

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550199

研究課題名(和文) 金属錯体型塩基対のDNAポリメラーゼによる認識

研究課題名(英文) Recognition of metal-mediated base pairs by DNA polymerases

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNAポリメラーゼを用いた銀(I)イオン存在下でのプライマー伸長反応を行い、銀(I)イオンが最も安定化すると報告されているC-Ag(I)-C塩基対ではなく、C-Ag(I)-A塩基対が形成されることを見出した。また、各種金属イオンの存在下、様々なミスマッチ塩基対の形成反応を系統的に検討したところ、銀(I)イオン存在下でC-Ag(I)-T塩基対が形成されることを見出した。本反応と、以前見出したT-Hg(II)-T塩基対形成反応を組合せ、異なる二種の金属イオン(Hg(II)およびAg(I)イオン)を二重鎖DNA中の標的とする部位に特異的に取り込ませることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this project, first we studied the DNA polymerase-catalyzed primer extension in the presence of Ag(I) ions and unexpectedly found the formation of not the C-Ag(I)-C base pair but the C-Ag(I)-A base pair. Subsequently, we found the formation of the C-Ag(I)-T base pair by exhaustive screening of DNA polymerase-catalyzed mismatch base pair formation under the presence of various kinds of metal ions. By using very high specificity of the formation of the C-Ag(I)-T base pair and the previously reported T-Hg(II)-T base pair, we demonstrated that two kinds of metal ions, Ag(I) and Hg(II), highly selectively mediate the incorporation of thymidine 5'-triphosphate (dTTP) into the sites opposite cytosine and thymine in the template, respectively. In other words, the regulated incorporation of different metal ions into the programmed sites in duplex by DNA polymerase was successfully achieved.

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 金属イオンは蛋白質や RNA など生体高分子の高次構造の形成・安定化や、酵素の活性部位で酸塩基反応や酸化還元反応など種々の反応の cofactor としての役割を担うなど生体にとって不可欠な成分である。一方で、鉛、水銀を始めとする重金属イオンは腎毒性、変異原性や発癌性など生体に対し強い毒性を示し、生体に及ぼす影響は様々である。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 Watson-Crick 型の塩基対を形成して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 (Hg^{2+}) によって、またシトシン-シトシン (C-C) ミスマッチ塩基対が銀イオン (Ag^+) によって安定化され、それぞれ $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ および $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$ 錯体型塩基対を形成することを見出した (*J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 2172; *Chem Commun.*, **2008**, 4725)。また、核磁気共鳴法を用いた研究から、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。

(2) DNA ポリメラーゼは鋳型 DNA に相補的な塩基を持つヌクレオシド三リン酸を取り込みプライマー末端に連結し、DNA 鎖を伸長する酵素であり、高い校正能で正確に DNA を複製する。代表者は、金属錯体型塩基対、特に T-T ミスマッチ塩基対に対する Hg^{II} イオンの高い結合選択性に着目し、DNA ポリメラーゼによる $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ 塩基対形成を介した複製反応(プライマー伸長反応)を世界に先駆けて見出した。DNA ポリメラーゼは、「非 Watson-Crick 型の人工塩基対形成を介するプライマー伸長反応」など天然のヌクレオチド以外のヌクレオチドアナログを基質として認識し、伸長反応を触媒することが報告されているが、今回、代表者が発見した新規プライマー伸長反応は、プライマー末端でリン酸ジエステル結合が形成される過程で金属錯体型塩基対を形成する点でまったく新規のタイプのプライマー伸長反応であり、本反応の限界と拡張性を知ること、様々な方面への応用が期待でき、その全貌の

解明が喫緊の課題であった。

2. 研究の目的

本研究計画では、DNA ポリメラーゼによる金属錯体型塩基対形成を介する新規プライマー伸長反応について、その全貌を解明することを目的とし以下の検討を行うこととした。

