

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17929

研究課題名(和文)機能性ヘム核酸の創成とその機能発現メカニズムの解明

研究課題名(英文)Creation and Characterization of functional heme-DNA

研究代表者

柴田 友和 (SHIBATA, Tomokazu)

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号：70739721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNA塩基配列d(TTAGGG)は四分子がG-カルテットを形成することで四重鎖DNAが生じる。ヘムタンパク質の補欠分子族であるヘムは3'末端のG-カルテットに結合し安定な複合体を形成する。本研究では、ヘム周辺環境を変化させ機能を制御することを目的として、3'末端に塩基を追加した四重鎖DNAにおいても、ヘムとの相互作用を解析した。その結果ヘムは追加した塩基と3'末端のG-カルテットの間で結合することが明らかとなった。ヘムと四重鎖DNAの複合体はペルオキシダーゼ活性を示すが、3'末端にアデニンを追加したDNAとヘムの複合体では更にその活性が上昇することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：A single DNA repeat sequence of the human telomere, d(TTAGGG), forms all parallel G-quadruplex DNA i.e., (d(TTAGGG))<sub>4</sub>. We found that heme binds to 3'-terminal G6 G-quartet of (d(TTAGGG))<sub>4</sub> to form a stable complex. In this study, we have characterized the molecular structures of heme-(d(TTAGGGX))<sub>4</sub> complexes, where X is vacant, A, or T, and the peroxidase activities of the complexes in order to delineate the relationship between the heme environment and peroxidase activity of the complex.

NMR analysis indicated that heme stacks onto G6-quartet of the DNA in the complex. Consequently, the interaction between heme and G6-quartet in the complex was found to be independent of the addition of the extra base at the 3'-terminal, i.e., A7 or T7.

Peroxidase activity of the heme-(d(TTAGGGA))<sub>4</sub> complex was found to be remarkably higher than those of the other two complexes, suggesting that the 3'-terminal A of the DNA acts as a general base to enhance the catalytic activity of the complex.

研究分野：生物無機化学

キーワード：DNA ヘム ペルオキシダーゼ活性 G-カルテット 四重鎖DNA ヘム核酸

1. 研究開始当初の背景

ヘムタンパク質はアミノ酸が鎖状に連結されたポリペプチドからなるタンパク質部分と補欠分子族としてヘム (Fig. 1A) タンパク質部分だけでは発現しない様々な機能を発現させている。ヘムタンパク質ではタンパク質部分が作り出すヘムポケットと呼ばれる特異な空間にヘムが挿入された構造をしている。ヘムの構造は同じでもこのヘムポケットの環境の違いにより、酸素のような気体分子との結合、酸化反応を触媒するペルオキシダーゼ活性、電子の伝達など様々な機能が発現させている。このタンパク質部分を DNA に置き換えることでヘムタンパク質のような機能を発現させることを目指している。ポリペプチドと比較して DNA は化学的に安定で合成も容易であり、さらに、その塩基配列から立体構造を予想しやすいために、工業利用への応用や分子設計への応用が期待できる。

DNA はワトソン・クリック塩基対で形成される二重鎖構造が有名であるが、グアニンが豊富である塩基配列をもつ DNA ではグアニン四つが平面上に会合した G-カルテット (Fig. 1B) を形成することが知られている。この G-カルテット平面は生体中で四重らせん構造は、テロメアと呼ばれる真核生物の染色体末端部位や遺伝子を制御するプロモータ部位に存在し、転写・翻訳・複製などの制御に関与している。この G-カルテットとヘムの平面の大きさがほぼ同じであることから、スタッキング相互作用が強く働き、安定なヘム-DNA 複合体 (以下、ヘム拡散) を構築可能であることを既に報告しているが、その結合様式およびヘムの配位構造に関しての詳細は明らかになっていなかった。さらに、そのヘム核酸では、ヘムタンパク質の機能の一つであるペルオキシダーゼ活性や気体分子の結合の機能を示すことが報告されているが、その詳細な機能出現機構が明らかにされていない。そこで、私どもはヘム DNA 複合体の構造の結合様式とヘムの配位構造を解明し、その構造をもとにして、機能発現の分子論的メカニズムの解明を目指し研究を行った。更には、ヘム結合部位の塩基を変えることにより、ヘム近傍の環境を変化させることで、ヘム-DNA 複合体の機能を向上させること目指した。

