

どうして核酸は変性するの？

藤原 伸介

生物工学会の会員でプラスミドのアルカリ抽出をしたことがない人はいないと思う。分子生物学では一般的な技術で、キットも多数販売されている。キットの価格も下がったので、実際に3種類の溶液を自分で調製し、作業を行う研究室はほとんどない。筆者が学生の頃はすべての溶液を自分で調製しなければならなかった。教科書は「Molecular Cloning」であり、各溶液の調製法が詳しく書かれていた。特に溶液2の作り方には注意書きがあった。溶液2とはドデシル硫酸ナトリウム（1%）と水酸化ナトリウム（0.2 N）の混合液で、菌体を可溶化すると同時に細胞内の核酸を変性させる。注意書きとは「水酸化ナトリウムは10 N溶液から直前に希釈して調製すること」である。その理由は、0.2 Nの溶液だと空気中の二酸化炭素が溶けてすこしづつpHが下がってしまうからだ。特に冬になると気温が下がって二酸化炭素が溶けやすくなる。夏場は気温が高いのでなかなかpHは下がらない。実際、夏に調製した溶液2を冬に使うと、プラスミドはあまりとれないのであった。学生数の多い大きな研究室では、調製した溶液2はすぐになくなってしまうので、このようなトラブルはめったに起こらない。今のようにプラスミド抽出用キットが普及してくると、それぞれの溶液の役割について考えることはない。アルカリ抽出ではアルカリ性にして核酸を変性させることができて語源にもなっている。分子生物学の実験ではPCR、サザンハイブリダイゼーション、ノザンハイブリダイゼーションなど、核酸を変性させることはとても多い。ここでは核酸を安定化している要因と変性のメカニズムを復習してみたい。

核酸を安定化させている要因

DNAは二本鎖で安定な二重らせん構造を形成する。この構造の安定化には塩基対形成が最も重要なことは言うまでもない。塩基にはプリン骨格をもつアデニンとグアニン、ピリミジン骨格をもつシトシン、チミン、(RNA

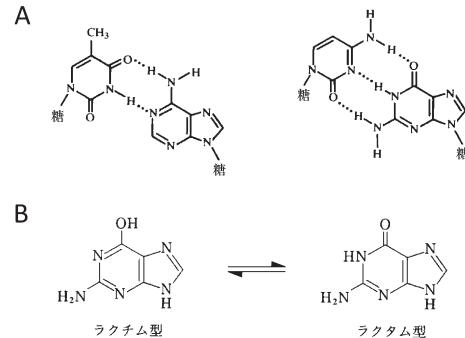


図1. DNAの塩基対形成と塩基の互変異性体。A、中性付近での塩基対形成；B、グアニンのエノール型（ラクチム型）-ケト型（ラクタム型）互変異性体。

ではウラシル）がある。アデニンとチミン、シトシンとグアニンは水素結合を形成する。ここでDNAの二重らせん構造を詳しく説明するのは省略するが、らせん（ヘリックス）は3.4 nmで一巻きし、この一巻き（1ピッチ）に10.5個の塩基対が形成される。DNAの二重らせん構造は三つの力のバランスで安定に保たれている。一つ目は塩基間に形成される水素結合である。プリン塩基もピリミジン塩基も互変異性体をとりうる。塩基対形成は今では高校の教科書にも載っているが、ワトンとクリックは当初、エノール型（ラクチム型）を使って構造を解こうとしていた（図1）。その後、中性付近のpHではケト型（ラクタム型）になることに気づき、有名な塩基対形成のパズルが解かれた。グアニンとシトシンは塩基間に水素結合を3つつくり、アデニンとチミンは2つつく。GC含量が高い分子ほど安定性が増すのは水素結合の数が増えるためである。二つ目の安定化要因は積み重なる塩基による相互作用である。塩基はらせん軸に対して垂直に積層する。積層する塩基はお互いに0.34 nmの距離という近さで配置される。その結果、疎水性コアには水分子が入り込む余地がなくなり、疎水性相互作用が生じる。また、積層するプリン-ピリミジン複素環は分子平面をあわせる形で積み重なるので、相互のπ電子雲

間で分子軌道の重なりが生じ、両分子の π 電子はさらに非局在化することで安定化している。三つ目はリン酸の反発力のつりあいである。DNAの二重らせん構造ではリン酸は表面に位置し、その負電荷によりお互いに反発している。この反発のおかげでねじれてらせんができる。

