

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05574

研究課題名(和文) 金属錯体型塩基対の形成を構造基盤とするDNA複製反応の制御

研究課題名(英文) Regulation of DNA polymerase-catalyzed primer extension reaction based on formation of metal-mediated base pairs

研究代表者

浦田 秀仁 (Urata, Hidehito)

大阪薬科大学・薬学部・教授(移行)

研究者番号：80211085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：DNAポリメラーゼを用いたプライマー伸長反応(PER)におけるT-Ag(I)-CやT-Hg(II)-T錯体型塩基対の形成反応の選択性について、チミン誘導体として5位修飾ウラシルを含む鏝型鎖を用いて検討を行った。その結果、チミン3位NHの酸性度が、PERにおけるT-Ag(I)-C錯体型塩基対の形成や安定性に重要であるが、T-Hg(II)-T錯体型塩基対の形成や安定性への影響は小さいことが明らかになった。このことから、チミン5位の修飾により3位NHの酸性度を変化させることで、T-Ag(I)-C塩基対の形成を選択的に制御できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this project, we studied the selectivity for the formation of metal-mediated T-Ag(I)-C and T-Hg(II)-T base pairs in DNA polymerase-catalyzed primer extension reaction (PER) by using DNA templates containing the thymine analogs such as 5-fluorouracil (5FU) and 5-hydroxyuracil (OHU), etc. The results indicated that the acidity of NH at the N3 position of thymine is important for the formation of the T-Ag(I)-C base pair in PER and also the stability of DNA duplex containing the T-Ag(I)-C base pair, although the acidity hardly affected on the formation of the T-Hg(II)-T base pair in PER and the stability of DNA duplex containing the T-Hg(II)-T base pair.

Thus, selective regulation of the formation of the T-Ag(I)-C base pair in PER can be successfully achieved by changing the acidity of NH at the N3 position by modifying the 5-methyl group of thymine.

研究分野：核酸化学

キーワード：金属錯体型塩基対 DNAポリメラーゼ プライマー伸長反応 銀(I)イオン 水銀(II)イオン

### 1. 研究開始当初の背景

DNA はアデニンとチミン (A-T) 間、グアニンとシトシン (G-C) 間で水素結合による Watson-Crick 型の塩基対を構造基盤とした二重らせん構造を形成しているが、最近、小野らは二本鎖DNA 中のチミン-チミン (T-T) ミスマッチ塩基対が水銀イオン ( $\text{Hg}^{\text{II}}$ ) によって安定化されることを見出した。その構造は X 線結晶構造解析により、水銀イオンはチミン 3 位の窒素原子間に配位結合し、T-T 塩基対を安定化していることが明らかにされた (図 1)。また、小野らはシトシン-シトシン (C-C) ミスマッチ塩基対が銀イオン ( $\text{Ag}^{\text{I}}$ ) によって安定化されることも見出している (図 1)。

