

N⁶-メチルーおよびN⁶, N⁶-ジメチルアデノシン -水系の希釈エンタルピーと分子間自己会合

森本 敏*, 桜井通陽**, 井上康男***

(昭和58年5月18日受理)

Enthalpy of Dilution and Intermolecular Self-association of N⁶-Methyl- and N⁶, N⁶-Dimethyladenosines in Aqueous Solution

Satoshi Morimoto*, Michiharu Sakurai** and Yasuo Inoue***

Determination of the thermodynamic functions (parameters) of the intermolecular self-association of N⁶-monomethyladenosine (m⁶Ado) and N⁶, N⁶-dimethyladenosine (m₂⁶Ado) in water has been made by solution calorimetric dilution measurements at 298.15 K. The standard enthalpy change ΔH° and standard entropy change ΔS° of self-association were as follows; ΔH° : -43~-50 and -38 $\pm$ 3 kJ mol⁻¹, ΔS° : -122~-147 and -100 $\pm$ 11 kJ K⁻¹ mol⁻¹ for m⁶Ado and m₂⁶Ado, respectively. From these values, it is clear that the methylation, especially the dimethylation, of N⁶-amino group of adenosine leads to a higher stacking equilibrium quotient than that of adenosine in consequence of an increased value of ΔS° . This supports that intermolecular association of N⁶-methylated adenosines is partly due to a contribution of substituted methyl groups to the formation of hydrophobic bond.

1. はじめに

核酸塩基間のスタッキング相互作用は、核酸の種々の秩序構造形成にとって主要な駆動力の一つである^{1,2)}。また、核酸塩基上のメチル基や置換基の効果は、tRNAやmRNAにみられるように、生体中での認識相互作用や活性に重要な役割を演ずることが知られている³⁾。その理由から、ピリミジンやプリン塩基、また、それらから誘導されるヌクレオチド、ヌクレオチドおよび各種誘

導体の溶液中でのスタッキング相互作用についての知見は重要性を持っている。

プリン誘導体の一つである6-メチルプリンは、水溶液中で理想自己会合(会合過程がisodesmic (indefinite) noncooperative self-association modelに適合)を示すことが実証^{4,5)}されているために、われわれは、しばしばこの物質を用いて水および水-有機混合溶媒溶液系での希釈エンタルピーの測定から、プリン塩基の自己会合の溶媒効果を検討してきた⁶⁻⁹⁾。さらに、常温において高い蛍光量子収率をもち、それを構成単位とする二量体および補酵素アナログを用いた多くの物理化学的、酵素学的研究¹⁰⁾がなされている。1. N⁶-エテノアデノシン(εAd)の水溶液中における自己会合について、溶液の蒸気浸透圧と希釈エンタルピーの測定とより、会合の様式(理想自己会合)と熱力学関数(パラメータ)との決定を行った¹¹⁾。

ここでは、アデノシンのN⁶-アミノ基のメチル化誘導体: N⁶-メチルアデノシン(m⁶Ado)とN⁶, N⁶-ジメチルアデノシン(m₂⁶Ado)の分子間スタッキング会合について、希釈エンタルピーの測定から熱力学的検討を行ったので、その結果を報告する。

* 工業技術院繊維高分子材料研究所: 茨城県筑波郡谷田部町東 1-1-4 〒305

Research Institute for Polymers and Textiles,
1-1-4 Yatabe-Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305,
Japan

** 農林水産省家畜衛生試験場: 茨城県筑波郡谷田部町
観音台 3-1-1 〒305

National Institute of Animal Health, 3-1-1
Yatabe-Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305

*** 東京大学理学部生物化学科: 東京都文京区本郷
7-3-1 〒113

Department of Biophysics and Biochemistry,
Faculty of Science, University of Tokyo,
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113

