

プラスミド DNA の融解と遺伝的機能

前田好美

(平成元年5月13日受理)

The Helix-Coil Transition of Plasmid DNA and Genetic Function

Yoshimi Maeda

Differential scanning calorimetry (DSC) of several plasmid DNAs was carried out. The DSC curves for the DNAs linearized with a restriction enzyme provided several peaks due to the stepwise transition of double-stranded DNA to single-stranded DNA along the molecular chain. These DSC curves are very similar to the melting profiles constructed by calculation from the entire base sequences of these plasmids according to the helix-coil transition theory. The theoretical analysis shows that the boundaries of cooperative melting regions of the DNA coincide with the end regions of each of the coding regions. The interaction between various drugs and plasmid DNA was also studied by the DSC method. The DSC curves of DNA in the presence of drugs are affected in the characteristic manner depending upon the interaction mode of the drug, demonstrating that DSC method is very useful for the study of the drug-DNA interaction.

遺伝子の本体である DNA は、グアニン (G)、シトシン (C)、チミン (T)、アデニン (A) の 4 つの塩基からなる 2 本の相補鎖が、A と T、G と C が対をつくることによって 2 重らせんを形成している。2 重らせんは、A-T や G-C 間の水素結合や隣接塩基対間に働くスタッキングによって安定化されている。これらの結合は、同一分子鎖内で各塩基間に働く共有結合よりかなり弱い。生体内において DNA は、その複製や RNA への転写などの生物学的機能発現において、2 本鎖が 1 本鎖に解離する反応、すなわち融解あるいはヘリックス-コイル転移などと呼ばれる反応を起こす。DNA の 2 重らせんが、共有結合による強固な骨組みのなかにあつて、水素結合やスタッキングのような弱い結合で形成されていることは、このような生物学的機能の発現に非常に都合のよい構造であると考えられる。また、このような構造が、のちに述べる理論的取扱いを容易にしている。

DNA のヘリックス-コイル転移は、温度、pH、誘電率の変化、ホルムアミドや尿素のような変性剤の添加によっても起こる。ヘリックス-コイル転移反応を検出する物理的手段としてはいろいろあるが、なかでもプリン環やピリミジン環における $\pi-\pi^*$ 遷移に基づく 260 nm 付近の紫外波長領域の吸収強度が、2 重鎖の開裂にともなう増大する現象すなわち濃色効果 (Hyperchromicity) を利用したものが多い。また、2 重鎖の開裂にともなう熱の吸収をみる熱測定の方法もかなり古くから行われている。紫外吸収測定の方法が主としてスタッキングの崩壊を測定しているのに対して、熱測定の方法は、スタッキングの崩壊の他に水素結合の切断やヘリックス-コイル転移に伴って起こるその他の反応、たとえば水素イオンの解離や結合あるいは水の構造変化によるエンタルピー変化も測定していることになる。

ところで、G-C 塩基対は A-T 塩基対よりも結合力が強く (融解温度で約 40K の差がある)、したがって DNA 分子鎖上におけるこれらの塩基対の分布にしたがって、安定性に局所的な差が生じ、温度上昇に伴う融解は、ある領域ごとに協同的に起こる。協同的融解領域は、通常 100~1500 塩基対 (bp) にわたっている。この過程をた

東京大学応用微生物研究所

〒113 東京都文京区弥生 1-1-1

Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113

たとえば紫外吸収で測定して、吸収強度の温度微分を温度に対してプロットした融解曲線は、いくつかの鋭いピークを生じ、いわゆる微細構造を呈する。ピークの温度幅は通常0.2~1.0 Kである。すなわち100~1500 bpの領域がこのような極めて狭い温度幅で融解するわけで、同じ生体高分子であるタンパク質やRNAのヘリックス-コイル転移とは異なった特徴を有する。このようなDNAの段階的融解は、紫外吸収測定の方法^{1),2)}、電子顕微鏡による直接的方法³⁾、変性剤の濃度勾配をつけたゲル電気泳動法⁴⁾などによって観察されている。

熱的方法によるDNAの段階的融解の測定は、原理的には可能であったにもかかわらず報告がなかった。最近、われわれはプラスミドDNAを使い、示差走査熱量計(DSC)によって、段階的融解の測定が可能であることを示した^{5),6)}。その後塩基配列のわかっている各種プラスミドについて、DSCによる測定と塩基配列からヘリックス-コイル転移理論による解析を行い、DNA分子鎖上にコードされた遺伝子との相関⁷⁾⁻⁹⁾、DNA複製開始領域の解析⁸⁾、制がん性薬剤とDNAの相互作用の解析などを行った¹⁰⁾⁻¹¹⁾。本稿においては、主としてプラスミドDNAの段階的・協同的融解のDSCによる測定と理論的解析について、主としてわれわれの研究室で得られた結果を中心に概説する。

なお、一般的なDNAの段階的・協同的融解に関しては、和田ら¹²⁾⁻¹⁶⁾、後藤¹⁷⁾、およびWartellとBenight¹⁸⁾による詳しい総説があるので、それらを参照していただきたい。

1. DNAの段階的融解のDSC曲線

前述のように、DNAの融解について、DSCによる測定はかなり古くから、幾多の研究者によって行われている¹⁹⁾⁻²⁵⁾。しかし、そのほとんどが、染色体DNAのような巨大なDNAを使用しているため、段階的な融解は観測されていない。Fig. 1には、われわれがT4ファージ、サケ精巢および子ウシ胸腺それぞれのDNAについて熱流束型DSCで測定した結果を示す⁹⁾。T4ファージとサケ精巢のDNAはいずれも単調な、単一ピークを示す。分子量がこれらのなかでもっとも小さなT4でさえも、塩基配列の長さは約170 kbpであるが、このような大きなDNAでは、昇温にともなって起こる段階的融解はみられない。この理由として、それぞれのDNA分子鎖においては段階的に融解しているが、平均化されてなめらかな単一ピークになったものと考えられる。サケ精巢DNAのような染色体DNAにおいては、その大きさの影響だけでなく、調製過程において2重らせんが切断されるか、あるいはニック(一方の鎖だけが切断されること)が入り、その影

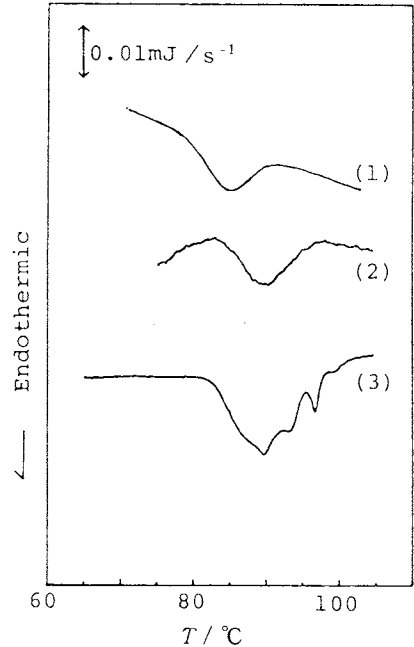


Fig. 1 DSC curves of phage and chromosomal DNAs. A heat-flux type of differential scanning calorimeter (DSC), SSC 560U (Seiko Instruments & Electronics Ltd., Tokyo) was used at a heating rate of 0.75 K min⁻¹. (1) T4 DNA, (2) salmon testes DNA, (3) calf thymus DNA.

