

令和元年6月13日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05662

研究課題名(和文) 核酸塩基の立体構造解析を目的とした中赤外マーカー振動バンドの探索

研究課題名(英文) Exploring mid-IR marker bands relevant to conformational analysis of nucleic acid bases

研究代表者

三枝 洋之 (Saigusa, Hiroyuki)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科(八景キャンパス)・教授

研究者番号：90162180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：中赤外領域での振動スペクトルを測定することで、核酸塩基対の立体構造をより顕著に反映するようなマーカーバンドを見出すことを目的とした。対象はグアニンを含む塩基対、9-メチルグアニン2量体[(9MG)<sub>2</sub>]と9-メチルグアニン-1-メチルシトシンWatson-Crick (WC)型塩基対[(9MG)(1MC)]である。その結果、塩基対を生成したり水和したりすると内部座標の寄与の割合が大きく変化する。従って単純にCO伸縮に局在化した振動と帰属できないことを示しており、詳細なPED解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸塩基の高次構造を決定するためには、これまで共鳴ラマンスペクトルが多く用いられており、特に中赤外領域に現れる特徴的な振動バンド(ラマンマーカーバンドとよばれる)の解析が有効である。本研究では赤外スペクトルにおいても同様なマーカーバンドが存在すること、特に溶液中や結晶では困難な振動モードの詳細な解析が、気相における中赤外領域の振動バンドを観測することで可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We have tried to explore specific IR absorption bands in the mid-IR region which directly related to conformational structures of nucleic acid bases. The systems we studied are base pairs involving DNA base guanine, i.e., hydrogen-bonded dimer of 9-methylguanine, and Watson-Crick base pair formed between 9-methylguanine and 1-methylcytosine. It was found that contribution of the internal coordinate localized to CO stretching vibration of guanine to the normal mode is significantly decreased upon base pair formation and hydration. This result demonstrates that exploration of relevant IR marker bands requires more rigorous vibrational mode analysis based on PED (potential energy distribution).

研究分野：分子分光学

キーワード：核酸塩基 中赤外スペクトル 立体構造解析 マーカーバンド レーザー脱離

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで気相クラスターを用いて、核酸塩基対(水素結合型,スタッキング型),水和構造(塩基、糖への水和),糖やリン酸基の立体構造(syn、anti構造)などを赤外分光法により検討してきた。しかし、近赤外領域に現れる振動はNHやOH伸縮振動のような局在化したモードであるため、高次構造に関する直接的な情報を得ることが困難であった。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、中赤外領域での振動スペクトルを測定することで、核酸塩基対の立体構造をより顕著に反映するようなマーカーバンドを見出すことを目的とした。対象はグアニンを含む塩基対,9-メチルグアニン 2 量体[(9MG)<sub>2</sub>]と9-メチルグアニン-1-メチルシトシン Watson-Crick (WC) 型塩基対 [(9MG)(1MC)](Structure I 参照)である。

また6-チオグアノシン(6-TGs)とその1水和物(6-TGsW)について紫外と赤外分光法を用いて立体構造解析を行った。

Prodrug の一つとして知られている6-チ

オグアノシンは体内で代謝により6-TGsとしてDNAに組み込まれる。するとグアノシン(Gs)では吸収しないUVA領域の紫外光を吸収するようになり、DNAを破壊し皮膚がんを引き起こすことが知られている。本研究では6-TGsとその1水和物の互変異性構造と立体構造をGsと比較して検討した。

### 3. 研究の方法

これらの塩基対の生成はレーザー脱離超音速分子線法を用いて行った。まず紫外レーザーによる2光子共鳴イオン化法を用いてこれらの塩基対構造を選択的にイオン化した。電子基底状態における中赤外スペクトルの測定は赤外紫外2重共鳴法を用いた。これらの手法を組み合わせることにより質量分析と異性体構造を分離した赤外スペクトルの測定が可能になる。中赤外レーザー光はAgGaSe<sub>2</sub>結晶を用いてOPO/OPA system (LaserVision)のsignal光とidler光の差周波(1400-1900cm<sup>-1</sup>)を発生させることにより得た。