DNAの変性

二本鎖DNAはさまざまな条件で変性して一本鎖DNAになる。たとえばPCRでは高温で処理する。DNAは長い分子なのでその溶液は粘性をもつ。DNA溶液を過熱すると二重らせんがほぐれ、粘性が低下する。一本鎖の割合が増え粘性の低下とともに吸光度スペクトルも変化する。二本鎖DNAと一本鎖DNAの260 nmの吸光度は一本鎖のDNAの方が二本鎖のものにくらべて高い。これは塩基対の解離に起因する濃色効果(hyperchromic effect)が起こるためである。温度上昇に伴う二本鎖DNAの変性は、塩濃度(イオン強度)の影響を受ける。二重らせん構造ではリン酸は表面に位置し、その負電荷によりお互いに反発している。イオン強度を上げると遮蔽効果により負電荷の反発が緩和される(静電的反発が弱まる)。遮断効果は塩基性の物質でも起こる。たとえばDNAにポリアミンを添加すると融解温度Tmは上昇する。図2¹⁾に最も不安定な二本鎖DNAであるpoly(dA-dT)の融解曲線を示す。このDNAのTmは48°Cであるが、1Mの塩化カリウム下では78°Cに上昇する。またポリアミンであるスペルミジンを添加しても上昇する。塩基性タンパク質であるヒストンを加えても同じようなTm上昇効果はみられるが、これはDNAがコンパクト化され

スクレオソーム様構造を形成したことによるものだ。ヒストンもポリアミンも塩基性であり、塩基配列に非特異的に結合する。同じDNAに結合するタンパク質でも転写因子は等電点が低いものが多い。この場合、静電的には負電荷どうしとなりDNAと反発する。ところが、転写因子は結合すべき塩基配列に出会うと、局所的に塩基と静電相互作用し結合する。転写因子の結合特異性はこうして生まれる。

Tmは昔から生物分類の指標とされ、多くの微生物で生育温度と染色体のGC含量について調べられた。生育温度の高い微生物ほどGC含量が高く、塩基間の水素結合の重要性が指摘されてきた。ところが、85°Cを超える温度で活発に生育する超好熱菌が分離されると、GC含量と生育温度にはまったく相関がないことがわかつてきた(図3)。たとえば*Methanothermus fervidus*は生育温度が83°CだがGC含量は38%しかない。ただし、この微生物の細胞内イオン強度は高く、カリウムイオンが985 mMもある²⁾。高濃度のカリウムイオンはリン酸の反発を遮蔽し、緩和することで染色体DNAの変性を防いでいる。つまりGC含量が低くても変性しないのである。ただし、その後の研究からDNAのトポロジーが融解温度に影響を与えていることも示された³⁾。このことについては最後に触れたい。

DNAを変性させるためのもう一つの要因はpHである。前述したようにDNAは中性付近のpHで塩基間に水素結合を形成している。塩基はpHによってイオン化的状態が異なる。ウリジン、グアノシン、チミジンはアルカリ側にpK(9.2)が存在する。このためpH 9.2を超

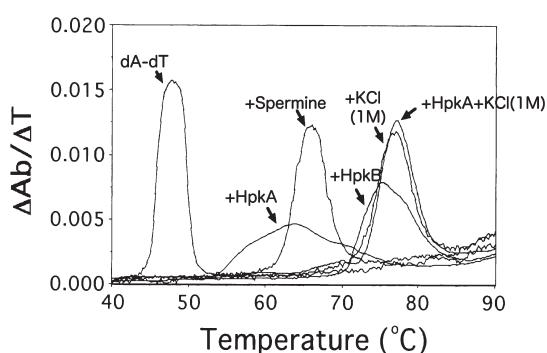


図2. DNAのTmに及ぼすポリアミン、塩化カリウム、ヒストンの影響。poly(dA-dT)(10 µg)に対してスペルミジン(10 µM)、塩化カリウム(1M)、二種類の超好熱菌ヒストンHpkA、HpkB(2.3 µM)を添加して融解温度に及ぼす影響を調べた。

