

論文内容の要旨

論文題目 DNA-ポルフィリン相互作用の定量的解析

氏名 新田義倫

序

遺伝情報が書かれている DNA は蛋白質や生理活性小分子と相互作用して多くの生命現象に関与する。このため、DNA と蛋白質や生理活性小分子(リガンドとする)との相互作用の解析は重要である。ポルフィリンは生体分子であり、対称性の高い比較的大きな芳香性縮合環で、単純な構造でありながら、中心金属の種類を変えたり、meso 位の置換基を化学的に修飾でき、多様な立体構造にすることが出来る。このため、DNA との相互作用の研究対象として優れている。また、ポルフィリンは DNA と様々な様式で相互作用するが、ポルフィリンの吸収帯(Soret 帯)は近紫外領域にある DNA の吸収帯と離れた位置に存在し、吸光度が強いため、スペクトルの解析が比較的容易という利点もある。これらのため、多くの研究が行われてきた。

DNA に 1 種類の結合様式で結合するリガンドに対しては、蛍光、紫外可視スペクトル等から結合定数、1 分子が結合する塩基対数(サイトの塩基対数)を求める方法が確立されている。しかし、DNA に複数の結合様式で結合するリガンドの定量的な解析方法は確立されていない。

そこで、本研究では、複数の結合様式で結合する manganese(III)-tetra (4-N-methylpyridyl)

porphyrin (MnTMpyP)を対象とし、新たに開発した方法で MnTMpyP-DNA 溶液の CD スペクトルを分解し、結合様式ごとにスペクトルの形と強度を定量的に解析した。さらに、それぞれの結合様式での DNA の結合部位、サイトの塩基対数を解析した。その結果、ポルフィリン-DNA 相互作用を初めて定量的に解析できた。MnTMpyPは軸配位子をもち、DNA の塩基対間にインターカレーションしないため DNA のコンフォメーションを大きく変えることがなく、解析が比較的容易と考えられる。分光法として、キラルな DNA に結合したアキラルな MnTMpyP に誘起される溶液中の CD スペクトルを用いた。DNA に結合していない MnTMpyP は CD を示さず、通常の吸収スペクトルとは異なり結合様式の違いが CD スペクトルに敏感に反映されるためである。

実験

薄い MnTMpyP 溶液に、濃い poly(dA-dT)₂, poly(dG-dC)₂, poly(dI-dC)₂ あるいは子牛胸腺(以下 CT とする)DNA 溶液を加えて、多数の r 値で CD スペクトルを測定した。ここで、DNA 1 塩基対に対するリガンドの濃度を、 $r = [\text{Ligand}]/[\text{DNA}]$ と定義する。

スペクトルの解析方法

r 値が 0 から大きくなるにつれリガンドはより多くの結合様式で DNA に結合するようになる。そこで、 r 値が 0 から大きくなるにつれ現れる結合様式を、mode 1, mode 2, mode 3... と定義した。

CD スペクトル $CD(\lambda)$ は $CD(\lambda) = \sum I_i \cdot B_i(\lambda)$ で表すことが出来る。ここで I_i は mode i の強度を表す係数で、 $B_i(\lambda)$ は mode i の基底スペクトルとする。スペクトルの分解には、まず $B_i(\lambda)$ を求める。 $B_i(\lambda)$ は、以下の様に求めた。

- 1: DNA 濃度でスペクトルを規格化した。
- 2: r 値による CD スペクトルの変化から、 r 値が 0 から大きくなるにつれ mode 1, mode 2, mode 3 の順に飽和してゆく事を予想した。
- 3: 線形最小二乗法を用い、飽和する mode の順、等吸収点などを手掛かりに、 $B_i(\lambda)$ を求めた。

次に、線型最小二乗法によりすべての実測スペクトルを $CD(\lambda) = \sum I_i \cdot B_i(\lambda)$ として curve fitting し I_i を得た。すべての実測スペクトルについて、残差は無視できるほど小さくなり、実測スペクトルは

基底スペクトルの線形結合で見事に再現できることが明らかになった。すなわち、結合様式毎に、基底スペクトルとスペクトル強度の r 値による変化を定量的に明らかにした。

また、 r 値が大きくなるにつれ、遊離の MnTMpyP 濃度が大きくなることを予測し、スペクトルの分解結果から、線形最小二乗法を用いて、それぞれの mode についてサイトの塩基対数そして、MnTMpyP $1 \mu\text{M}$ 当たりのスペクトルを見積もった。