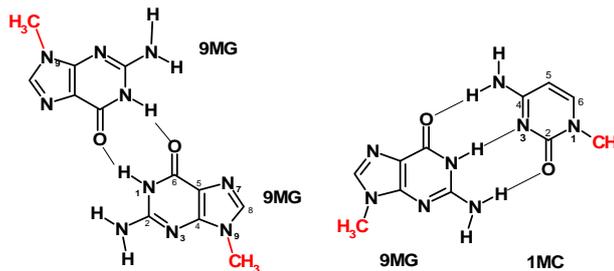
### 4. 研究成果

#### (9MG)<sub>2</sub>:

Fig.1(a)に(9MG)<sub>2</sub>の中赤外スペクトルを示す。UV励起に用いた波長(302.5nm)では、Structure I(a)の対称的な塩基対構造を選択的にイオン化できる。観測された3つのピークのうち1721cm<sup>-1</sup>のピークは計算スペクトル[Fig. 1(b)]との比較から、2つのC6O伸縮振動が反対称的(out-of-phase)に結合したバンドと帰属できる。しかしこの基準振動におけるC6O伸縮内部座標

(internal coordinate)の寄与の割合(PED)はそれぞれ-11%と12%であり、9MG単量体の場合[Fig. 1(c)]の58%に比べかなり低下していることがわかる。この振動モードにおける最も大きなPEDはN1Hを含む面内変角(β<sup>∠</sup>C6N1H)で22%と見積もられた。一方対称的結合(in-phase)の強度は殆どゼロであるため観測されない。1667と1646cm<sup>-1</sup>のピークは、2つのアミノ基変角(β<sup>∠</sup>NH<sub>2</sub>)が反対称結合したPEDの寄与が大きいことがわかる。この2つの振動モード違いは面内変角(β<sup>∠</sup>C2N1H)の位相が異なる点である。このように塩基対を生成したり水和したりすると内部座標の寄与の割合が大きく変化する。従って単純にCO伸縮に局在化した振動と帰属できないことを示しており、詳細なPED解析が必要である。

Structure I



(a) (9MG)<sub>2</sub>

(b) (9MG)(1MC) WC base pair

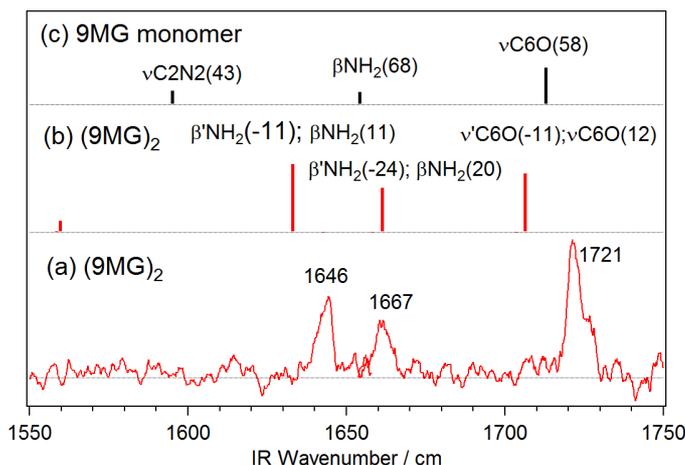


Fig. 1. (a) Mid-IR spectrum of (9MG)<sub>2</sub>, Calculated spectra of (b) (9MG)<sub>2</sub> and (c) 9MG. The sign (∠) in internal coordinates description is used to distinguish the two 9MG moieties.

### (9MG)(1MC):

Fig. 2 に(9MG)(1MC)の WC 型塩基対の赤外スペクトルを示す。(9MG)<sub>2</sub>の場合と同様、1700 cm<sup>-1</sup>付近の振動モードにおける 9MG の C6O 伸縮振動の PED は 19% に低下していることがわかる。この場合、面内変角( $\beta$ C2N1H)の寄与が 24%、アミノ基の面内変角( $\beta'$ NH<sub>2</sub>)が 22%となり、C6O に局在化した振動とみなすことはできない。

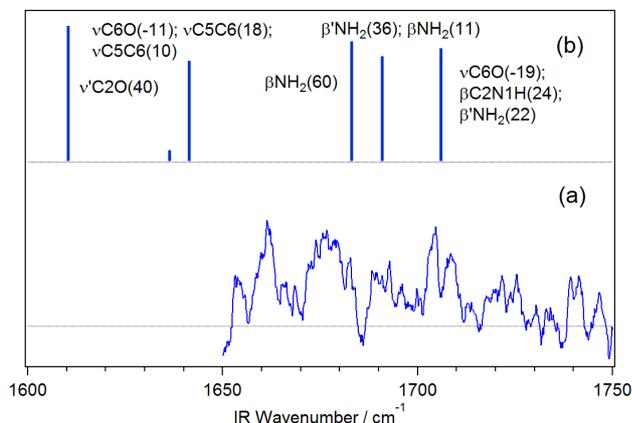


Fig. 2. (a) Experimental and (b) calculated IR spectra of (9MG)(1MC) WC base pair. The sign (') denotes internal coordinates associated with the 1MC moiety.

