

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06576

研究課題名(和文) DNAのハイパーモバイル水制御によるp53の非特異結合定数と1次元拡散への効果

研究課題名(英文) Effects on p53 diffusion along dsDNA and nonspecific binding constant between p53 and dsDNA of hyper-mobile water control

研究代表者

鈴木 誠 (Suzuki, Makoto)

東北大学・多元物質科学研究所・名誉教授

研究者番号：60282109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質分子とDNAの結合は水中の分子間相互作用である。静電力やファンデルワールス力はその主役であり水の性質に依存する。ここではDNA周りの水が純水の性質と異なるかを調べた。研究には高分解能マイクロ波誘電分光と高分解能ラマンOH伸縮バンド分光法と分子動力学(MD)計算法を使用した。誘電分光によりdsDNAの周りには純水より配向応答が速い水と遅い水の層が検出され、ラマン分光から純水のOH伸縮バンドより低波数側に多数の水分子の協同振動バンドを検出した。この新バンドとMD計算によりDNAの10倍以上の体積の水が純水と異なる特性がわかった。今後DNA蛋白質結合や分子認識の更なる理解につながるだろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、dsDNA鎖上をガン抑制蛋白質p53の1次元拡散係数が溶液内のMgやCaイオンの添加により高まるとの論文に興味を持ち、DNA鎖が周りの水に与える影響とDNA周りの水への各イオンの影響を調べるこの研究を進めた。その結果これまで観測されたことのないDNA鎖周りの水の密度等性質が通常水と大きく異なることを高分解誘電とラマン分光法とMD計算で明らかにした。水の性質のDNA-蛋白質等分子間相互作用への影響は物理化学分野の課題であり、DNA関連生化学や医学薬学分野につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：The binding between a protein molecule and DNA is an intermolecular interaction in water. Electrostatic force and van der Waals force are the protagonists and depend on the nature of water. Here, we investigated how the water around DNA differs from the properties of pure water. High-resolution microwave dielectric spectroscopy, high-resolution Raman OH stretch band spectroscopy, and molecular dynamics (MD) computation were used in the study. Dielectric spectroscopy detected water around dsDNA that had a faster and slower orientation response than pure water. And from Raman spectroscopy, a new band of cooperative vibration mode of many water molecules at the low wavenumber side of the OH stretch band of pure water was detected. By these results and MD calculation, it was found that more than ten times the volume of water as DNA is different from pure water. It will deepen our understanding of DNA protein binding and sequence recognition.

研究分野：生体分子の溶液科学

キーワード：DNAタンパク質相互作用 DNA水和 誘電分光水和解析 ラマン分光水和解析 OH stretch band cooperative vibration 水分子間協同振動モード

