

航空宇宙技術研究所資料

TECHNICAL MEMORANDUM OF NATIONAL AEROSPACE LABORATORY

TM-397

合成ポリマーの構造転移におけるヒステリシス特性

吉原正一・舟木和夫

1979年11月

航空宇宙技術研究所
NATIONAL AEROSPACE LABORATORY

目 次

1. まえがき	1
2. 核酸系の構造転移と測定方法	2
2-1. 核酸の分子構造	2
2-2. poly(U), poly(A) 混合系の高次構造	2
2-3. 高次構造転移の測定方法	4
2-3-1. 紫外線吸収スペクトル	4
2-3-2. poly(U), poly(A) 混合系の紫外線吸収スペクトル	4
3. 実験方法	5
4. 実験結果および考察	5
4-1. ヒステリシス曲線の pH 変化速度依存性およびマイナーループ	5
4-2. ヒステリシス曲線の温度依存性	7
4-3. ヒステリシス曲線の熱安定性	8
5. まとめ	10

合成ポリマーの構造転移におけるヒステリシス特性*

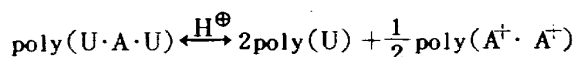
吉原正一** 舟木和夫***

§ 1. まえがき

今日まで固体物性の研究を基礎にしてトランジスタ等の能動素子や計算機の記憶素子等、数多くの電子材料の開発が行なわれ、その工学的応用はまだ計りしれないものがある。一方、ここ10数年来、生体の各種の機能と計算機等の電子機器の働きとを比較してさまざまな議論がなされており、新しい電子機器のソフトウェアとして生体におけるメカニズムからそのヒントを得る可能性を求める分野にも拡大しつつある。このような電子工学と生体工学の接点領域において生体の機能をなう構成要素の役割を明らかにすることは基本的課題のひとつとして重要である。

このような動向の中で近年、生体高分子の膜等の生体構成要素の分子構造が次第に明らかにされてきて、それらの生体における機能や役割が分子のレベルで究明されている。中でも核酸をはじめ各種の生体高分子の特異的な相互作用や構造転移は、生体の基本的な働きをなう鍵のひとつとして各方面から注目されている。とりわけ、化学合成技術の進歩に伴ない、比較的容易に合成ポリヌクレオチドが手にはいるようになって核酸系(DNA複製、RNA転写等)のモデル系として単純な構造を持つホモポリマーやコポリマーの構造解析や特異的相互作用等の研究が意欲的に行なわれている。このようなポリヌクレオチドの高次構造研究の中で、最近、リボゾーム RNA やある種のホモポリヌクレオチド混合系において、構造転移の際にヒステリシス現象を示す例が報告されている。¹⁾²⁾

E・Neumann ら¹⁾は2種類のホモポリヌクレオチド、poly(U)、poly(A)をモル濃度比2:1に混合した水溶液系である範囲の温度、イオン強度の領域において、pH周期変化に対して系の構造転移がヒステリシスを持つことを報告している。この系のヒステリシスは、おおまかに言うと次のような2種類のらせん構造間の転移の際に生じる。



pHが中性付近では、上式の左辺で示されるように2個のウラシルと1個のアデニンが特異的な対を形成して3重らせん構造が実現する。pHが十分酸性側に移行すると3重らせん構造は不安定になり、右辺に示されるようなプロトンが特異的に結合して形成されるpoly(A)同士の2重らせん構造が現われる。右辺のA⁺はアデニンの特異的な部位にプロトンが結合していることを示している。これら2種類のらせん構造間で転移を起こす場合、そのpH値がプロトン添加時とプロトン除去時とで異なり、系はヒステリシスを示す。

ヒステリシス現象は、磁性体や超伝導体等でもみられ今日まで物性的研究や工学的応用のために詳細にその性質が明らかにされているが、それぞれの現象、機構にもとづく個別の議論しかなく、ヒステリシスを広く説明する一般論の試みはまだ成功していない。本報告で取り上げたポリヌクレオチド系においてはヒステリシス現象があることが示された段階を越えてはならず、ヒステリシスが生じる原因としてのヒステリシス機構の説明や系の現象論的記述さえも十分になされていない。

ポリヌクレオチド混合系におけるヒステリシス現象は、核酸系を基礎においた生体の各種の機能の中で広義の記憶につながる可能性が考えられ、そのメカニズムを明らかにすることは有意義なことと思われる。さらに、この系のヒステリシス現象を追求するに当たって他のヒステリシス現象と比較、検討しヒステリシスの包括的説明を得るためにも、系のヒステリシスの詳細な把握やヒステリシス機構の微視的究明は今後はたすべき重要な課題になる。

本報告では、このような立場から今日まで行なわれてきたpoly(A)、poly(U)混合系のヒステリシス現象に関する実験的研究を受けつぎ、ヒステリシス機構のよりミクロなレベルでの究明の出発点として

- (1) ヒステリシス曲線のpH変化速度依存性
- (2) マイナーループの詳細
- (3) ヒステリシス曲線の温度依存性
- (4) ヒステリシス曲線の熱安定性

* 昭和54年9月5日受付

** 宇宙研究グループ

*** 九州大学・工学部・電子工学科

等に重点をおいてヒステリシス現象を実験的に追求したのでその結果を報告する。

§ 2. 核酸系の構造転移と測定方法

§ 2-1. 核酸の分子構造³⁾

核酸の分子構造はリン酸基、糖、塩基のくり返し配列によっており、糖のある特定の部分に水素イオン(H⁺)が付いたデオキシリボースと水素イオンの代わりに水酸基(OH⁻)が付いたりボースの2種類がある。このうちデオキシリボースを持ったものをデオキシリボ核酸(DNA)と呼び、一方リボースを持ったものはリボ核酸(RNA)と呼ばれている。塩基はDNAでは、アデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、チミン(T)の4種類で

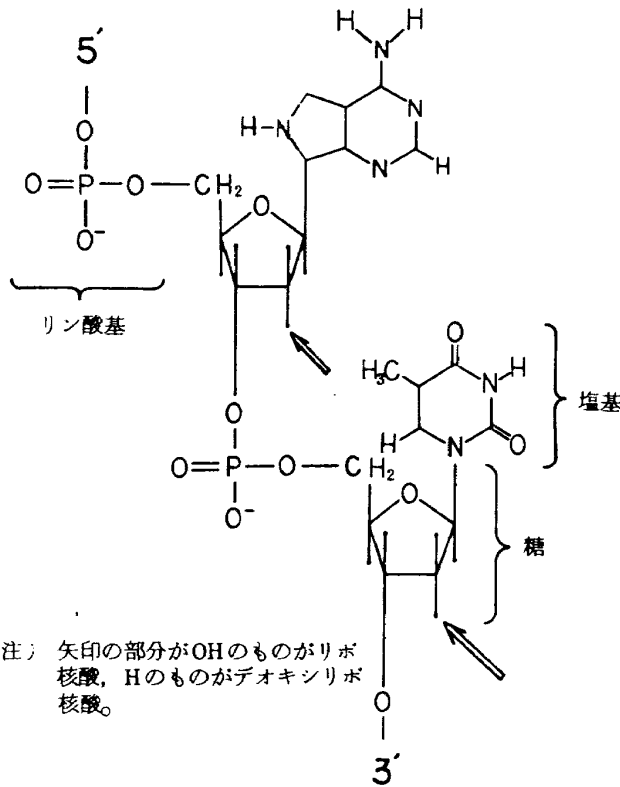


図1 核酸分子の基本構造

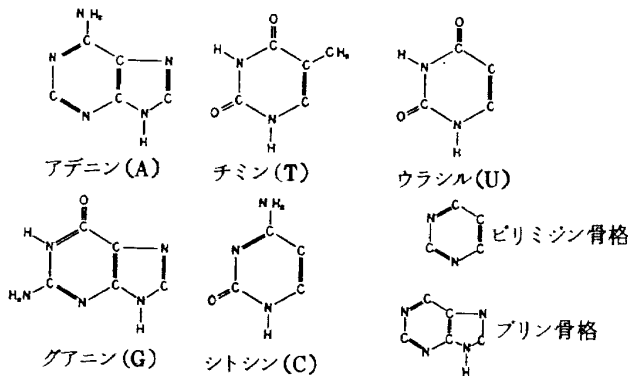


図2 各種塩基の分子構造

あり、RNAではチミン(T)の代わりにウラシル(U)が入った4種類である。またRNAではこの4種類の塩基の他に、他の塩基が微量含まれることもある。核酸分子の基本構造と各種塩基の構造を図1と図2に示す。

