

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 9 月 29 日現在

機関番号：22701  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2013～2015  
課題番号：25410023  
研究課題名(和文) 気相水とクラスターを用いた核酸塩基水和構造のモデリング：ヌクレオチドへの展開  
  
研究課題名(英文) Modelling hydration structure of nucleic acid using corresponding gas-phase hydrated clusters: Toward elucidating nucleotide structure  
  
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  
  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：核酸塩基の水和構造と機能発現との関連をモデリングすることを目的としてこれら核酸塩基の気相水とクラスターの構造解析を行った。その結果、塩基に糖-リン酸基バックボーンが結合したヌクレオチドの水和構造を検討する手法を確立した。  
本研究費により整備した中赤外レーザー分光装置を用いて、尿酸分子のC=O伸縮振動領域のスペクトルを測定した。その結果、尿酸の一水和物について、2つの構造異性体のローカルモード結合様式に大きな違いがあることを見出した。更にこのモード結合様式の水素結合サイト依存性を利用することで、近赤外領域の測定では困難であった、尿酸-メラミンの水素結合錯体の構造決定を明確に決定した。

研究成果の概要(英文)：In order to model the hydration structure of nucleic acid systems in relation to their biological functions, we have performed structural characterization of corresponding hydrated clusters isolated in the gas-phase. We have been able to establish an effective strategic method for elucidating hydration structure of nucleotides, in which a sugar-phosphate group is bonded to the base. With this financial support, we have also developed a novel Mid-IR spectroscopic system and measured C=O stretching vibrational spectra of uric acid and its monohydrates. It was found that the two structural isomers of the monohydrated cluster show very different local mode-coupling behavior, depending strongly upon the hydrogen-bonding site. By using this mode coupling scheme, we have been able to identify unambiguously the hydrogen-bonded structure of uric acid-melamine complex.

研究分野：レーザー分光学および光化学

キーワード：核酸塩基 水和クラスター 中赤外レーザー 尿酸 ローカルモード結合

### 1. 研究開始当初の背景

DNAやRNAなどの核酸塩基高次構造は、糖リン酸基バックボーンと結合した塩基同士が、水素結合やスタッキングすることにより決定される。しかしこれらの安定性には水和が大きな影響を及ぼしており、例えばDNAの構造がRNAに比べてより湿度(水和)の影響を受けやすいことは、構造の柔軟性が水和に依存することを示している。しかし結晶構造解析などの手法では、このような高次構造形成に水和がどのような役割を果たしているかを知ることは難しい。

我々はこれまでグアニン塩基に糖の結合したヌクレオシド(グアノシンと2'-デオキシグアノシン)について、その水和構造を気相分光法により検討してきた。その結果、グアノシンでは2'-OHが関与した特異的な水素結合ネットワーク構造が存在することを明らかにした。しかし実際のDNAやRNAは、糖の3'-OH基や5'-OH基にリン酸基が結合したヌクレオチドを単位として構成されており、この水和構造を調べるのがより重要となる。

### 2. 研究の目的

本研究では、核酸塩基分子に糖リン酸基バックボーンが結合したヌクレオチドや、2つの塩基が糖リン酸基で結合したジヌクレオチドについて、その立体構造や塩基対構造が水和によりどのように変化するかを赤外振動分光法により検討した。これにより結晶解析では知ることが難しい、DNAやRNAの高次構造の安定化における水和の役割(水和の有無や水和部位の影響)に関する知見が得られるものと期待される。具体的には以下の3点に焦点を絞り研究を行った。

- (1)ヌクレオチドの水和構造:グアノシン-リン酸(GMP)とその2'-デオキシ体の水和構造に違いはあるか?
- (2)ジヌクレオチドにおけるスタッキング型塩基対生成と水和構造
- (3)2つのジヌクレオチド間の塩基対生成と水和構造

### 3. 研究の方法

- (1)これまでに開発したレーザー脱離超音速分子線法を用いて、グアニンヌクレオチド(GMP)の水和物を生成し、その微細構造を赤外分光法(赤外紫外2重共鳴法)により解析した。更にそのデオキシ体の水和構造との比較を行った。
- (2)2つの塩基(例えばグアニンとシトシン塩基)が糖リン酸基で結合したジヌクレオチド(リン酸基をエステル化したもの)を化学合成し、(1)と同様の測定を行った。合成法は既に研究分担者により確立されており、2つのグアニン塩基が結合したヌクレオチドの合成には成功している。ジヌクレオチドの水和構造解析には、骨格振動領域(指紋領域)