### 6-TG と 6-TGsW:

Fig. 3 に 6-TGs と 6-TGsW の紫外領域の電子スペクトルを比較して示す。6-TGs のスペクトルはGs に比べ大きくレッドシフトする。また 1 水和物では更に長波長にシフトし UVA の領域に入る。

6-TGs と 6-TGsW の立体構造を決定するために赤外スペクトルを測定した。6-TGs のスペクトルはGs に観られた enol-OH が消失するだけでその他の振動は殆ど変化しない。このことからこの構造は thiol 型構造であり、糖の 5'-OH が塩基の N3

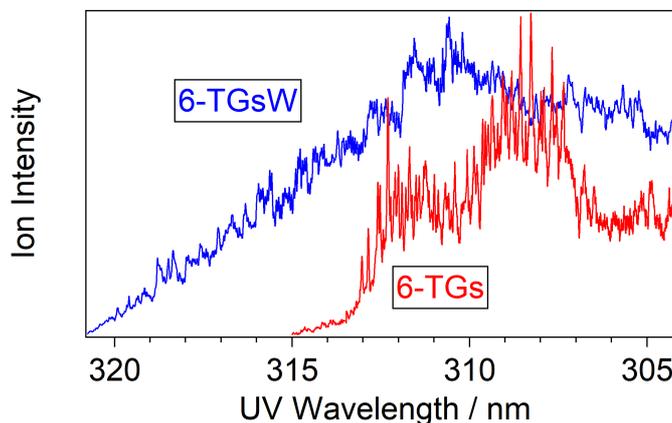


Fig. 3. UV spectra of 6-TGs and 6-TGsW.

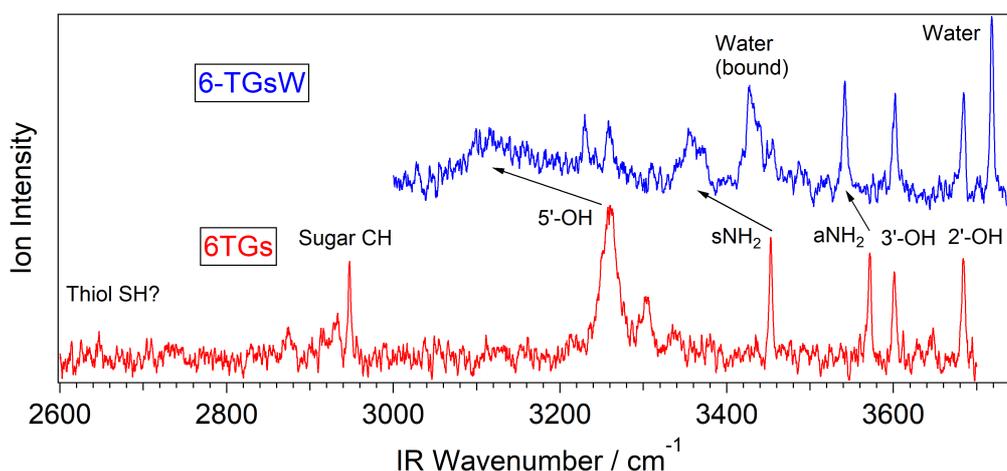
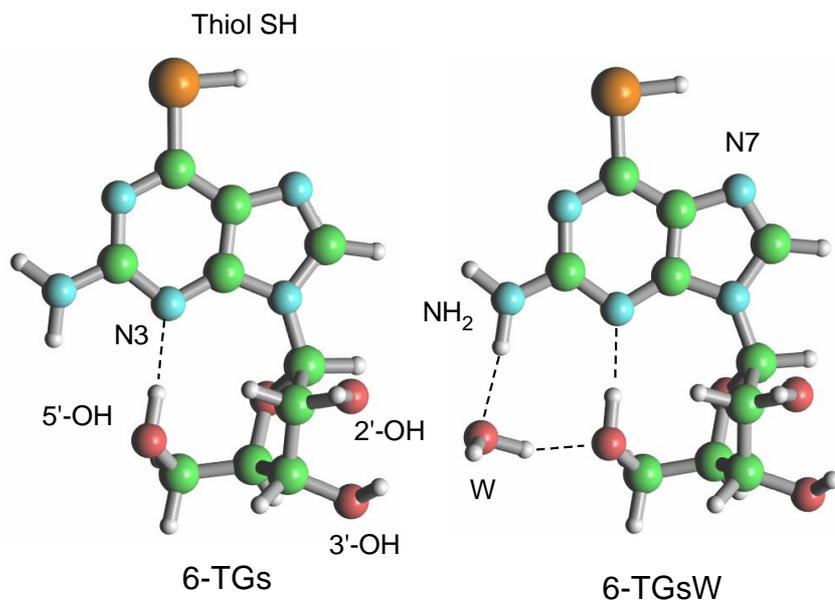


