

DNA polymerase による金属錯体型塩基対の形成に関する研究

2019

船井 達也

目次

序論	1
本論	7
第一章 DNA polymerase による水銀(II) 錯体型塩基対の形成	7
第一節 Klenow fragment による水銀(II) 錯体型 T-T 塩基対の形成	7
第二節 DNA polymerase による水銀(II) 錯体型 T-T 塩基対形成の必須因子	17
第二章 DNA polymerase による銀(I) 錯体型塩基対の形成	23
第一節 銀(I) 存在下での校正機能を持つ	
DNA polymerase によるプライマー伸長反応	23
第一項 銀(I) 存在下での Klenowfragment によるプライマー伸長反応	23
第二項 DNA polymerase による銀(I) 錯体型 C-A 塩基対形成の必須因子	31
第二節 銀(I) 存在下での校正機能を持たない	
DNA polymerase によるプライマー伸長反応	41
第一項 銀(I) 存在下での 3'→5' exonuclease 活性欠損 Klenowfragment による プライマー伸長反応	41
第二項 DNA polymerase による銀(I) 錯体型 C-T 塩基対形成の必須因子	49
第三章 銀(I) 錯体型塩基対の特性の比較	54
第一節 銀(I)イオンが C-A, C-T ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA の 熱安定性に及ぼす影響	54

第二節	二重鎖 DNA の末端に位置するミスマッチ塩基対に対する 金属イオンの影響	64
第三節	DNA polymerase による C の相補位への dNTP の取り込み反応	68
第四章	DNA ナノマテリアルへの応用に向けた	
	DNA polymerase による金属錯体型塩基対の形	75
第一節	水銀(II) ナノワイヤーの酵素合成に向けた	
	DNA polymerase による水銀(II) 錯体型 T-T 塩基対の連続形成	75
第一項	DNA polymerase による水銀(II) 錯体型 T-T 塩基対の連続形成	75
第二項	連続した T-Hg ^{II} -T 錯体型塩基対を含む二重鎖 DNA の熱安定性	90
第二節	DNA polymerase による特定の金属イオンの位置選択的導入	94
結論		103
謝辞		105
実験の部		106
第一章の実験		116
第二章の実験		119
第三章の実験		125
第四章の実験		129
引用文献		135

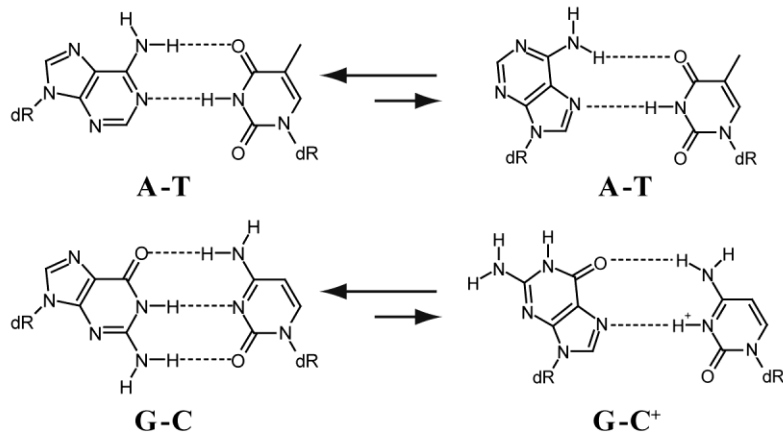
序 論

デオキシリボ核酸 (DNA) は、遺伝情報の貯蔵のみならず、多様な化学的・物理的機能を備え、様々な高次構造を形成することにより、その機能を発現している。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 型塩基対を形成することで、2 本の DNA 鎖が相互に絡み合い、二重らせん構造を形成することを Watson と Crick が発見した。¹⁾ Watson-Crick 型塩基対は、purine 塩基である A, G と pyrimidine 塩基である T, C がそれぞれ水素結合し、安定な塩基対を形成する (Figure 1a)。B 型二重らせん構造中には、Watson-Crick 型塩基対だけでなく、わずかながら一過性の Hoogsteen 型塩基対が存在すること、また特定のタンパク質が Hoogsteen 型塩基対を認識しそれに結合することや、DNA の酸化損傷やアルキル化といった構造修飾が Hoogsteen 型塩基対を誘発することも報告されている。²⁾ Hoogsteen 型塩基対は、purine 塩基である A と G がグリコシド結合を軸に anti 型から syn 型に回転し、7 位窒素原子 (N7) が相補位塩基である T もしくは C と水素結合を形成する (Figure 1a)。³⁾ この Hoogsteen 型塩基対において特徴的な purine 塩基の N7 が水素結合に関与する結合様式は、二重鎖 DNA だけでなく、三重らせん構造 (Figure 1b) や四重鎖構造 (Figure 1c) の中で認められており、⁴⁾ これら高次構造の形成には不可欠な塩基対様式である。つまり、Watson-Crick 型塩基対だけでなく Hoogsteen 型塩基対の存在が、二重らせん構造だけでなく、三重鎖、四重鎖、ヘアピン構造などの多様な高次構造を発現する上で重要な要因の一つとなっている。

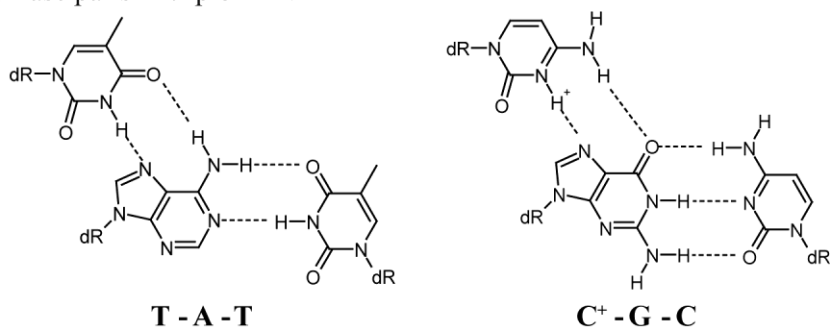
a) Base pairs in duplex DNA

Watson-Crick base pairs

Hoogsteen base pairs



b) Base pairs in triplex DNA



c) Base pair in G-quadruplex DNA

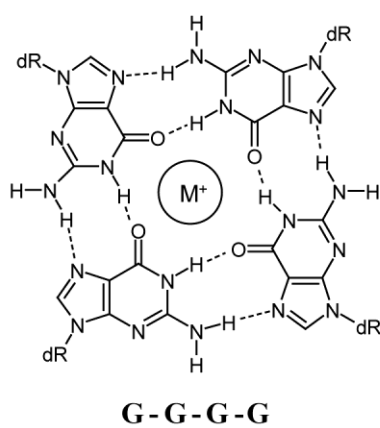


Figure 1. Structures of a) Watson-Crick and Hoogsteen base pairs, and base pairs in b) triplex DNA and c) G-quadruplex.

本研究では、非 Watson-Crick 型塩基対の一つであり、他の人工塩基対とは異なる特徴を有する“金属錯体型塩基対”に注目した。金属錯体型塩基対とは、天然もしくは人工の核酸塩基間に金属イオンが配位することで形成される塩基対であり、塩基対の構造により様々な配位する金属イオンの選択性が変化するユニークな塩基対である (Figure2).⁵⁾

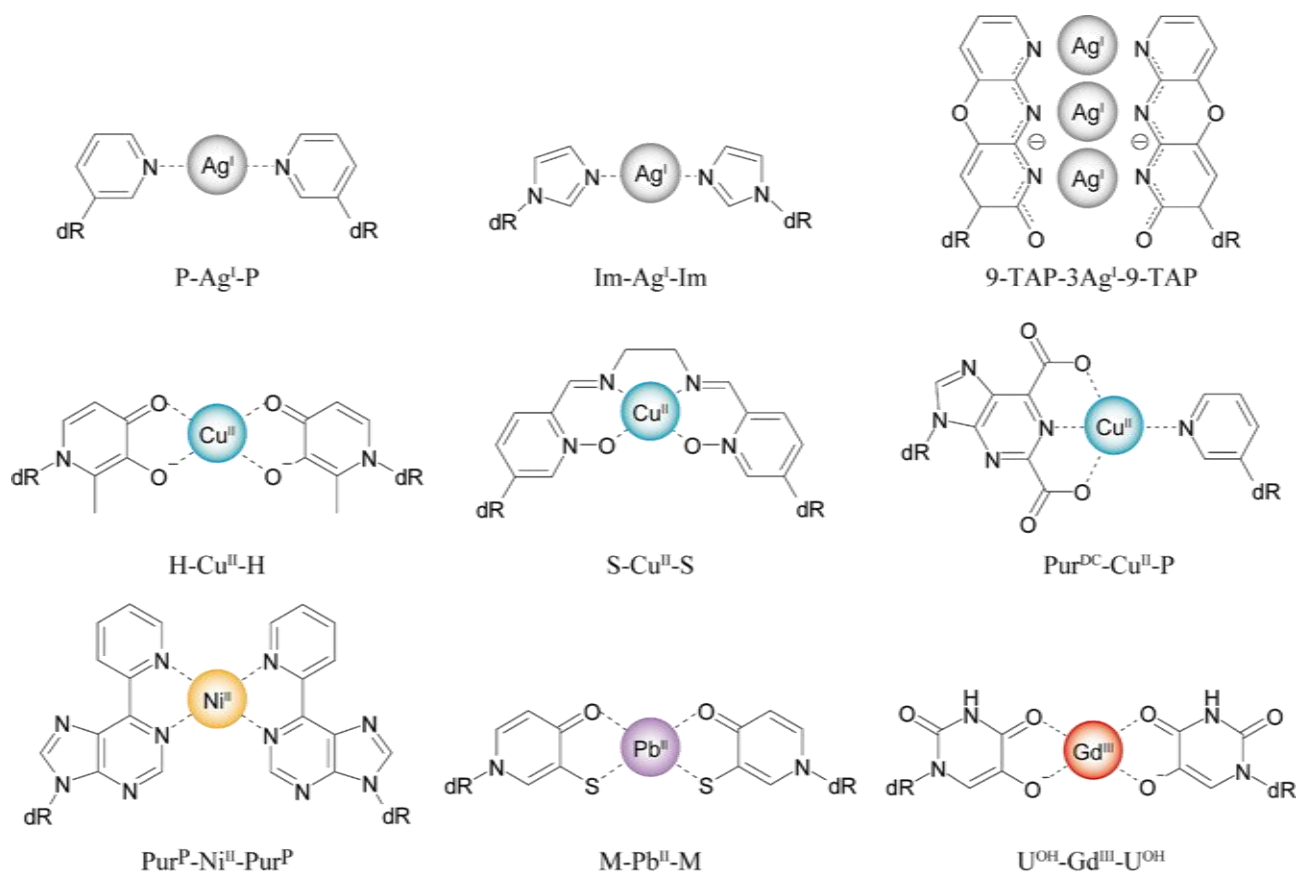


Figure 2. Structures of artificial metal-mediated base pairs.

金属錯体型塩基対を二重鎖 DNA に導入することで、二重鎖 DNA の二重らせん構造の内部に金属イオンが配位し、様々な機能を二重鎖 DNA に付与する。例えば、二重鎖 DNA に大きな熱安定性をもたらすだけでなく、金属イオンならではの磁性⁶⁾や導電性⁷⁾といった本来 DNA が持ち得ない性質を付与することが出来る点で他の機能性人工塩基対とは一線を画している。さらに、金属錯体型塩基対を含む DNA は、金属イオンの有無により塩

基対形成に伴う高次構造の制御が可能である (Figure 3). 例えば, 金属イオン非存在下では金属錯体型塩基対を形成することができないため, 2 本の一本鎖として存在している DNA が, 金属イオン存在下では金属錯体型塩基対を形成し, 二重鎖 DNA を形成する (Figure 3a). また同様に一本鎖 DNA が金属イオンにより, ヘアピン構造を形成することも可能である (Figure 3b). さらに金属イオンにより, 二重鎖 DNA と一本鎖 DNA が Hoogsteen 型の金属錯体型塩基対を形成し, 三重鎖 DNA を形成することも可能である (Figure 3c). このような金属イオンによる DNA の高次構造変化を利用した DNAzyme,⁸⁾ endonuclease,⁹⁾ exonuclease¹⁰⁾ や ligase¹¹⁾ の活性制御などが報告されている. このように金属イオンにより, DNA の多様な機能の ON/OFF の制御が可能であるため, DNA-based logic gate,¹²⁾ DNA ナノマシン,¹³⁾ DNA ナノワイヤー,¹⁴⁾ 金属イオンセンサー,¹⁵⁾ 一塩基多型 (SNP) センサー,¹⁶⁾ DNA origami¹⁷⁾ などへの応用が期待されている.

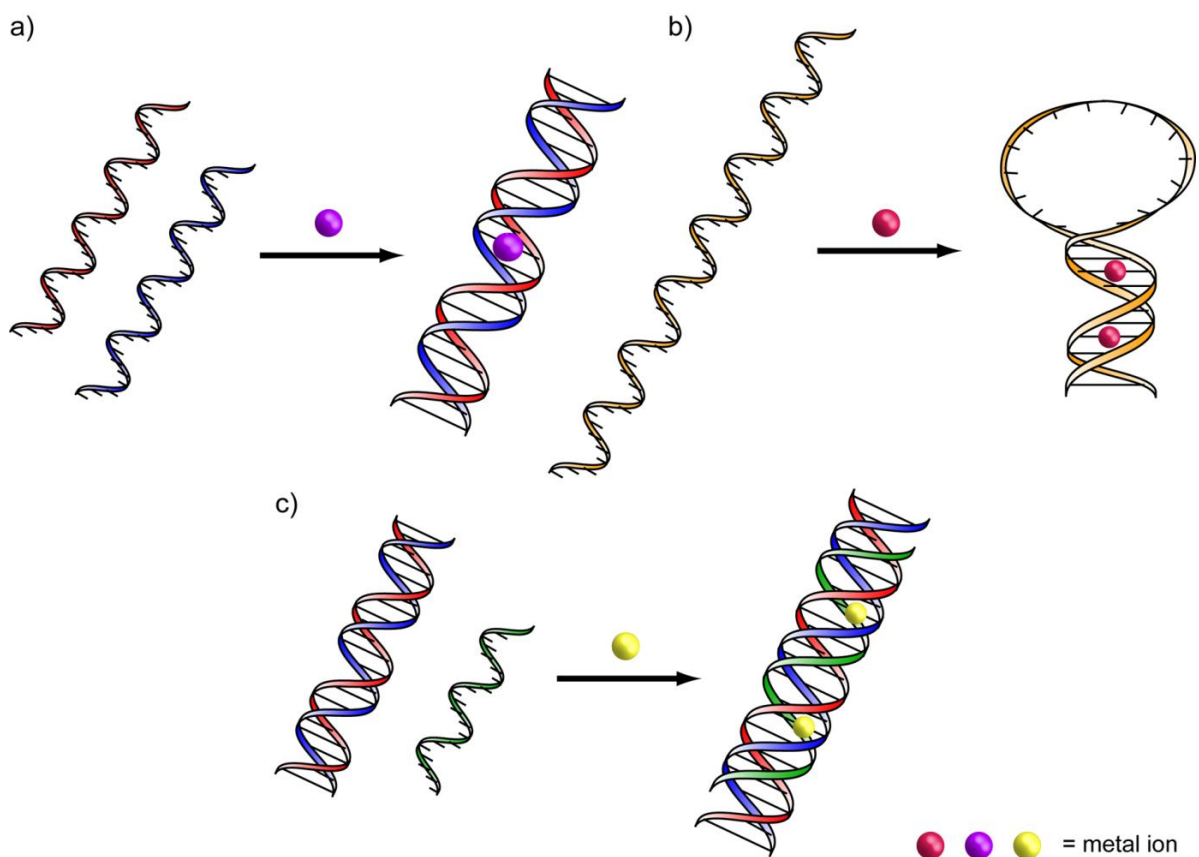


Figure 3. Dynamic changes of structures of DNA containing metal-binding base pairs.

人工の核酸塩基と金属イオンで構成される金属錯体型塩基対だけでなく、金属イオンが天然の核酸塩基に配位する金属錯体型塩基対も多数報告されている。例えば、T-T ミスマッチ塩基対に水銀イオン (Hg^{II}) が、C-C ミスマッチ塩基対に銀イオン (Ag^{I}) がそれぞれ配位することで T- Hg^{II} -T,¹⁸⁾ C- Ag^{I} -C¹⁹⁾ 錯体型塩基対 (Figure 4) が形成されることが報告されている。²⁰⁾ 浦田らは C-T ミスマッチ塩基対に Ag^{I} が配位し、C- Ag^{I} -T 錯体型塩基対 (Figure 4) が形成されることを報告している。^{20,21)} さらに、G- Ag^{I} -G,²²⁾ C- Hg^{II} -T,²³⁾ C- Au^{I} -T,²⁴⁾ U- Hg^{II} -U²⁵⁾ 錯体型塩基対などのミスマッチ塩基対間に金属イオンが配位するだけでなく、Watson-Crick 型塩基対である A-T 塩基対に Hg^{II} が、G-C 塩基対に金イオン (Au^{III}) が配位し、A- Hg^{II} -T,²⁶⁾ G- Au^{III} -C²⁷⁾ 錯体型塩基対が形成されることも報告されている。

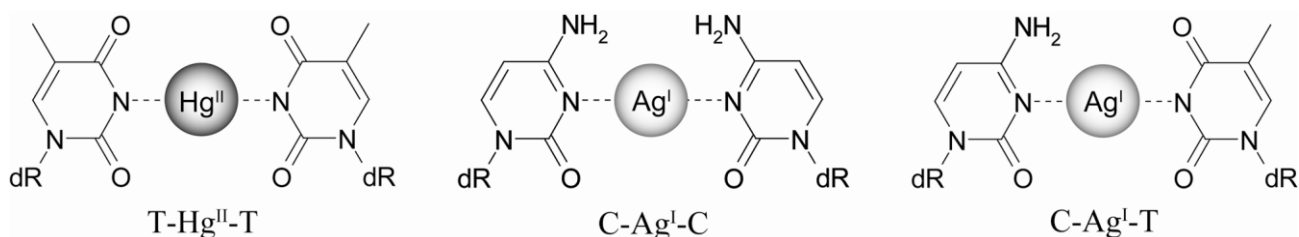


Figure 4. Structures of T- Hg^{II} -T, C- Ag^{I} -C and C- Ag^{I} -T base pairs.

以上のように、ミスマッチ塩基対並びに Watson-Crick 型塩基対に金属イオンが配位する金属錯体型塩基対が報告されているが、特にミスマッチ塩基対を含む二重鎖 oligodeoxynucleotides (ODNs) の熱安定性は、金属イオンの有無により大きく変化するため、ODN の高次構造変化を金属イオンにより制御することができる。また、T-T, C-C ミスマッチ塩基対を利用することは、金属イオンの配位する人工塩基対を化学合成する必要がないため、容易に利用することが可能である。これらの特性を利用し、T- Hg^{II} -T 錯体型塩基対並びに C- Ag^{I} -C 錯体型塩基対は、DNA ナノマテリアルへの応用もいくつか報告されており、中でも金属イオンセンサーへの応用は多数報告されている。¹⁵⁾

DNA は、A, G, C, T の核酸塩基の配列中に生命の根幹である遺伝情報を貯蔵している。高い精度での遺伝情報の複製・伝達を担う DNA polymerase が金属錯体型塩基対を認識す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が、筆者らが本研究を開始した時点で、DNA polymerase が金属錯体型塩基対を形成・認識するという報告はなされていなかった。そこで本研究では DNA polymerase に焦点を当て、金属錯体型塩基対が DNA polymerase により認識・形成されるかを検討した。

本研究では、まず先述した T-Hg^{II}-T, C-Ag^I-C 及び C-Ag^I-T 錯体型塩基対に注目し、Hg^{II} もしくは Ag^I 存在下での DNA polymerase によるプライマー伸長反応を行い、これら金属錯体型塩基対が DNA polymerase により認識され、形成されるかの検討を行った。その結果、Hg^{II} 存在下で T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対が、Ag^I 存在下で C-Ag^I-A 錯体型塩基対および C-Ag^I-T 錯体型塩基対が DNA polymerase により認識され、形成されることを見出すことに成功した。C-Ag^I-A 錯体型塩基対は、本研究において新たに発見された金属錯体型塩基対である。本研究で見出すことができた C-Ag^I-A 錯体型塩基対と浦田らが既に報告している C-Ag^I-T 錯体型塩基対、²¹⁾ 及び小野らが報告している C-Ag^I-C 錯体型塩基対¹⁹⁾ について、これら金属錯体型塩基対を含む二本鎖 DNA の安定性を評価した。さらに評価した銀(I)錯体型塩基対の DNA polymerase による形成されやすさについて評価した。また、DNA polymerase による金属錯体型塩基対の認識・形成反応の応用を目指し、DNA polymerase による同一配列中での T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の連続形成反応の検討、並びに同一配列中への取り込み位置を厳密に制御した二種類の異なる金属イオン (Hg^{II} 及び Ag^I) の選択的取り込み反応を試みた。

本 論

第一章 DNA polymerase による水銀(II) 錯体型塩基対の形成

これまで金属錯体型塩基対が DNA polymerase により形成・認識されるかを検討した例はなく、本章では金属錯体型塩基対として T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対に着目し、Hg^{II} イオン存在下におけるプライマー伸長反応で T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対が形成されるかの検討を行った。

第一節 Klenow fragment による水銀(II) 錯体型 T-T 塩基対の形成

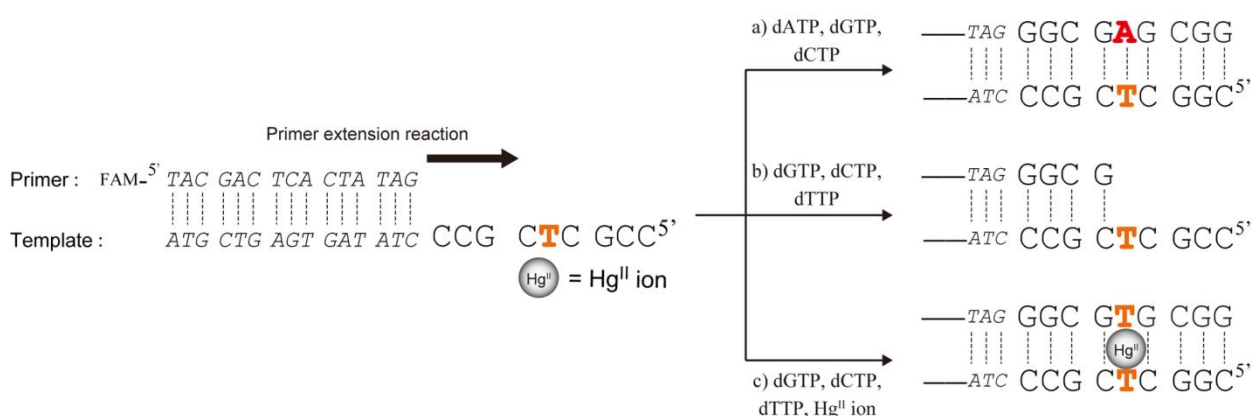
T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対が DNA polymerase により形成・認識されるかの検討を行うため、Table 1 に示した ODNs を用いた。鋳型鎖を 24-mer の ODN (Template-1), 15-mer の ODN を primer として使用し、T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成部分が一本鎖領域の中央に位置するように設計した。プライマー伸長反応で生成した生成物を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE, 8 M Urea 20% 変性ゲル) で確認するため、primer 鎖の 5' 末端を蛍光標識 (FAM) した。

本検討では、DNA polymerase として Klenow fragment (KF) を選択した。KF は、DNA polymerase の family A (Pol I 型) に属する *E. coli* DNA polymerase I の 5'→3' exonuclease 活性ドメインを欠損させた DNA polymerase である。KF は、Primer 鎖の 3' 末端に鋳型鎖と相補的なヌクレオチドを付加する polymerase 活性と、Primer 鎖の 3' 末端に誤取り込みされたヌクレオチドを校正する 3'→5' exonuclease 活性を有する。なお、Hg^{II} として、過塩素酸水銀 [Hg(ClO₄)₂] を反応溶液に添加した。

Table 1. Sequences of ODNs

sequence name	Sequence
Full-length-1	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAG CGG ^{3'}
Full-length-2	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG GGC GTG CGG ^{3'}
19mer-1	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG GGC G ^{3'}
Primer	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG ^{3'}
Template-1	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG CTC GCC ^{5'}

2'-デオキシヌクレオシド三リン酸 (dNTP) の dATP, dGTP, dCTP 存在下, KF によるプライマー伸長反応を行うと, Template-1 に相補的な full-length product (24-mer) が生成する (Scheme 1a). 一方で, dATP の代わりに dTTP を添加すると, 鋳型鎖の一本鎖領域の T と相補的な dATP が存在しないため, T の手前でプライマー伸長反応は停止し, 19-mer が主生成物となる (Scheme 1b). ここに Hg^{II} を添加した場合, T- Hg^{II} -T 錯体型塩基対が形成されるならば, T の位置で Hg^{II} を介した dTTP の取り込み反応が起こり, full-length product (24-mer) が生成する可能性が考えられる (Scheme 1c).



Scheme 1. Schematic description of primer extension reactions in the presence or absence of Hg^{II} ions by DNA polymerase.

まず初めに、DNA polymerase のプライマー伸長反応における Hg^{II} の影響を確認することにした。反応に用いた New England Biolabs 社製の KF には高次構造維持の目的で、還元剤として 1 mM のジチオスレイトール (DTT) が含まれている。酵素活性に不可欠であると考えられる DTT は、 Hg^{II} を補足するため、²⁸⁾ 反応溶液中に多量に存在することを避けなければならない。そこで、反応溶液中の DTT 濃度を 8 μM とし、プライマー伸長反応を検討した。

低濃度の DTT が及ぼす KF の polymerase 活性への影響と、 Hg^{II} が反応に及ぼす影響を確認するため、Scheme 1a に示した鋳型鎖 (Figure 5a) に相補的な dNTP (dATP, dGTP, dCTP) 存在下での反応を検討した (Figure 5b)。また鋳型鎖 T に相補的な dATP 非存在下 (dGTP, dCTP 存在下) では、 Hg^{II} の有無に関係なく、伸長反応が T の手前で停止するかについても併せて確認した (Figure 5c)。

dATP, dGTP, dCTP 存在下では、50 μM Hg^{II} 存在下であっても KF の polymerase 活性は失活することなく、伸長反応が進行し full-length product (24-mer) が生成した (Figure 5b, Lanes 2-8)。また、dATP 非存在下 (dGTP, dCTP 存在下) であれば、鋳型鎖 T と相補的な dATP が存在しないため、 Hg^{II} の有無に関係なく、反応が 19-mer で停止した (Figure 5c, Lanes 1-8)。これらの結果より、懸念していた低濃度の DTT (8 μM) であっても、KF によるプライマー伸長反応は塩基選択性に問題なく進行することがわかった。さらに 50 μM 以下の Hg^{II} であれば、KF が持つ高い複製精度を保ちつつ polymerase 活性は失活せず、プライマー伸長反応が進行することが明らかとなった。

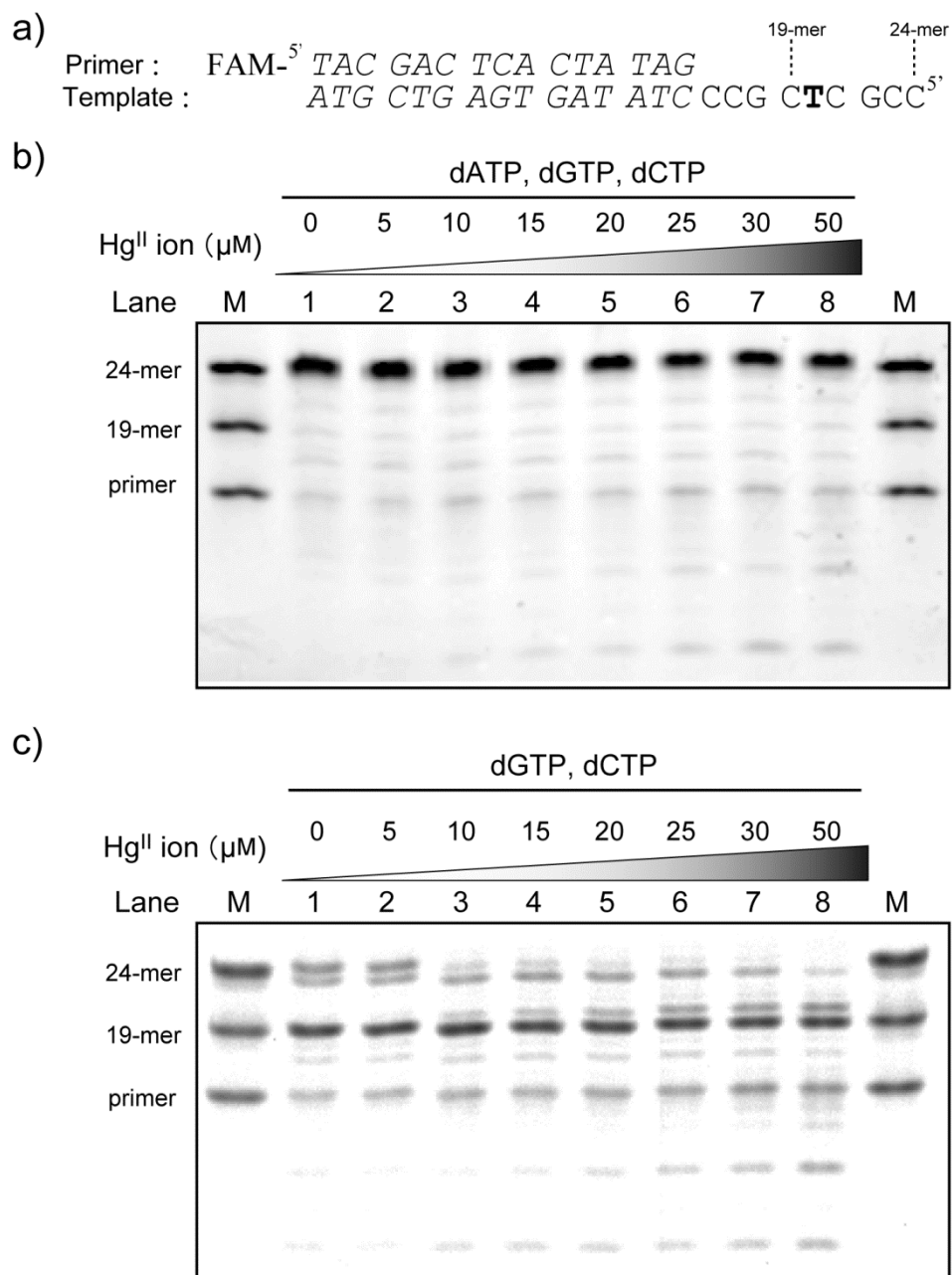


Figure 5. Effects of Hg^{II} ions on primer extension reaction. a) Sequences of the template and primer strands. The primer was fluorescence-labeled with 6-FAM at the 5' end. The reactions contained b) 10 μM dATP, dGTP, dCTP and c) 10 μM dGTP, dCTP, 0.4 units KF, 0-50 μM Hg(ClO₄)₂ and 8 μM DTT. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

次に Schme 1c に示したように dATP 非存在下であっても, Hg^{II} (5-50 μM) と dTTP 存在下であれば, 鋳型鎖 T の相補位へ dNTP が取り込まれ, full-length product (24-mer) が生成するかを確認した (Figure 6b). また Hg^{II} の影響をさらに詳しく調査するため, 0.1-1000 μM の Hg^{II} 存在下で同様の反応を行った (Figure 6c).

dGTP, dCTP, dTTP 存在下, Hg^{II} 非存在下では, 反応は T の手前に位置する 19-mer で停止したが (Figure 6b, Lane 1, Figure 6c, Lane 1), 10-50 μM の Hg^{II} 存在下においては, dATP 非存在下にも関わらず, KF は鋳型鎖の T をリードスルーし, 24-mer の full-length product (24-mer) と考えられる生成物を与えた (Figure 6b, Lanes 3-8, Figure 6c, Lanes 4, 5). 0.1-5 μM の Hg^{II} 存在下では, 反応は T の手前 (19-mer) で停止したため, 低濃度の Hg^{II} 存在下では, T の相補位への dNTP の取り込み反応は, 起こらないことが分かった (Figure 6b, Lane 2, Figure 6c, Lanes 2, 3). 一方, 100 μM 以上の Hg^{II} 存在下では, primer 鎖が分解され, primer 鎖よりも短鎖のバンドが確認された (Figure 6c, Lanes 6-8). Primer 鎖の分解の要因として, Hg^{II} により DNA polymerase の polymerase 活性が阻害され, 相対的に 3'→5' exonuclease 活性が優位となるためと考えている. 本反応の進行率を full-length product (24-mer) の各バンドの蛍光強度を用いて解析した結果, 15 μM の Hg^{II} 存在下において, 最も効率よく full-length product (24-mer) が生成することが明らかとなった.

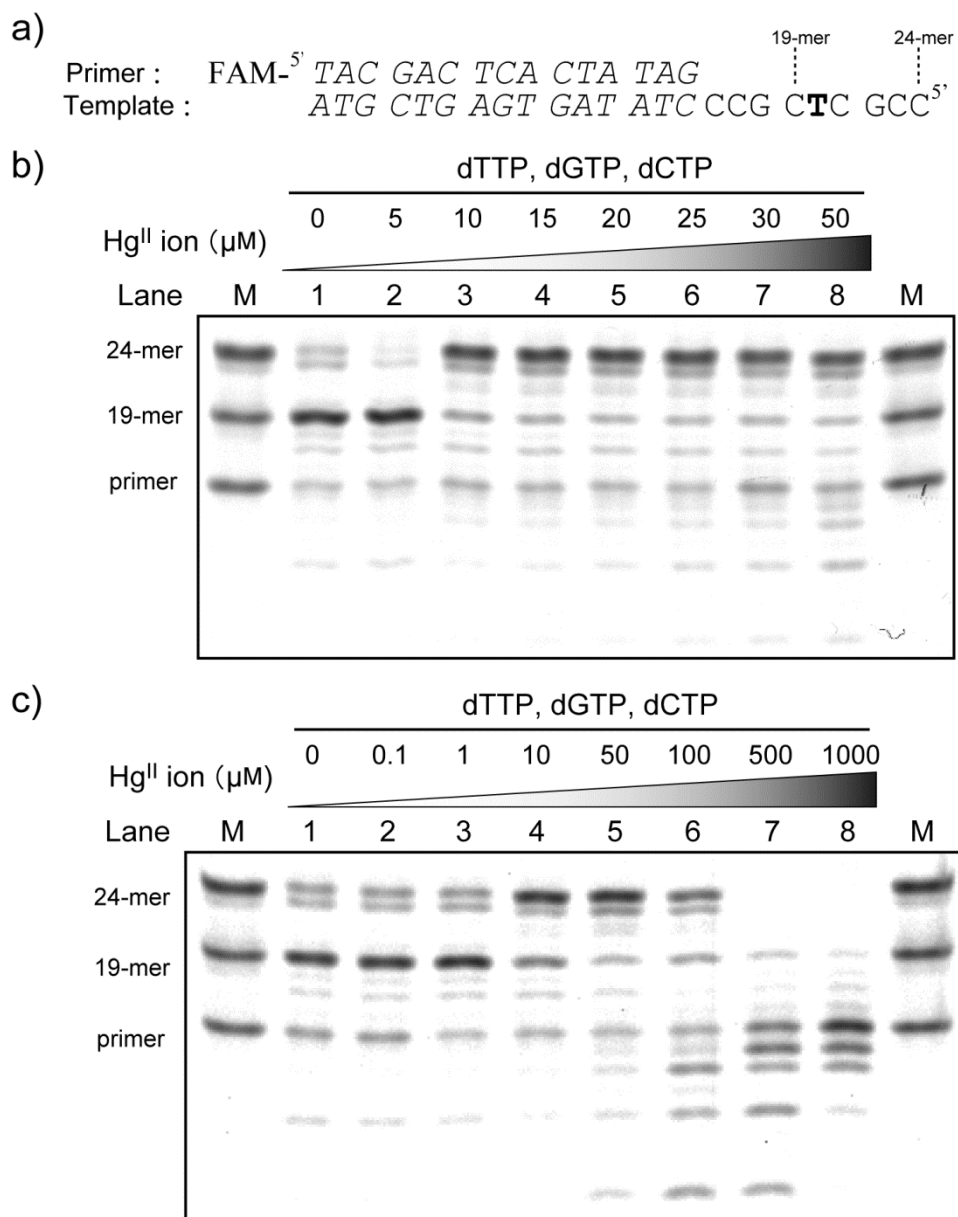


Figure 6. Effects of Hg^{II} ions on primer extension reactions by KF. a) Sequences of the template and primer strands. The reactions contained 10 μM dNTPs, 0.4 units KF and b) 0-50 μM and c) 0-1000 μM Hg(ClO₄)₂. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

次に Hg^{II} 存在下で T の相補位へ取り込まれた dNTP を同定するため、様々な組み合わせで dNTPs を存在させ Scheme 1a-c に示した反応を行った (Figure 7). dATP 存在下では、 Hg^{II} の有無に関わらず full-length product (24-mer) が生成した (Figure 7, Lanes 1, 2). これは、T の相補位への dATP の取り込みを介した伸長反応が進行したと考えられる. dATP 非存在下, dTTP 存在下では、 Hg^{II} 存在下でのみ full-length product (24-mer) が生成し、 Hg^{II} 非存在下では T の手前で伸長が停止した 19-mer が主生成物であり、24-mer は生成しなかった (Figure 7, Lanes 3, 4). dATP, dTTP 非存在下においては (dGTP, dCTP 存在下), Hg^{II} の有無に関わらず、19-mer が主生成物 (Figure 7, Lanes 5, 6) であった. 以上のことから、dATP 非存在下, Hg^{II} 存在下において、鑄型鎖 T の相補位へ dTTP が取り込まれ、その後のプライマー伸長反応も進行し、full-length product (24-mer) が生成することが示唆された.

