

# Poly(A)・Poly(U)duplex におよぼす 金属イオンの影響

田中重幸\*, 馬場義博\*  
影本彰弘\*, 藤代亮一\*

(昭和55年10月25日受理)

## Influence of Metallic Ions on poly(A)・Poly(U) Duplex

Shigeyuki Tanaka, Yoshihiro Baba, Akihiko Kagemoto,  
and Ryoichi Fujishiro

The influence of metallic ions such as  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$  on the poly(A)・poly(U) duplex formed by an equimolar mixture of poly(A) and poly(U) was studied by using a modified differential scanning calorimeter (DSC) with a help of the spectral measurements.

The transition temperature,  $T_1$ , of poly(A)・poly(U) duplex shows a definite value of about 315 K which is nearly independent of  $r$  (the mole ratio of metallic ion to phosphate in polynucleotide).

While, the dependence of the heat of helix-coil transition,  $\Delta H$ , on  $r$  was divided into two cases: in the first case, when  $r$  is less than  $10^{-2}$ ,  $\Delta H$  for  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  systems increases with an increase of  $r$ , but  $\Delta H$  for  $\text{Hg}^{2+}$  system is a definite value which is nearly independent of  $r$ . In the second case, when  $r$  is in excess of  $10^{-2}$ ,  $\Delta H$  for all systems shows a drastic decrease as  $r$  increases.

From the results of spectral measurements obtained, poly(A)・poly(U) duplex seems to form a complex with  $\text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Hg}^{2+}$  at room temperature when  $r$  is more than  $10^{-2}$  except for  $\text{Cd}^{2+}$  system, and random coil structure of poly(A) and poly(U) obtained in which are the helix-coil transition of poly(A)・poly(U) duplex interacts also with metallic ions, and its interaction is expected to be exothermic. While, the behavior for  $\text{Cd}^{2+}$  system is the same to that of  $\text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Hg}^{2+}$  system. However, the effects of poly(A)・poly(U) duplex on  $\text{Cd}^{2+}$  may differ from those of  $\text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Hg}^{2+}$  systems.

### 1. 結 言

ポリリボアデニル酸 (poly(A)) と ポリリボウリジル酸 (poly(U)) は等モル混合することにより核酸と同様、二本鎖ヘリックス構造を持つ poly(A)・poly(U) duplex を形成する。この poly(A)・poly(U) duplex は温度上昇とともにヘリックス構造からコイル構造の一本鎖に転移することが知られている<sup>1-7)</sup>。

前報<sup>7)</sup>において、我々は poly(A)・poly(U) duplex

の転移温度,  $T_1$ , ヘリックス-コイル転移熱,  $\Delta H$ , を NaCl の濃度をいろいろ変えることにより、示差走査熱量計 (DSC) を用いて検討した。その結果,  $10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  NaCl 以下の領域において,  $T_1$ ,  $\Delta H$  は塩濃度に依存しないが,  $10^{-2}$  mol  $\text{dm}^{-3} < [\text{NaCl}] < 10^{-1}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  の領域で  $T_1$ ,  $\Delta H$  はともに塩濃度に依存する結果を得た。

本報において, poly(A)・poly(U) duplex の熱安定性に及ぼす金属イオンの効果についての知見を得るため, 遷移金属イオンとして,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  の poly(A)・poly(U) duplex に及ぼす効果について DSC, CD, UV スペクトルの手段によって検討した。

\* 大阪工業大学一般教育科：大阪市旭区大宮 5 丁目 16-1 〒535

Department of General Education, Osaka Institute of Technology, Asahi-Ku, Osaka 535, Japan

## 2. 実 験

## 2.1 試 料

ポリリボアデニル酸(poly(A), No. 11-96-308), ポリリボウリジル酸(poly(U), No. 11-91-308)はMiles社製のものである。金属塩としての $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{HgCl}_2$  は市販分析用特級試薬である。溶媒は $10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ (pH 5.4)をもちいた。水はイオン交換水をさらに $\text{KMnO}_4$ 中で蒸留したものを使用した。

## 2.2 装置と試料調製

示差走査熱量計(DSC)は前報<sup>8)</sup>と同様に、微小な熱量をも感熱できるように市販DSC(M 8005, 理学電機社製)を改良したものを使用した。

