

平成 21 年 5 月 22 日日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790030
 研究課題名 (和文) 温度制御による結晶化を利用した DNA 薬剤に関する X 線結晶解析
 研究課題名 (英文) X-ray crystallographic analysis of DNA using temperature-control crystallization technique
 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

研究成果の概要：本研究の目的は、独自に開発した温度制御による結晶化法を用いることにより DNA の X 線結晶解析の効率を飛躍的に向上させ、構造に基づいた核酸系薬剤のドラッグデザインへの基盤を確立することにある。今回の研究では、(1)温度制御結晶化法を結晶成長学的な観点から実証して、(2)これに基づいた B 型・Z 型 DNA の結晶化と高分解能 X 線結晶構造解析を行い、(3)薬剤設計の基本となる特殊な DNA (デオキシ型リボザイム・ミニヘアピン DNA・ボロン化合物を導入した DNA) の結晶化を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	700,000		700,000
2007年度	1,400,000		1,400,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,900,000	240,000	3,140,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：物理化学

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA の構造研究の現状

X 線結晶解析は生体分子の立体構造決定において 80%以上のシェアをもつ有力な実験法である。特に蛋白質については、2002 から 2006 まで文科省による“タンパク 3000 プロジェクト”が進められ、バイオ産業への応用を目的として 2,500 の立体構造が決定された。その一方で、DNA についてはこの様なプロジェクトは行われていない。その一番の理由として、X 線結晶解析に必要な DNA の結晶の作成(結晶化)が非常に難しいことが挙げられる。DNA の結晶化では、一般に数種類の試薬(アルコール、金属塩、ポリアミン等)の混合

物が使用されるが、良質の単結晶を得るためには様々な混合比を試す必要がある。このために結晶化に要する時間と労力が大きくなり、X 線結晶解析のボトルネックとなっているのである。

(2) 新しい DNA 結晶化法

これを解決するために、私は結晶化を従来の混合比ではなく温度で制御することを発案した。水溶液中の DNA 分子は、温度が上昇すると変性して溶解度が大きくなる。結晶化に用いられる DNA 分子の変性温度(T_m)は 50-80°C の範囲であり、この近辺で温度を変化させれば結晶が得られると仮定した。実際に結晶化を行ったところ、Z-DNA ($T_m=75^\circ\text{C}$)で

温度により極端に変化する溶解度曲線が得られた。この新しい結晶化法は、これまでの DNA 結晶化の労力を軽減しその成功率を著しく向上させることが期待できる。

(3) 本結晶化法の薬剤開発への応用

本結晶化法を利用することで DNA の立体構造解析がより容易になり、DNA 薬剤に関わる特異な立体構造を解析することが可能となる。本研究では、本結晶化法の理論的な実証と応用実験を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この結晶化法を用いて DNA の X 線結晶解析の効率を向上させ、構造に基づいた核酸系薬剤のドラッグデザインへの基盤を確立することにある。その試金石として、以下の研究目標を設定した。

- (1) 温度制御法の結晶成長学からの検討
- (2) (1)に基づいた、高分解能 X 線結晶構造解析による DNA の A 型⇌B 型⇌Z 型の構造転移についての調査
- (3) 薬剤設計の基本となる特殊な DNA (デオキシ型リボザイム・ミニヘアピン DNA・ボロン化合物を導入した DNA)の結晶化

3. 研究の方法

(1) DNA サンプルについて

表 1 に示した 6 種類の DNA を実験に用いた。これらの受託合成 DNA されたものを、FPLC によるゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex-G10) で精製して、純度 99%以上、塩濃度 0.1mM であることを確認した後に結晶化実験に使用した。使用後の DNA は回収して再精製を行い、再利用した。

表 1. 実験に用いた DNA

配列	種類
A d(CGCGCG)	二重らせん (B 型/Z 型)
B d(CGCGAATTCGCG)	二重らせん (B 型)
C d(GCGAAAGC)	ミニヘアピン
D d(CGAA)	ミニヘアピン
E d(CTGAAGGGGCTAGCTACAACGAT TCTTCCT) d(AGGAAGAAGCCCTTCA G)	デオキシリボザイム
F d(CATATACTCCGAGCCGGTCGAACA CGTCGC) d(GCGACGTGAGGTATATG)	デオキシリボザイム

(2) 溶解度と変性温度の測定

温度制御法を結晶成長学の観点から検証するため DNA の溶解度と変性温度の測定を行った。両測定は結晶化溶液と同じ条件で行

った。DNA の溶解度曲線は、20°C で結晶が析出した DNA 溶液を 75°C まで熱しながら DNA 濃度を測定することにより求めた。変性温度は 25°C から 80°C まで DNA 溶液を熱しながら 260nm の吸収光度を測定することにより求めた。

