

氏 名	トウ 唐 国 慶
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 187 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科・専 攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	Study on Drug-DNA Minor Groove Interactions and DNA Supercoiling by Using Hydrostatic Pressure as a Perturbation Agent
審 査 委 員	(主査) 教 授 功 刀 滋 教 授 木 村 良 晴 教 授 黒 田 裕 久 教 授 村 上 章

論 文 内 容 の 要 旨

本論文においては、連続した A・T-塩基配列における DNA の Minor groove に対する可逆的な抗生物質などの薬剤の結合、および、閉鎖した環状の DNA のとる Supercoil (超らせん) 構造に対する圧力の効果を研究している。このような系に対する高圧力を用いた研究はこれが最初である。

第 1 章で論文の目的と関係する研究分野の背景等を概説した後、第 2 章においては、プラスミド pBR322DNA が制限酵素 EcoRI によって触媒される加水分解反応に対して示される Restriction Endonuclease Protection Assay (REPA) 法を用いて、抗生物質などの薬剤 (distamycin、Hoechst 33258、及び、DAPI) と DNA の EcoRI-認識配列との相互作用 (Minor groove への結合) に対する圧力の影響を解析した。その結果、高い圧力が制限酵素による加水分解反応に対する薬剤の保護効率を著しく上昇させることを見いだした。EcoRI の認識配列への薬剤の (競争) 結合定数が REPA の薬剤濃度依存性から決定され、その圧力依存性から薬剤が Minor groove に結合するに伴う負の体積変化が計算されたが、このことより、薬剤-DNA 複合体形成に際して DNA 及び薬剤に大きな水和の変化が生じることが示唆された。

第 3 章ではこの結果をふまえて、加圧下における合成ポリヌクレオチド、poly(dA)・poly(dT) (ホモポリマー) 及び poly [d(A-T)]・poly [d(A-T)] (コポリマー)、と蛍光性薬剤である Hoechst 33258 の相互作用を蛍光強度および発光波長の濃度依存性の測定により検討し、二種の合成ポリヌクレオチドの間で薬剤結合に関して体積効果と水和変化に大きな差が見られることを明らかにしている。適用されたイオン濃度のすべての範囲で、Hoechst 33258-コポリマー結合に伴っては負の体積変化が見られたが、その値は Hoechst 33258 の結合に際して DNA の Minor groove における水和スパインが置換されることから予想される値とは逆の値であり、従って DNA-薬剤複合体でより大きな水和収縮変化がおこっていると結論している。これに反して、ホモポリマーとの相互作用においては、溶媒中の塩濃度や圧力に複雑に依存する体積変化が示され、ホモポリマーの異常な B-型 DNA 構造及び複合体の形成に伴う環境因子変化が寄与していると考察した。ホモポリマーよりも、A・T のコポリマーの方が、通常の DNA 分子のようにふるまうという他の報告からみて、これらの圧力効果の違いは、前章において示された REPA の結果とよく一致していると結論した。

つづいて第 4 章では、Tris バッファー中において A・T ポリマーに結合した Hoechst 33258 ($[Drug] / [DNA] < 0.01$) の蛍光及び吸収スペクトルパラメーターが、塩濃度や pH 値に大きく依存して変化することを明らかにし、この結果は、Hoechst 33258 が結合した DNA の局所的な構造及び水和の揺らぎに伴う薬剤分子のコンホメーション変化によってもたらされると考察した。前章において得られ

たDNA-薬物の結合体積変化に対応して、ここでの蛍光・吸光スペクトルデータは、ホモポリマーがコポリマーよりも薬剤との複合体の形成においてより大きく脱水を受けることを示した。また塩濃度に対する変化より Hoechst 33258 と non-A・T 型塩基配列との複合体の安定性には静電相互作用が重要な役割を果たしていることを示した。

一方、第5章では、閉鎖した環状DNAの高次構造に対する圧力の影響を、麦芽由来DNA topoisomerase I およびT4 DNA ligaseが引き起こすDNA supercoilの緩和（または緊張）反応を用いて、加圧下でのtopoisomerの平衡分布の変化を固定し、放圧後に電気泳動法によって解析することによってtopoisomerの平衡分布に対する圧力の効果を研究している。加圧下での反応によってつくられたtopoisomerは、常圧でつくられたものより、一次元のあるいは二次元の電気泳動において大きなゲル移動性を示し、より強いsupercoilingが得られたが、この結果に基づいて、DNA二重らせんのねじれに対する圧力効果が、約 $1.1 \sim 1.7 \times 10^{-3} / \text{MPa}$ であると算出した。ここで得られたDNAのsupercoil分布に対する圧力の効果は、二次構造そのもの、及び、自由エネルギーに関するDNAの部分的不均一性やDNAらせん構造の剛性への圧力の影響と解釈された。また、加圧下では閉鎖した環状DNAのlinking数が増加することに基づき、生物学的な意味に対する示唆を与えた。

