

(様式第9 別紙2：公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 望月 俊介

2. 養成カリキュラム名： DNA複製プロセスの分子科学的解析技術

3. 養成カリキュラムの達成状況

DNA複製プロセスにおける共存金属イオンと有機溶媒の効果を液相の分子レベルの相互作用から解析するため、溶液中のミクロな構造を観測する液相クラスター質量分析計に関する技術習得を行い、イオンの溶媒和の支配因子、対イオン間の相互作用、生体分子の自己組織化現象などをクラスター構造の観測から明らかにした。また、水中での核酸構成塩基のクラスター構造形成に及ぼす金属イオン・有機溶媒の効果を考察し、それらと人工的なDNA複製プロセスであるPCR (Polymerase Chain Reaction) における金属イオン・有機溶媒の効果の間に相関を見だし、生体反応と液相構造の関連性を指摘する結果を得た。これらから、化学・生体反応における液相構造の役割について極めて重要な知見を得ることができ、カリキュラムの目標であるDNA複製プロセスの分子科学的な解析技術の開発という目標を達成することができた。

4. 成果 (A4版3枚程度)

(1) 正イオンと負イオンの溶媒和構造の関係

初めに、溶液中のイオンの溶媒和に関してクラスター構造から検討した。アルカリ金属塩 (LiCl, CsCl) のメタノール溶液に対して正・負イオンのクラスターを観測すると、正・負イオンの溶媒和構造 ($\text{Li}^+(\text{CH}_3\text{OH})_m$, $\text{Cl}^-(\text{CH}_3\text{OH})_m$ など) や、 $\text{Li}^+(\text{LiCl})_n$ などのイオン対クラスターが観測され、溶液中ではイオンが強く溶媒和されるとともに、対イオンとの相互作用も重要であることが示された。一方、この溶液に正イオンと強く相互作用して錯体を形成する18-クラウン-6を添加すると、正イオンとの錯形成によって生成した錯イオンのクラスターが強く観測されるに伴い、18-クラウン-6とはほとんど相互作用しない負イオンについて溶媒和が進行するという変化がもたらされることが分かった。

溶液中では正・負イオンのそれぞれの電荷密度により、イオンと溶媒との相互作用が存在するが、正・負イオン間のクーロン力による静電相互作用も存在し、18-クラウン-6などの錯形成剤が存在しないときは、それらのバランスにより各イオンの溶媒和構造やイオン対の構造が決定される。しかし、18-クラウン-6を添加すると正イオンが配位子と強く相互作用し、正イオンと負イオンとのクーロン相互作用が減少する。これを補うように負イオンと溶媒分子の相互作用が相対的に増加し、負イオンの溶媒和が進行したと考えられる。このようなイオン溶媒和における相補的關係は、凝集相である溶液の本質的な特性を強く示しており、観測されたクラスター構造が液相の相互作用を強く反映していることが確認された。

(2) 溶液中における生体必須金属イオン (Mg^{2+} 、 Zn^{2+}) の微視的な環境の観測

金属イオンは多くの生体反応の中で、触媒や酵素活性など様々な役割を担う重要な物質である。生体反応は液相で進行することから、液相中における金属イオンのミクロな構造を解析することによって、生体反応の特異性の解明に繋がる情報が得られる可能性もある。そこで、生体の必須イオンである Mg^{2+} と Zn^{2+} の塩化物について、水-1 ブタノール混合溶液中での正イオン、負イオンのクラスター構造を観測し、それらの構造を考察した。

正イオンのクラスター構造の観測では、 Mg^{2+} は 1 ブタノールで強く溶媒和されることが分かり、 $Mg^{2+}(1-BuOH)_s$ ($s = 3 \sim 10$) の構造のクラスターが強く観測された。また負イオンの観測では、 Cl^- イオンは 1 ブタノールよりも水による水和 ($Cl(H_2O)_t$; $t = 0 \sim 4$) が優勢であることが分かった。一方、 Zn^{2+} では 1 ブタノールによる溶媒和クラスター ($Zn^{2+}(1-BuOH)_v$; $v = 3 \sim 9$) とともに、陰イオン (Cl^-) を含む $[Zn_3Cl_4]^{2+}(1-BuOH)_w$ ($w = 0 \sim 6$) の構造も非常に強く観測され、 Mg^{2+} とは異なる相互作用の存在が示唆された。さらに負イオンの測定では、 $[ZnCl_4]^{2-}$ という化学種が非常に強く観測された。