結果と考察

1, CD スペクトルの r 値による変化

poly(dI-dC)₂ の major groove 側は poly(dG-dC)₂ と同様の構造をし、minor groove 側は poly(dA-dT)₂ と同様の構造をしている。MnTMpyP-poly(dA-dT)₂, poly(dI-dC)₂ は共に 3 つの mode で分解でき、基底スペクトルは同様のものとなり、 r 値に対して I_1 は同様の変化を示した。また MnTMpyP-poly(dG-dC)₂ では、MnTMpyP-poly(dA-dT)₂, poly(dI-dC)₂ の mode 1, mode 3 と同様の 2 つの mode のスペクトルに分解できた。そこで、この 2 つの mode を mode 1, mode 3 とする。

MnTMpyP-poly(dG-dC)₂ では、mode 2 のスペクトルは現れなかったが、mode 2 で MnTMpyP は minor groove 奥深くに結合し、グアニンの minor groove にアミノ基があるために、MnTMpyP は minor groove 奥深くに結合できず、そして、GC 配列には mode 2 で結合できないことを示唆している。

複雑な塩基配列をしている天然の DNA, MnTMpyP-CT DNA では、MnTMpyP-poly(dA-dT)₂, poly(dI-dC)₂ と同様の分解結果が得られた。ただし、MnTMpyP-poly(dA-dT)₂, poly(dI-dC)₂ と比べて、mode 3 の現れ始める r 値は小さい値となり、mode 2 の強度 I_2 は比較的小さい値となった。GC 配列には mode 2 で結合できない事により、CT DNA に存在する mode 2 のサイトの数は mode 1, mode 3 のサイトの数より少ないことが、 I_2 は比較的小さい値となった大きな要因と考えられる。

CT DNA は複雑な塩基配列となっているにもかかわらず、MnTMpyP-CT DNA のスペクトルはたった 3 種類の mode で精度良く分解出来たことは驚くべき事である。これは、サイトを構成する塩基配列が異なっても、MnTMpyP の結合できる結合様式は限られることを示唆している。また、本研究で開発した解析方法は、異なった塩基配列の DNA に対しても幅広く適用できることを示して

いる。ただし、本研究の方法でスペクトルを分解するには、次の2つの条件が必要である。(1) 2成分系あるいは3成分系である事。(2) mode 3のスペクトルに正と負のピークがある事。(3) mode 1, 2, 3が現れる r 値に十分に差があり、かつ、飽和する r 値も十分に差がある事。

一般的にリガンドが塩基対間に結合(インターカレート)した場合に負のCDを示し、grooveに結合した場合に正のCDを示す。また、リガンド-DNA複合体についてCDスペクトルの理論計算も試みられており、リガンドの配向や塩基配列などにより、CDスペクトルの形と強度は大きく変わり、現段階ではCDスペクトルからリガンド-DNA複合体の構造を定量的に解析できない事が示されている。

塩基対が異なれば、塩基対の遷移モーメントは異なる。また、同じmodeのスペクトルであれば、MnTMpyP $1 \mu\text{M}$ 当たりのスペクトル強度はDNAによって異なるが、スペクトルの形は良く似たものとなった。これは、塩基対の遷移モーメントは塩基対の平面上にあり、DNA塩基対及び遷移モーメントはDNAの二重螺旋の軸に対してほぼ垂直に配向していることがスペクトルの形を決める大きな要因で、遷移モーメントの種類がスペクトルの強度を決める要因となっている事が考えられる。

2, 薬物阻害実験

major grooveに結合する事が知られているmethyl greenをMnTMpyP-poly(dA-dT)₂溶液に加えたところ、methyl greenはMnTMpyPのmode 1での結合を阻害し、mode 1でMnTMpyPはmajor grooveに結合している事が明らかになった。また、minor grooveに結合する事が知られているberenilをMnTMpyP-poly(dA-dT)₂, poly(dI-dC)₂溶液に加えたところ、berenilはMnTMpyPのmode 2, mode 3での結合を阻害した。mode 2でMnTMpyPはminor grooveの奥深くに結合することから、mode 3はminor grooveの外側に結合する事を示唆している。

3, 結合様式のまとめ

以上の結果よりMnTMpyPの結合様式について以下の事が明らかになった。mode 1ではMnTMpyPはmajor grooveで6塩基対に結合し、459nmに正のピークを持つCDスペクトルを示

す。mode 2 では MnTMpyP が minor groove 奥深くで 6 塩基対に結合し、454–456, 468nm に正のピーク、461–462nm に負のピークを持つ CD スペクトルを示す。mode 3 では MnTMpyP は minor groove の外側に結合し、455–459nm に弱い負のピーク、464–466nm に正のピークを持つ CD スペクトルを示す。

さらに、これまで報告されている事を元に、MnTMpyP–DNA 複合体の立体構造を考察した。