最終章では、本論文の研究によって得られた結果について総括し、今後の研究方向について展望している。

論文審査の結果の要旨

圧力は有用な実験変数であり、これまで蛋白質や脂質、生体膜の構造形成、安定性、ダイナミクス、あるいは、機能の研究に広く適用されてきた。しかし、核酸の構造や機能に対する圧力の効果はあまり研究例がなく、B-型DNA構造の塩基対形成に関しては圧力の上昇による安定化が見られること、また、intercalaterとの相互作用は圧力の上昇が結合を強めるという報告がある程度であった。このような背景からDNAの種々の高次構造や他の薬剤との相互作用に圧力がどのような影響を及ぼすかは、核酸の構造や機能を理解する上でも重要かつ興味ある問題であると指摘されてきた。

本論文で著者は、薬剤-DNAのMinor groove及び、DNAのSupercoil（超らせん）構造についての高圧を利用した研究を初めて展開しているが、これは、酵素反応を介して高圧下でのDNAに関連する現象を「可測化」する事により、直接的な分光学的方法では対象とできなかった系を取り扱うことに成功したからである。

すなわち、薬剤-DNAのMinor groove結合では、薬剤の結合がいわゆる制限酵素（Restriction Endonuclease）によるDNAの特異的切断を「保護」することに着目し、この保護作用を通じて（放圧後の）常圧下での詳細な切断分画解析により、「加圧下」での相互作用の様子を知るという方法論を利用した。またDNAのSupercoil構造の解析ではDNA topoisomerase I およびT4 DNA ligaseが引き起こすDNA supercoilの緩和（あるいは緊張）反応を用いて、加圧下でのtopoisomerの平衡分布変化を固定するという手法を用いて、topoisomerの分布に対する圧力の効果を知ることになった。さらに、蛍光性薬剤であるHoechst 33258を対象とする系では、酵素反応保護法と高圧下での直接的蛍光測定とを併用し、両方法の特色の相補性を検証している。

これらの方法論は、常圧の系で他の研究者が近年すでに用いているものであるが、これらを高圧という条件下での解析に適用したところに著者のoriginalityがあり、またその適用を以てはじめてこのような条件下での様子を知ることになった。その結果、薬剤-DNA複合体形成に際して両者に大きな水和の変化が生じることや、ホモポリマー・コポリマーの二種のポリヌクレオチドの間で薬剤結合に関して体積変化と水和変化に大きな差が見られること、後者の方が天然のDNA分子に近いふるまいをすること、加圧下では、常圧より強いsupercoilingが得られたことなど、DNAの構造・水和・薬剤との相互作用に関する重要な知見が見出され、また、加圧下では閉鎖した環状DNAのlinking数が増加することなど、生物学的な意味に対する重要な示唆も与えた。

本論文の内容は、核酸にかかわる化学、生物物理学、生化学の研究に対して大きく貢献するものであると判断できる。

なお、論文の内容は下記のようにすでに申請者を筆頭著者とする5報の原著論文に纏められ、うち3報が発刊済みであり、1報が印刷中、1報が審査中である。また論文内容の一部は2つの国際会議の proceedings として刊行（1つは印刷中）されている。

【原著論文】

- *Guo-Qing Tang, Naoki Tanaka, and Shigeru Kunugi; Effects of Hydrostatic Pressure on DNA Minor Groove Binding as Studied by Restriction Endonuclease Protection Assay (REPA). *Chemistry Letters*, 747-748 (1997).
- *Guo-Qing Tang, Naoki Tanaka, and Shigeru Kunugi; Effects of Pressure on the DNA Minor Groove Binding of Hoechst 33258. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 71, 1725-1730 (1998).
- *Guo-Qing Tang, Naoki Tanaka, and Shigeru Kunugi; *In vitro* Increases in Plasmid DNA Supercoiling by Hydrostatic Pressure. *Biochem. Biophys. Acta*, 1443, 364-368 (1998).
- *Guo-Qing Tang, Naoki Tanaka, and Shigeru Kunugi; Study on the Salt Effect on DNA-Hoechst 33258 Interactions by Fluorescence Spectral Shifts and Pressure Dependence of the Binding Equilibrium. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 72, in press.
- *Guo-Qing Tang, Naoki Tanaka, and Shigeru Kunugi, Characterization of Pressure Effects on Winding of the DNA Helix by Enzyme-Induced Supercoiling Assay. *Eur. J. Biochem.* (in contribution)

【国際会議報告】

- *Guo-Qing Tang, Naoki Tanaka, and Shigeru Kunugi; Effects of Pressure on Minor Groove Binding to DNA as Studied by the REPA and Fluorometric Methods. in "*High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry*" (N.S.Isaacs, Ed.) The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, (1998), pp.364-369.
- *Guo-Qing Tang, Naoki Tanaka, and Shigeru Kunugi; DNA Supercoiling under High Pressure. in "*the Advances in High Pressure Bioscience & Biotechnology*" (H.Lüdwig, Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, in press.