Fig. 4. IR spectra of 6-TGs and 6-TGsW.

に内部水素結合した最安定構造であることが分かる。

一方 6-TGsW では糖の 2'-OH と 3'-OH の振動数は全く変化しないが、アミノ基の対称と反対称伸縮振動のピークはレッドシフトする。また内部水素結合した 5'-OH のピークも更にレッドシフトしていることから、水分子はアミノ基と糖の 5'-OH に架橋した構造であることが分かる。Gs で観測された塩基の enol-OH と N7 に架橋した最安定な水和構造は観測されなかった。これは thiol-SH になると水素供与性が非常に小さくなり不安定となるためである。本研究で観

測された 6-TGs と 6-TGsW の構造を Fig. 5 に示す .



**Fig. 5.** Structures of 6-TGs and 6-TGsW observed in this study.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. H. Saigusa, S. Kitamura, A. Oyama, “Structural analysis of 6-thioguanosine and its monohydrate by UV and IR spectroscopy”, *J. Phys. Chem. B.* (査読有り , manuscript in preparation).

2. 三枝洋之, “芳香族分子錯体の電子励起ダイナミクス - 構造と励起エネルギーの関係 -”, *分光研究*第 67 巻第 6 号, 233-235 (2019) . (査読有り)

3. H. Asami, M. Tokugawa, Y. Masaki, S. Ishiuchi, E. Gloaguen, K. Seio, H. Saigusa, M. Fujii, M. Sekine and M. Mons, “Effective strategy for conformer-selective detection of short-lived excited state species: Application to the IR spectroscopy of the N1H keto tautomer of guanine”, *J. Phys. Chem. A*, **120**, 2179–2184 (2016). (査読有り)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 三枝洋之, 北村佐樹, 小山歩美 “6-Thioguanosine とその 1 水和物の紫外及び赤外分光 - Guanosine との比較”, 第 13 回分子科学討論会名古屋 2019, 名古屋大学, 2019 年 9 月 17-20 日 . (口頭発表予定)

2. 三枝洋之, 小山歩美 “核酸塩基対生成に特徴的な赤外マーカーバンドの探索”, 第 12 回分子科学討論会福岡 2018, 福岡国際会議場, 2018 年 9 月 10 日 . (ポスター発表 1P16)

3. H. Saigusa, “Gas-phase Study of Hydrogen-bonding Interaction in Clusters of Biological Molecules Using IR Spectroscopy”, *Spectroscopy and Dynamics of Molecules and Clusters SDMC 2018*, Doors, India, February 13-19, 2018. (Invited talk)

4. 小山歩美, 三枝洋之 “赤外 - 紫外二重共鳴分光法による 5-プロモウラシルとグアニン間の誤塩基対の立体構造解析”, 第 11 回分子科学討論会仙台 2017, 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市), 2017 年 9 月 15-18 日 . (ポスター発表 2P008)

5. 小山歩美 三枝洋之 “5-プロモウラシルとグアニン間の誤塩基対の理論的解明”, 第6回 CSJ フェスタ 2016, タワーホール船堀(東京都江戸川区), 2016年11月14-16日(ポスター発表).

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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、研究者個人に帰属されます。