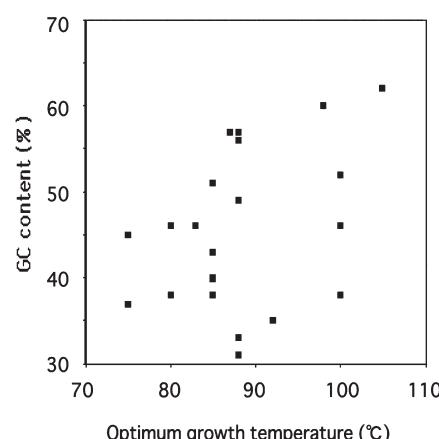


図3. 好熱菌の生育温度とGC含量の関係

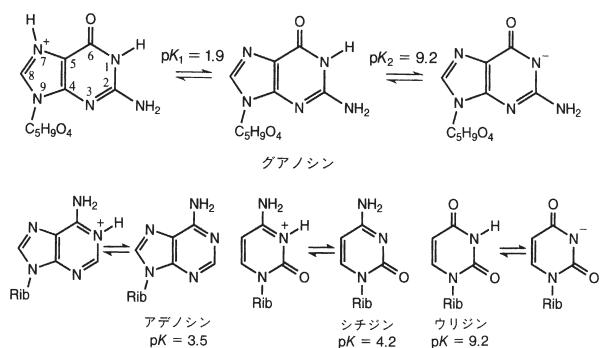


図4. 核酸構成塩基のイオン化. チミジンはウリジンと同様にイオン化する.

えると塩基の脱プロトン化がはじまる(図4). たとえばグアニンは1位で、チミンは3位で脱プロトン化し、GCおよびATの水素結合が壊れ変性する(一本鎖化する). ただこの変性は可逆的であるのでpHを下げる再び安定な二本鎖DNAが形成される. 急激なpH変化を与えると高分子のDNAはもとの構造に戻れなくなり、変性凝集してしまう. プラスミドのアルカリ抽出では酢酸ナトリウムを含む溶液3を、水酸化ナトリウムを含む溶液2に加えたときに急激なpH変化が生じる. このとき低分子のDNA(プラスミド)は二本鎖に戻ることができるが、高分子DNA(染色体)は変性凝集する. 遠心分離して凝集した沈殿物を取り除くことで、プラスミドの画分が得られていたわけである.

DNAはpH変化以外にも、塩基対の積み重ねによる安定化を乱しても変性される. 積層される塩基対は疎水性相互作用しているのだから、溶媒の極性を下げるような薬剤を添加すればよい. サザンハイブリダイゼーションではハイブリダイゼーションバッファーにホルムアミドが添加されているが、この薬剤はまさに積層部分を不安定化しTmを下げているのである.

RNAの変性

サザンハイブリダイゼーションのときのDNA変性は水酸化ナトリウムで行うが、ノザンハイブリダイゼーションのときのRNA変性はホルムアルデヒドを用いる. これはなぜだろうか? pHを高めることでRNAはバラバラになってしまうからである. リン酸のリンは周囲を電気陰性度の高い酸素原子に囲まれて水酸基の酸素原子から求核攻撃を受けやすく、この攻撃によりホスホジエステル結合が切れてしまう. RNAの構成糖はリボース

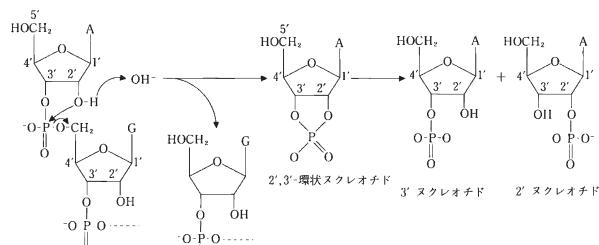


図5. 塩基触媒によるRNAの分解

であり、2位に水酸基が存在する. RNAは塩基触媒の存在下で速やかに加水分解され、2',3'-環状スクレオチドを形成したのち、2'-スクレオチドと3'-スクレオチドを生じる(図5)⁴⁾. リボヌクレアーゼによる反応も同様の機構が関与している. DNAはRNAよりも化学的に安定である. 生命進化の過程では最初の生命体は反応性に富むRNAを遺伝情報の担い手としていたが、やがて安定的に遺伝情報を残せるDNAが選ばれたと考えられている. RNAを変性するためにはスクレオチド鎖を切断することなく、構造をほぐす必要があるが、ホルムアミドやホルムアルデヒドが利用されるのはこのためである.

