

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770176

研究課題名(和文) 中性子結晶解析による構造揺らぎを含めたDNAの水和構造の解明

研究課題名(英文) Neutron Crystallographic study of hydration structures of DNA and its fluctuation

研究代表者

茶竹 俊行 (Chatake, Toshiyuki)

京都大学・原子炉実験所・准教授

研究者番号：30383475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：DNAの水和構造を揺らぎを含めて明らかにするために、中性子解析を中心としたDNAの結晶学的研究を行った。Z-DNA d(CGCGCG)について、(1)完全重水素化DNAの作成、(2)中性子実験に必要な大型単結晶の作成を行い、パルス中性子を利用してTOF型回折計で中性子回折像を測定した。測定の結果1.6-18オングストローム分解能の回折斑点を得ることに成功した。解析プロトコルについても、別サンプルを使用して構築を行うことができた。また、相補的な解析として、放射光を用いたZ-DNAの高塩状態と低塩状態の構造解析を行い、特異なイオンと水和の構造を発見した。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of revealing structure of DNA hydration including structural fluctuation, neutron and X-ray crystallographic studies were carried out. (1) Deuterated Z-DNA d(CGCGCG) could be produced. (2) Large single crystals of Z-DNA d(CGCGCG) were obtained from H<sub>2</sub>O solution, and TOF neutron experiment was performed using pulsed neutron source. Neutron diffraction spots were detected up to 1.6 - 1.8 Angstrom. Protocol for refinements was tested using neutron data sets of protein crystals. X-ray crystallographic analyses were also carried out complementarily, as the result, Z-DNA structures at high and low concentrations of metal salts were determined. Each of these structures had specific features, suggesting that these crystals would be dominant candidates for neutron crystallographic studies.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：水和構造 揺らぎ DNA 中性子

## 1. 研究開始当初の背景

水分子はDNAの構造や機能を左右する重要な要素である。DNAの立体構造は、遺伝情報の保存、複製、転写と密接に関わっており、特に、DNAが遺伝情報を伝達するために蛋白質と結合する際には、DNAと水と蛋白質の三者間の相互作用が深く関与している。従って、生体内でのDNAの機能を解明するためには、DNAの水和構造とDNA-イオン相互作用の詳細な解析が必要である。

これまでのX線構造解析では、DNAのらせん形状に注目した解析が行われてきた。この結果、多様ならせん構造が報告されているものの、X線解析では水素原子の観測がほぼ不可能なため、水分子や水素結合等、DNA表面の構造は完全には解析されていない。

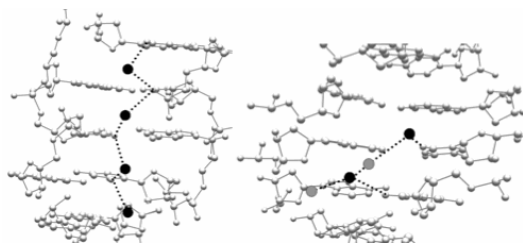


図1. DNAの溝で観測された水和水。  
(左: Z-DNA、右: B-DNA)

図1は、研究代表者がこれまでに行ったB-DNA, Z-DNAのX線解析結果である。図中の黒丸は第一水和水、灰色丸は第二水和水を示している。点線は予測された水素結合である。両者とも高精度で解析したにもかかわらず、X線では水分子(H<sub>2</sub>O)の三原子のうち酸素(O)原子しか観測できていない。O原子位置から、DNAがつくる螺旋の副溝に周期的な水分子の配置が見られる。B-DNAでは、DNAと直接結合する第一水和水と、その上部で第一水和水をつなぐ第二水和水が交互に観測される。これに対してZ-DNAでは、第一水和水が直線状に並んでいる。この様に、水和構造はらせん形状と深いかかわりがある。しかしながらH原子が見えないために、水分子の向きや水素結合のパターンを決定できなかった。