(3) 温度制御による DNA の結晶化

温度制御による結晶化は、5 μ l の結晶化溶液を 96 穴プレートに入れて、蒸発を防ぐために 20 μ l のパラフィンオイルで覆った後、75°C から 25°C まで 5°C/day で冷却することにより行った。結晶化溶液は以下の 4 種類を用いた。

- 1) 10 % MPD, 20mM MgCl₂
- 2) 10 % MPD, 200mM MgCl₂
- 3) 30 % MPD, 20mM MgCl₂
- 4) 30 % MPD, 200mM MgCl₂

*共通の条件は 5mM DNA, 40mM buffer (pH7.0), 12mM spermine, 40mM NaCl

また、らせん構造転移の結晶化は、金属イオン(Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺)や spermine を低濃度から高濃度まで変化させた一次元のスクリーニングをイオン別に行った。

(4) X 線結晶構造解析

X 線回折実験は高エネルギー加速器研究機構の PF および、Spring-8 の放射光を用いて行った。得られた X 線回折像は研究室の Linux 上で Mosflm と SCALA により処理を行い、AMoRe による位相決定と Phenix による構造精密化を行った。特殊な構造が見られた場合には、NAMD2 による MD 計算でその構造が構造化学的に安定であるかの検討を行った。

4. 研究成果

(1) 温度制御法の結晶成長学からの検討

DNA d(CGCGCG)の溶解度から、van't Hoff plot を作成した(図 1)。これによると、結晶析出によるエンタルピー変化量(ΔH)は 313-318K の間で約 5 倍になっており、二つの結晶成長過程があることを示唆している。

これと熱変性曲線(図 2)を比べると、van't Hoff plot のエントロピー変化量の切り替わる温度(315K)と付近で DNA が溶液中で二重らせんから一重らせんに変化している($T_m=323K$)ことがわかる。これは、溶解度変化がらせん構造の変化に大きな影響を受けており、また、多くの DNA を水溶液中に溶解させることが出来る(ΔH (高温)= 61.8kJ/mol、 ΔH (低温)=12.9kJ/mol)ことを示している。

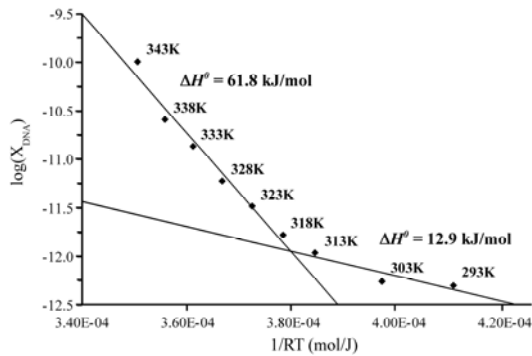


図 1. DNA 6 量体の結晶析出の van' t Hoff plot

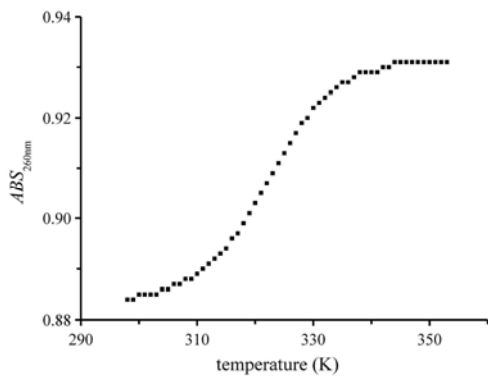


図 2. DNA 6 量体の熱変性曲線

これらの情報に基づいて DNA の結晶化を 75°C⇒20°C の温度制御 (-5°C/day) で行った。この結果、20mM MgCl₂-10% MPD で大型の単結晶を得ることに成功した(図 3)。この結晶は 323K で既に析出しており、正に DNA の二重らせん⇒一重らせんによる溶解度変化を利用した結晶化であると結論できる。

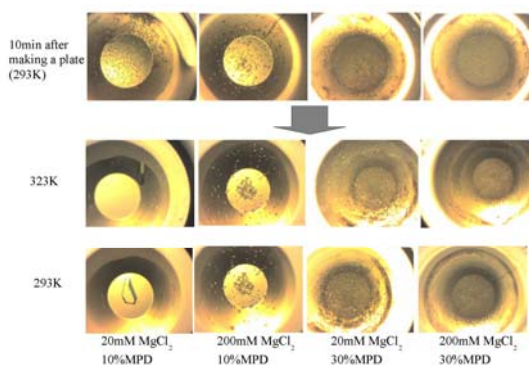


図 3. DNA 6 量体の温度制御による結晶化

(2)高分解能 X 線結晶構造解析による DNA の B 型⇌Z 型の構造転移についての研究

Z⇒B 型のらせん構造変化を調べるために行ったスクリーニングで良好な結果を得ることが出来た。図 4 は DNA d(CGCGCG) の Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ イオンでの結晶化結果である。

