

機関番号 : 22701

研究種目 : 基盤研究 (B)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20350012

研究課題名 (和文) 赤外振動スペクトルと量子化学計算による核酸塩基高次構造の決定

研究課題名 (英文) Structural characterization of supramolecular nucleic acid structure based on IR vibrational spectroscopy and quantum chemical calculation

研究代表者

三枝 洋之 (SAIGUSA HIROYUKI)

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号 : 90162180

研究成果の概要 (和文) :

新規レーザー脱離法を開発することにより、核酸塩基対や塩基に糖の結合したヌクレオシド、及びこれらの水和物を中性状態で気相孤立化し、その微細構造を紫外及び赤外振動分光法と量子化学計算を駆使して決定することを行った。更に、塩基に糖-リン酸基バックボーンの結合したヌクレオチドを化学修飾することにより、レーザー脱離法により非破壊的に気化し、その高次構造を決定することに成功した。

研究成果の概要 (英文) :

We have developed laser desorption technique for generating hydrated clusters of the DNA base pairs and those of *nucleoside* molecules consisting of base and sugar group, and performed structural characterization based on UV and IR spectroscopy combined with quantum mechanical calculation. We have also implemented this method for vaporizing a *nucleotide* having sugar-phosphate backbone, and identified the formation of a supramolecular structure.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	11,000,000	3,300,000	14,300,000

研究分野 : 化学

科研費の分科・細目 : 基礎科学・物理化学

キーワード : クラスタ

1. 研究開始当初の背景

生体分子とその機能の発現との関連性を明らかにするためには、生体中の複雑な環境から分離した孤立状態と比較することが鍵となる。この目的のため研究代表者(三枝)らは、塩基のような熱的に不安定な生体分子をレーザー脱離法により気化し、超音速分子線法と組み合わせることで気相クラスタを生成させる手法を開発した。その結果、生体分子の機能やそれを取り巻く水分子の役

割を分子レベルで検討することが可能な段階となった。このような状況に基づいて、塩基や塩基対とそれらの水和物の微細構造を決定することが早急の課題であると認識し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、核酸塩基や塩基対とそれらの水和物を気相孤立化し、その微細構造を赤外振動分光法により決定することを目的とし

た。このような微細構造は従来の NMR や X 線回折では得ることができない情報であり、機能との関連性についてより詳細な議論が可能となるため、今後の飛躍的な発展が期待される。更に、塩基ヌクレオチド（糖鎖とリン酸基が結合した塩基）など、より生体中に近い塩基のクラスターへと展開することで、DNA の紫外線損傷や光化学反応過程を分子レベルで解明すること試みる。

3. 研究の方法

1. これまでに開発したレーザー脱離法を用いて核酸塩基対とその水和物を生成し、それぞれの異性体について赤外振動スペクトルを測定する。
2. 測定した振動スペクトルを量子化学計算と比較することで、異性体構造および水和構造を決定する。特に、塩基同士が水素結合型構造（塩基対）をとる場合と、積み重なったスタッキング構造をとる場合があるが、計算と比較することでそれらの安定性を検討する。
3. それぞれの構造に対する水和の違いを調べる。
4. 塩基の水和構造が決定できると、水和により塩基分子の双極子モーメントがどのように変化するかを計算できる。このことでタンパク質が塩基配列を認識する際に、水和による双極子モーメントの変化が関与しているのではないかという推測に対して、新たな知見が得られるものと期待される。

4. 研究成果

(1) グアニンヌクレオシドの糖を含む高次水和構造の解明 [論文 4-5]

RNA は DNA に比べ 2'-OH 基に水素結合するだけで多数の水分子を結合するから、DNA 以上に構造が硬い”（ヴォート“基礎生化学”）とされている。本研究では、このような核酸塩基の水和構造を分子論的な観点から考察するために、独自に開発したレーザー脱離-超音速分子線法によりグアニンヌクレオチド（グアノシン、Gs）の水和クラスターを生成することに成功した。更に、赤外-紫外二重共鳴分光法と量子化学計算を用いて、塩基や糖を含む高次水和構造が存在することを示した。

