- (1963)
- 38) D. W. Green, V. M. Ingram, M. F. Perutz, *Proc. Roy. Soc.*, A225, 287 (1954)
- 39) D. W. Green and A. C. T. North, *Acta Cryst.*, 13, 1055 (1960)
- 40) H. Scouloudi, *Proc. Roy. Soc.*, A252, 181 (1960)
- 41) D. M. Blow, M. G. Rossmann and B. A. Jeffery, *J. Mol. Biol.*, 8, 65 (1964)
- 42) C. C. F. Blake, R. H. Fenn, A. C. T. North, D. C. Phillips and R. J. Poljak, *Nature*, 196, 1173 (1962)
- 43) R. J. Poljak, *J. Mol. Biol.*, 6, 244 (1963)
- 44) R. B. Corey, R. H. Stanford, R. E. Marsh, Y. C. Leung and L. M. Kay, *Acta Cryst.*, 15, 1157 (1962)
- 45) L. K. Steinrauf, J. M. Reddy and R. E. Dickerson, *Acta Cryst.*, 15, 423 (1962)
- 46) G. Kartha, J. Bello, D. Harker and F. E. DeJarnette, *Aspects of Protein Structure*, Academic Press, London (1963)
- 47) J. D. Bernal, C. H. Carlisle and M. A. Rosemeyer, *Acta Cryst.*, 12, 227 (1959)
- 48) D. W. Green, R. Aschaffenburg, J. C. Coppola, R. M. Simmons and P. J. Dunnill, *Acta Cryst.*, 16, A77 (1963)
- 49) M. L. Ludwig, I. C. Paul, G. S. Pawley and W. N. Lipscomb, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 50, 282 (1963)
- 50) B. Strandberg, B. Tilander, K. Fridborg, S. Lindskog and P. O. Nyman, *J. Mol. Biol.*, 5, 583 (1962)
- 51) D. C. Phillips, *Scientific American*, p 78, Nov. (1966)

第6章 核酸およびポリヌクレオチドの解析

大阪大学 薬学部 富田 研 一※

はじめに

核酸およびポリヌクレオチドのX線による構造解析はX線結晶学の歴史からみれば比較的新しい分野であり、その解析法は単結晶についてのオーソドックスな方法とはいささか異なり、要するに得られたセンイ写真をいかに本質的な分子模型と結びつけて解釈できるかという点にかかっている。

核酸 (nucleic acid) は細胞の核から発見されたためにその名がつけられたが、現在では細胞の核のみではなく細胞のいろいろな部分から抽出されており、DNA, リボゾーム RNA, メッセンジャー RNA や転移 RNA などの名前はよく知られている天然の核酸である。また、バクテリオファージやウィルスからも DNA や RNA が抽出され、それらの解析も進められている。一方、合成核酸は、Kornberg および Ochoa によって核酸合成酵素が発見されて以来、種類の塩基組成を持った核酸を人工的に合成できるようになり、その解析によって天然核酸の構造について極めて重要な知見が得られるようになった。

ところで、核酸およびポリヌクレオチドは Watson-Crick モデルで代表されるように、規則的な二重ラ

セン構造をしているけれども、球状蛋白質のように rigid ではなく、恐らく回りの状況の変化によってかなり flexible に構造変化を起こし得るものと考えられるし、それゆえに核酸が遺伝因子としての進化あるいは突然変異を起こし得る原因となっているとも考えられる。

ここでは核酸およびポリヌクレオチドのX線構造解析について実際の例をひいて、いかにして構造が決定されたかを述べてみたいと思うが、それぞれの場合の¹⁾詳細な結果は文献または総報を参照されたい。

実験法

(a) 試料

Spencer²⁾によれば、パン酵母より抽出した転移 RNA のセンイ写真には微結晶生成を示す spot が現われているが、これはあくまでも微結晶であって通常の単結晶X線解析に使えるような大きさの結晶ではないので、残念ながら現在までのところ核酸あるいはポリヌクレオチドの単結晶作成には成功していない。

では一体どのような試料によって、これらの物質の構造を決定できるのであろうか。よく知られているようにセンイ状の高分子物質は結晶性部分と非晶質部分とからなり、熱処理を行なったり、ローラーにかけたり、あるいは張力をかけたりして結晶性部分を増やし、しかもできるだけこの結晶性部分の並びを規則的に再配列させようという試みが行なわれる。ここで述べよ

X-ray Analysis of Natural and Synthetic Polynucleotides;

※ Ken-ichi TOMITA: Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

うとする核酸やポリヌクレオチドも、また普通の高分子物質と同じように細長い糸状の分子であるから、当然分子の配向性を高めるための工夫が必要になってくる。実際にどうするかと言えば、先ずゲル状の濃厚溶液を作らねばならない。そのためには超遠心分離法によって核酸を tube の底に集め、上澄液を除いて pellet 状の試料にすると、冷凍乾燥させた核酸に少量の水とか buffer を加えてゲル状にする。このようにしてできたゲル状の試料から配向性のよいセニを作ることになるが、これには前述の合成高分子の場合に用いた張力を加えるという方法を取る。即ち、(1)ゲル状の試料をピンセットの先端につけ、閉じたピンセットを開くと糸状に引っ張られる。この細い糸を束ねる方法。(2)マイクロメーターや顕微鏡の微動装置を利用して、二つの細いガラス棒を向い合わせて、わずかの間隙をおいた状態で、ここにゲル状の試料をつけ徐々にこの間隙を広げてゆく方法。これらの方法でゲル状の試料が段々と固まってゆくと同時に張力がかかっているの、中に含まれる分子は一方に配向するようになり、このセニを固定したまま乾燥させる。こうしてできたセニが果して配向性のよいセニかどうかを調べるには偏光顕微鏡を使って複屈折を測定する。一般に核酸の場合、 $-0.02 \sim -0.07$ 位の値を持つ。負の複屈折と言うことは、核酸の塩基対の面がセニ軸に垂直であることを示すもので、負の値が大きい程配向性がよいと言えるが、必ずしも透光性のよい試料ばかりとは限らないので一概には言えない。