金属塩を含む溶媒にそれぞれ poly(A)および poly(U)を等モルに溶解し、均一な溶液を得るため、278 K で約 12 時間放置、均一になった溶液の約 30 mg を DSC 測定にもちいた。なお DSC 測定にもちいた poly(A)と poly(U)の濃度はいずれも  $6 \times 10^{-3} \text{ unit mol dm}^{-3}$  である。poly(A)の濃度は波長、257 nm での吸光係数( $E_p = 10400$ )より、また poly(U)のそれは 261 nm の吸光係数( $E_p = 9900$ )よりそれぞれ決定した。

紫外吸収スペクトル(UV)測定は日立 124 型分光光度計でおこなった。温度昇温には小松エレクトロニクス社製の電子冷熱装置を使用した。なおセル内の温度は銅-コンスタンタン熱電対により測定した。

円偏光二色性(CD)スペクトル測定には日本分光製自記旋光分散計 J-20 をもちいた。

UV, および CD スペクトル測定にもちいた poly(A) および poly(U)の濃度はそれぞれ  $6 \times 10^{-6} \text{ unit mol dm}^{-3}$  で DSC 測定にもちいたポリヌクレオチドの濃度及び金属イオン濃度を約 100 倍に希釈した溶液である。

## 3. 結果と考察

## 3.1 CD スペクトル

金属塩を含まない  $10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$  溶液中での poly(A)と poly(U)の等モル混合体の CD スペクトルは Fig. 1 (a)(b)(c)に見られるように、波長 266 nm に正のピークを、波長 246 nm に負のピークを示した。また UV スペクトルの結果などより考慮すると  $10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$  溶液中で poly(A)と poly(U)は等モル混合することにより poly(A)・poly(U) duplex が形成されているものと思われる。

Fig. 1 (a)に見られるように、溶液中に含まれるポリヌクレオチドと  $\text{Cd}^{2+}$  のモル比( $r$ )が増加( $\text{Cd}^{2+}$  濃度の増加に対応)しても 266 nm および 246 nm における正、負のピーク波長は変化しない。またその分子楕円率にも著しい変化は認められない。これらの結果から室温において、poly(A)・poly(U) duplex は  $\text{Cd}^{2+}$  によりほとんど影響されないと考えられる。

一方、 $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  を含む溶液で、Fig. 1 (b)(c)に見られるように、 $r$  の小さい領域でこれら金属イオンは poly(A)・poly(U) duplex 形成に効果を及ぼさないものと考えられる。しかし、 $\text{Cu}^{2+}$  系で  $r = 1.4 \times 10^{-2}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  系で  $r = 1 \times 10^{-2}$  以上の領域で正負のピーク波長が

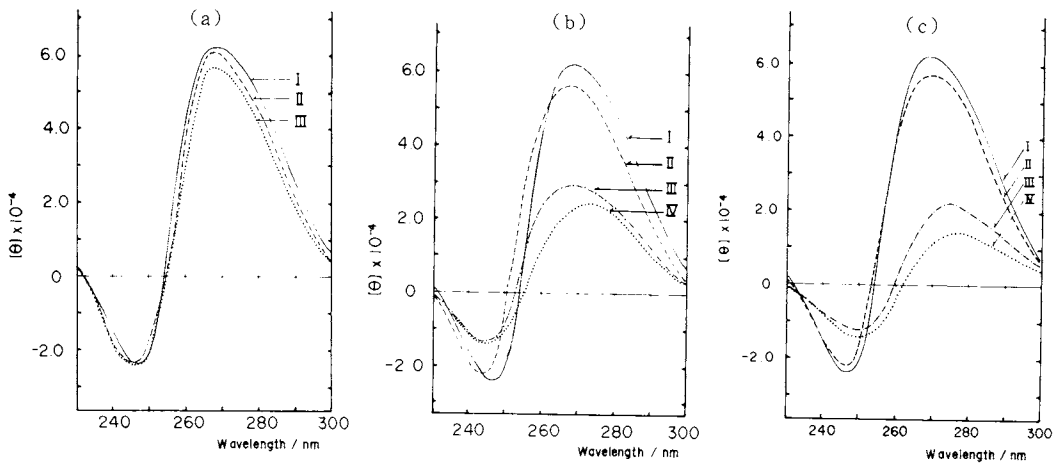


Fig. 1 CD spectra for an equimolar mixture of poly(A) and poly(U) in various  $r$  (mole ratio of divalent metallic ion to phosphate in polynucleotide) at pH 5.4