2. 実験

m_2^6 Ado は Zémlicka と Šorm の方法¹²⁾ によって調製した。 m^6 Ado は、 m_2^6 Ado 調製の時の中間体である 6-クロロプリン誘導体に Ikehara と Uno の方法¹³⁾ により、モノメチルアミンを作用させて得た。これらのヌクレオシドの精製は水からの再結晶により行い、分光学的およびクロマトグラフィー的に純粋であることを確かめた。それぞれの溶液調製の前に、試料ヌクレオシドを P_2O_5 上で減圧下 100°C で 4~10 時間乾燥させて用いた。

各ヌクレオシドの初濃度 (m_i : mol kg⁻¹) から各最終濃度 (m_f : mol kg⁻¹) までの希釈エンタルピーの測定は、LKB 8721-1 型恒温壁熱量計を用いて行った。測定と同一条件で熱量計システムが正常に作動していることを、KCl (NBS SRM 918) の水系への溶解エンタルピー¹⁴⁾ (17.514 ± 0.009 kJ mol⁻¹) によって確かめた。アンブル (LKB 8727-1 型) に封入した約 1 cm³ の各ヌクレオシド

初濃度溶液を熱量計セル中の約 25 cm³ の低濃度溶液に希釈し、この際の希釈エンタルピーを測定した。測定温度は 298.15 K である。

3. 結果と考察

Table 1 と Table 2 に m^6 Ado と m_2^6 Ado の希釈エンタルピー測定の結果を示した。 m_2^6 Ado については二つの異なる初濃度の溶液について測定した。これらの結果から、各ヌクレオシドの分子間スタッキング会合の熱力学関数の決定を試みた。

分子間スタッキングのエンタルピー変化 ΔH° は、あるモル濃度 m における分子浸透圧係数 ϕ と m から無限希釈までの溶質のモル当りの希釈エンタルピー Φ とで (1) 式のように与えられる^{15, 16)}。したがって、いま初濃度 m_i

$$\Delta H^\circ = \frac{-\Phi}{1-\phi} \quad (1)$$

から最終濃度 m_f までのモル当りの希釈エンタルピーを

Table 1 Enthalpies of Dilution of N⁶-Methyladenosine (m^6 Ado) Aqueous Solution at 298.15 K.

Exp. No.	Mass of initial solution	Final molar concentration	Observed heat	Enthalpy of dilution
	g	$10^2 m_f$ mol kg ⁻¹	Δh mJ	$\Delta_{dil}H$ kJ mol ⁻¹
$m_i = 0.079688$ mol kg ⁻¹				
1	0.95077	0.29593	694.3	9.064
2	0.96131	0.58762	571.9	7.259
3	0.87185	0.84369	399.1	5.525
4	1.04221	1.1331	404.5	4.672
5	0.94649	1.3858	216.5	2.547
6	1.00829	1.6462	291.9	3.327
7	0.94334	1.8805	213.6	2.646

m_i : Initial molar concentration

Table 2 Enthalpies of Dilution of N⁶, N⁶-Dimethyladenosine (m_2^6 Ado) Aqueous Solution at 298.15 K.

Exp. No.	Mass of initial solution	Final molar concentration	Observed heat	Enthalpy of dilution
	g	$10^2 m_f$ mol kg ⁻¹	Δh mJ	$\Delta_{dil}H$ kJ mol ⁻¹
$m_i = 0.080726$ mol kg ⁻¹				
1	0.94331	0.28958	782.8	10.18
2	0.86462	0.54663	547.2	7.654
3	0.94530	0.81901	493.1	6.275
4	0.91626	1.1068	401.1	5.200
5	0.91105	1.5393	236.0	3.285
6	0.94824	1.7714	259.1	3.466
$m_i = 0.16079$ mol kg ⁻¹				
1	0.99029	0.57056	1731	11.89
2	1.00621	1.1568	1079	6.931
3	1.00497	1.7296	851.5	5.349
4	0.94292	2.7816	521.6	3.428
5	1.04303	3.3131	458.9	2.707
6	1.01558	3.8115	243.3	1.398
7	0.97082	4.2582	237.7	1.425

