

 MLF Experimental Report	提出日 Date of Report 2014/2/14
課題番号 Project No. 2012BX0002 実験課題名 Title of experiment アミノ酸・核酸類の中性子線結晶構造解析 実験責任者名 Name of principal investigator 柏木 立己 所属 Affiliation 味の素株式会社イノベーション研究所	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 2013年1月29~2月1日

試料、実験方法、利用の結果得られた主なデータ、考察、結論等を、記述して下さい。(適宜、図表添付のこと)
 Please report your samples, experimental method and results, discussion and conclusions. Please add figures and tables for better explanation.

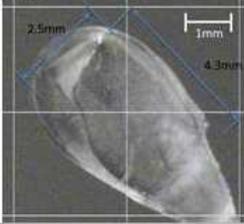
1. 試料 Name of sample(s) and chemical formula, or compositions including physical form. ・試料名: 5'-イノシン酸二ナトリウム(IMP・2Na)、5'-グアニル酸二ナトリウム(GMP・2Na)の混晶(I+G) ・化学式: $0.633(\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_8\text{PNa}_2) \cdot 0.367(\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_8\text{PNa}_2) \cdot 7.5\text{H}_2\text{O}$ ・物理的形態: 単結晶

2. 実験方法及び結果 (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 method and results. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons. <p>IMP・2Na と GMP・2Na の混合水溶液からは、両者の混晶(I+G)が析出してくることが知られている¹⁾。I+G は、粉末 X 線回折図形のパターンが IMP・2Na 7.5 水和物結晶と殆ど同じであり、また IMP、GMP の含有比が結晶化条件により変動することより、置換型の混晶であると推定される。IMP と GMP は、IMP プリン塩基の C2 位には H が結合しているのに対し、GMP プリン塩基の C2 には NH₂ が結合している点が異なる。I+G が混晶であることを構造的に実証するために、iBIX において I+G の中性子結晶構造解析を実施した。</p> <p>測定用の I+G 結晶は、まず 0.30g/ml の IMP・2Na、GMP・2Na 等量混合水溶液から種晶を調製し、それらの結晶を 0.28g/ml の IMP・2Na、GMP・2Na 等量混合水溶液中で 20°C で数か月間静置させることにより、長さ 1cm 以上、幅 5mm 以上、厚さ 1mm 弱程度にまで成長した。調製した I+G 結晶を再溶解し、弱陰イオン交換カラムで組成分析を実施した結果、IMP:GMP=0.63:0.37 であった。iBIX での I+G 結晶の中性子回折強度データ収集の際には、結晶成長溶液に 20v/v% グリセロールを添加した溶液に結晶を移し、窒素ガス吹き付けによる低温測定を実施した。データ収集、構造解析の条件と結果を表 1 に示す。中性子回折強度データ処理、消衰効果補正には、それぞれソフトウェア STARGazer²⁾、GSAS³⁾を用いた。結果、0.8 Å 分解能程度のデータを取得し、構造決定に成功した。</p> <p>図 1a に解析された I+G の結晶構造を示す。I+G 結晶の構造は、IMP・2Na 7.5 水和物結晶とほぼ同一であった。水和水の水素原子を含め殆どの水素原子が明瞭に観測され、その多くを非等方性温度因子で精密化できた。その結果、I+G 結晶中の複雑な水素結合ネットワークを詳細に解析することが可能となった。水和水の水素結合受容体は、リン酸基の酸素原子やプリン塩基の窒素原子、他の水和水等であった。GMP の C2 炭素に結合した NH₂ の水素原子のみ観測されず、立体化学的な理想位置に原子を発生させた。</p>

2. 実験方法及び結果(つづき) Experimental method and results (continued)

図 1b のオミットマップから分かるように、プリン塩基の C2 炭素の先には、IMP の H5A に相当する位置に負の原子散乱長密度が、GMP の N5 に相当する位置に正の原子散乱長密度が、それぞれ明瞭に検出されている。また中性子結晶構造解析の最後の段階で、IMP と GMP それぞれの占有率を精密化したところ、GMP の占有率は 0.42(3) となり、分析とほぼ同じ値に収束した。これらの結果より、I+G の結晶構造は、IMP・2Na 7.5 水和物結晶構造中の IMP 分子のサイトが統計的ランダムに GMP に置き換わることにより構築されていると考えられる。すなわち、I+G が混晶であることが中性子結晶構造解析により初めて構造的に確認されたと判断した。

表1 I+GのiBIXでの中性子回折データ測定

MLF出力	300 kW
波長	0.6~3.8 Å
検出器台数	30
測定温度	100 K
結晶サイズ	4.3 x 2.5 x 0.6 mm
結晶写真	
セッティング数	40
露光時間/1セッティング	2時間
測定時間	約3日
構造単位	0.633(C ₁₀ H ₁₁ N ₄ O ₈ PNa ₂) 0.367 (C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₈ PNa ₂) 7.5H ₂ O
空間群	C222 ₁
格子定数a	8.716 Å
b	23.16 Å
c	21.95 Å
構造単位数Z	8
分解能	0.8 Å
独立な反射数	3030 (I > 2σ(I))
R因子	0.104 (I > 2σ(I))

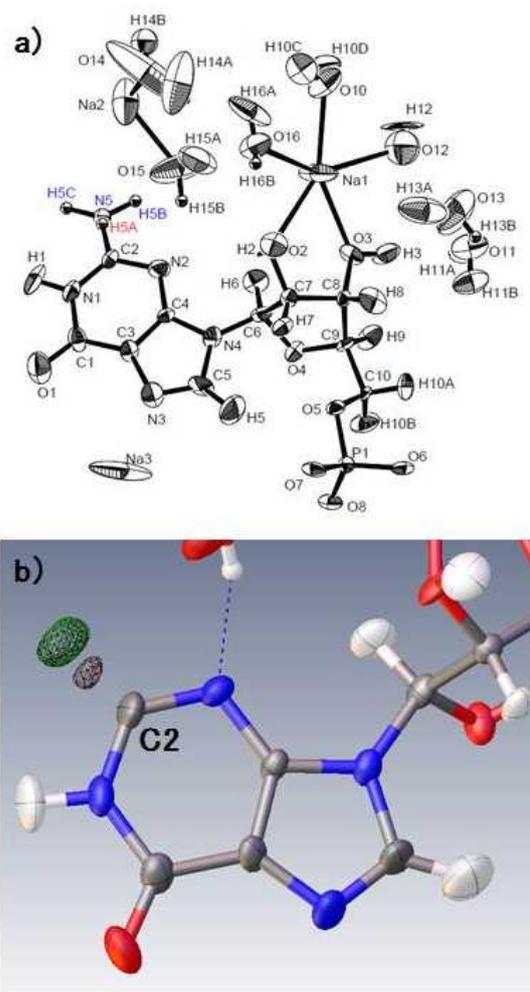


図1 I+Gの中性子結晶構造

a) 結晶の非対称単位のORTEP図。IMPとGMPで構造の異なる部分は、IMPを赤、GMPを青の原子名で表示した。b) 核酸塩基周辺のORTEP図とオミットマップ(IMP C2位のH、グアニル酸C2位のNH₂を分子モデルから除いた原子散乱長密度図)。緑色は正の密度分布(+5σ)、灰色は負の密度分布(-5σ)である。

参考文献： 1) N.Nagashima, Ph. D. thesis, The Univ. of Tokyo, Japan (1985). 2) TOhara *et al.*, Nucl. Instr. Meth. A 600, 195 (2009). 3) A.C.Larson *et al.*, General Structure Analysis System, Report LAUR 86, 748 (2004).