- (a)  $\text{Cd}^{2+}$ ; I: 0, II:  $7.0 \times 10^{-4}$ , III:  $2.6 \times 10^{-1}$ ,  
 (b)  $\text{Cu}^{2+}$ ; I: 0, II:  $1.0 \times 10^{-3}$ , III:  $1.4 \times 10^{-2}$ , IV:  $5.0 \times 10^{-1}$ ,  
 (c)  $\text{Hg}^{2+}$ ; I: 0, II:  $1.5 \times 10^{-4}$ , III:  $1.0 \times 10^{-2}$ , IV:  $1.6 \times 10^{-1}$ ,  
 The concentration of polynucleotide is about  $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ .

長波長にシフトし、分子構率率も減少する。すなわち、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ の濃厚領域において、poly(A)とpoly(U)の等モル混合より形成されるpoly(A)・poly(U) duplexは、希薄領域と比較して少ないものと考えられる。この理由は以下のように解釈すればよいと考えられる。すなわち、濃厚領域において、これら金属イオンはpoly

(A)・poly(U) duplexのヌクレオチド間の水素結合を切り、breakerイオンとして作用するためであろう。

### 3.2 poly(A)・poly(U) duplexのHelix-coil 転移

各種金属イオンを含む溶液中で形成されるpoly(A)・poly(U) duplexの熱的挙動の知見を得るため、DSC

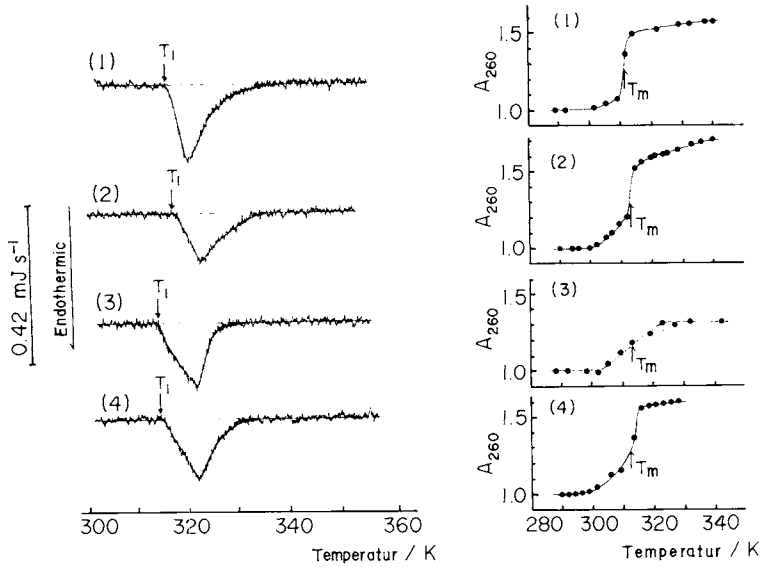


Fig. 2 Typical DSC curves and thermal denaturation curves at 260 nm of an equimolar mixture of poly(A) and poly(U) in solutions with various divalent metallic ions

- (1) without divalent metallic ion, (2)  $\text{Cd}^{2+}$ :  $r=1.7 \times 10^{-2}$ ,
- (3)  $\text{Cu}^{2+}$ :  $r=4.2 \times 10^{-2}$ , and (4)  $\text{Hg}^{2+}$ :  $r=9.2 \times 10^{-3}$

Table 1 Influence of divalent metallic ions on the helix-coil transition temperature,  $T_1$ , and heat of transition,  $\Delta H$ , of poly(A)・poly(U) duplex