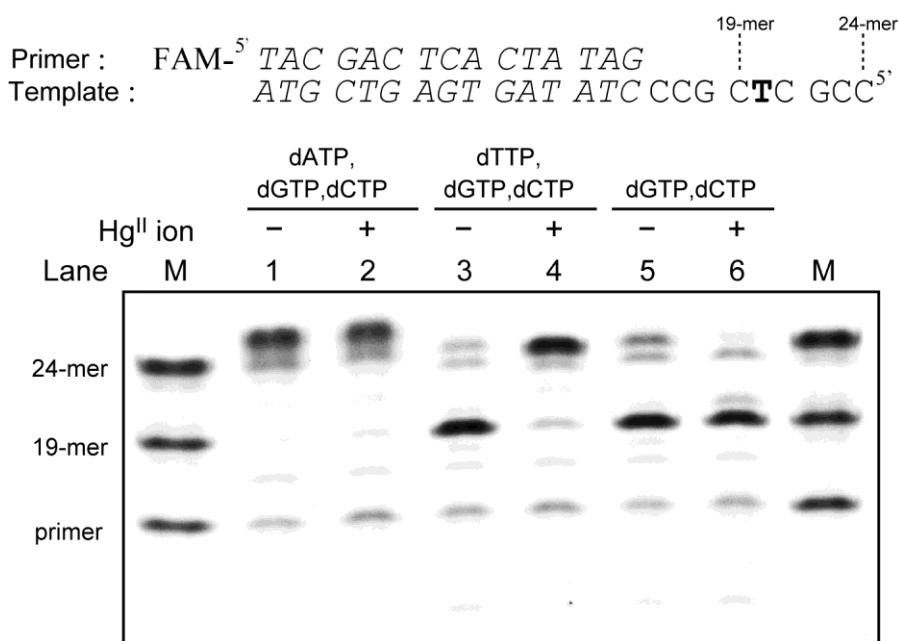


Figure 7. Primer extension reactions in the presence of Hg^{II} ions by KF. The reactions contained 10 μM dNTPs and 0.4 units KF in the presence or absence of 15 μM $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

以上の結果より, KF は T の相補位へ Hg^{II} を介した dTTP の取り込み反応及びその後の鎖伸長を行うことで, full-length product (24-mer) を生成することが示唆された. そこで本反応における, 反応生成物の配列を同定する目的で, MALDI-TOF MS による解析を行った. しかし, MALDI-TOF MS の測定には, 比較的多量の反応生成物が必要であり, 上述の反応スケールでは, 十分量の反応生成物を得ることができないため, 反応のスケールアップを行った. 反応の進行の確認は, 反応溶液の一部を PAGE 解析することにより行った (Figure 8b). dATP, dGTP, dCTP 存在下では, Hg^{II} 存在下であっても問題なく伸長反応が進行し, full-length product (24-mer) の生成を確認することができた (Figure 8b, Lanes 1). dGTP, dCTP, dTTP 存在下では, Hg^{II} 存在下においては full-length product (24-mer) の生成を確認でき (Figure 8b, Lane 2), Hg^{II} 非存在下においては, 19-mer で反応は停止した (Figure 8b, Lane 3). 同様に dTTP 非存在下, dGTP, dCTP, Hg^{II} 存在下では, 19-mer で反応は停止した (Figure 8b, Lane 4). 全ての条件において, Figure 7 に示した結果と同様の結果となり, 反応のスケールアップに成功した. 各反応を 16 回ずつ行い, 脱塩後, MALDI-TOF MS にて各種条件における反応生成物の解析を行った (Figure 8d-g).

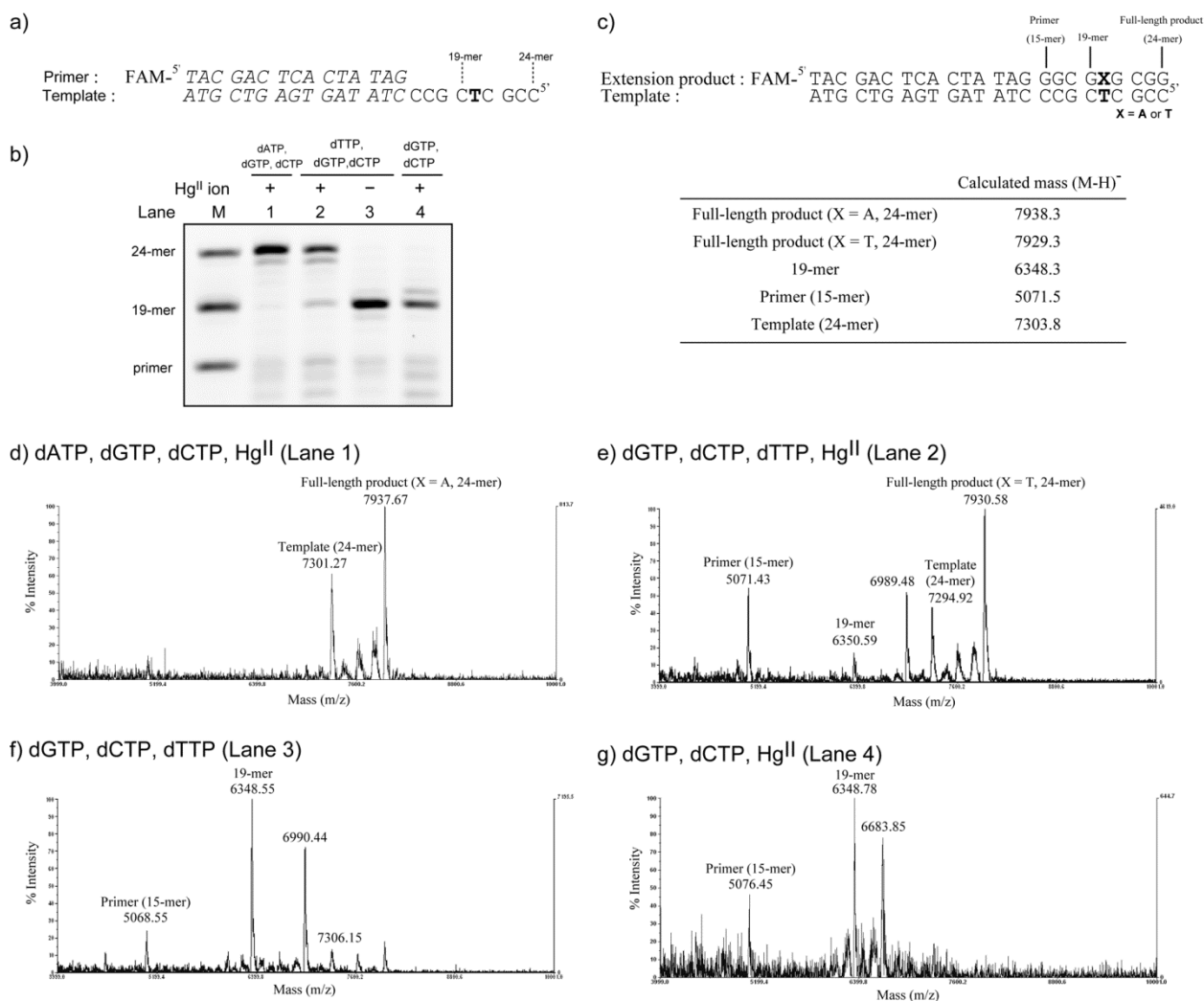


Figure 8. Primer extension reactions in the presence of Hg^{II} ions by KF and their MALDI-TOF mass analyses. a) Sequences of the template and primer strands. b) The reactions contained 1.4 μ M Template, 1.4 μ M primer, 420 μ M dNTPs, 0.4 units KF and 50 μ M Hg(ClO₄)₂. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. c) Calculated masses of oligomers. d-f) MALDI-TOF mass spectra of the reactions corresponding to lanes 1-4 in b), respectively. Other experimental details are described in the experimental section.

MALDI-TOF MS の解析結果より、dATP, dGTP, dCTP 存在下では、T の相補位へ dATP が取り込まれ Watson-Crick 型塩基対の A-T 塩基対の形成を介した full-length product (X = A, 24-mer) が生成していることを確認することができた [Figure 8d, observed mass:7937.7 (Lane 1), calculated mass (M-H)⁻: 7938.3]. 一方で、dGTP, dCTP, dTTP 存在下, Hg^{II} 非存在下 (Lane 3) 並びに dGTP, dCTP, Hg^{II} 存在下 (Lane 4) では、鋳型鎖の T の手前 (19-mer) で反応が停止していることを確認できた [Figure 8f, observed mass: 6348.6 (Lane 3), Figure 8g, 6348.8 (Lane 4), calculated mass (M-H)⁻: 6348.3]. さらに、dGTP, dCTP, dTTP, Hg^{II} 存在下では、T の相補位へ dTTP が取り込まれた full-length product (X = T, 24-mer) が生成していることを確認できた [Figure 8e, observed mass:7930.6 (Lane 2), calculated mass (M-H)⁻: 7929.3].

MALDI-TOF MS の結果、Hg^{II} 存在下、T の相補位へ dTTP が取り込まれ伸長反応が進行し、full-length product (24-mer) が生成していることが明らかとなり、PAGE により得られた結果と一致した。以上のことより、DNA polymerase は、Hg^{II} 存在下、dATP 非存在下では、T の相補位へ dTTP を取り込み、T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対を形成することが明らかとなった。

以上本節より、dATP 非存在下において、Hg^{II} 存在下では、KF は鋳型鎖 T の相補位に Hg^{II} を介した dTTP の取り込み反応を行うことで、プライマー伸長反応を進行させることが明らかとなった。これは T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対が KF により認識・形成されること示している。

第二節 DNA polymerase による水銀(II) 錯体型 T-T 塩基対形成の必須因子

T-T ミスマッチ塩基対は、他の金属イオン存在下では安定化されず Hg^{II} 選択的に安定化されることが報告されている。¹⁸⁾ そこで、種々の金属イオン存在下でのプライマー伸長反応を行い、本反応の Hg^{II} に対する選択性を評価した。

本反応に対する Hg^{II} 以外の金属イオンの影響を確認する前に、 Hg^{II} の対イオンの影響を評価した。本反応は、過塩素酸水銀 $[\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2]$ を反応溶液中に添加することで、 Hg^{II} 存在下でのプライマー伸長反応を行っている。 Hg^{II} の対イオンである過塩素酸イオン (ClO_4^-) の反応に対する影響を確認するため、反応溶液中に既に存在しているマグネシウムイオン (Mg^{2+}) と過塩素酸の塩である過塩素酸マグネシウム $[\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2]$ と、対イオンが ClO_4^- とは異なる水銀塩である酢酸水銀 $[\text{Hg}(\text{OCOCH}_3)_2]$ 存在下におけるプライマー伸長反応を検討した。

Table 1 に示した ODNs を使用し、Scheme 1 に示した反応を行った (Figure 9)。 $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 存在下では、反応は T の手前 (19-mer) で停止したのに対し (Figure 9, Lane 3), $\text{Hg}(\text{OCOCH}_3)_2$ 存在下では、full-length product (24-mer) の生成を確認することができた (Figure 9, Lane 6)。この結果より、T の相補位への dTTP の取り込み反応は、 ClO_4^- によるものではなく、 Hg^{II} イオンが必須であることが明らかとなった。

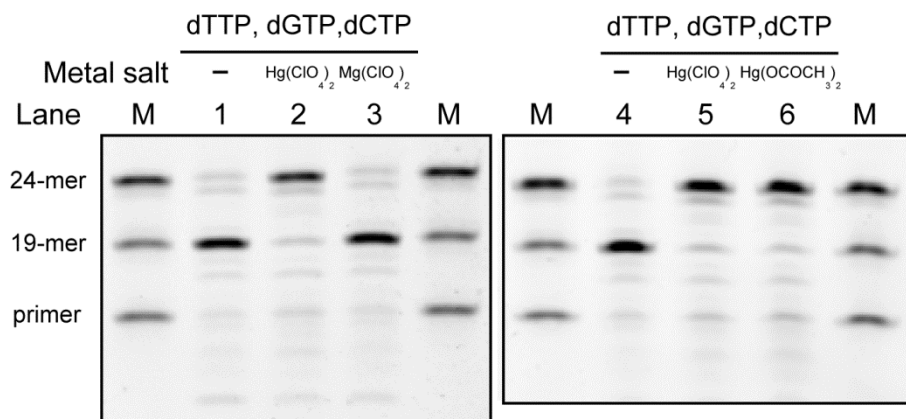


Figure 9. Effects of counter anion (perchloric anion) on the primer extension reaction by KF. The reactions contained 10 μ M dNTPs, 0.4 units KF and 15 μ M Hg(ClO₄)₂, Mg(ClO₄)₂ or Hg(OCOCH₃)₂. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

次に DNA と相互作用することが報告されている²⁹⁾ Mn^{II}, Fe^{II}, Fe^{III}, Co^{II}, Cu^{II}, Zn^{II}, Pb^{II}, Ni^{II}, Au^I 存在下でのプライマー伸長反応を行い, T の相補位への dTTP の取り込み反応の, Hg^{II} に対する選択性を検討した. Table 1 に示した ODNs を用い, Scheme 1 の反応を行った (Figure 10). Hg^{II} 存在下では, full-length product (24-mer) が生成したのに対し, Mn^{II}, Fe^{II}, Fe^{III}, Co^{II}, Cu^{II}, Zn^{II}, Pb^{II}, Ni^{II}, Au^I 存在下では, いずれも T の手前 (19-mer) で反応は停止した (Figure 10). この結果より, Hg^{II} 以外の金属イオン存在下では T の相補位への dTTP を取り込み反応は起こらず, 本反応が Hg^{II} 選択的な反応であることが明らかとなった. この結果は, T-T ミスマッチ塩基対が Hg^{II} にのみ安定化されることと一致した.

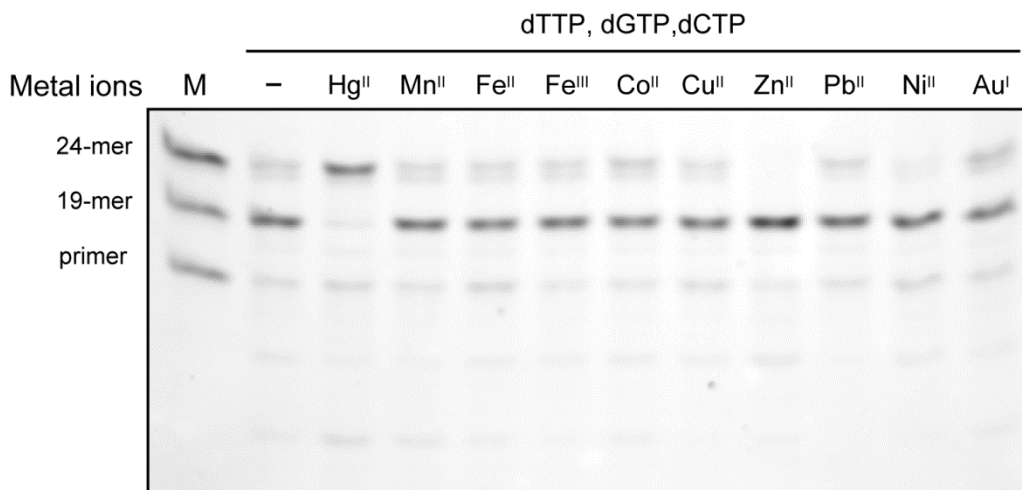


Figure 10. Effects of various metal ions on the primer extension reaction by KF. The reactions contained 10 μ M dNTPs, 0.4 units KF and 15 μ M various metal ions. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

これまで本反応の検討には、KF を用いてきたが、他の DNA polymerase でも同様に T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対が認識・形成されるかを検討することで、本反応における DNA polymerase に対する一般性を評価した。そこで polymerase chain reaction (PCR)に広く用いられる酵素である Taq polymerase と KOD Dash polymerase を用いて、本反応を検討した。Taq polymerase は好熱細菌 *Thermusaquaticus* YT-1 由来の DNA polymerase であり、family A (Pol I型) に分類され、3'→5' exonuclease 活性を持たず、5'→3' exonuclease 活性を持つ。一方、KOD Dash polymerase は、超好熱古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株由来の DNA polymerase であり、family B (α型) に分類され、5'→3' exonuclease 活性を持たず、3'→5' exonuclease 活性を持つ KOD DNA polymerase と、3'→5' exonuclease 活性を欠損させた改変型 KOD DNA polymerase の混合酵素である。これら両酵素を使用し、Table 1 に示した ODNs を用いて、Scheme 1 に示した反応を行った (Figure 11)。

両酵素とも、dATP 存在下であれば、Hg^{II} の有無に関わらず full-length product (24-mer) を生成する (Figure 11b, c, Lanes 1, 2) が、dTTP もしくは Hg^{II} 非存在下では、T の手前 (19-mer) で反応は停止した (Figure 11b, c, Lanes 3, 5, 6)。しかしながら、dTTP と Hg^{II} が共存下では、full-length product (24-mer) が生成した (Figure 11b, c, Lanes 4)。これらの結果は、KF の結果と一致した。Hg^{II} 存在下での T の相補位への dTTP の取り込み反応は、KF だけではなく、他の DNA polymerase でも同様に行われることが明らかとなった。

本節の結果より、T の相補位への dTTP の取り込み反応は、カウンターイオンである過塩素酸イオン (ClO₄⁻) によるものではなく、Hg^{II} によるものであり、Hg^{II} 以外の金属イオンでは促進されず、Hg^{II} に高い選択性があることがわかった。また本反応は、KF 特異的ではなく、DNA polymerase に一般的な反応であることが示唆された。

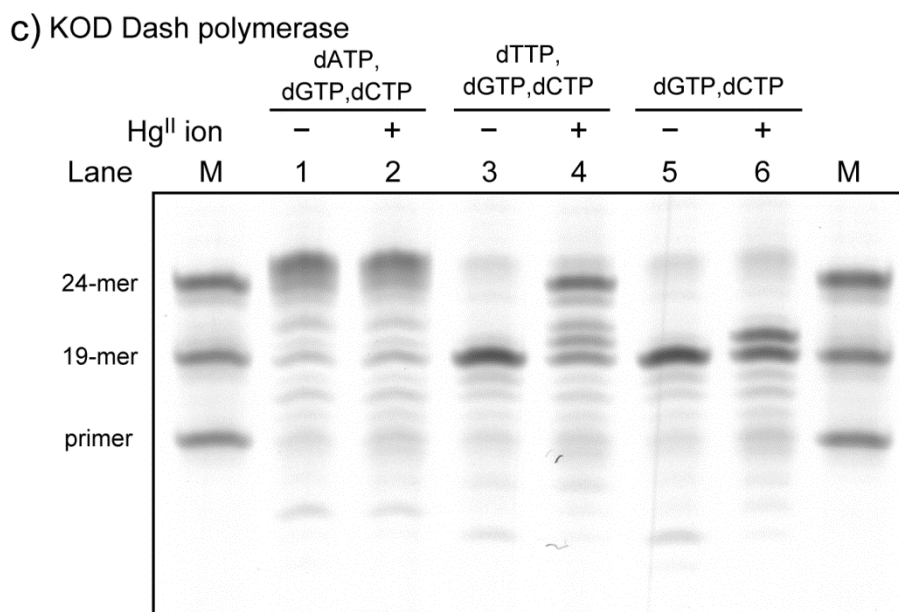
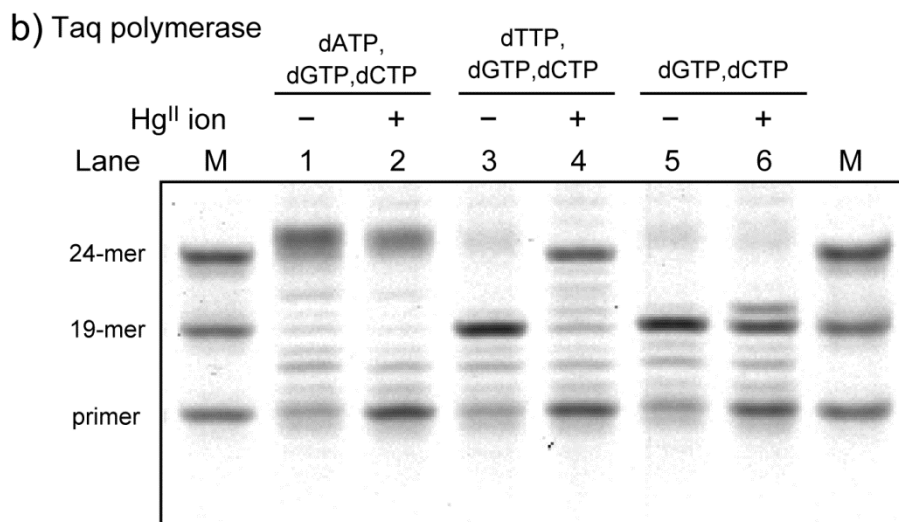
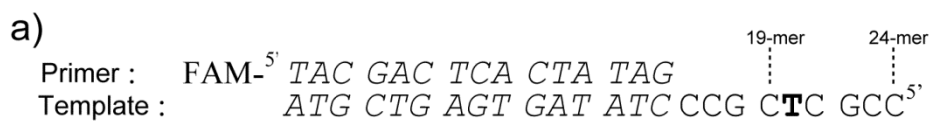


Figure 11. a) Sequences of the template and primer strands. b) Primer extension reactions in the presence of Hg^{II} ions by Taq polymerase. The reactions contained 30 μM dNTPs, 0.8 units γTaq polymerase and 50 μM Hg(ClO₄)₂. c) Primer extension reactions in the presence of Hg^{II} ions by KOD Dash polymerase. The reactions contained 10 μM dNTPs, 0.4 units KOD Dash polymerase and 25 μM Hg(ClO₄)₂. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

以上, 本章より DNA polymerase は Hg^{II} 存在下のプライマー伸長反応において, 鋳型鎖 T の相補位へ dTTP を取り込み, T- Hg^{II} -T 錯体型塩基対を認識・形成することが明らかとなった. これは金属錯体型塩基対が DNA polymerase により認識・形成されることを見出した最初の例となった.

第二章 DNA polymerase による銀(I) 錯体型塩基対の形成

第一章において、 Hg^{II} 存在下、DNA polymerase が T の相補位へ dTTP を取り込みその後の鎖伸長も行うことから、金属錯体型塩基対である T- Hg^{II} -T 錯体型塩基対が DNA polymerase により認識・形成されることが明らかとなった。そこで次に Ag^{I} 錯体型塩基対に注目し、その中でも C- Ag^{I} -C 錯体型塩基対に焦点を当て、 Ag^{I} 存在下でのプライマー伸長反応を行い、C- Ag^{I} -C 錯体型塩基対も T- Hg^{II} -T 錯体型塩基対と同様に DNA polymerase に認識・形成されるかの検討を行った。

第一節 銀(I) 存在下での校正機能を持つ DNA polymerase によるプライマー伸長反応

第一項 銀(I) 存在下での Klenow fragment によるプライマー伸長反応

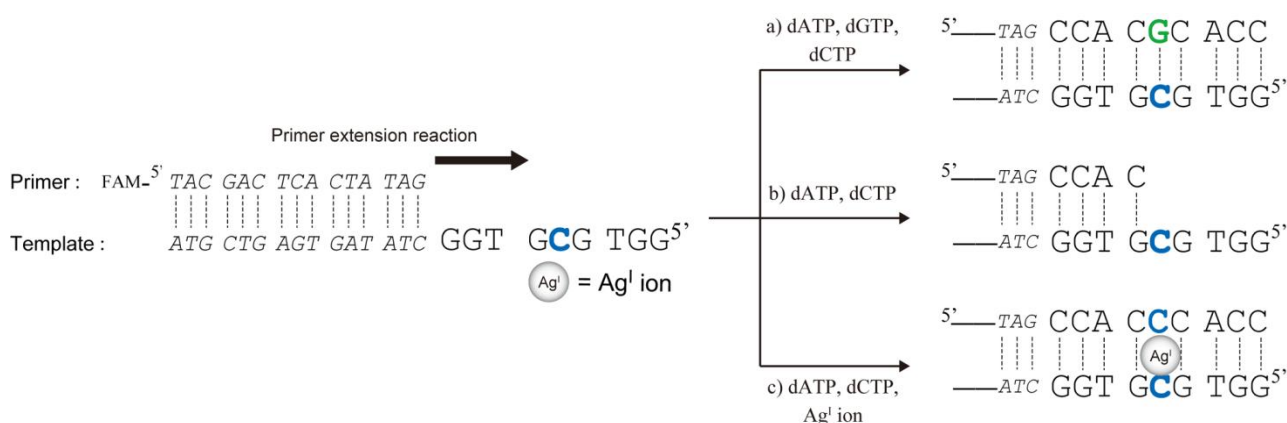
DNA polymerase による C- Ag^{I} -C 錯体型塩基対の認識・形成を検討するにあたり、Table 2 に示した ODNs を使用し、Scheme 2 に示した反応を行うこととした。使用する ODNs は、第一章で使用した primer 鎖を使用し、Template 鎖は一本鎖領域の中央を C 残基とし、C- Ag^{I} -C 錯体型塩基対形成部位となるように設計し、プライマー伸長反応は DNA polymerase として KF を使用した。第一章で使用した反応用緩衝液には、塩化物イオン (Cl^-) が含まれているため、本反応で使

用する Ag^{I} と難溶性の塩化銀 (AgCl) を形成することが予想される。そこで第一章で使用した反応用緩衝液を改良し、塩化アンモニウム (NH_4Cl) を含む緩衝液に変更した。アンモニウムイオン (NH_4^+) は Ag^{I} と可溶性の錯体 ($\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$) を形成するため、 AgCl を溶

解する目的でアンモニウムイオンを反応用緩衝液中に添加した。

Table 2. Sequences of ODNs

sequence name	Sequence
Full-length-3	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG CCA CAC ACC ^{3'}
19mer-2	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG CCA C ^{3'}
Primer	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG ^{3'}
Template-2	FAM- ^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC GGT CCG TGG ^{5'}



Scheme 2. Schematic description of insertion of dCTP into the site opposite C in the presence of Ag^I ions in the primer extension reactions.

まず初めに一本鎖領域と相補的な dNTPs (dATP, dGTP, dCTP) を添加した Scheme 2a の反応より, KF の polymerase 活性に対する Ag^I の影響を評価した (Figure 12b, Lanes 1, 2). 30 μM Ag^I 存在下, 非存在下に関わらず, 反応は進行し full-length product (24-mer) を生成した (Figure 12b, Lanes 1, 2). これより 30 μM の Ag^I は KF の polymerase 活性に大きな影響を与えず, プライマー伸長反応は問題なく進行することが明らかとなった. Scheme 2b に示した Ag^I 非存在下, dATP, dCTP 存在下では, C の手前 (19-mer) で反応は停止した (Figure 12b, Lane 3). 一方で Ag^I 存在下では, C の相補位へ dATP もしくは dCTP が取り

込まれ、伸長反応が進行し、full-length product (24-mer) の生成が確認できた (Figure 12b, 5-9). Ag^{I} 濃度が 5~50 μM で効率よく full-length product (24-mer) の生成が確認できたことから、より幅広い Ag^{I} 濃度 (0.1~1000 μM) でのプライマー伸長反応を実施した (Figure 12c). その結果、Figure 12b と同様に 5 μM 以上の Ag^{I} 濃度で効率よく full-length product (24-mer) の生成が確認できた一方で (Figure 12c, Lanes 4-6), 高濃度 (1000 μM) の Ag^{I} は、KF の polymerase 活性を阻害し、鎖伸長されていない primer 鎖 (15-mer) のバンドが濃く見られた (Figure 12c, Lane 8). また 500 μM , 1000 μM の Ag^{I} では、バンドが薄く見られた. これは Ag^{I} により ODNs が凝縮したためと考えている. 以上の結果より、5~100 μM の Ag^{I} 存在下におけるプライマー伸長反応において、鋳型鎖 C の相補位へ dATP もしくは dCTP が取り込まれ、プライマー伸長反応が進行することが明らかとなった.

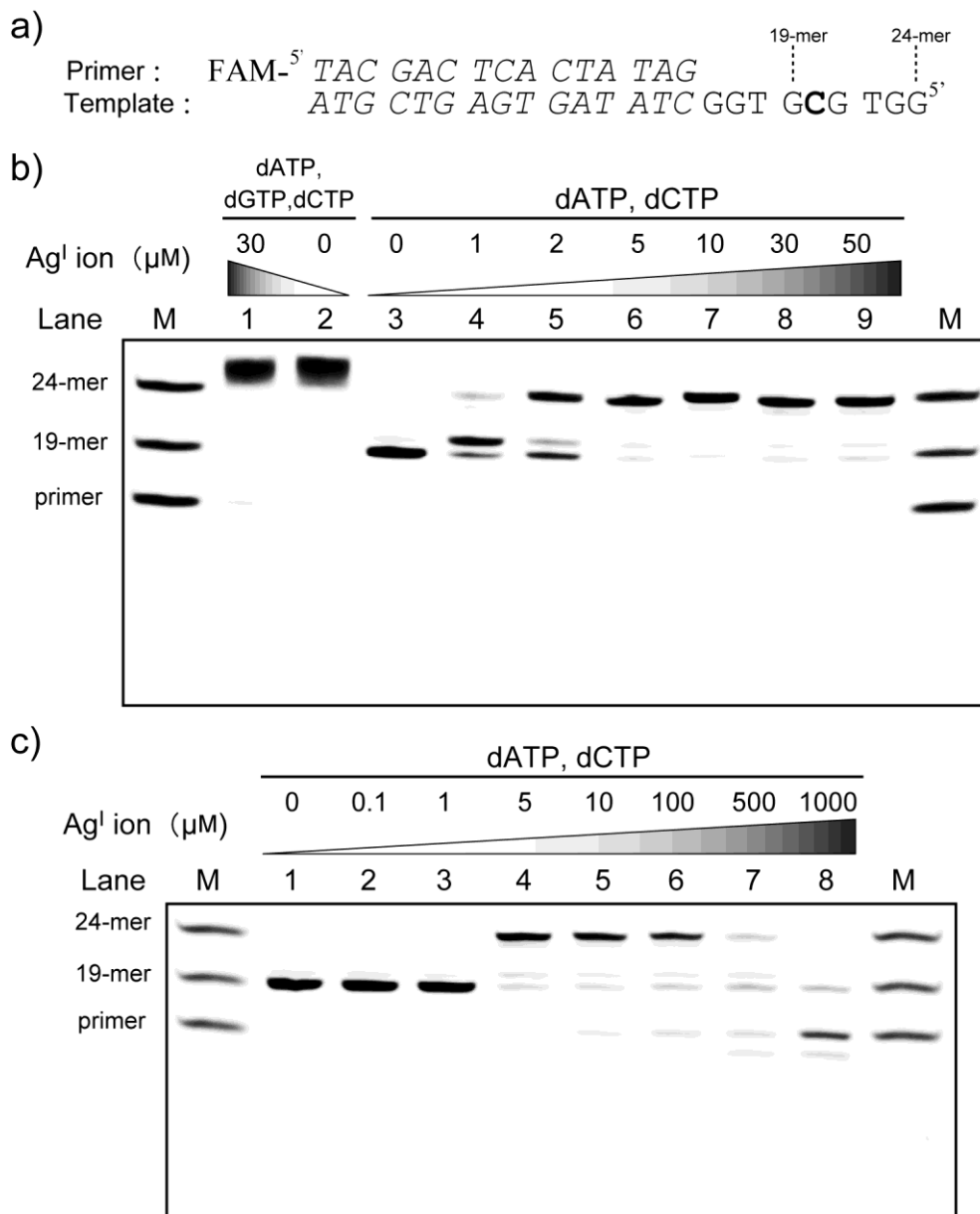
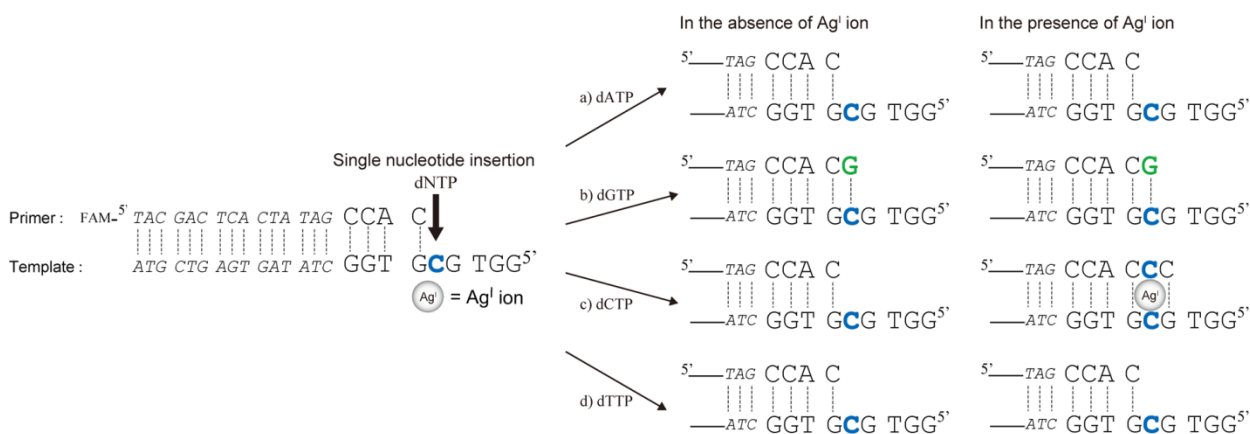


Figure 12. Effects of Ag^I ion concentration on the primer extension reaction by KF by using the primed template shown in a). The reactions contained 20 μM dNTPs, 0.3 units KF and b) 0-50 and c) 0-1000 μM AgNO₃. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

次に、 Ag^{I} 存在下におけるプライマー伸長反応において、C の相補位へ取り込まれた dNTP が dATP か dCTP のどちらであるかを確認するため、Scheme 3 に示した一塩基伸長反応を実施した。一塩基伸長反応とは 1 種類の dNTP のみを反応溶液に添加し、primer 鎖の 3' 末端に dNTP を 1 つ取り込ませる反応である。Table 2 に示した 19-mer-2 を primer 鎖とし、 Ag^{I} 存在下における C の相補位への dNTP の一塩基伸長反応を実施した (Figure 13).



Scheme 3. Schematic description of single nucleotide insertion into the site opposite C in the template in the presence or absence of Ag^{I} ions.

鋳型鎖 C と相補的な dGTP 存在下では、 Ag^{I} の有無に関わらず、Watson-Crick 型塩基対である G-C 塩基対が形成された (Figure 13, Lanes 3, 4). 一方、dTTP 存在下では、 Ag^{I} の有無に関わらず、dTTP は取り込まれず、3'→5' exonuclease 活性による primer 鎖の分解が見られた (Figure 13, Lanes 7, 8). Ag^{I} 非存在下においては、dATP、dCTP は取り込まれず、dTTP と同様に、primer 鎖は 3'→5' exonuclease 活性により分解された (Figure 13, Lanes 2, 6). この分解は、分解によって生じる primer 鎖の 3' 末端塩基が、添加した dNTP と同じ塩基になるまで続き、分解物の 3' 末端に位置する核酸塩基と添加した dNTP が同じ種類の核酸塩基となる位置で停止し、分解物を生成すると考えられる (n-1, n-2, n-6). dATP,

dCTP の Ag^{I} 存在下での C の相補位への取り込みは、予想¹⁹⁾に反して dATP が取り込まれ、dCTP は取り込まれなかった (Figure 13, Lanes 1, 5). 一塩基伸長反応の結果より、 Ag^{I} 存在下におけるプライマー伸長反応において、C の相補位へ dATP が取り込まれることが示唆された.

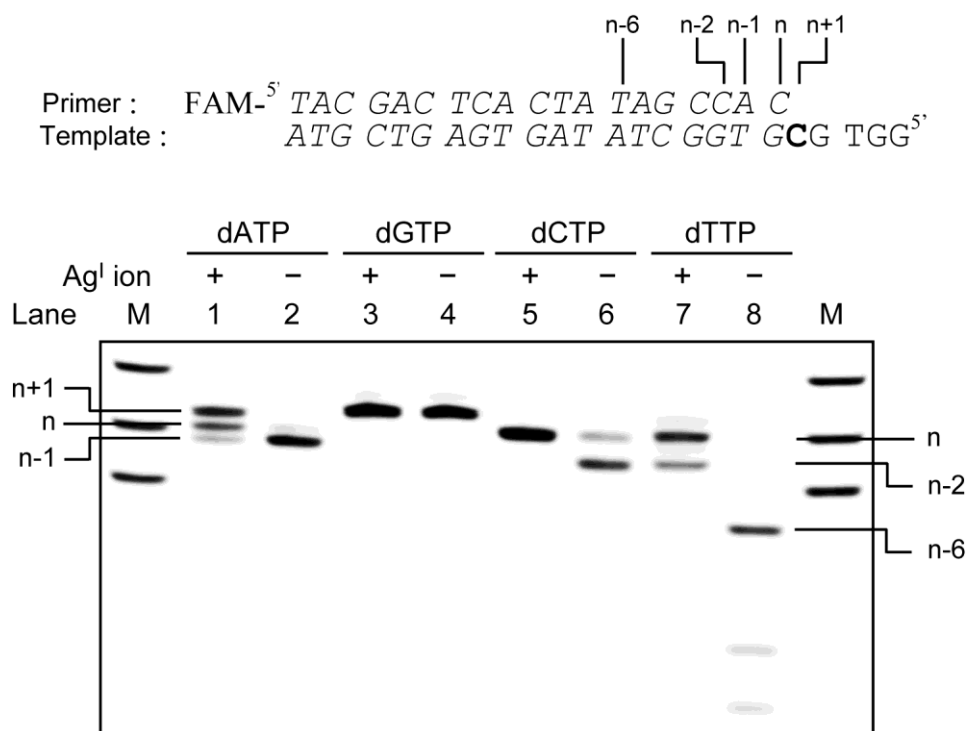


Figure 13. Single nucleotide insertions into the site opposite C in the template in the presence or absence of Ag^{I} ions by KF. The reactions contained 20 μM dNTPs, 0.3units KF and 30 μM AgNO_3 . M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

次に本反応における、生成物の配列を同定する目的で、第一章と同様に反応生成物の MALDI-TOF MS による解析を行った。

Table 2 に示した ODNs を使用し、Scheme 2 に示した反応を行い、反応生成物を MALDI-TOF MS にて解析した。第一章と同様の反応のスケールアップを行い、反応の進行を確認した (Figure 14). dATP, dGTP, dCTP 存在下では、 Ag^{I} の有無に関わらず full-length product (24-mer) が生成した (Figure 14b, Lanes 1, 2). dATP, dCTP 存在下では、 Ag^{I} 非存在

下においては、C の手前に位置する 19-mer で反応は停止し (Figure 14b, Lane 3), Ag^{I} 存在下においては full-length product (24-mer) が生成した. (Figure 14b, Lane 4). 全ての条件において、Figure 11 に示した結果と同様の結果となった. 反応のスケールアップに成功したため、第一章と同様の操作を行い、それぞれの反応生成物を MALDI-TOF MS にて解析した (Figure 14d-g).

