

氏 名 (本 籍)	よし 吉	ざき 崎	ふみ 文	ひこ 彦
学 位 の 種 類	薬	学	博	士
学 位 記 番 号	薬 博 第	7 5	号	
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 5 1 年 3 月 2 5 日			
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当			
研 究 科 専 門 課 程	東 北 大 学 大 学 院 薬 学 研 究 科 (博 士 課 程) 薬 学 専 攻			
学 位 論 文 題 目	核 酸 お よ び 構 成 塩 基 の 化 学 反 応 性 に 関 す る 研 究			

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 竹 本 常 松 教 授 岡 野 定 輔

教 授 加 藤 鉄 三

論文内容要旨

筆者は、核酸構成成分と化学試薬との反応性、そしてその修飾部分の構造と特異性や反応機構さらに速度論的研究が、核酸の機能や構造解明の研究に寄与するものであるとの観点からいくつかの反応を検討した。

エチル化剤のひとつである triethyloxonium fluoroborate (TEOF) を cytidine-2'(3')-monophosphate (CMP) と種々のイオン強度をもつ pH 8.9 の buffer 中反応させるとエチル化 CMP (Et-CMP) が生成する。イオン強度 (μ) 0.6 付近で最高の収率を示すが、0.2 以下では全く反応しない。 $\mu = 0.6$ の buffer を使用し、pH を変化させつつ反応を行わせると pH 9 付近で最もよく反応が進行し、75% 近くが Et-CMP となるが、pH 6 以下ではアルキル化はほとんど進行しない。Uridine-2'(3')-monophosphate (UMP) を種々のイオン強度をもつ pH 8.9 の buffer 中で同様に反応させると $\mu = 0.6$ 付近で約 55% の Et-UMP が生成し、少量の uridine を副生する。 $\mu = 0.1$ 付近ではほとんど反応がおこらない。 $\mu = 0.6$ および 0.1 の buffer を使用し、各種 pH のもとに同様の反応を行わせると、Et-UMP はいずれも pH 9 付近で最高の収率を示す。Guanosine-5'-monophosphate (GMP) を各種 buffer 中 TEOF と反応させ、塩酸にて加水分解後反応率を調べてみると、アルキル化は $\mu = 0.5$ 付近、pH 9 付近で最もよく進行し、80% 近い収率を示す。 $\mu = 0.1$ 、pH 9 付近においても 50% 近くが Et-G に変化する。adenosine-5'-monophosphate (AMP) を同様に各種 buffer 中 TEOF と反応させたが、アルキル化は全くおこらず、用いた buffer の pH で定量的に原料を回収した。

以上、モノヌクレオチドで得られた事実は反応条件を選択すれば特定塩基のみを修飾しうる可能性を示している。モノマーで得られた条件すなわち、pH 8-9、 $\mu = 0.1-0.2$ の buffer 中で TEOF を RNA および DNA と反応させると、主要塩基のうち G のみが選択的にエチル化されると予想された。そこで yeast RNA および salmon DNA を pH 8.9、 $\mu = 0.1$ の buffer 中、約 5 倍当量の TEOF と反応させた後、それぞれを加水分解して常法の如く塩基分析を行った。その結果、含有 G のそれぞれ 49.6%、41.4% が選択的にアルキル化され、他の塩基、A、T、U および C は未変化であることが確認された。

アルキル化 DNA は、native DNA に比し約 0.8% の hyperchromicity を示すにすぎないが、融点は約 25° 低下しており、CD 曲線の残基楕円率も 9-18% 減少していた。これらの結果は、エチル化 DNA が base stacking および base pairing を若干減少して不規則性が生じているものの、依然 double helical structure を保持していることを示している。しかしながら、

Table II. The Base Composition of Yeast RNA before and after Treatment with TEOF

mole %	Up	Cp	Ap	Gp	Et-Gp
Native Yeast RNA	26.5	21.0	25.9	26.6	—
Ethylated RNA	26.1	21.3	25.8	13.5	13.3

Table III. The Base Composition of Salmon DNA before and after Treatment with TEOF

mole %	dTp	dCp	dAp	dGp	Et-dGp
Native Salmon DNA	27.1	20.3	27.1	25.5	—
Ethylated DNA	26.9	20.1	27.4	15.0	10.6