DNAとRNAの区別は図1に示したように化学的に非常によく似ており、3'-5'リン酸ジエステル結合でつながれた4種類の塩基からなる長い枝分れのない分子である。上に述べたようにDNAとRNAの区別は化学構造上の違いによるものである。しかし、このような違いにもかかわらず、RNAはDNA型の相補的2重らせん構造を塩基間の水素結合によって作る事ができる。ただしRNAは通常1本鎖である。DNAとRNAは、それぞれ4つの塩基によって、それぞれの一次元配列で定義されている。

近年、ホモポリマー(1種類の塩基が重合したもの)やコポリマー(相補的な2種の塩基が交互に重合したもの)等は比較的簡単に手にはいるようになった。たとえばアデニン塩基のみで合成されるリボ核酸は略してpoly rA(又は単にpoly(A)), ウラシル塩基のみのはpoly rU(poly(U))等と呼ばれる。

§ 2-2. poly(U), poly(A)混合系の高次構造

poly(A)は中性pHでは1本鎖の状態であり、酸性pHでは塩基間の水素結合が形成されpoly(A⁺·A⁺)の2重鎖となる。ここでA⁺はアデニンにプロトンが結合していることを示す。またpoly(U)は広い温度範囲で、中性pHから酸性pH領域において安定した1本鎖で存在することが知られている。

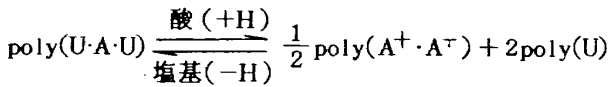
poly(A)が酸性pH領域で2重鎖のpoly(A⁺·A⁺)を作るのはアデニン塩基のN-1原子に水素原子が付く(この現象をプロトネーションと呼ぶ)からである。プロトネートされていない状態では主鎖のリン酸基が持っている負の電位のために主鎖間に静電気障壁(electrostatic barrier)が生じて2重鎖構造を組めないが、プロトネートされることによって静電気障壁が電的に中和されて、2重鎖構造のpoly(A⁺·A⁺)を作る。poly(U)は酸性pH領域では2重鎖構造にならない。

poly(U)とpoly(A)の混合系では外部変数の値によってpoly(U·A·U), poly(U·A), poly(A⁺·A⁺)の3重鎖, 2重鎖の高次構造が存在することが明らかにされている。ここで、たとえばpoly(U·A·U)は3重塩基対(U·A·U)の重合された3重らせん構造を意味する。それぞれの構造は図3に示す。外部変数としては、温度、イオン強度、pH、分子長(塩基数)などがある。系の状態がイオン強度に依存するのはpoly(A)の静電気障壁が溶液中の陽イオンの影響を受けるためであり、一般に陽

イオンの存在はポリマーの高次構造体を安定させると説明されている。

適当な温度，イオン強度，そして中性 pH 領域の溶液中で poly(U) と poly(A) をそのモル濃度比 2 : 1 で混合するとイオン強度 (NaCl 濃度) 0.02 M 以上では 3 重鎖の poly(U·A·U) を，また 0.02 M 以下では 2 重鎖の poly(U·A) を形成する。この 2 つの構造は水素結合とスタッキング (図 3 参照) によって安定している。

次に，中性 pH で上記のようなイオン強度において安定している 3 重鎖の poly(U·A·U) 溶液に酸と塩基による酸，塩基滴定を行う。これを反応式で表わすと



となる。これは poly(U·A·U) に酸を加えて行くと (酸滴定) 溶液中に水素イオン (H⁺) が多くなり，poly(U·A·U) はアデニン (A) 残基のプロトネーションにより 3 重鎖がほどけ始め 2 重鎖の poly(A⁺·A⁺) と自由な poly(U) を作り，滴定が進むにしたがい pH 3 程度で完全に 3 重鎖 poly(U·A·U) は 2 重鎖 poly(A⁺·A⁺) と自由な poly(U) へと構造転移する。塩基滴定は酸滴定とは逆の反応を行なわせる滴定である。

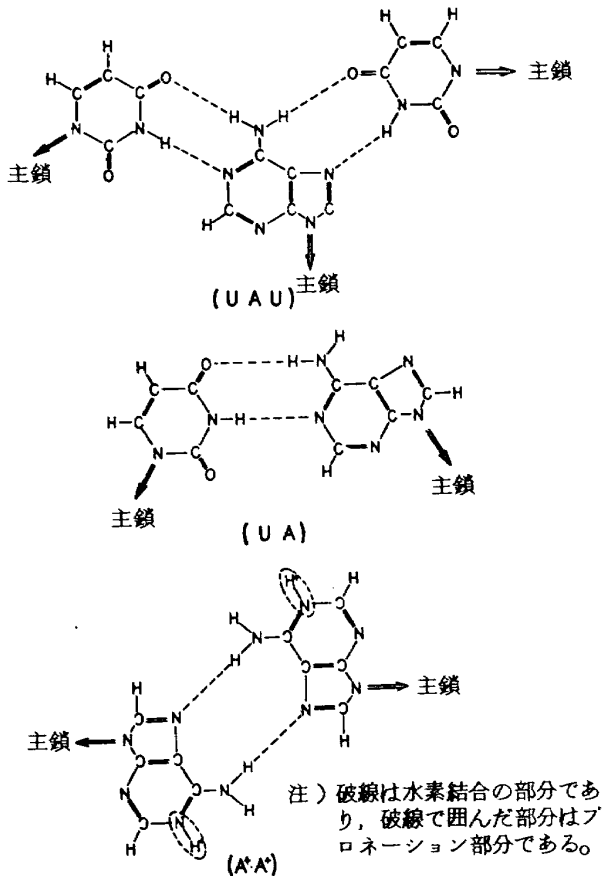


図 3 (U·A·U) · (U·A) · (A·A) の分子構造

さて，この酸，塩基滴定による 3 重鎖から 2 重鎖，2 重鎖から 3 重鎖への構造変化の反応において注目すべき点は，同一 pH でも pH 変化の方向によって異なった安定状態が存在することである。酸滴定のときのある pH における系の状態と，塩基滴定のときの同一 pH における系の状態は異なっている。具体的には系の状態を表わす量 (内部変数) として poly(A) が 2 重鎖 poly(A⁺·A⁺) を組んでいる割合を外部変数の pH に対してグラフに表わすとヒステリシス曲線を示す。

poly(A) のみの溶液においては 2 poly(U) + poly(A) 混合系の様にヒステリシス現象はなく，2 poly(U) + poly(A) 混合系のヒステリシス現象の原因として，poly(A⁺·A⁺) と poly(U·A·U) の異なった塩基対，さら