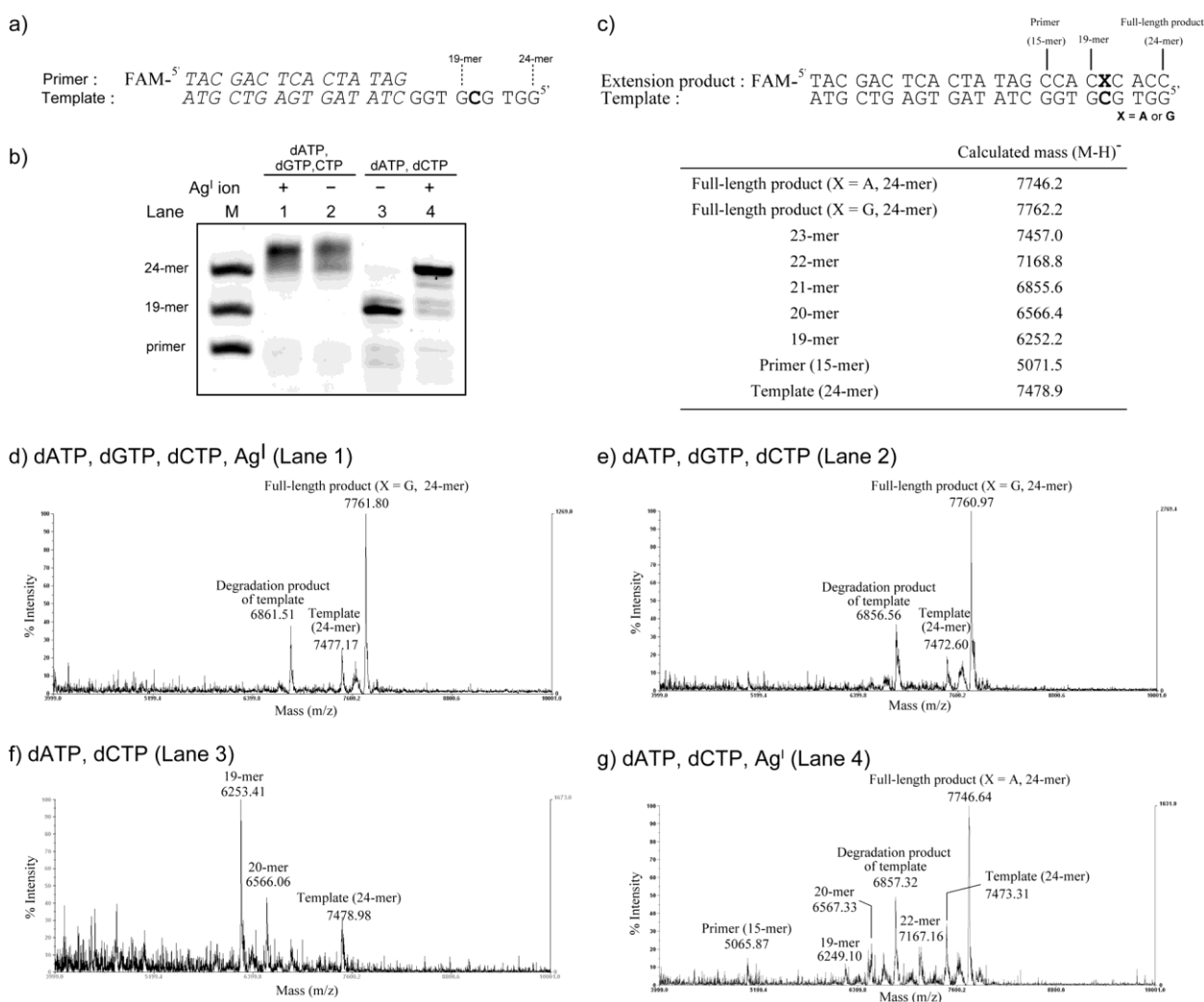


Figure 14. a) Sequences of the template and primer strands. b) Primer extension reactions in the presence or absence of Ag^{I} ions by KF. The reactions contained 1.4 μM Template, 1.4 μM primer, 420 μM dNTPs, 0.8 units KF and 50 μM AgNO_3 . M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. c) Calculated mass of each oligomer. d-g) MALDI-TOF mass spectra of the reactions corresponding to lanes 1-4 in b), respectively. Other experimental details are described in the experimental section.

MALDI-TOF MS の解析結果より, Template 鎖の一本鎖領域と相補的な dNTP (dATP, dGTP, dCTP) 存在下では (Lanes 1, 2), Ag^{I} の存在に関わらず dGTP が C の相補位へ取り込まれ G-C 塩基対の形成を介した full-length product (X = G, 24-mer) の生成が確認できた (Figure 14d, observed mass: 7761.8 (Lane 1), Figure 14e, 7761.0 (Lane 2), calculated mass (M-H)⁻: 7762.2). また dATP, dCTP 添加時では, Ag^{I} 非存在下では (Lane 3), 鋳型鎖の C の手前 (19-mer) で反応が停止している (Figure 14f, observed mass: 6253.4, calculated mass (M-H)⁻: 6252.2) ことを, Ag^{I} 存在下では (Lane 4), C の相補位へ dATP が取り込まれた full-length product (X = A, 24-mer) が生成していることを確認できた (Figure 14g, observed mass: 7746.6, calculated mass (M-H)⁻: 7746.2). 一塩基伸長反応と, MALDI-TOF MS の結果より, KF は, Ag^{I} 存在下において C の相補位へ dCTP ではなく dATP を取り込み, その後の鎖伸長を行うことが明らかとなった. 上記の結果より, DNA polymerase は, Ag^{I} 存在下におけるプライマー伸長反応において, 既知の C- Ag^{I} -C 錯体型塩基対ではなく, C- Ag^{I} -A 錯体型塩基対を形成することが明らかになった.

第二項 DNA polymerase による銀(I) 錯体型 C-A 塩基対形成の必須因子

次に C の相補位への dATP の取り込み反応における重要因子の検討を行った。第一章第二節と同様に、反応溶液中に添加する Ag^{I} のカウンターイオンの影響、 Ag^{I} 以外の金属イオンがもたらす影響を評価し、さらに Klenow fragment 以外の DNA polymerase で反応を行った。

まず初めに、反応溶液中の Ag^{I} は、硝酸銀水溶液 (AgNO_3) 由来であるため、 Ag^{I} の対イオンである硝酸イオン (NO_3^-) の反応に対する影響を確認した。反応溶液中に含まれるナトリウム及びマグネシウムの硝酸塩 [NaNO_3 および $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$] 存在下でのプライマー伸長反応を検討した。Table 2 に示した ODNs を使用し、Scheme 2 に示した反応を行った。

NaNO_3 および $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 存在下でのプライマー伸長反応は、C の手前 (19-mer) で停止したのに対し、 AgNO_3 存在下は、full-length product (24-mer) の生成を確認することができた (Figure 15)。以上の結果より、C の相補位への dATP の取り込み反応に対する NO_3^- の影響はなく、 Ag^{I} が必須因子であることが明らかとなった。

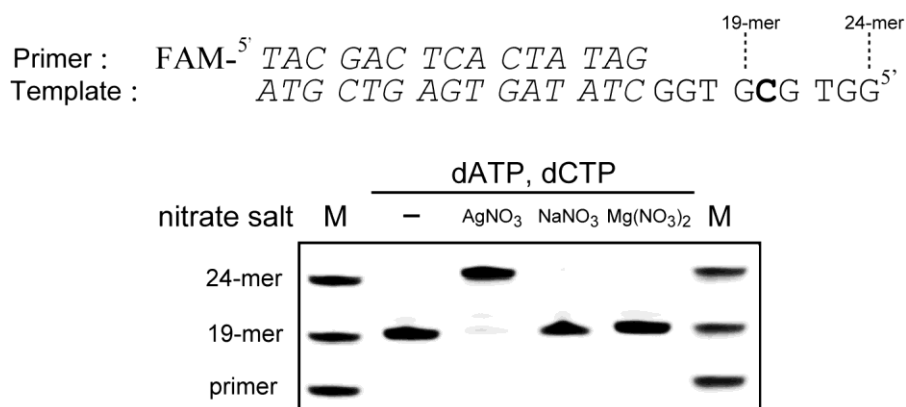


Figure 15. Effects of counter anion (nitrate anion) on the primer extension reaction by KF. The reactions contained 20 μM dNTPs, 0.3 units KF and 30 μM NaNO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ and AgNO_3 . M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

次に、 Ag^{I} 以外の金属イオンは、C の相補位への dATP の取り込みを介したプライマー伸長反応に対して、どのような影響を及ぼすかを検討することにした。第一章より DNA polymerase による T の相補位への dTTP の取り込み反応は、 Hg^{II} に高い選択性があり、他の金属イオン存在下では起こらないことを明らかにした。これは T-T ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA が Hg^{II} 存在下でのみ安定化され、他の金属イオン存在下では安定化されないことと一致している。そこで C の相補位への dATP の取り込み反応が、 Ag^{I} に高い選択性があるかを確認するため、DNA と相互作用することが報告されている²⁹⁾ Mn^{II} , Fe^{II} , Fe^{III} , Co^{II} , Ni^{II} , Cu^{I} , Cu^{II} , Zn^{II} , Cd^{II} , Au^{I} , Au^{III} , Hg^{II} , Tl^{I} , Pb^{II} 存在下で、Table 2 に示した ODNs を用い、Scheme 2 の反応を行った。

各金属イオン存在下での full-length product の生成量を、 Ag^{I} 存在下での full-length product の生成量と比較した (Figure 16)。Full-length product の生成量は、PAGE の結果より得られた full-length product のバンドの蛍光強度より算出した。その結果、full-length product の生成量は、 Ag^{I} 存在下で最も多く、本反応が Ag^{I} に高い選択性があることが明らかとなった (Figure 16)。しかし、 Cu^{I} , Cu^{II} , Mn^{II} , Co^{II} 存在下におけるプライマー伸長反応においても、わずかながら full-length product の形成が認められた。DNA polymerase は、複製反応を行うにあたり Mg^{II} を必須因子としているが、 Mn^{II} や Co^{II} は、 Mg^{II} と置き換わり、DNA polymerase の fidelity (複製精度) を低下させることが知られている。³⁰⁾ 本反応においても、 Mn^{II} や Co^{II} 存在下では、DNA polymerase の複製精度が低下することで、C の相補位へ金属イオンとの相互作用を有さないミスマッチ塩基対が形成され、full-length product が生成した可能性が考えられる。 Cu^{I} および Au^{I} に関しては、非経験的分子軌道法 (*ab initio*) の計算結果では、 Ag^{I} と同様に C-A ミスマッチ塩基対を安定化させると報告されているが、³¹⁾ 両金属イオンとも水に対して難溶であり、さらには溶液中で容易に酸化され、それぞれ Cu^{II} および Au^{III} と変化するため再現性がよくなかった。以上の結果より、C の相補位への dATP 取り込み反応は、 Ag^{I} に高い選択性があるということが明らかとな

った。

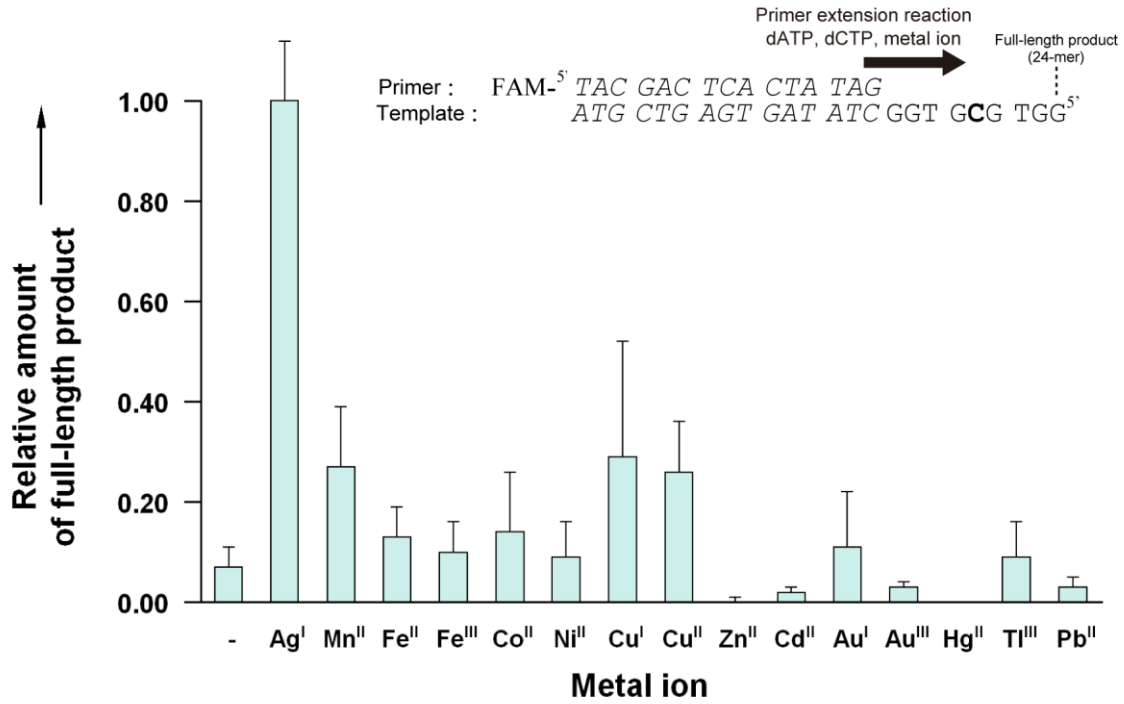


Figure 16. Amounts of the full-length product of metal ion-mediated reactions relative to that of Ag^I ion-mediated reaction. The reactions contained 20 μM dNTPs, 0.3 units KF and 30 μM various metal ions. Other experimental details are described in the experimental section.

第一章より、T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対は、KF だけでなく、他の DNA polymerase でも同じく認識・形成された。Ag^I 存在下における C の相補位への dATP の取り込み反応も、他の DNA polymerase でも同様に起こる一般性のある反応であるかを検討した。そこで第一章と同様に Taq polymerase と KOD Dash polymerase を用いて、Table 2 に示した ODNs を使用し、Scheme 2 に示したプライマー伸長反応及び Scheme 3 に示した一塩基伸長反応を行った (Figure 17, Figure 18)。Ag^I 濃度は、前検討で両酵素それぞれの polymerase 活性に影響を与えないことが分かった 100 μM と 25 μM をそれぞれ用いた。

Taq polymerase による反応では、dATP, dGTP, dCTP 存在下で、C の相補位に dGTP が取り込まれた Watson-Crick 型塩基対 (G-C 塩基対) の形成を介した full-length product

(24-mer) が生成した (Figure 17a, Lanes 1, 2). dATP, dCTP 存在下においては, Ag^I 非存在下, C の手前 (19-mer) で反応が停止した (Figure 17a, Lane 4) のに対し, Ag^I 存在下では full-length product (24-mer) の生成が確認できた (Figure 17a, Lane 3). KF の結果と同様に, Ag^I 存在下であっても, Taq polymerase の polymerase 活性は失われず, dATP, dCTP 存在下 (dGTP 非存在下) では, 反応は C の手前 (19-mer) で停止するのに対し, Ag^I 存在下では, full-length product (24-mer) が生成した. また KOD Dash polymerase の場合も同様の結果となった (Figure 18a).

次に Taq polymerase や KOD Dash polymerase において, C の相補位へ取り込まれた dNTP を確認するため, Ag^I 存在下における C の相補位への一塩基伸長反応を行った (Figure 17b, 18b). 一塩基伸長反応の結果, 両酵素とも C の相補位へ dCTP は取り込まず (Figure 17b, Lane 5, Figure 18b, Lane 5), dATP を取り込むことが明らかとなった (Figure 17b, Lane 1, Figure 18b, Lane 1). また, Taq polymerase においては, Ag^I 存在下で C の相補位へ dTTP が取り込まれたバンドを確認することができた (Figure 17b, Lane 7). Taq polymerase は, KF および KOD Dash polymerase とは異なり, 3'→5' exonuclease 活性を有していない. 3'→5' exonuclease 活性のない Taq polymerase でのみ C の相補位への dTTP の取り込み反応が見られたことから, 生成した塩基対はミスマッチ塩基対と認識され, 3'→5' exonuclease 活性の基質となり, 取り込み後分解されたと考えられる. そのため KF や KOD Dash polymerase による反応では, 見かけ上 dTTP は取り込まれない結果となったと考えられる. 以上の結果より, Taq polymerase および KOD Dash polymerase は, Ag^I 存在下において, KF と同様に C の相補位へ dCTP ではなく dATP を取り込み, プライマー伸長反応を進行させることが明らかとなった. よって本反応は, KF に特異的な反応ではなく, DNA polymerase に一般的な反応であることが示唆された.

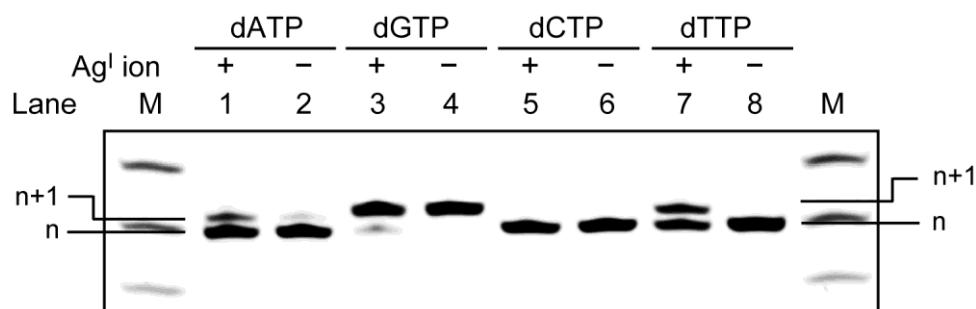
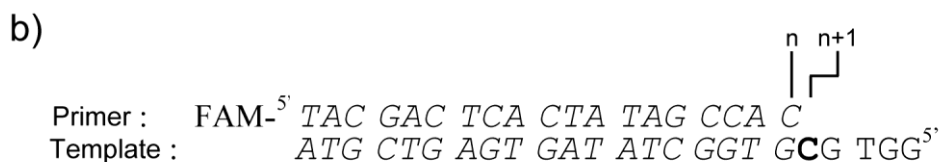
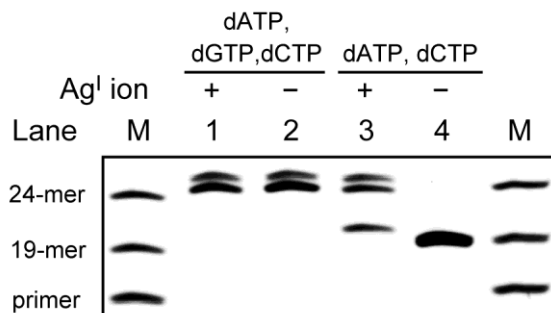


Figure 17. a) Primer extension reactions in the presence of Ag^I ions by Taq polymerase. The reactions contained 50 μM dNTPs, 2.5 units Taq polymerase and 100 μM AgNO₃. b) Single nucleotide insertions at the site opposite C in the template by Taq polymerase. The reactions contained 50 μM dNTPs, 2.5 units Taq polymerase and 100 μM AgNO₃. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

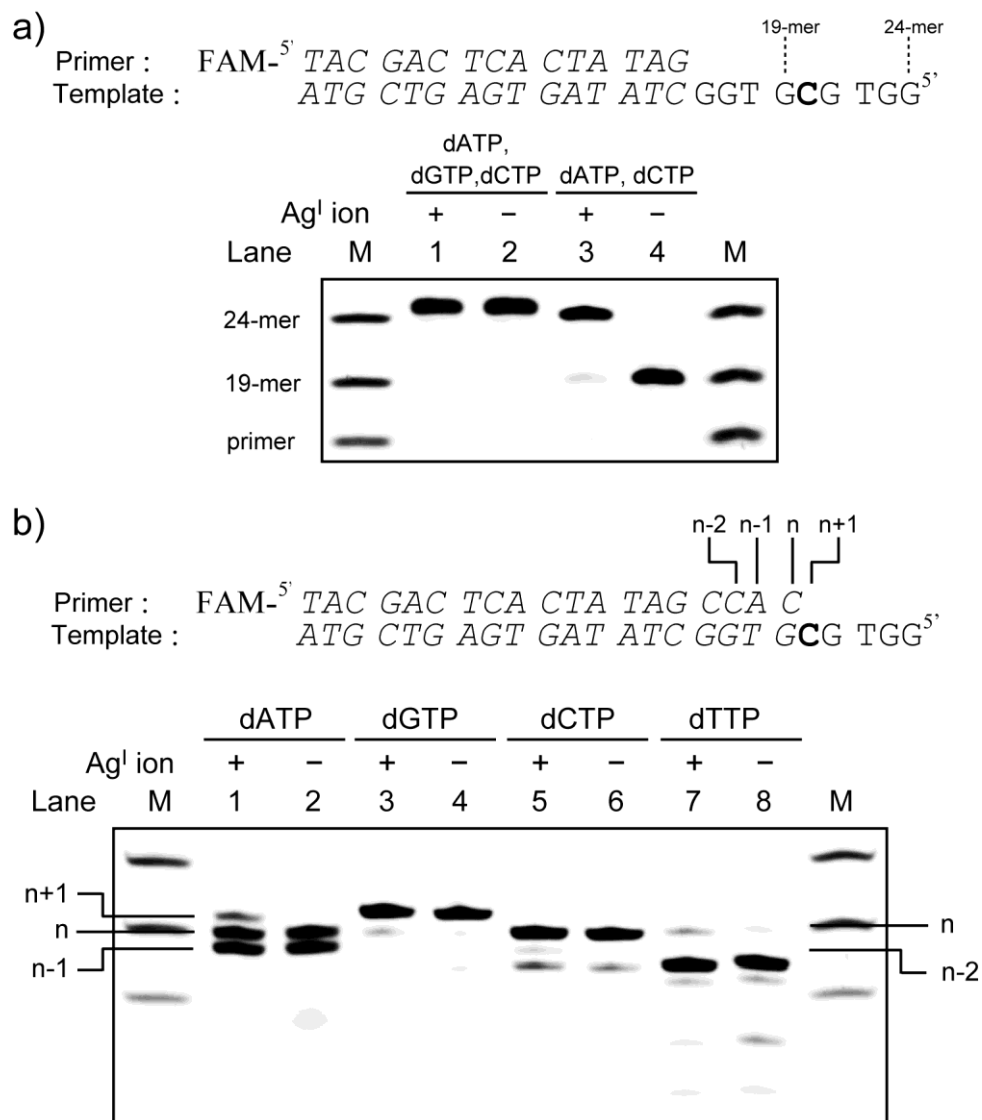


Figure 18. a) Primer extension reactions in the presence of Ag^I ions by KOD Dash polymerase. The reactions contained 20 μM dNTPs, 0.4 units KOD Dash polymerase and 25 μM AgNO₃. b) Single nucleotide insertions at the site opposite C in the template by KOD Dash polymerase. The reactions contained 20 μM dNTPs, 0.4 units KOD Dash polymerase and 25 μM AgNO₃. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

第三項 銀(I) 錯体型 C-A 塩基対の Ag^{I} の配位様式の考察

本節第一項の検討で、 Ag^{I} 存在下におけるプライマー伸長反応において、C の相補位へ dATP が取り込まれることを見出した。この事象は、C-A ミスマッチ塩基対間に Ag^{I} が配位し、C- Ag^{I} -A 錯体型塩基対が形成されることに起因していると考えている。そこで次に、C- Ag^{I} -A 錯体型塩基対の構造について、分子軌道計算^{32,33)} と X 線結晶構造解析³⁴⁾ による報告をもとに考察した。

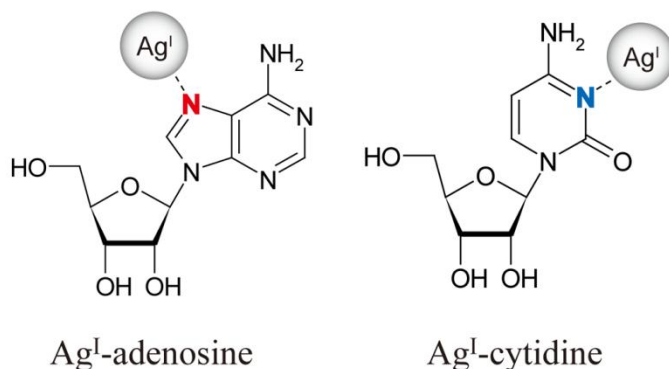
分子軌道計算の密度汎関数法 (DFT) によると、 Ag^{I} は adenosine, cytidine に配位するとき、それぞれ 7 位窒素原子 (N7) と 3 位窒素原子 (N3) に最も強く配位すると報告されている (Figure 19a).³²⁾ 計算方法の異なる非経験的分子軌道法 (*ab initio*) でも、adenine と cytosine の間に Ag^{I} が配位する際には、adenine の N7 と cytosine の N3 に Ag^{I} が配位する様式が最安定配位構造であると報告されている (Figure 19b).³³⁾ さらに X 線結晶構造解析において、9-methyladenine の N7 と 1-methylcytosine の N3 の間に Ag^{I} が配位した構造が報告されている (Figure 19c).³⁴⁾ このように、purine 環の N7 と pyrimidine 環の N3 に Ag^{I} が配位する様式が安定であると報告されている。

Watson-Crick 型塩基対では、thymine の N3 の水素と水素結合するのは、adenine の 1 位窒素原子 (N1) であるが、Hoogsteen 型の塩基対では、adenine が Watson-Crick 型の *anti* 型から *syn* 型に反転し、adenine の N7 が thymine の N3 の水素と水素結合する (Figure 1a).²⁾ 1-deazaadenine (1-deazaA) は、adenine の N1 が、炭素に置き換わっているため、相補鎖の thymine と Watson-Crick 型塩基対を形成することができない。そのため 1-deazaA の N7 と thymine の N3 の水素との間で水素結合を有する Hoogsteen 型の塩基対を形成する。この塩基対間に Ag^{I} が配位することが報告されており、1-deazaA の N7 と thymine の N3 との間に Ag^{I} が配位することで安定な塩基対を形成する (Figure 19d).³⁵⁾ これら Hoogsteen 型の金属錯体型塩基対は、DFT 計算も行われており、 Ag^{I} は、purine 環の N7 と

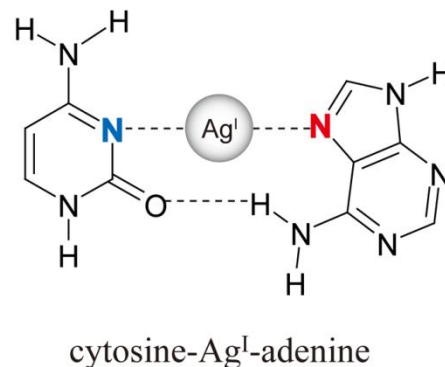
pyrimidine 環の N3 との間に配位する様式が提唱されている。³⁶⁾

以上のように Ag^{I} は、purine 環の N7 と pyrimidine 環の N3 との間に配位する様式が数多く報告されている一方で、purine 環が *anti* 型を取り、purine 環の N1 と pyrimidine 環の N3 との間に Ag^{I} が配位する様式も報告されている。その一例として、二重鎖 DNA 中に金属錯体型塩基対が連続で配列した銀ナノワイヤー中に G- Ag^{I} -C 錯体型塩基対が確認されている。G- Ag^{I} -C 錯体型塩基対の guanine は *anti* 型を取っており、 Ag^{I} は、guanine の N1 と cytosine の N3 との間に配位している。^{14a)}

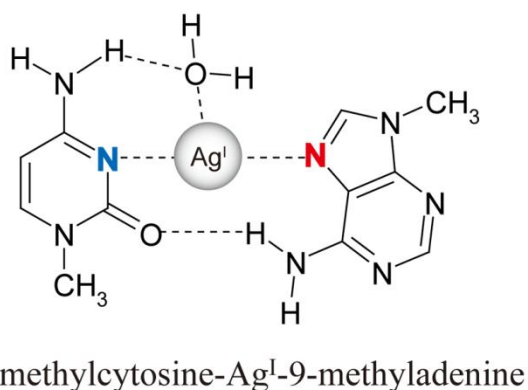
a) DFT calculation



b) Ab initio study



c) X-Ray crystallography



d) Structural study in solution

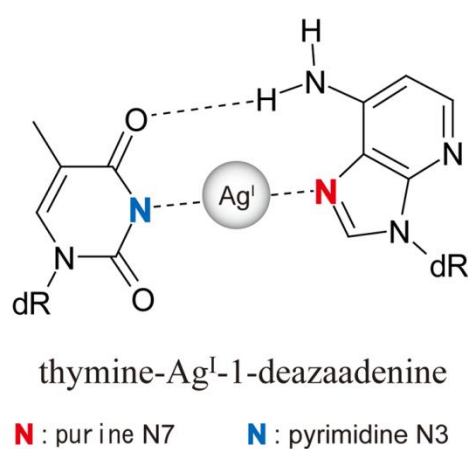
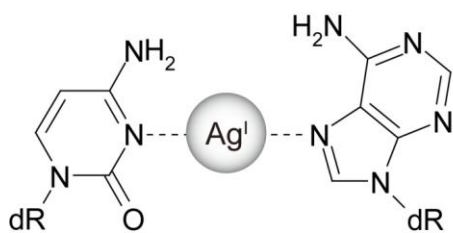


Figure 19. Coordination of Ag^{I} ion to a) nucleosides, b), c) nucleobases and d) a base pair in duplex DNA.

上述の報告通り, Ag^{I} が adenine の N7 への配位を介して C- Ag^{I} -A 錯体型塩基対を形成する場合, adenosine は, 安定型配座である *anti* 型から準安定型配座である *syn* 型に反転する必要がある(Figure 20a). 仮に *anti* 型の adenine の N1 と cytosine の N3 との間に, Ag^{I} が配位した場合 (Figure 20b), 糖部アノメリック炭素間 (C'1-C'1) の距離が長くなると予想される. そこで adenine が *syn* 型の C- Ag^{I} -A 錯体型塩基対と *anti* 型の C- Ag^{I} -A 錯体型塩基対それぞれのグリコシド窒素原子間の距離を評価するため, 9-methyladenine- Ag^{I} -1-methylcytosine の最安定配座を, DFT にて計算した (Figure 21). 計算を簡便にするため糖部のない 9-methyladenine と 1-methylcytosine を使用し, グリコシド結合する 9-methyladenine の 9 位窒素原子と 1-methylcytosine の 1 位窒素原子の距離を比較した. その結果, 9-methyladenine が *syn* 型の場合, 8.52 Å に対し, *anti* 型の場合は, 10.4 Å となった (Figure 21b). Watson-Crick 型塩基対である T-A 塩基対では, 8.95 Å (Figure 21a) であり, 9-methyladenine が *syn* 型の場合と同程度の距離であった. これらのことから adenosine は, C- Ag^{I} -A 錯体型塩基対を形成する際に, 安定型配座である *anti* 型から準安定型配座である *syn* 型に反転することも十分に起こりうると考えられる. 一方で, 先述した通り, グリコシド窒素間の距離が長くなると予想される purine 環が *anti* 型を取る G- Ag^{I} -C 錯体型塩基対も確認されている.^{14a)}

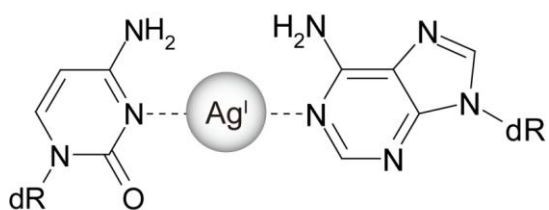
以上より, C- Ag^{I} -A 錯体型塩基対の構造は, adenine が準安定な *syn* 型を取り, adenine の N7 と cytosine の N3 との間に, Ag^{I} が配位している構造様式 (Figure 20a) と, adenine が安定な *anti* 型を取り, adenine の N1 と cytosine の N3 との間に, Ag^{I} が配位している構造様式の 2 種類が考えられる (Figure 20b).

a) Ag^I-mediated C-A (*syn*) base pair



C-Ag^I-A (*syn*)

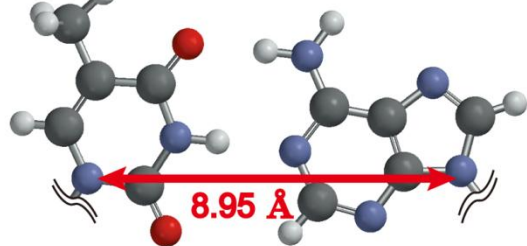
b) Ag^I-mediated C-A (*anti*) base pair



C-Ag^I-A (*anti*)

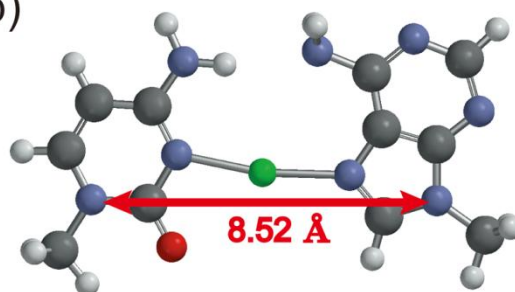
Figure 20. Possible structures of C-Ag^I-A base pairs.

a)

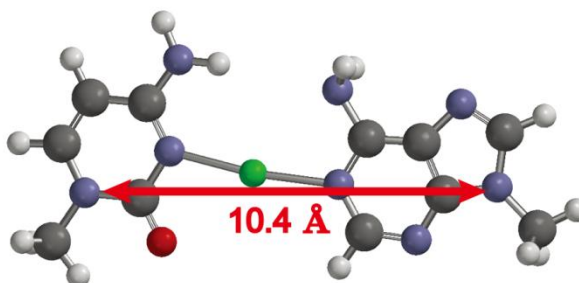


thymine-adenine

b)



1-methylcytosine-Ag^I-9-methyladenine (*syn*)



1-methylcytosine-Ag^I-9-methyladenine (*anti*)

Figure 21. Distance of N1-N9 of a) Watson-Crick base pairs and b) 1-methylcytosine- Ag^I-9-methyladenine (*syn*) and 1-methylcytosine-Ag^I-9-methyladenine (*anti*) by DFT calculations.

第二節 銀(I) 存在下での校正機能を持たない DNA polymerase によるプライマー伸長反応

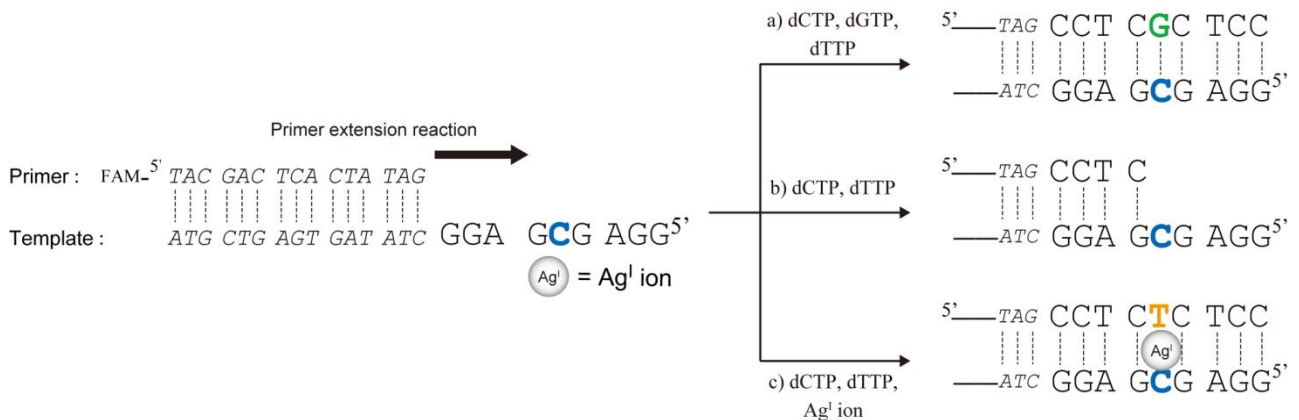
第一項 銀(I) 存在下での 3'→5' exonuclease 活性欠損 Klenow fragment によるプライマー伸長反応

第一節の結果より, DNA polymerase は Ag^{I} 存在下で C の相補位に dATP を取り込み, C- Ag^{I} -A 錯体型塩基対を形成することを明らかにしたが, 第一節第二項で C- Ag^{I} -T 錯体型塩基対の形成が示唆された (Figure 17). 本節では, Ag^{I} 存在下における C, T の相補位への dTTP, dCTP の取り込み反応についてそれぞれ検討した.

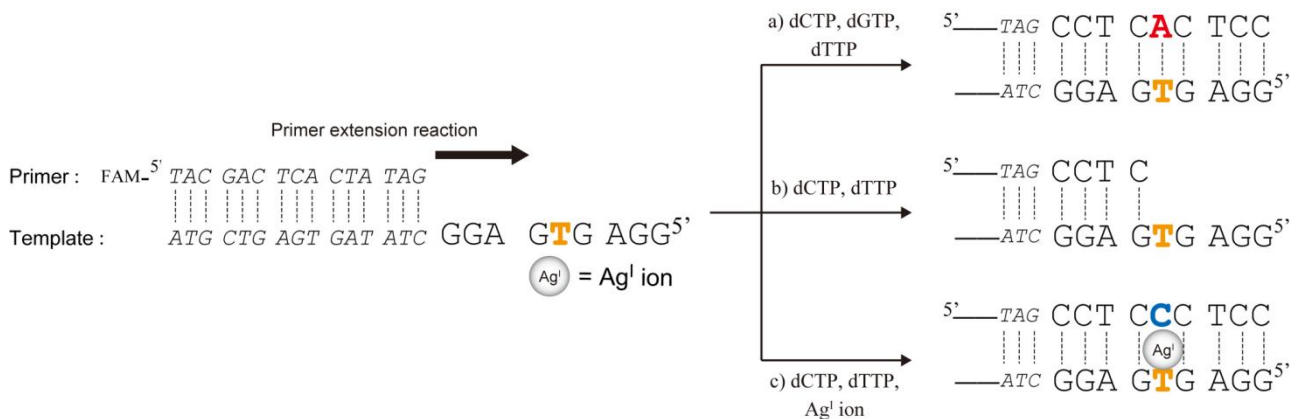
C の相補位への dTTP の取り込み反応及び T の相補位への dCTP の取り込み反応を検討するにあたり, Table 3 に示した Template-3, 4 を使用し, Scheme 4, 5 に示したプライマー伸長反応を検討した. 第一節の KF, Taq polymerase, KOD Dash polymerase による C の相補位への dNTP の取り込み反応の検討より, Ag^{I} 存在下での C の相補位への dTTP の取り込み反応は, 3'→5' exonuclease 活性を持たない Taq polymerase に認められたことから, 本節では同様に 3'→5' exonuclease 活性を持たない 3'→5' exonuclease 活性欠損 Klenow fragment (KF exo-) を使用した.