(b) 解析用写真法

前節で述べた方法で作ったX線解析用のセニを、カメラに取り付けるわけであるが、普通の高分子の場合と違って、核酸やポリヌクレオチドは含まれる水の量によって分子の配向性も変わってくるので特別の注意が必要になる。X線写真用のカメラとしては、スリットの口径が $50 \sim 100 \mu$ のもので、しかも密閉式のカメラでなければならない。即ち、試料の周りの相対湿度を一定にする必要があり、しかもセニの太さは高高 0.1 mm 程度であるからスリットの口径も小さい方がよいのである。X線源としても微小焦点式のものがよい。DNA の場合には手製のカメラを使っているが、普通よく使われるのは Norelco Philips 社製のマイクロカメラである。X線源としては、Hilger & Watts 社製の semi-micro focus X-ray unit などがある。任意の相対湿度を得るためには、次に示すような物質の飽和水溶液を作り、カメラの中へこれらの

飽和水溶液中を通した空気を導けばよい。

飽和水溶液	相対湿度
炭酸カリウム	44%
硝酸ナトリウム	66
塩化ナトリウム	75
酒石酸ナトリウム	92

しかしながら、空気によるX線の散乱のため写真の中心部が黒くなるので、これを避けるためによく使われる方法は、ヘリウムガスをボンベから飽和水溶液に通し、適当な相対湿度を含んだヘリウムガスをカメラに送る。密閉式のカメラなので、当然核酸試料もこの相対湿度と平衡状態にあるので、乾燥させた状態のセニも膨潤し、せっかく引っ張って作った試料も中央部がたるんでたれさがってしまう。これを防ぎ、常に張力のかかった状態にしておくためには、試料保持台に特別の工夫が必要である。Poly L-lysine 塩酸塩のX線解析の場合には、第1図に示したような特別の装置を使っているが、カメラ全体を一定の相対湿度に保つ必要がない点では便利であるけれども、おもり(図

第1図. Poly L-lysine 塩酸塩の場合に用いた試料保持台
a : 試料, b : ガラス細棒, c : ガラスキャピラリー,
d : 接着剤, e : プラスチック製キャップ,
f : 飽和水溶液を入れる容器
g : 任意の相対湿度を持つ飽和水溶液, h : おもり

のh)で常に張力のかかった状態にある試料がガラスキャピラリーの内壁に接触しないように注意しないと、毛細管凝結現象を起こしてしまう。核酸の場合、普通は Langridge らが DNA センイのX線解析のときに使った試料保持台、即ち第2図に示すように、コの字型の真鍮製の枠を作り、この内側に薄い銅板を固定させる。張力の調節は枠に取り付けたネジの歩みを利用する。

第2図. DNA の場合に用いられた試料保持台

フィルムは高感度のX線フィルムを使い、普通は二、三枚重ねて装填するが、相対湿度が高くなるとフィルムが互いに附着して取れなくなるので、各フィルムの間に黒紙をはさむか、DNA の場合に Langridge らがやったように、フィルムの前に polythene などの膜を張るとよい。X線回折データーを集めるのに、普通は写真法が使われるけれども、将来はカウンター法も有効になるであろう。

構造解析法

前章で述べたような方法で得られた核酸またはポリヌ

クレオチドのX線回折データーから、分子構造を解析するには種々の過程を経なければならない。

(a) 他の物理化学的あるいは生化学的事実

まずできるだけ多くの物理化学的あるいは生化学的な実験事実を得ることが、解析を進めてゆくうえで大いに助けとなる。例えば、解析しようとする核酸の塩基組成がどうであるとか、二重ラセンとか三重ラセンを作っているかどうかとか、塩基のどの側鎖が化学的に修飾されやすいとか、赤外吸収スペクトルなどによってどのような水素結合様式で塩基対を作っているかと言うような点が分かっていると、後で述べる分子モデルを組み立てるうえで、ある程度限られた数のモデルにしぼることができるからである。Poly(A+2U) についての赤外吸収スペクトルから推論された三重ラセン構造における水素結合様式は、その後のX線解析に大いに助けになったものと思われる。

(b) 結晶学的データー

得られたX線写真は、普通の単結晶の場合の全回折写真に対応するので、各斑点は必ずしも一つの(hkl)反射によって出てくるとは限らず、幾つかの反射が重なって現われることもある。即ち、一般にセンイ状に伸ばした鎖状高分子は一軸配向(センイ軸方向へ鎖状分子が平行に配列)であるから全回折写真に対応する写真が得られるわけである。合成高分子の場合には、二軸配向の試料を得ることのできる場合があるが、核酸の場合はそれがむずかしく、偶然に二軸配向性を持った回折像が得られるにすぎない。

単結晶解析の場合と同様、得られたセンイ写真から、晶系、単位格子の大きさ、空間群、単位格子中の分子の数などを求めることはむずかしいが不可能ではない。その際、センイ写真に現われる反射の幅に大いに

第 1 表

物質名	DNA Na 塩	DNA Li 塩
型	A 型	B 型
単位格子の大きさ	$a = 22.24 \pm 0.06 \text{ \AA}$ $b = 40.62 \pm 0.10$ $c = 28.15 \pm 0.16$ $\beta = 97.0 \pm 0.4^\circ$	$a = 22.72 \pm 0.09 \text{ \AA}$ $b = 31.28 \pm 0.11$ $c = 33.60 \pm 0.01$
消滅則	$(hkl): h+k=2n$	$(h00): h=2n, (oko): k=2n$ $(ool): l=2n$
空間群	C2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
晶系	単斜晶系	斜方晶系

左右され、幾つかの可能な晶系、単位格子が残る場合がある。特に空間群を判定することはむずかしく、現在までに解析された核酸およびポリヌクレオチドの中では、DNA のA型およびB型が詳しく研究されている^{(10), (12)} (第1表)。