このことから、 Mg^{2+} では 1 ブタノールとの静電的な会合による溶媒和が支配的であるのに対し、 Zn^{2+} は 1 ブタノールとの相互作用に加え、 Cl^- との錯形成反応が大きな効果を持つ可能性が示された。このように、溶液中の金属イオンはその種類によって溶媒和と錯形成のバランスが大きく異なり、その差によって特徴的なクラスター構造をとることが考えられる。

(3) 核酸構成塩基の自己会合、および PCR におよぼす金属イオンの効果

上述の Mg^{2+} や Zn^{2+} は DNA の関連する反応で強く影響を与えることが知られており、 Mg^{2+} は DNA 複製反応において有効な触媒作用を持つイオンであるが、同じ二価のイオンである Mn^{2+} や Zn^{2+} は DNA 複製反応を阻害する変異原であることが知られている。このような金属イオンに関する分子レベルの情報、DNA 複製を行う酵素 (DNA ポリメラーゼ) の結晶構造解析から報告されているが、液相状態のイオンと生体分子 (酵素や核酸分子) という観点からの報告はほとんどない。そこで、生体分子と金属イオンのミクロな相互作用について、液相クラスター構造から考察した。核酸構成塩基の一つのシチジン (Cy) の水溶液に各種金属イオンを共存させて検討すると、アルカリ金属イオン (Li^+ 、 Na^+ 、 K^+) 共存下ではシチジン分子はアルカリ金属イオンの周りに会合し、 $M^{n+}(Cy)_a$ という型のクラスターが強く観測された (M^{n+} : 金属イオン、 Cy : シチジン)。またアルカリ土類金属イオン (Mg^{2+} 、 Ca^{2+}) 共存下でも同様の型のクラスターが観測された。ここで、イオンの周りに会合したシチジン分子の数 a は、アルカリ金属イオンで 1-4、アルカリ土類金属イオンで 1-9 となり、二価のアルカリ土類金属イオンではシチジンの会合数が著しく増加することが分かった。一方、アルカリ土類金属と同じ二価である遷移金属イオン (Mn^{2+} 、 Zn^{2+}) 共存下では、最も主要な構造は $M^{2+}CH(Cy)_b$ となり、シチジン会合数 b は 3 (Mn^{2+})、あるいは 2 (Zn^{2+}) などの少ない分子数で特異的に強く観測されることが分かった。

一価のアルカリ金属イオン、二価のアルカリ土類金属イオンとシチジンとの相互作用では、イオ

ンの電荷に比例してシチジンの会合数が増加したことから、シチジンと金属イオンの相互作用はイオンの電荷に基づく静電的なプロセスで進行していると考えられる。このような会合は、水などの溶媒分子が静電的にイオンと会合して溶媒和イオンを生成するプロセスと類似しており、「溶媒和型会合」とみなすことができる。一方、 Mn^{2+} などの遷移金属イオンの場合では、シチジンの会合は金属イオンの電荷に依存せずに特定の構造を持ったことから、アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオンの場合に見られた静電的な会合とは異なるプロセスが考えられる。シチジンは分子内にピリミジン塩基（シトシン）を持ち、N(3)とOの部位が配位サイトとなって金属イオンに配位することができる。（リボース内のOH基による配位は塩基性条件下で有効であり、本実験条件下（ $pH = 5.9 \sim 6.2$ ）では無視できると考えられる。）この場合、シチジン分子は金属イオンの配位数を満たすように配位する。 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} の配位数はそれぞれ6、4であり、それを満たすためにはそれぞれ3個、および2個のシチジン分子が必要である。実験結果はこれらの考察と良く一致し、 Mn^{2+} では3個のシチジンを含む $Mn^{2+}Cl(Cy)_3$ 、 Zn^{2+} では2個のシチジンを含む $Zn^{2+}Cl(Cy)_2$ の構造を持つクラスターが主要なピークとして観測された。これらのイオンとシチジンの会合については Na^+ 、 Mg^{2+} などで見られた「溶媒和型会合」に対して、シチジンとの錯形成反応による「配位型会合」とみなすことができる。このシチジン分子の会合の差は、(2)項で述べた水-1ブタノール混合溶液中における Mg^{2+} と Zn^{2+} の溶媒和と錯形成の差にも通じている。