響により単一ピークになったとも考えられる。子ウシ胸腺DNAにおいては、5個のピークが見られたが、すでに報告されている多くの結果と一致する。高温側のピークは、サテライトDNAすなわち染色体上で特異なG+C含量をもち、反復配列として存在していたものが、切断されてきたDNA断片の融解によるものと考えられている。

Fig. 2に、プラスミドDNAの断環型示差走査微量熱量計によるDSC曲線を示す⁹⁾。使用したプラスミドは、5277 bpからなるpJL3-TB5とよばれるもので、in vivoでは閉環状(closed circular)であるが、抽出精製後、制限酵素EcoRIによって1箇所切断して線状(linear)にしたものである。このような処理を行って端を自由にするにより、DNAが巻戻し(融解)を行うときによじれがたまることなく容易に進行することになる。pJL3-TB5では、8~9個のピークが観察される(曲線1)。すなわち、DNA分子鎖上におけるG+Cの分布の差にしたがって、特有の長さの領域にわたって協同的・段階的に融解を起こし、それに伴う吸熱反応によってピークとして観察されたことを示す。曲線2は、

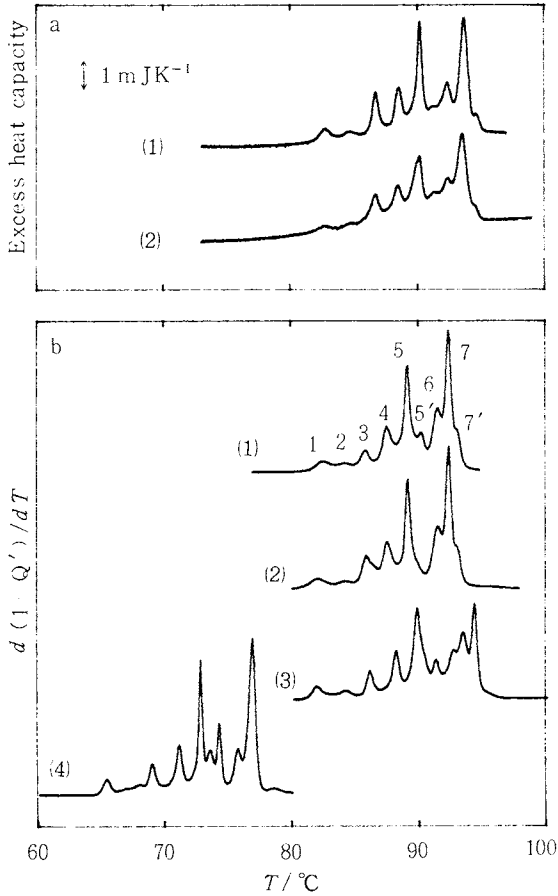


Fig. 2 Adiabatic DSC and theoretical melting curves of the plasmid pJL3-TB5 DNA. Panel a. About 0.5 ml DNA sample (0.05%) was scanned at a heating rate of 0.25 K min⁻¹ using an adiabatic differential scanning microcalorimeter, DASM-4 (Academy of Science of the USSR, Moscow) (curve 1). Curve 2 shows the second scan of the renatured DNA of curve 1. Panel b. Curve 1 shows the theoretical melting profile obtained by the helix-coil transition theory using the conventional base-pair parameters, and curve 2 shows the theoretical melting profile using the base-pair parameters, including that specific for the methylated adenine-thymine pair (see also ref. 9). Curve 3 and curve 4 show the theoretical melting curves using the stacking parameters obtained by Gotoh and Tagashira (36, 50), for 1 x SSC buffer and for 0.1 x SSC buffer, respectively.

曲線1で昇温した試料を室温まで下げて、再昇温した結果を示す。昇温-降温過程で融解-再生したものが、2度目の昇温過程で再び融解したものと考えられる。最初の融解や再生の過程で少量のDNAの切断やミスマッチが起きて、やや曲線が変形して履歴現象がみられるが、再昇温においても明瞭な段階的融解がみられる。再生・再融解がかなり明瞭にみられるのは、プラスミドのような小さなDNAの特徴で、前述の染色体DNAでは再融解ピークはきわめて小さい。このような巨大なDNAでは、いったん融解すると相補鎖が再会合する機会がきわめて小さいためであろう。

ColE1は、他の大腸菌を殺す抗菌性タンパク質コリシンE1を産生するプラスミドで、6646 bpの全塩基配列が決定されている。これをEcoRIで1箇所切断して線状にしたものについて、熱流束型DSC曲線のもう一つの例としてFig.3に示す。Fig.3aは、1 x SSCバッファー(0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム)、Fig.3bは0.1 x SSCバッファーにおけるものである。バッファー濃度が高くなると全体のピークが高温側にシフトしていることが分かる。すなわちDNA鎖上の、解離して負に荷電したリン酸基間にはたらく斥力が、バッファー中の陽イオンによる遮蔽効果により弱められて、2重らせんが安定になったと考えられる。それぞれの図で曲線2と3は、それぞれの降温過程と再昇温過程のDSC曲線である。第1回目の走査ほど明瞭ではないが、ここでも再生・再変性が協同的に進行していることがわかる。また、降温過程においては過冷却現象がみられる。ColE1については、すでに紫外吸収による測定(報告^{26)~28)}があるので、それらと比較することができる。その結果、異なる測定法による差とは断定できない若干の相違はあるがほぼ同様な融解挙動を示す。

前述のように、巨大な染色体DNAにおいては、決してこのような段階的な融解は見られないが、約48.5 kbpの長さのλ phageでは、分光学的方法ではあるが、段階的融解が観測されている²⁹⁾。したがって、熱的な方法によってもその程度の大きさのDNAまでは測定が可能であろう。また、あまり小さなDNAは、協同的融解領域が全分子に及び、ヘリックス状態が完全なコイル状態への2状態転移を起こすので、段階的な融解は見られない。200 bp程度の長さのものでも段階的な融解が見られるものがある¹⁸⁾。

塩基配列の長さに関する分解能は、5277 bpの長さのpJL3-TB5から約100 bp欠失した変異体については、もとのpJL3-TB5と明らかな差が認められているが⁹⁾、紫外吸収測定によって、全長が1150 bpのもので、1 bpの欠失があるものでも差が認められているので

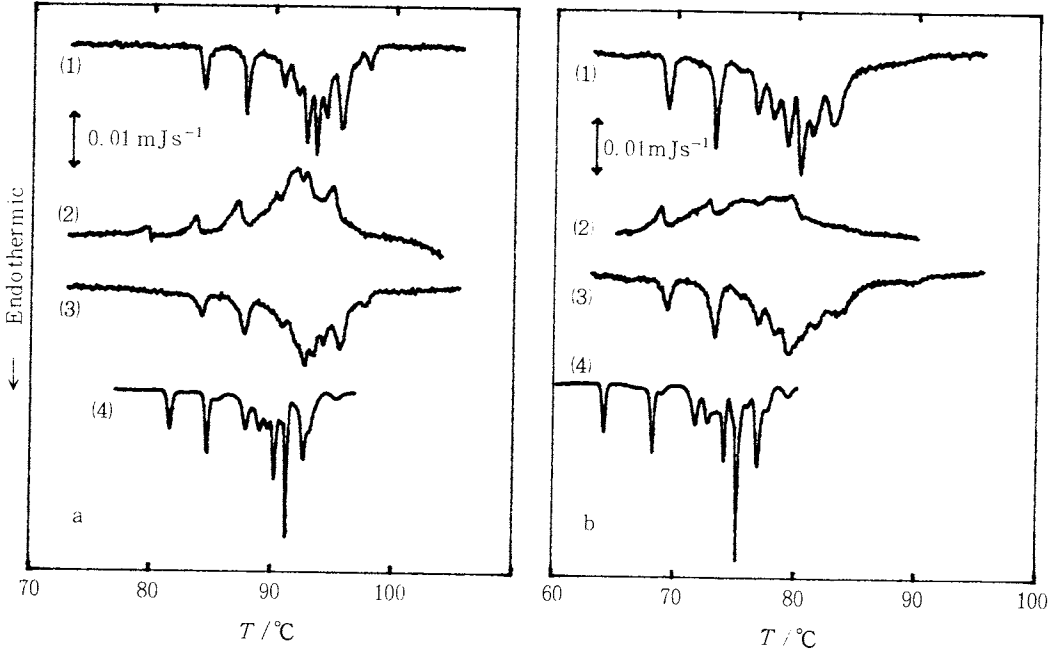


Fig. 3 DSC and theoretical melting curves of ColE1 DNA. The DNA samples of 0.06 ml (0.55%) were scanned at a heating rate of 0.5 K min⁻¹ using a heat-flux type DSC (see Legend to Fig. 1). (a) 1.0 x SSC buffer solution: (1) 1st heating, (2) cooling after 1st heating, (3) 2nd heating, (4) theoretical curve calculated by the base-pair model. (b) 0.1 x SSC buffer solution: (1) 1st heating, (2) cooling after 1st heating, (3) 2nd heating, (4) theoretical curve calculated by the stacking model (see also ref. 7).