(c) 強度測定

写真フィルム上の各反射の強度を測定し、各反射の強度極大の位置を求めることが必要である。普通はマイクロデンシトメーターで各反射の相対強度を測定するわけであるが、核酸のように鎖状分子が配列している場合には、次にあげるような原因から各反射がぼけてくる。

- 1) 結晶領域内で各分子が規則正しい位置からずれる。
- 2) ラセン軸方向に沿って screw disorder が起こる。
- 3) 各結晶領域相互間のひずみ。
- 4) センイ中の相異なる結晶領域で、それぞれ違った格子常数を持つ。
- 5) 結晶領域が小さすぎるために、Laue 関数の幅が広がる。

したがって、各反射がぼけてきて、ある場合には arc を画くことになり、強度測定に誤差が生ずる。さらに、子午線上に現われる反射が第何層線上にあるかを正確に知らなければ、一体何個の残基で一回転するラセン構造であるかも分からないことになる。使用するカメラに合わせて計算した Bernal の図表と、実測のフィルムとを重ねて、各層線上の反射を判定するのも一つの方法である。後に述べるように、二重ラセン構造を持った RNA では、10残基/1回転なのか、11残基/1回転なのか今だに問題になっている。

(d) 分子モデル作成

一応強度測定および各反射の逆格子座標が決まり、ラセンの種類、一回転当りの残基数、ピッチの値などが決定すると、これらの値から実際に分子モデルを作成する。このモデル作成用には、第3図に示すように、プリン、ピリミジン塩基は金属板に結合手をつけたもの、炭素、酸素、窒素、燐などの各原子については、それぞれ適当な長さで作った四面体型や三角型の結合手のものを使うが、 $1\text{\AA}=5\text{cm}$ の scale で作っておくと、モデル自身が適当な大きさになって便利である。分子モデルは一残基だけを組み立てればよいはずであるが、隣接残基の側鎖との Van der Waals 距離を

第3図

考慮する必要があるので数残基一緒にして組み立てる方がよい。これを空間的に固定するには、土台に角度を刻みこんだ円板を持ったスタンドの中心の棒に腕(クランプ)をつけて適当な結合手のところを固定すればよい。

このようにしてモデルが完成したら、一残基中に含まれる各原子(水素は除く)の座標を円筒座標($r(\text{\AA})$, $\phi(^{\circ})$, $z(\text{\AA})$)で実際にモデルについて測定する。

(e) Fourier transform の計算

場合によっては、測定強度から Cylindrical Patterson 関数を計算して、ラセンのピッチ、ラセンの半径などについてかなりのことが分かるが、ここでは省略⁽¹⁷⁾する。この特集号で既に解析の理論についての総説があるので、理論の詳しいことはそちらに譲ずって、ここでは実際に強度の実測値と計算値との比較をどのようにして行なうかについて述べたい。

一つのラセン分子についての Fourier transform は次の形に表わされる⁽¹⁸⁾。

$$A_n = \sum_j f_j J_n(2\pi r_j R) \cos \left\{ n \left(\frac{\pi}{2} - \phi_j \right) + \frac{2\pi l z_j}{c} \right\}$$

$$B_n = \sum_j f_j J_n(2\pi r_j R) \sin \left\{ n \left(\frac{\pi}{2} - \phi_j \right) + \frac{2\pi l z_j}{c} \right\}$$

ここで

f_j : j 原子の原子散乱因子

J_n : n 次の Bessel 関数

r_j, ϕ_j, z_j : j 原子の円筒座標値

R : 逆格子動径座標

を表わす。したがって、 A_n 項(実数部)と B_n 項(虚数部)が求まれば、

$$\sum_n (A_n^2 + B_n^2) = F^2(R, l/c) = \text{強度}$$

第4図. ポリペプチドの種々のラセン構造についての計算強度

a: α -ラセン (18残基/5回転),

b: π -ラセン (22残基/5回転),

c: 3残基/1回転のラセン, 実線は右巻きラセン, 点線は左巻きラセン

として計算ができるわけである。この場合、各層線について Bessel 関数の次数が異なり、一回転当りの残基の数の違ったラセンでは、各層線で強度の分布が違ってくる (第4図)。各層線について、第何次の Bessel 関数がきいてくるかは

$$n = \frac{l - mN}{K}$$

で決まるがここで K および N は次の関係式で示される。

$$K = \frac{c}{P}, \quad N = \frac{c}{p}$$

n : Bessel 関数の次数

P : ラセンのピッチ

p : 残基当りのセンイ軸方向への移動距離

c : センイ軸 (c 軸) の軸長

l : 層線の数

m : 任意の整数

したがって、例えば第一層線で、二次の Bessel 関数が強度計算にはいってくるとすれば、

$$J_2(2\pi r R) = \text{maximum}$$

となるような $2\pi r R$ を Bessel 関数表から引いて、 $R(\text{\AA}^{-1})$ としては、実測強度の第一層線上で子午線に近い反射の中の最強のものの値を入れてやると、実空間での動径座標 $r(\text{\AA})$ が求まる。これはもちろん、平均のラセン半径を与えるものであるが、構造についての目安をつけるのに便利である。

とにかく、Fourier transform の二乗が強度に対応するので、各層線ごとにこの曲線を描き、実測の強度

値およびその位置を比べることによって、仮定した分子モデルが正しいかどうかを判定できる。強度の分布と計算値とが、もっともよく合うようになるまで、何度も trial and error method でモデルを改良してゆき、最終的に正しい構造が導き出される。もちろん、計算で求められるのは continuous Fourier transform であって、一つの曲線で表わされるけれども、実際の X 線写真では幾つかの反射に分れている。これは各ラセン分子間の規則的配列によって sampling が起こるからである。