Table3. Sequences of ODNs.

sequence name	Sequence
Full-length-4	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG CCT C TC TCC ^{3'}
19mer-3	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG CCT C ^{3'}
Primer	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG ^{3'}
Template-3	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC GGA G CG AGG ^{5'}
Template-4	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC GGA G TG AGG ^{5'}



Scheme 4. Schematic description of primer extension reactions in the presence or absence of Ag^I ions through the incorporation dTTP into the site opposite C in the template.



Scheme 5. Schematic description of primer extension reactions in the presence or absence of Ag^I ions through the incorporation dCTP into the site opposite T in the template.

各鋳型鎖の一本鎖部分と相補的な dNTP 存在下では (dGTP, dCTP, dTTP もしくは dATP, dCTP, dTTP), 15 μ M の Ag^I の有無に関係なく, プライマー伸長反応は進行し full-length product (24-mer) を形成した (Figure 22a, Lanes 1, 2, Figure 22b, Lanes 1, 2) ことから, 15 μ M の Ag^I は KF exo- の polymerase 活性を阻害せず, プライマー伸長反応は進行することがわかった. dCTP, dTTP 存在下, Ag^I 非存在下では, それぞれ C もしくは T の手前 (19-mer) で反応は停止した (Figure 22a, Lane 3, Figure 22b, Lane 3). 一方で Ag^I 存在下では, それぞれ伸長反応は進行し, full-length product (24-mer) が生成した (Figure 22a, Lanes 4-11,

Figure 22b, Lanes 4-11).

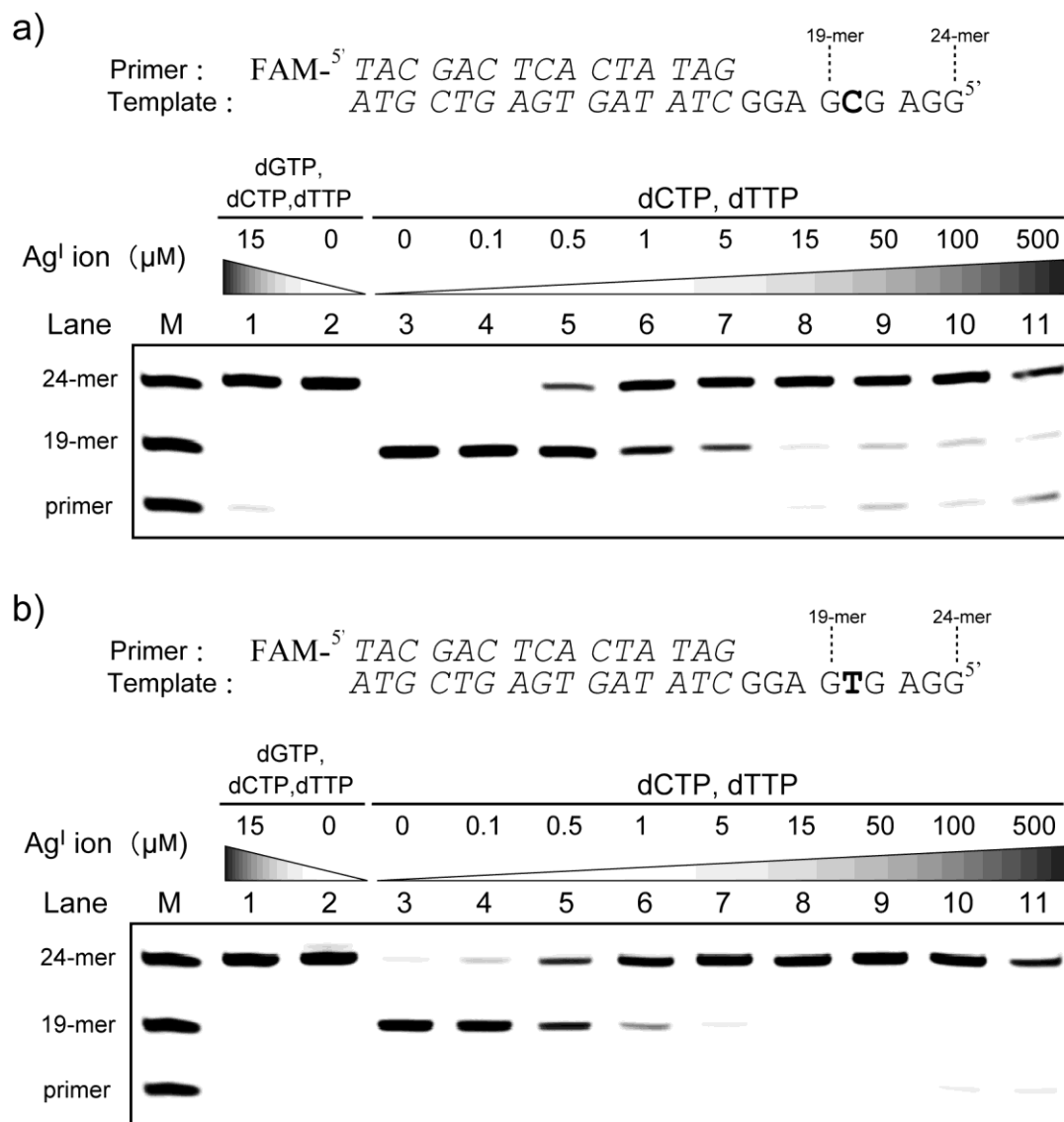
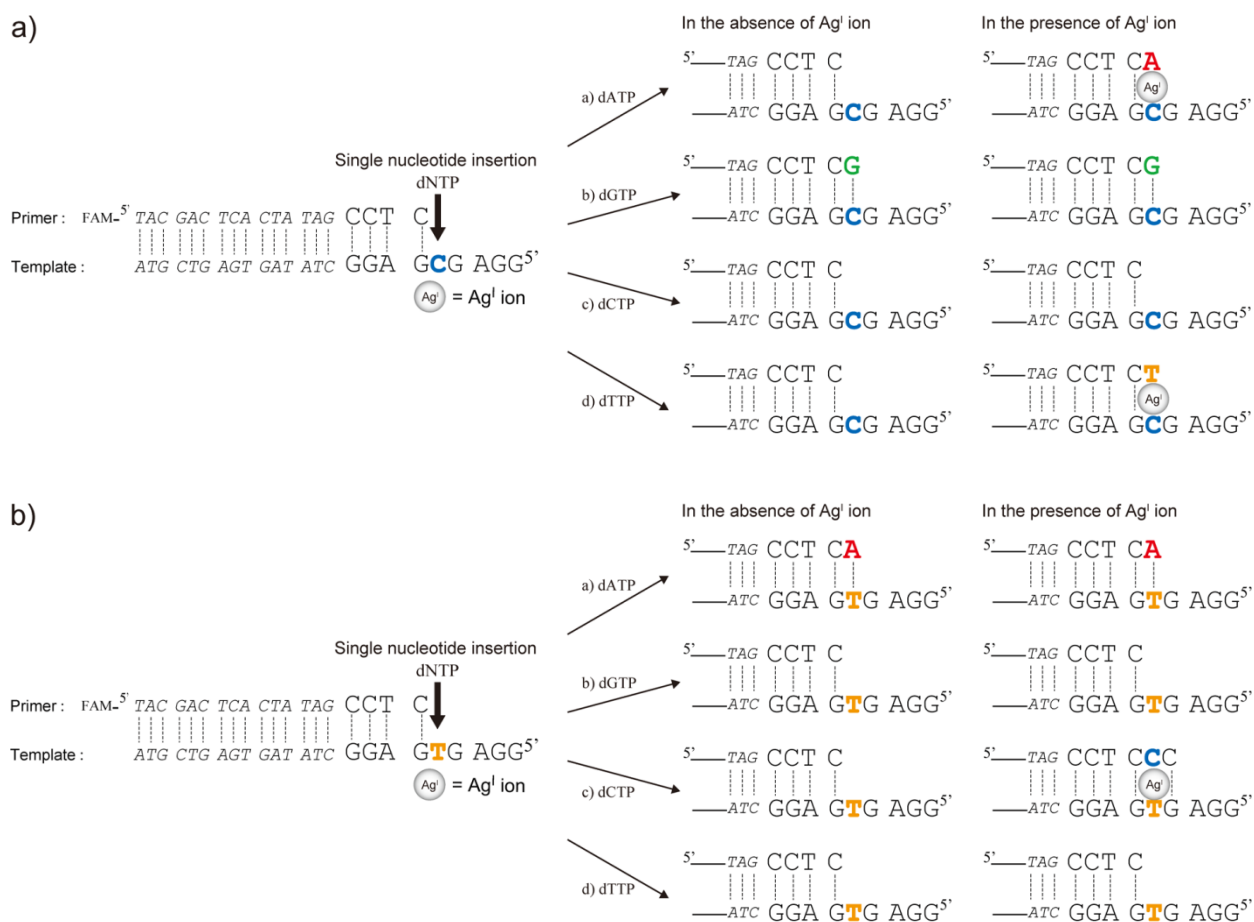


Figure 22. Primer extension reaction at the various concentrations of Ag^I ions through the incorporation of dTTP or dCTP into the site opposite a) C or b) T in the template by KF exo-. The reactions contained 20 μM dNTPs, 0.4 units KF exo- and various concentrations of AgNO₃. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

次に、上記プライマー伸長反応で C, T の相補位へ取り込まれた dNTP を確認する目的で、Table 3 に示した 19-mer-3 を使用し、Scheme 6 に示した Ag^{I} 存在下における一塩基伸長反応を実施した。



Scheme 6. Schematic description of single nucleotide insertions into the site opposite a) C or b) T in the presence or absence of Ag^{I} ions.

C 及び T と相補的な dGTP および dATP 存在下では、 Ag^{I} の有無に関わらず、Watson-Crick 型塩基対により一塩基の伸長が認められた (Figure 23a, Lanes 3, 4, Figure 23b, Lanes 1, 2). T の相補位への dGTP の取り込み反応は、 Ag^{I} の有無に関わらず、少ないな

がらも一塩基伸長したバンド (n+1) が確認された (Figure 23b, Lanes 3, 4). これは、複製反応中で比較的形成されやすいミスマッチ塩基対である T-G ミスマッチ塩基対が形成したためと考えられる. 本節で使用している DNA polymerase は、3'→5' exonuclease 活性を持たないため、形成された T-G ミスマッチ塩基対が校正されなかったと考えられる. C の相補位への dATP の取り込み反応は、第一節と同様に Ag^{I} 存在下でのみ起こり、C- Ag^{I} -A 錯体型塩基対が形成したと考えられる (Figure 23a, Lanes 1, 2). 次に C の相補位への dCTP, dTTP の取り込み反応は、 Ag^{I} 存在下における C の相補位への dTTP の取り込み反応以外の条件では、一塩基伸長したバンドは確認できなかった (Figure 23a, Lanes 5-8). 第一節と同様に、C の相補位への dCTP の取り込み反応は見られず、C- Ag^{I} -C 錯体型塩基対は、3'→5' exonuclease 活性を持たない KF exo- であっても形成されなかった (Figure 23a, Lanes 5, 6). また、T の相補位への dCTP の取り込み反応においては、 Ag^{I} 存在下において、T の相補位へ dCTP が取り込まれ、その後の G の相補位へ dCTP が取り込まれたバンド (n+2) が確認できたが (Figure 23b, Lanes 5, 6), dTTP の取り込み反応では一塩基伸長したバンドは確認できなかった (Figure 23b, Lanes 7,8). 一塩基伸長反応の結果より、 Ag^{I} 存在下におけるプライマー伸長反応において、C の相補位へ dTTP が、T の相補位へ dCTP が取り込まれ、C- Ag^{I} -T および T- Ag^{I} -C 錯体型塩基対が形成したと考えられる.

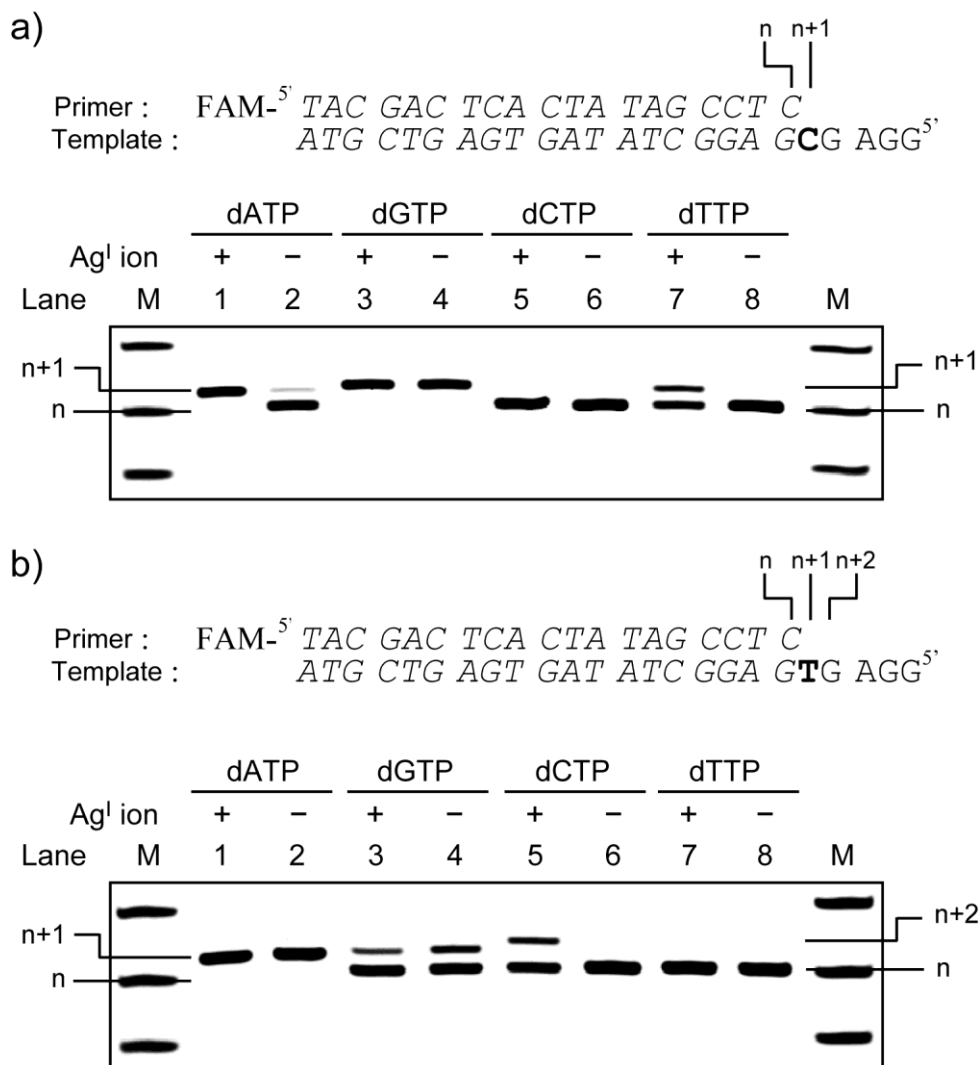


Figure 23. Single nucleotide insertions into the sites opposite a) C or b) T in the presence or absence of Ag^I ions by KF exo-. The reactions contained 10 μM dNTPs, 0.2 units KF exo- and 15 μM AgNO₃. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

次に第一章第一節と第二章第一節と同様に MALDI-TOF MS によりプライマー伸長反応の反応生成物を解析した。Table 3 に示した ODNs を使用し、Scheme 4c, 5c に示した Ag^I 存在下におけるプライマー伸長反応を行った。MALDI-TOF MS の解析に必要な量の反応生成物を得るための反応のスケールアップおよび操作は、第一章第一節及び第二章第一節と同様に行った。

MALDI-TOF MS の結果, KF *exo*- は, Ag^{I} 存在下において, C の相補位へ dTTP (Figure 24c, observed mass: 7718.6, calculated mass $(\text{M-H})^-$: 7719.2) を, T の相補位へ dCTP (Figure 25c, observed mass: 7704.9, calculated mass $(\text{M-H})^-$: 7704.1) を取り込み, プライマー伸長反応を進行させていることが明らかとなった. 以上の結果より, KF *exo*- は, Ag^{I} 存在下におけるプライマー伸長反応において, C- Ag^{I} -T および T- Ag^{I} -C 錯体型塩基対を形成することが明らかとなった.

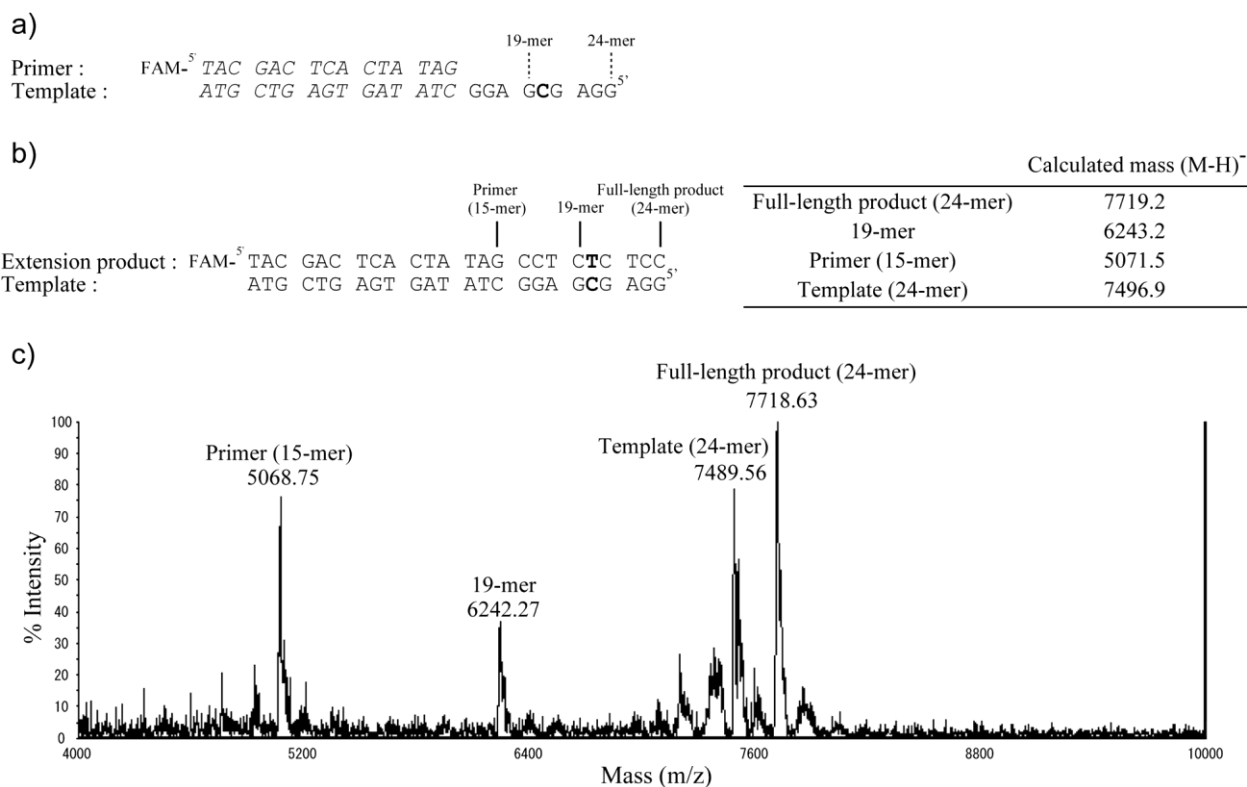


Figure 24. a) Sequences of the template and primer strands. b) Sequences of the extension product and calculated mass of each oligomers. c) MALDI-TOF mass spectrum of extension products obtained by the incorporation of dTTP into the site opposite C in the presence of Ag^{I} ions by KF *exo*-. Primer extension reactions in the presence or absence of Ag^{I} ions by KF *exo*-. The reactions contained 1.4 μM Template, 1.4 μM primer, 420 μM dNTPs, 0.8 units KF *exo*- and 50 μM AgNO_3 . Other experimental details are described in the experimental section.

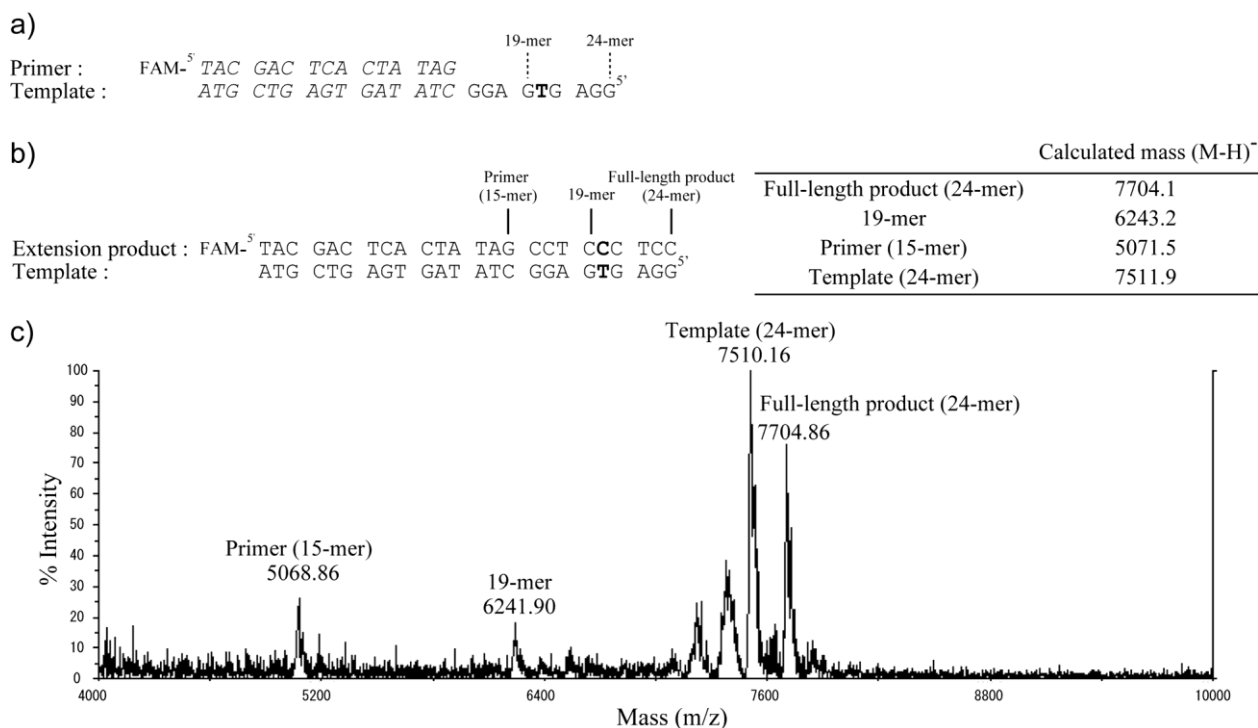


Figure 25. a) Sequences of the template and primer strands. b) Sequences of the extension product and calculated mass of each oligomers. c) MALDI-TOF mass spectrum of extension products obtained by the incorporation of dCTP into the site opposite T in the presence of Ag^{I} ions by KF exo-. Primer extension reactions in the presence or absence of Ag^{I} ions by KF exo-. The reactions contained 1.4 μM Template, 1.4 μM primer, 420 μM dNTPs, 0.8 units KF exo- and 50 μM AgNO_3 . Other experimental details are described in the experimental section.

第二項 DNA polymerase による銀(I) 錯体型 C-T 塩基対形成の必須因子

次に第二章第一節第二項と同様に, Ag^{I} のカウンターイオン及び Ag^{I} 以外の金属イオンの影響を評価し, Klenow fragment 以外の DNA polymerase で反応を検討した.

まず, Ag^{I} 存在下における C および T の相補位への dTTP および dCTP の取り込み反応の必須因子を評価するため, Ag^{I} のカウンターイオンである硝酸イオン (NO_3^-) の影響を評価した. 第一節と同様に, 反応溶液中に含まれている Na^+ イオンおよび Mg^{2+} イオンと硝酸イオンの塩である NaNO_3 および $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 存在下, Table 3 に示した ODNs を使用し, Scheme 4, 5 に示したプライマー伸長反応を行った (Figure 26).

AgNO_3 存在下では, 前節同様に full-length product (24-mer) の生成が確認できたが, Ag^{I} イオン非存在下, NaNO_3 および $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 存在下では, 反応はそれぞれ C および T の手前 (19-mer) で停止した (Figure 26a, 26b). この結果より, DNA polymerase による C および T の相補位への dTTP および dCTP の取り込み反応に NO_3^- の影響はなく, Ag^{I} が重要な因子であることが明らかとなった.

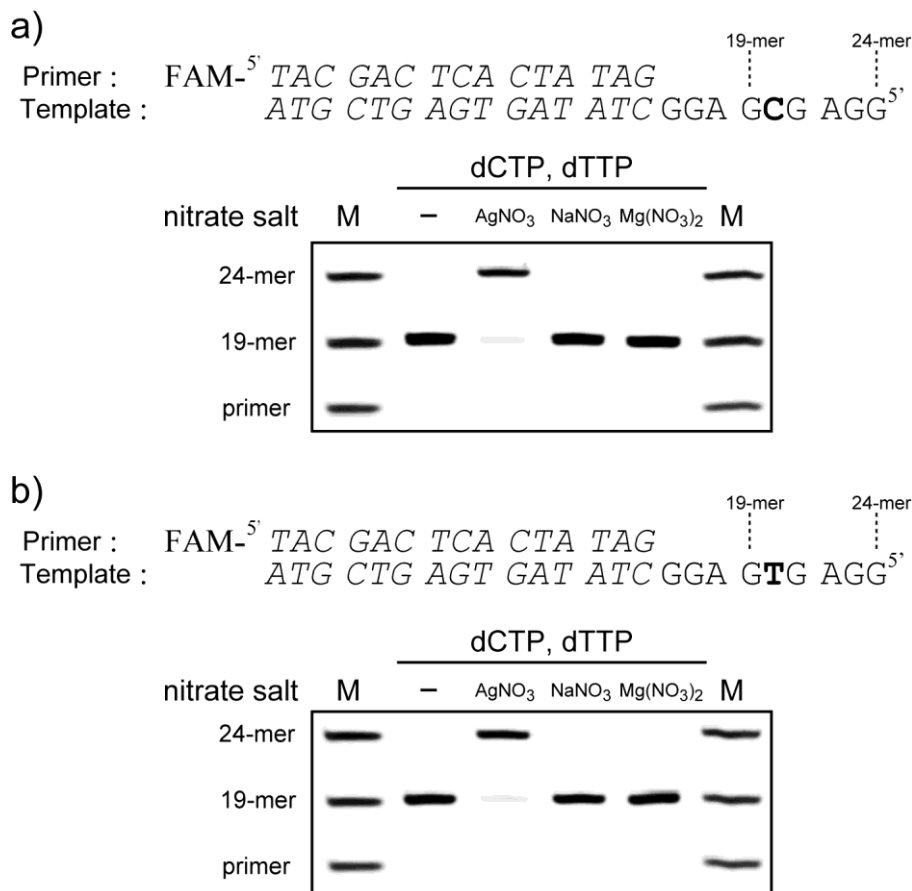


Figure 26. Effects of counter anion (nitrate anion) on primer extension reaction through the incorporation of dTTP or dCTP into the site opposite a) C or b) T in the template by KF *exo-*, respectively. The reactions contained 20 μ M dNTPs, 0.4 units KF *exo-* and 15 μ M nitrate salt. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

次に第一章第二節，第二章第一節と同様に様々な金属イオン存在下でのプライマー伸長反応を行った。Table 3 に示した ODNs を使用し，Scheme 4, 5 に示した反応を Ag^{I} に代え，DNA と相互作用することが知られている ²⁹⁾ Mn^{II} ， Fe^{II} ， Fe^{III} ， Co^{II} ， Ni^{II} ， Cu^{II} ， Zn^{II} ， Cd^{II} ， Au^{III} ， Hg^{II} ， Tl^{I} ， Pb^{II} 存在下で行った (Figure 27)。

Ag^{I} 存在下では，それぞれの反応で full-length product (24-mer) が生成した (Figure 27a, 27b)。T の相補位への dCTP, dTTP の取り込みを介したプライマー伸長反応においては， Hg^{II} 存在下で full-length product (24-mer) が生成した (Figure 27b)。これは，第一章と同様に T の

相補位へ Hg^{II} を介した dTTP の取り込み反応が起こり, T- Hg^{II} -T 錯体型塩基対形成を介した full-length product (24-mer) の生成であると考えられる. そこで Scheme 6b の Ag^{I} を Hg^{II} に変更した一塩基伸長反応を実施した結果 (Figure 28), T の相補位へ取り込まれているのは推測通り, dCTP ではなく dTTP であることが分かった (Figure 28). その他の金属イオン存在下では, 反応は 19-mer で停止したため (Figure 27), DNA polymerase による C の相補位への dTTP の取り込み反応および T の相補位への dCTP の取り込み反応は, Ag^{I} に高い選択性があることがわかった.

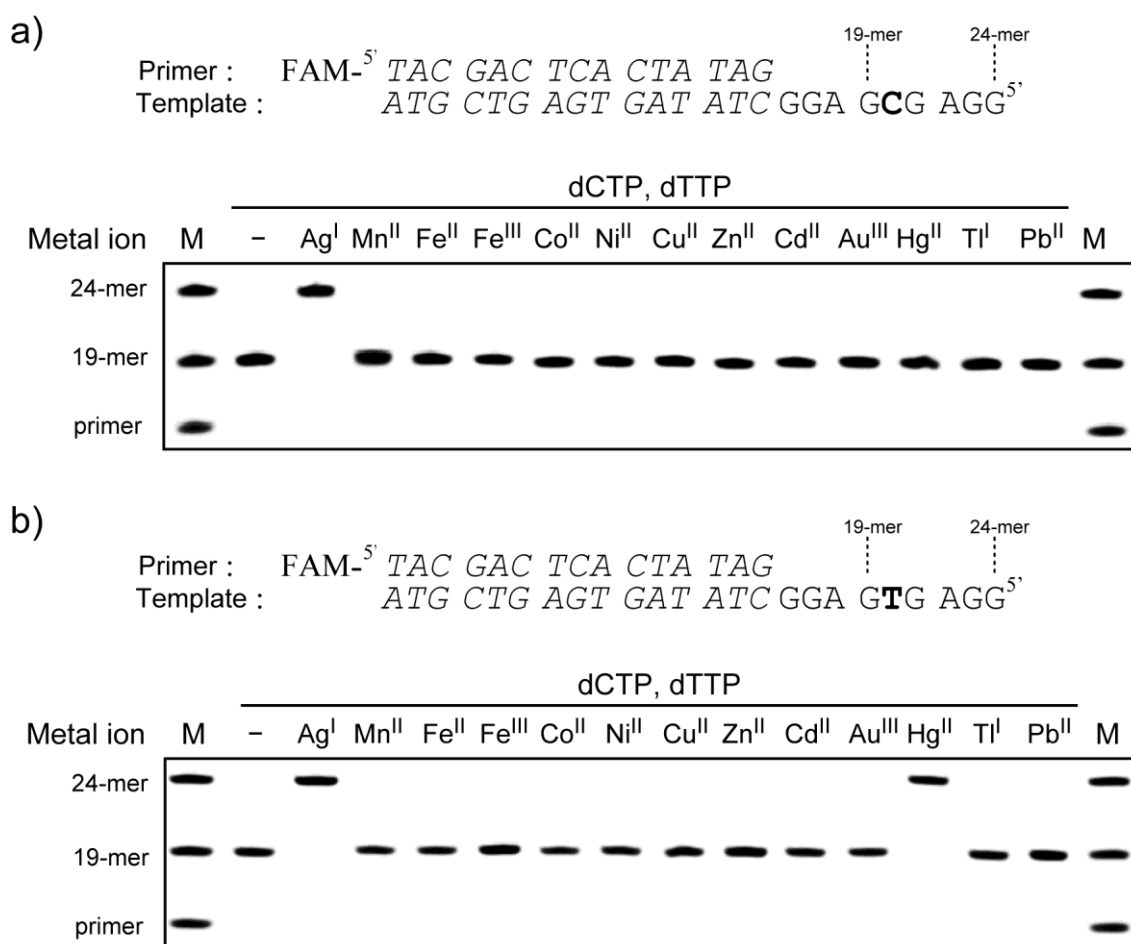


Figure 27. Primer extension reactions in the presence of various metal ions, in which dTTP or dCTP is incorporated into the site opposite a) C or b) T in the template by KF exo-. The reactions contained 20 μM dNTPs, 0.4 units KF exo- and 5 μM various metal ions. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

Primer : FAM-^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG CCT C
 Template : ATG CTG AGT GAT ATC GGA GⁿTG AGGⁿ⁺¹5'

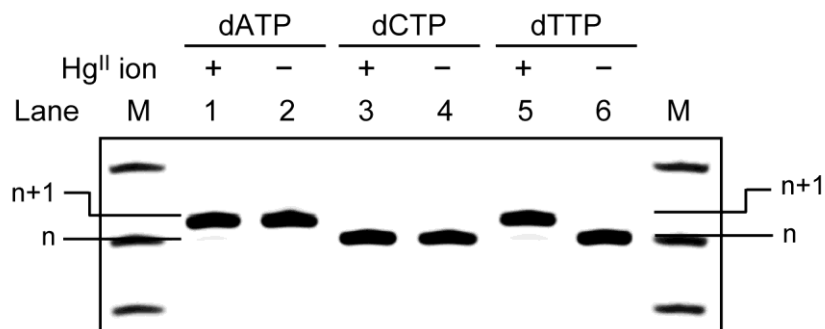


Figure 28. Single nucleotide insertions into the site opposite T in the presence or absence of Hg^{II} ions. The reactions contained 10 μM dNTPs, 0.2 units KF exo- and 5 μM Hg(ClO₄)₂. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

次に KF exo- 以外の DNA polymerase でのプライマー伸長反応を試みた。DNA polymerase として、KF exo- と同様に 3'→5' exonuclease 活性を持たない Taq polymerase を使用した (Figure 29).

伸長部分と相補的な dNTP (dGTP, dCTP, dTTP または dATP, dCTP, dTTP) 存在下では、Ag^I の有無に関係なく full-length product (24-mer) を生成し (Figure 29a, b, Lanes 1, 2), dCTP, dTTP 存在下では、Ag^I 存在下でのみ full-length product (24-mer) が生成し (Figure 29 a, b, Lanes 3), Ag^I 非存在下では、19-mer で反応は停止した (Figure 29 a, b, Lanes 4). これらの結果は、KF exo- の結果と同様であり、Ag^I 存在下における C もしくは T の相補位への dCTP または dTTP の取り込み反応は、KF exo- 非特異的であり、DNA polymerase に一般的な反応であることが示唆された。

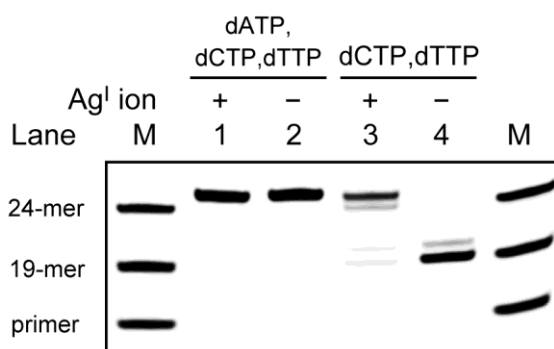
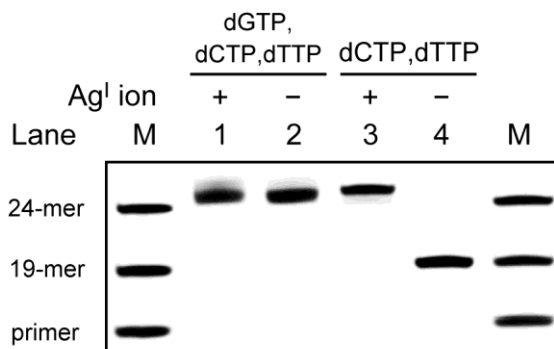


Figure 29. Primer extension reactions, in which dTTP or dCTP is incorporated into the site opposite a) C or b) T in the template by Taq polymerase. The reactions contained 80 μM dNTPs, 3.0 units Taq polymerase and 30 μM AgNO₃. M indicates markers for primer, 19-mer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

第三章 銀(I) 錯体型塩基対の特性の比較

第一章で、DNA polymerase による T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成を見出すことができた。これに続き、第二章第一節、第二節でそれぞれ C-Ag^I-A, C-Ag^I-T 錯体型塩基対が DNA polymerase による認識・形成されることが明らかとなった。しかし C-A, C-T ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA の構造やその安定性に対する Ag^I の影響は未だ詳細に知られていない。そこで本章では、C-A, C-T ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA に対する Ag^I の影響を詳細に評価し、C-C ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA に対する Ag^I の影響と比較評価した。さらに DNA polymerase による銀(I) 錯体型塩基対の形成を比較するため、鋳型鎖 C の相補位への dATP, dCTP, dTTP の取り込み反応について詳細に比較検討した。これらの検討から DNA polymerase により認識・形成される金属錯体型塩基対の条件について考察した。

第一節 銀(I) イオンが C-A, C-T ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA の熱安定性に及ぼす影響

C-A, C-T 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^I の影響を C-C ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA と比較するため、Table 4 に示した 15-mer の ODNs を設計した。中央部分にそれぞれ、C-A (A-C), C-T (T-C), C-C ミスマッチを含む二重鎖 ODNs の構造及び安定性に及ぼす Ag^I の影響を、二重鎖の融解温度 (T_m 値) と円二色性スペクトルを用いて比較した。ミスマッチ塩基対の対照として、T-A (A-T), C-G (G-C) のフルマッチ塩基対の ODNs を用いた。なお T_m 値は、温度変化測定により得られた ODN の 270 nm における吸光度の融解曲線から一次微分法で算出した。

Table 4. Sequences of ODNs.

duplex name	sequence	duplex name	sequence
C-A	5' CAT TGG ACT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC TAA CTG CGA ^{5'}	T-A	5' CAT TGG ATT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC TAA CTG CGA ^{5'}
A-C	5' CAT TGG AAT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC TCA CTG CGA ^{5'}	A-T	5' CAT TGG AAT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC TTA CTG CGA ^{5'}
C-T	5' CAT TGG ACT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC TTA CTG CGA ^{5'}	C-G	5' CAT TGG ACT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC TGA CTG CGA ^{5'}
T-C	5' CAT TGG ATT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC TCA CTG CGA ^{5'}	G-C	5' CAT TGG AGT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC TCA CTG CGA ^{5'}
C-C	5' CAT TGG ACT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC TCA CTG CGA ^{5'}		

まず初めに各 duplex の T_m 値を、二重鎖 DNA に対して 1 当量 (1 eq.) の Ag^{I} 存在下、非存在下で測定し、ミスマッチ塩基対を含む duplex に対する Ag^{I} の影響を評価した。なお各 duplex に対して 1 eq. の Ag^{I} を用いた理由としては、C-C ミスマッチ塩基対と Ag^{I} は 1:1 の割合で配位すること¹⁹⁾ が知られているためである (Table 5, Figure 30).