(対応する領域の転移温度が約0.1 K移動している)³⁰⁾、性能のよい熱量計を使えば、おそらくこの程度は可能であろう。また、切断箇所が違えば、端の塩基配列に差が生じるのでDSC曲線に明らかな差がみられる⁶⁾。

2. 理論融解曲線との比較

DNAの融解に関する理論は、パーフェクトマッチングモデルと呼ばれるモデルの範囲内では、かなり早い時期に完成している^{16), 17), 31)}。パーフェクトマッチングモデルは、Fig. 4-1に示したようにDNAの2本の相補鎖の対応する塩基対間でのみ対を作っているか(1)、作っていないか(0)、の2つの状態を考えて解く方法である。したがって、対応しない塩基対間では、たとえそれらが相補的であっても考慮しないし、また十字型構造(Fig.

4-2)やバルジ構造(Fig. 4-3)をとっていても理論には取り入れない。しかし、このようなモデルでもきわめてよく実験に合う。

N bpの長さの塩基配列について考えると、ある温度でのコンフィギュレーションCは、たとえばFig. 4-1の場合、ベクトル(00111000001111100)で表される。この状態の統計的の重率Zcは、開いた状態を基準にとると次のようになる。

$$Z_c = 1 \times 1 \times s_3 \times s_4 \times s_5 \times s_6 \times s_{12} \times s_{13} \times s_{14} \times s_{15} \times s_{16} \times 1 \times 1$$

ここで、 s_i は安定度定数で

$$s_i = \exp(-(\Delta H_i - T\Delta S_i)/RT)$$

である。 ΔH_i と ΔS_i は塩基によって異なるパラメータであるが(通常、 ΔS_i は塩基対またはスタッキングによ

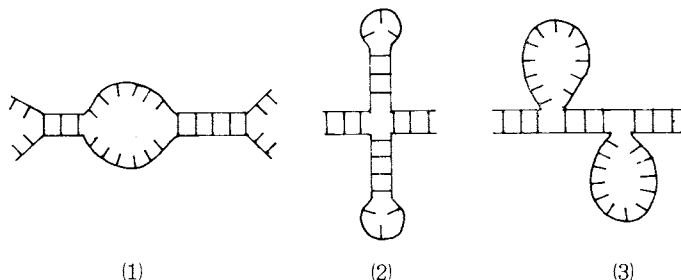


Fig. 4 The structures of DNA. (1) Perfect matching model, (2) cruciform model, (3) bulge model.

って区別しない), 2重らせんの結合力として塩基対間の水素結合を重視する場合と隣接した塩基対間のスタッキングを重視する場合とで異なる。前者は A・T と G・C のそれぞれにパラメータを割り当てる。後者は 5'-XY-3' なる配列にパラメータを割り当てるので10種類 (4 × 4 = 16 であるが対称なものは同じとみなす。たとえば 5'-AT-3' と 5'-TA-3') を考える。後者はスタッキングモデルと呼ばれるが³⁶⁾、これに対して前者はベースペアモデルと呼ばれる。また, σ_1 は loop weighting factor と呼ばれる統計的重率で, ループの大きさ l (bp) とは $\sigma_1 = \sigma_0 (l + d)^{-c}$ の関係がある (詳しくは, 文献13, 16, 17などを参照)。ところで, ある温度における全コンフィギュレーションに対する分配関数 Z は $Z = \sum_C Z_C$ となり, これから i 番目の塩基対がヘリックスを作っている確率 P_i は, $P_i = \partial \ln Z / \partial \ln s_i$ のように表すことができる。全塩基配列におけるヘリックス含量は, $\theta = \sum_{i=1}^N P_i / N$ となるから, θ を温度に関して微分したものが融解曲線になる。

ところが, この式から計算するのは現実的ではなく, 実際には, Polandが開発し, その後FixmanとFreireによって改良されたアルゴリズムがよく使われている^{32),33)}。Polandの方法は, 全く近似をおいていないのでモデルの範囲内で厳密な値が得られるが, 計算時間が N (塩基対の数)の2乗に比例する。これに対してFixmanとFreireの方法は, Polandの方法に適当な近似をおいて計算時間を $N \times I$ (I は通常10前後の整数値)に比例するようにした。通常 N は数千の値であるので, このことにより計算時間が数百分の一に短縮される。

このようにして計算された理論曲線と紫外吸収曲線との比較はよく行われていて, 両者でかなりよく一致することが知られている^{12), 34), 35)}。また, スタッキングモデルにおける10種類のパラメータは, 実験データからベストフィットで決定され, フィッティングに使った DNA

以外の多くの DNA について理論と実験の一致がよいことが報告されている^{15), 17), 36)}。

上記の理論にもとづいて, われわれが, pJL3-TB5 について, その塩基配列から計算した理論融解曲線を Fig. 2 b に示した⁹⁾。曲線1と曲線2は, ベースペアモデル (パラメータについては文献9) によって計算した結果である。曲線1は, A-T と G-C の2種類のパラメータを考えた場合, 曲線2は, 後に述べるアデニンのメチル化による影響をパラメータの変化に取り入れて計算した結果である。ともに高温側でピークの位置が実験値からずれているが, 全体の形はよく実験曲線と合っている。特に, メチル化の影響を考慮することによって, ピーク3の高さが改善されている。曲線3は, スタッキングモデルで計算した結果である (スタッキングモデルによる計算は, 陶山と和田²⁷⁾ によって書かれたプログラムを用い, パラメータは後藤のパラメータを用いた^{36), 50)})。高温側のピークの形にやや差があるが, ピークの高低や位置は, 全体に実験曲線によく合っている。同じくスタッキングモデルにおいて, イオン強度は異なるが (0.1 × SSC), フィッティングに使った実験データが多いので信頼性の高いパラメータを用いて計算した結果が, 曲線4である。部分的な相違はあるが, イオン強度が異なるので厳密な比較はできない。Col E1の理論融解曲線を Fig. 3 a-4 と Fig. 3 b-4 に示す。Fig. 3 a-4 はベースペアモデルによる計算 (1 × SSC), Fig. 3 b-4 はスタッキングモデルによって計算 (0.1 × SSC) した結果である。いずれのモデルでも比較的よく DSC 曲線を再現しているといえる。このように, 理論と実験のかなり良好な一致が, 塩基配列の理論的な解析を可能にする。

最近, Breslauerらは, 熱測定による直接的方法によって, 各スタッキングに対する転移エンタルピーと転移エントロピーを求めている³⁸⁾。これは, パラメータが実験により直接的に求められていることとエントロピーがそれぞれのスタッキングに対して別々に決定されている

