



# 論文内容要旨

## 第1章 序論

中性子小角散乱は、生体物質の構造研究にとって極めて有力である。それは散乱密度の異なる特定成分—例えばDNAとタンパク質—の構造を別々に浮彫りにするコントラスト変調法と、複合体の構成成分間の空間距離を決定する選択的重水素化法が有効に利用できることに依っている。我国においても1980年より冷中性子小角散乱実験が開始され、生体物質の構造研究への応用が可能となった。本研究の目的の一つは、パルス冷中性子の特徴を生かした実験的手法及び解析法の確立である。

また、対象であるヌクレオソーム・コア粒子は、真核生物の遺伝情報担体の染色質の繰り返し構造単位で、146塩基対のDNAと4種類のヒストンタンパク質各2個からなるヒストン8量体により構成されている。転写活性時にはDNAが解かれmRNAに情報が伝達される。分裂期には染色質から染色体への高次構造が形成される。このような遺伝情報伝達機構の解明には、ヌクレオソーム・コア粒子の構造とその外部環境変化に対する安定性や可変性に関する知見が重要である。ヒストンタンパク質とDNAの相互作用は静電力と考えられるので、イオン強度をパラメータとしてコア粒子の構造安定性を研究した。

この章では、中性子小角散乱の概要、特に生体材料への応用の基本とヌクレオソーム構造研究の背景を論じた。

## 第2章 中性子小角散乱実験法

本研究で用いた装置は、高エネルギー物理学研究所ブースター利用施設の冷中性子小角散乱装置である。この装置はパルス冷中性子源に設置されているため、測定はTOF法に依る。小角散乱は主に、真空槽内の二次元位置敏感検出器により観測される。この装置の最大の特徴は、逆空間の広い範囲の測定を同時に行えることである。

波長分散方式のデータ処理の流れを記述した。各波長の中性子線強度及び検出器効率の補正には $H_2O$ の等方散乱を用いる。さらに、溶液散乱一般の処理及び選択的重水素化法での処理について述べた。その中で高角側の非干渉性散乱を用いると高精度の補正が容易に行えることを示した。

また、ヌクレオソーム・コア粒子の散乱実験の測定条件をまとめた。

## 第3章 その他の測定法

本研究では、中性子小角散乱以外に、X線小角散乱、沈降測定、比重測定、原子吸光分析、円偏光二色性測定を行った。

X線小角散乱実験には、高エネルギー物理学研究所放射光実験施設の溶液用小角散乱装置を用いた。装置の概要、データ処理及び測定条件について記述した。

沈降係数は分子の形，分子量の他，分子間の相互作用にも依存する。円偏光二色性測定に関しては  $A_{232}$ ， $A_{222}$  の吸収は各々ヌクレオソーム・コア粒子の DNA supercoil 構造及びヒストン8量体の  $\alpha$ -helix 構造を反映している。また，比重測定の偏比容評価及び溶液中の H-D 交換率測定への応用，原子吸光分析の対イオン数測定への新たな応用を示した。

#### 第4章 試料作成

実験結果の再現性は作成試料の完全性に依っている。又，ヌクレオソーム・コア粒子は鶏の赤血球核から調製したクロマチン（染色質）を micrococcal endonuclease で分解処理した後ショ糖密度向配法及び電気泳動法により分離，精製して得た。

また，選択的重水素化法及び逆コントラスト変調法の応用実験のためのヒストンの重水素化をイースト菌（*Saccharomyces cerevisiae*）の重水中培養で行った。その中で，ヒストンの抽出法の確立，重水素化率と培養条件の決定を実現した。さらに，コア粒子の再構成も行った。

尚，コア粒子溶液試料の完全性は電気泳動，円偏光二色性，沈降測定を用いて検討した。

#### 第5章 回折実験

中性子小角散乱及び X 線小角散乱を用い，ヌクレオソーム・コア粒子構造の低イオン強度での挙動を研究した。

中性子小角散乱ではコントラスト変調法を利用して、ヌクレオソーム・コア粒子全体の構造とヒストン8量体の構造を区別した。100%  $D_2O$  溶媒中では全体構造を65%  $D_2O$  溶媒中では8量体構造をそれぞれ反映している。イオン強度の減少（10mM $\rightarrow$ 0mM）について、両者の回折半径はともに減少し、1mM近傍に転移が見出された（図1）。Stuhrmann plot の傾きの変化は散乱密度の高い部分が粒子の中心に移動することを意味し、DNAの収縮を示唆している（図2）。