$\text{Cd}^{2+}$ system			$\text{Cu}^{2+}$ system			$\text{Hg}^{2+}$ system		
$r^*$	$T_1$ K	$\Delta H$ kJ (bpm) <sup>-1**</sup>	$r^*$	$T_1$ K	$\Delta H$ kJ (bpm) <sup>-1**</sup>	$r^*$	$T_1$ K	$\Delta H$ kJ (bpm) <sup>-1**</sup>
0	315.2	23.6	0	315.2	23.6	0	315.2	23.6
$1.5 \times 10^{-5}$	316.5	25.4	$1.5 \times 10^{-5}$	315.0	24.7	$2.8 \times 10^{-5}$	316.3	24.0
$8.3 \times 10^{-5}$	314.8	26.0	$1.5 \times 10^{-4}$	315.0	23.5	$8.0 \times 10^{-5}$	316.0	23.5
$1.6 \times 10^{-4}$	316.5	25.4	$3.0 \times 10^{-4}$	315.0	24.0	$3.2 \times 10^{-4}$	316.1	21.9
$2.1 \times 10^{-4}$	315.5	24.7	$9.9 \times 10^{-4}$	314.0	23.9	$1.1 \times 10^{-3}$	316.8	23.1
$4.7 \times 10^{-4}$	315.9	24.8	$2.1 \times 10^{-3}$	314.1	25.0	$3.2 \times 10^{-3}$	317.3	23.0
$2.1 \times 10^{-3}$	315.4	28.5	$5.8 \times 10^{-3}$	315.0	27.4	$9.2 \times 10^{-3}$	314.3	21.7
$4.2 \times 10^{-3}$	316.9	28.2	$1.4 \times 10^{-2}$	314.0	26.3	$4.0 \times 10^{-2}$	314.5	21.0
$1.1 \times 10^{-2}$	315.9	27.3	$4.2 \times 10^{-2}$	314.5	24.2	$6.4 \times 10^{-2}$	316.8	18.2
$1.7 \times 10^{-2}$	317.0	29.1	$5.6 \times 10^{-2}$	317.0	17.9	$1.0 \times 10^{-1}$	317.4	17.8
$3.4 \times 10^{-2}$	316.7	23.7	$1.7 \times 10^{-1}$	316.0	13.2	$1.3 \times 10^{-1}$	316.1	14.4
$5.0 \times 10^{-2}$	316.0	21.2				$1.6 \times 10^{-1}$	317.0	11.9
$6.5 \times 10^{-2}$	316.6	20.8				$2.6 \times 10^{-1}$	316.9	7.1
$8.7 \times 10^{-2}$	316.3	16.4						
$1.3 \times 10^{-1}$	317.3							

\* ' $r$ ' is mole ratio of divalent metallic ion to phosphate in polynucleotide

\*\* bpm here refers to mole of base pair of polynucleotide

測定を行なった。

得られた典型的なDSC曲線をFig.2に示した。Fig.2に見られるように吸熱ピークは温度幅約15~20Kをもつ。この吸熱ピークを検討するため、UVスペクトルの測定を行なった。得られた結果をDSC曲線と対比させるためにFig.2に共に示した。UVスペクトルの温度依存性から得られた転移温度、 $T_m$ 、はDSC曲線のピーク温度よりむしろDSC曲線の変化が始まる立ち上がり温度と一致する。

UVスペクトルの温度依存性の結果から、DSC曲線の吸熱ピークはpoly(A)・poly(U) duplexの転移に相当する。DSC曲線の立ち上がり温度を転移温度、 $T_1$ 、面積から転移熱、 $\Delta H$ 、がそれぞれ評価できる。評価された $T_1$ 、 $\Delta H$ をTable 1に示した。Table 1に従い、 $r$ に対して、 $T_1$ 、 $\Delta H$ をプロットしたのが、Fig.3である。

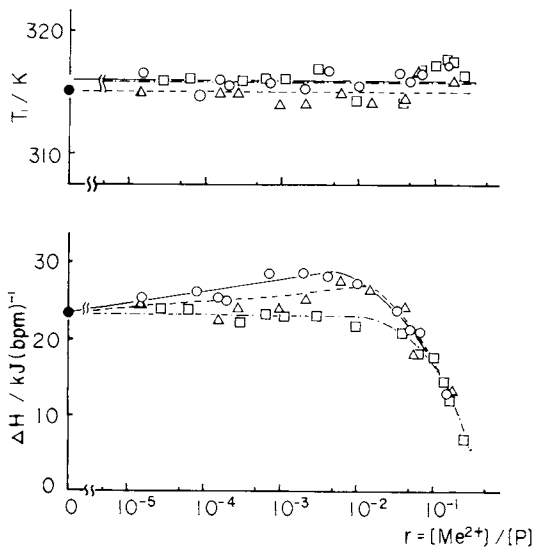


Fig. 3 The dependence of the transition temperature,  $T_1$ , and heat of helix-coil transition,  $\Delta H$ , of an equimolar mixture of poly(A) and poly(U) on the mole ratio,  $r$ .  
○: Cd<sup>2+</sup>, △: Cu<sup>2+</sup>, and □: Hg<sup>2+</sup> systems.