本結果から、 Mg^{2+} イオンが最も多くのシチジン分子を引き付けることが分かり、このような構造形成がDNA複製反応に強く関わる可能性が考えられる。これをより具体的に検証するため、人工的なDNA複製反応であるPCR（Polymerase Chain Reaction）を用い、ヒトβ-グロビン遺伝子の345塩基対（bp）の増幅反応における共存金属イオン（アルカリ金属イオン（ Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ ）、アルカリ土類金属イオン（ Mg^{2+} 、 Ca^{2+} ）、遷移金属イオン等（ Mn^{2+} 、 Zn^{2+} ）の影響を検討した。複製反応で得られたDNA断片を電気泳動で分離すると、 Mg^{2+} では理想的な増幅反応が確認されたが、 Mn^{2+} ではそれ以外の非特異的な産物の生成が目立ち、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ のアルカリ金属イオン類、 Ca^{2+} 、および Zn^{2+} 共存下では適切な増幅反応が確認されなかった。

DNA複製過程では、DNAポリメラーゼの反応性が複製効率および正確性を大きく支配すると考えられている。DNAポリメラーゼに対して金属イオンは、DNAテンプレート、プライマー（DNAの短い断片）、デオキシリボヌクレオシド三リン酸（dNTP：DNA鎖の原料）を酵素内の活性部位に導き、ホスホジエステル結合生成の触媒となりDNA鎖を伸長させると考えられている。このとき、 Mn^{2+} や Zn^{2+} などのd軌道に電子を持つ金属イオンは基質との相互作用が強く、適切な反応を阻害して非特異的な産物を生成することがDNAポリメラーゼ結晶のX線構造解析の報告で示唆されている。これはシチジんクラスター構造の観測において、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 共存下でそれぞれの金属イオンとシチジンとの配位的相互作用が優勢となり、特定の構造をとった結果と一致する内容と考えられる。 Mg^{2+} は配位的な相互作用をとらず、緩やかな静電的相互作用によりシチジンを会合させる機能を持つ。このような反応性が酵素活性に対して最も効果的であると考えられ、クラスター構造観測の結果はその可能性を強く示唆している。

(4) PCRにおける有機溶媒の効果とシチジんクラスター構造の関連

PCRは基本的に水中で進行するが、DMSO(ジメチルスルホキシド)などの特定の有機溶媒を添加することで、複製効率が上昇することが知られている。この効果はPCRにおけるプライマーの会合に影響を与えるのではないかと考えられているが、未知の部分が多く、分子レベルの情報は皆無といってもよい。この有機溶媒の効果を考察するため、PCRにおける有機溶媒の効果とシチジんクラスター形成における有機溶媒の効果を同時に検討し、DNA複製における分子レベルの解析の可能性を探った。

ヒトβ-グロビン遺伝子に対し、種々の有機溶媒(メタノール、アセトニトリル、DMSO)を5%(v/v)共存させて345bp領域の増幅をリアルタイムPCRで行った。複製反応で得られたDNA断片を電気泳動で分離した結果、有機溶媒未添加(H₂Oのみ)、メタノール、DMSO共存下の三条件では目的とする345bpのDNA断片が増幅できたが、アセトニトリル共存下ではまったく複製が進行しなかった。

一方、それぞれの有機溶媒共存下での水中(MgCl₂が共存)のシチジんクラスターの構造測定を行うと、水中、メタノール共存下ではMg²⁺の周りにシチジんが多数(7-8分子)会合するシチジんクラスター形成が有効に進んだが、アセトニトリル中では会合したシチジん分子は3-4分子程度で、またその強度も極めて弱く、クラスター形成が著しく抑制されることが分かった。DMSO共存下では水中ほどクラスター形成は起きなかったが、アセトニトリル共存下と比べるとクラスター中のシチジん分子数が依然として多い(7分子)という特徴が見られた。そこで、DMSOについてより詳細に検討するため、DMSOの濃度を変化させてPCRおよびクラスター測定を行った。DMSO濃度を0-10%(v/v)と変化させたときのPCR産物の電気泳動分離の結果から、DMSOが低濃度条件下(0-5%)では増幅が確認されたが、高濃度(10%)では増幅が起らないことが確認された。この高濃度条件においてシチジんのクラスター観測を行うと、クラスター中のシチジん分子数が減少し(3-4分子)、アセトニトリル共存下で見られた質量スペクトルの分布に近くなることが分かった。