ので大変魅力的である。そこで、このパラメータを使って pTSO 125 と pJL 3-TB5 について計算した結果を Fig. 5 に示す。ここで使用したプラスミドの一つ pTSO 125 は、大腸菌染色体の複製開始領域 *oriC* を含む全長 5382bp のプラスミドである。*oriC* 領域には DNA アデニンメチラーゼ (Dam) の認識部位となる配列 GATC が高頻度で存在し、この部位のアデニンメチル化の影響があるので、pTSO 125 の調製は、そのような酵素をもたない *dam* 変異株を用いた。Fig. 5 a-1 と Fig. 5 b-1 はそれぞれ pTSO 125 の断熱型熱量計による DSC 曲線と理論融解曲線である。転移温度の大幅な相違はあるが、融解曲線のパターンはかなりよく一致している。しかし、pJL 3-TB5 については、Fig. 5 a-2 に示した熱流束型 DSC 曲線と Fig. 5 b-2 の理論融解曲線との間に大きな違いがある。図には示していないが、Col E1 についても pJL 3-TB5 と同様に、DSC 曲線と理論曲線の間に大きな差がある。pJL 3-TB5 と Col E1 は、wild 株から調製されているのでアデニンのメチル化があることと DSC 曲線との理論融解曲線の間でイオン強度の違いはあるが、これだけで説明するには違いがやや大きい。

その原因についてはよく分からないが、オリゴマーで決定された値をそのまま長鎖の DNA に外挿して、適用することにも問題があるのかも知れない。

ところで、上に述べた計算は根拠のしっかりした物理学の理論に基づいたものであるが、DNA 塩基配列上に適当な長さの移動ウィンドをとって、各ウィンド内の G + C の出現頻度の計算とヒストグラムの作成によって、きわめて大ざっぱな実験曲線の再現と転移曲線上の主要ピークに対応する大まかな塩基配列の特定が出来る。きわめて単純な計算によっても、融解曲線のある程度の説明ができることは興味深いことである^{(5), (6), (39)}。

3. G + C 含量と融解曲線

DNA が温度により融解するとき、全 DNA の半分が融解する温度 T_m は、G + C の含量に比例することが知られている。Marmur と Doty が、いろいろの染色体 DNA の融解温度と G + C 含量の測定から $T_m = 69.3 + 0.41 X_{gc}$ なる関係式を得た。ここに、 T_m は融解の中点で定義される転移温度、 X_{gc} は G + C の含量 (%) である⁽⁴⁰⁾。

DNA 分子鎖内における転移においても、協同的融解

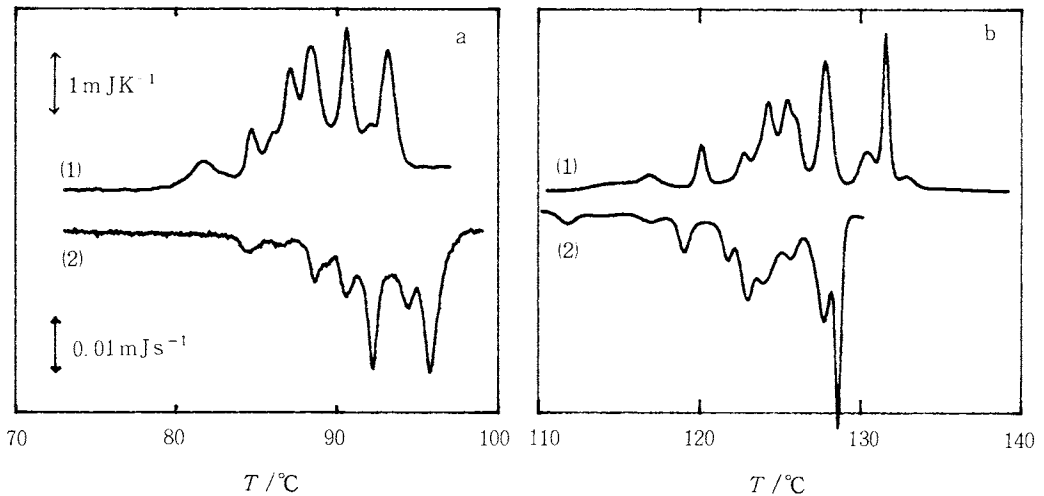


Fig. 5 Comparison of DSC curves and theoretical melting curves constructed using the parameters obtained experimentally by Breslauer et al. (ref. 38). (a) DSC curves of (1) pTSO125 DNA (5382 bp in length) obtained by an adiabatic type calorimeter (see Legend to Fig. 2 and also ref. 8) and (2) pJL3-TB5 DNA obtained by a heat-flux type calorimeter (see Legend to Fig. 1). (b) Theoretical melting curves of (1) pTSO125 DNA and (2) pJL3-TB5 DNA.

領域と転移温度にほぼこのような比例関係があることが知られている。しかし、この場合はある融解領域の転移温度は、隣接する領域の塩基配列の影響を受けたり、またそれが分子鎖の末端にあるときは融解挙動に変化が生じたりするのでそれほど単純ではない。

Fig. 6に、pJL3-TB5について理論的に計算した協同的融解領域(次節 Fig. 7を参照)の転移温度と対応する協同的融解領域におけるCまたはGの出現頻度をプロットした。ただし、Fig. 2において理論と実験の間で低温側から高温側にわたり0.7~1.7 Kのピーク温度のずれがあるので、各転移温度についてはDSC曲線のピーク温度を使用した。また、前述のMarmurとDotyの式をプロットしたものが図中の直線である。全体としてはほぼ比例関係にあるが、*印をつけた点は比例関係からかなり大きくはずれている。これは、G+Cの出現頻度の高い領域に隣接しているために、その影響で転移温度が高い方に移動したものである。巨大な染色体DNAについて得られた関係式が、分子内の転移についても成立していることがわかる。

4. 協同的融解領域と遺伝子構造

DNAの協同的融解領域は、タンパク質をコードしてい

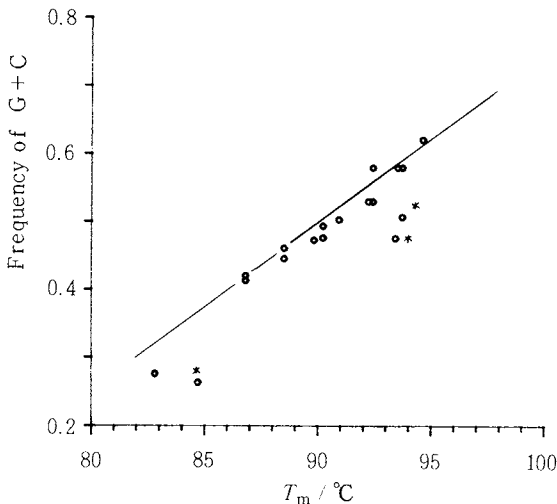


Fig. 6 Dependence of the melting temperature, T_m , on the frequency of G+C in the cooperative melting regions of pJL3-TB5 DNA. The points labeled with the symbol * deviate remarkably from the linear relationship, demonstrating that these points are influenced by the flanking regions with high G+C contents.