にらせん構造が共存していることが推定される。系の外部変数として，イオン強度，分子長，温度などを挙げたが，イオン強度依存性に関しては，E·Neumann ら²⁾ の実験があり，図 4 に示した相図が提出されている。次に分子長依存性についてはまだくわしい実験は行なわれていないが，分子長を低減した 2 poly(U) + poly(A) 混合系の滴定実験結果が出されている。⁴⁾ この実験による系の構造転移にヒステリシス現象を生じるには，その系の構成ポリマーの分子長にある下限が存在すると説明されている。温度依存性については，C·L·Stevens ら⁵⁾ によって中性 pH 付近におけるイオン強度と温度によって系の構造がどのように変化するかの実験が行なわれているが，ヒステリシス現象と関連した検討は現存のところみあたらない。

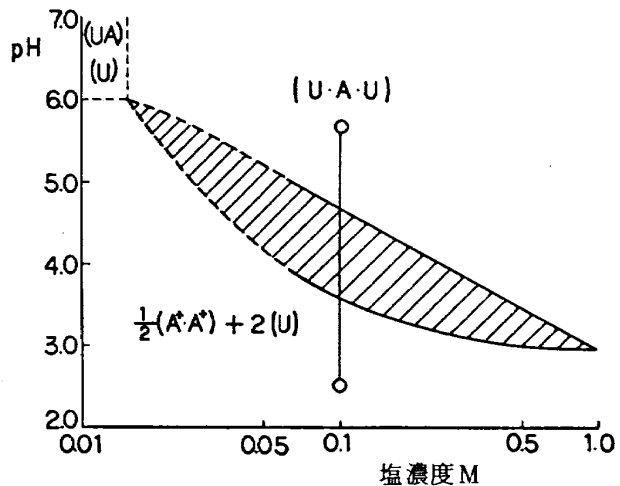


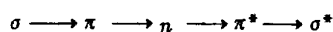
図 4 25°C における poly(U) · poly(A) 2 : 1 混合系の相図 (参考文献(2)から引用した) (斜線部を通過するとヒステリシス現象が生じる)

我々は、一定イオン強度における系の温度に対する依存性について中性 pH から酸性 pH 領域にわたって調べヒステリシス現象の原因追求の一つのデータとした。なお系の高次構造転移に伴う緩和過程があることが知られている。緩和過程には我々が興味を持つタイムスケール内で二つのものが観察される。一つは、滴定後数時間で終るものでこれは塩基に水素原子が付くプロトネーションに関係していると考えられ、pH の変化を伴っている。一方は、数日にわたるもので、これはポリマーの高次構造の変化に関係するものと思われる。

§ 2-3. 高次構造転移の測定方法

§ 2-3-1. 紫外線吸収スペクトル⁶⁾

物質が電磁波を吸収すると電磁波のエネルギーは電子のエネルギーに変わり蓄積される。電子のエネルギー準位は分子固有の値を持っており、物質はそれぞれ特有の吸収スペクトルを持つ。核酸のような多原子分子では、電子のエネルギー帯は多くの副準位があり紫外線の吸収スペクトルは幾多の吸収帯の包絡線として得られる、ベンゼン環やイミン環の電子エネルギー準位はエネルギーの低い方から



である。ここで π^* , n^* の(*)は電子が紫外線を吸収することによって電子のエネルギー準位が基のエネルギー準位からここまで遷移することを示す。また σ は単結合, π は二重結合, n は非共有結合を形成する電子である。核酸はピリミジン骨格, プリン骨格の誘導体である塩基を含んでおり、それらの塩基の紫外線吸収スペクトルでは波長 260 nm 付近では $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移がまた 290 nm では $n \rightarrow \pi^*$ 遷移が起こる。核酸の構造転移は塩基の π 電子遷移確率に直接に影響し、吸収スペクトルを観察することによって核酸の高次構造の変化を測定することができる。

光の吸光度は Lambert - Beer の法則により

$$OD_{\lambda} = \log_{10} I_0 / I = \epsilon \cdot C \cdot l$$

ただし

OD_{λ} : 波長 λ nm での吸光度の光学密度 (optical density)

I_0 : 入射光強度

I : 透過光強度

ϵ : 光の波長によって決まる物質の吸光係数

C : 光を吸収する物質の濃度

l : 光路長

の関係がある。この式を用いて試料の濃度決定やデータの解析を行う。

核酸等のポリマーの紫外線吸収スペクトルでは、波長 205 nm 付近にピークを持つ Y バンドと呼ばれる吸収帯と波長 260 nm 付近にピークを持つ X バンドと呼ばれる 2 つの吸収帯が存在する。Y バンドの吸収帯は溶液の影響を受けやすいので普通は X バンドを用いて測定する。

§ 2-3-2. poly(U), poly(A) 混合系の紫外線吸収スペクトル

3 重鎖 poly(U·A·U) から 2 重鎖 poly(A⁺·A⁺) と自由な poly(U) へと構造転移したとき、波長 260 nm 付近の吸収スペクトルは濃色効果 (hyperchromic effect) によって 50 % 程度増加する。反対に 2 重鎖から 3 重鎖へと構造転移したときは淡色効果 (hypochromic effect) によって吸収スペクトルは減少する。構造転移に伴う吸光度の変化の原因は主に水素結合と塩基間のスタッキングによると考えられている。すなわち $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移の阻害が水素結合と塩基間のスタッキングの影響で吸収スペクトル 260 nm において引き起こされるのであると説明されている。

poly(U), poly(A) 混合系の紫外線吸収スペクトルの例を図 5 に示すが、この図において注目すべきことは poly(U), poly(A) 混合系の紫外線吸収スペクトルの波長 225 nm と 285 nm 付近に系の構造変化によっても吸光度の光学密度 (OD) が変化しない点がある。この点は系の構造変化によって変化しないことが実験によって確認されており、この点をアイソベイスティックポイントと呼ぶ。紫外線吸収スペクトルがこの点を変化させるものであれば、それは構造変化以外の原因によるものであり、実験精度の指標とすることができる。我々は測定結果の整理に相対吸光度 (rel. OD _{λ}) を用いてデータの整理を行なった。

$$\text{rel. OD}_{\lambda} = (\text{測定点の OD}_{\lambda}) / (\text{基準点の OD}_{\lambda})$$

この式で基準点 OD _{λ} は、それぞれの試料の poly(U·A·U) が完全に形成されていると確認出来た pH 5.80

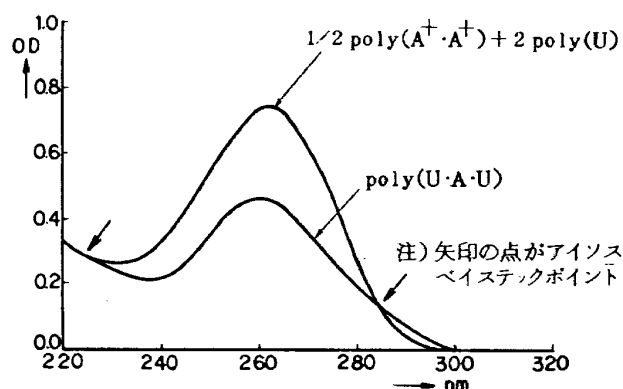


図 5 poly(U) · poly(A) 混合系の紫外線吸収スペクトル

における紫外線吸収スペクトル OD_{260} を用いた。またデータ解析に用いた波長 260 nm における各種構造体のモル吸光係数 ϵ は表 1 に示す通りである。

次に紫外線吸収スペクトルとポリマーの高次構造を直接的に対応させることはできないが、X線回折による高次構造の解明にもとずいて紫外線吸収スペクトルとポリマーの高次構造とを間接的に対応させることができるのである。

表 1 波長 260 nm における各種構造体のモル吸光係数 ϵ

構造体の種類	モル吸光係数 ϵ
poly(A)	10×10^{-3}
poly(U)	8.94×10^{-3}
poly(A ⁺ ·A ⁺)	7.5×10^{-3}
poly(U·A·U)	17.35×10^{-3}