ここで注意しておきたいことは、求められた構造が唯一の解であるかどうかという点である。特に強度データがぼけた反射のために不正確であればなおさらのことであり、ここに核酸またはポリヌクレオチド構造解析のむずかしさがあると言えよう。

解析の実例

以上大略の解析法を述べてきたが、ここで実際の構造解析の例をあげてみたい。核酸やポリヌクレオチド、特に DNA の A 型、B 型、C 型のそれぞれの解析は詳しく行なわれているが、これらの内容については総説に譲るとして、ここでは二重ラセン構造を持つ RNA の解析および筆者が実際に行なった合成ポリヌクレオチド、Poly(I+C⁺) の構造解析について話を進めてみたい。

(a) 二重ラセン構造を持つ RNA

RNA が DNA と化学構造上異なる主な点は、よく知られているように、構成塩基のチミン (DNA) とウラシル (DNA) の違い、リボース環の C_{2'} に OH 基のない場合 (DNA)、ある場合 (RNA) の差である。

RNA の X 線回折を始めて研究したのは Rich および Watson であるが、写真そのものがあまりはっきりした回折像を与えなかったにもかかわらず、DNA とかなり類似のラセン構造を持っているらしいことが推測された。RNA が DNA の A 型構造と極めてよく似ていることを始めて示したのは、Spencer²⁰⁾らの酵母から抽出した転移 RNA の X 線回折像である。(この試料は後になって転移 RNA でなく、リボゾームの一部であったことが判明している)²¹⁾その後、種々のウィルス中の RNA が二重ラセン構造を持っていることが分かり、その X 線解析が行なわれた。例²²⁾えば、reovirus RNA, wound tumor virus RNA,

第 2 表

RNA	型	相対湿度	晶 系	単 位 格 子 の 大 き さ
Fragmented yeast RNA	β	75%	六 方	$a = b = 40.7 \pm 0.2 \text{ \AA}$ $c = 29.0 \pm 0.2 \text{ \AA}$
Reovirus RNA	α	"	"	$a = b = 43.9 \pm 0.2$ $c = 30.0 \pm 0.2$
	β	"	"	$a = b = 39.87 \pm 0.15$ $c = 29.95 \pm 0.15$
Wound tumor virus RNA	α	"	"	$a = b = 43.5$ $c = 30.1$
Rice dwarf virus RNA	β	"	"	$a = b = 40.0$ $c = 30.5$

rice dwarf virus RNA などである。²⁴⁾

(i) 結晶学的データー

ここでは、yeast RNA および reovirus RNA の解析の結果を詳しく述べることにするが、まずこれらの RNA の写真から得られた結晶学的データーを表に示すと次の通りである (第2表)。²⁵⁾

この表から分かるように、いずれも六方晶系に属し、reovirus RNA の場合に見出された二種類 (α および β 型) の単位格子のいずれかに、他の RNA も含まれるようである。この α 型および β 型における分子配列は異なり、なにゆえ材料の違いによってこのいずれかの型を取るかは興味のある点である。

写真 1. reovirus RNA の X 線回折像
(a) α 型 (b) β 型

回折強度の点から見ると、全体的に α 型と β 型とは大きな変化はない。(写真 1a, 1b)

(ii) 分子モデル

RNA の X 線回折像が DNA-A 型二重らせん構造のものによく類似していることから、RNA も DNA と同じように Watson-Crick 型塩基対 (第 5 図) によって二本の逆平行鎖がらせん状につながった構造を持つことが予想される。事実、ウィルス RNA の塩基比は 1 であることが既に分かっている。また、赤道線および第二層線の強度分布を DNA の場合と比べて、RNA 分子中の糖および磷酸基がらせんの中心から半径約 $9 \text{ \AA}$ のところにあることが予測された。さらに、回折強度をうまく説明するためには、RNA 分子の塩基対の中心はらせん軸から $5 \text{ \AA}$ 離れた位置にあること、塩基対の平面がらせん軸に垂直でなく約 70° の傾きを持っていることが決定されたけれども、子午線上の反射が強くなり、しかも第 10 層線の反射が果して子午線上に出ているか否か確定的でないために、二

第 5 図. 核酸塩基対の水素結合様式 (Watson-Crick 型)

第 6 図. 二重らせん構造を持つ RNA のモデル

(らせん軸を紙面に垂直に取ってある)

実線: 11残基/1回転のモデル 点線: 10残基/1回転のモデル

第7図 二重ラセン構造を持つ RNA の実測および計算強度

左図：一本の RNA ラセンによる計算強度，実線：10残基/1回転，点線：11残基/1回転

右図：実測強度（reovirus RNA α 型， β 型，yeast RNA についての結果）点線：continuous diffraction

つの可能な構造即ち10残基/1回転構造と，11残基/1回転構造が提唱され，それぞれのモデルおよび実測，計算強度の比較は次の第6図，第7図に示してある。

(iii) 格子中の分子の配列

前に述べたように，二重ラセン構造の RNA は α 型と β 型の二種の格子を持ち得る。しかも α 型， β 型の回折像から各反射の指数を注意深く決めて見ると，指数と強度分布との関係から， α 型は $x_j \sim y_j \sim 1/2$ ， β 型では $x_j \sim y_j \sim 1/3$ (x_j : j 番目分子の x 座標) でなければならない。即ち，これを図に示せば第8図のような分子配列になる。図から分かるように， β 型は近似的に六方稠密充填構造を取るのに対して， α 型は間に大きな穴のある構造を取っている。しかし， α 型も

この穴に水分子またはイオンがつかまって近似的にはやはり六方稠密充填構造を取ると考えられる。さらに注目すべきことは， α 型と β 型で単位格子の $a(=b)$ 軸の長さおよび x_j の値が異なっているにもかかわらず，三回軸で関係づけられる三つの近接分子はそれぞれの型について同じ大きさ並びに同じ分子の相互配列を持っているという点である。もっと詳しく言えば，隣接する四つの分子の各々と全く同等の接触をしているわけである（第8図を参照）。