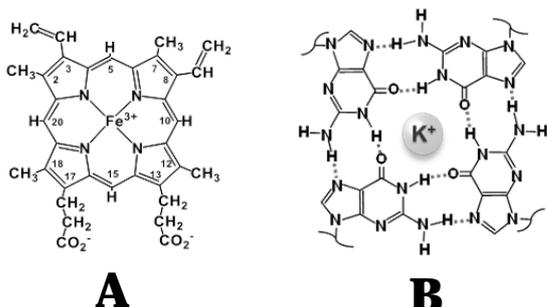


Fig. 1. Structures of heme(A) and G-quartet (B)

2. 研究の目的

ヘムはヘムタンパク質の補欠分子族として含まれる分子であり、タンパク質部分の作り出す独特の環境にヘムが存在することにより、様々な機能を発現している。本研究ではこのタンパク質部分を DNA に置き換えることでヘムタンパク質のような機能を出現させること、およびその機能発現の分子的メカニズムや機能調節機構を明らかにすることを目指している。DNA は二重鎖構造が有名ですが、グアニンが豊富な塩基配列を持つ DNA では、四重鎖構造を形成することが知られており、この四重鎖 DNA にヘムが結合し様々な機能を発現することが明らかになっていますが、その構造、特に結合様式については未だに明らかになっていません。そこで、本研究では四重鎖 DNA とヘムの結合様式決定および機能出現メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

私どもは、四重鎖 DNA を形成する配列として、ヒト染色体末端のテロメア部位に存在する繰り返し DNA 塩基配列の基本単位である d(TTAGGG) を用いた。この塩基配列は G カルテットと呼ばれる特徴的な構造の形成を通して、 $C_4$  対称軸をもつ平行型四重鎖 DNA  $[d(TTAGGG)]_4$  を形成することが知られている。 $C_4$  対称軸を持つことから、NMR シグナルの数が 1/4 になるため構造解析が容易なためである。これまでの研究でヘムは  $[d(TTAGGG)]_4$  の 3' 末端に結合することが明らかになっている。そこで、その 3' 末端に新たに塩基を追加することでヘム周辺の構造を変化させることで、ヘム核酸のペルオキシダーゼ活性を制御できると考え、3' 末端にチミン及びアデニンを追加した配列も用いた。

四重鎖 DNA にヘムを混合させることでヘム核酸が形成するかどうかを UV-Vis 分光法等を用いて確認した。構造解析には主に  $^1H$  NMR を用いた。NMR では四重鎖 DNA 中の  $^1H$  を区別して解析することが可能である。 $^1H$  シグナルのシフト変化を解析することで、ヘムの結合部位を明らかにできる。

また、ヘムと四重鎖 DNA のペルオキシダーゼ活性は 2,2'-azino-bis(3-ethylbenthiazole 6-sulphonic acid) (ABTS) の酸化反応を用いた。更にヘムの配位状態の解析には、NMR および共鳴ラマン分光法を用いた。

4. 研究成果

(1) 構造解析

ヘム核酸の構造解析は、ヘム ( $Fe^{2+}$ )-四重鎖 DNA 複合体の一酸化炭素 (CO) 付加物で行った。ヘム ( $Fe^{2+}$ )-  $[d(TTAGGG)]_4$  の CO 付加物の  $^1H$  NMR スペクトルにおいて、G-カルテットの形成に関与する NH プロトンに由来するシグナルがヘムのポルフィリン環の環電流効果によって高磁場シフトする程度は  $G4 < G5 < G6$

であったことから、ヘムは G6 G-カルテットに結合していることが明らかになった。ヘムのポルフィリン環の管電流効果を考慮して結合距離を計算すると結合距離は約 0.35 nm であることが明らかになった。

また、3' 末端にアデニン及び [d(TTAGGGA)]<sub>4</sub> および [d(TTAGGGT)]<sub>4</sub> 他、他の 2 つの複合体のスペクトルでも同様のパターンが観測されシフト変化も同程度であることから、これらヘム核酸でもヘムは G6 G-カルテットに約 0.35 の距離で結合していることが確認された。従って、3' 末端に A7 または T7 をもつ DNA の複合体の場合、G6 G-カルテットと追加した塩基(A7 または T7)の間に結合することが明らかになり、これら塩基とヘムの相互作用が予想された(Fig. 2)。