の赤外スペクトルが有効である。そこで海外研究協力者(Dr. Mons、フランス)との共同研究により、中赤外領域の赤外スペクトル測定を行った。

(3)同じジヌクレオチドを用いて、DNAの2つのラセン構造間のWC塩基対に相当する塩基対構造が生成するか、水和により安定化するかを検討した。

### 4. 研究成果

#### (1)25年度:

DNAやRNAの結晶構造解析の結果、これらの内部には特定の構造を持った水和殻が存在することが明らかとなった。しかしこの第一水和物を構成する水分子が分子認識機能にどのような役割を果たしているかを結晶構造から知ることは難しい。初年度は、核酸塩基の水和構造と機能発現との関連をモデリングすることを目的としてこれら核酸塩基の気相水和クラスターの構造解析を行った。その結果、塩基に糖-リン酸基バックボーンが結合したヌクレオチドの微細水和構造を検討する手法を確立した。

#### (2)26年度:

25年度科研費により整備した中赤外レーザー分光装置を用いて、代表的な生体分子の一つである尿酸分子のCO伸縮振動領域のスペクトルを測定した。その結果、尿酸の一水和物について、2つの構造異性体のローカルモード結合様式に大きな違いがあることを見出した(図1、論文2)。

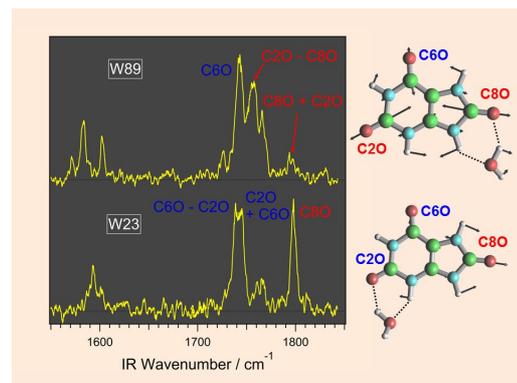


図1. 中赤外スペクトルにより見出された尿酸水和のCO伸縮振動間のローカルモード結合(論文2より転載)

更にこのモード結合様式の水素結合サイト依存性を利用することで、以前の近赤外領域の測定では困難であった、尿酸-メラミンの水素結合錯体の構造を明確に決定した。このことにより、メラミンが混入した粉ミルク乳幼児に発症した尿結石の核となる錯体構造が明らかとなった(図2)。

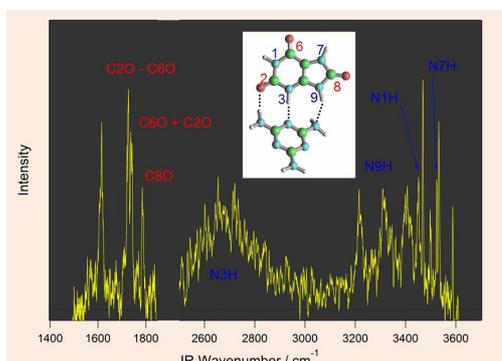


図 2. 中赤外スペクトルの測定により解明された尿酸-メラミンの水素結合錯体の構造.

(3)27 年度 :

我々の研究グループは、同様に生体分子の赤外レーザー分光を行っている France (CEA) の Michel Mons 博士のグループと共同研究を行ってきた。そこで本研究グループで博士号を取得した浅見祐弥が、Mons 博士の研究室で博士研究員として一年滞在した結果、DNA 塩基グアニンに関する共同研究が急速に進展した。

DNA 中に存在するグアニンのケト互変異性体は、電子励起状態の寿命が短いため、ナノ秒 UV レーザー光によるイオン化では観測できないとされてきた。そこで、グアニンの一部をナフチル基で化学修飾し電子励起状態の寿命を長くすることを試みた結果、世界で初めてケト体を観測することに成功した(図 3)。更にこの修飾グアニンの CO 伸縮振動スペクトルを測定し、ケト互変異性体であることを明確に示した。

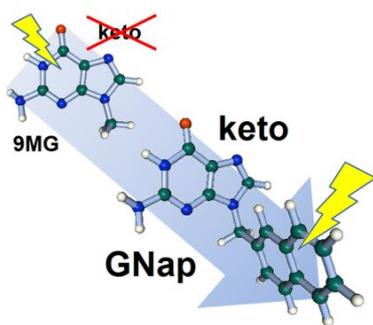


図 3. ナフチル基で修飾したグアニンのケト体の観測。(論文 1 より転載)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件、いずれも査読付、下線は Corresponding author)

(1) 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).

(2) H. Saigusa, D. Nakamura and S. Urashima,  
“Hydrogen-bonding interactions of uric acid complexes with water/melamine revealed by mid-IR spectroscopy”,  
*Phys. Chem. Chem. Phys.*, **17**, 23026-23033 (2015).