また、このような構造変化の過程で、散乱曲線の小角側にピークが出現する（図3）。このピークはコア粒子の濃度の減少とともに、さらに小角側へ移動する（図4）ため、このピークの成因はコア粒子間の相互作用によることが分かった。

放射光の強力 X 線を用い、統計精度を上げてさらに希薄な溶液で測定した結果、同様な構造変化及び粒子間相互作用の変化を確認した。また、高角側の散乱曲線に明確な差を見出した（図5）。さらに得られた距離分布関数の解析から、粒子内ベクトルの重心が短距離側に移動することが示され Stuhrmann plot の解釈を支持する。

以上の結果は、コア粒子濃度 1.04 wt %  $\sim$  0.05 wt %，イオン強度 0 mM NaCl  $\sim$  10 mM NaCl の範囲で行われた実験により得られた。

#### 第6章 その他の実験結果と解析

回折実験で得たコア粒子の構造変化と粒子間相互作用の変化を、コア粒子の溶液中での存在状

態の変化と対応づけることに成功した。

沈降係数はイオン強度の減少につれて11sから8.5sまで変化し、1mM近傍に転移が見られる。また、係数値のコア粒子濃度依存性から粒子間相互作用が反発力であることが示唆される。対イオン数測定によると、低イオン強度になるにつれて対イオンが100個程度脱離する。これは対イオンによるコア粒子の有効電荷の遮へい効果が弱まり、粒子間相互作用が顕在化することを示す。偏比容の値も0.68から0.62に変化し水和状態の変化（水和水の減少）を示す。

さらに、このような転移の過程でヒストンタンパク質の二次構造は保たれ、DNAのsuper-coil構造には変化が生じていることが円偏光二色性測定により示された。

## 第7章 議論I

コントラスト変調法は、中性子散乱の生体物質構造研究への応用の基礎であるが、生体高分子の水和の影響によりH-D交換速度が極めて遅く、溶液試料と溶媒試料のD<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O比が著しいずれを生じデータ補正が困難になるという重大な問題を見出した。この問題を、白色パルス中性子を用いる本装置の特徴を利用した中性子透過率測定により、その比を高い精度で評価した後両者を一致させる操作を行う（transmission matching法）方法を開発することで解決した。これは標準溶媒試料の各波長での透過率の値から検量線を作成し未知の溶液の透過率を用いD<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O比を評価する手法である。この方法によりコントラストの評価及びデータ補正が厳密かつ容易になった。

次に、粒子間相互作用の変化と粒子構造変化が共存する場合の散乱曲線の解析法をモデル計算により考察した。粒子間の効果はHosemannの取り扱いに従い、粒子形状は二重円柱を与えた。粒子間相互作用の効果が顕著な小角領域とやや高角側と、やや高角側（ $\lambda$  0.025 Å<sup>-1</sup>）の散乱領域を分離して用いることで、相互作用と粒子形の変化を分けて議論できることを示した。

また、Guinier plotの折れ曲がりの考察から、他の著者によるデータの解釈の誤りを指摘した。さらに得られた散乱曲線の変化（図5）が、コア粒子形の偏平円柱から単円柱への構造変化に対応することを示した。

## 第8章 議論II

この章では、イオン強度変化のその他の実験についての考察とコア粒子の試料上の問題点について検討を行った。

偏比容は溶質分子の排除体積効果と分子の溶媒和の状態の両方を反映する。後者は分子の形に依存すると考えられるので偏比容の減少はコア粒子形変化による水和状態の変化と結論できる。また、対イオンの結合はイオン自身の水和をともなっているため、その変化の傾向に一致する。沈降係数の変化は、対イオン濃度が極めて低いため起きる拡散ポテンシャルの形成と粒子間相互作用の両方の効果が相乗的に現われていると考えられる。

コア粒子の試料上の問題点として、溶液の不安定性、透折平衡の評価、長期保存の方法を取り

上げ議論した。

## 第9章 議論Ⅲ

中性子散乱のもう一つの重要な手法である選択的重水素化法を用いヌクレオソーム・コア粒子のヒストン8量体の構成成分間の距離を求める実験を試行し、その方法及び結果について議論した。同一成分を対で含む場合でも、従来の方法をmodifyすることでその成分間の距離を決定できることを示した。また、この実験は、高精度の測定及びデータ処理と粒子の厳密な再構成が要求され、前者については本装置での測定が可能であることを示した。後者については得られたデータの解釈から試料上の問題点を具体的に提起した。