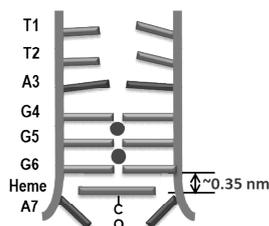


Fig. 2. Schematic drawing of heme-DNA

### (2) 配位構造の解析

[d(TTAGGG)]<sub>4</sub> および [d(TTAGGGT)]<sub>4</sub> と [d(TTAGGGA)]<sub>4</sub> の四重鎖 DNA のヘム核酸の CO 付加物の <sup>1</sup>H NMR において、-3.5 ppm 付近に交換性のシグナルが観測された。通常、反磁性の物質ではこの領域に観測されるシグナルは少ないが、ヘムの環電流効果によって、高磁場にシフトし更に、G6 の G-カルテットのカルボニルの酸素原子と水素結合して観測されたヘムに配位した水のシグナルであると考えられた(Fig. 3)。DFT 計算により NMR のシフト値を計算すると概ね一致し、ヘム核酸の CO 付加物ではヘム鉄に水と CO が配位していることが示唆された。共鳴ラマンスペクトルでもヘム核酸の CO 付加物の測定を行った。ヘムのポルフィリン環の振動の解析からヘム鉄は 6 配位であることが示され、ヘムに水が配位していることを支持する結果になった。このヘムに配位した水は G-カルテット

のカルボニルの酸素原子と水素結合しているため、水の水素原子がプラスに酸素原子がマイナスに分極すると考えられる。

### (3) 機能解析

[d(TTAGGG)]<sub>4</sub> および [d(TTAGGGT)]<sub>4</sub> と [d(TTAGGGA)]<sub>4</sub> の四重鎖 DNA のヘム核酸のペルオキシダーゼ活性の評価を行った。反応により生じる ABTS ラジカルカチオン由来の 410 nm の吸光度の経時変化を、ヘム単体および三つの複合体で比較した(Fig. 4A)。ヘム(Fe<sup>3+</sup>)-[d(TTAGGG)]<sub>4</sub> の  $V_0$  はヘム単体の値に比べて約 5 倍であることが示され、ヘムは四重鎖 DNA と複合体を形成することでペルオキシダーゼ活性が上昇することが明らかになった。このことはヘム鉄に配位した分極した水の水素原子が電子を押し出すことで活性が高まったと考えられる。

また、ヘム(Fe<sup>3+</sup>)-[d(TTAGGGT)]<sub>4</sub> はヘム(Fe<sup>3+</sup>)-[d(TTAGGG)]<sub>4</sub> とほぼ同じ  $V_0$  を示したのに対し、ヘム(Fe<sup>3+</sup>)-[d(TTAGGGA)]<sub>4</sub> はヘム(Fe<sup>3+</sup>)-[d(TTAGGG)]<sub>4</sub> の約 10 倍の  $V_0$  を示した。ヘムタンパク質であるペルオキシダーゼでは、ヘム鉄に結合した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> のプロトン電離が近傍のヒスチジンの塩基触媒作用を通して促進される機構が活性の発現において重要であると報告されている。従って、ヘム(Fe<sup>3+</sup>)-[d(TTAGGGA)]<sub>4</sub> における 3' 末端塩基のアデニンは、一般塩基触媒として  $V_0$  の増大に寄与していることが推測された(Fig. 2B)。

分子動力学計算の結果、ヘム(Fe<sup>2+</sup>)-[d(TTAGGGA)]<sub>4</sub> では A7 がヘム鉄に結合した CO と相互作用出来る距離に近接していることが示唆された。また、ヘム(Fe<sup>2+</sup>)-[d(TTAGGGA)]<sub>4</sub> の共鳴ラマンスペクトルで測定された CO 関連振動バンドには、ヘム鉄に結合した CO と A7 の静電的相互作用が反映された。これらの結果は、A7 が一般塩基触媒として複合体のペルオキシダーゼ活性の増大に寄与することを支持している。本研究で得られた知見は、ヘム-四重鎖 DNA 複合体の分子設計に有用であると考えられる。

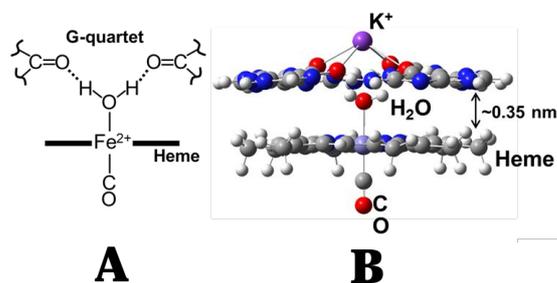
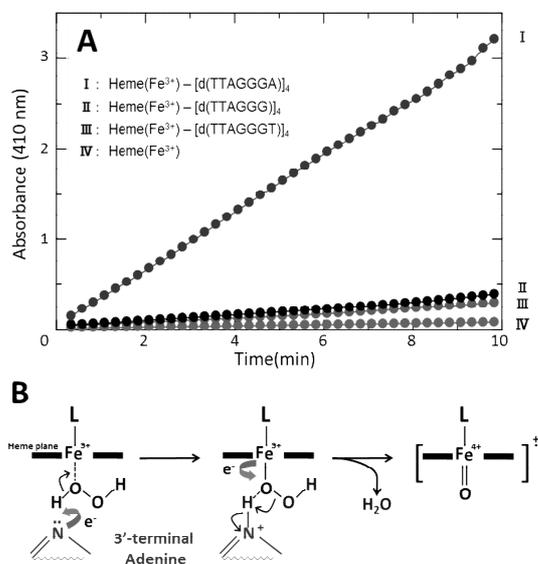