本研究では、Gs と 2'-デオキシグアノシン (2'-dGs) の電子スペクトルを測定することに

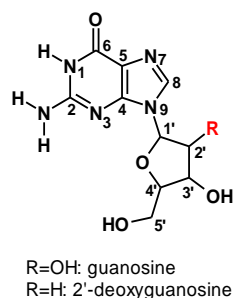


図 1. Gs と 2'-dGs のアミノケト構造。

成功した。これらを比較することで、Gs の二水和物には特異的な水和構造が存在すると推定した（論文 5）。そこで Gs の一水和と二水和物の赤外スペクトルを測定し、その微細構造を検討した。図 2 に示した二水和物の赤外スペクトルはややブロードで、電子スペクトルで分離できない異性体がいくつか存在することが示唆される。特に 2'-OH, 3'-OH 基による強度が減少していることから、この 2

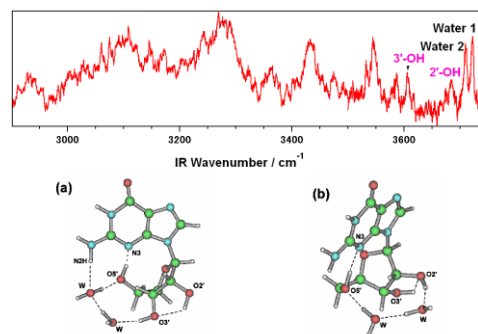


図 2. Gs 二水和物の赤外スペクトルと水和殻構造 (a, b).

つの OH 基の関与した水和構造であると推測される。

そこで量子化学計算を行ったところ、(a)と(b)のような Gs に特有の二水和構造が安定であることがわかった。(a)の構造では、3'-OH と 5'-OH の間に水 2 量体が架橋し、更に 2'-OH が 3'-OH に結合し、塩基も含めた水素結合ネットワーク（水和殻）が形成されている。一水和物の場合は、3'-OH の水素が 2'-OH の酸素原子に水素結合しているが、(a)の 2 水和構造では逆に 2'-OH の水素が 3'-OH の酸素に結合し、水素結合の”スイッチング”が起こっている。また(b)は 2'-OH と 5'-OH が水 2 量体により架橋した構造で、3'-OH が 2'-OH に水素結合することでネットワーク構造が安定化されている。この他に 1 水和物(c)に相当する二水和構造も安定であることを考慮すると、図 2 のスペクトルを解釈できる。

2'-dGs の場合このような水素結合ネットワークは形成できないため、塩基に水和した 2 水和構造の方が安定と予想されるが、実験結果（論文 3）はこれを裏付けている。

(2) グアノシンと 2'-デオキシグアノシンの微視的水和構造の違い [論文 3]

DNA は水和により構造が変化することが知られており、その理由の一つとして 2'-OH 基がないため 2'-デオキシリボース基へ水合しにくいことがあげられる。

そこで本研究では、2'-dGs の水和クラスターをレーザー脱離-超音速ジェット法により生成し、その構造を赤外-紫外二重共鳴分光法と量子化学計算を用いて決定した。その結果から、Gs と 2'-dGs の微視的水和構造の

違いを検討した。

2'-dGsの一水和物にはいくつかの構造異性体が観測されたが、いずれもGsの場合と本質的な違いはないことが明らかとなった。一方、図3に示した二水和物(2'-dGsW₂)の赤外スペクトルには、Gsと2'-dGsで顕著な違いがみられる。特に、(b)に示した2'-dGsW₂の場合、(a)のGsの二水和物(GsW₂)に見られるエノールOH伸縮振動(3587 cm⁻¹)による吸収が観測されない。また、3'-OHの伸縮振動は、2'-dGsW₂では強く現れる(3662 cm⁻¹)が、GsW₂