Fig.3に見られるように、 $T_1$ は金属イオンの種類、濃度には依存せず、ほぼ315Kの一定温度を示すが、 $\Delta H$ は $r$ の小さい領域では単調に増加するか、または一定値を示す。

さらに、 $r$ の増加と共に $\Delta H$ はDrasticに減少する。これらの傾向はCu<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>系ともに同じであるが、 $\Delta H$ が減少し始める $r$ の値は金属イオンの種類に依存するようである。すなわち、Cd<sup>2+</sup>系は $r = 5 \times 10^{-3}$ 、Cu<sup>2+</sup>系は $r = 1 \times 10^{-2}$ 、Hg<sup>2+</sup>系は $r = 1 \times 10^{-2}$ である。

### 3.3 UVスペクトル

DSCで得られた各種金属イオンの熱効果についてさらに詳細な知見を得るため、UVスペクトルを測定した。

得られた最大吸収波長、 $\lambda_{\text{max}}$ 、を $r$ に対してプロットしたのが、Fig.4である。

Fig.4に見られるように、室温におけるCd<sup>2+</sup>系の $\lambda_{\text{max}}$ は $r$ に依存せず258nmで一定値を示した。これはpoly(A)・poly(U) duplexの塩基とCd<sup>2+</sup>間で相互作用をしていないことを意味している。さらにpoly(A)・poly(U) duplexを昇温し、転移温度以上のスペクトルの $\lambda_{\text{max}}$ は室温と同様、一定値を示した。転移後のpoly(A)・poly(U)の一本鎖は、室温の状態と同様にCd<sup>2+</sup>と相互作用していないように考えられる。

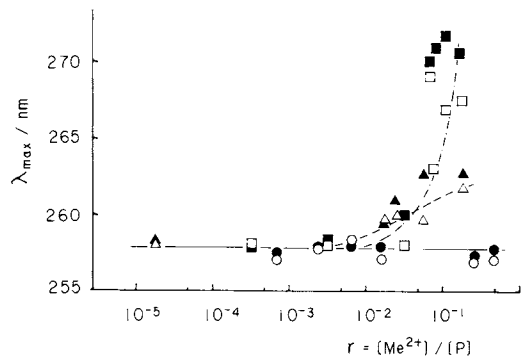


Fig. 4 The wavelength of absorption maximum,  $\lambda_{\text{max}}$ , for an equimolar mixture of poly(A) and poly(U) solutions with various concentrations of metallic ion at room temperature, (○, △, □) and at beyond transition temperature (●, ▲, ■). Symbol is the same as that of Fig. 3.

一方、 $r < 1 \times 10^{-2}$ の領域におけるCu<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>系では室温において、 $\lambda_{\text{max}}$ はCd<sup>2+</sup>系と同様258nmで一定値、すなわちpoly(A)・poly(U) duplexの塩基はCd<sup>2+</sup>と同様、Cu<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>とは相互作用をしていないようである。

しかし、 $r$ の増加とともに $\lambda_{\text{max}}$ は室温で長波長に、さらに転移温度、 $T_1$ 、以上でも $\lambda_{\text{max}}$ は長波長へそれぞれシフトする。すなわち、 $r > 1 \times 10^{-2}$ 以上の領域でpoly(A)・poly(U) duplexの塩基はCu<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>と相互作用しており、また転移後の一本鎖のpoly(A)・poly(U)の塩基はこれら金属イオンと相互作用すると考えられる。

### 3.4 poly(A)・poly(U)の金属イオン効果

DSC測定で得られた $\Delta H$ の $r$ 依存性は前述したUVスペクトルの結果と合わせて考察すると以下のように考えられる。

Cd<sup>2+</sup>系での $r \leq 5 \times 10^{-3}$ 、Cu<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>系での $r \leq 1$