その sucrose を用いた濃度勾配分析より、エチル化DNAは二重らせん構造を保持しているものの、いくつかのポリマーに切断され、しかも各ポリマー中には数多くの切れめが入っていることが示された。

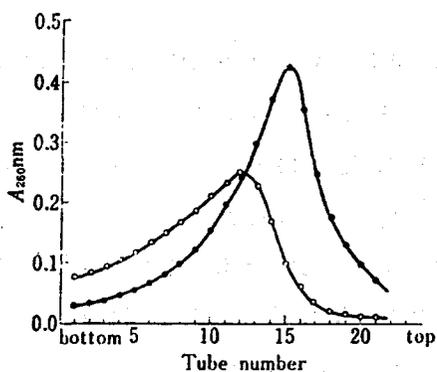


Fig. 9A. Zone Sedimentation Profiles of Native DNA and Ethylated DNA in Sucrose Density Gradient

Conditions of analyses were described in Experimental. —○—: native DNA, —●—: ethylated DNA

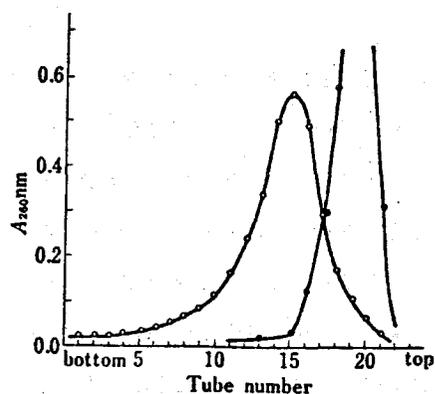


Fig. 9B. Zone Sedimentation Profiles of Native DNA and Ethylated DNA in Alkaline Sucrose Density Gradient

Conditions of analyses were described in Experimental. —○—: native DNA, —●—: ethylated DNA

3-Methyluridine (3-Me-UR)は通常のRNA アルカリ加水分解条件下、N-methyl-uracil-ribose にまで分解されるが、この分解反応は5'位の水酸基の6位の炭素への求核攻撃に基づくものと思われた。そこでさらに、uracilの1位へriboseに代えて直鎖のhydroxy-alkyl基が結合した化合物(5a-5e)を合成し、これらのアルカリ分解性についても検討を加えた。もし、先にあげられた反応機構が正しいならば、アルキル部分の炭素数を変化させた場合炭素数3個のとき水酸基部分と6位の炭素とで6員環となって最も安定化し、このときの反応速度が最大となるはずである。5a-5eを各種濃度の水酸化カリウム溶液中、 2×10^{-3} Mの濃度に

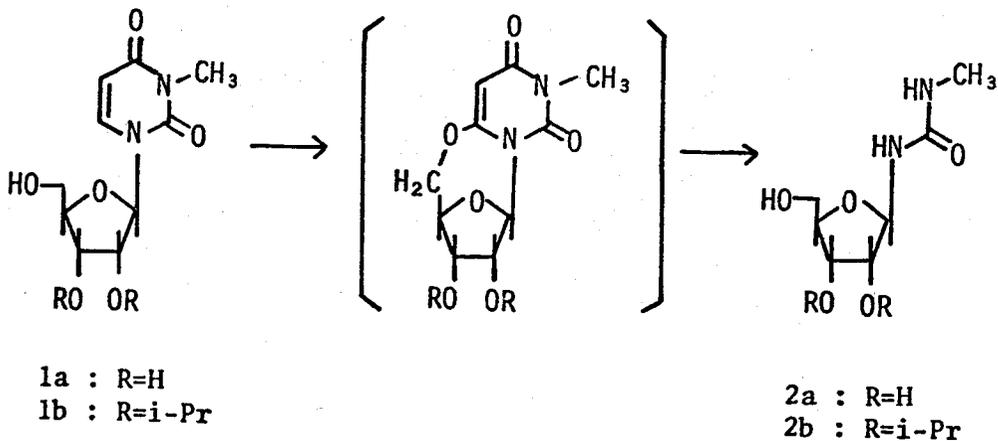


Chart 4

溶かし、各種温度下一定時間インキュベートした後一定量を採取、塩酸酸性とした後267nmにおけるUV吸収強度の減少を観察すると、たとえばN-KOH中、55°の場合、各化合物はMe-URより分解速度がおそいが、いずれも一次反応速度式に従っており、5a-5eの中では5bが最も速く、90分後で50%以下にまで減少する。また、求核反応促進性のあるDMSOを水溶液に加えることにより、反応は促進される。各分解条件下での速度定数kを求め、さらに反応初速度を求めて比較すると下図のごとくなり、予想どおり炭素数3のとき反応速度は最大となった。