m_i : Initial molar concentration

$\Delta_{\text{dil}}H$ とし、 m_i および m_f から無限希釈までのモル当りの希釈エンタルピーを $\Delta_{\text{dil}}H^\infty$ および ϕ とすれば、(1)式から(2)式が導かれる。ここで各ヌクレオシドの分子浸透圧係数 ϕ は、会合定数(各同族会合種に対して理想会合系では同じ) K を用いて(3)式から算出が可能であ

$$\Delta_{\text{dil}}H = \Delta_{\text{dil}}H^\infty + \Delta H^\circ (1 - \phi) \quad (2)$$

$$\phi = \frac{(1 + 4Km)^{1/2} - 1}{2Km} \quad (3)$$

る。したがって、最終濃度 m_f までのモル当りの希釈エンタルピー $\Delta_{\text{dil}}H$ を(3)式によって算出した $(1 - \phi)$ に対してプロットすれば、その傾きから ΔH° を決定することができる。この場合、 K 値は文献¹⁷⁾によった。

各ヌクレオシドの $\Delta_{\text{dil}}H$ 対 $(1 - \phi)$ のプロットを Fig. 1~3 に示した。また、これから得られた ΔH° 、および、これと K 値から算出した分子間スタッキング会合のエントロピー変化 ΔS° の値を Table 3 に示した。 $m_2^6\text{Ado}$ について異なる初濃度溶液を用いた測定の結果得られた ΔH° の値は、誤差範囲内で一致した。すなわち、 $m_i = 0.080726 \text{ mol kg}^{-1}$ の測定と、 $m_i = 0.16079 \text{ mol kg}^{-1}$ からの測定から得られた ΔH° の値は、それぞれ、 $-38.9 \pm 3.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ と $-36.4 \pm 3.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ であった。Table 3 にはその平均値を示した。また、Table 3 に比較のために、ここで関係のある以前われわれの得た結果と文献値とを共に記載した。

Table 3 の結果は、 $m_2^6\text{Ado}$ の分子間会合の ΔH° 、 ΔS° 値は、 ϵAdo の結果と同様に、 Ado の文献値¹⁷⁾と比較してどちらも大きく(絶対値の減少)なっていること、また、その中で ΔS° の増大が顕著であることが示される。したがって、 ϵAdo と $m_2^6\text{Ado}$ の会合定数 K の Ado のそれらと比較しての増大は、エントロピー項の寄与によることを示している。 $m^6\text{Ado}$ については、 K の文献値における不確定さのためこの傾向は明らかではなかった。

従来、核酸塩基間のスタッキング相互作用の機作^{19~21)}の問題とも関連して、塩基に対する種々の修飾が塩基間スタッキング相互作用の強さに与える影響について、いくつかの議論がなされている。中でも、一般に塩基に対するメチル化にともなう分子間スタッキング相互作用が強まることに対して、いわゆる“隠れた疎水結合”の存在が示唆されてきた^{1, 3, 6, 9, 22, 23)}。疎水的な基であるメチル基を二つ持つ $m_2^6\text{Ado}$ についての Table 3 の結果は、その寄与を示すものと考えられる。 ϵAdo のエンタルピー変化およびエントロピー変化の値は、 ϵAdo の場合も 1-N^6 -エテノ基によるいわゆる疎水的寄与²⁴⁾によって会合定数 K の増大がもたらされていることを示唆するものと考えられる。

最近、Zielenkiewicz らは、ピリミジン塩基(ウラシル

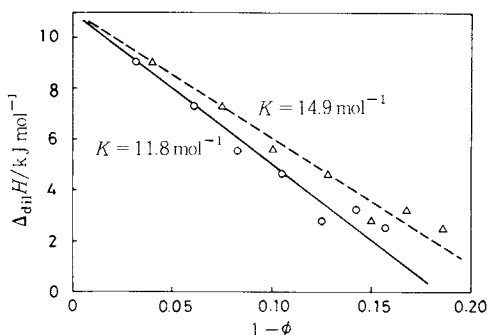


Fig. 1 Plots of enthalpy of dilution $\Delta_{\text{dil}}H$ versus $1 - \phi$ for N⁶-methyladenosine aqueous solution at 298.15 K.
 $m_i = 7.9688 \times 10^{-2} \text{ mol kg}^{-1}$, ϕ : Osmotic coefficient.