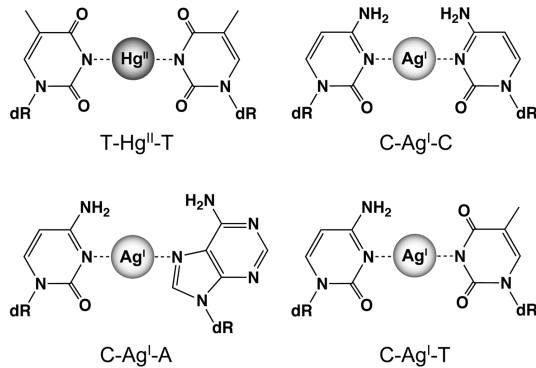


図 1 金属錯体型塩基対

申請者は、金属錯体型塩基対、特に  $\text{Hg}^{\text{II}}$  イオンの T-T ミスマッチ塩基対に対する高い選択性に着目し、DNA ポリメラーゼによる T- $\text{Hg}^{\text{II}}$ -T 塩基対を介した複製反応 (プライマー伸長反応, PER) を世界に先駆けて見出し、報告した。さらに  $\text{Ag}^{\text{I}}$  イオン存在下での PER を Klenow fragment (KF) を用いて行い、鋳型鎖のシトシンの相補位に dATP が取り込まれ C- $\text{Ag}^{\text{I}}$ -A 塩基対を形成することを明らかにした (図 1)。さらに、同様の検討を 3'-5' exonuclease 活性を欠損した KF<sub>exo-</sub> を用いて行うと dATP に加えて、dTTP も取り込まれ C- $\text{Ag}^{\text{I}}$ -T 塩基対を形成することも見出した (図 1)。 $\text{Ag}^{\text{I}}$  イオン存在下での dATP 取り込み反応と比較し、dTTP 取り込み反応は再現性や  $\text{Ag}^{\text{I}}$  イオンに対する選択性の点で非常に優れており、 $\text{Hg}^{\text{II}}$  イオン存在下での T- $\text{Hg}^{\text{II}}$ -T 形成反応に匹敵するものであった。そこで、T- $\text{Hg}^{\text{II}}$ -T および C- $\text{Ag}^{\text{I}}$ -T 錯体型塩基対の形成

反応を利用して、二重鎖 DNA 中の特定の位置に異なる二種の金属イオン ( $\text{Hg}^{\text{II}}$ ,  $\text{Ag}^{\text{I}}$ ) を、DNA ポリメラーゼを用いて取り込ませることに世界で初めて成功し、当該論文のイメージ図が掲載号の Back Cover に採用されるなど高い評価をいただいた。

### 2. 研究の目的

これまで DNA ポリメラーゼによる幾つかの金属錯体型塩基対形成反応を見出してきたが、次の 2 点の疑問がある。1)  $\text{Hg}^{\text{II}}$  イオンによって T- $\text{Hg}^{\text{II}}$ -T 塩基対が、 $\text{Ag}^{\text{I}}$  イオンによって C- $\text{Ag}^{\text{I}}$ -C 塩基対が最も安定に形成されるが、これら T-T および C-C ミスマッチ塩基対に対する  $\text{Hg}^{\text{II}}$  および  $\text{Ag}^{\text{I}}$  イオンの厳密な選択性の起源。2) C-C あるいは C-T ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA の  $\text{Ag}^{\text{I}}$  イオンによる安定化効果は C-C ミスマッチの方が大きいにも関わらず、DNA ポリメラーゼによる  $\text{Ag}^{\text{I}}$  イオン存在下でのプライマー伸長反応では C- $\text{Ag}^{\text{I}}$ -C 塩基対が極度に形成されにくかったことである。これらの疑問の解明が、本プライマー伸長反応における金属イオンと核酸塩基による錯体型塩基対形成の特異性の構造化学的基盤となり、PER の制御に繋がると考えられる。また、PER の制御と併せて視覚的検出が可能になればテクノロジーとしての応用範囲がさらに拡大されることから、以下の点の達成を目的とし検討を行った。

- (1) 金属錯体型塩基対形成を介する PER へのピリミジン 5 位修飾の影響
- (2) 金属錯体型塩基対を含む二重鎖 DNA の熱安定性へのピリミジン 5 位修飾の影響
- (3) 金属錯体型塩基対形成を介する PER の検出プローブの開発

### 3. 研究の方法

#### (1) 金属錯体型塩基対形成を介する PER へのピリミジン 5 位修飾の影響

ピリミジン塩基の 5 位を電子求引性基、或は電子供与基で置換することでピリミジン環の電子密度およびウラシル 3 位 NH の  $\text{pK}_a$  を変化させ、これに伴う PER への影響を検討した。具体的には、5-フルオロデオキシウリジ

ン(5-FdU)、5-ヒドロキシデオキシウリジン(5-OHdU)、および5-ヒドロキシデオキシチジン(5-OHdC)を含む鋳型 DNA と、蛍光(FAM) 標識したプライマー-DNA に対し、KF または KF<sup>exo-</sup>を用いて PER を行い、20%変性ゲル電気泳動で分析した。また、ウラシル 3 位 NH の pK<sub>a</sub>の影響を調べるため pH7.1 と pH7.9 で PER を比較検討した。

#### (2) 金属錯体型塩基対を含む二重鎖DNAの熱安定性へのピリミジン 5 位修飾の影響

ピリミジン 5 位の置換による環の電子密度変化、あるいはウラシル 3 位 NH の pK<sub>a</sub> の変化 が金属錯体型塩基対を含む二重鎖 DNA の熱安定性に及ぼす影響を調べるために、5-FdU、5-OHdU、5-OHdC を含む二重鎖 DNA の Ag<sup>I</sup> イオン非存在下および存在下での融解曲線を測定し、T<sub>m</sub> 値を算出した。

