

氏 名	竹 内 伸 太 郎 たけ うち しん た ろう
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 516 号
学 位 授 与 の 日 付	昭 和 53 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 生 物 物 理 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	螢光試薬 fluorescein mercuric acetate を用いた DNA の構造解析法の研究

論文調査委員 (主査) 教授 吉澤 透 教授 寺本 英 教授 大井龍夫

論 文 内 容 の 要 旨

螢光試薬 フルオレセイン マーキュリック アセテート (FMA) は強い吸収と螢光を持ち、タンパク質の SH 基に結合する試薬として知られている。申請者はこの試薬が核酸にも結合することを見出し、核酸の構造解析に極めて有用であることを明らかにした。さて、FMA が DNA に結合すると、FMA の吸光度と螢光強度がともに著しく減少するので、このいずれかを測定することによってその結合反応を解析することができる。DNA として GC 含量の著しく異なる子ウシ胸腺や *Micrococcus lyso-deikticus* の DNA を用いた。また、それぞれを熱変性させて 1 本鎖にした DNA についても調べた。低い濃度の FMA は DNA の 1 本鎖の部分に選択的に結合するが、高い濃度では 1 本鎖の部分にすみやかに結合した後、さらに 2 本鎖の部分をはどいて結合することを明らかにした。この性質を利用することにより、DNA に存在する 1 本鎖部分と 2 本鎖部分の比率を求めることができる。FMA の結合部位は DNA の GC 含量に無関係で塩基約 2 個に 1 個の割合で存在し、この数は DNA に存在するイミノ基を持つ塩基 (チミンとグアニン) の数と一致する。また、種々のヌクレオシド、ヌクレオチド、合成ポリヌクレオチドなどを用いて FMA との相互作用を調べ、FMA がイミノ基を持つ塩基に結合することを明らかにした。FMA は水銀を 2 原子含むフルオレセインの誘導体であるが、1 本鎖 DNA に対しては結合が強く (結合定数 $K \sim 10^8 M^{-1}$)、モノマーのヌクレオチドに対しては結合が弱い ($K \sim 10^3 - 10^4 M^{-1}$)。これに対して、水銀を 1 原子しか含まないフルオレセインの誘導体は、ポリマーに対してもモノマーに対しても結合が弱い ($K \sim 10^3 - 10^4 M^{-1}$)。これらのことを根拠に、FMA の一方の水銀原子は DNA のイミノ基を持つ塩基と結合するというモデルを提出した。

さらに申請者は、FMA が DNA に結合する反応の速度論的解析を行ない、1 本鎖 DNA に結合する過程は単純な 2 分子反応と見なし得ること、また、活性化エンタルピーが大きな負の値をとることなどから、反応の機構を考察した。また、FMA が 2 本鎖の DNA をはどいて結合する過程を解析し、DNA の 2 重らせんが開くときのエンタルピー変化は、熱測定によって得られている DNA の変性のエンタ

ルピーとほぼ一致することなどを明らかにした。

また、超音波処理によってDNAを小さくしたもの、DNase I によって1本鎖切断を入れたもの、また紫外線照射によって何らかの損傷を生じさせたものなどについて、FMAがほどこいて結合する反応を調べ、それらの初速度が速くなることを見出した。このことを根拠に、FMAと2本鎖DNAとの反応機作に関するモデルを提出するとともに、超音波処理によって得られたDNAフラグメントの分子量と初速度との関係から、DNAがほどこけて行く速度を計算し、これに基づいて2本鎖DNAに存在する微量の損傷を定量する方法を考案した。

また、FMAは低い頻度ではあるが、損傷を含まない完全な2本鎖部分からも反応を起こすことからこれが T_m より低い温度での2本鎖DNAのゆらぎを反映しているという考え方に基づいてDNAの動的構造の解析にも応用できることを示した。

論文審査の結果の要旨

DNA と相互作用する試薬の中で、可視部に蛍光や吸収をもつ試薬はアクリジン系色素をはじめとして数多く知られている。これらの試薬は2本鎖DNAの塩基対の間に挿入 (intercalation) したり、外側からリン酸に結合したりする性質を持っている。一方、1本鎖DNAに優先的に結合する性質をもつ試薬として、ホルムアルデヒドやメチル水銀などが知られている。この性質を利用して、特にホルムアルデヒドは、核酸の構造解析にしばしば用いられているが、これらは可視部や近紫外部に吸収または蛍光を持たないため、DNAに結合した量を正確に知ることは必ずしも容易ではない。申請者はFMAが、ホルムアルデヒドと同様に、1本鎖DNAに優先的に結合することを見出し、ホルムアルデヒドよりすぐれた試薬であることを提示した。この試薬の最大の利点は、可視部における吸収や蛍光の変化からその結合量を容易に知ることができること、蛍光を測定手段として使うことにより、極めて微量のDNAの構造解析に応用できるということにある。さらに申請者はこの利点を生かし、慎重な実験とデータの解析により、FMAとDNAとの相互作用の様式を詳細に調べた。

以上の申請者の研究はFMAが核酸と結合することを明らかにしただけでなく、それが核酸の構造解析の試薬として使用できることを示したものであり、核酸の構造の研究に貢献する所が大きいと考えられる。

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。