変性しにくいDNAとは?

DNAの安定性はGC含量とイオン強度に依存する. 実際にはこれら条件に加えてDNAのトポロジーがTmに影響を与えている. 直鎖状のDNAの場合、GC含量からDNAのTmを算出することができる. しかし環状DNAの場合、超らせん構造をとるので実際のTmは計算値よりもかなり高くなる. 好熱菌のプラスミドは、生育温度を上昇させるにつれて正の超らせんが増加する(リンク数が増える). 直鎖状(線状)の二本鎖DNAは3.4 nmで一巻きしているので、長さあたりの巻数は決まっている. このらせんに余分に巻数を加える(リンク数を増やす)と全体構造はコンパクトになってくる. 特にプラスミドのような閉環状分子の場合は、リンク数を増減するとより超らせん構造は変化する. リンキング数が増えた超らせん(正の超らせん)構造の環状DNAは非常に安定であり、107°Cでも融解しない. この正の超らせん構造を導入する酵素がリバースジャイレースである. リバースジャイレースはヘリカーゼとトポイソメラーゼのドメインを有し、進化的にもきわめて興味深い構造を持つ. 微生物はバクテリアとアーマー

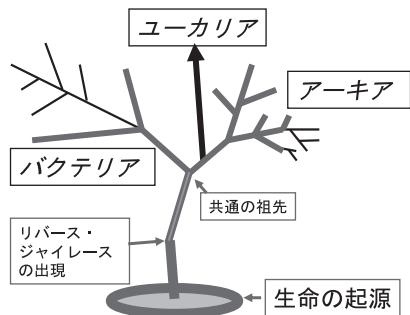


図6. 生物進化とリバースジャイレースの出現時期。図中の太い線は85°C以上で生育する超好熱菌を示す。リバースジャイレースは、バクテリア、アーキアを問わずすべての超好熱菌に共通して存在することから、共通祖先が分岐する前に誕生した可能性が高い。

キアという二つのドメインに分かれている。両者はいずれも原核生物であるが、系統的には異なる。生命誕生のストーリーでは高温で誕生した原始生命はユーカリア/アーキアの起源とバクテリアの起源に分岐したと考えられている。もし共通の祖先が存在するとすれば、現存する好熱性のアーキアと好熱性のバクテリアで共通の遺伝子が存在しても不思議ではない。ゲノムプロジェクトを行ってきた微生物で比較解析した結果、超好熱性のバクテリアと超好熱性のアーキアで共通している唯一の遺伝子は、リバースジャイレースであることが報告された(図6)⁵⁾。ここで意地悪な解釈をすれば、この酵素さえあれば高温で生きることができ、原始生命は好熱性ではなくても、リバースジャイレースを獲得して高温に適応

していくとも考えることができる。最近、遺伝子破壊技術で超好熱菌のリバースジャイレースの破壊が試みられた⁶⁾。リバースジャイレース遺伝子を破壊された超好熱菌は、生育上限温度が下がり、高温での生育が顕著に衰えた。ただ本破壊株は85°Cでも生育し、依然超好熱菌であった。リバースジャイレースが生命進化の過程で果たした役割は大きいと予想されるが、核酸の安定化には複数の要因があったことは間違いない。

おわりに

核酸の安定性にまつわる研究は非常に多くなされており、ここで触れた内容はほんの一端でしかない。わたしたちは日常的に遺伝子操作をしており、それぞれの原理を考えることはあまりない。ただ原理をあらためて見直すと遺伝子操作はきわめて合理的に設計されたものであり、先人達のアイデアに驚かされる。日常的に行っている実験も見直してみると意外と知らないことが多いのではないだろうか。

文 献

- 1) Higashibata, H. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 103 (2000).
- 2) Grayling, R. A. et al.: *Advances in Protein Chemistry*, **48**, 437 (1996).
- 3) 藤原伸介: 生物工学, **75**, 448 (1997).
- 4) 三浦ら: ライフサイエンス系の化学, p.83, 三共出版 (1996).
- 5) Forterre, P.: *Trends Genet.*, **18**, 236 (2002).
- 6) Atomi, H. et al.: *J. Bacteriol.*, **186**, 4829 (2004).