

実施課題名: 溶液NMR法による酵素反応の正確性における水和の寄与の解析

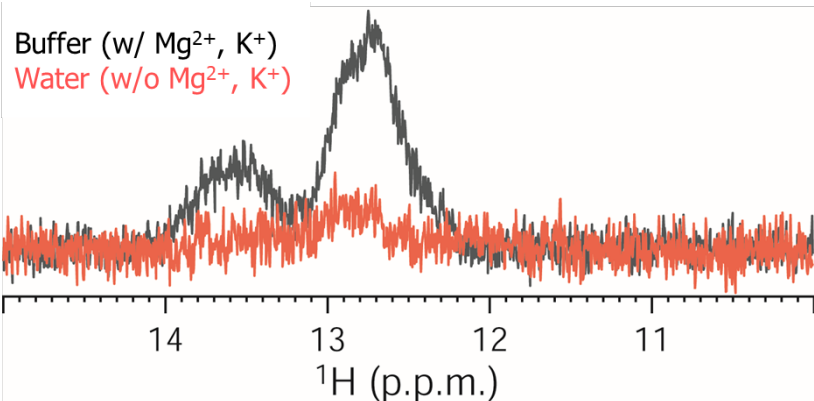
【背景】

我々はこれまでに、サブテラヘルツ(sub-THz)帯電磁波照射によって、タンパク質水和の平衡状態への緩和過程等に、単純な温度上昇では説明できない変化が生じることを見出してきた。これらの結果は、sub-THz波が水和ダイナミクスや分子間相互作用に影響を与える可能性を示唆しているが、その微視的機構の多くは未解明である。本課題では、40塩基ランダム配列DNA(N40)を用い、DNA再水和過程における塩基スタッキング相互作用および塩基対形成ダイナミクスをNMRにより解析し、sub-THz波照射の影響評価を行った。

【実施内容】

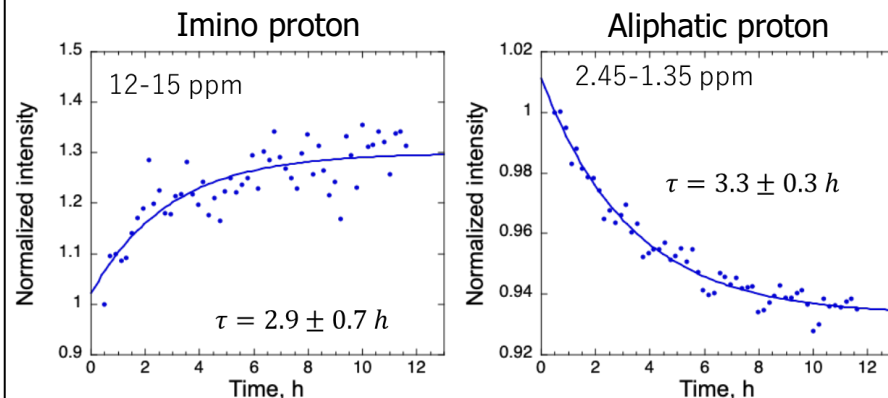
高磁場NMR装置を活用し、N40 DNA のイミノプロトン等の ^1H シグナルを観測することにより、DNA再水和過程における塩基対形成ダイナミクスを解析した。イミノプロトンは塩基対形成時にのみ水との交換から保護され観測可能となるため、DNA二本鎖形成を直接反映する指標となる。まず、 Mg^{2+} および K^+ の有無においてイミノプロトンシグナルを比較した結果、これらのイオン存在下において顕著にシグナルが増大したことから、 Mg^{2+} および K^+ が塩基対の安定化に寄与することを確認した(Fig. 1)。さらに、乾燥DNAを水に溶解した後の再水和過程におけるイミノプロトンおよび脂肪族プロトンシグナルの経時的な強度増大および減少が観測され、二本鎖DNAの形成が進行する非平衡緩和過程を定量的に示すことに成功した(Fig. 2)。これらの結果は、UV分光およびFCSによる解析結果と整合するとともにその解釈を補強するものであった。sub-THz波照射下におけるUV分光およびFCSの in situ 観測からは、sub-THz波が塩基対形成を促進する結果が得られ、照射作用が単なる熱効果では説明できない非熱的作用であることが示唆されていた。以上の結果を統合的に解釈することにより、DNA再水和初期には非特異的な塩基スタッキング相互作用が優勢である一方、水和の進行とともに相補的な塩基対形成へ移行するとの結論に至った。このように、NMRを活用することでsub-THz波の作用機構について重要な知見が得られた。