分解産物については11の各化合物の生成が予想され、別途合成した標品と比較し、一致をみた。

亜硫酸水素ナトリウムの存在下、2537Åの紫外線を照射すると、pH9のbuffer中、thymidine (TR)およびuridine (UR)は還元を受ける。その反応曲線は、一定時間ごとに

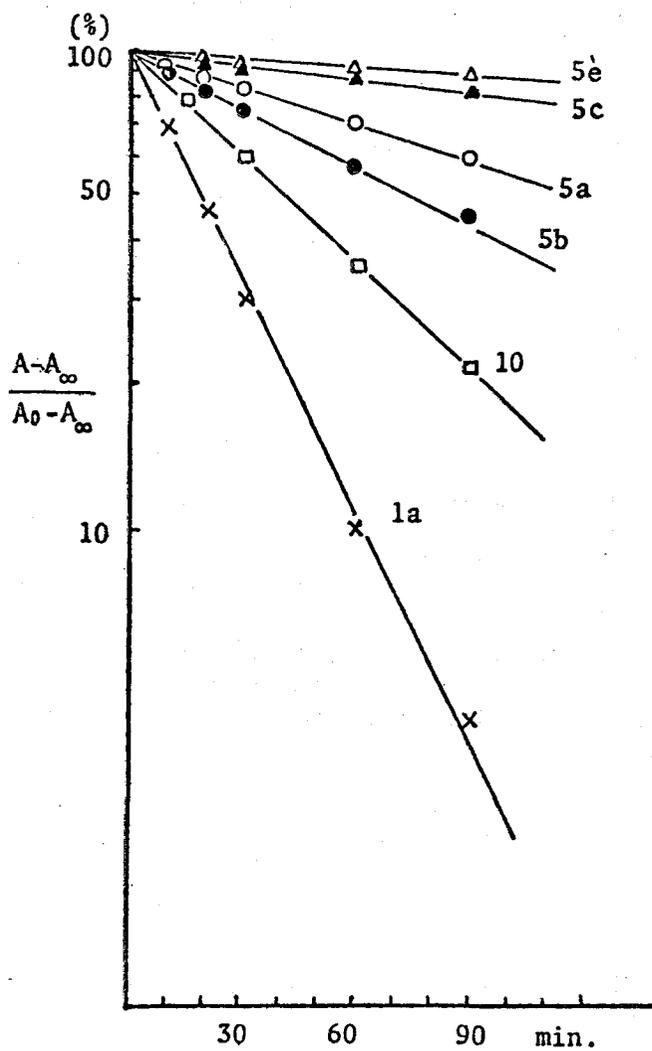


Fig.16. Semilogarithmic plots against time of absorbance changes. 3-Methyluracil derivatives were incubated in aqueous solution of N-KOH at 55°.