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究の代表者 Suzuki ら[1-5]は荷電したアクチンフィラメント周りにはハイパーモバイル水(HMW)と呼ぶ純水より誘電緩和周波数の高い水和層と通常の緩和周波数の低い拘束水層があることを観測しミオシンとの力発生に関わる可能性を提示していた。この方向から 2 重らせん DNA (dsDNA)を考えると、dsDNA はらせん状に配置されたホスホジエステル(>PO₂)基により負に荷電したフィラメントであることから誘電緩和分光(DRS)測定をして HMW と拘束水の存在を検出していた。この水和構造が dsDNA と結合する蛋白質の運動にも影響する可能性がある。一方、研究分担者の Kamagata ら[6-9]は、がん抑制機能をもつ p53 蛋白質が dsDNA 鎖上で標的配列をサーチする運動に関わる 1 次元拡散係数の 1 分子測定を行い、それが Mg イオンや Ca イオンを添加すると上昇することを報告した。これら 2 価イオンが DNA と蛋白質間の相互作用に直接作用するのか水の性質の変化を介して影響をしているのかを物理化学的視点から調べておきたい。DNA-蛋白質分子間相互作用は水環境内で起こるため、結合定数や分子認識効果を予測するには水中での各構成原子間に作用する静電力とファンデルワールス力を総合して調べることになるが、長時間かかる全原子計算も重要であるが溶媒を連続体近似で計算を行うためには DNA 鎖周りの水の性質を明らかにしなければならない。そのことから dsDNA 周りの水がどのように純水の性質と異なるのか、Mg イオンや Ca イオンを添加することで dsDNA との直接の結合がどうなるのか、そして周りの水の特性にどう影響するのかを調べておく必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、dsDNA 周りの水の性質を 2 つの測定法で調べた。1 つはマイクロ波誘電緩和分光法(DRS)であり、もう 1 つは OH stretch band ラマン分光法である。DNA の周りの水への影響を調べるためには十分な量の水を含む 0.5~10 mg/ml 濃度の DNA 水溶液を測定する必要がある。この濃度は細胞の核内の DNA 濃度に近い。溶質である DNA と同程度の体積の水和層の特性をバルクの水特性と比較するためには、測定に必要な DRS 精度は 10mg/ml の DNA 溶液では比誘電率 0.02、OH stretch band ラマン分光では 1 mg/ml DNA 溶液の場合この band を複数波数域に分けた積分値を求める際に 0.02%の分解能が必要となる。(1) DRS では純水中の DNA 水和特性を調べる。DRS 水和特性測定には 10mg/ml の DNA 溶液が数 ml 必要なため様々な条件下で水和特性測定をすることは困難である。そのため細胞内に近い環境条件を作るうえで pH を制御する buffer 種やイオン強度や Mg や Ca イオンの影響を調べるためには 1 mg/ml 程度の試料溶液を調べることが可能な新たな測定システムの開発が必須となる。そのため、(2) ラマン分光測定システムの目標分解能実現に努めた。2 年目後半以降に目標分解能を達成し次の課題に取り組んだ。(3) 合成 10mer dsDNA の周りの水の OH stretch band を測定および buffer 種として細胞内にある phosphate ion 等の影響と Mg・Ca イオン自体の周りの水への影響を調べ dsDNA の水和特性に及ぼすこれら添加分子・イオンによる影響を調べた。実験的に得られた結果を総合して解釈するためには物理化学の基礎理論面から情報を得る必要がある。そのため、(4) 分子動力学(MD)法により dsDNA 周りの水の配置状態や水素結合の配向方向分布等を計算しさらにイオン強度や Mg・Ca イオンの効果も調べた。以上の情報を総合して DNA から影響を受ける水量と水の性質を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) DRS 測定 (0.2 GHz~26 GHz, 20.0 ± 0.01) によって、純水中の二重鎖(ds)DNA の水和特性を調べた。必要な複素比誘電率測定精度を実現する方法は既報[3~5]にあり、試料溶液測定と参照溶液測定を交互に 10 回繰り返し測定することで装置のドリフトを低減し 2~26 GHz の周波数範囲で比誘電率分解能 0.02 を実現した。0.1~1 GHz 域ではイオン濃度分布のゆらぎの緩和成分、2~10 GHz 域では拘束水の緩和成分、17 GHz に純水がもつ分散(比誘電率の大きな減少)、17~26 GHz 域で HMW が存在すると比誘電率の減少量が小さくなる。これら 4 つのデバイ緩和成分と高周波極限の比誘電率 ϵ_{∞} といった多数のパラメータをスペクトルから最小二乗法で求めた。(2) 高分解能ラマン分光法開発では、DPSS 561nm 100 mW レーザーと CCD アレイ分光器を用いて純水の OH stretch band と HOH bend band を含む波数域[1300, 3766] (cm⁻¹) でのスペクトル測定を行った。誤差要因はレーザー強度の変動、CCD アレイのピクセル毎の感度変動、光軸の変動、迷光、および測定溶液セルの温度変動であり、それぞれの低減を図った。レーザー光強度の変動は注目する波数域スペクトルの積分値で各波数域スペクトルを規格化することで解消できる。そのため OH stretch band は波数域 [2500, 3766]を直線 baseline からの積分値で規格化し、HOH bend band [1310, 1880]と weak band [1880, 2500] を 2 次関数 baseline からの積分値でそれぞれ規格化した。測定溶液の温度は 20.0 ± 0.02 とした。CCD アレイの感度変動は分光器設置スペースの温度を安定化させペルチエ温調能を高める冷却ファン増設によって感度変動が減少し 6 時間以上安定化させることで目標分解能 0.02%を達成できた。(3)この OH stretch band ラマン分光法で dsDNA のリン酸 buffer の溶液 (pH 7.8) と TRIS-HCl buffer の溶液(pH

8.0) を対象に水和特性を調べた。Buffer 種の周りの水への影響も調べるため dsDNA による周りの水の OH stretch band と HOH bend band を測定し、イオン強度と Mg・Ca イオンの効果も調べた。CCD アレイの感度は水のラマン発光強度の高い波数域 [3100, 3600] (cm^{-1}) でノイズが大きいのでこの波数域ではスペクトル形状の変化でなく積分値の変化量を評価対象として dsDNA 周りの水の OH stretch band [2500, 3766] を調べた。(4) 10mer dsDNA 水溶液の NAMD による MD 計算を水分子 5 万個の中で 1 bar, 293 K で行い dsDNA 周りの水の密度とホスホジエステル基の酸素原子に向く各水分子の OH 配向分布を調べた。