C-A (A-C) ミスマッチ塩基対を含む duplex は、1 eq. の Ag^{I} 存在下で、 T_m 値が顕著に上昇した (Table 5, C-A: $\Delta T_m = +6.0$ °C, A-C: $\Delta T_m = +5.4$ °C). また同じく C-T (T-C) ミスマッチ塩基対に関しても、1 eq. の Ag^{I} 存在下で、 T_m 値が顕著に上昇した (Table 5, C-T: $\Delta T_m = +6.2$ °C, T-C: $\Delta T_m = +5.3$ °C). C-A (A-C), C-T (T-C) ミスマッチ塩基対に対する Ag^{I} の安定化効果は ΔT_m 値より、同程度であることが分かった。一方で、C-C ミスマッチ塩基対に対する Ag^{I} の安定化効果は大きく、C-A, C-T よりも T_m 値は上昇した (Table 5, C-C: $\Delta T_m = +9.9$ °C). フルマッチ塩基対の duplex である T-A (A-T), C-G (G-C) の T_m 値は、1 eq. の Ag^{I} を添加することで、 Ag^{I} と ODN の間に起こる非特異的相互作用により、³⁷⁾ わずかに上昇する程度であった ($\Delta T_m \approx +1.0$ °C). 以上のことから、C-A, C-T ミスマッチ塩基対に Ag^{I} が特異的に配位し、C-C ミスマッチ塩基対と同様に、安定な C- Ag^{I} -A, C- Ag^{I} -T 錯体型塩基

対が形成されると考えられる。

Ag^{I} 非存在下での T_{m} 値を比較すると $\text{C-A} \approx \text{C-T} > \text{C-C}$ (Table 5, C-A : 45.3 °C, C-T : 45.5 °C, C-C : 42.5 °C) であった。C-C ミスマッチ塩基対は、塩基対間の水素結合が 1 本しか形成されず、また pyrimidine 塩基は隣接塩基との π - π スタッキング相互作用が弱いため、ミスマッチ塩基対の中でも不安定な塩基対である。³⁸⁾ 実際に隣接塩基の影響を加味して計算する nearest-neighbor model で算出されたミスマッチ塩基対の安定性は $\text{C-A} \geq \text{C-T} \geq \text{C-C}$ であると報告されている。³⁸⁾ 一方で、 Ag^{I} 存在下での T_{m} 値は、 C-A (A-C), C-T (T-C), C-C の全ての duplex で同程度であった (Table 5, C-A : 51.3 °C, A-C : 50.3 °C, C-T : 51.7 °C, T-C : 51.1 °C, C-C : 52.4 °C)。つまり C-C ミスマッチ塩基対の Ag^{I} 添加後の大きな T_{m} 値の上昇は、 Ag^{I} 非存在下における C-C ミスマッチ塩基対の低い熱安定性が一因と考えられる。

DNA polymerase により形成される塩基対は、 $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-A}$, $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-T}$ 錯体型塩基対であるのに対し、 Ag^{I} で最も安定化されたのは、C-C ミスマッチ塩基対 (ΔT_{m} : $\text{C-C} > \text{C-A} \approx \text{C-T}$) であった。以上の結果より、DNA polymerase による金属錯体型塩基対の形成は、必ずしも金属イオンによる高い安定化効果が要因ではないことが示唆された。

Table 5. T_m values of mismatch-containing duplexes and full-match duplexes in the presence and absence of Ag^{I} ions.^a

Duplex	T_m ($^{\circ}\text{C}$)		ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$)
	$-\text{Ag}^{\text{I}}$	$+\text{Ag}^{\text{I}}$	
C-A	45.3 ± 0.31	51.3 ± 0.64	+ 6.0
A-C	44.9 ± 0.50	50.3 ± 0.61	+ 5.4
C-T	45.5 ± 0.31	51.7 ± 0.90	+ 6.2
T-C	45.8 ± 0.35	51.1 ± 0.12	+ 5.3
C-C	42.5 ± 0.42	52.4 ± 0.00	+ 9.9
T-A	56.1 ± 0.12	57.3 ± 0.58	+ 1.2
A-T	56.0 ± 0.00	57.0 ± 0.53	+ 1.0
C-G	58.7 ± 0.50	59.8 ± 0.40	+1.1
G-C	58.8 ± 0.00	59.7 ± 0.12	+ 0.9

^aSamples contained 2 μM duplex, 100 mM NaClO_4 and 10 mM MOPS (pH 7.1) in the presence or absence of 2 μM AgNO_3 . T_m values are averages \pm SD of at least two experiments by first derivative plots.

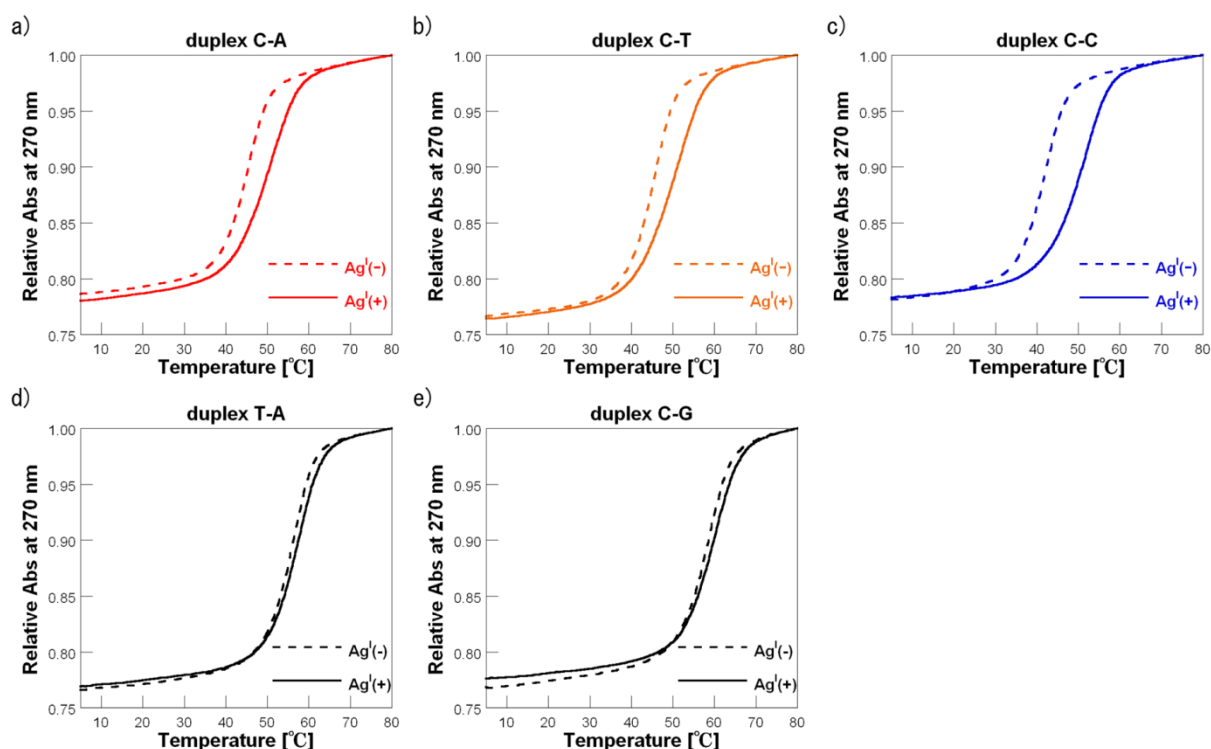


Figure 30. Melting profiles of a) C-A, b) C-T, and c) C-C mismatch-containing duplexes and d) T-A and e) C-G full-match duplexes in the presence and absence of 1 equivalent of Ag^{I} ions at 270 nm. Samples contained 2 μM duplex, 100 mM NaClO_4 and 10 mM MOPS (pH 7.1).

次に、C-A (A-C), C-T (T-C) ミスマッチ塩基対と Ag^{I} の結合比を評価した。各 duplex に対して、0~3 eq. の Ag^{I} を添加し、 T_m 値を測定した (Table 6, Figure 31)。その結果、C-A (A-C), C-T (T-C) ミスマッチ塩基対を含む duplex の T_m 値は、1eq. の Ag^{I} まで顕著に上昇した (Table 6, Figure 31a, 31b)。C-C ミスマッチ塩基対は、0.25 eq. と 0.5 eq. では、融解曲線から 2 つの微分極大が得られたため (Figure 32c)、両当量での正確な T_m 値は算出することができなかったが、0.75 eq. 以上の Ag^{I} 添加時の T_m 値は算出することができ、 T_m 値は 1 eq. の Ag^{I} まで顕著に上昇した (Table 6, Figure 31c)。C-A (A-C), C-T (T-C) ミスマッチの 1 eq. 以上の当量での T_m 値の上昇は、フルマッチ塩基対である T-A (A-T), C-G (G-C) 塩基対のわずかな T_m 値上昇と類似しているため、1 eq. 以上の Ag^{I} は、ミスマッチ塩基対に特異的に作用しているのではなく、ODNs に対して非特異的な相互作用をしていると考えられる。 Ag^{I} は、DNA のリン酸基への静電的相互作用に加え、T-A, C-G 塩基対に対して非特異的な相互作用をし、³⁷⁾ わずかながら T_m 値を上昇させたと考えられる。

次に、 Ag^{I} がミスマッチ塩基対間に配位することによる高次構造変化を評価するため、円二色性スペクトル (CD スペクトル) を測定した (Figure 33)。C-A (A-C), C-T (T-C), C-C の duplex では、1 eq. の Ag^{I} 添加時においても、 Ag^{I} 非存在下時と同様に、DNA の B 型二重らせん特有の 280 nm 付近の正のコットン効果および 260 nm 付近の負のコットン効果を確認することができた (Figure 32a-c) ことから、1 eq. までの Ag^{I} による顕著な T_m 値の上昇は、高次構造に変化をもたらさないことが明らかとなった。しかし 2 eq. の Ag^{I} 添加時では、280 nm 付近の正のコットン効果は小さくなった。この現象は、T-A (A-T), C-G (G-C) のフルマッチ塩基対の duplex では、1 eq. の Ag^{I} で確認できたことから、二重鎖 DNA に非特異的な相互作用をする Ag^{I} は、二重鎖 DNA に対して何らかの高次構造変化をもたらしていると考えられる。この高次構造の変化に伴い、わずかな T_m 値の上昇が見られたと考えられる。

C-A, C-T ミスマッチの Ag^{I} イオン当量に対する T_m 値の上昇の傾向は、1 原子の Ag^{I}

が配位すると報告されている C-C ミスマッチ^{19b,c)}と同様であったため (Table 6, Figure 31a-c), C-A, C-T ミスマッチ塩基対も C-C ミスマッチ塩基対と同様に, 1 原子の Ag^I が配位し, 安定な C-Ag^I-A, C-Ag^I-T 錯体型塩基対を形成していると考えられる.

Table 6. Melting temperatures (T_m) of fully matched and mismatch-containing duplexes in the presence of various amounts of Ag^I ion.^a

duplex	T_m (°C)						
	0 eq.	0.25 eq.	0.5 eq.	+Ag ^I			
				0.75 eq.	1 eq.	1.5 eq.	2 eq.
C-A	45.3	45.5	45.7	50.3	51.3	51.5	52.4
A-C	44.9	44.9	48.0	50.0	50.3	51.5	51.6
C-T	45.5	45.7	47.3	51.7	51.7	52.6	53.0
T-C	45.8	45.9	47.5	50.1	51.1	51.5	52.5
C-C	42.5	41.1(52.3) ^b	(40.1)51.5 ^b	51.3	52.4	51.9	52.4
T-A	58.7	-	-	-	59.8	-	60.2
A-T	58.8	-	-	-	57.3	-	57.7

^a Samples contained 2 μ M duplex, 100 mM NaClO₄, 10 mM MOPS (pH 7.1), and various amounts of Ag^I ions. T_m values were obtained from the first-derivative plots of melting curves, and values are averages of at least two measurements.^b Two maxima were observed in the first-derivative plots. The lower maximum is shown in parentheses.

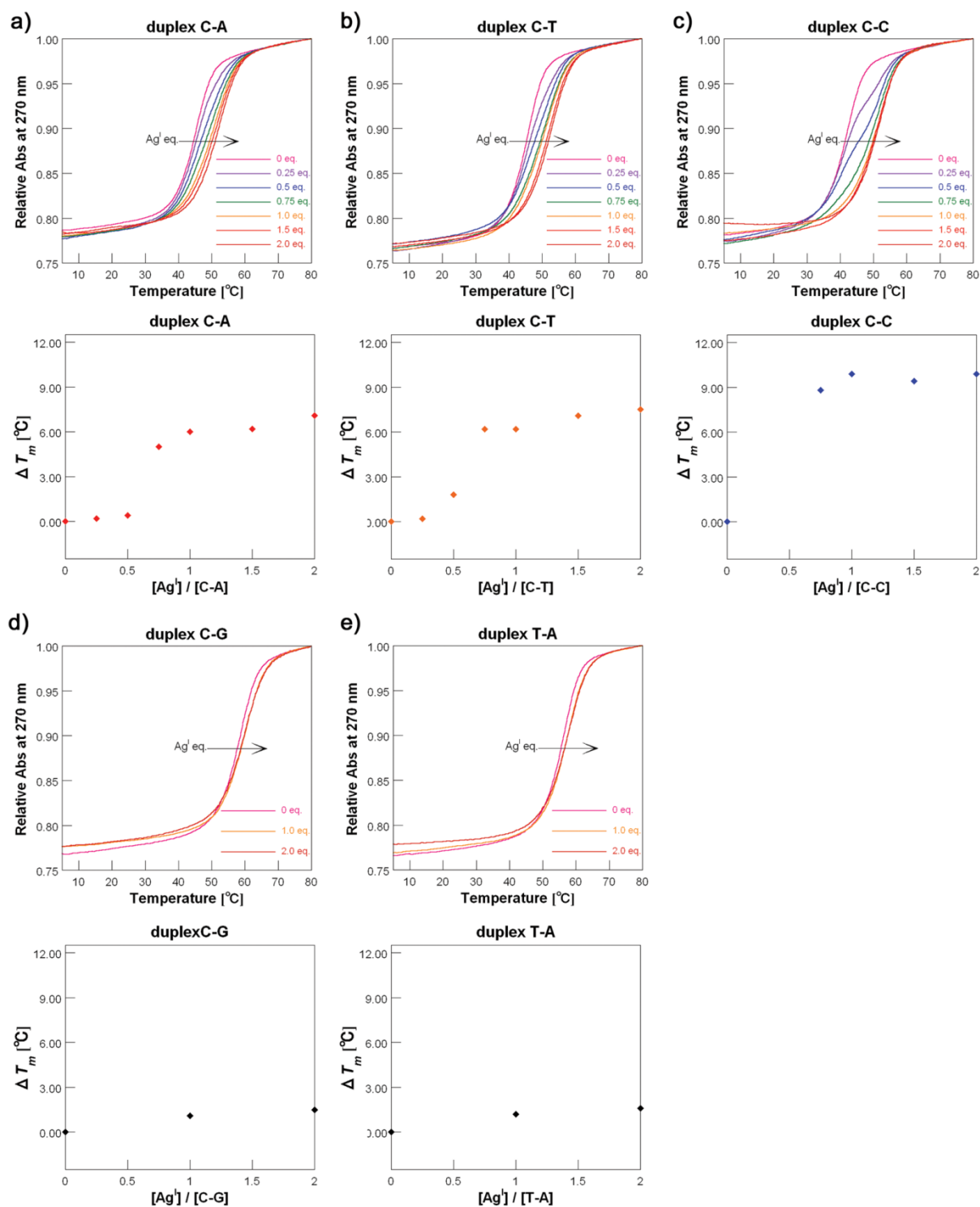


Figure 31. Melting profiles of a) C-A, b) C-T, and c) C-C mismatch-containing duplexes and d) T-A and e) C-G full-match duplexes in the presence of various equivalents of Ag⁺ ions at 270 nm. Samples contained 2 μ M duplex, 100 mM NaClO₄ and 10 mM MOPS (pH 7.1).

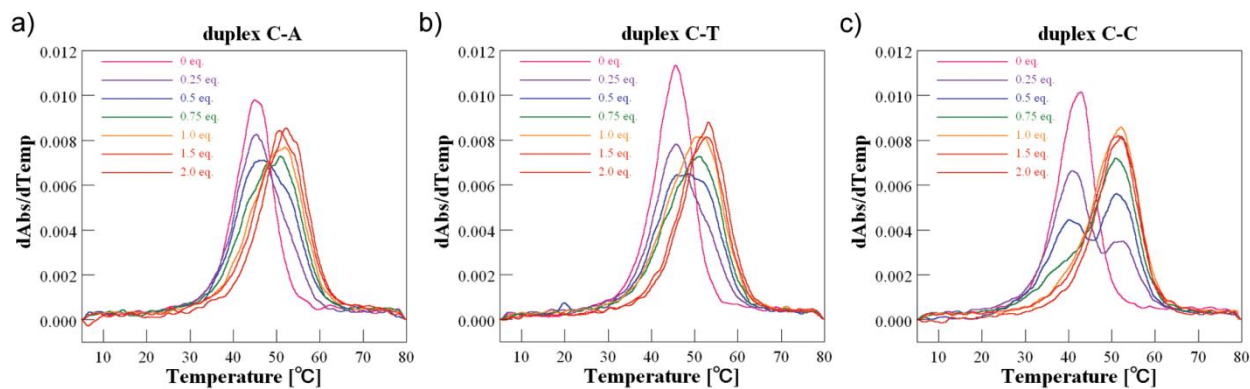


Figure 32. The first-derivative plots of the melting curves of duplex a) C-A, b) C-T and c) C-C.

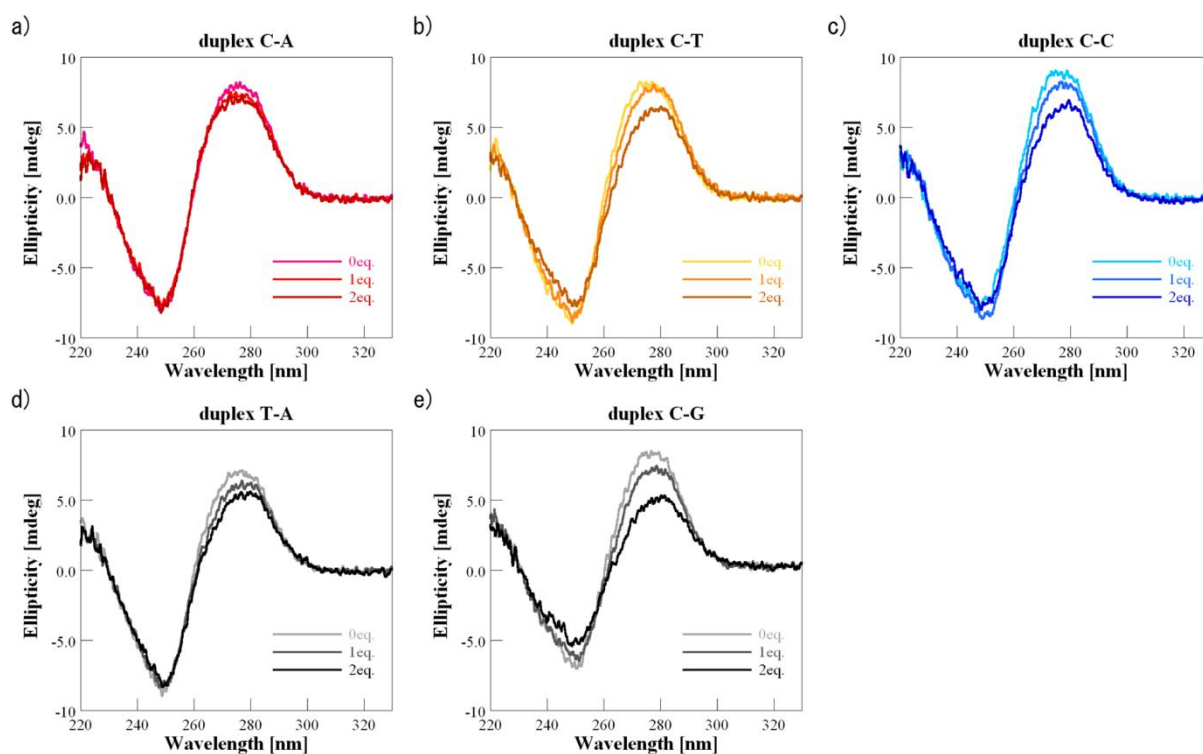


Figure 33. CD spectra of a) C-A, b) C-T, and c) C-C mismatch-containing duplexes and d) T-A and e) C-G full-match duplexes in the presence of 0, 1 or 2 equivalents of Ag^{I} ions. Samples contained $2 \mu\text{M}$ duplex, 100 mM NaClO_4 and 10 mM MOPS (pH 7.1).

次に Ag^{I} により認められた C-A, C-T ミスマッチ塩基対の安定化効果が, 他の金属イオンで見られるかを検討した (Table 7). 第二章第一節, 第二節で, DNA polymerase による C の相補位への dATP, dTTP の取り込み反応は, Ag^{I} に高い選択性があることを明らかにしたが, C-T ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA は, Hg^{II} や Cu^{II} により安定化されることが報告されている.^{20a)} そこで Mn^{II} , Fe^{II} , Fe^{III} , Co^{II} , Ni^{II} , Cu^{II} , Zn^{II} , Cd^{II} , Au^{III} , Hg^{II} , Tl^{I} , Pb^{II} が, C-A (A-C), C-T (T-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影響を T_m 値を測定することにより評価した (Table 7). なお金属イオンは, duplex に対して 1 eq. 添加した.

C-A (A-C) ミスマッチ塩基対を含む duplex は, Ag^{I} 添加時でのみ顕著な T_m 値の上昇が認められたが (Table 7, C-A: $\text{Ag}^{\text{I}} \Delta T_m = +6.0$ °C, A-C: $\text{Ag}^{\text{I}} \Delta T_m = +5.4$ °C), C-T (T-C) ミスマッチ塩基対を含む duplex は, Ag^{I} と Hg^{II} 添加時に顕著な T_m 値の上昇が認められた (Table 7, C-T: $\text{Ag}^{\text{I}} \Delta T_m = +6.2$ °C, $\text{Hg}^{\text{II}} \Delta T_m = +2.4$ °C, T-C: $\text{Ag}^{\text{I}} \Delta T_m = +5.3$ °C, $\text{Hg}^{\text{II}} \Delta T_m = +1.5$ °C). Hg^{II} の方が Ag^{I} よりも安定化させる例も報告されているが,^{20a)} ミスマッチ塩基対の隣接塩基が, 金属イオンによる T_m 値上昇に影響することも併せて報告されている.^{20a)} Cu^{II} が C-T ミスマッチ塩基対をわずかに安定化することも同じく報告もされているが,^{20a)} 隣接塩基が異なるため今回の測定では T_m 値の上昇は見られなかったと考えられる. C-T ミスマッチ塩基対間に Hg^{II} が配位した, C- Hg^{II} -T 錯体型塩基対は報告されており,²³⁾ Hg^{II} による安定化効果は, C- Hg^{II} -T 錯体型塩基対形成に起因したものであると考えられる. しかし第一章, 第二章第二節の結果, Hg^{II} 存在下では, DNA polymerase による C の相補位への dTTP の, T の相補位への dCTP の取り込みは見られず, T_m 値上昇の結果と異なる結果であった.

Table 7. Effects of metal ions on melting temperature (T_m) of duplexes C-A, A-C, C-T and T-C.^a

duplex	metal ion	T_m (°C)	ΔT_m (°C)	duplex	metal ion	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
C-A	-	45.3 ± 0.3	-	C-T	-	45.5 ± 0.3	-
	Ag ^I	51.3 ± 0.6	+6.0		Ag ^I	51.7 ± 0.9	+6.2
	Mn ^{II}	45.1 ± 0.1	-0.2		Mn ^{II}	45.8 ± 0.0	+0.3
	Fe ^{II}	45.3 ± 0.7	±0.0		Fe ^{II}	45.5 ± 0.2	±0.0
	Fe ^{III}	45.3 ± 0.3	±0.0		Fe ^{III}	45.7 ± 0.1	+0.2
	Co ^{II}	45.1 ± 0.4	-0.2		Co ^{II}	45.7 ± 0.1	+0.2
	Ni ^{II}	45.0 ± 0.8	-0.3		Ni ^{II}	45.7 ± 0.1	+0.2
	Cu ^{II}	44.9 ± 0.2	-0.4		Cu ^{II}	45.7 ± 0.3	+0.2
	Zn ^{II}	45.3 ± 0.1	±0.0		Zn ^{II}	45.7 ± 0.1	+0.2
	Cd ^{II}	45.5 ± 0.6	+0.2		Cd ^{II}	46.0 ± 0.4	+0.5
	Au ^{III}	45.1 ± 0.1	-0.2		Au ^{III}	45.6 ± 0.0	+0.1
	Hg ^{II}	44.3 ± 0.3	-1.0		Hg ^{II}	47.9 ± 0.4	+2.4
	Tl ^I	45.6 ± 0.5	+0.3		Tl ^I	45.6 ± 0.8	+0.1
Pb ^{II}	45.4 ± 0.2	+0.1	Pb ^{II}	45.3 ± 0.2	-0.2		
A-C	-	44.9 ± 0.5	-	T-C	-	45.8 ± 0.4	-
	Ag ^I	50.3 ± 0.6	+5.4		Ag ^I	51.1 ± 0.1	+5.3
	Mn ^{II}	44.9 ± 0.2	±0.0		Mn ^{II}	46.0 ± 0.5	+0.2
	Fe ^{II}	44.8 ± 0.4	-0.1		Fe ^{II}	45.9 ± 0.4	+0.1
	Fe ^{III}	45.3 ± 0.5	+0.4		Fe ^{III}	45.9 ± 0.4	+0.1
	Co ^{II}	45.3 ± 0.1	+0.4		Co ^{II}	45.6 ± 0.2	-0.2
	Ni ^{II}	45.4 ± 0.2	+0.5		Ni ^{II}	46.1 ± 0.2	+0.3
	Cu ^{II}	45.0 ± 0.4	+0.1		Cu ^{II}	46.1 ± 0.3	+0.3
	Zn ^{II}	45.6 ± 0.4	+0.7		Zn ^{II}	46.1 ± 0.5	+0.3
	Cd ^{II}	45.1 ± 0.1	+0.2		Cd ^{II}	45.7 ± 0.1	-0.1
	Au ^{III}	45.3 ± 0.3	+0.4		Au ^{III}	45.9 ± 0.3	+0.1
	Hg ^{II}	45.0 ± 0.4	+0.1		Hg ^{II}	47.3 ± 0.2	+1.5
	Tl ^I	44.9 ± 0.2	±0.0		Tl ^I	46.3 ± 0.3	+0.5
Pb ^{II}	45.3 ± 0.2	+0.4	Pb ^{II}	46.2 ± 0.4	+0.4		

^a Samples contained 2 μ M duplex, 100 mM NaClO₄, 10 mM MOPS (pH 7.1) in the presence or absence of 1 equivalent of Ag^I ions (2 μ M). T_m values were obtained from the first-derivative plots of melting curves and values are averages \pm SD of at least two measurements.

第二節 二重鎖 DNA の末端に位置するミスマッチ塩基対に対する金属イオンの影響

前節で C-A, C-T, C-C ミスマッチ塩基対に対する Ag^{I} の影響を比較評価した。その結果、金属イオンによるミスマッチ塩基対の安定化と DNA polymerase による認識・形成の間には相関性はないことがわかった。しかし、前節の実験で使用した二重鎖 DNA のミスマッチ塩基対の位置は、中央部分であった。DNA polymerase による塩基対形成部位は、プライマー鎖の 3' 末端であるため、DNA polymerase による金属錯体型塩基対の形成を正しく評価したとは言い難い。しかし二重鎖 DNA の末端に位置する金属錯体型塩基対を報告した例は少なく、³⁹⁾ T- Hg^{II} -T, C- Ag^{I} -C 錯体型塩基対が二重鎖 DNA の末端に位置する場合の報告はこれまでない。そこで、本節では二重鎖 DNA の末端に位置するミスマッチ塩基対に対する金属イオンの影響を評価した。Table 8 に示した末端にミスマッチ塩基対を含む二重鎖 ODNs と対照として内部にミスマッチ塩基対を含む二重鎖 ODNs を使用し、C-A, C-T, C-C ミスマッチ塩基対に対する Ag^{I} の影響及び T-T ミスマッチ塩基対に対する Hg^{II} の影響を評価した (Table 9, 10)。

Table 8. Sequences of ODNs.

duplex name	sequence	duplex name	sequence
Terminal T-X	5' TAA TCT GCG ^{3'}	Internal T-X	5' AAA TCT GCG ^{3'}
	3' XTT AGA CGC ^{5'}		3' TTT XGA CGC ^{5'}
Terminal C-X	5' CAA TCT GCG ^{3'}	Internal C-X	5' AAA TCT GCG ^{3'}
	3' XTT AGA CGC ^{5'}		3' TTT AXA CGC ^{5'}

X = A, G, C, T

内部に T-T, T-C ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA の熱安定性は、 Hg^{II} により大き

く向上した (Table 9). また内部に C-A, C-T, C-C ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA の熱安定性も同様に Ag^{I} により安定化された (Table 9). これらの結果は, それぞれのミスマッチ塩基対に Hg^{II} もしくは Ag^{I} が配位することにより, 安定な T- Hg^{II} -T,¹⁸⁾ C- Hg^{II} -T,²³⁾ C- Ag^{I} -A, C- Ag^{I} -T,²¹⁾ C- Ag^{I} -C¹⁹⁾ 錯体型塩基対が形成されたことに起因しており, それぞれ既に報告されている結果及び第三章第一節の結果の再現性が得られた (Table 9).

二重鎖 DNA の内部に位置するミスマッチと比較して, 末端に位置する塩基対は, 強固な塩基対は形成せず, “Fraying” と呼ばれる柔軟な構造を取っている.⁴⁰⁾ そのため, 末端のミスマッチ塩基対は, 内部に位置するミスマッチ塩基対と比べ二重鎖 DNA の不安定化は極めて小さいことを浦田らは報告しており, 同時に末端に位置する塩基も相補鎖の塩基を識別していることを見出している.⁴¹⁾ 末端にミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA の熱安定性は, 金属イオン非存在下では, 対応するフルマッチ塩基対の T_m 値とほとんど差がなく, 浦田らの報告の再現性を確認することができた (Table 10). 末端に T-T ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA に 1 eq. の Hg^{II} を添加することで, T_m 値の上昇が認められただけでなく, 驚くべきことにフルマッチ塩基対 (T-A) の T_m 値を大きく上回った (Table 10, T-A Hg^{II} (+): $T_m = 37.5$ °C, T-T Hg^{II} (+): $T_m = 44.3$ °C). これは末端の柔軟な “Fraying” 構造が, Hg^{II} により固定され強固な T- Hg^{II} -T 錯体型塩基対を形成したためと考えられる. 実際に, 末端に金属錯体型塩基対を配置することで, 二重鎖 DNA に大きな安定性を付与させる例が報告されている.³⁹⁾ しかし, 末端に C-X ミスマッチ塩基対 (C-A, C-C, C-T) を含む二重鎖 DNA は, Ag^{I} を添加しても安定化されず Ag^{I} 非存在下の T_m 値とほとんど変わらなかった (Table 10, C-A: $\Delta T_m = +0.8$ °C, C-C: $\Delta T_m = -1.1$ °C, C-T: $\Delta T_m = -0.2$ °C). つまり末端に位置する C-X ミスマッチ塩基対 (C-A, C-C, C-T) は, Ag^{I} を強く補足することができず, 安定な Ag^{I} 錯体型塩基対を形成しにくいのではないかと考えられる. しかし, 3' 末端に配置した C-C ミスマッチ塩基対を含む二重鎖 DNA は, Ag^{I} 添加時にのみ DNA ligase の基質となり, 酵素反応が開始されることが報告⁴¹⁾ されている. これらの報告を加味すると,

末端の C-C ミスマッチ塩基対は, Ag^{I} が配位するが, T_m 値の上昇に寄与するほど, Ag^{I} と強固に結合していないことが示唆される. $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$, $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-A}$, $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-T}$ 錯体型塩基対は, プライマー伸長反応において, DNA polymerase により形成・認識される金属錯体型塩基対であることを前章までに見出してきたが, 末端に位置する C-A, C-T ミスマッチ塩基対は, Ag^{I} により安定化されなかつた. 前節と同様に, DNA polymerase による金属錯体型塩基対の形成と, 金属イオンによる熱安定化効果に相関性はないことが示唆された.

Table 9. T_m values of duplexes containing a mismatched base pair at the internal site in the presence and absence of one equivalent metal ions.

sequences	T-X	Hg^{II} (1 eq.)	T_m (°C)	ΔT_m (°C)	
$5' \text{AAA TCT GCG} 3'$ $3' \text{TTT XGA CGC} 5'$	T-A	(-)	37.2 ± 0.28	—	
		(+)	37.9 ± 0.71	+0.7	
	T-G	(-)	25.3 ± 0.61	—	
		(+)	33.9 ± 0.90	+8.6	
	T-C	(-)	15.7 ± 0.23	—	
		(+)	34.1 ± 0.76	+18.3	
	T-T	(-)	19.1 ± 0.42	—	
		(+)	46.2 ± 0.40	+27.1	
	sequences	C-X	Ag^{I} (1 eq.)	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
	$5' \text{AAA TCT GCG} 3'$ $3' \text{TTT AXA CGC} 5'$	C-A	(-)	8.0 ± 0.00	—
(+)			13.5 ± 0.42	+5.5	
C-G		(-)	37.2 ± 0.28	—	
		(+)	37.7 ± 1.03	+0.5	
C-C		(-)	7.3 ± 0.12	—	
		(+)	18.4 ± 0.40	+11.1	
C-T		(-)	14.5 ± 0.14	—	
		(+)	22.0 ± 0.85	+7.5	

Samples contained 5 μM duplex, 1 M NaClO_4 , 10 mM MOPS (pH7.1) and one equivalent metal ions. T_m values are averages \pm SD of at least two experiments from the first-derivative plots.

Table 10. T_m values of duplexes containing a mismatched base pair at the terminal site in the presence and absence of one equivalent metal ions.

sequences	T-X	Hg ^{II} (1 eq.)	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
5' TAA TCT GCG 3' 3' XTT AGA CGC 5'	T-A	(-)	37.3 ± 0.42	—
		(+)	37.5 ± 0.42	+0.2
	T-G	(-)	36.7 ± 0.42	—
		(+)	36.8 ± 0.57	+0.1
	T-C	(-)	35.4 ± 0.28	—
		(+)	36.2 ± 0.35	+0.8
	T-T	(-)	37.2 ± 0.28	—
		(+)	44.3 ± 0.71	+7.1
sequences	C-X	Ag ^I (1 eq.)	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
5' CAA TCT GCG 3' 3' XTT AGA CGC 5'	C-A	(-)	34.7 ± 0.14	—
		(+)	35.5 ± 0.12	+0.8
	C-G	(-)	35.1 ± 0.23	—
		(+)	35.3 ± 0.57	+0.2
	C-C	(-)	35.9 ± 0.50	—
		(+)	34.8 ± 0.53	-1.1
	C-T	(-)	35.7 ± 0.23	—
		(+)	35.5 ± 0.12	-0.2

Samples contained 5 μ M duplex, 1 M NaClO₄, 10 mM MOPS (pH7.1), and one equivalent metal ions. T_m values are averages \pm SD of at least two experiments from the first-derivative plots.

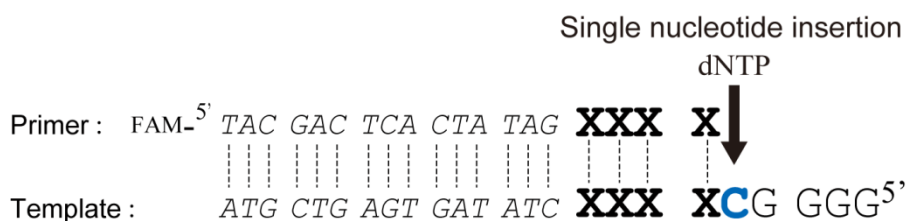
第三節 DNA polymerase による C の相補位への dNTP の取り込み反応

第二章より DNA polymerase は, Ag^{I} 存在下, C の相補位へ dATP 及び dTTP を取り込むことが明らかとなったが, 他の template-primer においても同様の傾向が認められるか, 特に dCTP が取り込まれにくい点に関しては, 検討していなかった. 本節では, Ag^{I} 存在下における C の相補位への dNTP の取り込み反応について, 塩基配列の異なる幾つかの template-primer を用いて dATP, dTTP 及び dCTP の取り込まれ易さの一般性を検証した. また, 第三章第一節, 第二節で得られた結果と合わせ, DNA polymerase による金属錯体型塩基対の形成要因を考察した.

DNA polymerase は, 取り込み位置である primer 鎖の 3' 末端から上流数塩基に対して, 相互作用をし, dNTP の取り込み反応を行っていることが知られているため, ⁴²⁾ 取り込み部位である C の上流 4 塩基を様々な配列へと変更した ODNs を使用し (Table 11), Scheme 7 に示した C の相補位への dNTP の一塩基伸長反応を行った (Figure 34). 取り込み部位の下流の影響を統一するため, 全ての配列の下流は G で統一し, 3'→5' exonuclease 活性による primer 鎖および伸長産物の分解を防ぐため, KF exo- を使用した. 反応条件は, 第二章を参考にし, 10 μM dNTP, 0.2 Units KF exo-, 10 μM AgNO_3 で行った (Figure 34b). また C の相補位への dCTP の取り込みを詳細に検討する目的で, より強い反応条件での一塩基伸長反応も併せて行った (Figure 34c, 30 μM dNTP, 0.6 Units KFexo-, 10 μM AgNO_3). 前者の活性を低活性条件とし, 後者の活性を高活性条件として, 両活性条件における dNTP の取り込みを比較した.