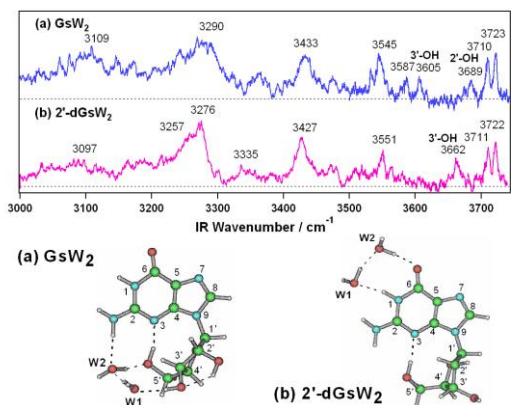


図3. (a) Gs 二水和物と(b) 2'-dGs 二水和物の赤外スペクトル(上) と帰属された水和構造(下)。

では 3605 cm⁻¹ に弱く観測される。このことから、2'-dGsW₂では、3'-OH 基は水和に関与していないことがわかる。量子化学計算により得られた赤外スペクトルとの比較から、この二水和物は(b)に示すようなケト体の N1H と O6 に水二量体が架橋した構造であると帰属した。この塩基に水和した構造は計算で得られた最安定構造であり、2'-デオキシリボース基をメチル基で置換した 9-methylguanine (9MG)でも観測される。

GsW₂の場合、3'-OH と 5'-OH の間に水二量体が架橋し、更に 2'-OH が 3'-OH に結合し、塩基も含めた水素結合ネットワーク(水和殻)が形成されるため(a)の構造が最安定となる。従って (a)の赤外スペクトルはこのような糖に水和した構造を持つケト体とそのエノール互異性体が共存しているとして説明できる。一方、2'-OH が存在しない 2'-dGs では、塩基に水和した(b)の二水和構造の方が安定となり優先的に観測されたと考えられる。また実際の DNA 中では、N1H と O6 位はシトシンとのワトソン-クリック型水素結合形成に用いられ水和することができない。そこで、このような塩基対の水和クラスターを生成しその構造を決定することも試みた(論文2)。

もう1つ注目すべきことは、図1に示したアミノ-ケト体の単量体は、本研究で用いたナノ秒レーザーによる二光子共鳴イオン化

(R2PI)法では観測されていない。これは、電子励起状態から基底状態への超高速緩和過程が存在し効率よくイオン化できないためとされている。しかし、図3に示したようなアミノ-ケト体の水和物は同じ手法で観測できることから、水和が電子励起状態の緩和過程に大きく影響していることが示唆される。またこのアミノ-ケト体は、シトシンと塩基対を形成するとナノ秒レーザーR2PI法でも観測できるようになり、水和や塩基対生成が励起状態ダイナミクスに及ぼす影響についても興味を持たれる。

(3) 核酸塩基対構造に対する水和の影響 [論文2]

近年、X線や中性子線によるDNAやRNAの構造解析の高分解能化により、周りの水和構造が明らかにされつつある(図4)。しかしこれらの水分子が、塩基対構造形成や機能発現にどのように影響するかを知ることは簡単ではない。

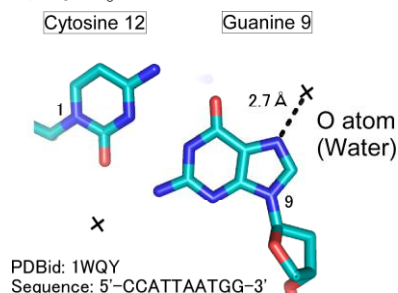


図4. B-DNAのX線結晶構造。回折分解能 2.0 Å. x は水分子の酸素原子を示す。

本研究では、塩基対の構造と水和との関係を明らかにすることを目的とし、塩基対の水和クラスターを生成し、赤外分光法により構造決定を行った。更に、水和によりスタッキング構造が安定化するという理論的予測についても検討した。

対象とした塩基対は、グアニン-グアニン(G-G)とグアニン-シトシン(G-C)で、それぞれの一水和物をレーザー脱離-超音速ジェット法により用いて生成させた。この場合、塩基の互変異性化や糖-リン酸基バックボーンへの水和を抑えるために、Gの9位とCの1位をメチル基で置換した塩基(9MGと1MC)を用いている。