§ 3. 実験方法

実験に用いた試料のポリマーは、ベイリンガー・マイハム社製の poly(A) と poly(U) であり、そのまま使用した。購入した試料は変質を極力さけるために常に低温 (4℃) で保存した。

試料溶液は塩濃度 0.1 M, 緩衝剤として 4.0×10^{-3} M カコジル酸ナトリウム ($(\text{CH}_3)_2 \text{AsO}_2 \text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 4.0×10^{-3} M 酢酸ナトリウム ($\text{CH}_3 \text{COO} \cdot \text{Na}$) をしてカビ発生防止として 0.4% (体積比) のクロロホルムの入った溶液を用意し, poly(A) と poly(U) を別々の容器に入れ室温で溶かした。緩衝剤としてカコジル酸ナトリウムと酢酸ナトリウムを用いたが, 前者は中性付近に, また後者は酸性領域でそれぞれ緩衝作用を持つ緩衝剤である。各々の試料溶液の濃度は紫外線吸収スペクトルによって調べ poly(U) と poly(A) をモル濃度比 2 : 1 で混合し, poly(2U+A) $2.5 \sim 3.0 \times 10^{-5}$ M 濃度の試料溶液を作製した。ここで安定な 3 重鎖構造の poly(U·A·U) になるまでには, 予備実験の結果によれば 4 ~ 6 日くらいの日数が必要であり, その期間試料溶液の保存は, 比較的低温 (4 ~ 10℃) で保存し続けた。

酸, 塩基滴定はあらかじめ用意しておいた poly(U·A·U) 試料溶液を恒温循環装置を用いて温度一定に保ち磁気攪拌器で攪拌しながら, 0.5 N HCl と 0.5 N NaOH の酸, 塩基を用いて pH を測定しながら滴定を行なった。試料の採取はあらかじめ決められた実験計画にしたがい, 必要な pH 値のところでは試験管に試料を 5 ~ 10 ml づつ採

取した。酸滴定終了後数時間から半日後に酸滴定と同様な操作をくり返して中性 pH 付近まで塩基滴定を行なった。

試験管に採取した試料は試料の蒸発と異物混入防止のためにラップをかぶせたシリコンゴム栓をし, 恒温バスの中で滴定のときと同じ温度で保存し続け, 測定も同じ温度で測定できるようにして各試料の紫外線吸収スペクトルを滴定後 1 日, 2 日, 4 日, 7 日などの時点で測定した。緩和が終わった試料は pH を測定しなおして pH が変化しているかどうかのチェックを行なった。

温度変化による構造変化を調べるために 20℃ で滴定し, 緩和の終了した試料を用いて温度を 20℃ ~ 85℃ まで変化させて, それぞれの温度における紫外線吸収スペクトルの変化を測定した。

また, ヒステリシスの pH 変化速度依存性を調べる方法として "Jump" 滴定を用いた。この実験方法はあらかじめ塩濃度 0.1 M, 4.0×10^{-3} M カコジル酸ナトリウム, 4.0×10^{-3} M 酢酸ナトリウムと 0.4% (体積比) クロロホルムの入った溶液を滴定して必要な pH のところでそれぞれをストックしておく。この実験で用いた poly(U·A·U) 試料溶液の濃度は 3.0×10^{-4} M で, その試料を pH 6.30 と pH 3.30 に滴定し予め用意しておいたストック溶液へ 1 : 9 の割合で正確に計量して投入した。この場合 pH 3.30 のストック溶液の中へ pH 6.30 の poly(U·A·U) 試料溶液を投入したとき pH は変化するが, 予め実験によって pH の変化を調べておき, また緩和が終わった時点で各試料の pH を測定しなおした。

実験に用いた装置は以下の通りである。pH 測定には PHM62 スタンダード pH メータ (ラジオメータ社), REC61 サーボグラフ X₁-T レコーダ (ラジオメータ社), 滴定には ABV12 オートビュレット (ラジオメータ社), 紫外線吸収スペクトル測定には MPS 5000 島津マルチパス自記分光光度計と 1 cm × 1 cm × 4 cm の石英セル, 恒温循環装置はハーケ社 FE 型を使用した。

§ 4. 実験結果および考察

§ 4-1. ヒステリシス曲線の pH 変化速度依存性およびマイナーループ

図 6 の横軸は pH であり, 縦軸は相対吸光度 (rel. OD_{260}) であり, poly(U·A·U) 試料濃度 3.0×10^{-5} M, 塩濃度 0.1 M, 温度 25℃ (± 0.5℃) における酸, 塩基滴定の主滴定曲線 (以下これをメジャー滴定曲線と呼ぶ) を実線で示した。また poly(U·A·U) 試料濃度 2.5×10^{-4} M, 塩濃度 0.1 M, 1.0×10^{-3} M カコジル酸ナトリウム, 4.0×10^{-3} M 酢酸ナトリウムの試料溶液とあら

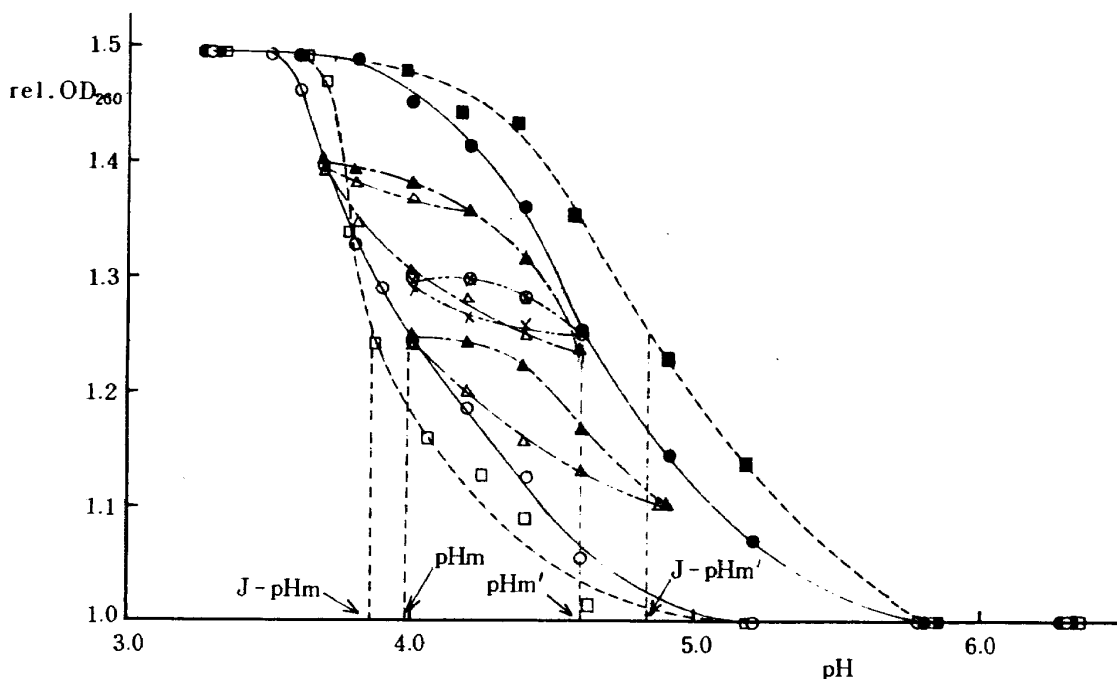


図6 メジャー滴定曲線、マイナー滴定曲線（実験温度 25℃，塩濃度 0.1 M）

ここで

- : A-ブランチ } メジャー滴定曲線, --□ : J-A-ブランチ } Jump 滴定曲線
- : B-ブランチ } メジャー滴定曲線, --■ : J-B-ブランチ } Jump 滴定曲線
- △ : AB-ブランチ } 実線で示したメジャー滴定曲線の A-ブランチの pH 3.8 と pH 4.0 からのもどして得たマイナー滴定曲線
- ▲ : ABA-ブランチ } 実線で示したメジャー滴定曲線の B-ブランチの pH 4.6 からのもどして得たマイナー滴定曲線
- × : BA-ブランチ } 実線で示したメジャー滴定曲線の B-ブランチの pH 4.6 からのもどして得たマイナー滴定曲線
- ⊗ : BAB-ブランチ } 実線で示したメジャー滴定曲線の B-ブランチの pH 4.6 からのもどして得たマイナー滴定曲線