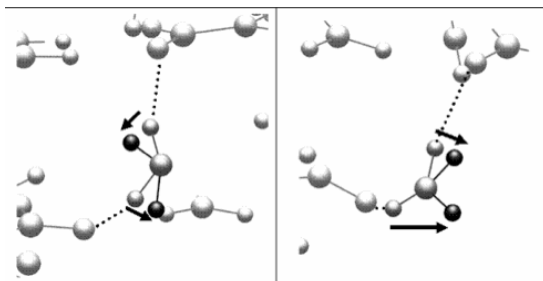


図2. 中性子線で観測したZ-DNAの水和水。黒丸は中性子で実際に観測された水素原子位置。灰色丸はX線からの予測位置。両者はかなり異なっている

この問題を解決するために、中性子線による解析を行った。中性子線は水素(H)原子とその同位体である重水素(D)原子の観測がX線に比べて容易である。図2にZ-DNAの中性子結晶解析を示す。注目する点は、規則正しく並んでいるO原子と違い、D原子はX線解析から予想した位置からかなり外れて観測されたことである。この結果は、DNA表面の水和水は、位置は規則的であっても、その向きには大きな揺らぎが起こっていることを示唆している。

以上のことから、DNAの立体構造を解明するためには、中性子解析による水素位置の決定と、X線解析によるイオン位置の決定を行い、これを組み合わせて全原子解析を実施する必要があると考えた。以前の中性子解析では、中性子線の強度が弱いため部分的な水素原子の観測しか出来ていなかった。これに対して現在は大強度陽子加速器施設J-PARCが建設されており、そこに設置された新型のTOF型中性子回折計を用いて、高い中性子強度を持つ中性子線が利用できる。

本研究では、構造揺らぎを含めたDNAの水和構造の詳細を明らかにするために、新型回折計、高品質試料、多角的な解析法を取り入れて、これまでになかったDNAの高精度での水和・イオン構造の解明を目指した。

## 2. 研究の目的

本プロジェクトでは、DNAの水和・イオン構造の解明のために、三項目を目標とした。

- (1) 実験試料の作成
- (2) 中性子実験
- (3) X線による相補的な実験

以下に概要を説明する。

### (1) 中性子実験用DNA試料の作成

#### Z-DNA大型結晶の作成

中性子結晶解析では、大型の単結晶が必要とされる。本研究ではZ-DNA六量体d(CGCGCG)を用いて大型単結晶の作成を行った。

#### Z-DNAの完全重水素化

より高精度の中性子データを得るために、Z-DNAの完全重水素化も試みた。中性子線の散乱において、重水素(D)原子は軽水素(H)原子に比べて散乱強度が3倍で、データのS/N比に悪影響を与える非干渉性散乱は1/80になる。このため、DNAを完全重水素化すると、高精度の中性子データをとることが可能となる。

#### Z-DNAの軽水結晶の作成

軽水結晶は、単独では中性子実験には不利だが、重水結晶と組み合わせると、図3に示す様に、D原子(+0.67)とH原子(-0.38)の中性子散乱長の差をとる(D/Hコントラスト)ことにより、水素原子を効率よく観測できることが期待される。この実験のために、軽水結晶の作成を行った。

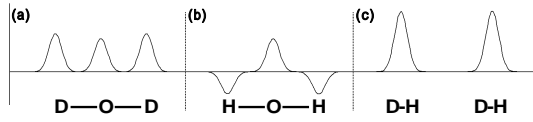


図3. 水分子で観測されるピーク  
(a) 重水、(b) 軽水、(c) D/H コントラスト

### (2) 中性子実験

TOF 法による中性子回折像の測定

J-PARC のパルス中性子を用いれば、高精度データを得ることが期待できる。作成した DNA 結晶を用いて中性子実験を行う。

他のサンプルを用いた予備実験

共同研究により、蛋白質の重水結晶と軽水結晶の中性子データを得ている。これを用いて、D/H コントラストの解析プロトコルの作成と評価を行う。

### (3) X線による相補的な実験

DNA は周囲の環境(特に溶液条件)に依存して、構造が変化する。特に、水分子や金属イオンなどの溶媒構造ではそれが顕著である。中性子実験は、測定の制約(結晶の大きさ、実験時間、測定回数)があるため、実験が容易な X 線実験によりこれを補う必要がある。Z-DNA について 高塩状態 Z-DNA、低塩状態 Z-DNA の解析を行った。また、これらは中性子実験の予備実験もかねる。

## 3. 研究の方法

### (1) 中性子実験用 DNA 試料の作成

Z-DNA 大型結晶の作成

大型結晶の作成は、先の科研費プロジェクトで開発した温度制御法を用いて行った。この方法は、DNA の溶解度が温度により大きく変化することを利用した結晶化法である。図4に示す様に、DNA は高温では二本鎖から一本鎖へ解離して、溶解度が大きく増大する。これを利用して、DNA 溶液を高温から低温へ序例することにより、大型結晶を作成した。