これらの質量スペクトルで特徴的なことは、各有機溶媒の差に依存して、共存しているMg²⁺の溶媒和構造がかなり変化していることである。水中、メタノール共存下ではMg²⁺の溶媒和とクラスターに含まれる水分子の数が多く、Mg²⁺の水和が優勢であることが示された。しかしアセトニトリル中ではMg²⁺の溶媒和とクラスター中の水分子の数が著しく減少し、アセトニトリルによる溶媒和が優勢になり始めていることが分かった。一方、DMSOの場合は、低濃度の場合はMg²⁺の溶媒和とクラスター中に依然として水分子が存在しているが、高濃度の場合は水分子がまったく見られなくなり、DMSOによる溶媒和が支配的になっていることが分かった。

以上から、Mg²⁺の水和が有効な系ではシチジんクラスターの形成が起こり、かつPCRの増幅も有効に進むという相関が存在することが明らかとなった。PCRは多くの物質が関わる非常に複雑なプロセスであるため、シチジんクラスター形成だけでは有機溶媒の効果を説明することはできないが、今回の測定からシチジんや金属イオンが共存する有機溶媒に依存して特徴的なマイクロ環境下にあることが明らかとなった。このような構造がPCRのような生体反応に関わる可能性は十分に考えられる。また、これらの液相内のマイクロ構造の微妙な変化が、生体反応における至適濃

度の存在に寄与している可能性もある。(4)項については現在、論文を執筆中である。

以上の結果をまとめ、液相のミクロ構造と生体反応の関連を示すことができた。今後の詳細な解析により、生体反応の特異性の支配因子や、それを利用した省エネルギー反応設計などへの応用が期待できる。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表(論文掲載済、または査読済を対象。)

1. “Solvation for Ions and Counterions: Complementary Relation between Ion–Counterion and Ion–Solvent Interaction”, Shunsuke Mochizuki and Akihiro Wakisaka (The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), *J. Phys. Chem. A*, **106**, 5095 (2002).
2. “Microscopic environment of metal ion controlled by the balance between preferential solvation and coordination”, Shunsuke Mochizuki and Akihiro Wakisaka (The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), *Chemical Communications*, 592 (2003).
3. “Interactions of a Nucleoside Cytidine with Metal Ions in Water Observed through Mass Spectrometry: Clustering Controlled by Electrostatic Interaction and Coordinating Interaction”, Shunsuke Mochizuki and Akihiro Wakisaka (The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), *J. Phys. Chem. B*, **107**, 5612 (2003).

(2) 口頭発表(発表済を対象。)

1. アルカリ金属イオンと塩化物イオンの溶媒和における相補的關係(産総研、NEDO) 望月俊介・脇坂昭弘、第24回溶液化学シンポジウム、岡山、2001年9月。
2. アルカリ金属塩溶液中の正イオンと負イオンの溶媒和における相補的關係、望月俊介、脇坂昭弘(産総研)、日本化学会第81春季年会、東京、2002年3月。
3. 水中でのDNA構成塩基の会合における金属イオン効果、望月俊介、脇坂昭弘(産総研)、第25回溶液化学シンポジウム、大阪、2002年9月。
4. DNA構成塩基の自己会合における金属イオン効果、(産総研) 望月俊介、脇坂昭弘、日本生物物理学会、第40回年会、名古屋、2002年11月。
5. 液相クラスター構造に基づくDNA複製プロセスへの金属イオン、溶媒効果の考察、(産総研) 望月俊介、脇坂昭弘、日本生物物理学会、第41回年会、新潟、2003年9月。
6. A Study of the Effect of Metal Ion on the DNA Replication Process from the Viewpoint of Molecular Clustering in a Solution, Shunsuke Mochizuki, and Akihiro Wakisaka, First International Symposium on Biomolecular Chemistry, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan, December 2-5, 2003. (ポスター賞を受賞)

(3) 特許等(出願番号を記載)

なし