図5に9MG塩基対とその一水和物の赤外スペクトルを比較した。無水和物の場合[図5(a)]には、アミノ基の伸縮振動が対称、反対称それぞれ1本ずつしか観測されないが、水和すると2つに分裂する[図5(b)]。計算結果との比較により、図6(a)に示すような対称的平面構造(最安定)に水和したものであると結論した。また、量子化学計算によると、図6(b)に示したスタッキング構造も平面型と殆ど等エネルギーとなるが、本実験では観

測できなかった。

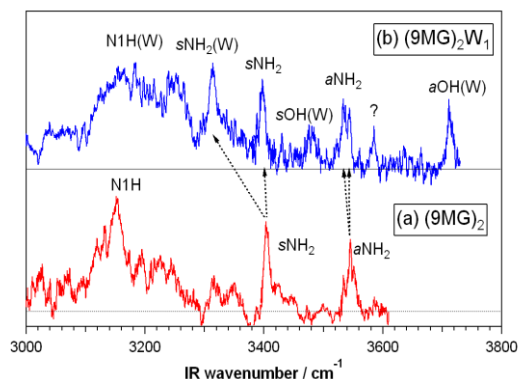


図5. 赤外スペクトル. (a) 9MG 塩基対, (b) 一水和

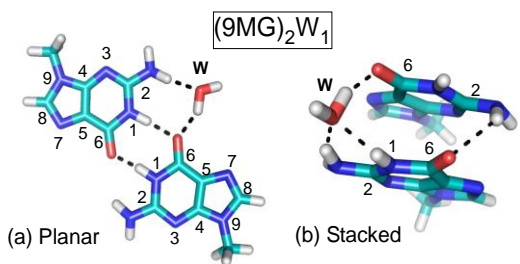


図6. 9MG 塩基対の一水和物の最安定構造.

一方、9MG-1MC 塩基対の一水和物では、赤外振動スペクトル解析により、図7に示したWatson-Crick(WC)型平面構造の異なるサイトに水和した2つの異性体が共存していることが示唆された。計算によると、これら2つの構造はほぼ等エネルギー的で最安定となった。9MG-1MC 塩基対の場合、スタッキング構造はWC型に比べてかなり不安定であり、水和してもWC型ほど安定にはならない。図7(a)の水和構造は、図4のB-DNA中のもので対応しているように見えるが、全く同じではない。

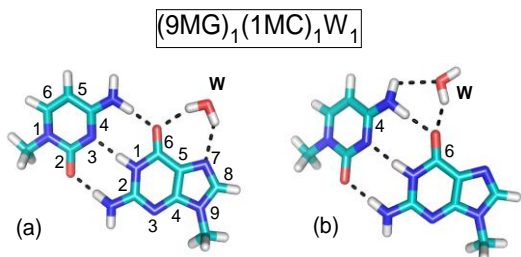


図7. 9MG-1MC 塩基対の一水和物の最安定構造.

今後、DNAの水和について、水素結合強度や方向性など考慮した詳細な議論ができるようになると期待される。

(4) 核酸塩基ヌクレオチドの気相孤立化と高次構造の観測 [論文1]

DNAの二重らせん構造は、4つの核酸塩基

(A/T/G/C)がWC型塩基対として認識されることを利用して形成される。しかしこのような分子認識機能の発現には、塩基単体だけではなくバックボーン鎖を構成する糖-リン酸基の立体構造が重要な役割を果たしている。本研究では、塩基と糖-リン酸基が結合した塩基ヌクレオチドをレーザー脱離法により非破壊的に気化し、その立体構造を赤外振動分光法により決定した。

レーザー脱離法を用いてリン酸基を含むヌクレオチドを気化すると、脱プリン化反応が

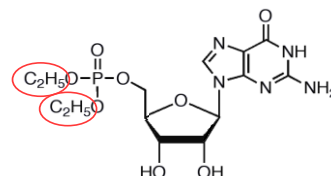


図8. GMPのエステル化.

起こり分解してしまう。そこで、早川芳宏教授(愛知工業大学工学部)と塚本眞幸博士(名古屋大学情報科学)の協力により、リン酸基をエステル化(図8)することでこの分解反応を抑制することを試みた。

図9に、グアノシン-リン酸(GMP)をレーザー脱離した後、R2PI法により得られた質量スペクトルを示す。親イオンのピーク($m/z=363$)は観測されず、脱プリン化したグアニン($m/z=151$)が生成する。一方、リン酸基をジエチルエステル化したGMP(diEtGMP)では、親イオン($m/z=419$)とその水和物(diEtGMP)₁(H₂O)_nが観測され、フラグメンテーションは全く起こらない。更に、ヌクレオチドはリン酸基を持つため非常に水和しや

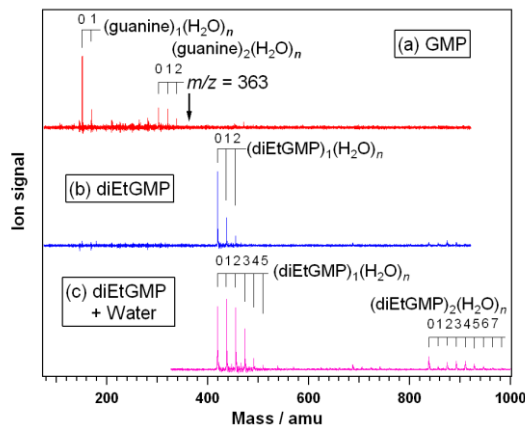


図9. (a) GMP と (b) diEtGMP の質量スペクトル. (c)は、diEtGMP 脱離の際に水蒸気を混入させて測定.

すく、脱離の際に水蒸気を混合させると図9(c)に示すような高次の水和クラスターも観測される。また、一つだけエステル化したモノエチル体では、親イオンがわずかに観測された。

次に、孤立冷却した diEtGMP のコンフォ

メーションを赤外振動分光法により決定することを試みた。図 10 に、diEtGMP とリン酸基のない Gs の赤外スペクトルを比較した。3586 cm^{-1} にグアニン塩基エノール体の OH 伸縮振動が観測され、Gs と同様にエノール互変異性体であることがわかる。しかしアミノ基の 2 つの伸縮振動は Gs に比べ低波数にシフトしており、リン酸基との間で内部水素結合が形成されたことを示している。

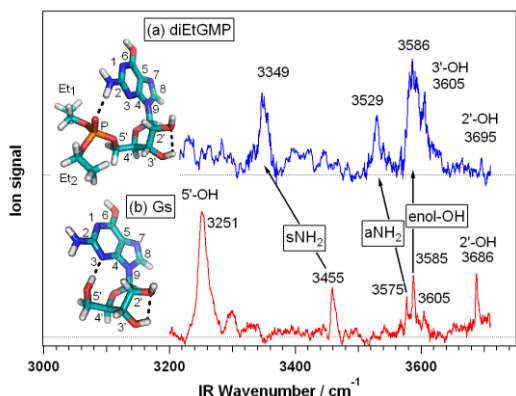


図 10. (a) diEtGMP と (b) Gs の赤外スペクトル。

この手法を用いると、2 つ以上の塩基がリン酸基で結合したポリヌクレオチドへの展開も視野に入り、糖 - リン酸基が持つ立体選択性を利用した高度な塩基対認識機能の発現へと展開できる可能性が開ける。

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 7 件)

[査読有]

1. H. Asami, M. Tsukamoto, Y. Hayakawa and H. Saigusa, “Gas-phase Isolation of Diethylguanosine 5'-monophosphate and Its Conformational Assignment”, Phys. Chem. Chem. Phys. (communication), 12, 13918-13921 (2010).
2. S. Urashima, H. Asami, M. Ohba and H. Saigusa, “Microhydration of the Guanine-guanine and Guanine-cytosine Base Pairs”, J. Phys. Chem A (invited article), 114, 11231-11237 (2010). [Most Read Articles].
3. H. Asami, S. Urashima and H. Saigusa, “Hydration Structures of 2'-Deoxyguanosine Studied by IR-UV Double Resonance Spectroscopy: Comparison with Guanosine”, Phys. Chem. Chem. Phys., 11, 10466-10472 (2009).
4. H. Saigusa, S. Urashima and H. Asami, “IR-UV Double Resonance Spectroscopy of the Hydrated Clusters of Guanosine and

9-Methylguanine: Evidence for Hydration Structures Involving the Sugar Group”, J. Phys. Chem. A., 113, 3455-3462 (2009).

5. H. Saigusa, N. Mizuno, H. Asami, K. Takahashi and M. Tachikawa, “Ultraviolet Spectroscopy and Theoretical Investigations of Mono- and Dihydrated Clusters of the Guanine Nucleosides. Different Hydration Structures for Guanosine and 2'-Deoxyguanosine”, Bull. Chem. Soc. Jpn., 81, 1274-1281 (2008).

[査読無]

1. R. Kikkawa, Y. Inokuchi, T. Ebata and H. Saigusa, “Mass Spectrometry for Nonvolatile Functional Molecules by Laser Desorption/Vacuum-Ultraviolet Photoionization Method”, BECKNIK (ロシアオレンブルグ大学紀要) (2011).
2. 三枝洋之, “レーザー脱離法による核酸塩基ヌクレオチドの気相孤立化 —リン酸基のエステル化による非破壊性向上”, 横浜市立大学叢書 61巻, 91-100 (2011).

[学会発表] (計 22 件)

[国際学会]

1. Contributed talk, H. Saigusa, Pacificchem 2010 Congress (842124), “Microhydration of the guanine nucleosides and base pairs”, Honolulu, Hawaii Dec 16, 2010.
2. Poster, H. Asami and H. Saigusa, Pacificchem 2010 Congress (872314), “Effects of hydration on the base pair structures of guanine - Stacked vs. planar base pairing”, Honolulu, Hawaii Dec 17, 2010.
3. Poster, Y. Ito, A. Yamaguchi, S. Koseki, Y. Fujimura, H. Kono, N. Shimakura, H. Saigusa, Pacificchem 2010 Congress (656), “Radiationless decay of thymine and uracil: Difference in lifetimes between the two systems”, Honolulu, Hawaii Dec 17, 2010.
4. Poster, H. Asami, H. Saigusa, K. Yagi, Pacificchem 2010 Congress (865220), “Conformational analysis of the guanine nucleosides based on *ab initio* anharmonic vibrational calculation”, Honolulu, Hawaii Dec 18, 2010. [日本化学会のハイライト講演に採択].
5. Poster, 37th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Yokohama, Japan, H. Asami, A. Motoda, M. Tsukamoto, Y. Hayakawa, H. Saigusa, “Non-destructive vaporization of GMP enabled by the phosphoesterification: Conformational preference in the gas phase”, Nov. 10-12, 2010.
6. Oral, S. Urashima, H. Asami, and H. Saigusa, International Symposium on Molecular Spectroscopy 65th Meeting (TB05), “Infrared

Spectra of Hydrated Clusters of Guanine Nucleosides Observed by IR-UV Double Resonance Spectroscopy”, Columbus, Ohio, Jun 22, 2010.

7. Poster, The 2010 Molecular and Ionic Clusters Conference, Niigata, Japan, H. Saigusa, “Microscopic hydration of guanine nucleosides and base pairs”, Sep. 7, 2010.

8. Poster, The 2010 Molecular and Ionic Clusters Conference, Niigata, Japan, H. Asami, A. Motoda, M. Tsukamoto, Y. Hayakawa, H. Saigusa, “Intact laser desorption of guanosine 5'-monophosphate facilitated by the phosphoesterification: Conformational analysis by infrared vibrational spectroscopy”, Sep. 7, 2010.

