

【 44 】

氏 名	迫 田 満 昭 さこ だ みつ あき
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 238 号
学位授与の日付	昭 和 47 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	ストップフロー法によるアクリジンオレンジと DNA との結合過程の研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 波多野博行 教 授 香月裕彦 教 授 大西俊一

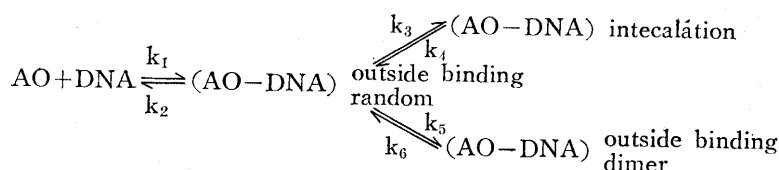
論 文 内 容 の 要 旨

アクリジンオレンジ,あるいはその類縁の色素化合物は細菌に対して突然変異を誘起する物質として知られている。一方,これらの色素はデオキシリボ核酸 (DNA) と結合することが知られており,これが突然変異を誘起する作用と関連があるものと予想されている。この場合の結合の様式に関しては従来の平衡測定法による結果から,大別して2種の様式があると考えられている。その1つは色素分子に対する DNA 中のリン酸基の比 (P/D) が大きい場合に起る結合 (I) であり,他の1つは P/D が小さい場合に起る結合 (II) である。前者の結合 (I) は DNA 中の塩基対の間へ色素分子が挿入される形 (intercalation) の結合様式であり,後者の結合 (II) は DNA 中のリン酸基 (1価の陰イオン) と色素分子 (1価の陽イオン) との間の静電的な結合 (outside binding) である。

これらの色素と DNA との結合過程を動的に解析する研究は比較的最近行なわれたもので,特に Li と Crothers はプロフラビンと DNA との結合について温度ジャンプ法による研究を行ない結合 II と I とは連続した反応であるというモデルを提唱した。

申請者の論文はアクリジン (AO) と,鮭の精子の DNA との結合をストップフロー分光法で研究したものである。申請者はこの色素 AO が DNA と結合する過程では結合様式 II の outside binding の状態で二量体あるいはそれ以上の多量体を作り易いことを見出し,この結合状態では結合 I の intercalation した単量体とは光吸収によって明瞭に区別出来ることを利用して,ストップフロー分光法によって結合の過程を解析した。その結果, Li らがプロフラビンについて提唱した intercalation が outside binding を通じて起ることをアクリジンオレンジについて証明した。

申請者はさらにアクリジンオレンジの蛍光が intercalation の場合は増大し二量体を形成すると消失することを見出し,これを用いる蛍光ストップフロー分光法を適用して両過程を明瞭に区別することに成功した。その結果,この色素 AO と DNA との結合の過程は Li らの提唱したような単純な二段階機構によるものではなく次に示すような分岐機構に従って起るものであることを示した。



この反応の速度定数 $k_1 \sim k_6$ は P/D を一定にしたときの緩和時間 τ の濃度依存性から決定した。すなわち、pH 6.9 (1mM リン酸緩衝液)、25°C における k_1, k_2 の過程は極めて迅速 (1 msec以下) であってストップフロー法では観測できない。 $P/D=10$ において k_3 は 310 sec^{-1} , $P/D=1$ において k_5 は 710 sec^{-1} と決定された。二量体形成の $1/\tau$ は $P/D=1 \sim 3$ の範囲で P/D の増加と共に減少することが見出された。これは AO が DNA に outside binding する際にランダムの状態から二量体の状態になるために AO が DNA の鎖上の静電ポテンシャルの溝にある平均距離が P/D と共に増加することによって説明することができた。intercalation の $1/\tau$ は $P/D=2.5 \sim 10$ の範囲で P/D の減少と共に減少することが見出された。このことは二量体形成の場合とは逆で、DNA 鎖の外側にある AO の二量体の存在により、intercalation の過程が阻害されることを示したものである。

論文審査の結果の要旨

アクリジンオレンジ、プロフラビン、フェナジンなどのようにイオンやラジカルになりやすい色素とそれに関連ある化合物と核酸との結合はそれらの色素化合物の発癌性や突然変異を誘起するなどの生物学的意義の重要性によりいろんな立場から研究されている。これらの多くは色素と核酸との平衡状態における測定であって、結合過程を動的に捕え反応速度論的解析を行なう研究は最近はじまったばかりである。

本論文はこのような新しい研究の先駆的な研究の一つであって結合過程の詳しい機構を実験的に提示した注目すべき成果をあげている。この成果の特徴は色素化合物にアクリジノオレンジを選んだため蛍光ストップフロー法が可能となり二量体形成の過程と **intercalation** の過程とを明瞭に区別することが出来た点にある。光吸収ストップフロー法によっては Li らがプロフラビンで提唱していた二段階過程をアクリジンについて証明すると共に分岐機構を提出し、さらに蛍光ストップフロー法によって各反応過程の速度定数を決定した。二量体形成過程と **intercalation** の過程とで蛍光の増減が逆転するという特徴は他の色素では容易にみられない現象で、これを巧妙に利用することにより両過程を速度論的に解明すると共に両過程の相互関係を明確にして新しい分岐機構を含むモデルを提出している。このモデルは今後の色素と核酸との研究に一つの指針を与えるであろう。

これらの結合過程を説明するために DNA のリン酸基上に捕捉された色素分子がリン酸基の並びに沿って作られた静電ポテンシャルの溝にあると考えられているが、この考え方自身が極めてユニークな考え方であるばかりでなく、この考えに実験的な支持が与えられ、逆にこのような静電ポテンシャルの溝の存在を実証している点は極めて有意義であると云える。

試料の精製，実験装置の工夫，結果の解析などいずれも十分に慎重に行なわれており，色素と核酸との相互作用の研究に大きく貢献出来る成果があげられていることを高く評価することができる。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。