(3) H. Asami and H. Saigusa, “Multiple hydrogen-bonding interactions of uric acid/9-methyluric acid with melamine identified by infrared spectroscopy”,  
*J. Phys. Chem. B*, **118**, 4851-4857 (2014).

(4) S. Yamazaki, S. Urashima, H. Saigusa and T. Taketsugu, “Ab initio studies on the photophysics of uric acid and its monohydrates: Role of the water molecule”, *J. Phys. Chem. A*, **118**, 1132-1141 (2014).

(5) S. Urashima, M. Miyazaki, M. Fujii and H. Saigusa, “IR-UV double resonance spectroscopy as implemented by polarized laser schemes: Probing orientations of vibrational transition dipole moments”, *Chem. Lett.*, **42**, 1070-1072 (2013).

(6) H. Asami, K. Yagi, M. Ohba, S. Urashima and H. Saigusa, “Stacked base-pair structures of adenine nucleosides stabilized by the formation of hydrogen-bonding network involving the two sugar groups”, *Chem. Phys.*, **419**, 84-89 (2013).

〔学会発表〕(計 12 件)  
( 国外 4 件、下線は講演者 )

(1) H. Saigusa, “Hydrogen-bonding interactions of uric acid complexes with water/melamine identified by near- and mid-IR spectroscopy”, Pacificchem 2015, session #438, December 15, 2015, Honolulu Hawaii. (招待講演)

(2) H. Saigusa, “Laser desorption of nucleic acid components and their structural characterization by IR spectroscopy”, Pacificchem 2015, session #352, December 19, 2015, Honolulu Hawaii. (招待講演)

(3) D. Nakamura and H. Saigusa, “Structural investigation of aspartame, an artificial sweetening, and its hydrated clusters in the gas phase”, session #438, December 17, 2015, Honolulu Hawaii.

(4) H. Saigusa, “Gas-phase isolation of nucleic acid components: From spectroscopy to biomodelling”, Isolated Biomolecules and Biomolecular Interactions (IBBI) 2014, Porquerolles Island, France, May 22, 2014. (招待講演)

(国内 8 件、下線は講演者)

(1) 三枝 洋之, 中村 大介, 浦島周平「中赤外分光による尿酸 水及びメラミン錯体の水素結合構造解析」, 第 9 回分子科学討論会 (東京) 2015, (口頭講演 1A13, 2015 年 9 月 16 日, 東京工業大学).

(2) 浅見 祐也, 中村 大介, 三枝 洋之「赤外分光法による尿酸-メラミン錯体の多重水素結合構造の決定」, 第 8 回分子科学討論会( 広島) 2014, (口頭講演 2A06, 2014 年 9 月 22 日, 広島大学).

(3) 中村 大介, 三枝 洋之「赤外-紫外二重共鳴分光法によるアスパルテーム水和クラスターの気相立体構造解析」, 第 8 回分子科学討論会 (広島) 2014, (ポスター講演 1P17, 2014 年 9 月 21 日, 広島大学).

(4) 山崎祥平, 浦島周平, 三枝洋之, 武次徹也「プリン塩基の光物理的挙動に対する一分子水和の影響」, 第 17 回理論化学討論会 (口頭講演, 2014 年 5 月 22 日~24 日, 名古屋大学).

(5) 浦島 周平, 宮崎 充彦, 藤井 正明, 三枝洋之, 「赤外-紫外二重共鳴スペクトルの直線偏光二色性測定: 遷移双極子モーメントの配向によるグアノシンの局所構造解析」第 7 回分子科学討論会( 京都) 2013 (口頭講演 1A06, 2013 年 9 月 24 日, 京都テルサ).

(6) 山崎祥平, 浦島周平, 三枝洋之, 武次徹也「尿酸一水和物の光物理過程における水分子の役割」, 第 7 回分子科学討論会 (京都) 2013, (口頭講演 1A10, 2013 年 9 月 24 日, 京都テルサ).

(7) 浅見 祐也, 正木 慶昭, 石内 俊一, 三枝洋之, 関根 光雄, 藤井 正明「ナフチル基の光イオン化を利用した核酸塩基のレーザー脱離・超音速ジェット分光 keto 体の観測」, 第 7 回分子科学討論会 (京都) 2013, (ポスター講演 2P009, 2013 年 9 月 25 日, 京都テルサ).

(8) 中村 大介, 三枝 洋之「赤外-紫外二重共鳴分光法による人工甘味料アスパルテームの気相立体構造解析」第 7 回分子科学討論会 (京都) 2013, (ポスター講演 3P016, 2013 年 9 月 26 日, 京都テルサ).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

三枝研ホームページ

<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 : 9016280

(2) 研究分担者

塚本眞幸

( TSUKAMOTO Masaki )

名古屋大学・情報科学研究科・助教

研究者番号 : 10362295