存性などをデカマー(1)と(3)とで比較したが、両者の間で大きな差は認められなかった。このことから、両デカマーで、二重ラセン形成時の塩基対のスタッキングジオメトリーにはあまり大きな違いのないことが予想される。これは、重水 (D_2O) 中における、塩基部C-Hプロトンの挙動からも支持されている。

重水中においては、 ^1H - ^1H シフト相関二次元NMR、COSY (Correlation Spectroscopy) および ^1H - ^1H NOE相関二次元NMR、NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) を利用して解析を行った。COSYでは、互いにスピ結合したプロトン(特に糖部)を明らかにすることができ、NOESYでは、互いに空間的に近いプロトン(糖部内及び塩基部-糖部間)について情報を得ることができる。まずはシグナルの帰属を試み、塩基部のすべてのC-Hプロトンと、糖部の1', 2', 2'', 3', 4'位のすべてのプロトンを帰属することができた。さらに、NOESYスペクトルを詳細に解析した結果、デカマー(1)も(3)もともに、基本的には標準的二重ラセン構造と思われるB-DNAコンホメーションに類似した立体構造を形成していることがわかった。しかし、塩基部のプロトンと糖部の各種プロトンとの間のNOEの大きさの比較から、以前にX線繊維回折の解析から得られたB-DNAモデルでは説明できないNOEが観察され、このB-DNAモデルとは若干異なった構造をとっているものと思われる。デカマー(1)と(3)との比較では、特に、塩基部のプロトン(プリン塩基ではH-8、ピリミジン塩基ではH-6)と同じヌクレオシド単位内の糖部の環外メチレン(5', 5''位)と思われるプロトンとの間のNOEの大きさに違いが観察された。このことは、シトシンのメチル化により、塩基部のプロトンと糖部5', 5''位のプロトンとの距離が変化したとして説明される。それは、C 4'-C 5'回りの内部回転角の変化を意味し、 ^{31}P -NMRでも観察された、糖-リン酸骨格のコンホメーション変化に通じるものであると考えられる。又、このNOEの大きさの違いは、5-メチルシトシ

ン残基から空間的に離れた部位においても観測されたことから、シトシンのメチル化の影響は、ある程度の範囲にまで伝播するものであると予想される。

以上のように、化学合成した5-メチルシトシン (m^5C)を含むDNAオリゴマーと含まないものとの二重らせん構造の比較から、 m^5C が1つのものと2つのものとの構造化学的性質にあまり大きな違いはないが、たとえ1つでも m^5C を含むものは、含まないものとは異なり、糖-リン酸骨格を中心に、メチル化による、少なからぬ構造化学的影響を受けることを明らかにした。

論文の審査結果の要旨

宮代君はDNA中に微量に存在する5-メチルシトシン (m^5C)の性質に興味をいだき、d-ATACGCGTATなる自己相補的な10-mer DNA及びそのCが m^5C に1ヶ又は2ヶ変化したオリゴマー3種を化学合成した。次にそのU. V.の熱的变化 (T_m)が m^5C の増加によって僅かに上昇し、その共同性が低下することを見出した。次にCDを測定し、全体としてB-DNA型を保持しているが、極端に塩濃度を上昇(8M NaClO₄)した場合には m^5C を含むものにB→Z型への変移の傾向を見出した。次に³¹PのNMR測定の結果 m^5C の有無によって大きな差を見出し、磷酸ジエステルの環境に m^5C が影響を与えることを推論した。更にプロトンNMRのCOSY及びNOESY測定の結果、 m^5C のH-6とsugarの5'のHの間に変化がみられ、これがPの環境変化の遠因と結論した。

以上の研究は博士号請求に値するものと認める。