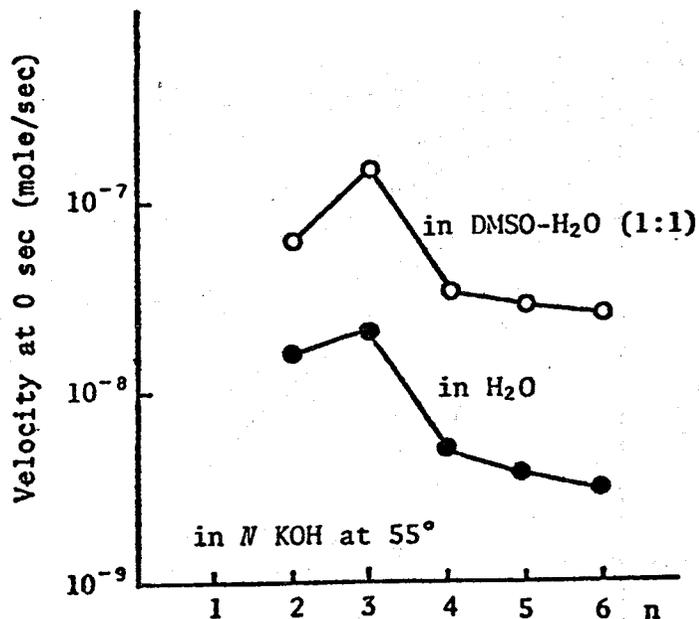


Fig.18. The relationship between the number of carbon and the velocity at 0 sec for alkaline degradation of 3-methyl-1-(ω -hydroxy-alkyl)uracil.

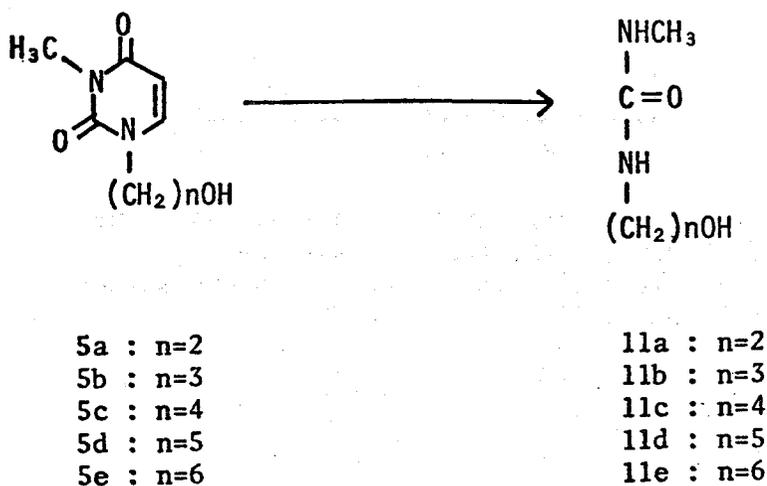


Chart 9

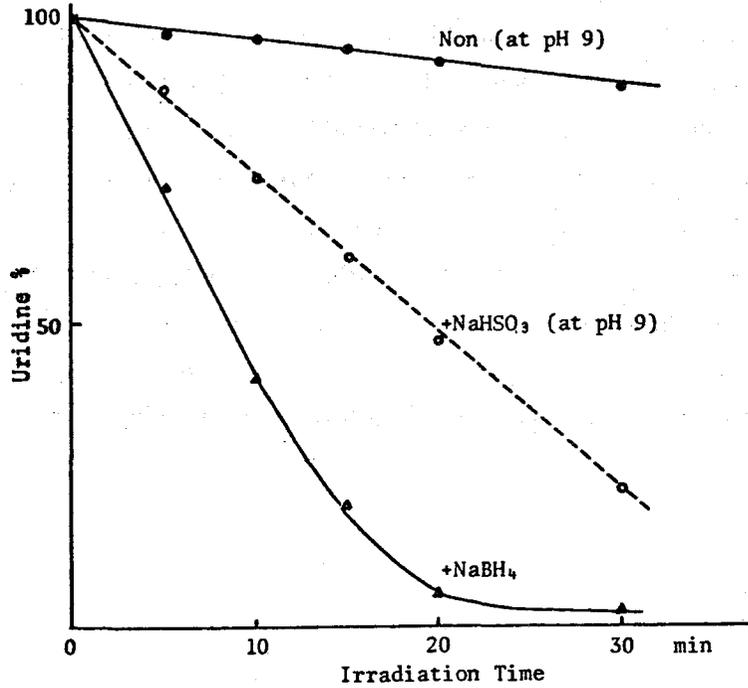


Fig. 1. Photoreduction of Uridine.