- (1) $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$ 錯体型塩基対の形成。
- (2) 核酸塩基アナログを利用した金属錯体型塩基対の geometry の決定。
- (3) 金属錯体型塩基対形成反応の酵素速度論的解析。
- (4) 様々な金属イオンの存在下での新規ミスマッチ塩基対の系統的探索。

(1) Ag^{I} イオン存在下でのプライマー伸長

反応：小野らは $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ 塩基対のみならず、C-C ミスマッチが銀イオンを介した $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$ 塩基対を安定に形成すると報告しており、 Ag^{I} イオン存在下において $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$ 塩基対形成を介するプライマー伸長反応が DNA ポリメラーゼにより効率よく進行するか検討する。本反応が進行するなら、金属錯体型塩基対形成を介するプライマー伸長反応の最初の拡張例となる。

(2) 核酸塩基アナログを用いる金属錯体型

塩基対の geometry の決定：金属イオンを介したプライマー伸長反応で、塩基対の geometry を、適切な核酸アナログの利用により塩基対の geometry を決定する。

(3) Hg^{II} イオン存在下でのプライマー伸長

反応の酵素速度論的解析：代表者が見出した金属錯体型塩基対の形成を介する新規プライマー伸長反応は、DNA ポリメラーゼによる金属錯体型塩基対の基質としての認識能を定量的に評価できておらず、 $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ 塩基対形成における dNTP 取込み反応を酵素速度論的に解析することで本反応の限界、拡張性の考察の一助になる。

(4) 金属イオンで安定化される新規ミスマ

ッチ塩基対の系統的探索：核酸塩基対間に配位して、ミスマッチ塩基対を安定化する金属イオンは現在のところ上記 Hg^{II} , Ag^{I} 以外知られていない。さらに金属錯体型塩基対形成を介するプライマー伸長反応を拡張する目的で、T-T, C-C 以外のミスマッチ塩基対を安定

化する金属イオンの探索を行う。

3. 研究の方法

(1) Ag^I イオン存在下でのプライマー伸長

反応: 代表者が見出した水銀イオン存在下での鑄型鎖チミンに対する dTTP の取り込み反応は、金属錯体型塩基対形成を介するプライマー伸長反応として見出された最初のものであり、他の金属イオンでもこのようなプライマー伸長反応が可能かの報告はない。そこで、小野らによる銀イオンが C-C ミスマッチ塩基対を安定化するという報告に基づき、C-Ag^I-C 塩基対形成を介するプライマー伸長反応を "running start" で評価できる鑄型鎖および 5'-末端を FAM 標識したプライマーを合成し、プライマー伸長反応を検討する。反応はゲル電気泳動により解析し、最終的な反応生成物の確認は MALDI-TOF mass スペクトルの測定により行う。Klenow fragment (KF) による C-Ag^I-C 塩基対形成を介するプライマー伸長反応が T-Hg^{II}-T 塩基対形成を介するプライマー伸長反応と同様に進行しない場合は、KF 以外の DNA ポリメラーゼとして KFexo⁻, Taq pol., KOD Dash pol. などを用いて検討を行った。

(2) 核酸塩基アナログを用いる金属錯体型塩基対の geometry の決定

KF を用いた予備検討で、鑄型鎖のシトシンに対し dATP が取り込まれ C-Ag^I-A 塩基対が形成されるという結果が得られているが、その一般性が他のポリメラーゼにおいても確認されれば、C-Ag^I-A 塩基対の構造を明らかにする必要がある。C-Ag^I-A 塩基対の geometry は C-Ag^I-A (anti) と C-Ag^I-A (syn) が考えられる。そこで、アデニンの 8 位をプロム化し強制的に syn 型となるよう構造を束縛した 8-Br-dATP を基質としたプライマー伸長反応の反応効率から C-Ag^I-A 塩基対の

```
d(TAC GAC TXA CTA TAG)
(ATG CTG AYT GAT ATC)d
```

X = A, G, C, T
Y = A, G, C, T, 8-BrA

図 1 融解温度測定二重鎖 DNA の塩基配列

geometry について検討を行った。また、本反応で Ag^I イオン存在下、シトシンに対して dATP が取り込まれる理由に関して、図 1 に示した二重鎖 DNA (X = C, Y = 8-BrA) の熱的安定性を評価した。

(3) Hg^{II} イオン存在下でのプライマー伸長反応の速度論的解析

本新規プライマー伸長反応の限界を理解する上で、水銀イオン存在下での dNTP の取り込み効率を知る必要がある。"standing start" を評価できる鑄型鎖および 5'-末端を FAM 標識したプライマーを合成し、DNA ポリメラーゼとして 3'-エキソヌクレアーゼ活性を持たない KFexo⁻ を用いて dATP の取り込み能と dTTP 取り込み能を比較検討した。また、水銀イオン非存在下での dTTP の取り込み能 (鑄型鎖上のチミンに対する KF のチミンの誤取り込み頻度) との比較も検討課題とした。

(4) 新規金属錯体型塩基対の系統的探索

様々な金属イオン存在下でプライマー伸長反応が進行する金属イオンと塩基対ミスマッチの組合せを系統的に探索した。本探索で見出された金属イオンにより DNA ポリメラーゼが触媒形成することが明らかになったミスマッチ塩基対については、図 1 の X および Y に該当する塩基を導入した二重鎖 DNA の金属イオン存在下での融解温度 (T_m) を測定し、金属イオンにより安定化されるミスマッチ塩基対の安定性とその金属イオン選択性を評価した。

このようにプライマー伸長反応と二重鎖 DNA の融解温度測定という 2 種類の方法で金属イオンと塩基対ミスマッチの組合せを評価することで、単純にミスマッチ塩基対の熱的安定性の向上でプライマー伸長反応が可能になるのか、塩基対の熱的安定性以外の要因も本反応に寄与するのか明らかにできる可能性が考えられた。

4. 研究成果

(1) 研究目的のうち、平成 24 年度の最重要課題は Ag^I イオン存在下でのプライマー伸長反応の検討であり、小野らによるシトシン-シトシン (C-C) ミスマッチ塩基対が Ag^I イオンにより安定化されるという報告に基づくも

のある。一本鎖領域にCを含む鋳型鎖を用いてAg^Iイオン存在下でのプライマー伸長反応を検討したところ、dCTPではなくdATPが取り込まれることが判明した。この反応はDNAポリメラーゼとしてKF以外のTaq polymeraseやKOD dash polymeraseでも進行する一般性を持つと同時に、銀イオン存在下で高選択的に進行する反応であることを見出した(図2)。本実験条件下では、DNAポリメラーゼによるC-Ag^I-C塩基対の形成は認められなかった。

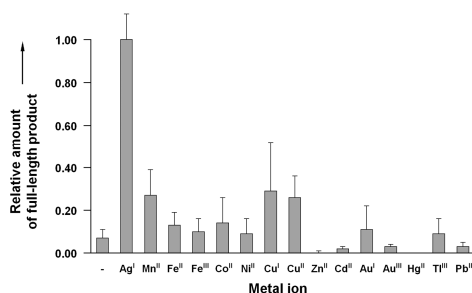


図2 DNAポリメラーゼによるC-Ag^I-A形成反応のAg^Iイオン選択性

(2) C-Ag^I-A錯体型塩基対はデオキシアデニン残基のグリコシド結合回りのコンホメーションが通常のanti型のみならずsyn型も比較的安定なため、その塩基対の geometryについても検討を行い明らかにする必要がある。そこで、Hoogsteen面で塩基対形成できない7-deaza-deoxyadenosine (7-deaza-dA) およびグリコシド結合回りがanti型よりsyn型が安定な8-bromo-dAを含む二重鎖の熱安定性の検討を行ったが、いずれもdAとはpKaやbulkyさが異なるなど、意図した点以外にも化学的性質に相違があるため、有益な情報は得られなかった。そこで、このC-Ag^I-A錯体型塩基対の geometryの決定については方針転換し、¹⁵N NMRを用いた解析を行うべく、二重鎖の中央部C-A塩基対のシトシンおよびアデニン残基を¹⁵NラベルしたDNAオリゴマーの合成を検討、実施中である。

(3) 蛍光標識したプライマーを用いたプライマー伸長反応の速度論的解析は、実験データの再現性の確保が困難を極め、種々検討を行ってきたが、現時点で公表できるデータの取得には至っていない。しかし、次項で述べ

るように幾つかの金属錯体型塩基対のDNAポリメラーゼによる定性的な形成効率は明らかにできており、一定の目的は達成できている。この点については今後も継続的に検討を行っていく予定にしている。

(4) 金属イオン存在下でのプライマー伸長反応で、天然型核酸塩基の組合わせで可能なすべてのミスマッチ形成に対する様々な金属イオンの影響を系統的に調べたところ、顕著にミスマッチ形成が促進されるのはHg^{II}によるT-Hg^{II}-T塩基対、Ag^IによるC-Ag^I-A塩基対に加え、新たにC-Ag^I-T塩基対が見出された。この鋳型鎖のCに対するdTTPの取り込みはdATPの取り込みほど普遍的に起こる反応ではなく、取り込み部位の数塩基上流の塩基配列に依存する反応であることが明らかになった(Angew. Chem. Int. Ed., 2014, 53, 6624.)。つまり、DNAポリメラーゼにより触媒される3種類の銀錯体型塩基対(C-Ag^I-C, C-Ag^I-A, C-Ag^I-T)の形成されやすさは、C-Ag^I-A > C-Ag^I-T >> C-Ag^I-Cであることが明らかになった。

そこで、3種類(C-Ag^I-C, C-Ag^I-A, C-Ag^I-T)の銀錯体型塩基対の熱力学的安定性を評価した。これらの塩基対を含むDNAオリゴマーの二重鎖の熱安定性の評価に加え、等温滴定カロリーメトリー(ITC)により求めたAg^Iイオンの各ミスマッチ塩基対への結合定数から、各銀イオン錯体型の安定性はC-Ag^I-C > C-Ag^I-A >> C-Ag^I-Tであることが明らかになり、必ずしも金属錯体型塩基対の熱力学的安定性が、金属錯体型塩基対形成を介するプライマー伸長反応の基盤となっているのではないことが判明した(Angew. Chem. Int. Ed., 2012, 51, 6464.)。

(5) Ag^Iイオン存在下でのC-Ag^I-T形成反応は、鋳型鎖のCに対してdTTPが特異的に取り込まれC-Ag^I-T錯体型塩基対が形成されることから、鋳型鎖上の塩基Tに対してはHg^{II}イオン存在下でdTTPが、鋳型鎖上の塩基Cに対してはAg^Iイオン存在下でdTTPが取り込まれ、1本の二重鎖DNA中に異なる二種の金属イオン(Hg^{II}およびAg^I)を標的とする部位に特異的に取り込ませることに世界に先駆けて成功した(Angew. Chem. Int. Ed., 2014, 53, 6624.)。

<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.

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.

Y. Tanaka, S. Oda, H. Yamaguchi, Y. Kondo, C. Kojima and A. Ono, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 244-245.

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

J. A. Piccirilli, T. Krauch, S. E. Moroney and S. A. Benner, *Nature*, 1990, **343**, 33-37.

K. M. Guckian, T. R. Krugh and E. T. Kool, *Nat. Struct. Biol.* 1998, **5**, 954-959.

D. A. Malyshev, Y. J. Seo, P. Ordoukhanian and F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, **131**, 14620-14621.

I. Hirao, T. Mitsui, M. Kimoto and S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 15549-15555.

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)

Tatsuya Funai, Junko Nakamura, Yuki Miyazaki, Risa Kiri, Osamu Nakagawa, Shun-ichi Wada, Akira Ono and Hidehito Urata, Regulated incorporation of two different metal ions into programmed sites in a duplex by DNA polymerase catalyzed primer extension. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有、53, 2014, 6624-6627.

DOI: 10.1002/anie.201311235

Tatsuya Funai, Yuki Miyazaki, Megumi Aotani, Eriko Yamaguchi, Osamu Nakagawa, Shun-ichi Wada, Hidetaka Torigoe, Akira Ono and Hidehito Urata,

Ag^I Ion-Mediated Formation of C-A Mismatch by DNA Polymerases, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有、51, 2012, 6464-6466.

DOI: 10.1002/anie.201109191

〔学会発表〕(計 13件)

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

船井達也、中村淳子、宮崎有紀、桐生里紗、中川治、和田俊一、小野晶、浦田秀仁

DNA ポリメラーゼによる金属錯体型塩基対の認識

第 24 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、京都、6 月、2014

田川知津子、船井達也、中川治、和田俊一、鳥越秀峰、小野晶、浦田秀仁

DNA polymerase による T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の連続形成反応の検討

第 63 回日本薬学会近畿支部大会、同志社女子大学、10 月、2013

中村淳子、船井達也、中川治、和田俊一、浦田秀仁

Ag^I 存在下における DNA ポリメラーゼによる C-T ミスマッチ塩基対の形成

第 63 回日本薬学会近畿支部大会、同志社女子大学、10 月、2013

Tagawa C, Funai T, Nakagawa O, Wada S, Torigoe H, Ono A, Urata H.

Formation of consecutive thymine-Hg^{II}-thymine base pairs catalyzed by DNA polymerases

第 40 回国際核酸化学シンポジウム、神奈川大学、11 月、2013

Nakamura J, Funai T, Nakagawa O, Wada S, Urata H.

Formation of silver(I) ion-mediated C-T mismatch by DNA polymerases

第 40 回国際核酸化学シンポジウム、神奈川

大学、11月、2013

船井達也,青谷恵美,中川 治,和田俊一,
浦田秀仁

C-A および C-T ミスマッチ塩基対に及ぼす
Ag⁺ の影響

日本薬学会第 133 年会、横浜、3月、2013

中村淳子、船井達也、宮崎有紀、山口瑛
理子、中川治、和田俊一、浦田秀仁

Ag⁺存在下における DNA ポリメラーゼによ
る C-T ミスマッチ塩基対の形成

第 6 2 回日本薬学会近畿支部大会、武庫川女
子大学、10月、2012

青谷恵美、中川 治、和田俊一、鳥越秀峰、
小野 晶、浦田秀仁

ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA の熱安
定性に及ぼす Ag⁺ イオンの効果

第 6 2 回日本薬学会近畿支部大会、武庫川女
子大学、10月、2012

宮崎有紀、船井達也、中川治、和田俊一、
浦田秀仁

DNA ポリメラーゼによるミスマッチ塩基対
形成に金属イオンが及ぼす影響の網羅的検
討

第 6 2 回日本薬学会近畿支部大会、武庫川女
子大学、10月、2012

船井達也、宮崎有紀、青谷恵美、山口瑛理
子、中川 治、和田俊一、鳥越秀峰、小野 晶、
浦田秀仁

DNA polymerase による C-Ag⁺-A 錯体型塩基対
の形成

第 6 2 回日本薬学会近畿支部大会、武庫川女
子大学、10月、2012

Y. Miyazaki, T. Funai, O. Nakagawa, S. Wada,
H. Urata

Exploration of novel metal-mediated base pairs
by DNA polymerase

第 39 回国際核酸化学シンポジウム、名古屋
大学、11月、2012

T. Funai, Y. Miyazaki, M. Aotani, E.
Yamaguchi, O. Nakagawa, S. Wada, H. Torigoe,
A. Ono, H. Urata

Silver(I) Ion-Mediated Cytosine-Adenine Base
Pairs Recognized by DNA polymerases.

第 39 回国際核酸化学シンポジウム、名古屋
大学、11月、2012

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

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

雑誌表紙
Angew. Chem. Int. Ed., 53, 2014, 6828.
<http://onlinelibrary.wiley.com/enhanced/doi/10.1002/anie.201401152/>
<http://www.oups.ac.jp/info/20140708.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：