るいわゆるコーディング領域と密接に関係していることが知られている^{12),15)}。この関係を調べるには、熱安定性地図^{35),41)}と呼ばれるものをつくって行くと便利である。熱安定性地図とは、それぞれの塩基対が開いている確率(P_i)が0.5になる温度を塩基対の分子鎖上における位置に対してプロットしたものである。温度軸は各塩基対の安定性を示し、温度が高いほど2重らせんが安定であることを示す。Fig. 7に上述のようにして計算した、pJL3-TB5の熱安定性地図を示す。温度が一定な領域が協同的融解領域と考えるとよい。

図の上部に、pJL3-TB5の遺伝子地図を示す。図で *bla* と *cat* はそれぞれアンピシリン耐性遺伝子とクロラムフェニコール耐性遺伝子を示す。また、挿入配列(トランスポゾン) *IS1* が2コピー存在し、その上に、*IS1* がゲノム上を他の部位に転移するときに必要なタンパク質をコードする遺伝子 *insA* と *insB* がある。

熱安定性地図と遺伝子地図を比較すると分かるように、例外はあるがコーディング領域と非コーディング領域の境界のところでは、熱安定性が急激に変化していることが分かる。*insA* と *insB* の境界のところでは、熱安定性にあまり大きな差はないが、これらの遺伝子がオペロンを形成しているからであると思われる。*insA* の内部で熱安定性に小さな段差がみられるが、最近 Sekine と Ohtsubo によってこの付近で翻訳段階でフレームシフトを起こしていることが見いだされ興味あるところである⁴²⁾。

Fig. 8 と Fig. 9 に Col E1 の熱安定性地図と遺伝子地図を示す。Fig. 8 は、遺伝子が実際に同定されているもので、コリシンE1の産生(*cea*)、自己の生産するコリシンE1に対する免疫(*imm*)、コリシンE1の膜透過(*ki1*)、プラスミドの他細胞への伝達(*mob*)、細胞の接合の際の排斥(*exc*)、DNA複製の制御(*rom*)に関係する遺伝子がマップされている。また、Fig. 9 は、塩基配列としてはタンパク質をコードすることができるが、遺伝子としては同定されていない単なるオープンリーディングフレームをマップしたものについて熱安定性地図と比較したものである。Fig. 8 では、コーディング領域と非コーディング領域の境界で、多くの場合熱安定性に大きな変化がみられるが、Fig. 9 では、オープンリーディングフレームの数が多くにもかかわらず、コーディング領域と非コーディング領域の境界と熱安定性の変化との一致がよくない。このことについては、統計的な解析によっても有為であること⁴³⁾ や境界付近の塩基配列の特徴について詳しい解析がなされている⁴⁴⁾。

ここで興味深いことは、*mob2* (Fig. 8) よりも翻訳開始信号が、*mob2* の内部から始まる *mob2 int* (Fig. 9) の方がコーディング領域-非コーディング領域間の

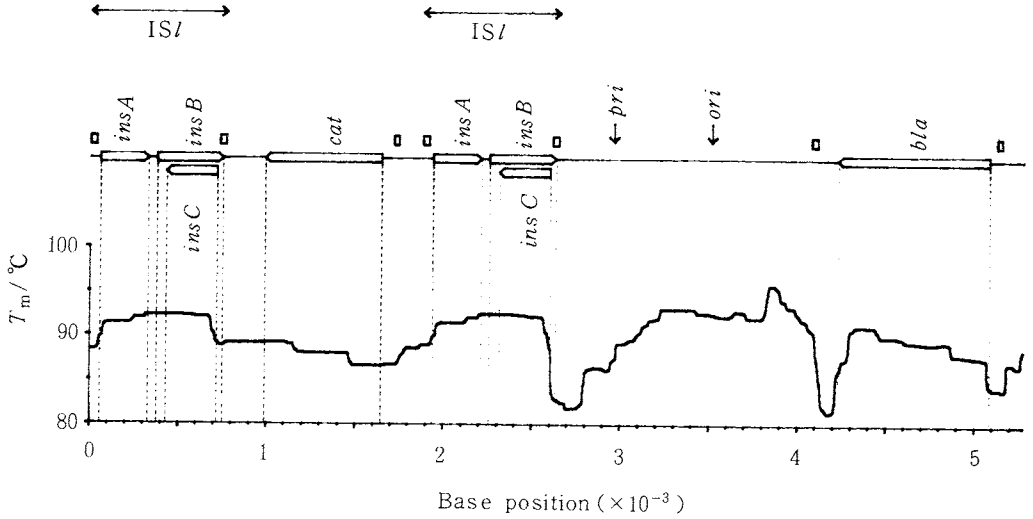


Fig. 7 Comparison of the thermal stability map with the genetic map of pJL3-TB5. The ordinate shows the melting temperature of each base pair where the promoters to be in a coiled state is 50%. The squares show the transcriptional promoters. The boundaries of the cooperatively melting regions coincide with the ends of each of coding regions (see also ref. 9).

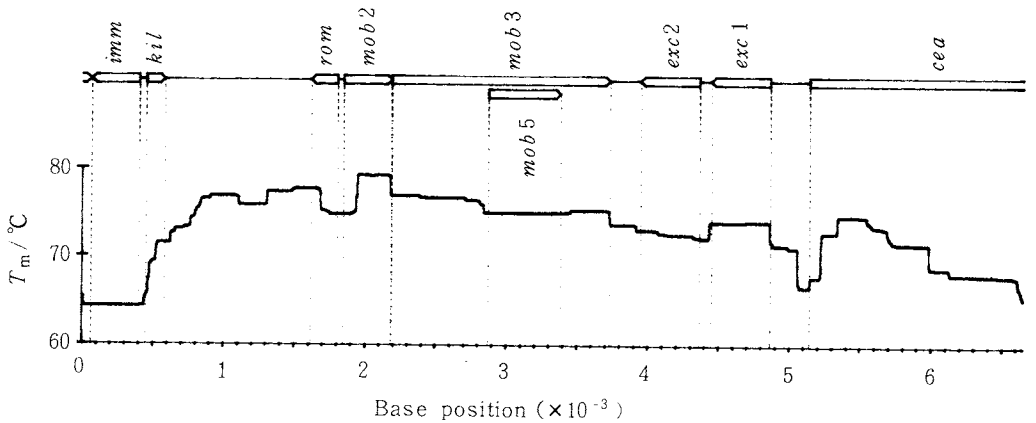


Fig. 8 Comparison of the thermal stability map with the genetic map of ColE1 (ref. 7). See Fig. 7 for other indications.

境界と協同的融解領域の境界の一致がよいことである。*mob2*と*mob2 int*のいずれが実際に機能している遺伝子であるか、現在のところは分かっていないが、熱安定性で見ると、*mob2 int*の方が機能していることを

想像させる。熱安定性地図は、塩基配列から遺伝子を推定するときの判定基準の一つを与えることが期待される。また、コリンE1タンパクをコードする*cea*は、熱安定性にかなり大きな変動があって不均一である。コリン

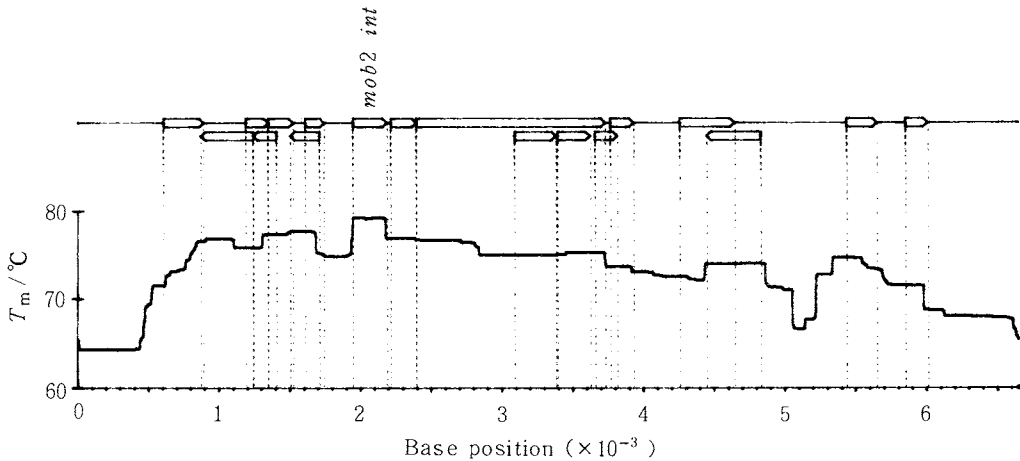


Fig. 9 Comparison of the thermal stability map with the map of open reading frames of ColE1 (ref. 7). The boundaries of cooperatively melting regions do not correlate with the end regions of open reading frames which may not encode proteins. See Fig. 7 for other indications.