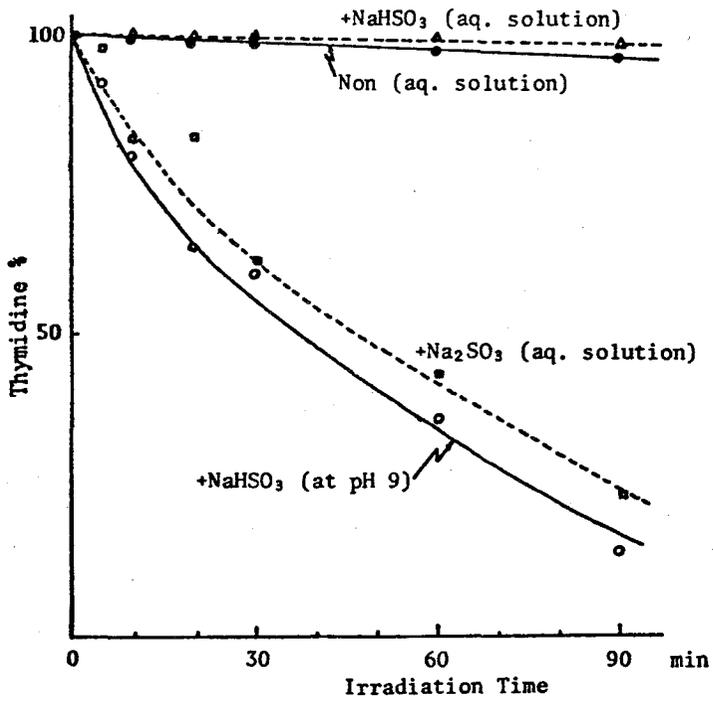


Fig. 2. Photoreduction of Thymidine.

反応液を採取，267あるいは262nmにおけるUV吸収強度の消長を観察することによって得られ，TRにおいては90分後で80%以上，URでは30分後には70%以上がそれぞれ消失する。還元生成物については，反応後酸加水分解を行い，TRの場合は5,6-dihydrothymineと精製の段階で副生したと思われる2-oxo-4-methoxy-5-methylhexahydropyrimidineを，URの場合は5,6-dihydrouracilを，それぞれ同定した。本反応においては反応液を100°で1時間加熱しても消失したUV吸収が再び現われないことより光加水反応の可能性は否定されるほか，pH 9の溶液中では暗室中8時間放置してもピリミジン環への亜硫酸イオンの付加はおこらず，他の還元反応よりもきわめて緩和にTRおよびURを選択的に還元する。

以上，検討された新しい化学反応性は，その核酸研究への幅広い応用が期待される。

審査結果の要旨

本論文はポリヌクレオチドの選択的アルキル化(第1章)、3-methyl-1-(ω -hydroxy-alkyl)uracilのアルカリ分解性(第2章)および亜硫酸イオンによるピリミジンヌクレオシドの光還元(第3章)について検討して得た結果をまとめたものである。

著者はエチル化剤の一つである triethyloxonium fluoroborate (TEOF) が使用する緩衝液を選択することによって uridine-2'(3')-monophosphate (UMP), cytidine-2'(3')-monophosphate (CMP), guanosine-5'-monophosphate (GMP) をエチル化するが、adenosine-5'-monophosphate (AMP) とは反応せず、イオン強度が低いとき UMP および CMP とはほとんど反応しないことに着目、TEOF を pH 8.9, $\mu=0.1$ の緩衝液中 DNA, RNA と反応させると特異的に 7-ethylguanine を生成、反応率は 50% に近いことを見出した。エチル化された DNA は、変性温度曲線、CD 曲線および濃度勾配分析の結果より二重らせんを保持しているものの、いくつかのポリマーに切断されていることを明らかにした。

次に、3-methyluridine のアルカリ分解には 5' 位の水酸基が関与していると思われたが、3-methyl-1-(ω -hydroxyalkyl)uracil のアルカリ分解においても、水酸基の 6 位の炭素への求核攻撃が反応に関与していることを証明した。このとき形成される無水物中間体が 6 員環となる、炭素数 3 個のとき分解速度は最大となる。分解は一次反応速度式に従っており、N-hydroxyalkyl-N'-methylurea が生成することを認めた。

さらに、亜硫酸イオンの存在下、 2537\AA の紫外線を照射すると、アルカリ性溶液中 thymidine および uridine のみが選択的に還元されて、5,6-ジヒドロ体がそれぞれ得られた。反応条件はきわめて緩和であり、光加水反応や高濃度の場合にみられる亜硫酸イオンの付加などの副反応はおこらず、cytidine やプリン塩基とも反応しないことを明らかにした。

以上の知見を詳述した本論文は学位論文として価値あるものと認める。