中性子散乱の応用で常に問題となるのは、溶媒中のprotonによる非干渉性散乱である。これは前章で議論した問題を引き起こすばかりではなく、データの統計精度を著しく低下させる。中性子線の強度は弱く、装置及び実験場所が限定されているため、この低下は重大である。この実験上のdemeritを解決する方法として、逆コントラスト変調法を発案した。この手法の要点は、試料の平均散乱密度を非干渉性散乱が最小となる溶媒の平均散乱密度に一致させることにある。これは通常のコントラスト変調法と逆である。この方法を用いると従来に比べ、一桁程度の統計精度の改善が得られることを示した。

## 第10章 総括

本研究の推進により、中性子散乱の生体物質への応用の基礎となる実験的手法（transmission matching法、データ処理法）が確立され、新たな方法（逆コントラスト変調法）も発案された。

また、ヌクレオソーム・コア粒子の低イオン強度での挙動を、粒子構造変化と粒子間相互作用の変化と同時に研究することに成功した。

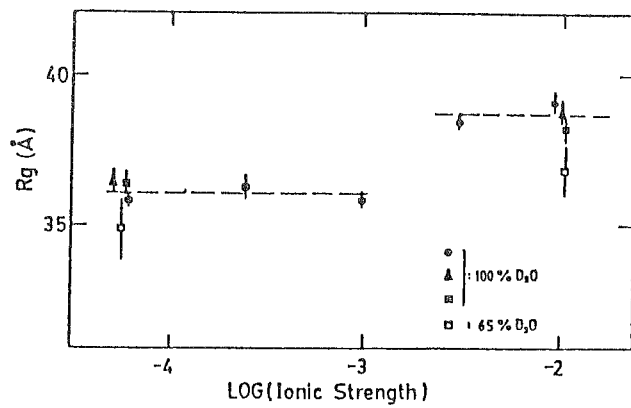


図1 回転半径のイオン強度変化

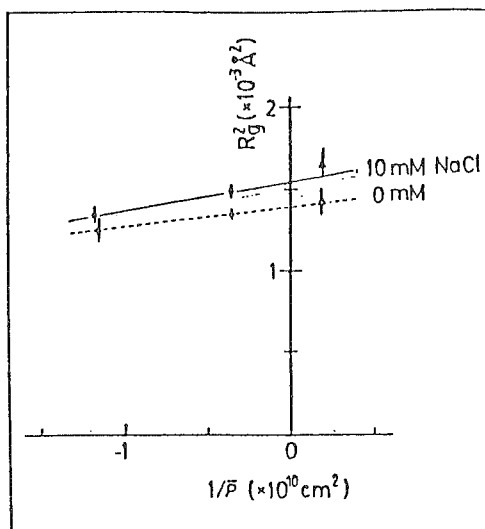


図2 Stuhrmann plot

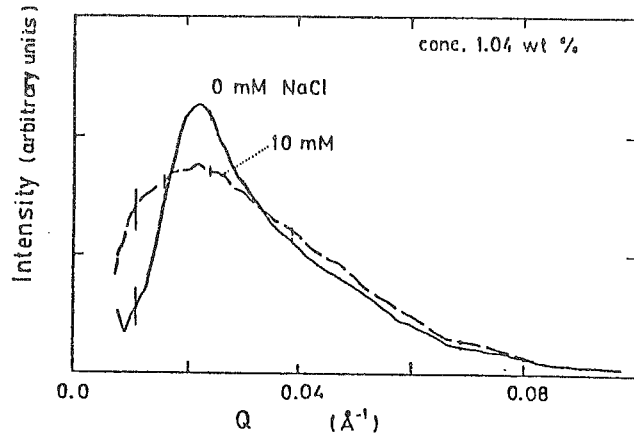


図3 散乱曲線の  
イオン強度変化  
(ピークの出現)