#### (3) 金属錯体型塩基対形成を介する PER の検出プローブの開発

当初予定していた photo-induced electron transfer (PET) による蛍光の消光が金属イオンの配位によりキャンセルされ蛍光性となる “turn-on” 蛍光プローブの設計は困難であったためアプローチを変更し、TaqMan プローブを用いた 5'-exonuclease assay により、PER による金属錯体型塩基対の形成を検出することを試みた。具体的には、50mer 前後の鋳型 DNA に対し、21mer のプライマーの下流に T-Hg<sup>II</sup>-T 塩基対形成サイトを設定し、さらにその下流に TaqMan プローブを配置する塩基配列を設計した。これに Taq DNA polymerase を作用させ Hg<sup>II</sup> イオン存在下で T-Hg<sup>II</sup>-T 塩基対形成サイトを read through すれば TaqMan プローブが分解され蛍光が検出される戦略である。

### 4. 研究成果

#### (1) 金属錯体型塩基対形成を介する PER へのピリミジン 5 位修飾の影響

5-FdU または 5-OHdU を含む鋳型 DNA を合成し、DNA ポリメラーゼによる PER を行ったところ、T-Ag<sup>I</sup>-C 塩基対より T (pK<sub>a</sub> 9.8) を 5-フルオロウラシル (<sup>5F</sup>U, pK<sub>a</sub> 7.7) で置換した <sup>5F</sup>U-Ag<sup>I</sup>-C 塩基対の方が形成されやすくなることが判明した。また、T-Ag<sup>I</sup>-C 塩基対の形成反応は反応溶液の pH の上昇 (pH

7.1 7.9) によっても促進されることが明らかになった。これらの結果は、前者ではフッ素の電子求引性により 3 位 NH の酸性度が上昇し、後者では反応液の pH が上昇し 3 位 NH の脱プロトン化が促進され Ag<sup>I</sup> 錯体型塩基対の形成に有利になったこと、また生成した Ag<sup>I</sup> 錯体型塩基対に存在する +1 の陽電荷がフッ素の電子求引性により安定化する効果があると考えられる。

さらに、5 位を水酸基で置換したウラシル (<sup>OH</sup>U, pK<sub>a</sub> 11.7) を用いた場合、T-Ag<sup>I</sup>-C と比較して <sup>OH</sup>U-Ag<sup>I</sup>-C の形成効率が低下することから、チミン 3 位 NH の酸性度が Ag<sup>I</sup> 錯体型塩基対の形成に重要であることが、この結果からも明らかになった。

一方、Hg<sup>II</sup> 存在下の PER による T-Hg<sup>II</sup>-T の形成反応の pH およびチミンの <sup>5F</sup>U への置換の影響について調べたところ、これらによる影響はほとんどないが、むしろ形成効率はやや低下傾向であり、Ag<sup>I</sup> の錯体形成を介する PER とは対照的であった。

以上の結果から、PER による <sup>5F</sup>U-Hg<sup>II</sup>-T 塩基対の形成効率は T-Hg<sup>II</sup>-T 塩基対の形成と比較して有意な差はないことから、T の代わりに <sup>5F</sup>U を用いることで、<sup>5F</sup>U-Hg<sup>II</sup>-T 塩基対形成にはほとんど影響を与えず、<sup>5F</sup>U-Ag<sup>I</sup>-C 塩基対形成のみを促進でき、5 位置換基による PER により形成される金属錯体型塩基対の選択性を変化させた最初の例となった。

#### (2) 金属錯体型塩基対を含む二重鎖DNAの熱安定性へのピリミジン 5 位修飾の影響

(1) での PER の結果を、生成する DNA 二重鎖の熱安定性の観点から考察する目的で、中央部に T, C, FU を含む 15mer オリゴヌクレオチド (ODN) を合成し、ミスマッチ塩基対を含む二重鎖の融解温度の測定を行った (表 1)。

表 1 に示したように、1 当量の Ag<sup>I</sup> の添加によって、T-C (C-T) ミスマッチ塩基対は約 6 の融解温度の上昇が認められるが、<sup>5F</sup>U-C (C-<sup>5F</sup>U) は約 12 の上昇が認められ、T の <sup>5F</sup>U への置換により Ag<sup>I</sup> により二重鎖の安定性が大きく向上した。一方、T-T ミスマッチ塩基対に 1 当量の Hg<sup>II</sup> を添加すると約 9