Fig. 1



Mg^{2+} および K^+ の有無における N40 のイミノプロトンシグナル

Fig. 2



N40 再水和過程におけるイミノシグナル(左)および脂肪族シグナル(右)の強度変化

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF25-01-083			
利用課題名	溶液 NMR 法による酵素反応の正確性における水和の寄与の解析			
所属機関	国立研究開発法人 産業技術総合研究所			
所属部署	細胞分子工学研究部門			
役職・氏名	役職	上級主任研究員	氏名	今清水 正彦
利用実施時期、及び期間	2025 年 4 月 1 日～2026 年 3 月 31 日 総利用日数： 7 日 ☐ 当初計画どおり・ ☒ 当初計画変更 (変更理由) 当初計画と比較してより単純な DNA のみの系を解析することにより、解釈の一 意性が高い結果を得ることを優先すべきと判断したため。			

1. 本課題の概要・目的

これまでに申請者らは、サブテラヘルツ(sub-THz)帯電磁波照射によって、タンパク質水和の平衡状態への緩和過程等に、単純な温度上昇では説明できない変化が生じることを見出してきた。また、sub-THz 波照射により、RNA ポリメラーゼ(RNAP)による転写反応の正確性が向上する現象を見出した。2つの sub-THz 波照射に依存する現象は、同じ時間領域で結びついている可能性があるが、その微視的詳細や因果関係はわかっていない。本課題では、油相中に分散させた微小水滴(逆ミセル)内での酵素反応系を構築し、水和水への直接的な照射作用を評価すること、および、溶液 NMR 法を用いて酵素および水和水の構造状態を解析することにより、照射作用の微視的詳細を明らかにすることを提案した。しかしながら、課題開始後に、まずは sub-THz 照射の効果について物理的に明快な解釈を得ることが重要であると判断し、解析対象をより単純な DNA のみの試料に変更した。具体的には、40 塩基の完全にランダムな配列の混合物(N40)を用い、無数の塩基対の組み合わせが形成される試料中における状態の時間変化を NMR により追跡し、他の分光学的手法を用いた sub-THz 照射効果の計測結果とあわせて解釈することで、DNA の塩基対形成に対する照射の寄与を明らかにすることを目的とした。

2. 成果の概要

実施内容

本研究では、sub-THz 波が DNA の塩基対形成に及ぼす非熱的影響を明らかにするため、40 塩基のランダム配列 DNA (N40)をモデル系として解析を行った。特に、DNA 再水和過程における塩基スタッキング相互作用と水素結合形成の競合に注目した。

まず、UV 吸収分光を用いた解析から、256 nm 付近の主ピークと 280 nm 付近の G:C 塩基対由来成分を Gaussian 分解し、照射によるスペクトル変化を解析した。さらに蛍光相関分光 (FCS)を用いた解析では、二本鎖 DNA へ選択的に結合する蛍光試薬を利用し、塩基対を形成した分子数や拡散時間の変化を評価した。

このような研究背景のもと、本利用課題では、高磁場 NMR 装置を利用することにより、主として ^1H NMR を用いてイミノプロトンシグナルを観測した。イミノプロトンは塩基対形成時のみ水との交換から保護され検出可能となるため、DNA 二本鎖形成の直接的指標となる。本研究では Mg^{2+} および K^+ 存在下でイミノプロトンシグナルを経時測定し、DNA 再水和後、数時間のスケールで塩基対形成が進行する非平衡緩和過程を定量化した。これら複数の手法を統合することで、sub-THz 照射が単なる加熱効果ではなく、DNA 塩基間相互作用や水とダイナミクスへ直接作用する可能性を検証した。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

本研究により、sub-THz 照射が DNA 塩基対形成を非熱的に促進することを示した。通常の加熱条件では塩基対形成がむしろ減少するのに対し、sub-THz 照射では逆方向の応答が観測され、単なる熱運動の上昇では説明できない非熱的な効果であることが示唆された。