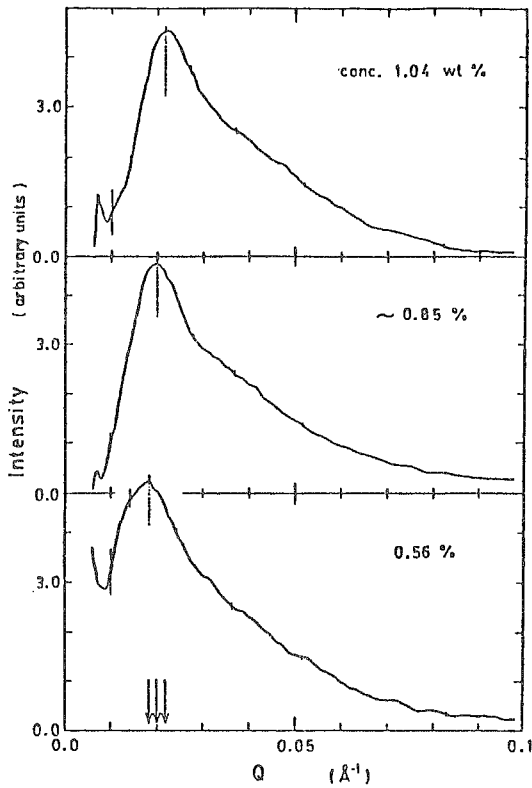


図4 ピーク位置の  
コア粒子濃度依存性

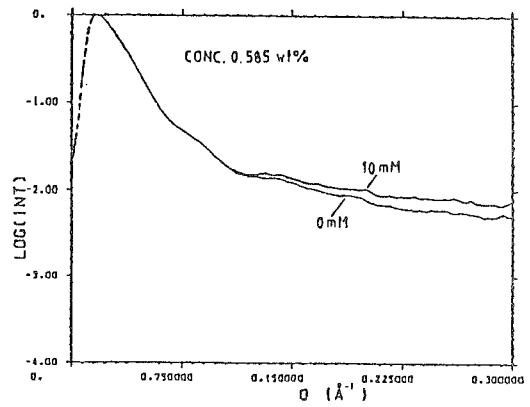


図5 散乱曲線のイオン強度変化

## 論文審査の結果の要旨

平井光博提出の博士論文は、ヌクレオソーム溶液中のイオン強度の変化に伴う構造変化を主として中性子小角散乱法で研究し、新しい知見を得たものである。中性子散乱法は軽水-重水混合溶液の混合比を変化させて、溶質である生体高分子構造をより正確に研究するコントラスト変調法と、生体高分子の一部高分子を重水素置換してその高分子の構造を選択的に研究する重水素置換法の存在によって生体物質の研究に最も重要な研究手段になっている。本研究ではこの二つの方法をヌクレオソームのコア構造への研究に応用した本邦最初の本格的な研究で、この種の研究が我国の中性子小角散乱装置でも出来る事を示した事は意義深いものである。

著者はまず測定に使用した高エネルギー物理学研究所の中性子散乱施設 KENS の中性子小角散乱装置 SAN の特徴である白色中性子を用いる事を生かし、中性子透過強度の波長依存性を求める事により、溶液中の重水濃度を正確に決定する方法を確立し、コントラスト変調法の精度を著しく向上させた。

次にこの方法を本研究に応用し、ヌクレオソーム希薄溶液の中性子小角散乱を種々のイオン強度について行う事により、イオン強度の低下（10 mM NaCl から 0 mM NaCl まで）に伴いコア粒子間に相関が出現し、粒子が約 600 Å 離れて存在するようになる事を見出した。またコア粒子内構造もイオン強度の低下と共に変化し平均回転半径は 60 % 程度収縮し、形も扁平円柱形から球形に近づく事が判明した。

著者は同種の研究をシンクロトロン軌道放射による X 線を用いて低溶質濃度、高運動量変化領域に拡張し、上記の結論を支持する結果を得た。またその他の生化学的研究手段によっても本結果に対する傍証が得られた。

ヌクレオソーム構造の溶液イオン強度による変化は、遺伝現象の解明にも重要であり、従来から多くの研究がなされ、異なる結論が得られており論争を巻き起こしているが、本研究が最も詳細な研究によってこの論争に終止符を打った事は評価すべき事である。又、著者は更に本研究を前進させるために、ヌクレオソームコアの散乱能を重水のそれと等しくする逆コントラスト法を提案し、それを実行するための試料作りも行っていることも評価に値する。

上記の測定と平行し著者はヌクレオソームコア中の H2B ヒストン蛋白を重水素化してその位置を決定する研究を行い、その様な測定が SAN で可能である事を実証した。得られた結果は測定に用いた試料に問題があり議論の対象とならなかったが、今後の前進の足掛かりを与えた事になるであろう。

以上に示したように本研究によって得られた結果は遺伝機構解明に重要な知見を与えたが、また同種の研究を中性子散乱で行う時の指針を与えるものである。よって平井光博提出の本博士論文は本人が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示しており、理学博士の学位論文として合格と認める。