融解温度の上昇が認められるが、 $^{5F}U-T$  ( $T-^{5F}U$ )では約 8.5、 $^{5F}U-^{5F}U$ でも 9.7 の上昇しか認められず、T の  $^{5F}U$  への置換による二重鎖の安定化は認められなかった。

**表 1** Effects of Ag(I) and Hg(II) on thermal stability of duplexes with a base pair mismatch.

			$T_m$ ( )	$T_m$ ( )
C-C	5'-CAT TGG ACT GAC GCT-3' 3'- GTAACC TCA CTG CGA-5'	(-)	41.6±0.40	-
		Ag = 1 eq.	51.1±0.50	+9.5
		Hg = 1 eq.	40.5±0.10	-1.1
		(-)	45.5±0.30	-
C-T	5'-CAT TGG ACT GAC GCT-3' 3'- GTAACC TTA CTG CGA-5'	Ag = 1 eq.	51.3±0.30	+5.8
		Hg = 1 eq.	47.5±0.70	+2.0
		(-)	44.6±0.20	-
C- $^{5F}U$	5'-CAT TGG ACT GAC GCT-3' 3'- GTA ACC T $^{5F}U$ A CTG CGA-5'	Ag = 1 eq.	56.1±0.30	+11.5
		Hg = 1 eq.	46.0±0.40	+1.4
		(-)	46.2±0.20	-
T-C	5'-CAT TGG ATT GAC GCT-3' 3'- GTAACC TCA CTG CGA-5'	Ag = 1 eq.	52.2±0.00	+6.0
		Hg = 1 eq.	47.6±0.20	+1.4
		(-)	44.3±0.10	-
$^{5F}U-C$	5'-CAT TGG A $^{5F}U$ T GAC GCT-3' 3'- 3'-GTAACC TCA CTG CGA-5'	Ag = 1 eq.	56.6±0.40	+12.3
		Hg = 1 eq.	46.2±0.40	+1.9
		(-)	47.3±0.10	-
T-T	5'-CAT TGG ATT GAC GCT-3' 3'- GTAACC TTA CTG CGA-5'	Ag = 1 eq.	48.1±0.50	+0.8
		Hg = 1 eq.	56.5±0.10	+9.2
		(-)	45.7±0.10	-
T- $^{5F}U$	5'-CAT TGG ATT GAC GCT-3' 3'- GTAACC T $^{5F}U$ A CTG CGA-5'	Ag = 1 eq.	49.5±0.30	+3.8
		Hg = 1 eq.	54.1±0.70	+8.4
		(-)	45.8±0.00	-
$^{5F}U-T$	5'-CAT TGG A $^{5F}U$ T GAC GCT-3' 3'- 3'-GTA ACC TTA CTG CGA-5'	Ag = 1 eq.	50.2±0.20	+4.4
		Hg = 1 eq.	54.3±0.10	+8.5
		(-)	43.2±0.00	-
$^{5F}U-^{5F}U$	5'-CAT TGG A $^{5F}U$ T GAC GCT-3' 3'- 3'-GTAACC T $^{5F}U$ A CTG CGA-5'	Ag = 1 eq.	55.6±0.60	+12.4
		Hg = 1 eq.	52.9±0.57	+9.7
		(-)	45.8±0.00	-

Samples contained 2  $\mu$ M duplex, 100 mM sodium perchlorate and 10 mM sodium cacodylate, pH 7.1. Melting curves were measured at least twice at 270 nm. The temperature was raised at a rate of 0.5  $^{\circ}C$   $min^{-1}$ .

以上の結果は (1) での PER の結果と、 $Ag^I$  イオンを介する T- $Ag^I$ -C 塩基対の形成は 3 位 NH の脱プロトン化が律速段階になっており、この段階の促進により可逆的な T- $Ag^I$ -C 塩基対形成過程が有利になり二重鎖の安定性も向上したと考えられる。

### (3) 金属錯体型塩基対形成を介する PER の検出プローブの開発

53mer の鋳型 DNA に対し、5'-末端を FAM 標識した 21mer のプライマーの下流に T- $Hg^{II}$ -T 塩基対形成サイトを設定した PER 系を設計・合成した。これに Taq DNA polymerase を作用させ、 $Hg^{II}$  イオンの有無による伸長反応の T- $Hg^{II}$ -T 塩基対形成サイトでの stop, read through を制御できる条件を確立できた。現在、T- $Hg^{II}$ -T 塩基対形成サイトの下流に、5'-末端を Cy5 で、3'-末端を BHQ3 で標識した 23mer の TaqMan プローブを共存させ、T- $Hg^{II}$ -T 塩基対が形成され、このサイトが read through されることにより、Cy5 が蛍