$\times 10^{-2}$  の領域における  $\Delta H$  の単調な増加又は一定値はつぎの反応における転移熱に相当する。

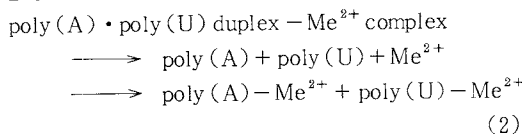


しかし、 $\text{Cd}^{2+}$  系での  $\Delta H$  が  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  系での  $\Delta H$  より大きな値を示しているのはこの領域で  $\text{Cd}^{2+}$  は  $\text{poly (A) } \cdot \text{ poly (U) duplex}$  と相互作用はしていないが、まわりの水との相互作用により、むしろ  $\text{poly (A) } \cdot \text{ poly (U) duplex}$  をより安定化させるようである。しかしこの問題についてはさらに検討する必要がある。

一方、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  系における  $r > 1 \times 10^{-2}$  の領域での  $\Delta H$  の減少はつぎのように考えるのが妥当であろう。

すなわち、室温において、 $\text{poly (A) } \cdot \text{ poly (U) duplex}$  は  $\text{Cu}^{2+}$ 、または  $\text{Hg}^{2+}$  と相互作用することによって、 $\text{poly (A) } \cdot \text{ poly (U) duplex}$  のヘリックス構造を不安定化させるものと考えられる。言いかえると、二本鎖ヘリックス構造形成に必要なアデニン-ウラシル間の水素結合をこれら金属イオンが破壊し、 $\text{poly (A) } \cdot \text{ poly (U) duplex} - \text{Me}^{2+}$  の複合体を形成し、温度上昇により一本鎖に転移する。一本鎖に転移した後にまた金属イオンと相互作用し、その相互作用には発熱が期待できる。従って、発熱だけ  $\Delta H$  の減少が起る。

従って DSC で得られた  $\Delta H$  は次の反応に相当するものと考えられる。



付言すると、 $\text{Cd}^{2+}$  系において、 $r$  とともに  $\Delta H$  が減少するのは (2) 式で示した  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  系の転移とは異なるものであろう。これは前述したように UV スペクトルの結果から  $\text{Cd}^{2+}$  が室温において  $\text{poly (A) } \cdot \text{ poly (U) duplex}$  と相互作用せず、また転移温度以上の高温においても  $\text{poly (A)}$ 、 $\text{poly (U)}$  などの一本鎖と相互作用していないことを考慮すると、 $\text{Cd}^{2+}$  は  $\text{poly (A) } \cdot \text{ poly (U) duplex}$  などと直接作用するのではなく、むしろ  $\text{poly (A) } \cdot \text{ poly (U) duplex}$  のまわりの水との相互作用、水和水の脱水、を優先的に起こっているためと思われる。しかしこの問題についてはさらに検討する必要がある。

### 文献

- 1) R. Warner, *J. Biol. Chem.* **229**, 711 (1957)
- 2) H. Miles, *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 324 (1958)
- 3) A. Rich, D. R. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 3548 (1963)
- 4) M. A. Rawitscher, P. D. Ross, J. M. Sturtevant, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1915 (1963)
- 5) R. D. Blake, J. R. Fresco, *J. Mol. Biol.* **19**, 145 (1966)
- 6) H. Krakauer, J. M. Sturtevant, *Biopolymers* **6**, 491 (1968)
- 7) S. Tanaka, Y. Baba, A. Kagemoto, *Polym. J.* **8**, 325 (1976)
- 8) Y. Baba, A. Kagemoto, *Biopolymers* **13**, 339 (1974)

(13 頁より)

#### ★熱物性国際連合会議の開催について

第 8 回熱物性シンポジウム (Eighth Symposium on Thermophysical Properties)、第 17 回熱伝導国際会議 (Seventeenth International Conference on Thermal Conductivity) および第 8 回熱膨張国際シンポジウム (Eighth International Thermal Expansion Symposium) が連合し、標題の国際会議 (International Joint Conferences on Thermophysical Properties) を 1981 年 6 月 15~19 日の期間、米国の NBS で開催される。

セカンド・サーキュラーが学会事務局に届いているので、詳細を知りたい読者は事務局に問い合わせられたい。