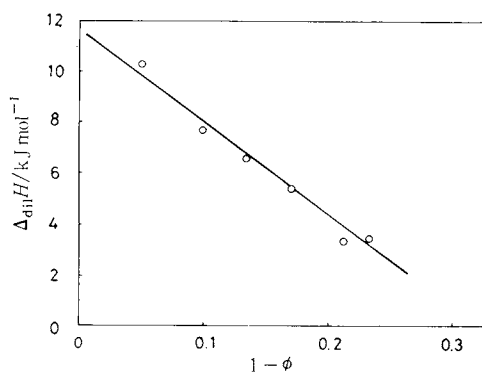


Fig. 2 Plots of enthalpy of dilution $\Delta_{\text{dil}}H$ versus $1 - \phi$ for N⁶,N⁶-dimethyladenosine aqueous solution at 298.15 K.
 $m_i = 8.0726 \times 10^{-2} \text{ mol kg}^{-1}$, ϕ : Osmotic coefficient.

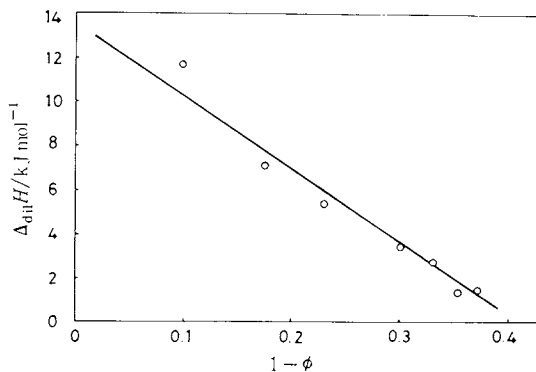


Fig. 3 Plots of enthalpy of dilution $\Delta_{\text{dil}}H$ versus $1 - \phi$ for N⁶,N⁶-dimethyladenosine aqueous solution at 298.15 K.
 $m_i = 1.6079 \times 10^{-1} \text{ mol kg}^{-1}$, ϕ : Osmotic coefficient.

Table 3 Evaluated Thermodynamic Quantities of Self-associations of N⁶-Methyl- and N⁶,N⁶-Dimethyladenosines in Water at 298.15 K. Reported values of methylated purine and methylated uracils are included for comparison.

Base	<i>K</i>	$-\Delta G^\circ$	$-\Delta H^\circ$	$-\Delta S^\circ$
	kg mol ⁻¹	kJ mol ⁻¹	kJ mol ⁻¹	JK ⁻¹ mol ⁻¹
ε Ado	18.7 ± 0.7	7.3 ± 0.1	36 ± 1 ¹¹⁾	95 ± 4 ¹¹⁾
m ₂ ⁶ Ado	22.2 ¹⁷⁾	7.7	38 ± 3	100 ± 11
m ⁶ Ado	11.8~14.9 ¹⁷⁾	6.1~6.7	50 ± 43	147~122
Ado	4.5 ¹⁷⁾	3.7	40 ¹⁸⁾	121 ¹⁸⁾
6-Methylpurine ⁶⁾	8.6 ± 0.9	5.3 ± 0.2	24 ± 1	61 ± 2
Purine ⁶⁾	1.3 ± 0.2	0.6 ± 0.3	20 ± 1	64 ± 3
m ₂ ^{1,3} Ura ²²⁾	0.56	-0.34	0.6	33
m ³ Ura ²²⁾	1.13	0.07	5	141
m ¹ Ura ²²⁾	0.83	-0.10	5	150
m ₂ ^{1,3} Thy ²²⁾	1.20	0.11	0.8	18
m ³ Thy ²²⁾	1.33	0.17	1	25
m ¹ Thy ²²⁾	0.93	-0.04	4	116