また、本研究はランダム配列 DNA の集団における二本鎖 DNA の形成原理に関して重要な知見を与えた。DNA 再水和過程の初期には、塩基は主として非特異的なスタッキング相互作用により凝集状態を形成しているが、水和の進行に伴いスタッキングが解離し、相補的な塩基対形成へ移行することが示された。特に G:C 塩基対に対応する 280 nm 吸収成分が sub-THz 照射下で増加したことから、照射により塩基スタッキングが緩和され、水素結合形成が選択的に促進される可能性が示された。この機構として、sub-THz 照射が DNA 水和層の水分子の回転ダイナミクスを選択的に変調し、結果として塩基スタッキング相互作用を弱め、塩基対形成探索を促進することが考えられる。これは、生体高分子の水和ダイナミクスと電磁波応答を結びつける新しい分子機構の提案につながる成果である。

以上の成果において、本利用課題にて NMR 装置を活用することで、 Mg^{2+} および K^+ 存在下でイミノプロトンシグナルが顕著に増大したことから、二本鎖 DNA の形成が促進されることを見出すとともに、再水和過程でイミノプロトンシグナル強度が経時的に増大したことから、二本鎖 DNA が形成される数時間オーダーの時定数を決定することに成功し、DNA の塩基対形成に対する照射の寄与を明らかとするうえで不可欠な情報が得られた。

以上の成果は 2026 年 2 月 10 日付で Journal of Chemical Physics 誌に掲載された (DOI: 10.1063/5.0298033)。

成果発表

該当なし。

今後の展開

本課題では、再水和過程の DNA をリアルタイム NMR 観測することで、二本鎖 DNA 形成の時定数を決定した。今後、sub-THz 照射下でリアルタイム NMR 測定を実施可能とする技術の高度化を図ることにより、sub-THz 照射効果を直接的に評価する応用的な展開が期待される。また、DNA 等の溶質分子に加えて、溶媒である水分子の運動性を緩和時間 (T_1/T_2) や DOSY-NMR を用いて直接解析することにより、水和水まで含めた sub-THz 応答機構を解明する方向へも展開可能である。さらに、RNA やタンパク質複合体系など、塩基スタッキングと水素結合で構成される比較的単純な DNA 以外の、折り畳み構造やタンパク質-核酸および基質・補酵素の複合体形成を伴う、より高次な生体分子の構造形成と機能場の形成機構を理解するとともに、それらに対する sub-THz 照射効果を NMR 法により解析する方向へ展開することにより、本課題の当初に提案した目標の達成につながると考えられる。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本研究成果は、加熱による変性と冷却による再結合からなる従来の二本鎖 DNA の作製法と異なり、特定の振動周波数のみを持つ相互作用を選択的に励起することにより少ないエネルギーでマイルドに二本鎖 DNA を作製する技術につながる可能性がある。また、化学修飾を施すことなく電磁波照射のみで核酸の構造や分子間相

相互作用を制御する、低侵襲な生体制御技術への創出にもつながると考えられる。核酸医薬および診断技術の分野においては、DNA/RNA ハイブリダイゼーションや核酸構造形成を制御する技術として、高品質の核酸医薬の製造および高精度・高効率の分子診断技術の開発が期待される。これらの応用・開発の過程においても、電磁波照射の作用メカニズムや品質管理の目的に NMR 技術が貢献すると考えられる。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

・良かった点

NMR 測定そのものだけでなく、実験の目的に沿った測定内容の提案、試料調製から測定開始までの操作内容やスケジュールの設計、データ解析・解釈までトータルで支援していただけた。

・改善してほしい点

特になし。

・提案事項

特になし。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

引き続き、分子の物性解析の高度技術を提供することで、生体分子の機能発現機構の解明をはじめとする学際的研究を支援していただきたい。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

特になし。

8. 利用施設

東京大学

溶液 800MHz

利用期間 1: 2025 年 4 月 7 日～2025 年 4 月 8 日

利用期間 1: 2025 年 4 月 11 日～2025 年 4 月 12 日

利用期間 1: 2025 年 5 月 7 日～2025 年 5 月 9 日

利用期間 1: 2025 年 5 月 12 日～2025 年 5 月 13 日

利用期間 1: 2025 年 8 月 30 日～2025 年 8 月 31 日

利用期間 1: 2025 年 11 月 18 日～2025 年 11 月 19 日

9. その他の利用施設

該当なし。