ンE1 はかなり大きなタンパク質であり、イオノフォア様作用、受容体結合、膜透過の活性をもった3つのドメインから構成されていることが分かっている。また同様な活性とドメイン構造をもち、互いの進化的関係が明らかにされている Col E 2, Col E 3 および Clo DF 13 プラスミド⁴⁵⁾のコリシタンパク (Clo DF 13 の場合はクロアシン DF 13) をコードしている領域も熱安定性に段差がみられる⁴⁶⁾。これは進化の過程でドメイン単位で組換えが起き、祖先の遺伝子の安定性の差が残っているものと考えられる。進化の過程で、コーディング領域は、熱安定性が一樣になる傾向 (gene-homostabilizing propensity) があるといわれているが^{15), 16), 47)}、コリシンを産生する遺伝子一群は、さらに進化が進めばいずれ一樣化するのかも知れない。また、コーディング領域において、熱安定性に段差がみられるところは、イントロンの挿入位置であることが多いという報告もある^{48), 49)}。なぜ熱安定性に不連続性があるのか、その原因についてはまだよく分かっていないが、進化の痕跡か、遺伝子の円滑な機能発現のためのものか、いずれにしても不連続なところでは、「何か」があるかまたはあったように思われる。

DNA の複製開始点や転写開始のために RNA ポリメラーが結合するプロモーター付近は、A + T - rich でありヘリックス-コイル転移の理論によっても開きやすい

ことが知られている⁵⁰⁾。われわれが、前述の大腸菌染色体 *oriC* の複製開始領域について、DSC で測定した結果は熱安定性が低いことを示し、特にこの領域のアデニンがメチル化されることによって特に開きやすくなることを示した。DNA の複製開始や転写の開始には、まず DNA の 2 重らせんが開くことが必要であり、このように開きやすい構造になっていることは、複製や転写開始のための活性化エネルギーを下げることになり、複製や転写がスムーズに進行するのに都合がよいものと考えられる^{8), 37)}。

5. 抗がん性薬剤と DNA の結合

抗がん性薬剤の多くは DNA と結合することが知られている。その結合様式には、1) ダウノマイシンやアドリアマイシンのように、隣接する塩基対間に挿入する形での結合 (intercalate)、2) ディスタマイシンのような DNA 2 重らせんの小さな溝 (minor groove) への結合、3) プレオマイシンのような DNA 鎖の切断、4) マイトマイシンのような 2 本鎖間またはシスプラチンのような 1 本鎖内の交差結合 (cross-linking) などが知られている。それぞれの結合様式によって、DNA の 2 重らせんに対する影響が異なるので、DSC をとるとその影響を見ることが出来る。

上述のようにプラスミド DNA の段階的融解は、理論的

解析によって、それぞれの融解ピークを塩基配列に帰属させることが出来る。したがって、DSCによってDNAの段階的融解に対する薬剤の影響を測定すれば、薬剤のDNAに対する作用を塩基配列レベルで知ることが出来る。われわれは、上記のような結合様式を異にするいろいろな薬剤について、その影響を調べた^{10),11)}。ここでは、ダウノマイシンなどと同一アンストラサイクリングループに属するアクラシノマイシンAの例について示す。Fig.10は、前述のpJL3-TB5 DNAに対するアクラシノマイシンAを加えた場合の熱流束型DSC曲線である。添加しない場合は、7つのピークが見られるが、アクラシノマイシンAの量が増えるにつれて、最も高温側のピーク7が特に強く影響を受けて、高温側にシフトしている。アクラシノマイシンAと同じアンストラサイクリングループに属するダウノマイシンやアドリアマイシンも同じような挙動を示すが、この場合はピーク7は見かけ上消滅したような形を取り、移動後のピークがみられない。これらは、アクラシノマイシンAに比べて相互作用が強い

ので、走査温度の上限を越えて移動したものと考えられる。ピーク7に対応する塩基配列は、塩基位置で313 - 693, 2195 - 2606, 3222 - 3898の部分である。したがって、この領域の塩基配列に、アクチノマイシンAは特に強く結合していることを示唆する。この領域は、上述のトランスポゾン転移に関係する遺伝子 *insB* に相当する領域とpJL3-TB5の複製開始領域である。pJL3-TB5のアンストラサイクリン抗生物質に対する感受性は、他の遺伝子よりもこれらの領域が強いかも知れない。

ところで、ダウノマイシンは、オリゴヌクレオチドとの複合体についてのX線解析から5'-CG-3'なる配列のCとGの間にインターカレートしていることが知られている^{51),52)}。したがってダウノマイシンの結合領域には、5'-CG-3'配列が高頻度で存在することが予想される。実際に、それぞれの協同的融解領域における5'-CG-3'配列の出現頻度を、各領域の融解温度に対してプロットして調べた結果、ピーク7に寄与する領域では、5'-CG-3'配列は異常に高い頻度で存在することを示し、X線解析の結果と一致した¹¹⁾。他のインターカレーターであるエチジウムブロミドやアクチノマイシンDでも、基本的にはアンストラサイクリングループと同じようなDSC曲線を示す¹¹⁾。

一方、上記の薬剤とは結合様式の異なる薬剤、たとえば小さな溝に結合するディスタマイシンは、上記インターカレーターとは異なったDSC曲線を示す。すなわち、ディスタマイシンは、濃度の高いところでは約103℃のところに1本の単調なピークを形成する¹¹⁾。ディスタマイシンは、AT-richな塩基配列に結合することが知られているが、このような結合によってAT-richな領域が安定化することによって全体としてピークが高温側に移動し、結局一つのピークに集束したと考えられる。実際に、ディスタマイシンの類縁化合物であるネトロブシンでは、合成poly-d(AT) duplexの転移温度が46K上がる⁵³⁾。また同一鎖内で交差結合する抗がん性白金錯体であるシスプラチンは、協同性を破壊するだけでなく2重らせんを不安定にするような結果を示した¹¹⁾。シスプラチンは、1本鎖内での結合によりスタッキングに歪を生じさせて、2重らせんを不安定にするものと思われる。子ウシ胸腺DNAとシスプラチンの反応は吸熱反応であるという報告はこのことを支持する⁵⁴⁾。

このように、DNAの段階的融解に対するいろいろなDNA結合薬剤の効果をDSCで測定することによって、塩基配列レベルでの結合領域、協同性に対する影響、結合の強さなどを知ることが出来る。さらに、作用が分かっているいろいろな薬剤のDSC曲線のデータを蓄積し

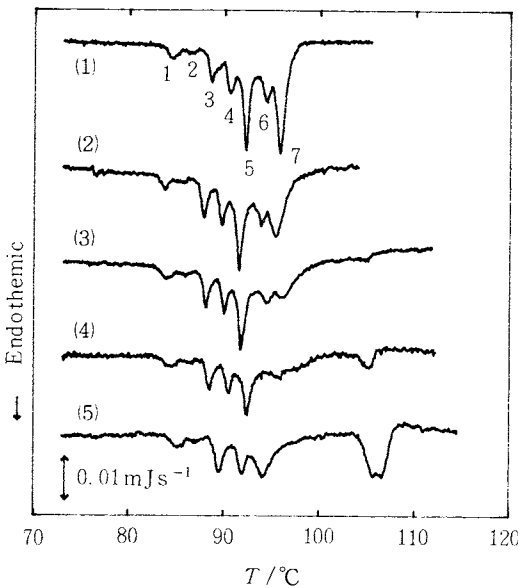


Fig. 10 Effect of aclacinomycin A on the stepwise melting of pJL3-TB5 DNA monitored by a heat-flux type DSC. About 60 mg of the DNA-drug mixtures containing 300 μ g DNA in 1 \times SSC buffer solution was scanned at a heating rate of 0.5 K min^{-1} . The mole ratios of drug to base-pair concentrations in the solution are: (1) 0, (2) 0.006, (3) 0.018, (4) 0.03, (5) 0.06.