ε Ado, Ado, Ura and Thy denote 1,N⁶-ethenoadenosine, adenosine, uracil and thymine, respectively. m¹, m³ and m₂^{1,3} are shown for 1-methyl, 3-methyl and 1,3-dimethyl derivatives, respectively.

Ura とチミン Thy) のメチル化物の水和エンタルピー $\Delta_{\text{hydr}}H^\circ$ と、(4) 式にもとづいた水和殻中での水分子との相互作用エンタルピー $\Delta_{\text{int}}H^\circ$ について、具体的な結果

$$\Delta_{\text{hydr}}H^\circ = \Delta_{\text{sol}}H^\circ - \Delta_{\text{subl}}H^\circ = \Delta_{\text{int}}H^\circ - \Delta_{\text{cav}}H^\circ \quad (4)$$

を報告²⁵⁾している。ここで、 $\Delta_{\text{sol}}H^\circ$ 、 $\Delta_{\text{subl}}H^\circ$ および $\Delta_{\text{cav}}H^\circ$ は、それぞれ、溶解(実測)、昇華(実測)および cavity 形成による(算出²⁶⁾)エンタルピー変化である。N-置換メチル化の場合には、メチル基の数の増加によって $\Delta_{\text{int}}H^\circ$ は平均 6.5 kJ mol⁻¹ CH₂ の増加(絶対値の減少)であり、C置換の場合には、メチル基は反対にその絶対値をほぼ 3 kJ mol⁻¹ CH₂ 増加させるという結果である。これは、疎水基置換による溶媒水構造の安定化の期待とは全く反対の傾向である。その Thy 誘導体の場合の結果を Fig. 4 に示した。

核酸塩基の、メチル化にともなう自己会合の熱力学量を評価した文献はそれほど多くはない。また、Ura と Thy については、水溶媒に対する溶解度が小さいためと思われる報告に接しない。会合の場合には脱溶媒の寄与も含まれることから、 ΔH° の絶対値は $\Delta_{\text{int}}H^\circ$ と対称的な傾向であろうことが期待される⁶⁾。この観点からは、Ura や Thy の絶対値はピリミジン骨格中の N 置換メチル化の場合は増大を、C 置換の場合には減少傾向が推定される。Table 3 の結果には、これとは異なった逆の傾向が示されている。これは、水和に関する Fig. 4 は一般に期待される疎水基導入による疎水性水和の場合とは異

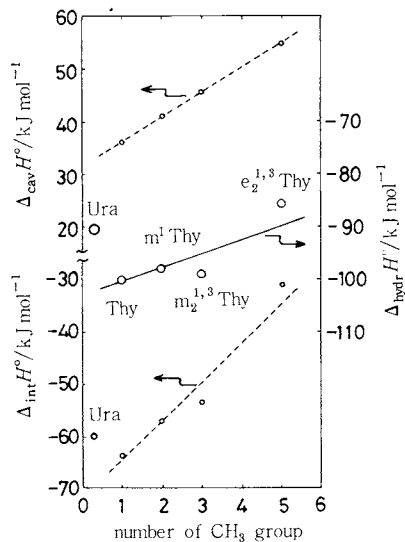


Fig. 4 Evaluated enthalpies of hydration $\Delta_{\text{hydr}}H^\circ$, of cavity formation $\Delta_{\text{cav}}H^\circ$ and of interaction $\Delta_{\text{int}}H^\circ$ of N-methylated thymine in water plotted against number of CH₃ groups substituted for hydrogen atoms at 298.15 K.²⁵⁾