Na⁺では低濃度から高濃度まで全般にわたって、Mg²⁺と Ca²⁺での高濃度側で結晶を得ることが出来た。これらの結晶構造を 1.0–1.2Å の高分解能で決定することが出来た。この結果、これまで溶液実験で予測されていた様に、塩濃度が立体構造に影響を与えて二重らせんの形状を変化させていることがわかった。

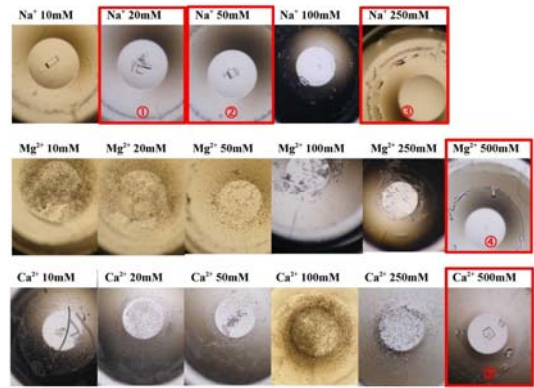


図 4. DNA 6 量体の結晶化結果

金属イオンが、Na⁺が 50mM 以下しか含まれていない極低塩状態では、DNA d(CGCGCG) の CpG 間にあるリン酸基の向きが二種類観測された(図 5)。このリン酸基は通常は図 6 の左図の様いらせんの外向きに配置されている。これが、低塩下では外向きと内向きの二種類が混在する形に変化している。これは CpG 間のリン酸基が低塩下で構造の揺らぎを起こしていることを示唆している。この構造揺らぎは、Z 型らせん(高塩状態で有利)から B 型らせん(低塩状態で有利)に切り替わる際の最初のトリガーであると予測している。

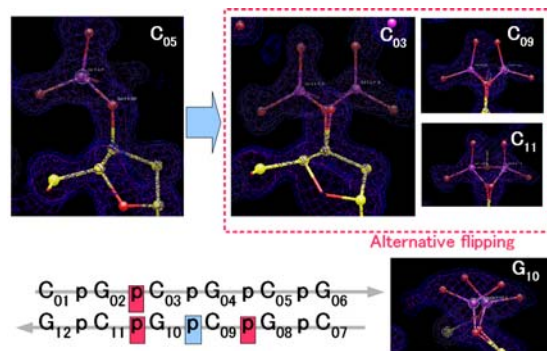


図 5. 極低塩状態での Z-DNA のリン酸基にみられる構造揺らぎ

一方、塩が過剰に含まれる状態でも興味深い構造を観察することが出来た。二価の金属イオン(Mg²⁺, Ca²⁺)が 500mM 以上含まれていると、これまでに観測されていなかった対

称を持つ結晶が得られた。この結晶は空間群 $P3_2$ であり、結晶の c 軸方向に DNA が一列に連なった構造をとっている(図 6)。特に隣り合うリン酸基の間は二つの 2 価金属イオンにより架橋されており、この相互作用によって、DNA は狭い空間内に密に詰まった構造をとっている。これは DNA が錠剤などの固形状態にある時の予想構造を示唆している。

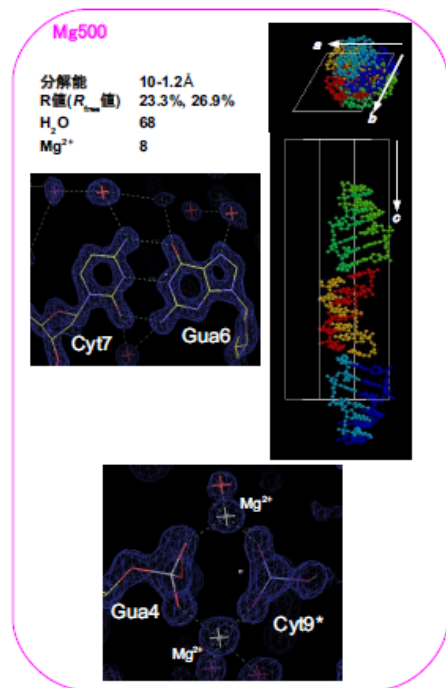


図 6. 極高塩状態でのリン酸基と金属イオン (Mg^{2+}) の相互作用と密なパッキング

これらの結晶は、従来の結晶化法では得ることが困難であった。今回の温度制御結晶化法を用いることにより、このような特殊な結晶を観察することが出来る。これらの情報は、構造転移の中間状態を調べる手がかりとなることが期待される。