Table 11. Sequences of ODNs.

sequence name	Sequence
Duplex-1	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG ATA G ^{3'} ^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC TAT CCG GGG ^{5'}
Duplex-2	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG TTT T ^{3'} ^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC AAA ACG GGG ^{5'}
Duplex-3	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG AAT A ^{3'} ^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC TTA TCG GGG ^{5'}
Duplex-4	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG GCT A ^{3'} ^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CGA TCG GGG ^{5'}

**Scheme 7.** Schematic description of single nucleotide insertions into the site opposite C.

まず, 低活性条件 (10 μ M dNTP, 0.2 Units KF exo-, 10 μ M AgNO₃) における C の相補位への dNTP の取り込み反応を比較した結果, C の相補位への dGTP の取り込みは, 全ての配列で起こり, duplex-1, 3, 4 では, C の直後の G の相補位へも dGTP は取り込まれ, n+2 の伸長産物を与えた (Figure 34b, Lanes 3, 4, duplex-1~4). C の相補位への dATP, dTTP の取り込みは, Ag^I 存在下でのみ起こり, 第二章の結果の再現性を確認した (Figure 34b, Lanes 1, 2, 7, 8, duplex-1~4). これら C の相補位への dATP および dTTP の取り込み収率を, 得られた一塩基伸長産物の蛍光強度より算出し, 各 duplex で比較すると, duplex-3 > duplex-4 \geq duplex-1 > duplex-2 であり (Figure 34b, Lanes 1, 2, 7, 8, duplex-1~4), 明らかに C の上流 4 塩基の配列によって, dNTP の取り込み収率が異なった. つまり C の相補位への dNTP の

取り込み反応は、取り込み部位の上流塩基の配列に依存することが明らかとなった。dATP と dTTP の取り込み収率を比較すると、全ての配列において dATP > dTTP であった。しかし、C の相補位へ dCTP の取り込みは全ての duplex において見られなかった (Figure 34b, Lanes 5, 6, duplex-1~4)。そこで、反応活性を高くした高活性条件で検討した結果、duplex-1,4 では、Ag^I 存在下において C の相補位へ dCTP が取り込まれ、下流の 4 連続した G にも dCTP は取り込まれ、full-length product (n+5) が生成した (Figure 34c, Lanes 5, duplex-1,4)。MALDI-TOF MS によっても C の相補位への dCTP の取り込みが確認された (Figure 35, observed mass: 7752.7, calculated mass (M-H)⁻: 7753.2)。この結果から、Ag^I 存在下における C の相補位へ dCTP は取り込まれないのではなく、dATP や dTTP に比べ、非常に取り込まれにくいということが明らかとなった。また、C の相補位への dCTP の取り込み収率においても、配列依存性が見られ、その順序は duplex-4 > duplex-1 >> duplex-2 ≈ duplex-3 であった。高活性条件では、dGTP は C に続いて G の相補位へも容易に取り込まれ、全ての配列において、n+2 の生成物が得られた (Figure 34c, Lanes 3, 4, duplex-1~4)。また、dATP は、Ag^I 非存在下であっても C の相補位へ取り込まれた (Figure 34c, Lanes 1, 2, duplex-1~4)。dTTP は、Ag^I 存在下でのみ C の相補位へ取り込まれ、低活性条件 (Figure 34b) よりも取り込まれ易い結果となった (Figure 34c, Lanes 7, duplex-1~4)。これらの結果は、一般に DNA polymerase は、purine-purine もしくは purine-pyrimidine ミスマッチは形成しやすいが、pyrimidine-pyrimidine ミスマッチ塩基対は形成しにくいことと一致した。^{43,44)}

以上の結果より、DNA polymerase による Ag^I 存在下における C の相補位への dNTP の取り込み反応の反応性は template-primer の上流配列に依存するものの、Ag^I 錯体型塩基対形成の選択性は template-primer の上流配列に依存せず、C-Ag^I-A > C-Ag^I-T >> C-Ag^I-C となる一般性を確認することができた。

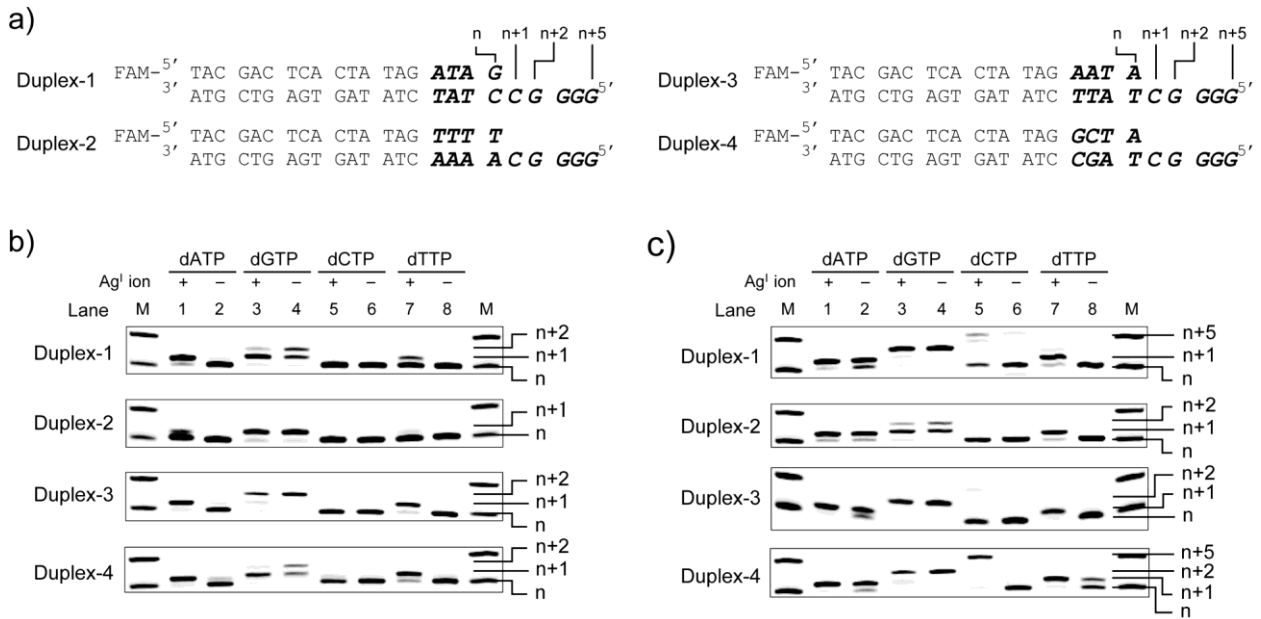


Figure 34. PAGE analysis of single-nucleotide insertions into the sites opposite C in the template strands catalyzed by KF *exo-*. a) Sequences of template-primer complexes. b) The reaction mixtures contained 10 μM dNTP and 0.2 unit of KF *exo-* in the presence or absence of 10 μM AgNO_3 . c) The reaction mixtures contained 30 μM dNTP and 0.6 unit of KF *exo-* in the presence or absence of 10 μM AgNO_3 . M indicates markers for primer and 24-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

a)



b)



	Calculated mass (M-H) ⁻
Full-length product (n+5, 24-mer)	7753.2
Primer (19-mer)	6307.3
Template (24-mer)	7447.9

c)

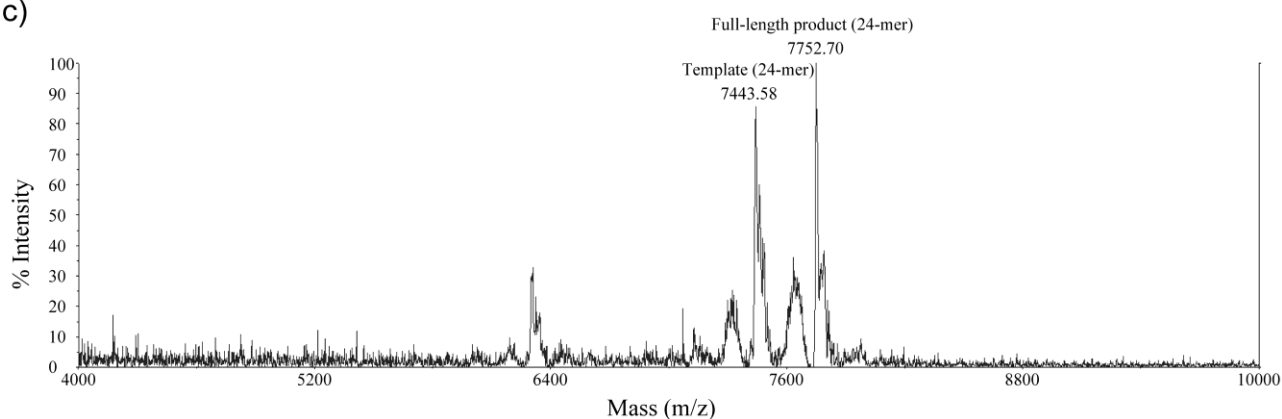


Figure 35. a) Sequences of the template and primer strands. b) Sequences of the extension product and calculated mass of each oligomers. c) MALDI-TOF mass spectrum of extension products obtained by the incorporation of dCTP into the site opposite C in the presence of Ag^I ions by KF exo-. Primer extension reactions in the presence or absence of Ag^I ions by KF exo-. The reactions contained 1.4 μM Template, 1.4 μM primer, 500 μM dNTPs, 1.0 units KF exo- and 50 μM AgNO₃. Other experimental details are described in the experimental section.

第三章の結果より, DNA polymerase により形成される金属錯体型塩基対について考察した.

ここまでに得られた結果を整理すると, 第三章第一節より, C-A, C-T, C-C ミスマッチを含む二重鎖 DNA の Ag^{I} 非存在下の熱安定性 (T_m 値) は, $\text{C-A} \approx \text{C-T} > \text{C-C}$ であったが, Ag^{I} 存在下では, $\text{C-C} > \text{C-A} \approx \text{C-T}$ の順であることから, Ag^{I} 錯体型塩基対の安定性は $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-C} > \text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-A} \approx \text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-T}$ の順であることが明らかとなった. 一方で, 第三章第三節の結果より, DNA polymerase による Ag^{I} 錯体型塩基対の形成し易さは, $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-A} > \text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-T} \gg \text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$ の順であることが明らかとなり, Ag^{I} 錯体型塩基対を含む二重鎖 DNA の熱安定性の結果と相関しないことが明らかになった. また, 第一章及び第二章第二節の結果より, DNA polymerase による Hg^{II} 錯体型塩基対の形成し易さは, $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T} \gg \text{C-Hg}^{\text{II}}\text{-T}, \text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-C}$ であった.

DNA polymerase は活性部位で, Watson-Crick 型塩基対や人工塩基対をその形状や大きさに認識しており, 塩基対の水素結合の有無や熱安定性は DNA polymerase の基質認識能に対して大きな影響を与えていないとする説が提唱されている.⁴⁵⁾ 筆者は, DNA polymerase による 3 種類の Ag^{I} 錯体型塩基対 ($\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-A}$, $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-T}$ 及び $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$) の形成の選択性を考察する上で, これら Ag^{I} 錯体型塩基対が持つ正味電荷に注目した. DNA polymerase で認識・形成されやすい $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-T}$ 錯体型塩基対は, T 残基から 1 つの H^+ が放出され, Ag^{I} が配位し正味電荷が ± 0 であると推測している (Figure 2).²¹⁾ 一方で, DNA polymerase に形成されにくい $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$ は H^+ が放出されることなく Ag^{I} が配位することから,¹⁹⁾ $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$ 錯体型塩基対の正味電荷は $+1$ である. この電荷が polymerase 活性部位で静電的反発等の影響を及ぼし, DNA polymerase は $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$ 錯体型塩基対を形成しにくいのではないかと考えられる. この仮説によって, 正味電荷が ± 0 の $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ 錯体型塩基対は, DNA polymerase により形成されやすいのに対して, 正味電荷が $+1$ の $\text{C-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ や $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-C}$ は形成されにくいことも説明できる (Figure 27, Figure 28). $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-A}$ 錯体型塩基対に関しては,

その配位様式が明らかとなっていないが、C-Ag^I-A (*syn*) 型であっても C-Ag^I-A (*anti*) 型 (Figure 20) であっても正味電荷は +1 と推測される (第二章第一節第三項). しかし, Ag^I 存在下における C の相補位への dATP の取り込みは dTTP や dCTP よりも起こり易い. その理由として, DNA polymerase は abasic site と呼ばれる塩基脱落部位などの塩基損傷部位では, その相補位に dATP を優先的に取り込む “A-rule” と呼ばれる特性を持つ. ⁴⁶⁾ そのため, Ag^I 存在下での C の相補位への dNTP の取り込みに対しても dATP に高い選択性を示したものと考えられる.

しかし, Ag^I 非存在下でのミスマッチ塩基対の熱安定性の観点から以下の可能性も否定できない. Ag^I 非存在下における C-A, C-T, C-C ミスマッチ塩基対の熱安定性は, C-A ≈ C-T > C-C であり, Ag^I 存在下における C の相補位へ取り込まれ易い dNTP の順 (dATP > dTTP >> dCTP) と一致している. また, 第三章第二節より T-T, C-T ミスマッチ塩基対の熱安定性は, T-T > C-T であり (Table 9), 第二章第二節の Hg^{II} 存在下において T の相補位へ dCTP よりも dTTP の方が取り込まれ易いことと一致している (Figure 27, Figure 28). これらのことから, DNA polymerase による Ag^I 錯体型塩基対の形成に対して重要な要因は, Ag^I 錯体型塩基対の熱安定性よりも, Ag^I が配位する前のミスマッチ塩基対の安定性であると考えられることもできる.

以上の考察から, DNA polymerase による C の相補位への dNTP の取り込みは, Ag^I 非存在下での塩基対の安定性が重要な因子である可能性も否定できないものの, Ag^I 錯体型塩基対が持つ正味電荷や A-rule が重要な因子であり, Ag^I 錯体型塩基対の熱安定性は重要な要因ではないと考えられ, C の相補位への dNTP の取り込まれ易さは, dATP > dTTP >> dCTP の順となっているのではないかと考えられる.

第四章 DNA ナノマテリアルへの応用に向けた DNA polymerase による金属錯体型塩基対の形成

第一章で $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ 錯体型塩基対が，第二章で $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-A}$ 錯体型塩基対， $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-T}$ 錯体型塩基対が，DNA polymerase により認識・形成されることが明らかとなった．これら DNA polymerase による金属錯体型塩基対の形成を DNA ナノマテリアルへの応用に向けた $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ 錯体型塩基対の連続形成と，同一配列中での $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-T}$ 錯体型塩基対と $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ 錯体型塩基対の形成について検討を行った．

第一節 水銀(II) ナノワイヤーの酵素合成に向けた DNA polymerase による水銀(II) 錯体型 T-T 塩基対の連続形成

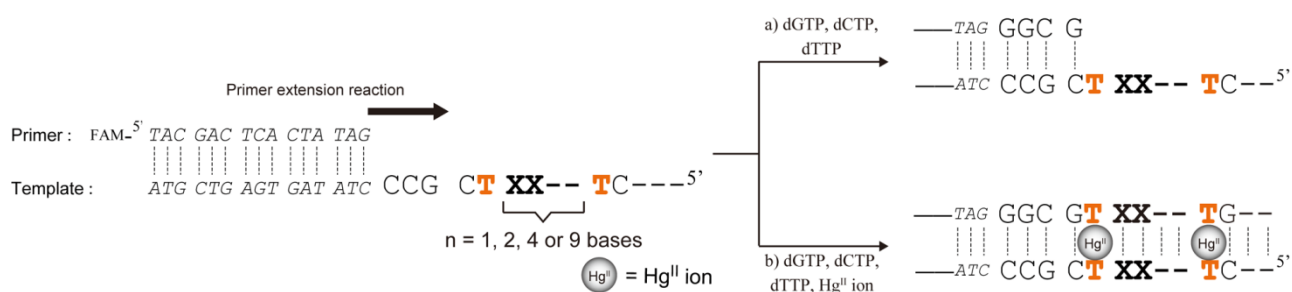
第一項 DNA polymerase による水銀(II) 錯体型 T-T 塩基対の連続形成

近年， Ag^{I} が二重鎖 DNA の塩基対間に連続で配位した Ag^{I} ナノワイヤーが報告され，^{14b)} 金属錯体型塩基対を利用した金属ナノワイヤーが注目されている．そこで金属ナノワイヤーの酵素合成を目指し，DNA polymerase による連続した金属錯体型塩基対の形成の検討を行った．金属錯体型塩基対としては第一章で DNA polymerase による認識・形成が確認された $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ 錯体型塩基対の連続形成について検討した．

連続形成を検討する前に，まず同一配列中に $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ 錯体型塩基対を 2 箇所形成することが可能であるかを検討した．Table 12 に示した primer と template を用いて，Scheme 8 に示した反応を行った (Figure 36)．Template 5~8 は，2 つの T 残基が，2, 3, 5, 10 塩基離れるように設計した．また反応には， $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ 錯体型塩基対の形成が確認できている KF を用いた．

Table12. Sequences of ODNs.

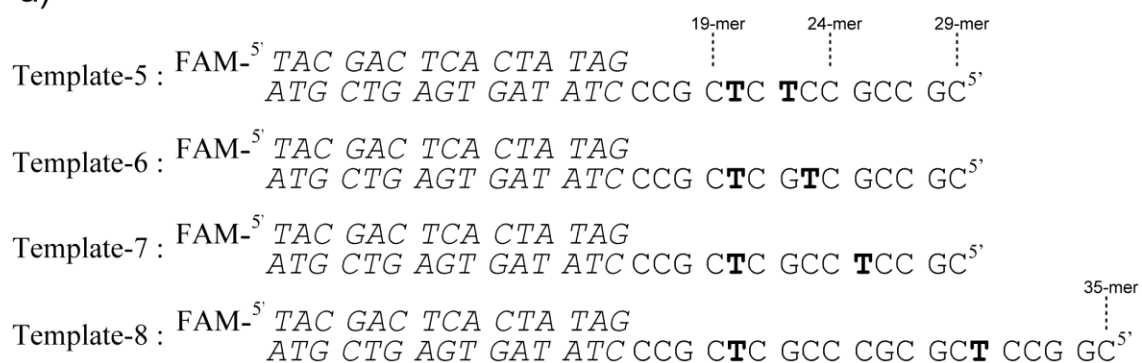
sequence name	Sequence
Primer	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG ^{3'}
Template-5	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG C T C T CC GCC GC ^{5'}
Template-6	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG C T C G T C GCC GC ^{5'}
Template-7	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG C T C GCC T CC GC ^{5'}
Template-8	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG C T C GCC CGC GC T CCG GC ^{5'}



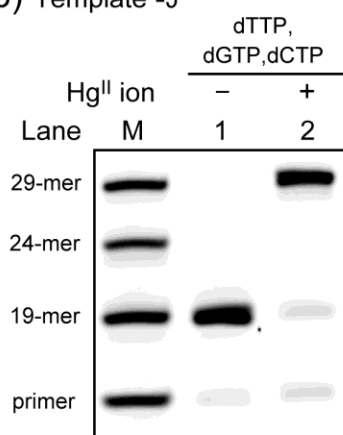
Scheme 8. Schematic description of primer extension reactions on templates containing two T residues.

Template-5~8 のいずれの Template においても, Hg^{II} 非存在下では 1 つ目の T の手前 19-mer の位置で反応が停止したのに対して, Hg^{II} 存在下では, full-length product の生成が確認できた (Figure 36). つまり KF は, 同一配列中に 2 つの T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対を形成することが可能であり, 2 つの T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成部位の間には 1 塩基が入れば, KF による 2 つの T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対は, 形成可能であることが明らかとなった.

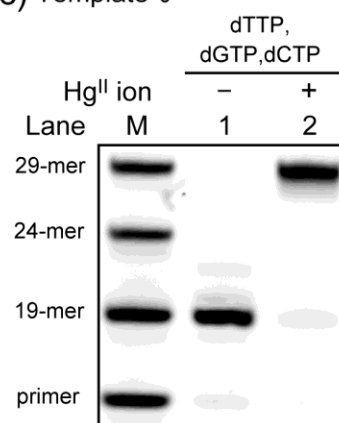
a)



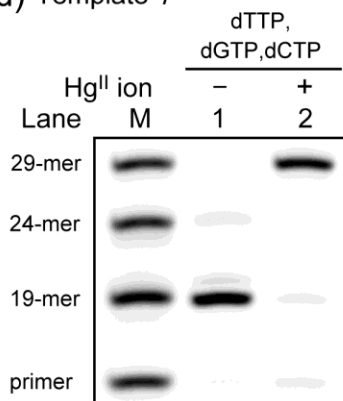
b) Template -5



c) Template-6



d) Template-7



e) Template-8

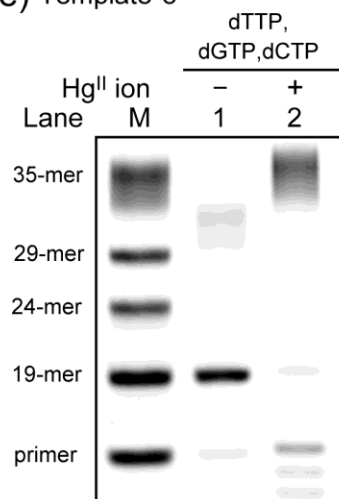
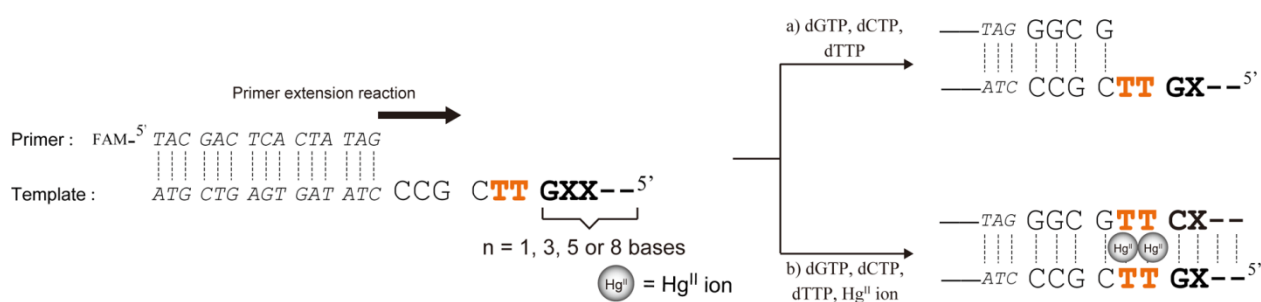


Figure 36. Hg^{II}-promoted primer extension reactions on the primed templates containing two T residues shown in a) by KF. The reactions contained 10 µM dNTPs, 0.2units KF and 30 µM Hg(ClO₄)₂. M indicates markers for primer, 19-mer, 24-mer, 29-mer and 35-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

上記結果より、2 つの T 残基の間が 2 塩基離れていれば、2 つの T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対は同一配列に形成されることが明らかとなったため、次に鋳型鎖の T 残基が 2 連続した場合、T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対は 2 連続で形成されるかの検討を行うこととした。使用した template は Table 13 に示した。第三章第三節より、金属錯体型塩基対形成は、塩基対形成部位の上流塩基配列に依存することが明らかとなっていたため、上流塩基配列は固定し、2 連続した T 残基以降の下流の塩基数を変更し、プライマー伸長反応への影響を確認した (Table 13, Template-9~12)。これら塩基対を使用し、Scheme 9 に示した反応を行った (Figure 39)。

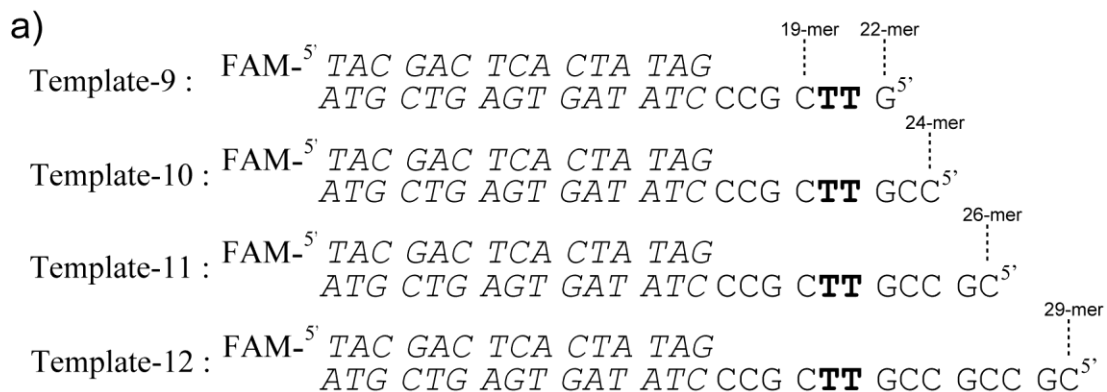
Table13. Sequences of ODNs.

sequence name	Sequence
Primer	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG ^{3'}
Template-10	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG CTT G ^{5'}
Template-11	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG CTT GCC ^{5'}
Template-12	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG CTT GCC GC ^{5'}
Template-13	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG CTT GCC GCC GC ^{5'}

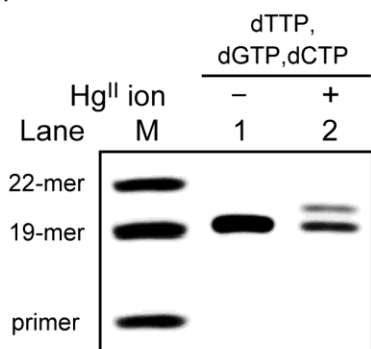


Scheme 9. Schematic description of primer extension reactions on templates containing the two consecutive T residues.

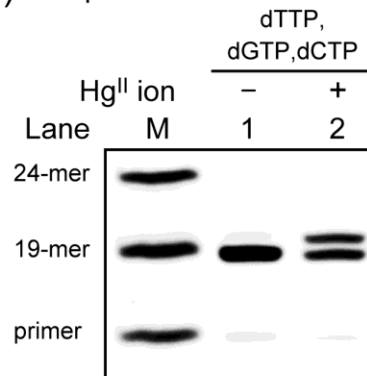
全ての template において, Hg^{II} 非存在下では, 反応は連続した T 残基の手前 19-mer で停止したのに対し (Figure 37b-d, Lanes 1), Hg^{II} 存在下では, Template-9, 10 では 19-mer, 20-mer で反応が停止したのに対し (Figure 37b, c, Lanes 2), Template-11, 12 では, full-length product (26mer, 29-mer) が生成した (Figure 37d, e, Lanes 2). MALDI-TOF MS の解析の結果, 2 つの連続した T の相補位に dTTP が 2 連続で取り込まれていることが確認できた (Figure 38c, observed mass: 9471.2, calculated mass (M-H)⁻: 9470.3). 以上の結果より, KF は, Hg^{II} 存在下において, 2 連続 T- Hg^{II} -T 錯体型塩基対を形成可能であることが明らかとなった. Hg^{II} 存在下での, Template-9, 10, 11, 12 の full-length product の生成率を比較すると, Template-12 が最も高かった. つまり 2 連続した T 残基に Hg^{II} を介した dTTP の取り込み反応は, T 残基の下流の塩基数が, 反応の進行に影響し, その鎖長が一定程度長いほど反応が進行しやすいことがわかった.



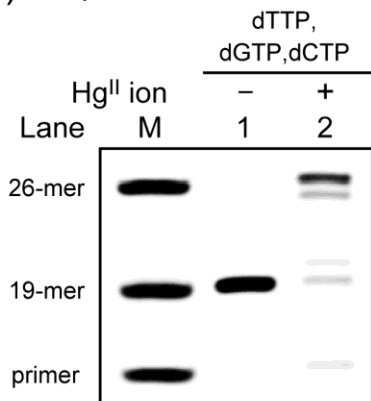
b) Template-9



c) Template-10



d) Template-11



e) Template-12

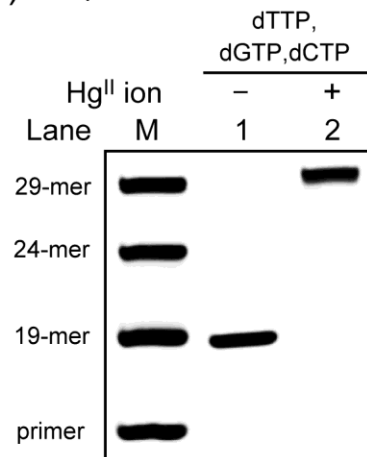


Figure 37. Hg^{II}-promoted primer extension reactions on the primed templates containing two consecutive T residues shown in a) by KF. The reactions contained 10 μM dNTPs, 0.2units KF and 30 μM Hg(ClO₄)₂. M indicates markers for primer, 19-mer, 22-mer, 26-mer, 24-mer and 29-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

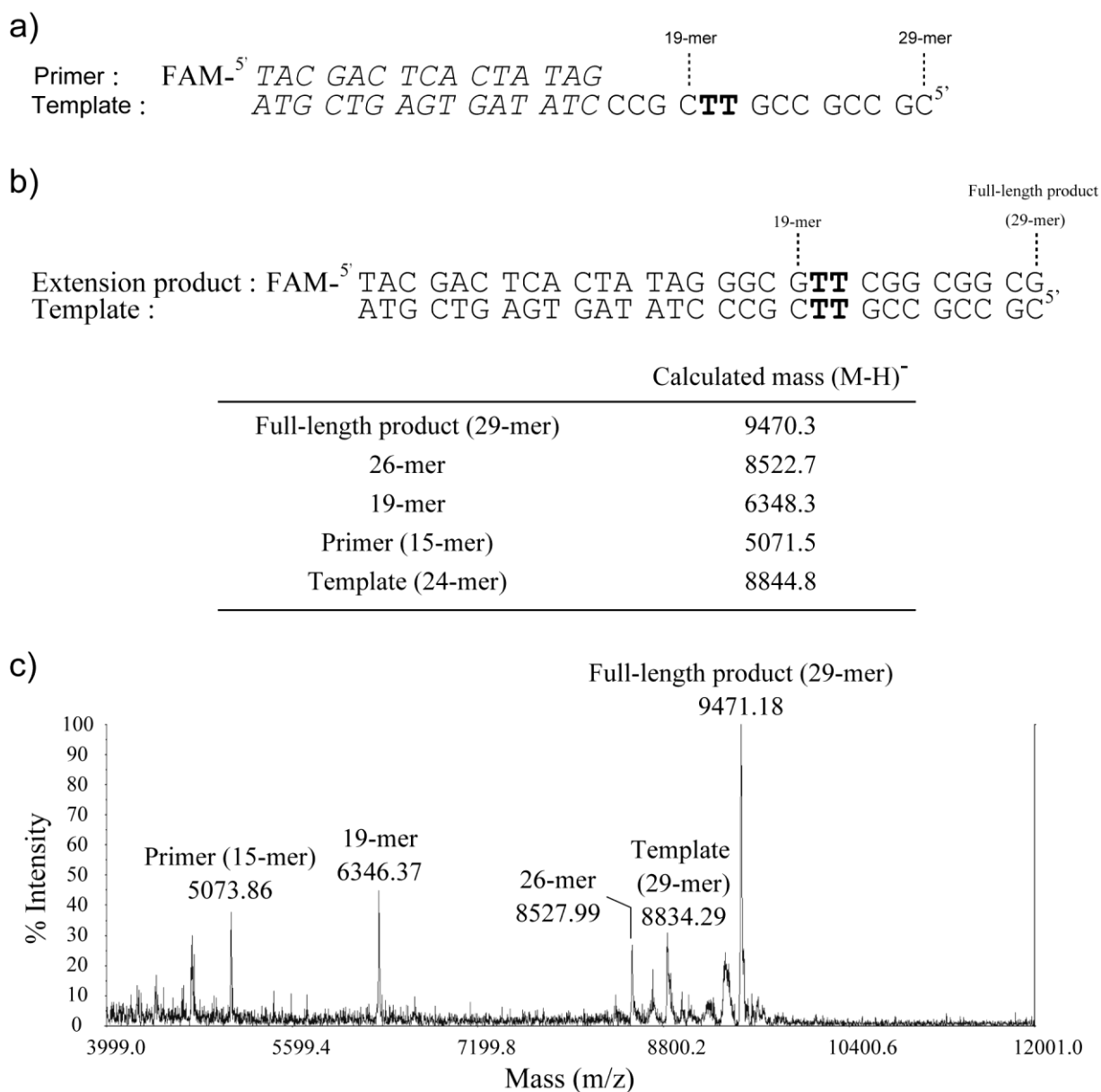
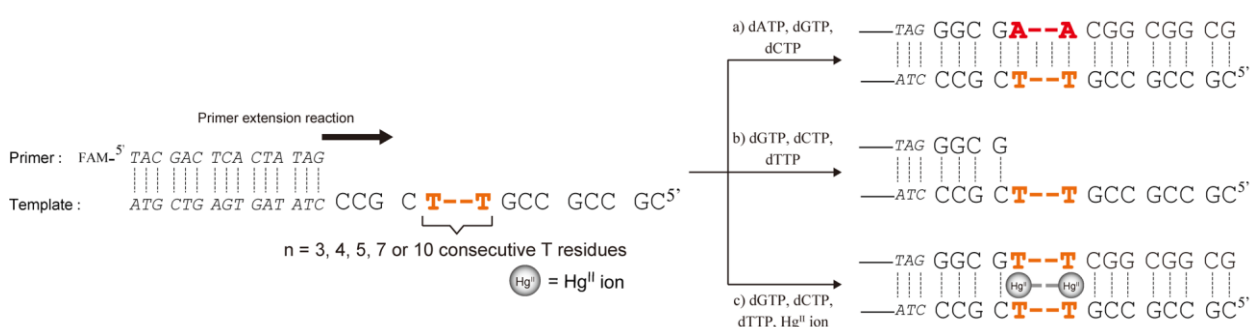


Figure 38.a) Sequences of template and primer strands. b) Sequences of extension product and calculated mass (M-H)⁻ of extension product, template and primer. c) MALDI-TOF mass spectrum of extension products obtained by the incorporation of dTTP into the site opposite two consecutive T in the presence of Hg^{II} ions by KF. The reactions contained 1.4 μM Template, 1.4 μM primer, 700 μM dNTPs, 1.2 units KF and 50 μM Hg(ClO₄)₂. Other experimental details are described in the experimental section.

上記検討に続き 3, 4, 5, 7, 10 連続 T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成について検討した. Table 14 に示した ODNs を使用し, Scheme 10 に示したプライマー伸長反応を行った (Figure 39). 各 template の連続した T 残基の下流の塩基数は, 上記検討結果から 8 塩基とした.

Table14. Sequences of ODNs.

sequence name	Sequence
Primer	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG ^{3'}
19-mer	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG GGC G ^{3'}
Template-13	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG CTT TGC CGC CGC ^{5'}
Template-14	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG CTT TTG CCG CCG C ^{5'}
Template-15	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG CTT TTT GCC GCC GC ^{5'}
Template-16	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG CTT TTT TTG CCG CCG C ^{5'}
Template-17	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG CTT TTT TTT TTG CCG CCG C ^{5'}



Scheme 10. Schematic description of primer extension reactions on templates containing three, four, five, seven and ten consecutive T residues.

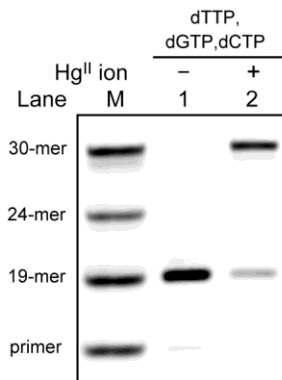
Hg^{II} 存在下, dGTP, dCTP, dTTP 存在下において, Template-13 では full-length product (30-mer) の生成が確認できたが (Figure 38b, Lane 2), Template-14~17 では反応は, 19-mer ~ 21-mer の位置で停止した (Figure 38c-f, Lanes 3). MALDI-TOF MS の解析の結果, 3 連続 T の相補位に dTTP が 3 連続で取り込まれていることが確認できた (Figure 40c, observed mass: 9774.8, calculated mass (M-H)⁻: 9774.5). つまり連続した DNA polymerase は 3 連続 T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成までは容易に行うことができるが, 4 連続以上は容易には形

成しないことが明らかとなった。

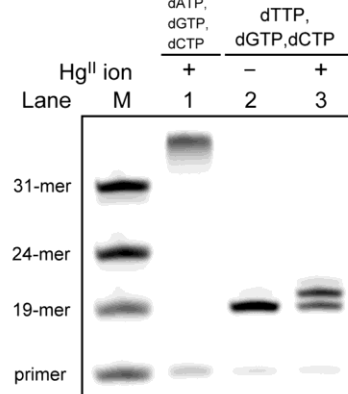
a)



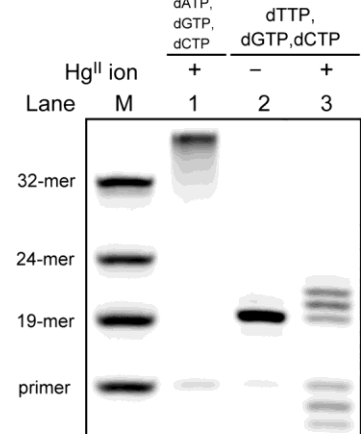
b) Template-13



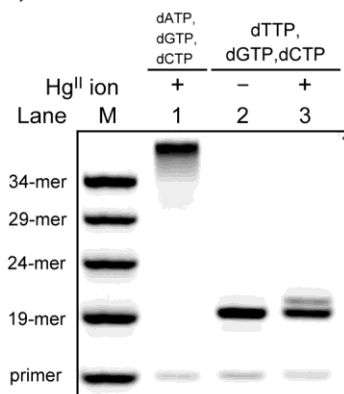
c) Template-14



d) Template-15



e) Template-16



f) Template-17

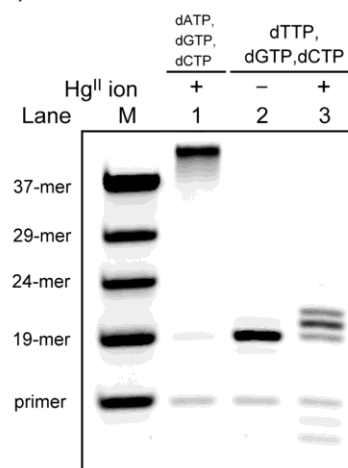


Figure 39. Hg^{II}-promoted primer extension reactions on the templates containing b) three, c) four d) five, e) seven and f) ten consecutive T residues shown in a) by KF. The reactions contained 10 μM dNTPs, 0.2 units KF and 30 μM Hg(ClO₄)₂. M indicates markers for primer, 19-mer, 24-mer, 29-mer, 30-mer, 31-mer, 32-mer, 34-mer and 37-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

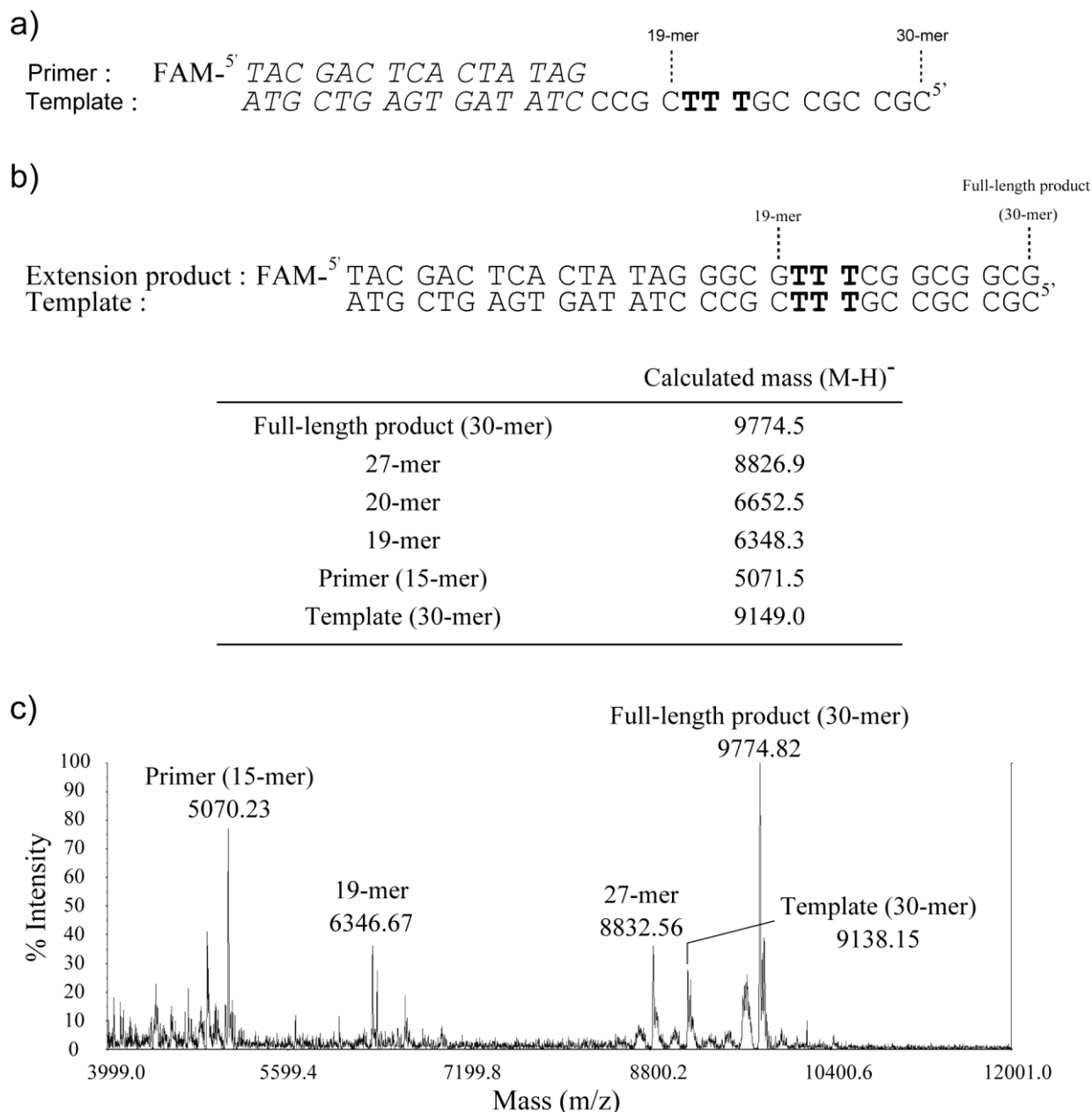


Figure 40. a) Sequences of template and primer strands. b) Sequences of extension product and calculated mass (M-H)⁻ of extension product, template and primer. c) MALDI-TOF mass spectrum of extension products obtained by the incorporation of dTTP into the site opposite three consecutive T in the presence of Hg^{II} ions by KF. The reactions contained 1.4 μM Template, 1.4 μM primer, 700 μM dNTPs, 2.0 units KF and 50 μM Hg(ClO₄)₂. Other experimental details are described in the experimental section.