(iv) OH 基による水素結合およびその生物学的意義

ラセン構造としては，リボース環についた OH 基が同じ分子中の他の原子，例えば一つ上又は下の残基のリボース環中の酸素との間に分子内水素結合をなす

第8図. 二重ラセン構造 RNA の分子配列 (11残基/回転の場合)
左: α 型, 右: β 型

場合も考えられるし, また分子間水素結合によって隣接分子との結合に OH 基が関与する場合も考えられる。reovirus RNA や yeast RNA の分子モデルから考えると, OH 基はむしろ分子間水素結合を隣接分子のリン酸基との間に形成している可能性が大きいと言う。しかし, DNA と同じ塩基組成を持っている二重ラセンの RNA 分子の方が熱的により安定であるという報告をいかに説明するかが問題になる。希薄溶液中では分子内水素結合をしており, 一旦この溶液が濃縮されるとラセン構造自体に変化を起こし, 分子間水素結合ができるようになる可能性もないわけではないが, この点については更に詳しい実証が必要であろう。

さて, この論文²⁵⁾では, OH 基の生物学的意義, 特に蛋白質合成の際の役割についての一つの見解を述べている。即ち, 転移 RNA の anticodon がリボゾーム上にあるメッセンジャー RNA の codon を表わす三つの塩基と Watson-Crick 型水素結合をしていると信じられているが, リボゾーム中の RNA は酵母のリボゾームから抽出された RNA の X線解析から判明したように恐らく二重ラセン構造部分を含むであろう。一方, 転移 RNA 自身も二重ラセン構造部分を持っている。ところで, リボゾーム RNA のラセン部分が一部リボゾーム分子の表面に露出していて, これが転移 RNA ラセン部分と, 上述の X線解析結果と同様に, OH 基による水素結合を形成する。もちろんこの場合に, codon-anticodon 相互作用に都合のよいように, リボゾーム RNA と転移 RNA との間の分子間水素結合が形成されるであろうと言う。以上の見解は, たしかに一つの可能性として尊重されるべきではあるが, OH 基の役割をいささか過大評価しているよ

うにも思われる。いずれにしても, リボゾームの表面の微細構造や, 転移 RNA の高次構造が判明したらすべての点が明らかになるであろう。

(b) $\text{Poly(I+C}^*)$ の構造²⁸⁾

合成ポリヌクレオチドの X線構造解析は数多く発表されているが, 詳しい解析を行なったものは比較的少ない。ここではヒポキサンチンを塩基組成として持つ合成リボ核酸 Poly I と, シトシンを塩基組成とする Poly C とを 1 対 1 の割合で混ぜ, 低い pH 値に持っていたときにどんな構造になるかについて詳しく述べてみたい。

(i) 他の物理化学的実験結果²⁹⁾

Davies および Rich は, pH=7 のときに Poly I と Poly C とが 1 対 1 の complex を形成することを発表し, さらに Davies はその X線回折像が DNA のものに似ていることから, ヒポキサンチンとシトシンとが Watson-Crick 型水素結合をしていると結論している。(第9図) 一方, それぞれの合成リボ核酸,

第9図. Poly(I+C) の塩基対

第10図. 三重らせん構造を取る poly I における水素結合様式, 3 回軸がらせん軸と一致している。

第11図. 二重らせん構造を取る PolyC における水素結合様式

Poly I および Poly C は単独にそれぞれらせん構造を取り得る。即ち, Poly I は中性溶液中で, 比較的イオン強度の高い場合に三重らせん構造³¹⁾になり, Poly C は pH=5 附近においてのみ安定な二重らせん構造³²⁾を形成し, 二つのシトシン残基当り 1 個の水素がシトシン塩基の N₁ の位置につき, 塩基対間の水素結合に関与することが分かっている。

Giannoni と Rich³³⁾ は, 酸性溶液中での Poly I と Poly C との反応, 例えば酸-塩基滴定, 溶解度, 沈降速度, 融解温度, ホルムアルデヒドとの反応などの実験から, pH=3 では, Poly C のすべてのシトシン塩基の N₁ の位置に水素が附加し, Poly I との間に 1 対 1 の complex を形成すること, またシトシンのアミノ基が塩基対水素結合に関与していることなどを明らかにした。

(ii) 分子構造の解析

写真 2. Poly(I+C) の X 線回折像 (pH=7)

写真 3. Poly(I+C⁺) の X 線回折像 (pH=3)

Poly I と Poly C を 1 対 1 の割合で 0.05 M NaCl 溶液に溶かし、これを pH=3.0 の 0.05 M Na formate 液で透析した後、105,000 g で12時間遠心分離を行ない、底にたまった透明な pellet からセニイを作り、その複屈折を測定して見ると-0.02の値になった。マイクロカメラに取り付け、相対湿度を色々変えてX線写真を撮ったが、相対湿度を30%から100%までの範囲で変化させただけでも回折像には何ら変化は起こさず、二重ラセン構造が極めて安定であることを示している。写真2には中性の Poly(I+C) のX線写真を、写真3には pH=3.0 の Poly(I+C⁺) の回折像を示してあるが、Poly(I+C⁺) の方はあまり多くの回折斑点を与えない。さらに、Poly(I+C⁺) の回折像は、Poly(I+C) に比べて、低次の層線上には反射が少なく、第一層線上には非常に弱い反射があるのみで、長時間露出させた写真にのみ現われる程度であった。層線間隔は約25Åであること、子午線上の反射は第八層線上で3.16Åであることから、一残基当りのラセン軸方向への移動距離が3.16Åで8残基/1回転の二重ラセン構造を持つことが判明した。12個の独立な反射から、強い指数をつけて見ると、六方晶系で

$$a=b=19.9\text{\AA}, \quad c(\text{セニイ軸})=25.3\text{\AA}$$

となる。これが正しいとすれば、単位格子の大きさから分子は高々二重ラセンであって、四重以上のラセンでないことを支持することになる。また、負の複屈折を示すと言うことは、塩基面がラセン軸にほぼ垂直であることを裏付けている。第一、第三層線上の反射が