ておけば、作用が未知の薬剤についてもその結合様式を知ることができるであろう。

6. 高次構造の熱測定

DNAは、通常のB型2重らせんの他に、A型、C型、Z型、超らせん、十字型などいろいろな高次構造をとる。これらの高次構造の熱測定によって、熱力学量を求めることは興味のあるところである。

閉環状DNAは線状のものより、ヘリックス-コイル転移に対して著しく安定である。われわれが、閉環状DNAについてDSCで測定したところでは、塩濃度が高い場合(0.2M Na⁺)は、ヘリックス-コイル転移を直接みることはできなかったが⁵⁾、塩濃度が低い場合(0.02M Na⁺) Col E1の閉環状DNAの融解は、約98°C付近に頂点をもつ単一ピークとして認められた⁷⁾。これは線状のものより転移温度が約18K高い。

Hinzのグループは、線状、開環状(open circular)、超らせん(2重らせん全体がさらにねじれたらせん構造)、リラックス型(2重らせん全体としてはねじれない)の各DNAについてDSCで測定し、線状と開環状ではほとんど差がないが、上記の順序で安定性が大きい(ヘリックス形成方向の自由エネルギー変化が小さい)ことを報告している⁵⁵⁾。ここで特に興味深いことは、従来閉環状DNAの安定性はエントロピー項の寄与が大きいと考えられていたが、ヘリックスからコイルに転移するときのエントロピーとエンタルピー変化はともに、線状や開環状DNAよりも閉環状DNAの方が大きく、閉環状DNAの安定性にはエンタルピー項が効いているということである。KClO₄が7.2Mという高濃度で存在する条件下での結果ではあるが興味深い。

poly-(dGdC)について、DSCによりB型からZ型への転移、さらにZ型からZ型DNAの集合体であるΨ(-)型DNAへの転移を観測し、エンタルピー変化などの熱力学的パラメータを求めた報告がある(56, 57)。その他、Holliday junctionあるいはfour-way junctionなどと呼ばれる枝分かれのある構造についての熱測定も報告されている⁵⁸⁾。hairpin構造については、濃度の問題があって直接測定するのは困難のようである⁵⁹⁾。近年DNAの化学合成が容易になったことから、いろいろと特徴のある高次構造をもったDNAが合成され、その熱測定によるDNAの高次構造の熱力学的な理解がますます深まるものと思われる。

7. おわりに

以上、DNAの段階的融解を中心に述べてきた。最近、Hinzのグループも熱測定によるDNAの段階的融解の測

定を行っている⁵⁵⁾。彼らは、熱測定の結果を、紫外吸収の方法や円偏光二色性(CD)の方法との比較を行っている。CD曲線でも、紫外吸収や熱測定と同じような微細構造の観測が期待されるところであるが、実際には観測されていない。しかし、いろいろな手段を相補的に利用し、より厳密な比較が可能になることが期待される。

ところで、エンタルピーは、分配関数を使ってその平均値を求める式で各項の係数となるのみならず統計的重率の指数部にも存在するという特殊性がある。このようなエンタルピーの特殊性が、DSC測定をきわめて有用なものにしている(ただし、温度走査型においても平衡熱力学の取扱が可能であるという近似の範囲内においてのことである)。すなわち、このことにより、分配関数が、エンタルピー変化の温度関数と結ばれ、ここでは断熱型DSC曲線と呼んできた過剰熱容量-温度曲線から直接求められることになるからである。したがって、過剰熱容量の温度依存性を測定すれば、多状態転移において、それぞれの反応機構について知ることなくあるいは仮定することなく、各中間状態の分布や各状態間転移の熱力学量を知ることができる⁶⁰⁾。このことは、他の測定手段にはない過剰熱容量測定の大きな特徴である。DNAの段階的融解の解析に、統計力学的デコンポリューションと呼ばれる上記の方法を適用し、ヘリックス-コイル転移の理論と併せて解析すれば、きわめて有用な情報が得られる可能性があ

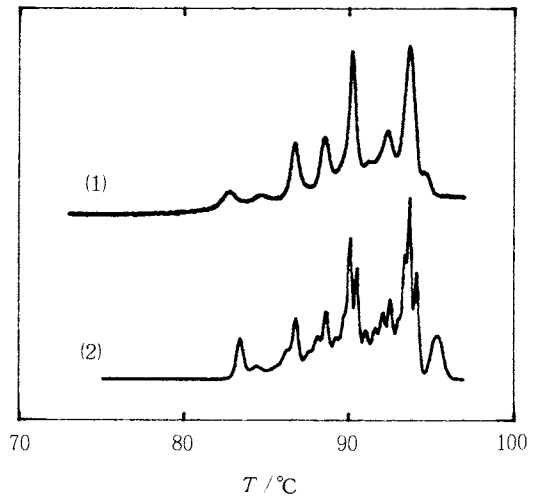


Fig. 11 Deconvolution of adiabatic DSC curve of pJL3-TB5 DNA. Curve 1 shows the adiabatic DSC curve of pJL3-TB5 DNA (see Fig. 2). Curve 2 shows the reconstructed curve using thermodynamic parameters obtained from deconvolution of curve 1.

る。しかし、われわれの研究室で予備的に行ったところ、転移が多いのでそれほど簡単ではない。Filimonov^ら⁶¹⁾による方法で行った結果をFig.11に示した。pJL3-TB5の過剰熱容量曲線(曲線1)は、デコンポリューションによって22個の成分に分解されたが、それを再構成した曲線2は、図に示した程度には合うが細かい議論のできる段階ではない(図には、フィッティングを行わない、生のデータを示した)。現在、他の方法⁶²⁾でも検討中である。今後、解析法でもその発展が望まれるところである。

物理学の法則によって説明される生物学的現象はきわめて限られていて、両者にはまだまだ大きな隔りがある。微細構造とも呼ばれるDNAの段階的融解現象は、物理学と生物学の数少ない接点の一つになるかも知れない。DSCによるDNAの段階的融解の測定は、「大きすぎず、小さすぎず」でちょうど遺伝子に対応した大きさであるところが面白い。物理学から生物学への入口が、熱測定から開けることを期待したい。