かじめ用意しておいたストック溶液を用い、温度 25℃（±0.5℃）で“Jump”滴定（§3を参照）によって得たメジャー滴定曲線を破線で示した。さらに同図に実線で示したメジャー滴定曲線の途中から逆に pH を変化させた滴定曲線（以下これをマイナー滴定曲線と呼ぶ）は次の手順による滴定実験である。酸、塩基滴定の途中（pH 4.00, pH 3.70, pH 4.60）で試料溶液をそれぞれ数 10ml ずつ取り出し 3 角フラスコに保存し、次に各試料が緩和し終わった時点で保存しておいた試料を主塩基滴定曲線（A-ブランチと呼ぶ）においては pH 4.00 → pH 4.90, pH 3.70 → pH 4.60 まで塩基滴定を行ない、また主塩基滴定曲線（B-ブランチと呼ぶ）においては、pH 4.60 → pH 4.00 まで酸滴定を行なった（この滴定によって得た曲線をそれぞれ AB-ブランチ, BA-ブランチと呼ぶ）。各 AB, BA-ブランチが緩和し終わった時点で pH 4.20, pH 4.60, pH 4.90, pH 4.00 で保存しておいたそれぞれの試料を pH 4.20 → pH 3.70, pH 4.60 → pH 3.70, pH 4.90 → pH 4.00 まで酸滴定を、pH 4.00 → pH 4.60 まで塩基滴定を行なった（この滴定によって得た曲線を ABA-ブランチ, BAB-ブランチと呼ぶ）。このような手順でメジャー滴定曲線の途中から pH を逆にもどす滴定をしてマイナー滴定曲線を得た。各ブランチの緩和時間は表 2 に示す通りである。

滴定後、試料溶液を試験管に採取し、恒温バスの中で

表 2 各ブランチの緩和時間

ブランチ	時間	ブランチ	時間	ブランチ	時間
A	2日	AB	4日	ABA	1日
B	5日	BA	1日	BAB	3日
J-A	2日	X			
J-B	6日				

保温している時や、紫外線吸収スペクトル OD 測定のために試料をセルへ移し替える時などに、試料の中へ異物が混入してしまい、滴定後最初の測定時に見られた、系の構造によって変化しないアイソスペースックポイントが測定を重ねることにある程度不鮮明になるが、表 2 に示した期間においては信頼できるデータを得た。

この図 6 において、実線で示したメジャー滴定曲線 pH を徐々に変化させて行ったものであり、破線で示したメジャー滴定曲線はこの実験方法を“Jump”滴定と呼ぶように pH をいっきに变化させていったものである。実線と破線で示した 2 つのメジャー滴定曲線には pH 変化速度に明らかな違いがある。ヒステリシス曲線を性格づけるヒステリシス曲線の巾（A-ブランチと B-ブランチにおける rel. OD₂₆₀ の中間点の pH 値を pH_m, pH_{m'} としてその差をいう）に注目して、この 2 つのヒステリシス曲線のヒステリシス巾を比較すると、実線で示したメジャー滴定曲線では約 0.6、破線で示したメジャー滴

定曲線では約 1.0 とヒステリシス中に大きな違いがある。

poly(U), poly(A) 混合系において同じ実験温度、イオン強度で pH を変化させて行ったとき、その pH 変化の速さの違いによって、ヒステリシスに大きな違いがある。図 6 に示した測定結果は、十分に緩和が終了しており、時間が経つとともにヒステリシス曲線が変化してヒステリシスの巾が小さくなるということはない。

従来ヒステリシスの形状を決める要因(すなわちポリマーの状態を決める要因)として、温度、イオン強度、pH などの熱力学的な量と、pH の変化方向の違いなどが考えられていた。しかし、前に述べた通り、我々の実験では pH の変化速度の違いによって、明らかにヒステリシスに違いがある。ヒステリシスの性格を決めるヒステリシスの中で比較すると 40% 程度の違いがあり、このように pH の変化する速さによってヒステリシスに違いがあるということは、ポリマー同士のもつれ等によって poly(U), poly(A) 混合溶液に pH 変化速度に関する特異的な構造が存在している可能性を考えることができる。

ヒステリシス現象を見る場合有力な情報源になるもののひとつとしてヒステリシス曲線のマイナーループがある。poly(U), poly(A) 混合系におけるマイナール

プの測定例は少ない。図 6 に実験温度 20℃、塩濃度 0.1 M のメジャー滴定曲線で A-ブランチの pH 4.00, pH 3.70, B-ブランチの pH 4.60 からもどしたときのマイナーループを示したが明らかに各ブランチの途中からもどした場合、可逆的にはもどらず非可逆的にもどることを示している。E・Neumann の行なった実験²⁾では、B-ブランチの途中からもどした場合可逆的であるとしているが、我々の実験では非可逆的にもどるという結果になった。我々の実験においては、途中からもどす pH 値が各ブランチにおける系の構造転移がいちじるしいと思われるところでしかもどしていないが、その他の部分で可逆部が存在しているかも知れず、A-ブランチと B-ブランチにおける可逆部、非可逆部の存在を確認する実験が望まれる。

§ 4-2. ヒステリシス曲線の温度依存性

試料として poly(U·A·U) 濃度 3.0×10^{-5} M、塩濃度 0.1 M の試料溶液を用いて、温度 20℃, 30℃, 40℃, 52℃ で滴定、保存、測定して得たメジャー滴定曲線を図 7 に示す。各温度における各ブランチの緩和時間は表 3 に示す通りである。