4. 研究成果

(1) DRS 測定により dsDNA はゆるく拘束 (緩和周波数 8.5 GHz) された水和層と純水より配向応答の速いハイパーモバイル水 (HMM, 緩和周波数 22 GHz) 層がそれぞれ DNA 体積の 4~6 倍存在することを再確認した。

(2) ラマン分光による OH stretch band スペクトルを波数域 [2500, 3100], [3100, 3433], [3433, 3600], [3600, 3766] (cm^{-1}) の各積分値を 0.02% の分解能精度で測定することができた。

(3) 濃度 0.5 mg/ml の合成相補性 10mer DNA (5' -CGCGCCGCG-3') のリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.8) 溶液を測定し、試料溶液スペクトルと参照溶液 (buffer sol.) スペクトルの (1-) 倍の差をもとめた。DNA 鎖によって影響を受けた水層の体積分率を $\rho = 30v$ (v : DNA の溶液内体積分率、部分比容 = 0.5 ml/g) とすることで DNA 鎖の影響を受けた水層のスペクトルを得た。その結果から純水の OH 伸縮バンドより低波数側にピークをもつ新バンド [2500, 3100] (cm^{-1}) を検出した。その新 band 積分値は通常の OH stretch band が減少した。DNA 溶液に 2 mM MgCl_2 を入れるとその新 band 積分値が約 30% 増加し純水の OH stretch band 成分が減少した。一方で 2 mM CaCl_2 を入れると新 band が約 30% 減少し通常の OH stretch band に近づいた。新 band 積分値から DNA の monomer unit 当り 100 個の水分子が影響を受けたことがわかる。dsDNA 溶液の buffer 種を TRIS-HCl (10 mM, pH 8.0) とすると同じ波数域に同じく新 band が観測され、band 積分値がリン酸 buffer 使用時より 36% 増加した。さらに KCl 0.15M を加えると KCl 添加によってさらに 30% 新 band の積分値が増加した。この TRIS-HCl buffer でも Mg 添加と Ca 添加の新 band への影響はリン酸 buffer 時と同じ変化を示した。この波数域の新 band が dsDNA の $>P=O_2$ 基のらせん状配置構造周りの水の性質と予想したので、リン酸水素 Na (10 mM, pH 7.8) 溶液を測定すると同じ波数域にこの水による振動 band を観測した。よって DNA の $>P=O_2$ 基の酸素原子群が周りの水の協同振動 band を誘起したことを示唆する。このように dsDNA 周りの水の性質はイオン強度と Mg Ca イオンの影響や buffer 種の影響を受けて大きく変化することがわかった。dsDNA の体積の 40 倍つまり dsDNA の外側厚さ約 15Å に及ぶ多量の水が影響を受けることがわかった。

(4) DRS で得た HMM と拘束水の結果とラマン分光で得た新 band の水量が整合するのかわかめるため MD 計算で 10mer dsDNA を 5 万個の水 (TIP3P) の中で 1 bar, 293K で NPT 計算を行った。その結果 dsDNA の $>P=O_2$ 基周りの水は密度が高い液相 (HDL) であり、第 1 層の水分子と $>P=O_2$ 基の酸素との水素結合は約 50 度の角が平均値でさらに外側 4 層の水分子配向は揺らぎやすく、外部電場 2×10^8 V/m を 40 ps かけた直後 10 ps 揺らいだ後に ~20 ps の緩和時間で配向分布が安定化した。パルス電場直後の水素結合角がゆらぐ時間 5~8 ps を誘電緩和周波数に換算すると 20~27 GHz で DRS で検出した HMM に対応すると考えられる。一方、緩和時間 20 ps は 8 GHz の拘束水に対応する。すなわち DRS で測定した結果は MD 計算からサポートされ、さらに HDL が $>P=O_2$ 基から 15Å の広い領域に存在する計算結果がラマン分光で観測した新 band の水量とほぼ一致した。(図 1) 以上をこれから論文化する。今後 DNA 分子間力解明に役立つと期待できる。