4 連続以上の T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成が達成されない理由として、反応溶液中に存在する dCTP, dGTP が T の相補位への dTTP の取り込み反応を競合阻害しているのではないかと考えた。そこで、dTTP 濃度を dCTP, dGTP よりも 10 倍濃くし、Scheme 10 に示した Template-14 (4 連続した T 残基を持つ template) を使用したプライマー伸長反応を行った (Figure 41)。その結果、Hg^{II} 存在下、dGTP, dCTP, dTTP 存在下において、生成効率は悪いものの、full-length product (31-mer) の生成が確認できた (Figure 41, Lane 3)。dTTP 濃度を 10 倍としたが、Hg^{II} 非存在下では、dTTP の誤取り込みは行われず、連続した T 残基の手前 19-mer で反応が停止した (Figure 41, Lane 2)。よって生成効率が悪いものの、4 連続 T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成を達成することができた。

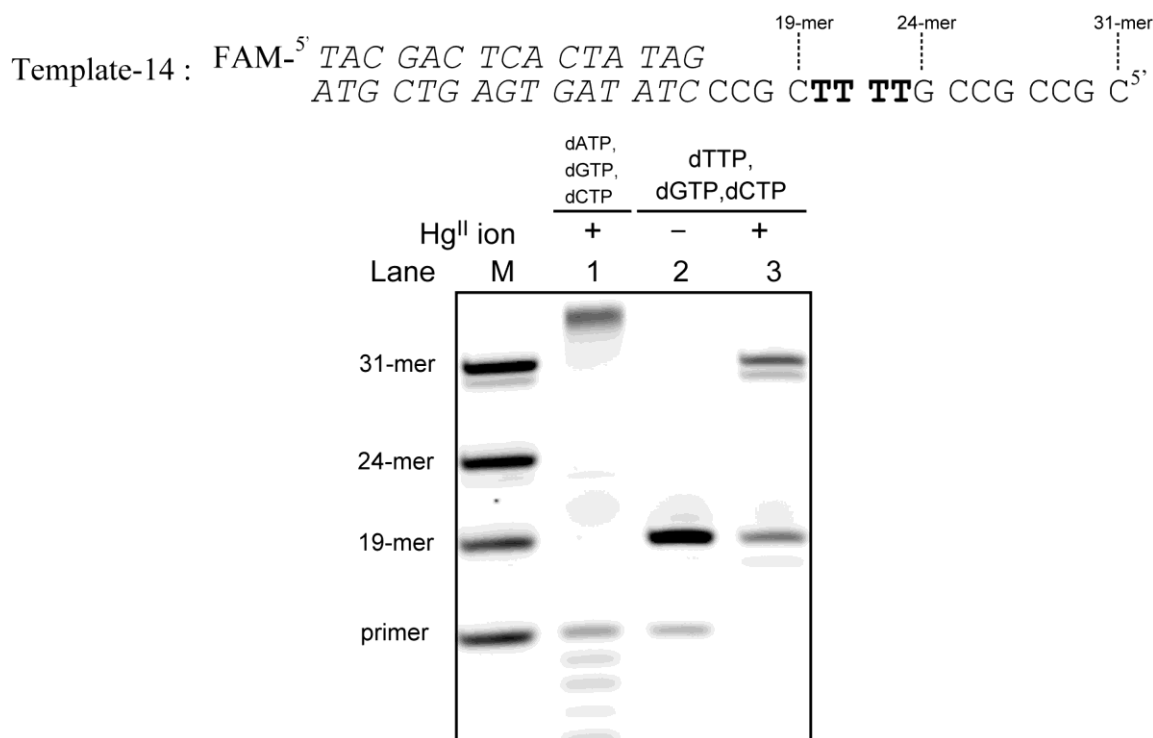
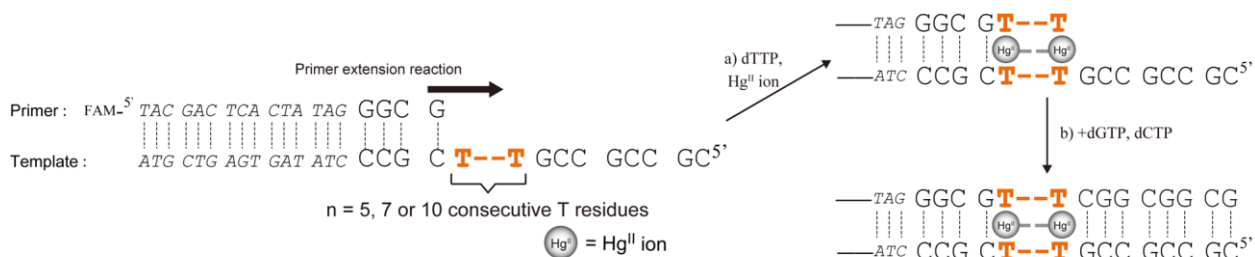


Figure 41. Hg^{II}-promoted primer extension reactions on the template containing the four consecutive T residues by KF. The reactions contained 10 μM dGTP and dGTP, 100 μM dTTP, 0.2units KF and 30 μM Hg(ClO₄)₂. M indicates markers for primer, 19-mer, 24-mer and 31-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

次に、5 連続以上の T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成を目指し、KF を用いて種々反応条件の検討を行ったが、full-length product の生成を確認することができなかった。反応が進行しない理由として、高い fidelity (精度) を持つ KF では、連続した T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対は、正常な塩基対として認識されないのではないかと考えた。そこで校正機能を持たない KF exo- を使用し、さらに DNA polymerase の fidelity を低下させることが知られている Mn^{II} を反応溶液中に添加することで、5 連続以上の T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成を試みた。しかし fidelity の低下により、T の相補位への dGTP, dCTP の取り込みが予想されたため、Scheme 11 に示したように、primer として Table 14 に示した 19-mer を使用し、まず dNTP としては dTTP のみを添加し (Scheme 11a)、1 時間後 dGTP と dCTP を添加する反応 (Scheme 11b) を試みた (Figure 42)。



Scheme 11. Schematic description of primer extension reactions on the templates containing five, seven and ten consecutive T residues. a) Primer extension reaction in the presence of dTTP and Hg^{II} ion. b) Adding of dGTP and dCTP after the reactions described in a).

Mn^{II} 存在下, KF exo- で反応を試みた結果, Scheme 11a の反応で, Template-15 では 5 連続 T 領域に, Template-16 では 7 連続 T 領域に, それぞれ dTTP が取り込まれ, 24-mer 並びに 26-mer が生成した (Figure 42b, c, Lanes 2). Hg^{II} 非存在下であっても, Mn^{II} による fidelity の低下から, T-T ミスマッチが形成され, 20-mer, 21-mer が生成したが, その後の伸長反応は進行せず (Figure 42b, c, Lanes 1), Hg^{II} 存在下でのみ連続した T 領域をリードスルーした (Figure 42b, c, Lanes 2). しかし, 10 連続の T 残基を持つ Template-17 では,

反応は 26-mer 程度の位置で停止し、連続した T 領域をリードスルーしなかった (Figure 42d, Lane 2). Template-15, 16 に、Scheme 11a に示した dTTP のみを 1 時間反応させ連続 T 領域をリードスルーさせた反応液に、dGTP, dCTP を添加し反応を行ったところ (Scheme 11b)、連続した T 領域より下流部分の反応が進行し、full-length product (32-mer, 34-mer) が生成した (Figure 42b, c, Lanes 3). この結果より、5, 7 連続の T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成を介したプライマー伸長反応を達成することができた.

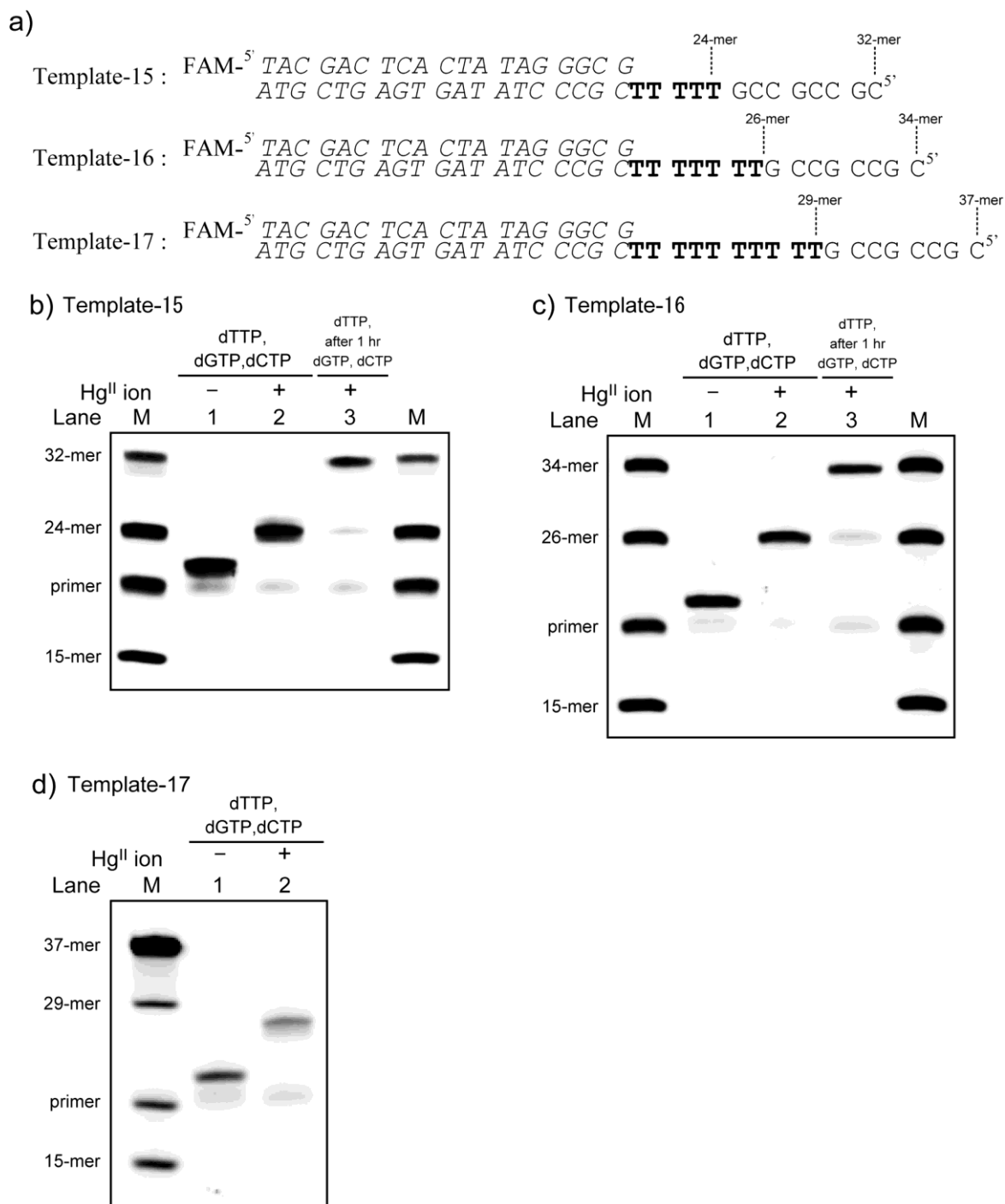


Figure 42. Hg^{II}-promoted primer extension reactions on the primed templates containing b) five, c) seven and d) ten consecutive T residues shown in a) by KF exo-. The reactions contained 500 μ M dTTP, b) 2.0 U, c) 4.0 U or d) 5.0 U KF exo-, 30 μ M Hg(ClO₄)₂, 1 mM MnCl₂ at 37 °C for 1 hr, then addition of 500 μ M dGTP and dCTP at 37 °C for 30 min. M indicates markers for 15-mer, primer, 24-mer, 26-mer, 29-mer, 32-mer, 34-mer and 37-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

ここまで達成できていない 10 連続 T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成について、DNA polymerase の種類を変更し、検討を試みた。その結果、Therminator DNA polymerase を用いた場合、反応の進行が良いことが分かった。Therminator DNA polymerase は、高度好熱菌由来 DNA polymerase である 9° N DNA polymerase の改変型 polymerase であり、family B に属する。Therminator DNA polymerase を用い、Scheme 11a の反応を行った結果、10 連続 T 領域をリードスルーし、29-mer の生成物が確認された (Figure 43, Lane 2)。Therminator DNA polymerase では、その後の反応を進行させることができなかったため、Scheme 11b の反応時に KF exo- を添加することで、full-length product (37-mer) の酵素合成を達成できた (Figure 43, Lane 3)。

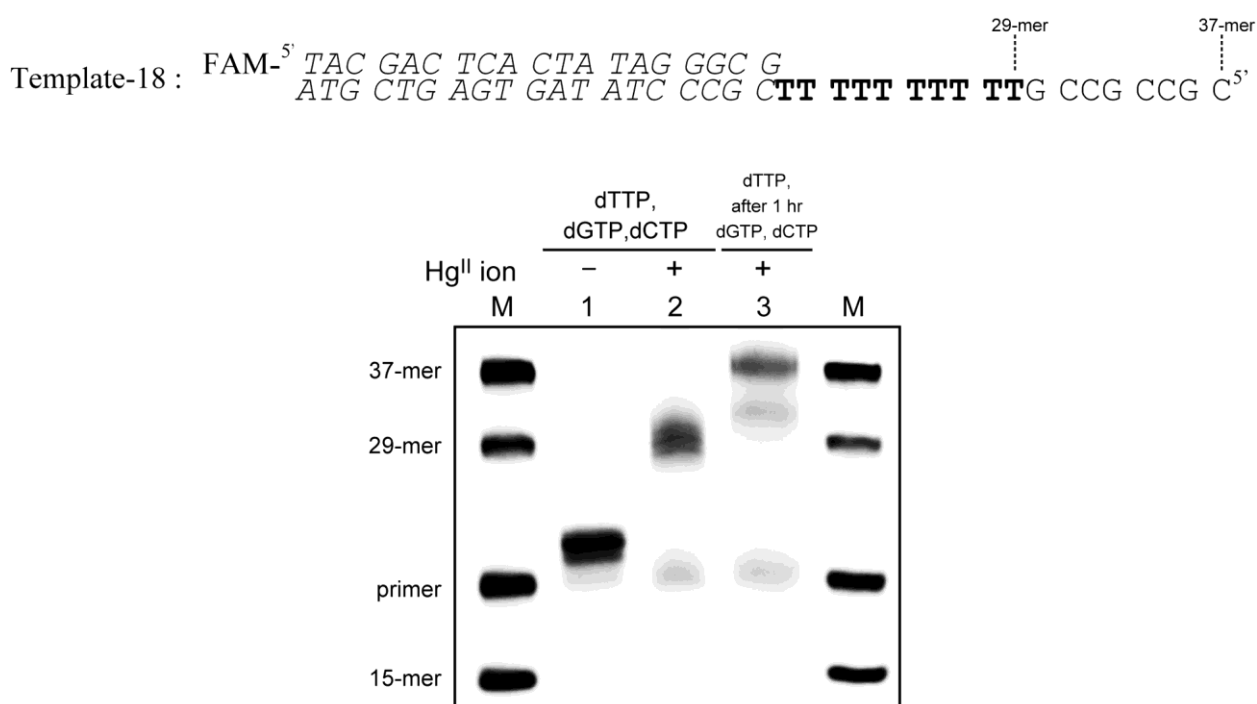


Figure 43. Formation of ten consecutive T-Hg^{II}-T base pairs by KF exo- and Therminator DNA polymerase. The reactions contained 500 μM dTTP, 0.3 units Therminator DNA polymerase, 30 μM Hg(ClO₄)₂, 1 mM MnCl₂ and were kept at 70°C for 1 hr. After addition of 500 μM dGTP and dCTP and 5.0 units KF exo-, the reactions were kept at 37 °C for 30 min. M indicates markers for 15-mer, 19-mer, 29-mer and 37-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

次に Table 15 に示した **template** 及び **primer** を使用し, 20 連続 T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成を試みた. 10 連続 T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成と同様に, まず Terminator DNA polymerase により 20 連続 T 領域の反応を行い, その後の伸長反応は KF *exo-* により行った (Figure 44). しかし, Hg^{II} 存在下であっても, 10 連続程度しか伸長反応は進行せず (Figure 44, Lane 2), KF *exo-* 添加後の反応で, **full-length product** の生成は確認できなかった (Figure 44, Lane 3). 原因としては, 20 連続の T 領域が Hg^{II} 存在下でヘアピン構造を取り, 分子内で T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対を形成する, または, 2 分子の **Template-18** が分子間で T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対を形成し部分的に二重鎖を形成するなど, 20 連続の T 領域が何らかの高次構造を取り, 反応を阻害しているのではないかと考えている.

Table15. Sequences of ODNs.

sequence name	Sequence
Primer	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG GGC G ^{3'}
Template-18	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC CCG C TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GCC GCC GC ^{5'}

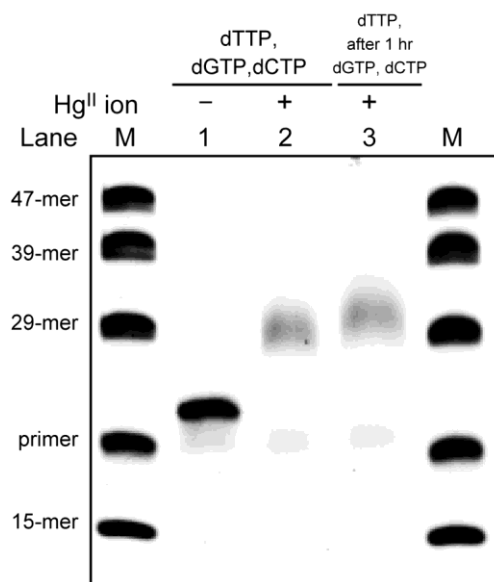
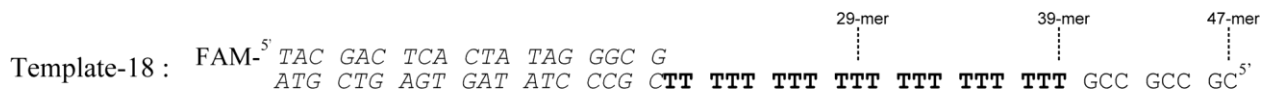


Figure 44. Hg^{II}-promoted primer extension reactions on the primed templates containing twenty consecutive T residues by Therminator DNA polymerase and KF exo-. The reactions contained 500 μM dTTP, 0.6 units Therminator DNA polymerase, 30 μM Hg(ClO₄)₂, 1 mM MnCl₂ and were kept at 70 °C for 1 hr. After addition of 500 μM dGTP and dCTP and 5.0 units KF exo-, the reactions were kept at 37 °C for 30 min. M indicates markers for 15-mer, 19-mer, 29-mer and 37-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

第二項 連続した T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対を含む二重鎖 DNA の熱安定性

DNA polymerase による 10 連続 T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成を確認できたが、その生成物である 3 連続以上の T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対を含む二重鎖 DNA の熱安定性はこれまで報告がない。そこで、Table 16 に示した ODNs の T_m 値を Hg^{II} 存在下、非存在下で測定することにより、2, 3, 5, 7, 10 連続の T-T ミスマッチ塩基対に対する Hg^{II} が及ぼす熱安定化効果を評価した (Table 17, Figure 45)。

Table 16. Sequences of ODNs.

duplex name	sequence
1TT	5' CAT TGG A TT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC T TA CTG CGA ^{5'}
2TT	5' CAT TGG A TTT TGA CGC T ^{3'} 3' GTA ACC T TTT ACT GCG A ^{5'}
3TT	5' CAT TGG A TTT TTG ACG CT ^{3'} 3' GTA ACC T TTT TAC TGC GA ^{5'}
5TT	5' CAT TGG A TTT TTT TGA CGC T ^{3'} 3' GTA ACC T TTT TTT ACT GCG A ^{5'}
7TT	5' CAT TGG A TTT TTT TTT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC T TTT TTT TTA CTG CGA ^{5'}
10TT	5' CAT TGG A TTT TTT TTT TTT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC T TTT TTT TTT TTA CTG CGA ^{5'}
1TA	5' CAT TGG A TT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC T AA CTG CGA ^{5'}
2TA	5' CAT TGG A TTT TGA CGC T ^{3'} 3' GTA ACC T AA ACT GCG A ^{5'}
3TA	5' CAT TGG A TTT TTG ACG CT ^{3'} 3' GTA ACC T AA AAC TGC GA ^{5'}
5TA	5' CAT TGG A TTT TTT TGA CGC T ^{3'} 3' GTA ACC T AA AAA ACT GCG A ^{5'}
7TA	5' CAT TGG A TTT TTT TTT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC T AA AAA AAA CTG CGA ^{5'}
10TA	5' CAT TGG A TTT TTT TTT TTT GAC GCT ^{3'} 3' GTA ACC T AA AAA AAA AAA CTG CGA ^{5'}

2, 3, 5, 7, 10 連続 T-T ミスマッチを含む二重鎖でも, 等量の Hg^{II} 存在下で, 大きな T_m 値の上昇が確認された. 横軸に T-T ミスマッチ塩基対数, 縦軸に Hg^{II} 非存在下, 存在下における T_m 値の差である ΔT_m 値をプロットすると, T-T ミスマッチ塩基対数に依存して, ΔT_m 値が増大した (Figure 46). つまり 2, 3, 5, 7, 10 連続の T-T ミスマッチに対しても Hg^{II} は, 単独 T-T ミスマッチの場合と同じく ¹⁸⁾T-T ミスマッチ : Hg^{II} = 1 : 1 で配位し, 連続した T- Hg^{II} -T 錯体型塩基対が形成されていると考えられる.

Table 17. Melting temperatures (T_m) of fully matched and consecutive T-T mismatched-containing duplexes in the presence or absence of various amounts of Hg^{II} ion.^a

duplex	T_m (°C)												ΔT_m (°C) ^b
	+ Hg^{II}												
	0 eq.	1 eq.	2 eq.	3 eq.	4 eq.	5 eq.	6 eq.	7 eq.	8 eq.	9 eq.	10 eq.	11 eq.	
1TT	46.5	55.4	55.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+8.9
2TT	41.8	44.7	54.3	54.6	—	—	—	—	—	—	—	—	+12.5
3TT	39.2	39.6	54.1	55.2	55.5	—	—	—	—	—	—	—	+16.0
5TT	32.2	34.1	36.1	54.8	55.7	56.7	58.0	—	—	—	—	—	+24.5
7TT	29.0	30.3	29.5	32.7	56.9	58.4	59.6	60.7	62.2	—	—	—	+31.7
10TT	23.4	24.8	27.5	28.4	29.1 (50.3) ^c	55.3	56.2	58.9	60.5	62.0	65.4	66.7	+42.0
1AT	55.9	54.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-1.5
2AT	57.0	—	55.6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-1.4
3AT	57.7	—	—	55.1	—	—	—	—	—	—	—	—	-2.6
5AT	58.0	—	—	—	—	56.6	—	—	—	—	—	—	-1.4
7AT	59.8	—	—	—	—	—	—	52.7	—	—	—	—	-7.1
10AT	60.6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	52.8	—	-7.8

^a Samples contained 2 μM duplex, 100 mM NaClO_4 , 10 mM MOPS (pH 7.1) in the presence or absence of various equivalents of Hg^{II} ions. T_m values were obtained from first-derivative plots of melting curves and values are averages \pm SD of at least two measurements.^b ΔT_m were obtained by subtracting the T_m value in the absence of Hg^{II} ions from T_m value in the presence of Hg^{II} ions.^c Two maxima were observed in the first-derivative plots and the lower maximum is shown in parentheses.

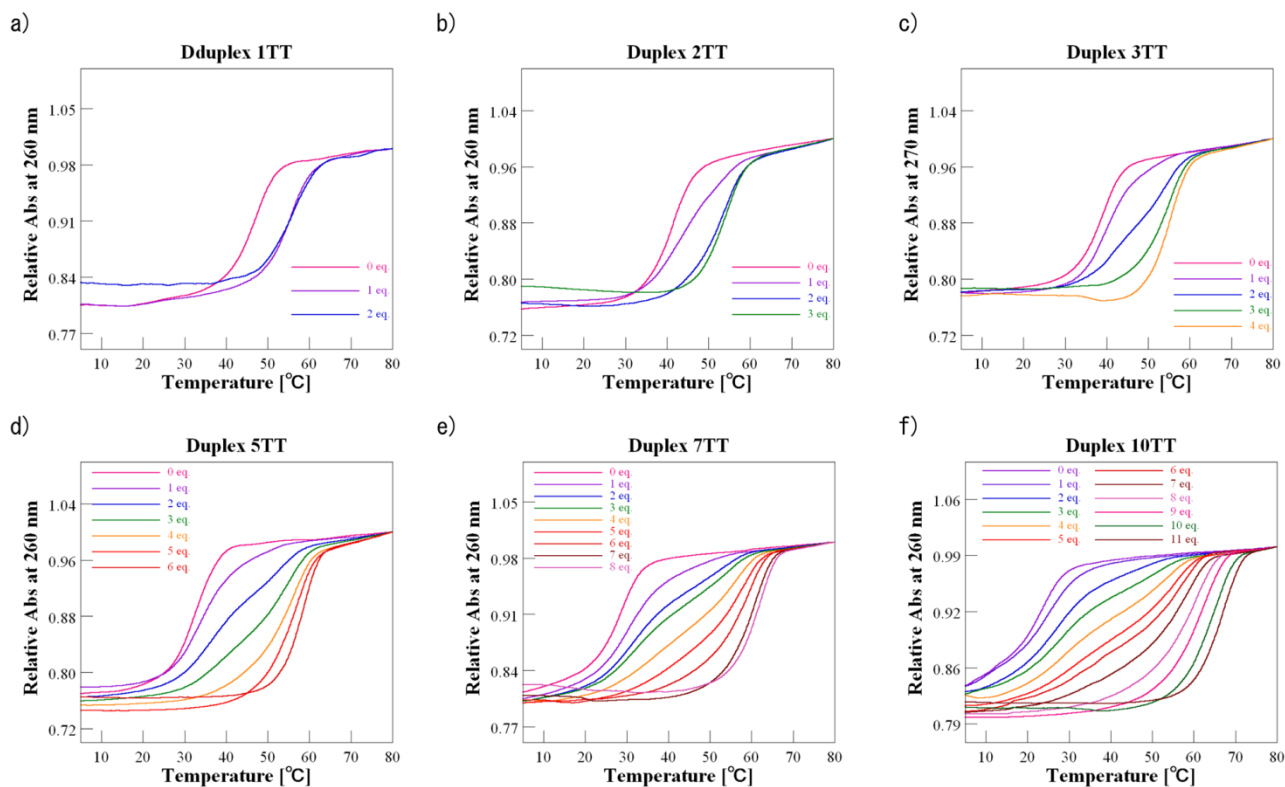


Figure 45. Melting profiles of duplexes containing of a) one, b) two, c) three, d) five, e) seven and f) ten consecutive T-T mismatched base pairs in the presence or absence of various equivalents of Hg^{II} ions at 260 nm. Samples contained 2 μM duplex, 100 mM NaClO_4 , and 10 mM MOPS (pH 7.1).

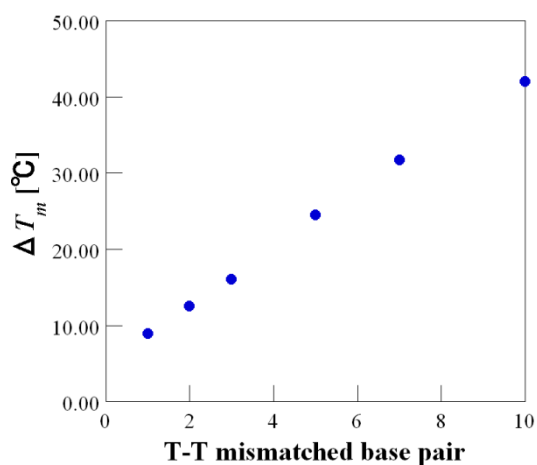


Figure 46. The relationship between the number of T-T mismatched base pairs and ΔT_m values.

本節の結果より, 2~10 連続 T-T ミスマッチ塩基対に対して, Hg^{II} は 1 : 1 の比で配位し, 二重鎖 DNA 中で 2~10 連続 T- Hg^{II} -T 錯体型塩基対が形成されることが明らかとなった. また, T-T ミスマッチ塩基対数に依存して, ΔT_m 値は大きく増大したことから, T- Hg^{II} -T 錯体型塩基対の形成により T-T ミスマッチ塩基対を含む二重鎖の安定性が向上すること, また T- Hg^{II} -T 錯体型塩基対が連続しても大きな立体的, 静電的反発が生じていない可能性が示唆された.

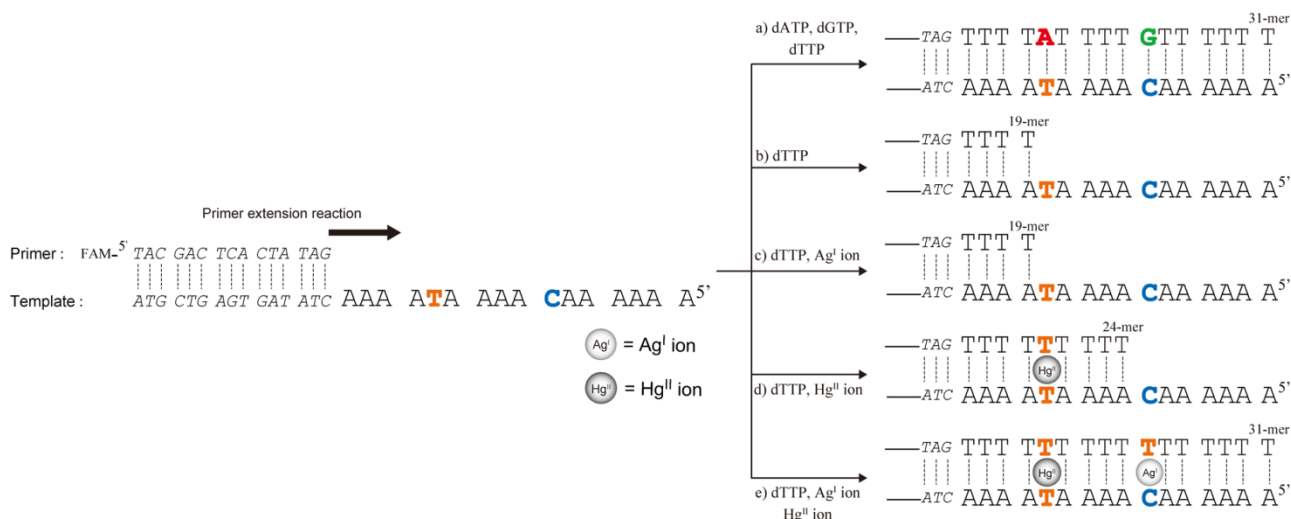
第二節 DNA polymerase による特定の金属イオンの位置選択的導入

第一節で、DNA polymerase による連続した T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成を達成した。次に第一章と第二章の反応を組み合わせ、DNA polymerase によるプライマー伸長反応で、同一配列中に、T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対と C-Ag^I-T 錯体型塩基対の選択的形成を試みた。別の見方をすると、同一配列中への Hg^{II} と Ag^I という異種の金属イオンの個別位置選択的導入反応とも言える。

Table 18 に示した template-primer を使用し、Scheme 12 に示した同一配列中での T-Hg^{II}-T 及び C-Ag^I-T 錯体型塩基対の選択的形成が可能であると考えた。Template-19 の一本鎖領域は、A リッチ配列中に T 及び C を 1 残基ずつ含み、それぞれ Hg^{II} が存在すると T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対形成部位、Ag^I が存在すると C-Ag^I-T 錯体型塩基対形成部位となるよう設計した (Table 18, Scheme 12)。金属イオン非存在下では、T の手前 19-mer で反応が停止する (Scheme 12b)。また Ag^I 存在下であっても、T-Ag^I-T 錯体型塩基対は DNA polymerase により形成されないため (第二章第二節, Figure 23b)、同様に T の手前 19-mer で反応は停止する (Scheme 12c)。Hg^{II} 存在下では T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対が形成され反応は進行するが、C-Hg^{II}-T 錯体型塩基対は DNA polymerase により形成されないため (第二章第二節, Figure 27, Figure 28)、Ag^I 非存在下では、進行した伸長反応も C の手前 24-mer で反応は停止する (Scheme 12d)。一方、Hg^{II} と Ag^I 両金属イオン存在下では、T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対、C-Ag^I-T 錯体型塩基対が形成され、full-length product (31-mer) が形成される (Scheme 12e)。以上のように、同一配列中に異なる金属イオンによる金属錯体型塩基対の形成を介した、金属イオンによる複製反応の制御を期待し、KF exo- を使用し検討を行った (Figure 47)。

Table 18. Sequences of ODNs.

sequence name	Sequence
Primer	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG ^{3'}
Template-19	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC AAA A TA AAA CAA AAA A ^{5'}



Scheme 12. Schematic description of the regulated incorporation of Ag^I and Hg^{II} ions into the programmed sites.

Hg^{II}, Ag^I 非存在下では、反応は T の手前 19-mer で停止した (Figure 47, Lane 2). Ag^I 存在下でも同じく反応は 19-mer で停止した (Figure 47, Lane 3). しかし Hg^{II} 存在下では、T の相補位へ dTTP が取り込まれ、T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対が形成され、鎖伸長は進行し、C の手前 24-mer で反応は停止した (Figure 47, Lane 4). Hg^{II}, Ag^I 存在下では、T, C の相補位へ dTTP が取り込まれ、T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対並びに C-Ag^I-T 錯体型塩基対が形成され、full-length product が生成した (Figure 47, Lane 5).

PAGE 以外の方法でもこの結果を証明するため、生成物の MALDI-TOF MS による解析を行った (Figure 48). その結果、金属イオン非存在下 (Figure 48b Lane 2), Ag^I 存在下 (Figure 48b, Lane 3) では、それぞれ 19-mer が生成しており (Figure 48d, observed mass: 6288.4, calculated mass (M-H)⁻: 6288.2, Figure 48e, observed mass: 6288.5, calculated mass

(M-H)⁻: 6288.2), Hg^{II} 存在下では 24-mer が (Figure 48f, observed mass: 7809.9, calculated mass (M-H)⁻: 7809.2), Hg^{II}, Ag^I 共存在下では 31-mer が (Figure 48g, observed mass: 9939.6, calculated mass (M-H)⁻: 9938.6) 生成していることが分かった. これらは全て PAGE の結果を支持するものであった.