なって、N-アルキル化によって水分子との相互作用や選択的な水分子との結合部位の状態の変化を多分に反映したための結果とみなされる。対称的なTable 3のUraやThyのN-メチル化物の ΔH° の絶対値の減少と ΔS° の絶対値の減少(エントロピーの増大)傾向は、自己会合が多分にメチル化した異分子間の疎水結合の寄与の結果を示すものであろう。われわれの得たAdoのN⁶-アミノ基をメチル化したm₂Adoやエテノ基導入のεAdoの ΔH° および ΔS° の結果は、UraやThyのピリミジン骨格中のN-メチル化物よりもその傾向は著しくはないが、同じように、多分に疎水的な置換基による疎水結合の寄与によって水中での自己会合が強まっていることを示しているものと考察される。

文 献

- 1) G. Felsenfeld, H. T. Miles, *Ann. Rev. Biochem.* **86**, 407 (1967).
- 2) C. R. Cantor, L. Katz, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **22**, 25 (1971).
- 3) H. Vogel, ed., "Nucleic Acid-Protein Recognition", Academic Press, New York (1977).
- 4) P. O. P. Ts'o, S. I. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 4176 (1964).
- 5) S. I. Chan, M. P. Schweizer, P. O. P. Ts'o, G. K. Helmkamp, *ibid.* **86**, 4182 (1964).
- 6) S. Morimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **52**, 2250 (1979).
- 7) S. Morimoto, M. Kinouchi, *Chem. Lett.* 1159 (1979).
- 8) S. Morimoto, Y. Tani, M. Kinouchi, *Nucleic Acid Res. (Sympo. No. 6)* 103 (1979).
- 9) S. Morimoto, *Nucleic Acid Res. (Sympo. No. 10)*, 67 (1981).
- 10) L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 819 (1978).
- 11) M. Sakurai, S. Morimoto, Y. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 5572 (1980).
- 12) J. Zemlicka, F. Šorm, *Collection Czech. Chem. Commun.* **30**, 1880 (1965).
- 13) M. Ikehara, H. Uno, *Chem. Pharm. Bull.* **13**, 221 (1965).
- 14) R. L. Montgomery, R. A. Melaugh, C. C. Lau, G. H. Meier, H. H. Chan, F. D. Rossini, *J. Chem. Thermodyn.* **9**, 915 (1977).
- 15) P. R. Stoesser, S. J. Gill, *J. Phys. Chem.* **71**, 564 (1967).
- 16) S. J. Gill, M. Downing, G. F. Sheats, *Biochemistry* **6**, 272 (1967).
- 17) A. D. Broom, M. P. Schweizer, P. O. P. Ts'o, *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 3612 (1967).
- 18) M. G. Marenchic, J. M. Sturtevant, *J. Phys. Chem.* **77**, 544 (1973).
- 19) P. O. P. Ts'o, in "Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry", P. O. P. Ts'o ed., Academic Press, New York (1974), Vol. I, pp. 537~562.
- 20) O. Sinanoğlu, S. Abdalnur, *Photochem. Photobiol.* **3**, 333 (1964).
- 21) O. Sinanoğlu, S. Abdalnur, *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 5 (1965).
- 22) E. Plesiewicz, E. Stepień, K. Bolewska, K. L. Wierzchowski, *Biophys. Chem.* **4**, 131 (1976).
- 23) D. M. Crothers, D. I. Ratner, *Biochemistry* **7**, 1823 (1968).
- 24) W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **14**, 1 (1959).
- 25) A. B. Teplitsky, I. K. Yanson, O. T. Glukhova, A. Zielenkiewicz, W. Zielenkiewicz, K. L. Wierzchowski, *Biophys. Chem.* **11**, 17 (1980).
- 26) O. Sinanoğlu, in "Molecular Association in Biology", B. Pullman ed., Academic Press, New York (1968), p. 427.