弱く、第二、第四層の反射が強いことは、近似的にセニイ軸の回りに二回対称軸がなければならず、したがって二本の鎖は DNA の場合とは違って平行に走っていると考えられる。

次に、ヒポキサンチン塩基と、水素の添加したシトシン塩基との間の水素結合様式であるが、これには可能なものが三通り考えられる(第12図)。

この中で、(A)はシトシン塩基のアミノ基が水素結合に関係していないので、前述のホルムアルデヒドとの反応結果と合わないものとして除くことができる。残った二つの可能な結合様式(B), (C)は、いずれもヒポキサンチン塩基の N₇ が水素結合³⁴⁾に関与しており、塩基対の型としても興味があるが、(B), (C)のいずれを取るかについては、前述の通りラセン軸に二回対称軸の存在することから考えて、(C)の方が妥当と思われる。

子午線(第八層)上の反射が3.16Åで、通常の塩基対間距離3.4Åに比べて短いことは、Poly(I+C⁺)の構造では塩基対の面がラセン軸に垂直でなくある程度傾いていることを示し、第六、第七層上の強い反射に合うモデルとしては、塩基対がプロペラのようにねじれてヒポキサンチン塩基の N₁ およびシトシン塩基のアミノ基 N₆ とが、それぞれ一残基下の反対側の鎖のリン酸基の酸素と水素結合をしたモデルを考えた。(第13図を参照)

次に、グリコチド結合即ち糖の C_{1'} と N₉ (プリン塩基) または C_{1'} と N₃ (ピリミジン塩基) 結合の回りのリボース環と塩基との立体的配置についての考察

第12図. Poly (I+C⁺) の場合の、三つの可能な塩基対水素結合様式

第13図. Poly(I+C⁺) のモデル

第14図. Poly(I+C⁺) の実測および計算強度実線は計算値、斜線の部分が実測値であるが、解析されたヌクレオチド、ヌクレオチドおよびDNA ではほとんどすべてが *anti*-conformation を取ることが分っているが、Poly(I+C⁺) ではラセン軸が二回対称軸になっているので、一方の鎖では *anti*-conformation を取っても、もう一方の鎖は *syn*-conformation を取らざるを得ないことになる。結局は Poly I 鎖が *anti*-conformation, Poly C⁺ が *syn*-conformation を取っているとモデルを作り上

げ、それによる Fourier transform の計算値と実測強度との比較を行なった (第13図, 第14図)。

第13図は、最終的に決まった分子の配列をラセン軸方向から見た図であるが、各ヌクレオチド対当り4コの水素結合 (3コの N-H...O と、1コの N-H...N) で非常にかがっちりした二重ラセン構造を取っていることが分かるであろうし、X線回折像が相対湿度に影響されないことも納得がゆくであろう。

X線小角散乱法その他の応用

前章までは通常の方法によるX線構造解析法の概略について述べてきたが、ここではかなり特殊な方法によって、核酸その他の生体高分子の分子構造決定への approach について述べてみたい。

その一つはX線小角散乱法の応用である。回折現象においては、X線によって回折を起こす物質の大きさが大きくなる程、回折角は小さくなってゆく。したがって、物質が高分子になればなる程、回折効果を示す角度は小さくなり、小角散乱法が有力になるわけである。小角散乱の理論は Guinier, Hosemann らによって展開されているが、X線によって一個の粒子から diffuse した小角散乱が引き起こされ、回折角 0° 附近の強度分布を測定することによって、その物質の大きさ、形、配列の様子などについての平均的な値を求めることができる。しかも、この方法では試料の溶液中での形状が推定できるから、特に flexible な生体高分子を生じた状態で取り扱う場合には大きな利点である。生体高分子の希薄溶液中でのX線小角散乱法については総説があるので、ここでは全般的なことは省略して、核酸特に転移RNAの構造についてのX線小角散乱法の応用例をあげることにする。

DNA の 1~6% 希薄溶液中での分子構造についての研究によれば、単位長さ当りの質量は実測値が 208~212/Å であるのに対して、Watson-Crick の DNA モデルからの推定値が 200/Å となっており、よい一致を示している。さらに、Luzzati らは DNA と色素 proflavine との相互作用について小角散乱法で研究を行なった。既に、Lerman によって粘度測定、X線回折写真測定から intercalation の考え方が発表されているが、この考え方によると、proflavine 分子は二重ラセン構造の DNA 分子の塩基対間に intercalation (挿入) され、糖、リン酸基による骨格はその部分だけ引きのばされた形になるが、DNA 分子の構造は全体

として変わらない。Luzzati らの研究から次の第3表に示すように、

第 3 表

	β	$R_g(\text{\AA})$	$\mu(\text{el. \AA}^{-1})$
1	0	8.4	100.4
2	0.103	8.2	102.5
3	0.202	8.0	87.5
4	0.304	7.8	83.0
5	0.510	7.5	71.9

ただし、 β : proflavine 分子と nucleotide pair との比
 R_g : 回転半径 (radius of gyration)
 μ : DNA Na 塩 rod の linear electron content,

- 1) DNA の構造は proflavine 分子との相互作用によって溶液中で幾らか変化するが、棒状構造は保たれる。
- 2) この棒状構造における単位長さ当りの質量は減少する。
- 3) 回転半径は proflavine の濃度が高くなるにつれて減少する。

ということが判明し、Lerman の考え方を支持する結果となった。

小角散乱法を適用したもう一つの例として、転移 RNA の構造についての研究を述べてみよう。

転移 RNA は蛋白質合成過程において、重要な役割を果し、その一次構造は幾つかのアミノ酸に特異的な転移 RNA について既に決定されている。⁴²⁾ アラニン転移 RNA の一次構造から、Holley らは第15図に示すような三つの二次構造モデルを提出した。