データの整理は 3 重鎖 poly(U·A·U) のみが存在して

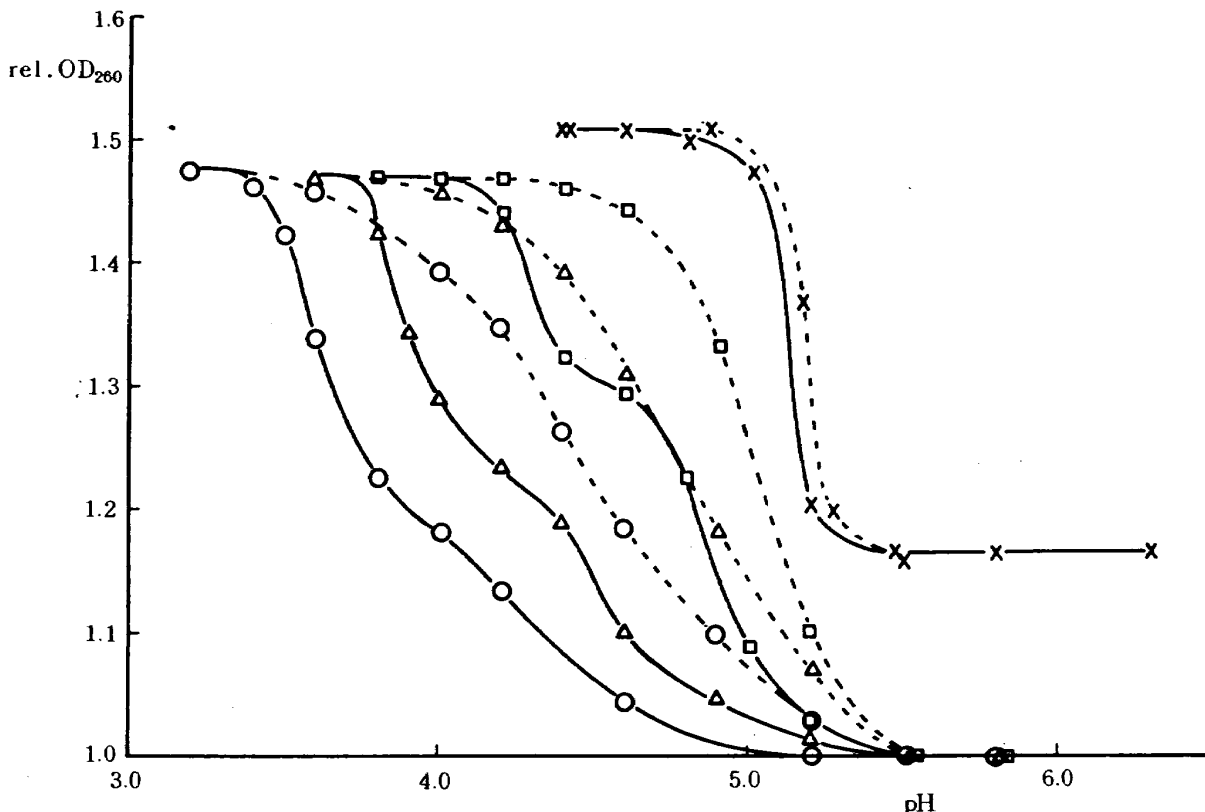


図 7 温度の違いによるメジャー滴定曲線(塩濃度 0.1 M)
 [ここで○印は 20℃, △印は 30℃, □印は 40℃,
 ×印は 52℃での実験値であり、又実線はA-
 ブランチ、破線はB-ブランチを表わす。]

表 3 20℃, 30℃, 40℃, 52℃における A, B 両ブランチの緩和時間

ブランチ \ 温度	20℃	30℃	40℃	52℃
A	4日	2日	1日	1日
B	6日	4日	5日	2日

いると確認された温度 20℃, pH 5.80 の紫外線吸収スペクトル OD₂₆₀ を基準点として行なった。

poly(U·A·U) 試料溶液をあらかじめ 20℃, 30℃, 40℃, 52℃ に保って実験を行なった場合 pH によってポリマーの構造が 3 重鎖 → 2 重鎖, 2 重鎖 → 3 重鎖へと転移する pH 値が温度によって明らかに異なっており, 実験温度を高くするにしたがい転移 pH 領域が中性側へ移動している。さらに 20℃, 30℃, 40℃ の A-ブランチにはショルダー部が存在し, 特に 40℃ の A-ブランチにおいては顕著にその存在を見ることができる。しかし, 52℃ の A-ブランチにおいては, それを見ることができないばかりかはっきりとしたヒステリシスを見ることができない。さらに各実験温度の B-ブランチには A-ブランチのように構造転移途中にショルダー部の存在を見ることができない。このようなショルダー部の存在は E·Neumann らの実験¹⁾²⁾ においては示されておらず又これについての議論もなされていない。ショルダー部に関する我々の実験データは十分でなく定量的に明らかにすることはできないが, 図から推定できるように可成り大きな変化があり, 定性的には, ショルダー部が存在するものと思われる。また 52℃ のメジャー滴定曲線は 20℃, 30℃, 40℃ のメジャー滴定曲線と異なり, pH 5.50 付近までの中性側において rel. OD₂₆₀ の値が 1.18 と大きくなっている。このことは 52℃ という温度では中性側においても完全な 3 重鎖 poly(U·A·U) の構造で存在していることができず, 3 重鎖 poly(U·A·U) のうち約 40% がすでにコイル状態に転移していることを示唆している。

表 4 20℃, 30℃, 40℃, 52℃ のヒステリシス曲線の pH_m, pH_mⁱ, ΔpH

	pH _m	pH _m ⁱ	ΔpH
20℃	3.77	4.46	0.69
30℃	4.17	4.78	0.61
40℃	4.78	5.02	0.24
52℃	5.15	5.20	0.05

表 4 に実験温度 20℃, 30℃, 40℃, 52℃ におけるヒステリシス曲線を性格づける pH_m, pH_mⁱ, ΔpH を示す。

実験温度 20℃, 30℃, 40℃, 52℃ によるヒステリシス曲線の特徴として, 温度が高くなるにしたがい, 表 4 に示した通りヒステリシスの巾 ΔpH が小さくなり, 転移 pH 値が中性側へと移り, 転移の傾きが急峻になっている。また 50℃ を越すとヒステリシスがほぼ消失している。この原因として, 中性 pH 領域 (pH 5.5 以上) において 20℃, 30℃, 40℃ の系と異なりすでに 3 重鎖 poly(U·A·U) のうち 30~40% 程度がコイル状態へと変化し, このコイル部の存在がポリマー同士のもつれ等の解消につながりヒステリシスがほぼ消失したのではないかと思われる。

各実験温度でのメジャー滴定曲線の A-ブランチにショルダー部が生じており, 実験温度を 20℃ → 30℃ → 40℃ と高くするにしたがってショルダー部が大きくなっている。今後, このショルダー部が系のヒステリシスとどのような関係があるかを水素結合エネルギー, ステッキングエネルギー等の温度依存性, ヒステリシスの原因となるメカニズムとその温度による変化等, 理論的, 実験的検討が必要である。

§ 4-3. ヒステリシス曲線の熱安定性

図 7 に示した実験温度 20℃ におけるメジャー滴定曲線の A-ブランチ, B-ブランチの緩和が終了したと思われる時点でそれぞれのブランチにおいてサンプリングしてあった試料を用い, 試料温度を 20℃ から 85℃ 付近まで連続的に変化させて紫外線吸収スペクトル OD を測定し, 測定結果を図 8 に示す。この図で紫外線吸収スペクトル OD₂₆₀ が約 0.4~0.6 付近までは 3 重鎖 poly(U·A·U) と 2 重鎖 poly(A⁺·A⁺) がある割合で存在していると考えられる領域であり, 0.6 付近は 2 重鎖 poly(A⁺·A⁺) とコイル状態の poly(U) が存在していると考えられる領域であり, それ以上の領域ではポリマーの構造はコイル状態の poly(A) と poly(U) が存在していると考えられる。また pH 3.40 における A, B-ブランチの試料の熱安定曲線は, 他の測定結果とは異なっている。両ブランチとも温度 20℃, pH 3.40 では 2 重鎖 poly(A⁺·A⁺) とコイル状態の poly(U) という系で存在しているが, 温度を連続的に上げて行くと 50℃ 付近から紫外線吸収スペクトル OD₂₆₀ が低下しているのが見られるが, これは 2 重鎖 poly(A⁺·A⁺) → 3 重鎖 poly(U·A·U) へと変化したとは考えられず, 2 重鎖 poly(A⁺·A⁺) がある温度以上になると 2 重鎖の一部分がはずれ, この自由なコイル状の部分が他の鎖の同様な部分 (塩基) と改めて