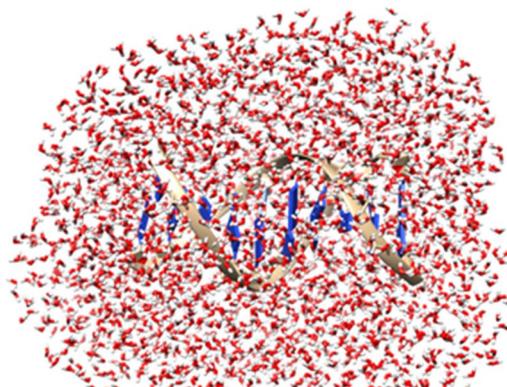


図 1 dsDNA 周り性質変化水量

参考文献

- [1] M.Suzuki, G.Mogami, H.Ohsugi, T.Watanabe, N.Matubayasi, Physical driving force of actomyosin motility based on the hydration effect, *Cytoskeleton*, 74, 512-527 (2017).
- [2] M.Suzuki, Novel Intermolecular Surface Force Unveils the Driving Force of the Actomyosin System, "The Role of Water in ATP Hydrolysis Energy Transduction by Protein Machinery" ed. by M.Suzuki, Chap.5, Springer, 257-274 (2018).
- [3] T.Wazawa, T.Miyazaki, Y.Sambongi, M.Suzuki, Hydration analysis of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome c551 upon acid unfolding by dielectric relaxation spectroscopy, *Biophys. Chem.*, 151, 160-169 (2010).
- [4] M.Suzuki, A.Imao, G.Mogami, R.Chishima, et al., Strong Dependence of Hydration State

- of F-Actin on the Bound Mg^{2+}/Ca^{2+} Ions J. Phys. Chem. B., 120, 6917–6928 (2016).
- [5] G.Mogami, T.Wazawa, T.Kodama, M.Suzuki et al., Hydration properties of adenosine phosphate series as studied by microwave dielectric spectroscopy, Biophys. Chem., 154, 1-7 (2011).
- [6] A.Murata, Y.Itoh, S.Takahashi, K.Kamagata et al., One-dimensional sliding of p53 along DNA is accelerated in the presence of Ca^{2+} or Mg^{2+} at millimolar concentrations, J. Mol. Biol., 427, 2663-2678 (2015).
- [7] D.R.G.Subekti, A.Murata, Y.Itoh, S.Takahashi, K.Kamagata, Transient binding and jumping dynamics of p53 along DNA revealed by sub-millisecond resolved single-molecule fluorescence tracking, Scientific Reports 10, 13697 (2020).
- [8] 鎌形清人, DNA 結合タンパク質研究の最前線, Precision Medicine, 3, 547-553 (2020).
- [9] K.Kamagata, Y.Itoh, D,R.G.Subekti, How p53 molecules solve the target DNA search problem, Int. J. Mol. Sci. 21, 1-13 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sbektı D.R.G., Kamagata K.	4. 巻 534
2. 論文標題 The disordered DNA-binding domain of p53 is indispensable for forming an encounter complex to and jumping along DNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 21-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.12	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Subektı D. R. G., Murata A., Itoh Y., Takahashi S., Kamagata K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Transient binding and jumping dynamics of p53 along DNA revealed by sub-millisecond resolved single-molecule fluorescence tracking	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70763-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 鎌形清人	4. 巻 3
2. 論文標題 DNA結合タンパク質研究の最前線	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 547-553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kamagata, K., Itoh, Y., Subektı, D.R.G.	4. 巻 21
2. 論文標題 How p53 molecules solve the target DNA search problem	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21031031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鈴木 誠, 鎌形清人, 高橋 聡, 魚住信之
2. 発表標題 ラマンOH伸縮バンドの高分解観測によるDNA周りの水の動きやすさ -Mg/Ca イオンの効果-
3. 学会等名 日本生物物理学会北海道・東北支部合同例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Makoto Suzuki
2. 発表標題 On the physicochemical origin of the driving force of actomyosin motor
3. 学会等名 10th Toyota Riken International Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 誠, 最上讓二, 松林伸幸
2. 発表標題 アクトミオシンの力発生機構 - 水和測定と高電場下の水和自由エネルギーから -
3. 学会等名 溶液化学シンポジウム (仙台)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 誠, 最上讓二, 松林伸幸
2. 発表標題 On the driving force mechanism based on the hydration state measurements and solvation free energy calculation under high electric field
3. 学会等名 溶液化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Suzuki
2. 発表標題 Collective water behavior around charged filaments by microwave dielectric relaxation and Raman OH-stretching/bending bands spectroscopy
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会Symposium of Water dynamics and biological functions: Revisit (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鎌形 清人 (Kamagata Kiyoto) (90432492)	東北大学・多元物質科学研究所・准教授 (11301)	
研究分担者	最上 譲二 (Mogami Joji) (70713022)	東北大学・工学研究科・助教 (11301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高橋 聡 (Takahashi Satoshi)	東北大学・多元物質研究所・教授 (11301)	
研究協力者	魚住 信之 (Uozumi Nobuyuki)	東北大学・工学研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------