それ以後に決まった他のアミノ酸転移 RNA の一次構造から、同じような base-pair, loop を考えてみると、クローバー型のモデルが最も一般性のあるモデルらしいことが分かってきている。ところで、これら転移 RNA の希薄溶液中での分子の形などについて X 線小角散乱法で研究されている。⁴³⁾

ここでは Lake らの結果について少し詳しく述べてみたい。酵母からの転移 RNA を 0.1 MKCl, 0.02 M tris-HCl buffer (pH=7.42) 液に溶かし、小角散乱法によって転移 RNA の回転半径が $23.5 \pm 0.25 \text{\AA}$ 、平均分子量は 27,500 になることを見出した。単純な回転楕円体や円筒型モデルでは実測曲線に合わないこと、しかも回転半径の値から種々の他のモデルとも合わないことが分かった。たとえば、一本鎖 random coil モデルでは計算による回転半径が $28 \sim 30 \text{\AA}$ となり大きすぎるし、一本鎖のヘアピンモデルも約 $25 \text{\AA}$ 、三重ラセ

第15図. アラニン転移 RNA の一次構造から推定した3つのモデル (Holley らによる)。loop をついている部分と、塩基対形成 (二重らせん構造) 部分とが混じっている。

ン構造でも約 $28 \text{\AA}$ で、いずれも大きすぎる。残された一つの可能なモデルは、Holley らのモデル (第15図) 中のクローバー型であること、しかも loop の中で anticodon の triplet nucleotide を含む loop を除いて、他の loop は一緒に折り畳まれてクローバー型平面から約 60° 傾いているモデルが最もよく実験結果に合うと言う。もちろんこのモデルが唯一でしかも正しいモデルであるか否かについては何にも言えないけれども、少なくとも転移 RNA が平面的でなく三次元的な分子構造を持っているだろうことは確かであろう。

最近、別の方面から生体高分子の構造についての研究法が開拓されつつある。その方法と言うのは、電子顕微鏡写真から、分子の規則的配列についての知見を得ようとするもので、電顕の写真をも mask にして optical transform によって、例えばラセンのピッチその他を求めようとする方法である。現在では、電子顕微鏡の技術も、また分解能も向上しており、隣タングステン酸や蟻酸ウラニウムによる negative stain をほどとした生体高分子 (たとえば、TMV, T4 フェ

ージの polyhead や tail, リボゾーム) の電顕写真に、波長一定の平行光線をあて、その後方にフィルムを置いて露光すると、丁度X線をセンイにあててフィルム上に回折像が現われる原理と同じで、もし電顕写真にある規則的な negative stain の像があれば、その周期性を示す光学回折像が得られる。⁴⁴⁾ この光学回折像から実際の生体高分子の分子構造について、ある程度の知見が得られるわけであり、今後いろいろな場合に利用される方法ではないかと思われ⁴⁵⁾る。