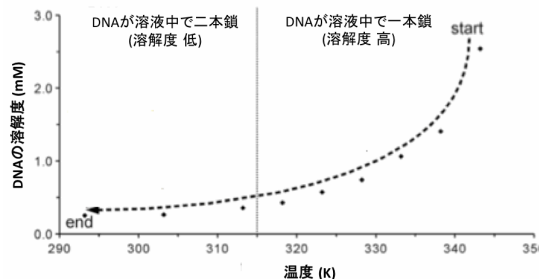


図4. Z-DNA の溶解度  
横軸は温度、縦軸は溶解度

Z-DNA の完全重水素化

DNA 鋳型に対して、DNA ポリメラーゼを用いて、重水素化した NTP を導入することにより、重水素化した Z-DNA の作成を試みた。プロトコルを図5に示す。

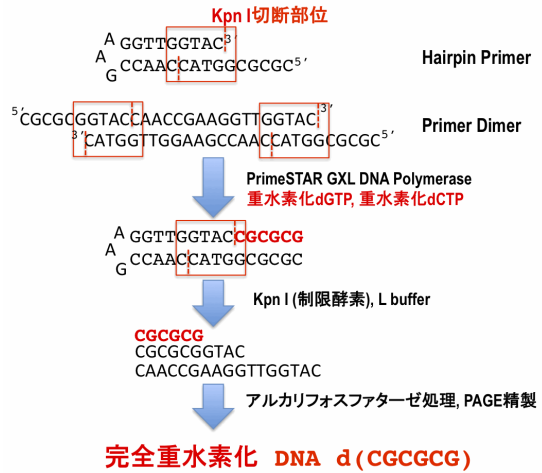


図5. DNA 重水素化のプロトコル

Z-DNA の軽水結晶の作成

の方法で結晶化を軽水中で行った。

### (2) 中性子実験

TOF 法による中性子回折像の測定

J-PARC の BL3 に設置された生体分子用中性子回折計 iBIX を用いて、中性子回折実験を行った。測定条件は、

加速器出力	280kW
使用波長領域	1.2~5.2
中性子検出器	WLSF 型検出器 30 台
測定時間は	15.5 時間

で行った。

他のサンプルを用いた予備実験

蛋白質結晶について、軽水型と重水型の両方のデータを研究用原子炉 JRR-3M に設置された BIX-3 で測定したデータを用いて、D/H コントラストの解析処理を行った。

### (3) X線による相補的な実験

Z-DNA については、これまで高塩型および低塩型の結晶構造報告例が非常に少ない。特に、二価以上の陽イオンを含まない低塩型の構造は皆無であった。これらの構造は中性子解析により、特殊な水和やイオン状態が観測されることが大きく期待される。本研究では、

高塩状態 Z-DNA  
0.5 M MgCl<sub>2</sub> および 0.5 M CaCl<sub>2</sub>  
低塩状態 Z-DNA  
40 mM NaCl

について、SPring-8 BL38B1 で測定した放射光 X 線データを用いて、構造解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 中性子実験用 DNA 試料の作成

約 1mm<sup>3</sup> の体積を持つ Z-DNA の単結晶を得ることに成功した。この結晶は軽水型であり、過去に測定した重水型の中性子データと組み合わせることにより、水分子の水素に関する情報をより高精度で得ることができる。この結晶を用いて、次項の中性子実験を行なう

ことができた。

完全重水素化 DNA については、合成後に変性ポリアクリルアミド電気泳動を行い、完全重水素化した Z-DNA の合成を確認した。しかしながら、精製系において、本合成法で作成した完全重水素化 Z-DNA は純度と収量が改善しなかった。このため、合成法を一部変更して、鑄型 DNA と合成された重水素化 DNA の切断を、酵素反応ではなくアルカリ処理によって行う系の方が有効かもしれない。

完全重水素化 DNA については、大強度陽子加速器 J-PARC が最大出力(1MW)に達した際には、重要度が低下する可能性がある。次項の中性子実験により、実験精度に不利な軽水結晶でも良質な中性子データが測定できることが判明したためである。しかしながら、(a) 最高水準データを目指す、(b) 他の中性子実験(溶液散乱法等)と組み合わせる、ことを目的とした場合、完全重水素化は依然重要なことには変わらない。

