 <b>茨城県</b> IBARAKI Prefectural Government	<b>MLF Experimental Report</b> 提出日(Date of Report) 2015/6/16
課題番号(Project No.) 2014PX0010 実験課題名(Title of experiment) 水和構造からみた Z-DNA の構造構築メカニズムの解明 実験責任者名(Name of principal investigator) 茶竹俊行 所属(Affiliation) 京都大学原子炉実験所	装置責任者(Name of responsible person) 日下勝弘 装置名(Name of Instrument : BL No.) iBIX(BL03) 実施日(Date of Experiment) 2015/4/11-12

実験目的、試料、実験方法、利用の結果得られた主なデータ、考察、及び結論を記述して下さい。

実験結果などの内容をわかりやすくするため、適宜図表添付して下さい。

Please report experimental aim, samples, experimental method, results, discussion and conclusions. Please add figures and tables for better explanation.

<b>1. 実験目的(Objectives of experiment)</b>
<p>本実験は、中性子結晶学における D/H コントラストの応用を目指して進められている。D/H コントラストは D<sub>2</sub>O 溶媒と H<sub>2</sub>O 溶媒で中性子データを測定して、両者の差分から蛋白質のプロトン状態や水和構造を高感度で検知する方法である。本法は、中性子溶液散乱では非常にポピュラーであるが、結晶解析では Kossiakoff らが四半世紀前に行った一例しか報告されていない。最近、我々は新しい D/H コントラスト技法を開発して蛋白質結晶への適用を行った。今回の実験では DNA の水和構造を D/H コントラストにより高精度で解析するために、H<sub>2</sub>O 溶媒の Z-DNA 結晶の中性子実験を行った。</p>

<b>2. 試料及び実験方法</b> Sample(s), chemical compositions and experimental procedure
<b>2.1 試料 (sample(s))</b> H <sub>2</sub> O-solvent Z-DNA crystal (軽水溶媒中で作成した Z-DNA 結晶) 塩基配列は d(CGCGCG)の自己相補型 結晶作成法は、実験責任者が開発した温度制御結晶化法  <b>2.2 実験方法(Experimental procedure)</b> 過去に、iBIX について、H <sub>2</sub> O 溶媒結晶の中性子実験を行っている。この時の測定は室温で行った(出力 280kW、測定時間 15.5 時間)。回折像からは、2.5 Å 近辺では反射が多数観測でき、最高分解能は 1.85 Å であった(図 1)。しかしながら、結晶が割れていたために結晶格子は決定できなかった。本実験では、測定温度を 100K に変更して、同一バッチから得られた H <sub>2</sub> O 溶媒結晶について再実験を行った(出力 404kW、測定時間 21 時間)。

### 3. 実験結果及び考察（実験がうまくいかなかった場合、その理由を記述してください。）

Experimental results and discussion. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons.

使用した結晶は  $0.62\text{mm}^3(0.8\times 0.6\times 1.3)$  であり、瞬間凍結法により結晶を 100K に瞬間冷却して実験に用いた(図 2 右)。1.5 時間の試験測定の後、波長  $5.94\sim 1.94\text{\AA}$  のパルス中性子を用いて長時間測定を行った。ヒストグラム化の前でも、低角から高角に至る検出器で回折斑点が目視できた(図 2 左)。iBIX グループがイベントデータのヒストグラム化を行い、実験者はヒストグラム化したデータの解析処理を自研究室の計算機で行った。

分解能の見積もりは、高角位置にある検出器 9 のデータを用いて行った。単波長領域では、遅延した超波長ビームが混在する危険性があると考え、波長範囲

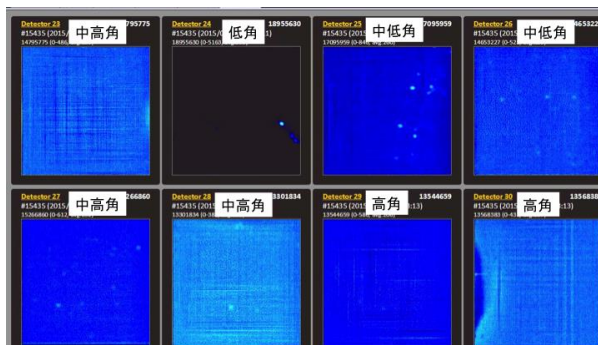


図 2. TOF のリアルタイム観察

$2.67\sim 5.94\text{\AA}$  で回折像のチェックを行った。この結果、図 3 に示すように、 $1.8\text{\AA}$  以上の回折斑点を複数確認できた(図 3)。さらに、目視(bin25)で確認できる回折斑点は、検出器 29 番の  $1.5\sim 1.6\text{\AA}$  の回折斑点であった。解析に十分な分解能を得ることに成功したと結論できる。

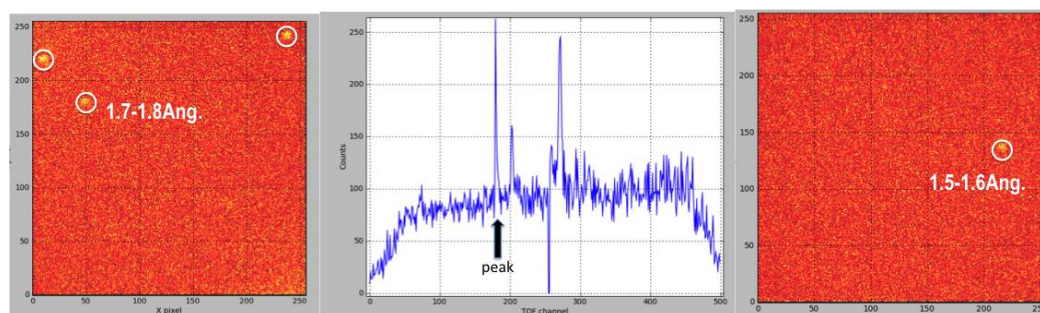


図 3. 高角側検出器(左 9 番、右 29 番)の回折像および、9 番の反射の TOF プロファイル

一方、反射の処理を行う過程で、この結晶が Z-DNA 結晶で多く見られる直方晶系では無い可能性が浮上した。低角検出器と中低角検出器のピークを基に格子を計算した結果、

$a = 36.2, b = 42.9, c = 36.0, \alpha = 90.2, \beta = 119.8, \gamma = 90.1$  の解が得られた。これは Z-DNA 結晶の多形の考えから、三方晶系を示唆している。

### 4. 結論(Conclusions)

今回の実験では、現在の iBIX の性能ならば、 $1\text{mm}^3$  以下の軽水溶媒結晶であっても、通常のビームタイムで高分解能( $1.6\text{\AA}$ )の中性子回折データを収集することが可能であることが確認できた。ただし、低角の反射の幾つかはピーク形状が悪いため、結晶の品質改善を行えばより高分解能のデータが収集可能であることが期待される。

一方、Stargazer による処理の結果、このサンプルの結晶系が、通常観察される直方晶系ではなく三方晶系をとっている可能性が見出された。これは、興味深い結果であり、今後処理を進め確認を行う予定。