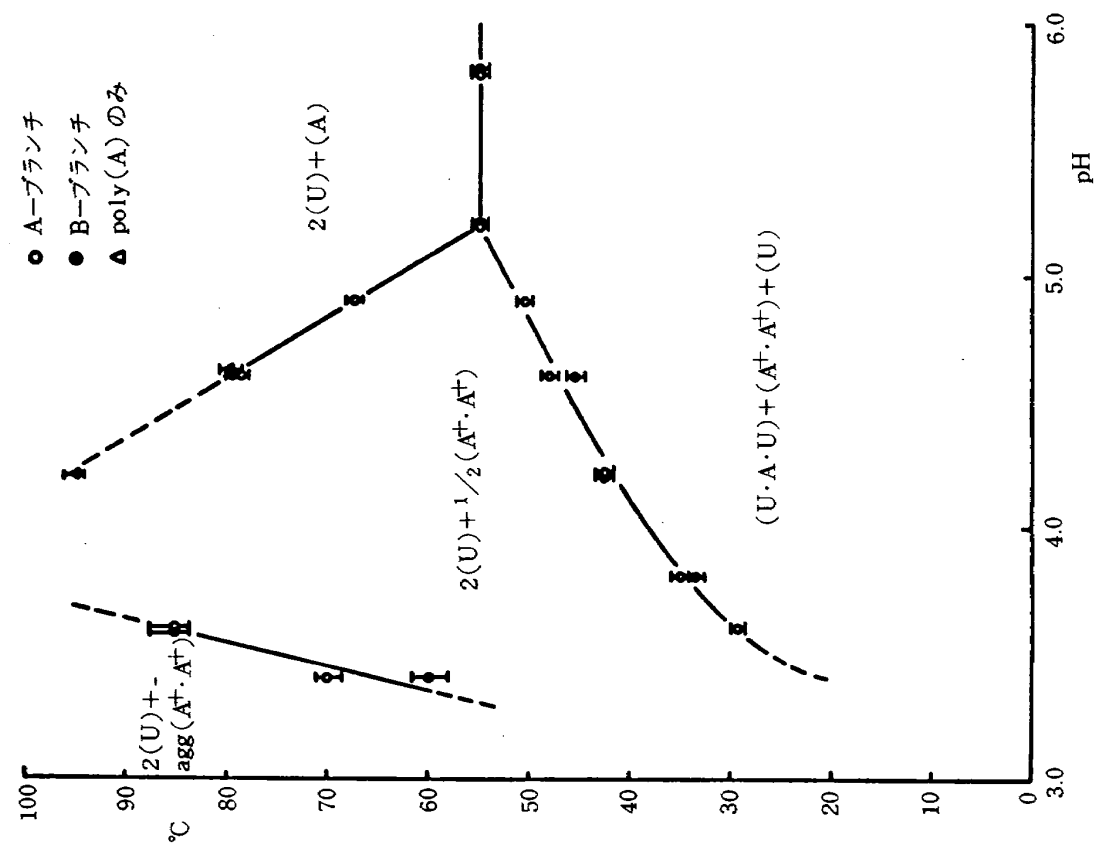


図9 20°Cメジャー滴定曲線の温度変化による構造の変化(塩濃度0.1M)

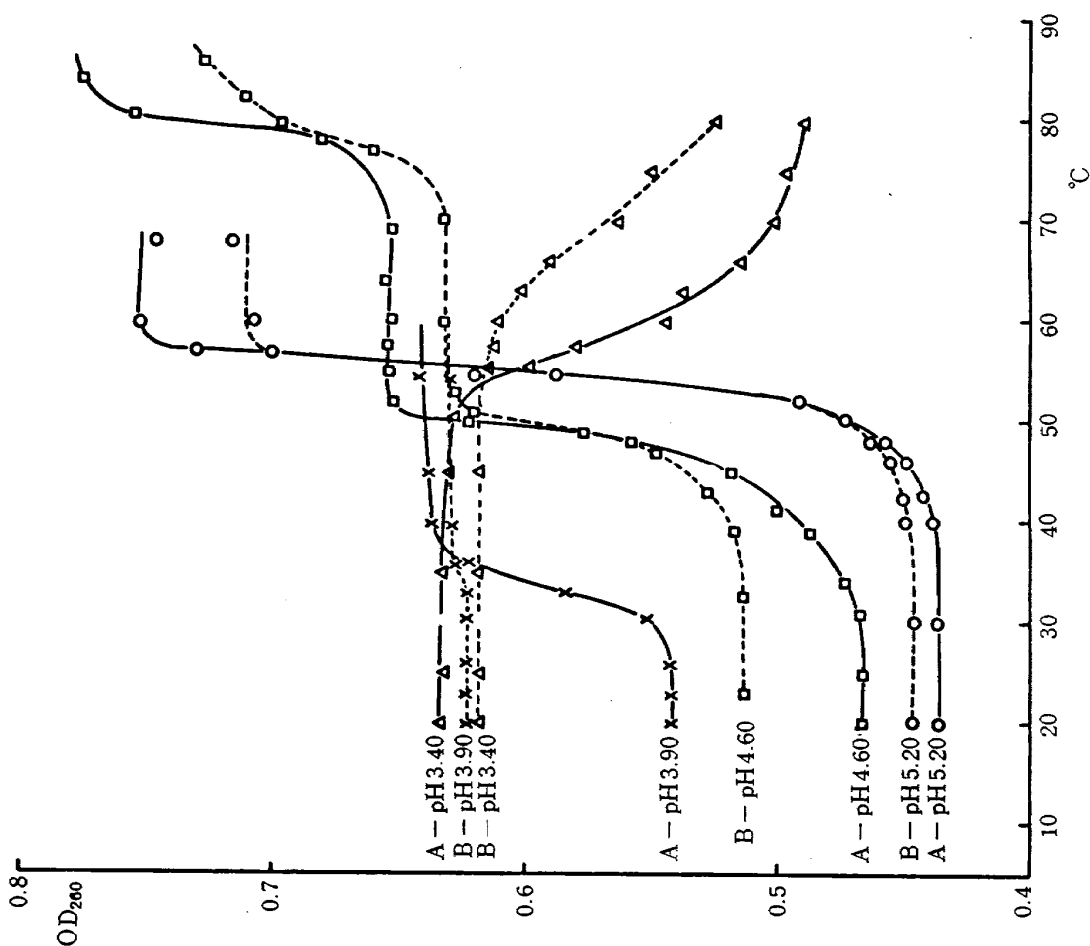


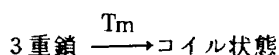
図8 20°Cにおけるメジャー滴定のサンプリング試料の温度変化による紫外線吸収スペクトルOD₂₉₀の変化。(塩濃度0.1M)

2重鎖を組み(ミセル化と呼ぶ)ポリマー同士がより集まりアグリゲーションを起したものと思われる。この現象はV・Vetterl⁷⁾らが行なったpoly(A)だけの高塩濃度試料を用いて行なった実験によってもpoly(A⁺・A⁺)がアグリゲーションを起し、紫外線吸光スペクトルODが減少することが確認されている。このアグリゲーションが起きるときにはpoly(U)はまったくこの現象には関係していない様に思われる。しかしpH 3.40, A・B-両ブランチ試料の熱安定曲線の50℃以上における紫外線吸光スペクトルODの減少は、以上述べたアグリゲーションだけでは説明されないように思える。

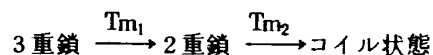
図8の各pH値におけるA-ブランチ, B-ブランチの試料による熱安定曲線の3重鎖→1重鎖, 3重鎖と2重鎖混合系→2重鎖→1重鎖への構造転移温度に注目して, 横軸にpHを縦軸に転移温度を取って, それぞれのpH値と温度によるポリマーの構造を相図風にして図9に示す。ここで(U・A・U) + (A⁺・A⁺) + (U)とした領域は3重鎖poly(U・A・U), 2重鎖poly(A⁺・A⁺)とコイル状態のpoly(U)がある割合で存在している領域である。同様に他の領域も図に示したポリマーの構造体で存在している。

次に同一pH値でもA-ブランチ, B-ブランチでは3重鎖poly(U・A・U)と2重鎖poly(A⁺・A⁺)の異なった構造体がある違った割合でそれぞれ安定に存在しているが, ある温度において3重鎖poly(U・A・U)が2重鎖poly(A⁺・A⁺)へ転移する転移温度は両ブランチにおいて違いが見られない。poly(A)のみの結果も併せて示したが, この系において2重鎖poly(A⁺・A⁺)が1重鎖へ転移する転移温度とpoly(U), poly(A) 2:1混合系の2重鎖から1重鎖への転移温度とは良い一致を示している。