Fig. 3. Coordination Structures of heme(A) and model of DFT calculation(B)



**Fig. 4.** (A): Plots of the absorbance at 410 nm against time of heme(Fe<sup>3+</sup>) and the heme(Fe<sup>3+</sup>)-DNA complexes at pH 7.0 and 25°C. (B): A portion of the reaction mechanism of peroxidase.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

(1) T. Shibata, Y. Nakayama, Y. Katahira, H. Tai, Y. Moritaka, Y. Nakano, Y. Yamamoto

Characterization of the interaction between heme and a parallel G-quadruplex DNA formed from d(TTGAGG)  
 Biochim. Biophys. Acta 1861, 1264-1270 (2017)

[学会発表](計 19 件)

(1) 篠宮僚介, 柴田友和, 小倉尚志, 柳澤幸子, 鈴木秋弘, 根矢三郎, Sen Dipankar, 山本泰彦

化学修飾ヘムと四重鎖 DNA [d(TTAGGG)]<sub>4</sub> の複合体のペルオキシダーゼ活性およびヘム配位構造の解析

日本化学会 第 98 春季年会 (2018)

(千葉県船橋市・日本大学), 2018 年 3 月

(2) 山本泰彦, 荒木はるか, 中山優作, 越智健太郎, 柴田友和, 逸見光, 萩原正規, Sen Dipankar

ヒトテロメア類似塩基配列の四重鎖 DNA とヘム複合体の NMR 分光法による構造解析

日本化学会 第 98 春季年会 (2018)

(千葉県船橋市・日本大学), 2018 年 3 月

(3) 〇荒木はるか, 中山優作, 越智健太郎, 篠宮僚介, 柴田友和, 逸見光, 萩原正規, 小倉尚志, 柳澤幸子, 鈴木秋弘, 根矢三郎, Sen Dipankar, 山本泰彦

ヒトテロメア類似塩基配列の四重鎖 DNA とヘム複合体のペルオキシダーゼ活性と構造の

## 関係の解析

日本化学会 第 98 春季年会 (2018)

(千葉県船橋市・日本大学), 2018 年 3 月

(4) T. Shibata, K. Ochi, H. Araki, Y. Nakayama, R. Shinomiya, S. Yanagisawa, T. Ogura, H. Hemmi, D. Sen, Y. Yamamoto  
 Characterization of Complexes between heme and G-Quadruplex DNAs Formed from Human Telomere-Related Sequences

The second international symposium on biofunctional chemistry (ISBC2017)

(京都府宇治市・京都大学宇治キャンパス), 2017 年 12 月

(5) R. Shinomiya, T. Shibata, S. Yanagisawa, T. Ogura, A. Suzuki, S. Neya, D. Sen, Y. Yamamoto

Characterization of Peroxidase Activities and Structures of Complexes between Chemically Modified Hemes and All Parallel G-Quadruplex DNA formed from d(TTAGGG)

The second international symposium on biofunctional chemistry (ISBC2017)

(京都府宇治市・京都大学宇治キャンパス), 2017 年 12 月

(6) R. Shinomiya, T. Shibata, S. Yanagisawa, T. Ogura, A. Suzuki, S. Neya, and Y. Yamamoto

Characterization of Peroxidase Activity of a Complex between Heme and G-Quadruplex DNA [d(TTAGGG)]<sub>4</sub>

ISNAC2017 第 44 回国際核酸化学シンポジウム

(東京都・東京理科大学 葛飾キャンパス), 2017 年 11 月

(7) 片平祐弥, 柴田友和, 松井亨, 守橋健二, 渡部明莉, 中尾知美, 柳澤幸子, 小倉尚志, 山本泰彦

ヘム-DNA 複合体の酸化触媒活性と DNA 塩基配列を通じた活性調節

第 44 回生体分子科学討論会(秋田県秋田市・カレッジプラザ), 2017 年 6 月

(8) Y. Yamamoto, T. Shibata, Y. Katahira, K. Ochi, Y. Nakayama, H. Tai, A. Watanabe, T. Nakao, S. Yanagisawa, T. Ogura, H. Hemmi, M. Hagihara, A. Suzuki, and S. Neya

Heme-DNA Complexes

14th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC14)

14th International Symposium on Applied Bioinorganic

Chemistry (ISABC14) (Toulouse · France), 2017 年 6 月

(9) Y. Yamamoto, K. Ochi, T. Shibata, H. Hemmi, M. Hagihara

Structural Characterization of G-Quadruplex DNAs Formed from Human Telomere-Related Sequences and Their Complexes with Heme

58th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference (ENC), Pacific Grove,

California・USA), 2017年3月  
(10)片平祐弥, 柴田友和, 松井亨, 守橋健二, 渡部明莉, 中尾知美, 柳澤幸子, 小倉尚志, 山本泰彦  
DNA塩基配列がヘム-DNA複合体の構造と機能に与える影響  
日本化学会第97春季年会(横浜市・慶応義塾大学日吉キャンパス), 2017年3月  
(11) 篠宮僚介, 片平祐弥, 柴田友和, 小倉尚志, 柳澤幸子, 中尾知美, 鈴木秋弘, 山本泰彦  
種々のフッ素化ヘムと四重鎖DNA[d(TTAGGG)]<sub>4</sub>の複合体の機能と構造  
日本化学会第97春季年会(横浜市・慶応義塾大学日吉キャンパス), 2017年3月  
(12)越智健太郎, 山本泰彦, 柴田友和, 萩原正規, 逸見光  
ヘムと四重鎖DNAの複合体の構造解析  
日本化学会第97春季年会(横浜市・慶応義塾大学日吉キャンパス), 2017年3月  
(13) Y. Yamamoto, T. Shibata, Y. Katahira, Y. Nakayama, H. Tai, T. Matsui, K. Morihashi, A. Watanabe, T. Nakao, S. Yanagisawa, T. Ogura, A. Suzuki, S. Neya  
Characterization of Complexes between Hemes and Parallel G-Quadruplex DNAs  
8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference(AsBIC 8)(New Zealand・Owen Glenn Building 12 Grafton Rd, The University of Auckland), 2016年12月  
(14) 越智健太郎, 柴田友和, 逸見光, 萩原正規, 山本泰彦  
ヘムと四重鎖DNAの複合体の構造解析  
第55回NMR討論会(2016)(広島県広島市・広島国際会議場), 2016年11月  
(15)T. Shibata, Y. Nakano, Y. Moritaka, Y. Nakayama, Y. Katahira, H. Tai, and Y. Yamamoto  
Effects of DNA Sequence Alteration on Structure of a Complex between Heme and All-Parallel G-Quadruplex  
第43回国際核酸化学シンポジウム(ISNAC 2016)(熊本県熊本市・熊本大学工学部百周年記念館), 2016年9月  
(16) Y. Katahira, T. Shibata, T. Matsui, K. Morihashi, A. Watanabe, T. Nakao, S. Yanagisawa, T. Ogura, and Y. Yamamoto  
Structural characterization of catalytic DNAs composed of heme and parallel G-quadruplexes  
第43回国際核酸化学シンポジウム(ISNAC 2016)(熊本県熊本市・熊本大学工学部百周年記念館), 2016年9月  
(17) 山本泰彦, 片平祐弥, 中山優作, 柴田友和, 渡部明莉, 中尾知美, 柳澤幸子, 小倉尚志, 鈴木秋弘, 根矢三郎  
ヘムと四重鎖DNAの複合体の触媒機能測定と構造解析  
第10回バイオ関連化学シンポジウム(石川県金沢市・石川県立音楽堂), 2016年9月

(18) 柴田友和, 片平祐弥, 山本泰彦  
ヘムと平行型四重鎖DNAの複合体の構造および機能の解析  
第17回若手NMR研究会(神奈川県箱根・箱根高原ホテル), 2016年9月  
(19) T. Shibata, Y. Katahira, H. Hemmi, and Y. Yamamoto  
Structural and Functional Characterization of Complexes between Heme and G-quadruplex DNAs formed from human telomere-related sequences  
The 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems(ICMRBS2016)  
(京都府京都市・京都国際会館) 2016年8月, ポスター

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
柴田友和(SHIBATA, Tomokazu)  
筑波大学・数理物質系・助教  
研究者番号: 70739721