## (2) 中性子実験

### TOF 法による中性子回折像の測定

軽水型 Z-DNA 結晶について中性子回折像を測定した。TOF 法で得られた回折データを積算して、ヒストグラムイメージを作成した。図 6 に回折像の一例を示す。回折斑点は 1.6~1.8 Å であり、これは原子炉中性子で測定した重水型 Z-DNA 結晶(反射限界 1.6 Å、実効分解能 1.8 Å)に匹敵している。測定時の J-PARC の出力は、予定されている最大出力(1MW)の 30%程度(280kW)であり、最大出力時には 1.4~1.6 Å 程度の分解能が期待できる。STARGazer による反射の指数付けは、結晶品質の問題もありうまくいかなかった。

研究最終年度に追加の中性子実験を計画していたが、J-PARC の予定外の停止のために、ビームタイムが次年度に延期された。

実験は 2014 年度も継続して行う予定。

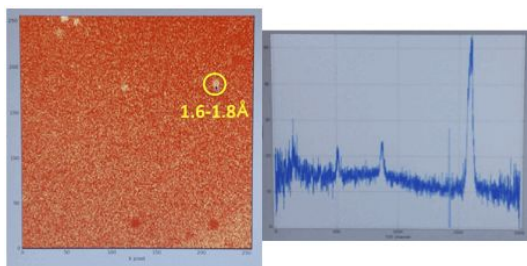


図 6. Z-DNA 結晶の中性子回折像  
左はヒストグラム化した回折像、  
右はピークの時間軸プロファイル

### 他のサンプルを用いた予備実験

蛋白質の中性子データは、軽水結晶・重水結晶ともに分解能 1.8 Å、収率 70%程度のものを用いた。単純な差分マップでは解析を進めることはできないが、手順を工夫することにより、従来の重水結晶データのみでの解析の精度を上回る処理が可能となった。基本的なプロトコルは確立したが、蛋白

質と DNA における化学構造差による修正が、DNA 解析では必要となることが予想される。

## (3) X 線による相補的な実験

### 高塩状態 Z-DNA

高塩状態の構造は、0.5 M  $MgCl_2$  存在下および 0.5 M  $CaCl_2$  存在下で行った。この二種類の二価金属イオンは類似した構造を形成していた。本報告では  $MgCl_2$  について説明する。

図 7 に示すように、 $Mg^{2+}$  イオンは DNA のリン酸基と配位結合して、P-O...( $Mg^{2+}$ )...O-P 型の相互作用で隣り合う Z-DNA 同士を架橋していた。この結果、DNA は密な六角形型の会合が可能となる。この会合は高塩状態での DNA の凝集モデルとして妥当であり、また、本構造モデルはナノテクノロジーにおける DNA 組立てにも有用性が期待される。

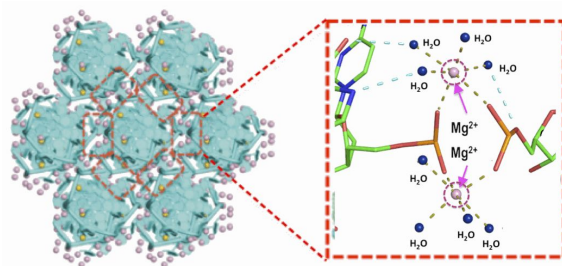


図 7. 高塩状態の Z-DNA 構造

### 低塩状態 Z-DNA

低塩状態は、二価金属イオンが無く、 $Na^+$  イオンのみを低濃度(100 mM 以下)しか含まない状態で構造解析した。低塩状態では、高塩状態や通常状態とは大きく異なる構造情報が得られた。

低塩状態における特筆点は、DNA の構造や水和構造に揺らぎが起こっていることである。図 8 に示すように、低塩状態ではリン酸基のコンフォメーションが  $Z_I$  と  $Z_{II}$  の平衡状態にある。また、水分子についても、Z-DNA の副溝の水分子が二つの配置をとっていることが明らかになった。これらは、Z-DNA の構造揺らぎのモードを示唆しており、これらの揺らぎは金属イオンなどの陽イオンにより通常は抑制されていると考えられる。