光を発する方法論を検証している段階である。

### < 引用文献 >

Y. Miyake, H. Togashi, M. Tashiro, H. Yamaguchi, S. Oda, M. Kudo, Y. Tanaka, Y. Kondo, R. Sawa, T. Fujimoto, T. Machinami and A. Ono, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2172-2173.

J. Kondo, T. Yamada, C. Hirose, I. Okamoto, Y. Tanaka and A. Ono, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 2385-2388.

A. Ono, S. Cao, H. Togashi, M. Tashiro, T. Fujimoto, T. Machinami, S. Oda, Y. Miyake, I. Okamoto and Y. Tanaka, *Chem. Commun.* **2008**, 4825-4827.

H. Urata, E. Yamaguchi, T. Funai, Y. Matsumura and S. Wada, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**, 6516-6519.

T. Funai, Y. Miyazaki, M. Aotani, E. Yamaguchi, O. Nakagawa, S. Wada, H. Torigoe, A. Ono and H. Urata, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, **51**, 6464-6466.

T. Funai, J. Nakamura, Y. Miyazaki, R. Kiri, O. Nakagawa, S. Wada, A. Ono and H. Urata, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 6624-6627.

T. Funai, J. Nakamura, Y. Miyazaki, R. Kiri, O. Nakagawa, S. Wada, A. Ono and H. Urata, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 6828.

R. Ishikawa, C. Kojima, A. Ono and M. Kainosho, *Magn. Reson. Chem.*, **2001**, 39 S159-S165.

C. J. La Francois, Y. H. Jang, T. Cagin, W. A. Goddard, III and L. C. Sowers, *Chem. Res. Toxicol.*, **2000**, 13, 462-470.

P. M. Holland, R. D. Abramson, B. Watson and D. H. Gelfand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88, 7276-7280.

### 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 2件)

Y. Tanaka, I. Kondo, V. S. J. Sychrovsky, T. Dairaku, H. Saneyoshi, H. Urata, H. Torigoe, A.

Ono.  
Structures, physicochemical properties, and applications of T-Hg(II)-T, C-Ag(I)-C, and other metallo-base-pairs., *Chem. Commun.*, (査読有) 2015, 51, 17343-17360.

船井達也、浦田秀仁  
金属イオンが機能制御する化学  
化学 (査読無), 2015, 70, 66-67.

〔学会発表〕(計 5件)

吉村沙奈子、林淳祐、和田俊一、浦田秀仁  
DNA polymerase による金属錯体型塩基対の形成に対する pyrimidine 5 位修飾の影響  
第 67 回 日本薬学会近畿支部総会・大会、兵庫医療大学、10 月、2017

杉町莉世、田中菜摘、船井達也、宮崎有紀、林淳祐、和田俊一、浦田秀仁  
Influences of Zn( ) and Mn( ) ions on fidelity of DNA polymerases  
第 43 回国際核酸化学シンポジウム、熊本、9 月、2016

桐生里紗、船井達也、中村淳子、林淳祐、和田俊一、浦田秀仁  
DNA polymerase による銀(I) 錯体型塩基対形成の塩基選択性  
日本薬学会第 135 年会、神戸、3 月、2015

中田 賢、船井達也、宮崎有紀、林 淳祐、和田俊一、浦田秀仁  
Cu<sup>I</sup> の配位による新規 C-Cu<sup>I</sup>-T 型塩基対の形成  
第 65 回 日本薬学会近畿支部総会・大会、大阪大谷、10 月、2015

森田敬子、中村淳子、船井達也、林 淳祐、和田俊一、浦田秀仁  
DNA polymerase による C-Ag<sup>I</sup>-T、T-Ag<sup>I</sup>-C 錯体型塩基対の連続形成の検討  
第 65 回 日本薬学会近畿支部総会・大会、大阪大谷、10 月、2015

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<https://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushitu/sousei.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
浦田 秀仁 (URATA, Hidehito)  
大阪薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：80211085

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )