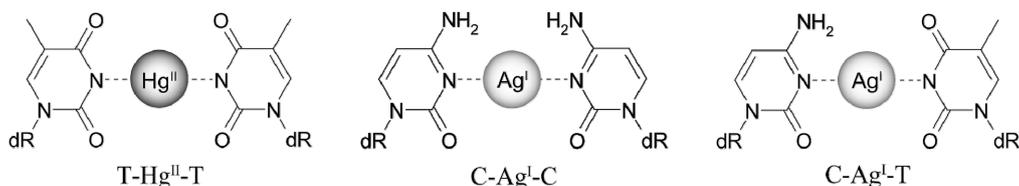


氏名	ふない たつや 船井達也
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	論博薬科第79号
学位授与の日付	令和2年3月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	DNA polymerase による金属錯体型塩基対の形成に 関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 宇佐美 吉英 (副査) 教授 浦田 秀仁 (副査) 教授 平野 智也

## 論文内容の要旨

デオキシリボ核酸 (DNA) は、アデニン (A) とチミン (T)、グアニン (G) とシトシン (C) の間で Watson-Crick 型塩基対を介して二重らせん構造を形成している。高度に配列化されたこれら 4 種のアルファベットが、遺伝情報の貯蔵を担っているだけでなく、ユニークな化学的・物理化学的機能を DNA に付与している。こうした DNA の構造学的特徴をさらに拡張してナノマテリアルとして応用すべく、人工塩基対の創製が盛んに行われている。本研究で注目した塩基対間に金属イオンが配位することで安定化する金属錯体型塩基対もその一つであり、その特徴としては、二重鎖 DNA を水素結合ではなく配位結合で安定化するだけでなく、磁性や導電性といった本来 DNA が持ちえない性質を DNA に付与できる点で、他の人工塩基対とは一線を画した機能性素子である。天然核酸塩基に基づく金属錯体型塩基対として、二重鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) 中の T-T ミスマッチ塩基対間に水銀(II) イオン ( $\text{Hg}^{\text{II}}$ ) が配位した T- $\text{Hg}^{\text{II}}$ -T 錯体型塩基対、C-C 及び C-T ミスマッチ塩基対間に銀(I) イオン ( $\text{Ag}^{\text{I}}$ ) が配位した C- $\text{Ag}^{\text{I}}$ -C 及び C- $\text{Ag}^{\text{I}}$ -T 錯体型塩基対が報告されている。これら金属錯体型塩基対は、金属イオンセンサーや DNA ナノワイヤーなど、DNA ナノマテリアルへの応用が期待されており、数多くの応用例が報告されている。



これら金属錯体型塩基対が、DNA の遺伝情報の複製・伝達に重要な役割を持つ DNA polymerase により認識・形成されれば、金属錯体型塩基対の DNA ナノマテリアルへの応用範囲は、飛躍的に拡大されることが予想される。そこで本研究では DNA polymerase に焦点を当て、先述した  $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ 、 $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$ 、 $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-T}$  錯体型塩基対が DNA polymerase により基質として認識されるか検討を行った。

まず初めに、 $\text{Hg}^{\text{II}}$  存在下で、一本鎖領域に T 残基を 1 つ含む鋳型鎖と蛍光標識したプライマー鎖を用いてプライマー伸長反応を行い、その結果をポリアクリルアミド電気泳動にて解析した。その結果、dATP 非存在下では、 $\text{Hg}^{\text{II}}$  存在下でのみ DNA polymerase により鋳型鎖 T の相補位へデオキシチミジン三リン酸 (dTTP) が取り込まれ、 $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$  錯体型塩基対の形成を介したプライマー伸長反応が進行することが明らかになった。

続いて  $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$  錯体型塩基対に注目し、一本鎖領域に C 残基を 1 つ含む鋳型鎖を用いて  $\text{Ag}^{\text{I}}$  存在下におけるプライマー伸長反応を行ったところ、予想に反して、DNA polymerase は鋳型鎖 C の相補位へデオキシシチジン三リン酸 (dCTP) ではなく、デオキシアデニン三リン酸 (dATP) を取り込み  $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-A}$  錯体型塩基対を形成することを見出した。 $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-A}$  錯体型塩基対は、本研究で見出すことができた新たな金属錯体型塩基対である。さらに 3' → 5' exonuclease 活性欠損 DNA polymerase を用いた  $\text{Ag}^{\text{I}}$  存在下のプライマー伸長反応では、 $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-T}$  錯体型塩基対も同様に形成されることが明らかとなった。これら金属錯体型塩基対の形成反応は、それぞれ  $\text{Hg}^{\text{II}}$  と  $\text{Ag}^{\text{I}}$  に高い選択性があり他の金属イオンでは進行しないことも明らかにした。

次に  $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-A}$  及び  $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-T}$  錯体型塩基対は DNA polymerase により容易に形成されるが、 $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$  錯体型塩基対は容易に形成されないことを明らかにし、これら錯体型塩基対の物理化学的性質を比較することで、DNA polymerase による金属錯体型塩基対形成反応の重要因子について考察した。 $\text{C-A}$ 、 $\text{C-T}$  及び  $\text{C-C}$  ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA の熱安定性に及ぼす  $\text{Ag}^{\text{I}}$  の影響を評価した結果、 $\text{Ag}^{\text{I}}$  による各ミスマッチ塩基対に対する安定化効果は、 $\text{C-C} > \text{C-A} \approx \text{C-T}$  であった。一方で、 $\text{Ag}^{\text{I}}$  存在下

での DNA polymerase による鋳型鎖 C の相補位へのデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) の取り込まれ易さは、 $dATP > dTTP \gg dCTP$  であり、 $Ag^I$  によるミスマッチ塩基対の安定化効果と一致しなかった。これらの結果から、 $Ag^I$  による安定化効果は DNA polymerase による金属錯体型塩基対の形成に対して重要な因子ではなく、金属錯体型塩基対がもつ正味電荷が最も重要な因子の一つであることが示唆された。

二重鎖 DNA 中に連続した金属錯体型塩基対を配列化することは、未知の物性を有する金属ナノワイヤーの合成の観点から高い関心が持たれている。そこで、DNA polymerase による金属錯体型塩基対の形成反応の応用として、 $T-Hg^{II}-T$  錯体型塩基対の連続形成を検討した。 $Hg^{II}$  存在下での  $3' \rightarrow 5'$  exonuclease 活性を持つ DNA polymerase によるプライマー伸長反応で、4 連続までの  $T-Hg^{II}-T$  錯体型塩基対が形成された。さらに、DNA polymerase の複製精度を低下させる  $Mn^{II}$  イオン存在下での、 $3' \rightarrow 5'$  exonuclease 活性を持たない DNA polymerase によるプライマー伸長反応では、10 連続  $T-Hg^{II}-T$  錯体型塩基対が形成されることを明らかにした。本結果は、金属ナノワイヤーの合成法として、酵素を用いる方法論の有効性を示唆するものであると考えている。

さらなる DNA polymerase による金属錯体型塩基対の形成反応の応用として、同一配列中での  $T-Hg^{II}-T$  錯体型塩基対及び  $C-Ag^I-T$  錯体型塩基対の位置選択的的形成反応を試みた。その結果、 $Hg^{II}$ 、 $Ag^I$  両イオン存在下において、DNA polymerase による同一配列中での  $T-Hg^{II}-T$ 、 $C-Ag^I-T$  錯体型塩基対の形成を達成することができ、異なる金属イオンを二重鎖 DNA の特定部位に挿入することに成功した。

本研究により、DNA polymerase が金属イオンの配位結合に基づく塩基対をも認識し、金属錯体型塩基対の形成を介したプライマー伸長反応を触媒する能力を有することを明らかにした。各金属錯体型塩基対の形成が、金属イオンに高い選択性を有することを利用し、DNA 鎖上の予め設定した任意の部位に特定の異なる金属イオンを部位特異的に取り込ませることに成功した。また、DNA polymerase は 10 塩基程度の連続した金属錯体型塩基対の形成を許容することも示し、DNA をナノマテリアルとして応用する際のファブリケーションツールとして、DNA polymerase の応用に新たな局面を切り開くことに成功した。

## 論文審査の結果の要旨

一般に、デオキシリボ核酸 (DNA) は、アデニン(A)とチミン (T)、グアニン(G)とシトシン(C)という特定の塩基同士が水素結合によって、いわゆる Watson-Crick 型塩基対を形成し、二重らせん構造を採ることで安定化し、生物の生命活動に最も重要な遺伝情報が蓄えられていると考えられている。近年、上述した特定の組み合わせではないミスマッチ塩基対の中に特定の金属イオンが配位することによって塩基対を形成するものが報告され、T-HgII-T 錯体塩基対、C-AgI-C 錯体塩基対、C-AgI-T 錯体塩基対が知られている。本博士論文は、船井氏が、これらの知見に基づいて、これらの金属錯体型塩基対が DNA polymerase による伸長反応において基質として認識されるのかという極めて挑戦的な課題に取り組んだ研究成果をまとめたものである。

船井氏は、一連の研究の結果、以下のことを明らかにした。

まず、一本鎖領域に T 残基を 1 つ含む 24 塩基からなる鋳型鎖とプライマー鎖との DNA polymerase として Klenow fragment を用いるプライマー伸長反応を行い、dATP 非存在下において HgII イオンが存在しない場合に伸長反応が停止する条件下、HgII イオン存在下では完全長の二重鎖が形成したことが確認されたこと、および伸長産物の MALDI-TOF MS による分析結果から、T-HgII-T 錯体塩基対が本反応において基質として認識されることを初めて明らかにし、また、Taq polymerase など他の 2 種の DNA polymerase に対しても同様の結果を得た。

さらに、C-AgI-C 錯体塩基対に対して上と同様の検討を行ったが、AgI イオン存在下で C の相補位に C ではなく A が取り込まれることを明らかにし、C-AgI-A 錯体塩基対を初めて見出した。その他に他の型の DNA polymerase による AgI イオン存在下でのプライマー伸長反応で C-AgI-T 錯体塩基対も基質として有効であることを示した。

次に、DNA polymerase により認識されることが明らかになった金属錯体型塩基対について、二重鎖中での熱安定性と DNA polymerase による認識について考察を行った。AgI イオンが C-A, C-T, C-C ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA の熱安定性におよぼす影響について検討を行った結果、安定化効果の順序は、C-C > C-A ≈ C-T となり、金属イオンによる安定化効果とそれらが DNA polymerase 伸長反応において基質の取込まれやすさの順序 (dATP > dTTP >> dCTP) との間に関連性がないことを示した。

最後に、金属錯体型塩基対の DNA polymerase による形成反応の金属ナノワイヤー合成への応用を目指して、連続した金属錯体塩基対の形成について検討し、Klenow fragment による 4 連続 T-HgII-T 錯体塩基対の形成に成功し、また、MnII イオン存在下での Terminator DNA polymerase により 10 連続 T-HgII-T 錯体塩基対の形成が可能なことを確認した。さらに、一配列中での T-HgII-T 錯体塩基対および C-AgI-T 錯体塩基対の位置選択的の形成を試み、HgII および AgI 両イオン存在下で、DNA

polymerase による伸長反応が起こることを確認し、これによって、鋳型の特定の部位に T や C を組み入れておけば、狙った位置に HgII や AgI イオンを組み込んだ二本鎖 DNA を形成させることができることを証明した。

本研究成果は、既に *Angewandte Chem. Int. Ed.* をはじめとするトップジャーナルに掲載されていること、また、早速、本研究成果を基にした他の研究グループによる応用例が報告されていることからわかるように、金属センサー、DNA ナノワイヤー、DNA ナノマテリアルといった近年注目されている新しい科学分野への応用も大いに期待されるものである。

以上により、上記の論文は、博士(薬科学)論文として適当と判断する。