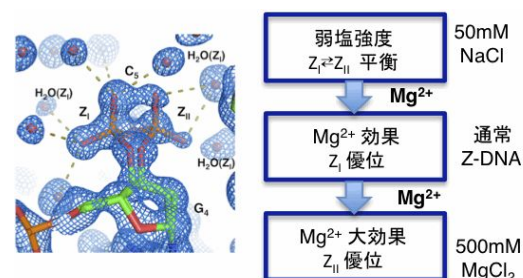


図 8. 低塩状態の Z-DNA 構造の揺らぎ

今回の両方の構造は、Z-DNA の構造構築を説明する上で、通常 Z-DNA との良い比較対象となると結論できる。

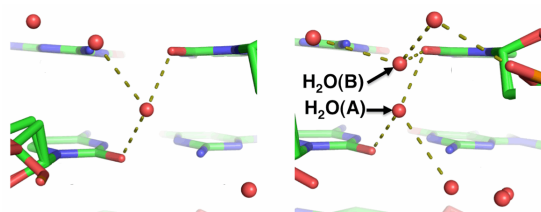


図9. 低塩状態のZ-DNA水和構造の揺らぎ  
左は通常のZ-DNA、右は低塩状態Z-DNA

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)(内5報査読有)

Tanaka I., Kusaka K., Chatake T., Niimura N., Fundamental studies for the proton polarization technique in neutron protein crystallography. *J. Synchrotron Rad.* 査読有り, **20**, 958-961 (2013).  
DOI:10.1107/S090904951302815.

Chatake T., Structural fluctuation observed in Z-DNA d(CGCGCG)<sub>2</sub> in the absence of divalent metal cations and polyamine. *J. Synchrotron Rad.* 査読有り, **20**, 864-868 (2013).

DOI: 10.1107/S0909049513020773

Yanagisawa, Y., Chatake T. 他9名(全11名中2番目), X-ray structure determination and deuteration of nattokinase. *J. Synchrotron Rad.* 査読有り, **20**, 875-879 (2013).

DOI:10.1107/S0909049513020700

茶竹俊行、森本幸生、生体分子の中性子単結晶解析(第一回)蛋白質中性子結晶学の基礎, *日本中性子科学会誌*, 査読無し, **23**, 81-85 (2013).

Chatake T., Sunami T., Direct interactions between Z-DNA and alkaline earth cations, discovered in the presence of high concentrations of MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub>. *J. Inorg. Biochem.* 査読有り, **124**, 15-25 (2013).

DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2013.03.004.

Chatake T., Ishikawa T., Yanagisawa Y., Yamada T., Tanaka I., Fujiwara S., Morimoro Y. High-resolution X-ray study of the effects of deuteration on crystal growth and the crystal structure of proteinase K.

*Acta Crystallogr.*, 査読有り, **F61**, 1334-1338 (2011).

DOI: 10.1107/S1744309111031903.

[学会発表](計7件)

茶竹俊行(発表者)、柳澤泰任、松尾龍人、藤原悟、森本幸生、納豆由来水溶性ビタミンK<sub>2</sub>の研究、京都大学原子炉実験所第48回学術講演会、京都大学原子炉実験所(大阪)、2014年1月30-31日。

茶竹俊行(発表者)、核酸科学を中心とした

中性子結晶構造解析、第一回 Neutron in Biology 研究会、京都大学東京オフィス(東京)、2013年3月13-14日。

樋口芳樹(発表者)、茶竹俊行、横山武司、山田太郎、生体高分子の昨日発現に重要な役割を持つ水分子およびプロトン化状態の直接観察、2012年度第2回水和ナノ構造研究会、新世代研究所(東京)、2013年2月23日。

茶竹俊行、高塩状態で誘導されるDNA会合の研究、蛋白質の異常凝集とその防御修復機構に関する研究会、京都大学原子炉実験所(大阪)、2012年11月2日

森本幸生(発表者)、杉山正明、茶竹俊行、藤井紀子、齊藤毅、藤原悟、日高雄二、生体試料解析のための重水素化手法の確立、京都大学原子炉実験所第46回学術講演会、京都大学原子炉実験所(大阪)、2012年2月2日。

T. Chatake(発表者)、N. Shibayama, S.Y. Park, K. Tomoyori, H. Hosoya, T. Ohara, K. Kusaka, I. Tanaka, N. Niimura, Y. Morimoto, Time of Flight Neutron Crystallographic analysis of Human Carbomonoxyhemoglobin, 1st Asia-Oceania Conference on Neutron Scattering, エポカル筑波(茨城), 2011年11月23日。

茶竹俊行(発表者)、DNAの水和構造における水分子と金属イオン、2011年第1回バイオ単分子・水素の構造合同研究会、パウエル箱根(神奈川)、2011年9月22日

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

茶竹 俊行 (CHATAKE, Toshiyuki)

京都大学・原子炉実験所・准教授

研究者番号: 30383475