

理学博士坪井正道君の「核酸の分子構造とその多形性に関する研究」に対する授賞審査要旨

一般に非生物の世界における物質の化学的性質は、その分子の構造を基礎として考究されているが、生物の世界においても同じ関係が成立するものと期待するならば、生体物質のうちで最も基本的な核酸の持つ重要な機能も、その立体構造に基づいて説明されるべきものと期待し得るであろう。事実、生物物理学および分子生物学の近来の目覚ましい進歩は、ワトソン・クリックの二重螺旋構造の発見にその端を発したが、それは一次構造を手掛りとしたものであって、この思想のより深き検討を行うためには、核酸の高次構造、即ち具体的な立体構造の知識が必要である。

然るに、現在知られている核酸を初めとする生体高分子の構造は、その殆ど全部がX線回折による結晶状態のものである。これに対して、生体反応が実際に行われている環境は水溶液又はそれに類似したものである。しかも一般に水溶液における分子構造は、結晶状態のものに比べて、著しく複雑となることが知られている。従って水溶液における核酸分子の構造を明らかにすることは、核酸の生物学的機能を理解する上にも是非とも達成しなければならない重要な課題であるといえよう。

坪井正道君は夙にこの点に着目して、水溶液中の核酸の分子構造と、その環境による変形に焦点を置いた研究を遂行したのである。其処に一貫して流れる特徴は、(1)核酸、蛋白質のような大きく且つ複雑な分子の構造を、小さな分

子における構造研究の延長として取扱ひ、その結論を後者に対して得られているものと同程度の精度に近づけることを目標として、種々の工夫をこらしていること、(2)結晶中の分子構造よりは、水溶液中の分子構造を決定することに重点を置いていること、さらに、(3)静的な分子構造のみでなく、時々刻々の変形にも注目していること、などである。

重要な具体例として、此処には、ラマン・スペクトルによる核酸の分子構造の研究について概括する。ラマン分光法の利点の一つは、試料が結晶であっても水溶液であっても構造に関する情報が得られる点にある。核酸の与える数十本のラマン線には、その分子の局所構造を良く反映しているものが多い。その一つ一つがどんな構造のどんな振動によるか、即ち「スペクトル構造の相関」を求めることを目標として、まず最初に核酸を構成している個々の成分分子における相関を決定し、その結果を参考として、順次大きな部分構造における相関を求め、終局的に、目的の核酸における「スペクトル構造の相関」を決定したものである。その途中においては、 ^{15}N 、 ^{18}O 同位体を含む分子のスペクトルを参考とすること、非経験的分子軌道法による分子内力場を推定することなど多くの補助手段を利用して、綿密な検討を行っている。しかも、かくして得た「相関」が合理的なものであることを、構造既知(単結晶X線解析による)のヌクレオチドの結晶約三〇種について確認し、最後に、この「相関」を適用することによって、二七種の核酸(塩基配列を制御した)について、水溶液において存在する個々の局所構造を決定し、同時に水溶液の塩濃度をかえてその変化をも追跡したものである。

結果は、まず第一に、DNA二重螺旋の構造は、水溶液と結晶で異なること、そして、その異なり方は、塩基配列

と塩濃度の両者に依存することが明らかとなった。これは、核酸の生物機能の差が、塩濃度で代表される種々の外部条件ごとに、結晶とは異なる多形性、しかも塩基配列によって異なる多形性、によって具現されるものとなるもので、核酸の生物学的機能を理解する上に極めて重要な結論である。

さらに、核酸の水溶液中における動的構造の変化を、同位体置換反応の速度を測定することによって研究している。核酸の通常の水溶液（軽水）を重水と急激に混合し、核酸のH原子がD原子によって置換される過程を分光学的に追求した。この「ストップドフロー紫外吸収法」は坪井君が先鞭をつけた測定法であるが、この結果によりDNA分子は、常に完全な二重螺旋構造を保持するのではなく、塩基対は切れたり繋がったりしているものであることが明らかとなったのである。

坪井君の報文は、大部分が専門分野の国際誌に発表されているが、同時に、一九六四年以来一六篇の総合報告を種々の総合雑誌に発表している。これは坪井君の研究が当初以来各時代ごとに、先導的役割を担ってきた証左であるといえよう。事実、この分野でこれだけの徹底した組織的研究を遂行した研究は外には見当たらないのである。その研究結果は、多くの研究者によって利用され、成書にもしばしば詳しく引用されている。

上述のごとく坪井君は、水溶液中にある核酸を回転異性体が多数個繋がって出来た鎖状分子であるとして取扱っていることを示し、其処には生物としての特別の因子を考慮することの不必要であることを示したのである。そもそも、回転異性体の着想およびその後の研究成果は、我が国が世界に誇るに足るべきものの一つであるが、生命現象の最も基礎であるべき核酸の分子構造が、従来の回転異性体の考え方の射程以内であることを確かめた坪井君の業績は、さ

参考文献目録

1. M. Tsuboi: Vibrational spectra of phosphite and hypophosphite anions, and the characteristic frequencies of PO_3^- and PO_2^- groups. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1351-1354 (1957).
2. G.B.B.M. Sutherland and M. Tsuboi: The infrared spectrum and molecular configuration of sodium deoxyribonucleate. *Proc. Roy. Soc. (London)*, **239**, 446-463 (1957).
3. Y. Kyogoku, M. Tsuboi, T. Shimanouchi and I. Watanabe: Nucleic acids in deuterium oxide solution. *Nature*, **189**, 120 (1961).
4. M. Tsuboi, Y. Kyogoku, and T. Shimanouchi: Infrared absorption spectra of protonated and deprotonated nucleosides. *Biochim. Biophys. Acta*, **55**, 1-12 (1962).
5. M. Tsuboi: Infrared spectra and secondary structure of deoxyribonucleic acid. *Progress of Theoretical Physics*, Supplement No. 17, 99-107 (1961).
6. M. Tsuboi: Infrared spectra of a few synthetic polyribonucleotides. *J. Polymer Sci.*, Part C, No. 7, 125-137 (1964).
7. M. Tsuboi: On the melting temperature of nucleic acid in solution. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **37**, 1514-1522 (1964).
8. M. Tsuboi, K. Matsuo, and P.O.P. Ts'o: Interaction of poly-L-lysine and nucleic acids. *J. Mol. Biol.*, **15**, 256-267 (1966).
9. M. Tsuboi: Use of isotope frequency shift due to small mass change in determining intra-molecular

- force field. *J. Mol. Spectrosc.*, **19**, 4-6 (1966).
10. T. Sato, Y. Kyogoku, S. Higuchi, Y. Mitsui, Y. Ikata, M. Tsuboi, and K. Miura: A preliminary investigation on the molecular structure of rice dwarf virus ribonucleic acid. *J. Mol. Biol.*, **16**, 180-190 (1966).
 11. Y. Kyogoku, S. Higuchi, and M. Tsuboi: Infrared absorption spectra of the single crystals of 1-methylthymine, 9-methyladenine and their 1:1 complex. *Spectrochim. Acta*, **23A**, 969-983 (1967).
 12. M. Tsuboi, K. Matsuo, and M. Nakanishi: Helix-with-loops structure of polynucleotides. II. Poly (I+CU). *Biopolymers*, **6**, 123-134 (1968).
 13. M. Tsuboi, K. Shuto, and S. Higuchi: Infrared spectrum of deoxyribonucleic acid—Effects of base composition and of ^{15}N -substitution. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **41**, 1821-1829 (1968).
 14. K. Morikawa, M. Tsuboi, Y. Kyogoku, T. Seno, and S. Nishimura: Infrared spectrum of an anticodon fragment of a transfer RNA. *Nature*, **223**, 537-538 (1969).
 15. S. Higuchi, M. Tsuboi, and Y. Itaka: Infrared spectrum of a DNA-RNA hybrid. *Biopolymers*, **7**, 909-916 (1969).
 16. M. Tsuboi, S. Higuchi, Y. Kyogoku, and S. Nishimura: Infrared spectra of transfer RNS's II. Formylmethionine transfer RNA from *Escherichia coli* in aqueous solution. *Biochim. Biophys. Acta*, **195**, 23-28 (1969).
 17. T. Katsura, K. Morikawa, M. Tsuboi, Y. Kyogoku, T. Seno, and S. Nishimura: Infrared spectra of transfer ribonucleic acids. III. Fragments of formylmethionine tRNA from *Escherichia coli*. *Biopolymers*, **10**, 681-698 (1971).

18. M. Tsuboi, S. Takahashi, S. Muraishi, and T. Kajjura: Evidence of a pre-resonance Raman effect of the base residue in a nucleic acid. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **44**, 2921-2925 (1971).
19. M. Tsuboi, S. Takahashi, S. Muraishi, T. Kajjura, and S. Nishimura: Raman spectrum of a transfer RNA. *Science*, **174**, 1142-1144 (1971).
20. K. Morikawa, M. Tsuboi, S. Takahashi, Y. Kyogoku, Y. Mitsui, Y. Itaka, and G.J. Thomas, Jr.: The vibrational spectra and structure of poly (rA-rU).poly (rA-rU). *Biopolymers*, **12**, 799-816 (1973).
21. Y. Nishimura, K. Morikawa, and M. Tsuboi: Spectral difference of the A and B forms of deoxyribonucleic acid. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **47**, 1043-1044 (1974).
22. M. Tsuboi, A.Y. Hirakawa, Y. Nishimura, and I. Harada: On the excited state geometry of the adenine residue as revealed by a pre-resonance Raman effect. *J. Raman Spectrosc.*, **2**, 609-621 (1974).
23. A.Y. Hirakawa and M. Tsuboi: Molecular geometry in an excited electronic state and a pre-resonance Raman effect. *Science*, **188**, 359-361 (1975).
24. Y. Nishimura, A.Y. Hirakawa, M. Tsuboi, and S. Nishimura: Raman spectra of transfer RNAs with ultraviolet lasers. *Nature*, **260**, 173-174 (1976).
25. Y. Nishimura, A. Y. Hirakawa and M. Tsuboi: Resonance Raman effects of nucleotides. *Chemistry Letters (Tokyo)*, 1977, 907-908.
26. M. Nakanishi, M. Tsuboi, Y. Saijo, and T. Nagamura: Stopped-flow ultraviolet spectroscopy of hydrogen-exchange studies of nucleic acids. *FEBS Letters*, **81**, 61-64 (1977).
27. Y. Nishimura, H. Haruyama, K. Nomura, A. Y. Hirakawa, and M. Tsuboi: On the normal modes of vibration in the uracil residue—The use of ^{15}N -isotope effects. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **52**,

1340-1345 (1979).

28. Y. Nishimura and M. Tsuboi: Resonance Raman effect of carbonyl group as a probe of its π -electron state. *Science*, **210**, 1358-1360 (1980).
29. Y. Nishimura, M. Tsuboi, S. Kato, and K. Morokuma: In-plane vibrational modes in the uracil molecule from an ab initio MO calculation. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1354-1358 (1981).
30. Y. Hayashi, M. Nakanishi, M. Tsuboi, I. Tazawa, and Y. Inoue: Hydrogen-exchange kinetics in a double-helical polynucleotide with the adenine-uracil basepair—A use of the N⁶-methyladenine residue. *Biochim. Biophys. Acta*, **656**, 120-122 (1981).
31. Y. Hayashi, M. Nakanishi, M. Tsuboi, T. Fukui, M. Ikehara, I. Tazawa, and Y. Inoue: Hydrogen exchange kinetics of nucleic acids—Double and triple helices with Hoogsteen-type basepairs. *Biochim. Biophys. Acta*, **698**, 93-99 (1982).
32. Y. Nishimura, M. Tsuboi, T. Nakano, S. Higuchi, T. Sato, T. Shida, S. Uesugi, E. Ohtsuka, and M. Ikehara: Raman diagnosis of nucleic acid structure: sugar-puckering and glycosidic conformation in the guanosine moiety. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1579-1588 (1983).
33. M. Tsuboi, Y. Tomimaga, and H. Urabe: Raman active torsional vibrations in DNA molecule. *J. Chem. Phys.*, **78**, 991-992 (1983).
34. M. Nakanishi, Y. Mitane, and M. Tsuboi: A hydrogen exchange study of the open segment in a DNA double helix. *Biochim. Biophys. Acta*, **798**, 46-52 (1984).
35. Y. Nishimura, M. Tsuboi, and T. Sato: Structure-spectrum correlations in nucleic acids. I. Raman lines in the 600-700 cm⁻¹ range of guanosine residue. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 6901-6908 (1984).

36. A. Y. Hirakawa, H. Okada, S. Sasagawa, and M. Tsuboi: Infrared and Raman spectra of adenine and its ^{14}N and ^{13}C substitution products. *Spectrochim. Acta*, 41A, 209-216 (1985).
 37. Y. Nishimura and M. Tsuboi: In-plane vibrational modes of cytosine from an ab initio MO calculation. *Chem. Phys.*, 98, 71-80 (1985).
 38. H. Takashima, M. Nakanishi, and M. Tsuboi: Determination of the kinetics of deuteration of DNA. RNA hybrids by ultraviolet spectroscopy. *Biochemistry*, 24, 4823-4825 (1985).
 39. H. Hayashi, Y. Nishimura, M. Katakira, and M. Tsuboi: The structure of nucleosome core particles as revealed by difference Raman spectroscopy. *Nucleic Acids Res.*, 14, 2583-2596 (1986).
 40. Y. Nishimura, C. Torrigoe, and M. Tsuboi: Salt induced B \rightarrow A transition of poly(dG) \cdot poly(dC) and the stabilization of A form by its methylation. *Nucleic Acids Res.*, 14, 2737-2748 (1986).
 41. M. Katakira, Y. Nishimura, M. Tsuboi, T. Sato, Y. Mitsui, and Y. Itaka: Local and overall conformations of DNA double helices with the A.T base pairs. *Biochim. Biophys. Acta*, 867, 256-267 (1986).
 42. Y. Nishimura, M. Tsuboi, T. Sato, and K. Aoki: Conformation-sensitive Raman lines of mononucleotides and their use in a structure analysis of polynucleotides: Guanine and cytosine nucleotides. *J. Mol. Structure*, 146, 123-153 (1986).
- 線 記
1. M. Tsuboi: Some problems in the infrared spectra of polypeptides and polynucleotides. *Biopolymers*, Symposia No. 1, 527-547 (1964).

2. M. Tsuboi: Helical complexes of poly-L-lysine and nucleic acids. In "Conformation of Biopolymers" (edited by G. N. Ramachandran), Academic Press, London (1967), p. 689-702.
3. M. Tsuboi: Application of infrared spectroscopy to structure studies of nucleic acids. *Applied Spectroscopy Reviews*, 3, 45-90 (1969).
4. M. Tsuboi: Infrared study of base-pairings in transfer RNAs and transfer RNA fragments in their aqueous solutions. *Studia Biophysica*, Berlin, Band 24/25, 9-22 (1970).
5. M. Tsuboi: Infrared studies of nucleic acids. *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 7, 145-177 (1971).
6. M. Tsuboi and Y. Kyogoku: Infrared spectroscopy of nucleic acid components. In "Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry, Vol. II" edited by W. W. Zorbach and S. Tipson, John Wiley, p. 215-265, (1973).
7. M. Tsuboi, S. Takahashi, and I. Harada: Infrared and Raman spectra of nucleic acids—Vibrations in the base residues. In "Physico-chemical properties of nucleic acids" Chapter 11, edited by J. Duchesne, Academic Press, p. 91-145 (1973).
8. M. Tsuboi: Infrared and Raman spectroscopy. In "Basic principles in nucleic acid chemistry" Vol. 1, edited by P.O.P. Ts'o, Academic Press, p. 399-452 (1974).
9. Y. Nishimura, A. Y. Hirakawa, and M. Tsuboi: Resonance Raman Spectroscopy of Nucleic Acids. In "Advances in Infrared and Raman Spectroscopy" Vol. 5, edited by R.J.H. Clark and R.E. Hester, Heyden, p. 217-275 (1978).
10. M. Tsuboi: Raman spectroscopy of nucleic acids and proteins. In "Vibrational spectroscopy—Modern trends", edited by A.J. Barns and W.J. Orville-Thomas, Elsevier, p. 405-412 (1977).

11. W. L. Peticolas and M. Tsuboi: The Raman spectroscopy of nucleic acids. In "Infrared and Raman spectroscopy of biological molecules" edited by T. M. Theophanides, Reidel Publ. (London) p. 153-186 (1979).
12. M. Tsuboi and Y. Nishimura: Recent development in the Raman spectroscopy of nucleic acids. In "Raman spectroscopy—Linear and nonlinear" edited by J. Lascombe and P. V. Huong, Wiley Heyden p. 683-693 (1982).
13. M. Tsuboi: Detailed structure of DNA duplex in solution as revealed by its vibrational spectrum. In "Spectroscopy of biological molecules" edited by A. J. P. Alix, L. Bernard and M. Manfait, John Wiley, p. 101-107 (1985).
14. Y. Nishimura and M. Tsuboi: Local conformations and polymorphism of DNA duplexes as revealed by their Raman spectra. In "Spectroscopy of biological systems" edited by R. J. H. Clark and R. E. Hester, John Wiley, p. 177-232 (1986).