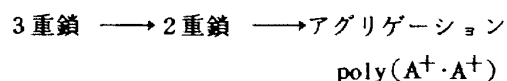
実験温度20℃で緩和が終了したpH 5.80~pH 3.30までのA-ブランチ, B-ブランチの各サンプリング試料を用いて連続的に温度を変化させて行った結果を図8に, それを整理した形で図9に示した。図9でpH 5.20から中性側においては, 両ブランチとも3重鎖poly(U・A・U)→2重鎖poly(A⁺・A⁺)という転移は生じないで直接3重鎖からコイル状態へと転移している。



このpH領域においてはT_mは, pH依存性がなくT_m≒55℃である。pH 5.20~pH 4.00というpH領域では, 温度を上げることによって3重鎖poly(U・A・U)が全て2重鎖poly(A⁺・A⁺)と自由なpoly(U)へと構造転移し, さらに温度上昇させると2重鎖poly(A⁺・A⁺)はコイル状態へと構造転移する。



構造転移する転移温度T_{m1}及びT_{m2}は, pH依存性がありpHが酸性側へ行くにしたがい温度によって3重鎖poly(U・A・U)はより不安定になり, 2重鎖poly(A⁺・A⁺)は安定になる。pH 4.00以下のpH領域においては, 温度を上げることによって3重鎖poly(U・A・U)が全て2重鎖poly(A⁺・A⁺)と自由なpoly(U)へ構造転移し, さらに温度が高くなるとこのpH領域においては, コイル状態の構造へ変化せず, 2重鎖poly(A⁺・A⁺)がアグリゲーションを起す。



この場合, 3重鎖poly(U・A・U)はさらに不安定となり, pH 3.40以下では存在していない。同一pH値において, A・B-両ブランチでは系の状態が異なっているにもかかわらず, それぞれの構造へ変化する転移温度T_{m1}, T_{m2}に違いがない。A・B-両ブランチで転移温度T_{m1}に違いがないということは, 3重鎖poly(U・A・U)から2重鎖poly(A⁺・A⁺)へと温度転移するとき, 各塩基間の水素結合がはずれやすくなり安定な構造へ変化していく。この場合ポリマー同士相互のもつれなどによる距離的な作用はないように思われ, 温度転移においては, ポリマー同士の長距離相互作用は関与していないことが推察される。

§ 5. まとめ

本報告は昭和53年6月1日から11月30日までの6ヶ月間九州大学・工学部・電子工学科・山藤研究室においてpoly(U), poly(A)混合系におけるヒステリシス現象を実験的に追求したものである。

ヒステリシス現象は, 磁性体や超電導体の磁化ヒステリシス, 気体の吸着-離脱, 強誘電体の分極の際のヒステリシス等各分野で解析され, 工学的応用も進んでいる。しかし, ヒステリシスの理論的研究は, 2安定状態間の相転移としての記述(例えば, 回転磁化モデル)や, 平衡状態への移行を阻害する機構を導入するピン理論(例えば, 磁性体の磁壁移動モデル)が提出されているが, 現象論の段階でしかなく, ヒステリシス現象の一般論, さらにミクロな理論への進展等, 今後の研究に期待される所が多い。

近年, リボゾームRNAやある種のホモポリヌクレオチド混合系において, 構造転移の際にヒステリシス現象を示すことが明らかにされている。¹⁾²⁾ このことが, どのような形で生体の有機的機能に関与するかを追求するか

は、興味もてるばかりでなく、他のヒステリシス現象と共にそのメカニズム等を検討することは、その工学的応用を含めてヒステリシス現象の把握に大きな寄与をするものと考えられる。我々は核酸のモデル系として合成ポリヌクレオチドを用いたが、特に poly(U), poly(A) 混合系のヒステリシス曲線が系の外部変数 (pH, イオン強度, 温度等) や pH の変化速度等によってどのように変化するかを実験的に追求し、多少の検討を加えた。

椿原, 船木の実験⁴⁾¹⁰⁾においては, pH や温度の設定方法に問題があり実験データに再現性があまりなく, 実験精度及びデータの信頼性等が poly(U), poly(A) 混合系のヒステリシス現象を定量的に説明する上で問題とされていたが, 今回の実験では, 上記の不備をおぎないデータに信頼性, 再現性のある実験方法を確立できたのが大きな成果である。

今後, poly(U), poly(A) 混合系のヒステリシスの原因追求のひとつの方向としては

- 1) ポリマー分子長による, メジャー・マイナー曲線の変化。(イオン強度, 温度との関連)
- 2) メジャー・マイナー各滴定曲線における可逆部, 非可逆部の詳細な実験および解析。

等が上げられ, 有効な情報を与えてくれるであろう。

最後に, 研修期間を通じ御多忙中にもかかわらず御指導いただいた, 九州大学・工学部・電子工学科・山藤教授, 並びに同教室の都甲, 浦浜の両氏, また測定に際し多くの御協力をいただいた農学部・食料化学教室の尊田助手, さらに私の国内研修に際し多くの御尽力をいただいた方々に対して深く感謝の意を表しておきたい。

参考文献

- 1) G. Weisbuh & E. Neumann; Molecular Field Theory of Hysteresis in Helix-Coil Transition of Polynucleotides, *Biopolymers*, Vol. 12, pp. 1479 ~ 1491 (1973)
- 2) M. Spodhiem & E. Neumann; Ionic Strength Dependence of The Hysteresis in the Polyriboadenylate - Polyribouridylate System, *Biophysical Chemistry* 3, pp. 109 ~ 124 (1975)
- 3) J. D. Watson 著 (三浦謹一郎ほか訳); 遺伝子の分子生分学 (上・下) 第2版, 東京化学同人, (1973)
- 4) Y. Tubakihara: 昭和52年度卒業論文, 九州大学・工学部・電子工学科

- 5) C. I. Stevens & G. Felsenfeld; The Conversion of Two-Stranded Poly (A + U) to Three-Strand Poly (A + 2U) and Poly (A) by Heat, *Biopolymers*, Vol. 2, pp. 293 ~ 314 (1964)
- 6) C. N. R. R. (中川正澄訳); 紫外・可視スペクトル第2版, 東京化学同人, (1970)
- 7) V. Vetterl & W. Guschlbauer; Protonated Polynucleotide Structures XI. Polyadenylic Acid at High Ionic Strength, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 148, pp. 130 ~ 140 (1970)
- 8) R. D. Blake & J. R. Fresco; Polynucleotides VII. Spectrophotometric Study of the Kinetics of Formation of the Two-Stranded Helical Complex Resulting from the Interaction of Polyriboadenylate and Polyribouridylate, *J. Mol. Biol.* Vol. 19, pp. 145 ~ 160 (1966)
- 9) M. Spodheim & E. Neumann; Kinetic Analysis of the Annealing Period in the Formation of the Poly (A), 2 Poly (U) Triple Helix, *Biopolymers*, Vol. 16, pp. 289 ~ 298 (1977)
- 10) K. Funaki et al; 合成ポリヌクレオチド系の履歴理論, 九州大学工学部集報, 第50巻, pp. 45 - 51 (1977)
- 11) 太田恵造著; 磁気工学の基礎 I. II., 共立全書, (1976)

航空宇宙技術研究所資料 397号

昭和54年11月発行

発行所 航空宇宙技術研究所
東京都調布市深大寺町1880
電話武蔵野三鷹(0422)47-5911(大代表)〒182
印刷所 株式会社 東京プレス
東京都板橋区桜川2-27-12