9. Invited talk, H. Saigusa, Symposium on Hydration Dynamics and Molecular Processes, Riken, Japan, “Microscopic hydration structure of biological molecules -In connection with their functions”, Mar. 16, 2010.

10. Contributed talk, H. Saigusa, 25th Conference on Chemical Reaction Dynamics, Ohmiya, Japan, “Excited-state dynamics of nucleic acid bases - Bright and dark sides”, (2E09) Jun 2, 2009.

[国内学会]

1. 浅見祐也, 元田彩香, 塚本眞幸, 早川芳宏, 三枝洋之, 分子科学討論会 2010 (3A01) “グアニンヌクレオチドのリン酸基エステル化による非破壊的気化と赤外振動分光”, 大阪大学, 平成 22 年 9 月 16 日.

2. 浦島周平, 浅見祐也, 三枝洋之, 分子科学討論会 2010 (3A02) “赤外-紫外二重共鳴分光法によるグアニン-シトシン及びグアニン-グアニン塩基対の微細水和構造解析”, 大阪大学, 平成 22 年 9 月 16 日.

3. 伊藤悠太, 浅見祐也, 三枝洋之, 小関史朗, 河野裕彦, 島倉紀之, 分子科学討論会 2010 (3P097) “9-メチルグアニン-水和物の電子状態とその性質”, 大阪大学, 平成 22 年 9 月 16 日.

4. 吉川 竜一, 片桐 勇志, 江幡 孝之, 井口 佳哉, 三枝 洋之, 分子科学討論会 2010 (4A16) “不揮発性分子のレーザー蒸発/レーザー分光の装置開発”, 大阪大学, 平成 22 年 9 月 17 日.

5. 浅見祐也, 三枝洋之, 八木清, 分子科学討論会 2009 (1A18), “赤外振動スペクトルと *ab initio* 非調和振動計算によるグアニンヌクレオチドの構造解析”, 名古屋大学, 平成 21 年 9 月 21 日.

6. 浦島周平, 浅見祐也, 三枝洋之, 分子科学討論会 2009 (1A19) “紫外-赤外二重共鳴法による 2'-デオキシグアノシンの微細水和構造の決定: グアノシンとの比較”, 名古屋大学, 平成 21 年 9 月 21 日.

7. 浅見祐也, 浦島周平, 三枝洋之, 分子

科学討論会 2009 (4P010) “DNA 塩基グアニンの電子励起ダイナミクスに及ぼす水和の影響”, 名古屋大学, 平成 21 年 9 月 24 日.

8. 吉川 竜一, 江幡 孝之, 井口 佳哉, 三枝洋之, 分子科学討論会 2009 (2P017) “レーザー蒸発/真空紫外イオン化を用いた不揮発分の質量分析法の開発”, 名古屋大学, 平成 21 年 9 月 22 日.

9. 浅見裕也, 浦島周平, 三枝洋之, 分子科学討論会 2008 (3B02) グアニンヌクレオチド水和クラスターの電子スペクトルにみられる異性体構造, 福岡国際会議場, 平成 20 年 9 月 26 日

10. 浦島周平, 浅見裕也, 三枝洋之, 分子科学討論会 2008 (1P061) “4 つの核酸塩基ヌクレオチドに対する安定水和構造の比較”, 福岡国際会議場, 福岡国際会議場, 平成 20 年 9 月 26 日

11. 浅見裕也, 浦島周平, 三枝洋之, 理論化学討論会 2008 (1P26) “核酸塩基ヌクレオチドの微視的水和構造の理論的解明”, 慶応大学, 平成 20 年 5 月 22 日.

12. 三枝洋之, 第 8 回分子分光研究会 (招待講演) “生体分子及びそのクラスターのレーザー脱離-超音速分子線分光”, 神戸大学, 平成 20 年 5 月 17 日.

[その他]

ホームページ等

<http://laser.sci.yokohama-cu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 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・教授

研究者番号: 90162180

(2) 研究分担者

立川 仁典 (TACHIKAWA MASANORI)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号: 00267410

大場 正志 (OHBA MASASHI)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 60115219