以上で、核酸およびポリヌクレオチドの解析についての拙文を終るが、多くの方々から内容について忌憚のないご批判をいただけたら幸いである。

文 献

- 1) 富田研一, 渡辺得之助: 有機結晶化学 (大崎, 角戸, 島田共編) p. 181. 化学同人, 京都 (1966)
富田研一: 日本結晶学会誌, 7, 169 (1965)
A. Rich, D. W. Green: Ann. Rev. Biochem., 30, 93 (1961)
J. Kraut: Ann. Rev. Biochem., 34, 247 (1965)
- 2) M. Spencer, W. Fuller, M. H. F. Wilkins, G. L. Brown: Nature, 194, 1014 (1962)
- 3) R. Langridge, H. R. Wilson, C. W. Hooper, M. H. F. Wilkins, L. D. Hamilton: J. Mol. Biol., 2, 19 (1960)
- 4) M. E. Bergmann: Norelco Reporter, 6, 96 (1959)
- 5) U. Shmueli, W. Traub: J. Mol. Biol., 12, 205 (1965)
- 6) W. Ruland: Norelco Reporter, 14, 12 (1967)
- 7) H. T. Miles: Proc. Natl. Acad. Sci., 51, 1104 (1964)
- 8) V. Sasisekharan, P. B. Sigler: J. Mol. Biol. 12, 296 (1965)
V. Sasisekharan, D. R. Davies, P. B. Sigler: in preparation
- 9) R. E. Franklin, R. G. Gosling: Acta Cryst., 6, 673 (1953)
- 10) W. Fuller, M. H. F. Wilson, H. R. Wilson, L. D. Hamilton: J. Mol. Biol., 12, 60 (1965)
- 11) 田口稲男: X線結晶学 (仁田勇監修) 上巻, p. 537 丸善, 東京 (1959)
- 12) S. Arnott: J. Mol. Biol., 12, 76 (1965)
- 13) B. K. Vainshtein: *Diffraction of X-rays by Chain Molecules*, Elsevier, New York (1966)
- 14) D. A. Marvin, M. Spencer, M. H. F. Wilkins, L. D. Hamilton: J. Mol. Biol., 3, 547 (1961)
- 15) C. H. Mac Gillavry, E. M. Bruins: Acta Cryst., 1, 156 (1948)
- 16) R. E. Franklin, R. G. Gosling: Nature, 172, 156 (1953)
R. E. Franklin, A. Klug: Biochim. Biophys. Acta. 19, 403 (1956)
- 17) 飯高洋一: 生物物理, 7, 324 (1967)
- 18) D. R. Davies, A. Rich: Acta Cryst., 12, 97 (1959)
- 19) R. Steiner, R. F. Beers, Jr: *Polynucleotides*, Elsevier, New York (1961)
- 20) A. Rich, J. D. Watson: Proc. Natl. Acad. Sci., 40, 759 (1954)
- 21) M. Spencer, F. Poole: J. Mol. Biol., 11, 314 (1965)
- 22) R. Langridge, P. J. Gomas: Science, 141, 694 (1963)
- 23) K. Tomita, A. Rich: Nature, 201, 1160 (1964)
- 24) T. Sato, Y. Kyogoku, S. Higuchi, Y. Mitsui, Y. Iitaka, M. Tsuboi, K. Miura: J. Mol. Biol., 16, 180 (1966)
- 25) S. Arnott, F. Hutchinson, M. Spencer, M. H. F. Wilkins, W. Fuller, R. Langridge: Nature, 211, 227 (1966)
- 26) P. J. Gomas, I. Tamm: Proc. Natl. Acad. Sci., 49, 707 (1963)
L. M. Black, R. Markham: Neth. J. Plant Path., 61, 715 (1965)
- 27) H. C. Kaerner, Z. Hoffmann-Berling: Z. Naturforsch., 19b, 593 (1964)
- 28) 富田研一, A. Rich: 日本物理学会発表 (昭和40年4月) 東京
K. Tomita, A. Rich: in preparation
- 29) D. R. Davies, A. Rich: J. Amer. Chem. Soc., 80, 1003 (1958)
- 30) D. R. Davies: Nature, 186, 1030 (1960)
- 31) A. Rich: Biochim. Biophys. Acta, 29, 502 (1958)
- 32) R. Langridge, A. Rich: Nature, 198, 725 (1963)
- 33) G. Giannoni, A. Rich: Biopolymers, 2, 399 (1964)
- 34) 富田研一: 蛋白質・核酸・酵素 10, 1313 (1965)
- 35) J. Donohue, K. N. Trueblood: J. Mol. Biol., 2, 363 (1960)
- 36) A. Guinier, G. Fournet: *Small Angle Scattering of X-rays*, John Wiley, New York (1955)
R. Hosemann: Z. Physik, 113, 759, 114, 133 (1939)
- 37) 角戸正夫: 実験化学講座 (日本化学会編) 4, p. 269, 丸善, 東京 (1956)
- 38) O. Kratky: *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Vol. 13, p. 105, Pergamon, New York (1963)
- 39) V. Luzzati, A. Nicolaieff, F. Mason: J. Mol. Biol. 3, 185 (1961)
- 40) V. Luzzati, F. Mason, L. S. Lerman: J. Mol. Biol. 3, 634 (1961)
- 41) L. S. Lerman: J. Mol. Biol., 3, 18 (1961)
- 42) R. Holley, J. Apgar, G. Everett, J. Madison, M. Marquisee, S. Merrill, J. Penwick, A. Zamir: Science, 147, 1462 (1965)
J. Madison, G. A. Everett, H. Klug: Science 153, 531 (1966)
U. L. RajBhandary, S. H. Chang, A. Stuart, R. D. Faulkner, R. M. Hoskinson, H. G. Khorana: Proc. Natl. Acad. Sci., 57, 751 (1967)
H. G. Zachau, D. Dütting, H. Feldmann: H.S. Z. Physiol. Chemie, 347, 212 (1966)
- 43) W. Krigbaum, R. Godwin: Science, 154, 423 (1966)
A. Dembo, N. Sosfenov, L. Feigin: Kristallografiya, 11, 581 (1966)
J. A. Lake, W. W. Beeman: Science, 156, 1371 (1967)
- 44) H. W. Wyckoff, R. S. Bear, R. S. Morgan, D.

- Carlstrom: J. Optical Soc. Amer., 47, 1061 (1957)
 45) A. Klug, J. E. Berger: J. Mol. Biol., 10, 535 (1964)
 J. T. Finch, A. Klug, A. O. W. Stretton: J. Mol. Biol. 10, 570 (1964)
 R. S. Morgan, B. G. Uzman: Science, 152, 214

- (1965)
 T. F. Anderson, S. Krim: Abstract of Sixth Int. Congress. Electron Microscopy, Kyoto (1966)
 M. Sawatake: ibid (1966)

第 7 章 核タンパク質のX線解析

東京大学 三井幸雄*

核タンパク質という言葉が普及しているので表題として使ったが、研究の目的は言うまでもなく核酸とタンパク質との複合体の構造にある。この意味では T. M. V. のようなウィルス類もその範囲に入る。これらについては Franklin, Klug, Caspar 等の有名な一連の仕事があるが、既に詳しい綜説もあるので、ここでは話をヌクレオプロタミンとヌクレオヒストンに限ることにする。これについても、すでにヌクレオプロタミンについては Wilkins らの、ヌクレオヒストンについては Zubay, Richards, Bradbury ら、磯¹⁶⁾等の綜説がある。そこで、ここではやや偏った内容になるが、筆者らの経験と関連した問題に重点を置くことにしたい。

1. ヌクレオプロタミン

1-1 回折像の特徴と解釈

プロタミンは全体の約%の残基が アルギニンからなる比較的低分子量のタンパクで 精子の中で DNA と結合している。そのX線回折像は Wilkins らによっていろいろな試料 (*Sepia*, *Salma trutta* 等) について撮られている。その結果、精子自身を配向させたもの、抽出したヌクレオプロタミン および DNA にプロタミンを加えて沈澱させたもの (再構成ヌクレオプロタミン) の三者が本質的に同一の pattern を与えることが分かった。その中心部の様子は 図1(a) のようで、抽出したものおよび再構成したものでは全体がもう少し diffuse になっている。

ヌクレオプロタミンのセンイは 60~100% の相対湿度 (R.H.) の空气中で常に六方格子を取り、格子定数は c (センイ軸) = 34.4 Å, $a \approx 25$ Å (60% R.H.) ~ 28.9 Å (98% R.H.) である。これに対し DNA 単独の場合

図 1. (a) ヌクレオプロタミン, (b) DNA, (c) DNA + ポリ-L-リジンの強度分布の比較

X-ray Analysis of Nucleoprotein;

* Yukio MITUI: Faculty of Pharmaceutical Science, Tokyo University.