最後に、本稿の執筆にあたり、共同研究者の大坪栄一博士に有益な助言をいただいたことに深謝します。

文 献

- 1) S. Falkow D.B. Cowie, *J. Bacteriol.* **96**, 777 (1968).
- 2) S. Yabuki, A. Wada, K. Uemura, *J. Biochem.* **65**, 443 (1969).
- 3) R.B. Inman, *J. Mol. Biol.* **18**, 464 (1966).
- 4) S.G. Fisher, L.S. Lerman, *Cell* **16**, 191 (1979).
- 5) Y. Maeda, Y. Kawai, T. Fujita, E. Ohtsubo, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **30**, 289 (1984).
- 6) Y. Maeda, Y. Kawai, T. Fujita, E. Ohtsubo, *Thermochim. Acta* **88**, 235 (1985).
- 7) Y. Maeda, E. Ohtsubo, *J. Mol. Biol.* **194**, 691 (1987).
- 8) H. Yamaki, E. Ohtsubo, K. Nagai, Y. Maeda, *Nucl. Acids Res.* **16**, 5067 (1988).
- 9) Y. Maeda, K. Takahashi, H. Yamaki, E. Ohtsubo, *Biopolymers* **27**, 1917 (1988).
- 10) Y. Maeda, E. Ohtsubo, *Nucl. Acids Res. Symposium Series No. 19*, 101 (1988).
- 11) Y. Maeda, K. Nunomura, E. Ohtsubo, in preparation.
- 12) A. Wada, S. Yabuki, Y. Husimi, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **9**, 87 (1980).
- 13) 陶山明, 江口至洋, 土田裕三, 和田昭允, 蛋白質・核酸・酵素 **28**, 1165 (1983).
- 14) 和田昭允, 中村春木, 陶山明, 数理科学 No. **268**, 50 (1985).
- 15) A. Wada, A. Suyama, *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **47**, 113 (1986).
- 16) 和田昭允, 陶山明, 日本物理学会誌 **41**, 616 (1986).
- 17) O. Gotoh, *Advan. Biophys.* **16**, 1 (1983).
- 18) R.M. Wartell, A.S. Benight, *Phys. Rep.* **126**, 67 (1985).
- 19) H. Klump, T. Ackermann, *Biopolymers* **10**, 513 (1971).
- 20) Y. Baba, A. Kagemoto, *Biopolymers* **13**, 339 (1974).
- 21) D.W. Gruenwedel, *Biochim. Biophys. Acta* **340**, 16 (1974).
- 22) H. Klump, W. Burkart, *Biochim. Biophys. Acta* **475**, 601 (1977).
- 23) H. Klump, *Biochim. Biophys. Acta* **475**, 605 (1977).
- 24) P.L. Privalov, O.B. Ptitsyn, T.M. Birshtein *Biopolymers* **8**, 559 (1969).
- 25) Y. Kawai, H. Takahashi, T. Fujita, S. Koga, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **88**, 410 (1979).
- 26) A.S. Borovick, Yu. A. Kalambet, Yu.L. Lyubchenko, V.T. Shitov, Eu.I. Golovanov, *Nucl. Acids Res.* **8**, 4165 (1980).
- 27) A. Suyama, A. Wada, *Biopolymers* **23**, 409 (1984).
- 28) S.A. Kozyavkin, Yu.L. Lyubchenko, *Nucl. Acids Res.* **12**, 4339 (1984).
- 29) S. Yabuki, O. Gotoh, A. Wada, *Biochim. Biophys. Acta* **395**, 258 (1975).
- 30) I.V. Razlutski, L.S. Shlyakhtenko, Yu.L. Lyubchenko, *Nucl. Acids Res.* **15**, 6665 (1987).
- 31) D. Poland, H.A. Sheraga, "Theory of Helix Coil Transitions in Biopolymers", Academic Press, New York (1970).
- 32) D. Poland, *Biopolymers* **13**, 1859 (1974).
- 33) M. Fixman and J.J. Freire, *Biopolymers* **16**, 2693 (1977).
- 34) Yu.L. Lyubchenko, A.V. Vologodskii, M.D. Frank-Kamenetskii, *Nature* **271**, 28 (1978).
- 35) S. Ueno, H. Tachibana, Y. Husimi, A. Wada, *J. Biochem.* **84**, 917 (1978).
- 36) O. Gotoh, Y. Tagashira, *Biopolymers* **20**, 1033 (1981).
- 37) 前田好美, 大坪栄一, 生物物理通巻165号(印刷中).
- 38) K.J. Breslauer, R. Frank, H. Blocker, L.A. Marky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 3746 (1986).
- 39) A. Wada, H. Tachibana, S. Ueno, Y. Husimi, Y. Machida, *Nature* **269**, 352 (1977).

- 40) J. Marmur, P. Doty, *J. Mol. Biol.* **5**, 109 (1962).
- 41) A. Wada, S. Ueno, H. Tachibana, Y. Husimi, *J. Biochem.* **85**, 827 (1979).
- 42) Y. Sekine, E. Ohtsubo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 4609 (1989).
- 43) A. Suyama, A. Wada, *J. Theor. Biol.* **105**, 133 (1983).
- 44) R. Hanai, A. Suyama, A. Wada, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **6**, 51 (1988).
- 45) H. Masaki, M. Toba, T. Ohta, *Nucl. Acids Res.* **13**, 1623 (1985).
- 46) Y. Maeda, E. Ohtsubo, unpublished results.
- 47) A. Wada, A. Suyama, "Molecular Basis of Cancer", Paet A, (R. Rein, ed.) Alan R. Liss Inc., New York, pp. 37 (1985).
- 48) R. Hanai, A. Suyama, A. Wada, *FEBS Lett.* **226**, 247 (1988).
- 49) 花井亮, 和田昭允, 陶山明, *生物物理* **28**, 1 (1988).
- 50) O. Gotoh, Y. Tagashira, *Biopolymers* **20**, 1043 (1981).
- 51) G.J. Quigley, A.H.-J. Wang, G. Ughetto, G. van der Marel, J.H. van Boom, A. rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 7204 (1980).
- 52) A.H.-J. Wang, G. Ughetto, G.J. Quigley, A. Rich, *Biochemistry* **26**, 1152 (1987).
- 53) L.A. Marky, K.S. Blumenfeld, K.J. Breslauer, *Nucl. Acids Res.* **11**, 2857 (1983).
- 54) 高木秀和, 馬場義博, 影本彰弘, 熱測定討論会, 第22回講演要旨集, pp. 208 (1986).
- 55) W. Thumm, A. Seidl, H.-J. Hinz, *Nucl. Acids Res.* **16**, 11737 (1988).
- 56) J.B. Chaires, J.M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5479 (1986).
- 57) J.B. Chaires, J.M. Sturtevant, *Biopolymers* **27**, 1375 (1988).
- 58) L.A. Marky, N. Kallenbach, K.A. McDonough, N.C. Seeman, K.J. Breslauer, *Biopolymers* **26**, 1621 (1987).
- 59) L.A. Marky, K.S. Blumenfeld, S. Kozlowskii, K.J. Breslauer, *Biopolymers* **22**, 1247 (1983).
- 60) E. Freire, R. Biltonen, *Biopolymers* **17**, 463 (1978).
- 61) V.V. Filimonov, S.A. Potekhin, S.V. Matveev, P.L. Privalov, *Mol. Biol.* **16**, 435 (1982).
- 62) S. Kidokoro, A. Wada, *Biopolymers* **26**, 213 (1987).

有機・複合系新素材の試験・評価等補助事業報告書
高分子の熱分析手順とデータ解析——JIS化の基礎資料

B 5 版 124 頁 1,000 円 (送料込)

国際標準化機構 (ISO) や米国材料試験協会 (ASTM) の試験法の規格には, TG や DTA, DSC を用いて, 分解温度, 質量増減, 残分, 融解・転移温度, 融解・転移熱, ガラス転移温度などを測定する方法が規定されている。わが国でもこれらの試験法を JIS 化する動きがあり, このための検討が(財)高分子素材センターで進められている。JIS 原案作成に先立ち, 20 を越える公的機関や民間会社で多くの共通試料と標準物質を用いて, プラスチックの熱的特性試験法の共同試験が行われた。

この共同試験に先立って, これらの試験の実態が調査されたが〔熱測定 13, 50 (1986) 参照〕, 熱容量測定もかなり実際に行われており, 成形加工などの点でも必要と

されることから, わが国独自のものとして熱容量測定の試験規格も検討され, 共同試験が行われた。

プラスチック, ICTA-NBS の標準物質, 純金属の共同試験結果は, 詳しく解析され, その結果にもとづいて, JIS 化のための試験法原案が作成された。この報告書は高分子の熱分析に関係している人はもちろん, その他の分野の熱分析研究者にとっても有用なものと思われる。

この報告書をご希望の方は下記へ代金 (送料込み) 1,000 円を添えてお申込み下さい。

申込先 〒113 東京都文京区湯島 2-16-13

齊藤ビル 日本熱測定学会