(3) 薬剤設計のための特殊な DNA の結晶化

今回の結晶化法を薬剤に関わる特殊な DNA に応用した結果、幾つかのサンプルで単結晶が析出した(図 7)。

ミニヘアピン DNA は DNA が小さなループ型の構造をとっている DNA 配列であり、X 線構造はまだとかれていない。二種類の配列 (CGAA、GCGAAAGC) について、3. (3) で示した 4 種類の結晶化溶液からの 1 つから単結晶が析出した。また、放射医療に用いるボロン化合物を DNA に導入したサンプルからも単結晶を得ている。

B-DNA については温度を下げる速度が速すぎたためか、集合晶になっているが、これに

ついては温度の下降速度を調節することにより、結晶の質を改善できると思われる。デオキシリボザイムについても結晶性の析出物があり、これについても温度調節により X 線解析が可能な単結晶を得られると思われる。

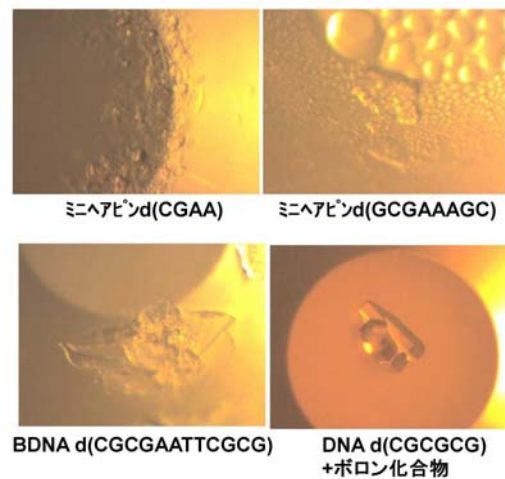


図 7. 薬剤関連 DNA の結晶化結果

(4) 今後の研究

今回の研究により、結晶化法は確立した。また、様々な DNA の結晶を得ることに成功している。現在、結晶化技術をまとめた論文を学術誌に投稿中(5/21 現在)である。今後は、得られた Z-DNA の高塩状態、低塩状態での立体構造について、成果をまとめて論文を投稿する予定である。また、現時点で結晶が得られている、薬剤関連の DNA については X 線回折実験と立体構造決定を行い、研究を進めていく。

(5) 研究の多方面への波及効果

今回の研究を進める上で、結晶の取り扱いや高分解能解析のための計算法などの改良が必要であった。この改良は DNA の構造解析だけでなく、タンパク質の高分解能解析にも応用することが出来る。

今回の研究では、幾つかのタンパク質解析に本研究のために開発した技術を応用することが出来た。これにより、幾つかの成果が得られている(発表論文の項を参照)

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 件が査読有り)

① Matsumoto F, Maeda K, Chatake T, Maeda Y,

2007年12月2日 東京都

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

- Fujiwara S. Functional aberration of myofibrils by cardiomyopathy-causing mutations in the coiled-coil region of the troponin-core domain. *Biochem Biophys Research Communication* **382**, 205-209 (2009) (査読有).
- ② Chatake T, Higuchi Y, Mizuno N, Tanaka I, Niimura N, Morimoto Y., Hydrogen bonds of DsrD protein revealed by neutron crystallography. *Journal of Synchrotron Radiation*. **15**, 277-280 (2008) (査読有).
- ③ Ishikawa T, Chatake T, Morimoto Y, Maeda M, Kurihara K, Tanaka I, Niimura N. An abnormal pK(a) value of internal histidine of the insulin molecule revealed by neutron crystallographic analysis. *Biochem Biophys Research Communication* **376**, 32-35 (2008) (査読有).
- ④ Kovalevsky AY, Chatake T, Shibayama N, Park SY, Ishikawa T, Mustyakimov M, Fisher SZ, Langan P, Morimoto Y. Preliminary time-of-flight neutron diffraction study of human deoxyhemoglobin. *Acta Crystallogr.* **F64**, 270-273 (2008) (査読有).
- ⑤ Chatake T, Shibayama N, Park SY, Kurihara K, Tamada T, Tanaka I, Niimura N, Kuroki R, Morimoto Y. Protonation states of buried histidine residues in human deoxyhemoglobin revealed by neutron crystallography. *Journal of American Chemical Society* **129**, 14840-14841 (2007) (査読有).
- ⑥ Chatake T, Morimoto Y. Protocol of refinement in neutron crystallographic analysis 日本中性子科学会誌 **17**, 216-217 (2007) (査読無).

[学会発表] (計3件)

①(招待公演)

発表者：茶竹俊行

温度制御によるDNAの結晶化とその応用
タンパク質結晶育成研究会

2009年3月6日 東海村(茨城県)

②(ポスター発表)

発表者：Chatake, Ishikawa, Morimoto.

Crystal Structures of Z-DNA complexed with Ca²⁺ ion, and Mg²⁺ ion

XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography

2008年8月25日 大阪市(大阪府)

③(ポスター発表)

発表者：石川卓哉・森本幸生・茶竹俊行

金属イオンがDNA構造に与える影響

日本結晶学会年会