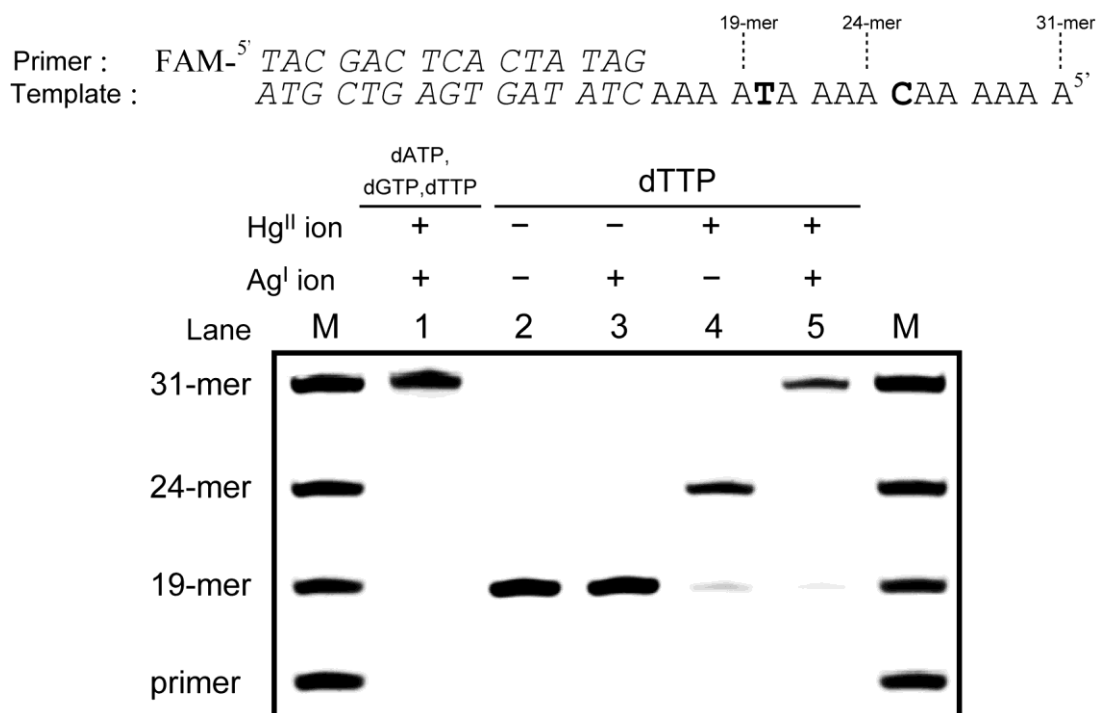
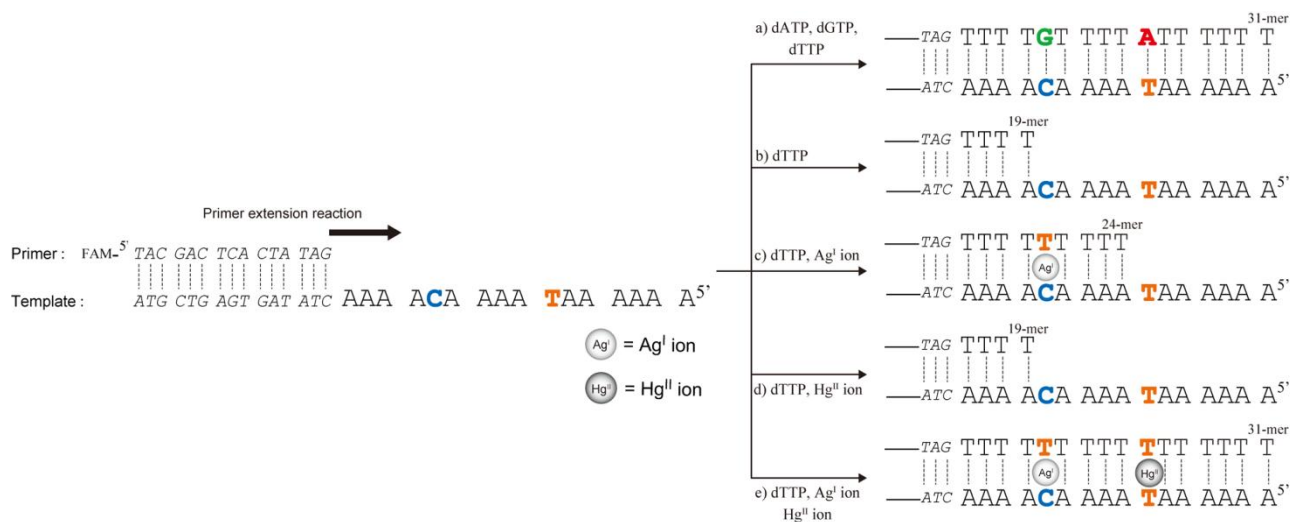


Figure 47. Primer extension reactions in the presence or absence of Ag^I and/or Hg^{II} ions by KF exo-. The reactions contained 30 μM dNTPs and 0.4 units of KF exo- in the presence of 2 μM AgNO₃ and/or Hg(ClO₄)₂. M indicates markers for primer, 19-mer, 24-mer and 31-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

また、C と T の位置を逆転させた配列 (Table 19) でも、同様結果を得ることができた (Scheme 13, Figure 49).

Table19. Sequences of ODNs.

sequence name	Sequence
Primer	FAM- ^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG ^{3'}
Template-19	^{3'} ATG CTG AGT GAT ATC AAA ACA AAA TAA AAA A ^{5'}



Scheme 13. Schematic description of the regulated incorporation of Ag^I and Hg^{II} ions into the programmed sites.

Primer : FAM-^{5'} TAC GAC TCA CTA TAG
 Template : ATG CTG AGT GAT ATC AAA ACA AAA TAA AAA A^{5'}

19-mer
⋮
24-mer
⋮
31-mer
⋮

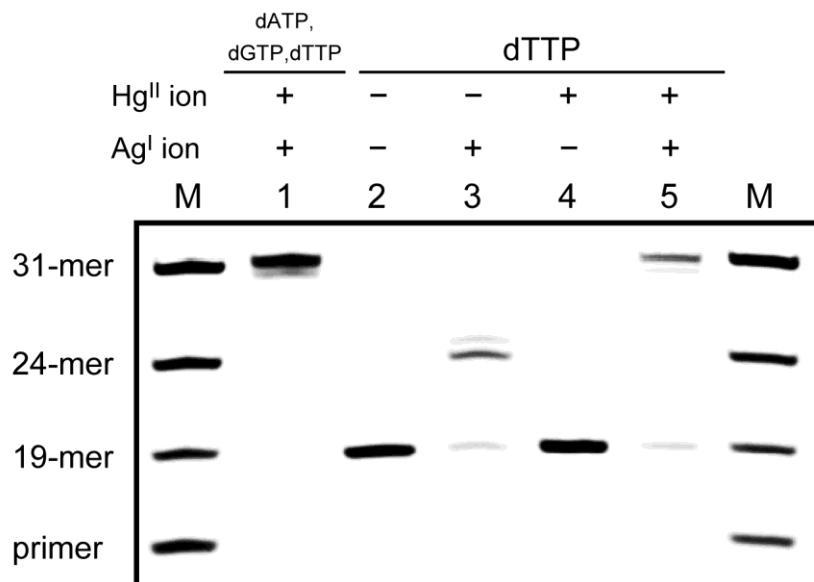


Figure 49. Primer extension reactions in the presence or absence of Ag^I and/or Hg^{II} ions by KF exo-. The reactions contained 30 μM dNTPs and 0.4 units of KF exo- in the presence of 2 μM AgNO₃ and/or Hg(ClO₄)₂. M indicates markers for primer, 19-mer, 24-mer and 31-mer. Other experimental details are described in the experimental section.

第一節の結果より、DNA polymerase による 2~10 連続の T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成を達成することができた。本結果は、酵素法が連続した T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対合成のアプローチの一つとしての有効性を示唆するものと考えている。

第二節の結果より、同一配列中に T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対並びに C-Ag^I-T 錯体型塩基対を形成することを達成できた。言い換えれば、二重鎖 DNA のデザインした部分に特定の金属イオンを導入することに成功した。第一節の連続した T-Hg^{II}-T 錯体型塩基対の形成反応と合わせ、様々な種類の金属含有 DNA 分子を提供するツールとなることが期待される。また本節の結果は、金属イオンの有無・組み合わせにより、プライマー伸長反応や PCR を制御することが可能になることを意味しており、DNA-logic gate への応用が期待される。

本研究成果は、DNA polymerase による金属錯体型塩基対の認識・形成を世界に先駆けて見出したものであり、筆者らの報告後、DNA polymerase を用いた金属イオンセンサーも報告された。⁴⁷⁾ また、人工塩基からなる金属錯体型塩基対が DNA polymerase により認識・形成されることが報告され、金属錯体型塩基対を利用した遺伝アルファベットの拡張が期待されている。⁴⁸⁾ さらに、DNA polymerase が金属イオンの有無により反応を停止・開始することを利用した DNA-logic gate も報告され、金属錯体型塩基対の DNA-logic gate への応用に新たな可能性を投じた。⁴⁹⁾

このように、DNA polymerase による金属錯体型塩基対の形成反応の発見は、DNA ナノマテリアルの研究領域における DNA polymerase の応用に新たな局面を切り開いたものであると同時に、本研究はその応用の一端をも示したものである。

結 論

・ DNA polymerase が、 Hg^{II} 存在下におけるプライマー伸長反応において、T の相補位へ dTTP を取り込み T- Hg^{II} -T 錯体型塩基対を形成することを見出した。これは金属錯体型塩基対が DNA polymerase により認識・形成されることを見出した最初の例となった。また本反応は、 Hg^{II} に高い選択性があり、他の金属イオン存在下では、T の相補位へ dTTP は取り込まれなかった。⁵⁰⁾

・ DNA polymerase が、 Ag^{I} 存在下におけるプライマー伸長反応において、C の相補位へ dATP を取り込み C- Ag^{I} -A 錯体型塩基対を形成することを見出した。本反応は、 Ag^{I} に高い選択性があり、他の金属イオン存在下での C の相補位への dATP の取り込み効率は、 Ag^{I} に劣っていた。⁵¹⁾

・ 3'→5' exonuclease 活性欠損 DNA polymerase が、 Ag^{I} 存在下におけるプライマー伸長反応において、C の相補位へ dTTP を、T の相補位へ dCTP を取り込み、C- Ag^{I} -T, T- Ag^{I} -C 錯体型塩基対を形成することを見出した。また本反応は、 Ag^{I} に高い選択性があり、他の金属イオン存在下では、C の相補位へ dTTP が、T の相補位へ dCTP は取り込まれなかった。⁵²⁾

・ 鑄型鎖の配列及び反応活性によっては、 Ag^{I} 存在下におけるプライマー伸長反応において、C の相補位へ dCTP を取り込み C- Ag^{I} -C 錯体型塩基対を形成することを見出した。⁵²⁾

・ C-A, C-T, C-C ミスマッチ塩基対の安定性に及ぼす Ag^{I} の影響を評価した結果, Ag^{I} による安定化効果は, $\text{C-C} > \text{C-A} \approx \text{C-T}$ であった. C-A, C-T ミスマッチ塩基対への Ag^{I} の配位の化学量論は, C-C ミスマッチ塩基対と同様に, ミスマッチ塩基対 : $\text{Ag}^{\text{I}} = 1 : 1$ であることが示唆された. ⁵³⁾

・ ミスマッチ塩基対が二重鎖 DNA の末端に位置する場合の, T-T ミスマッチ塩基対の安定性に及ぼす Hg^{II} の影響, C-A, C-T, C-C ミスマッチ塩基対の安定性に及ぼす Ag^{I} の影響を, 評価した結果, 末端に位置する C-A, C-T, C-C ミスマッチ塩基対は Ag^{I} によりほとんど安定化されないが, T-T ミスマッチ塩基対は, 末端に位置しても Hg^{II} により, 大きく安定化されることが明らかとなった. ⁵⁴⁾

・ DNA polymerase による $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-A}$, $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-T}$ 及び $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$ 錯体型塩基対の形成され易さについて, C-A, C-T, C-C に及ぼす Ag^{I} の安定化効果の側面から評価した結果, 熱安定化効果は 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, 金属錯体型塩基対の正味電荷や A ルールが重要な因子であることが示唆された. ⁵³⁾

・ 同一配列中に 2~10 連続の $\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ 錯体型塩基対が DNA polymerase により形成されることが明らかとなった.

・ プライマー伸長反応において, 同一配列中に, 異なる金属錯体型塩基対 ($\text{T-Hg}^{\text{II}}\text{-T}$ 錯体型塩基対, $\text{C-Ag}^{\text{I}}\text{-T}$ 錯体型塩基対) の位置選択的形成に成功した. ⁵²⁾

謝 辞

本研究の遂行ならびに論文作成にあたり，直接的指導を賜りました大阪薬科大学 浦田秀仁教授に深謝致します。

本研究におきまして，終始御指導御鞭撻下さいました大阪薬科大学 和田俊一准教授及び大阪大学 中川治特任講師に深く感謝致します。

本研究に際し，有益なご助言を頂きました神奈川大学 小野晶教授，東京理科大学 鳥越秀峰教授，徳島文理大学 田中好幸教授に深く感謝致します。

また，本研究にご尽力頂いた機能分子創製化学研究室 青谷恵美学士，宮崎有紀学士，田川知津子学士，中村淳子学士，足立尚未学士，田中菜摘学士ならびに桐生里紗学士に深く感謝致します。

最後に，ご協力頂いた機能分子創製化学研究室の皆様にご心よりお礼申し上げます。

実験の部

日本バイオサービスより、プライマー伸長反応、一塩基伸長反応、MALDI-TOF MS に用いた ODNs を購入した。温度変化測定 [融解温度 (T_m) 測定], CD スペクトル測定に用いた ODNs は、日本遺伝子研究所より購入しものと、機能分子創製化学研究室で合成されたものを使用した。dNTPs は、TOYOBO 社製の 100 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP を使用し、それぞれ適宜 milliQ 水で希釈して使用した。酵素は、NEW ENGLAND BioLabs Inc. 社製の KF (code: M0210S, M0210L), KF exo- (code: M0212S, M0212L), Terminator polymerase (code: M2061), TOYOBO 社製の γ Taq DNA Polymerase (code: TAP-211), KOD Dash polymerase (code: LDP-101), を使用し、それぞれ適宜、添付の storage buffer もしくは反応緩衝液で希釈して使用した。

プライマー伸長反応、一塩基伸長反応の進行を確認するためポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) を行った。PAGE は、ATTO 社製 AE-6530M 型ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽、パワーステーション 1000XP を使用し、泳動ゲルとして 8 M urea を含む変性 20% ポリアクリルアミドゲル (90 mm×80 mm×1 mm) を用い、250V 定電圧の条件下で、泳動緩衝液として TBE buffer (45 mM Tris-HCl, 45 mM boric acid, 1.3 mM EDTA-2Na) を使用し、泳動を行った。泳動後、FUJIFILM (現 GE Healthcare Life Sciences) 社製 LAS-3000 Image Analyzer により、励起波長 460 nm, 蛍光波長 515 nm の条件で、プライマー鎖の 5' 末端に標識したフルオレセイン検出することで、反応の結果を確認した。

MALDI-TOF MS スペクトルは、Applied Biosystems (現 Life technology) 社製 Voyager-DE STR で、吸光度の温度変化測定は、JASCO 社製 V-560 Spectrophotometer 並びに V-660 Spectrophotometer で、CD スペクトルは、JASCO 社製 J-820 Spectropolarimeter により測定した。

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件

1 μM template 水溶液を 3 μL , 1 μM primer 水溶液を 2 μL , milliQ 水を反応溶液の全量が 20 μL となるよう調整した量を, 反応用緩衝液 ($\times 10$) (第一章, 第四章第一節: 0.5M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH7.9), 0.1 M MgCl_2 , 第二章, 第三章第二節, 第四章第二節: 1.0 M AcONa, 0.1 M Tris-AcOH (pH7.9), 0.1 M Mg(OAc)_2 , 0.05 M NH_4Cl) を 2 μL の順でマイクロチューブにとり, 攪拌, 遠心後, アニーリングした. アニーリング後, dNTPs 水溶液を各 2 μL ずつ, 金属イオン水溶液を加え, 攪拌, 遠心した. 次いで DNA polymerase を 2 μL 加えて, タッピングにより攪拌して遠心し, 37 $^\circ\text{C}$, 60 min 反応した. 60 min 後, 金属イオンをマスクする目的で, 100 mM DTT aq. 0.5 μL を添加し, さらに Loading buffer (8M urea, 70 % sucrose, 0.2 % bromophenol blue) を 5 μL 加えて攪拌, 遠心後, 90 $^\circ\text{C}$ で 10 min 加熱し, 反応を停止した. このうち 7 μL を 20 % ポリアクリルアミド変性ゲル電気泳動 (PAGE) により電気泳動し, LAS-3000 Image Analyzer にて確認した.

	添加量 (μL)	最終濃度
1 μM Template	3	150 nM
1 μM Primer	2	100 nM
反応用緩衝液 ($\times 10$)	2	—
dNTPs*	*	*
Metal ions*	*	*
DNA polymerase*	*	*
milliQ 水	全量が 20 μL となるように添加	—
全量	20 μL	
100 mM DTT	0.5 μL	—
Loading buffer	5 μL	—

*: 各反応条件で濃度, 添加量を適宜変更

MALDI-TOF MS の基本条件

10 μ M template 水溶液, 10 μ M primer 水溶液を 7 μ L ずつ添加し, 反応の全量が 50 μ L となるよう milliQ 水, 反応用緩衝液 ($\times 10$) (第一章, 第四章第一節: 0.5M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH7.9), 0.1 M MgCl₂, 第二章, 第三章第二節, 第四章第二節: 1.0 M AcONa, 0.1 M Tris-AcOH (pH7.9), 0.1 M Mg(OAc)₂, 0.05 M NH₄Cl) を 5 μ L の順でマイクロチューブにとり, 攪拌, 遠心後, アニーリングをした. アニーリング後, dNTPs 水溶液, 金属イオン水溶液を加え, 攪拌, 遠心した. 次いで DNA polymerase を加え, タッピングにより攪拌し, 遠心し, 37 °C で 60 min 間反応させた. 60 min 後, 金属イオンをマスクする目的で, 100 mM DTT aq. 1.5 μ L を添加し, 攪拌, 遠心後, 90 °C で 10 min 加熱し, 反応を停止した. 反応停止後, 各反応溶液を 1 μ L ずつ別のマイクロチューブにとり, milliQ 水を 9 μ L, さらに Loading buffer (8 M urea, 70 % sucrose, 0.2 % bromophenol blue) を 4 μ L 加えて, 攪拌, 遠心した. このうち 6 μ L を 20 % ポリアクリルアミド変性ゲル電気泳動 (PAGE) により電気泳動し, LAS-3000 Image Analyzer にて確認した. 上記反応及び PAGE を複数回行った. 反応が問題なく進行した 16 回の反応溶液を合わせ, 減圧条件下 (Speed-Vac) にて溶液の全量が 200~300 μ L となるように濃縮した. 濃縮後, ゲル濾過クロマトグラフィー (GE Healthcare, illustra™ NAP™-25 Columns Sephadex™ G-25 DNA Grade) で脱塩を実施した. 脱塩操作は, 濃縮溶液を NAP-カラムの上へのせ, milliQ 水 5 mL を上部から流し込み, 500 μ L ずつ 10 本のマイクロチューブに取り分けた. LAS-3000 にて各フラクションのマイクロチューブを励起波長 460 nm, 蛍光波長 515 nm の条件で撮影し, 蛍光を示したフラクションを 1 つのマイクロチューブに集め, 凍結乾燥した. 凍結乾燥後, ミニマイクロチューブに移し, 再び凍結乾燥した. ODNs をマイクロチューブの底に集めるため, 凍結乾燥物を 20 μ L の milliQ 水に溶かし, よく攪拌, 遠心後, 再び凍結乾燥した. 凍結乾燥後, 2 μ L の 100 mM TEAA に溶解し, MILLIPORE 社製 ZipTip® Pipette Tips を使用し, 0.5 μ L

× 2 回のアセトニトリルで溶出しながら MALDI-TOF MS 測定用プレートにのせ、以下の条件で、Voyager-DE STR にて測定した。Mode of operation : Linear, Polarity : Negative, Matrix : 3-hydroxypicolinic acid (50 mg/mL) : ammonium citrate (50 mg/mL) = 9 : 1

プライマー伸長反応で使用したオリゴデオキシヌクレオチドの構造確認

プライマー伸長反応，一塩基伸長反応に用いた日本バイオサービスより購入した ODNs の分子式と分子量の計算値と negative ion mode による実測値を示した。

Sequence name	分子式	分子量- H ⁺	
		計算値	実測値
Full-length-1	C ₂₆₁ H ₃₁₆ N ₉₇ O ₁₄₉ P ₂₄	7938.3	7940.2
Full-length-2	C ₂₆₁ H ₃₁₇ N ₉₄ O ₁₅₁ P ₂₄	7929.3	7931.7
Full-length-3	C ₂₅₇ H ₃₁₆ N ₈₉ O ₁₄₇ P ₂₄	7746.2	7748.0
Full-length-4	C ₂₅₇ H ₃₁₉ N ₈₀ O ₁₅₃ P ₂₄	7719.2	7719.0
19-mer-1	C ₂₁₂ H ₂₅₆ N ₇₄ O ₁₂₀ P ₁₉	6348.3	6347.3
19-mer-2	C ₂₁₀ H ₂₅₆ N ₇₀ O ₁₁₉ P ₁₉	6252.2	6254.3
19-mer-3	C ₂₁₀ H ₂₅₇ N ₆₈ O ₁₂₁ P ₁₉	6243.2	6243.2
19-mer (Duplex-1)	C ₂₁₃ H ₂₅₇ N ₇₃ O ₁₁₉ P ₁₉	6331.3	6332.3
19-mer (Duplex-2)	C ₂₁₃ H ₂₆₀ N ₆₄ O ₁₂₄ P ₁₉	6288.3	6289.5
19-mer (Duplex-3)	C ₂₁₃ H ₂₅₇ N ₇₃ O ₁₁₈ P ₁₉	6315.3	6314.9
19-mer (Duplex-4)	C ₂₁₂ H ₂₅₇ N ₇₁ O ₁₂₀ P ₁₉	6307.3	6306.9
Primer	C ₁₇₃ H ₂₀₈ N ₅₆ O ₁₇₃ P ₁₅	5071.5	5072.3
Template-1	C ₂₃₂ H ₂₉₅ N ₈₆ O ₁₄₄ P ₂₃	7303.8	7303.6
Template-2	C ₂₃₇ H ₂₉₆ N ₉₃ O ₁₄₅ P ₂₃	7478.9	7480.9
Template-3	C ₂₃₇ H ₂₉₄ N ₉₉ O ₁₄₁ P ₂₃	7496.9	7494.1
Template-4	C ₂₃₇ H ₂₉₅ N ₉₈ O ₁₄₂ P ₂₃	7511.9	7511.8
Template (Duplex-1)	C ₂₃₆ H ₂₉₆ N ₉₁ O ₁₄₄ P ₂₃	7422.9	7420.8
Template (Duplex-2)	C ₂₃₇ H ₂₉₄ N ₉₉ O ₁₃₉ P ₂₃	7464.9	7465.0
Template (Duplex-3)	C ₂₃₇ H ₂₉₈ N ₈₇ O ₁₄₇ P ₂₃	7537.9	7436.2
Template (Duplex-4)	C ₂₃₆ H ₂₉₅ N ₉₄ O ₁₄₃ P ₂₃	7447.9	7446.1

Template-5	$C_{279}H_{356}N_{102}O_{175}P_{28}$	8804.7	8801.4
Template-6	$C_{280}H_{356}N_{104}O_{175}P_{28}$	8844.8	8842.6
Template-7	$C_{279}H_{356}N_{102}O_{175}P_{28}$	8804.7	8803.1
Template-8	$C_{336}H_{428}N_{126}O_{211}P_{34}$	10659.9	10658.9
Template-9	$C_{215}H_{272}N_{79}O_{133}P_{21}$	6740.4	6738.7
Template-10	$C_{233}H_{296}N_{85}O_{145}P_{23}$	7318.8	7320.3
Template-11	$C_{252}H_{320}N_{93}O_{157}P_{25}$	7937.2	7935.3
Template-12	$C_{280}H_{356}N_{104}O_{175}P_{28}$	8844.8	8845.1
Template-13	$C_{290}H_{369}N_{106}O_{182}P_{29}$	9149.0	9148.0
Template-14	$C_{300}H_{382}N_{108}O_{189}P_{30}$	9453.1	9453.1
Template-15	$C_{310}H_{395}N_{110}O_{196}P_{31}$	9757.3	9755.2
Template-16	$C_{330}H_{421}N_{114}O_{210}P_{33}$	10365.2	10364.2
Template-17	$C_{360}H_{460}N_{120}O_{231}P_{36}$	11278.3	11276.0
Template-18	$C_{307}H_{379}N_{131}O_{172}P_{30}$	9584.4	9581.9
Template-19	$C_{307}H_{379}N_{131}O_{172}P_{30}$	9584.4	9584.0

融解温度 (T_m 値) 測定の基本操作 (V-560 で測定)

スピッツに緩衝液 (×5) [500 mM NaClO₄, 50 mM MOPS (pH 7.1)] を 1.2 mL 加え, ここに duplex を構成する一本鎖 ODN を 12 nmol ずつ加え, 全量が 5 mL となるように milliQ 水を加えた. 攪拌後, 2.5 mL ずつ 2 本のスピッツに分け, 金属イオン水溶液を適量添加し, 全量を milliQ 水で 3 mL とした. これをアニーリングし, MILLIPORE 社製 Millex[®]-LG 0.20 μm で濾過後, 下記に示した条件で温度変化測定を行った. 得られた融解曲線を一次微分し, T_m 値を求めた. 測定は少なくとも 2 回行い平均値を示した.

機種 : JASCO 社製 V-560

測光モード : Abs レスポンス : Medium バンド幅 : 2.0 nm

測定温度 (温度範囲) : 5 - 80 °C 取込間隔 : 0.5 °C 時間取込間隔 : 10 sec

温度勾配 : 30 °C /hr 測定波長 : 270 nm Duplex : 2 μM or 5 μM

緩衝液 (final concentration) : 100 mM NaClO₄, 10 mM MOPS (pH 7.1)

or 1 M NaClO₄, 10 mM MOPS (pH 7.1)

<データ補間カット> 取込間隔 : 0.2 °C 開始温度 : 5 °C 終了温度 : 80 °C

<微分> アルゴリズム : 差分法 微分次数 : 1 次 データ間隔 : 11

<スムージング> 方式 : 単純移動平均 コンボリューション幅 : 7

融解温度 (T_m 値) 測定の基本操作 (V-660 で測定)

マイクロチューブに緩衝液 (×5) [500 mM NaClO₄, 50 mM MOPS (pH 7.1)] を 200 μL 加え, ここに duplex を構成する一本鎖 ODN を 2 nmol ずつ加え, 金属イオン水溶液を適量添加し, 全量が 1 mL となるように milliQ 水を加えた. 攪拌, 遠心後, アニーリングし, 下記に示した条件で温度変化測定を行った. 得られた融解曲線を一次微分し, T_m 値を求めた. 測定は少なくとも 2 回行い平均値を示した.

機種 : JASCO 社製 V-560

測光モード : Abs レスポンス : Medium バンド幅 : 2.0 nm

測定温度 (温度範囲) : 5 - 80 °C 取込間隔 : 0.5 °C 時間取込間隔 : 10 sec

温度勾配 : 30 °C /hr 測定波長 : 260 nm Duplex : 2 μM

緩衝液 (final concentration) : 100 mM NaClO₄, 10 mM MOPS (pH 7.1)

<データ補間カット> 取込間隔 : 0.2 °C 開始温度 : 5 °C 終了温度 : 80 °C

<微分> アルゴリズム : 差分法 微分次数 : 1 次 データ間隔 : 11

<スムージング> 方式 : 単純移動平均 コンボリューション幅 : 7

融解温度 (T_m) 測定/CD スペクトルで使用したオリゴデオキシヌクレオチドの構造確認

融解温度 (T_m) 測定/CD スペクトルに用いた日本遺伝子研究所より購入した ODNs 及び機能分子創製化学研究室で合成された ODNs の分子式と分子量の計算値と positive ion mode による実測値を示した. 各 1 本鎖を組み合わせて, 各 duplex とした.

Sequence	分子式	分子量+ H ⁺	
		計算値	実測値
5'CAT TGG AAT GAC GCT ^{3'}	C ₁₄₇ H ₁₈₅ N ₅₇ O ₈₈ P ₁₄	4593.0	4593.4
5'CAT TGG AGT GAC GCT ^{3'}	C ₁₄₇ H ₁₈₅ N ₅₇ O ₈₉ P ₁₄	4609.0	4608.1
5'CAT TGG ACT GAC GCT ^{3'}	C ₁₄₆ H ₁₈₅ N ₅₅ O ₈₉ P ₁₄	4569.0	4568.7
5'CAT TGG ATT GAC GCT ^{3'}	C ₁₄₇ H ₁₈₆ N ₅₄ O ₉₀ P ₁₄	4584.0	4583.2
3'GTA ACC TAA CTG CGA ^{5'}	C ₁₄₆ H ₁₈₄ N ₅₈ O ₈₆ P ₁₄	4562.0	4560.3
3'GTA ACC TGA CTG CGA ^{5'}	C ₁₄₆ H ₁₈₄ N ₅₈ O ₈₇ P ₁₄	4578.0	4577.4
3'GTA ACC TCA CTG CGA ^{5'}	C ₁₄₅ H ₁₈₄ N ₅₆ O ₈₇ P ₁₄	4538.0	4537.6
3'GTA ACC TTA CTG CGA ^{5'}	C ₁₄₆ H ₁₈₅ N ₅₅ O ₈₈ P ₁₄	4553.0	4552.9
5'AAA TCT GCG ^{3'}	C ₈₈ H ₁₁₁ N ₃₅ O ₅₁ P ₈	2723.8	2721.2
5'CAA TCT GCG ^{3'}	C ₈₇ H ₁₁₁ N ₃₃ O ₅₂ P ₈	2699.8	2699.4
5'TAA TCT GCG ^{3'}	C ₈₈ H ₁₁₂ N ₃₂ O ₅₃ P ₈	2714.8	2714.4
3'TTT AGA CGC ^{5'}	C ₈₈ H ₁₁₂ N ₃₂ O ₅₃ P ₈	2714.8	2714.5
3'TTT GGA CGC ^{5'}	C ₈₇ H ₁₁₂ N ₃₂ O ₅₄ P ₈	2730.8	2727.3
3'TTT CGA CGC ^{5'}	C ₈₇ H ₁₁₂ N ₃₀ O ₅₄ P ₈	2690.8	2687.5
3'TTT TGA CGC ^{5'}	C ₈₈ H ₁₁₃ N ₂₉ O ₅₅ P ₈	2705.8	2704.6
3'TTT AAA CGC ^{5'}	C ₈₈ H ₁₁₂ N ₃₂ O ₅₂ P ₈	2698.8	2697.0
3'TTT ACA CGC ^{5'}	C ₈₇ H ₁₁₂ N ₃₀ O ₅₃ P ₈	2674.8	2673.8

3' TTT ATA CGC 5'	C ₈₈ H ₁₁₃ N ₂₉ O ₅₄ P ₈	2689.8	2688.9
3' ATT AGA CGC 5'	C ₈₈ H ₁₁₁ N ₃₅ O ₅₁ P ₈	2723.8	2723.6
3' GTT AGA CGC 5'	C ₈₈ H ₁₁₁ N ₃₅ O ₅₂ P ₈	2739.8	2739.1
3' CTT AGA CGC 5'	C ₈₇ H ₁₁₁ N ₃₃ O ₅₂ P ₈	2699.8	2699.0
5' CAT TGG ATT TGA CGC T 3'	C ₁₅₇ H ₁₉₉ N ₅₆ O ₉₇ P ₁₅	4888.2	4887.1
5' CAT TGG ATT TTG ACG CT 3'	C ₁₆₇ H ₂₁₂ N ₅₈ O ₁₀₄ P ₁₆	5192.4	5192.7
5' CAT TGG ATT TTT TGA CGC T 3'	C ₁₈₇ H ₂₃₈ N ₆₂ O ₁₁₈ P ₁₈	5780.8	5800.0
5' CAT TGG ATT TTT TTT GAC GCT 3'	C ₂₀₇ H ₂₆₄ N ₆₆ O ₁₃₂ P ₂₀	6409.2	6407.6
5' CAT TGG ATT TTT TTT TTT GAC GCT 3'	C ₂₃₇ H ₃₀₃ N ₇₂ O ₁₅₃ P ₂₃	7321.8	7322.8
3' GTA ACC TTT ACT GCG A 5'	C ₁₅₆ H ₁₉₈ N ₅₇ O ₉₅ P ₁₅	4857.2	4854.6
3' GTA ACC TTT TAC TGC GA 5'	C ₁₆₆ H ₂₁₁ N ₅₉ O ₁₀₂ P ₁₆	5161.4	5159.0
3' GTA ACC TTT TTT ACT GCG A 5'	C ₁₈₆ H ₂₃₇ N ₆₃ O ₁₁₆ P ₁₈	5769.8	5767.9
3' GTA ACC TTT TTT TTA CTG CGA 5'	C ₂₀₆ H ₂₆₃ N ₆₇ O ₁₃₀ P ₂₀	6378.2	6375.8
3' GTA ACC TTT TTT TTT TTA CTG CGA 5'	C ₂₃₆ H ₃₀₂ N ₇₃ O ₁₅₁ P ₂₃	7290.8	7286.9
3' GTA ACC TAA ACT GCG A 5'	C ₁₅₆ H ₁₉₆ N ₆₃ O ₉₁ P ₁₅	4875.2	4874.9
3' GTA ACC TAA AAC TGC GA 5'	C ₁₆₆ H ₂₀₈ N ₆₈ O ₉₆ P ₁₆	5188.4	5186.9
3' GTA ACC TAA AAA ACT GCG A 5'	C ₁₈₆ H ₂₃₂ N ₇₈ O ₁₀₆ P ₁₈	5814.9	5812.3
3' GTA ACC TAA AAA AAA CTG CGA 5'	C ₂₀₆ H ₂₅₆ N ₈₈ O ₁₁₆ P ₂₀	6441.3	6439.6
3' GTA ACC TAA AAA AAA AAA CTG CGA 5'	C ₂₃₆ H ₂₉₂ N ₁₀₃ O ₁₃₁ P ₂₃	7380.9	7379.6

第一章の実験

第一節の実験

Figure 5. Effects of Hg^{II} ions on primer extension reaction.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 100 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し、10 μM dNTPs とし、Hg(ClO₄)₂ 溶液を適当な濃度となるよう (Hg^{II} 濃度 0-50 μM), DNA polymerase は、0.2 units/μL KF 溶液を 2 μL を加え、0.4 units KF とし、反応した。

Figure 6. Effects of Hg^{II} ions on primer extension reactions by KF.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 100 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し、10 μM dNTPs とし、Hg(ClO₄)₂ 溶液を適当な濃度となるよう (Figure 6b; Hg^{II} 濃度 0-50 μM, Figure 6c; Hg^{II} 濃度 0-1000 μM.), DNA polymerase は、0.2 units/μL KF 溶液を 2 μL を加え、0.4 units KF とし、反応した。

Figure 7. Primer extension reactions in the presence of Hg^{II} ions by KF.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 100 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し、10 μM dNTPs とし、200 μM Hg(ClO₄)₂ 溶液を 1.5 μL 添加し、15 μM Hg^{II} とし、DNA polymerase は、0.2 units/μL KF 溶液を 2 μL を加え、0.4 units KF とし、反応した。

Figure 8. Primer extension reactions in the presence of Hg^{II} ions by KF and thier MALDI-TOF mass analyses.

MALDI-TOF MS の基本条件のもと操作を行った。各 7 mM dNTPs 溶液を 3 μL ずつ

添加し，420 μM dNTPs とし，1 mM $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ 溶液を 2.5 μL 添加し，50 μM Hg^{II} とし，DNA polymerase は，0.4 units/ μL KF 溶液を 2 μL を加え，0.8 units KF とし，反応した。

反応生成物である full-length product の分子式並びに分子量の計算値及び実測値は以下に示した。

	分子式	分子量- H^+	
		計算値	実測値
Full-length product	$\text{C}_{261}\text{H}_{317}\text{N}_{94}\text{O}_{151}\text{P}_{24}$	7929.3	7930.6

第二節の実験

Figure 9. Effects of counter anion (perchloric anion) on the primer extension reaction by KF.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 100 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し，10 μM dNTPs とし，各 200 μM $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Hg}(\text{OCOCH}_3)_2$ 溶液を 1.5 μL 添加し，15 μM $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Hg}(\text{OCOCH}_3)_2$ とし，DNA polymerase は，0.2 units/ μL KF 溶液を 2 μL を加え，0.4 units KF とし，反応した。

Figure 10. Effects of various metal ions on the primer extension reaction by KF.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 100 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し，10 μM dNTPs とし，各 200 μM の $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$, MnCl_2 , FeCl_2 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, CuCl_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, AuCl 溶液を 1.5 μL 添加し，15 μM 金属イオンとし，DNA polymerase は，0.2 units/ μL KF 溶液を 2 μL を加え，0.4 units KF とし，反応した。

Figure 11b. Primer extension reactions in the presence of Hg^{II} ions by Taq polymerase.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 300 μM

dNTPs 溶液を 2 μ L ずつ添加し, 30 μ M dNTPs とし, 200 μ M Hg(ClO₄)₂ 溶液を 5 μ L 添加し, 50 μ M Hg^{II} とし, DNA polymerase は, 0.4 units/ μ L γ Taq polymerase 溶液を 2 μ L を加え, 0.8 units γ Taq polymerase とし, 反応した.

Figure 11c. Primer extension reactions in the presence of Hg^{II} ions by KOD Dash polymerase.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った. 各 100 μ M dNTPs 溶液を 2 μ L ずつ添加し, 10 μ M dNTPs とし, 200 μ M Hg(ClO₄)₂ 溶液を 2.5 μ L 添加し, 25 μ M Hg^{II} とし, DNA polymerase は, 0.2 units/ μ L KOD Dash polymerase 溶液を 2 μ L を加え, 0.4 units KOD Dash polymerase とし, 反応した.

第二章の実験

第一節の実験

Figure 12. Effects of Ag^{I} ion concentration on the primer extension reaction by KF.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 200 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し、20 μM dNTPs とし、 AgNO_3 溶液を適当な濃度となるよう (Figure 11b; Ag^{I} 濃度 0-50 μM , Figure 11c; Ag^{I} 濃度 0-1000 μM)、DNA polymerase は、0.15 units/ μL KF 溶液を 2 μL を加え、0.3 units KF とし、反応した。

Figure 13. Single nucleotide insertions into the site opposite C in the template in the presence or absence of Ag^{I} ions by KF.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 200 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し、20 μM dNTPs とし、200 μM AgNO_3 溶液を 3.0 μL 添加し、30 μM Ag^{I} とし、DNA polymerase は、0.15 units/ μL KF 溶液を 2 μL を加え、0.3 units KF とし、反応した。

Figure 14. Primer extension reactions in the presence or absence of Ag^{I} ions by KF and thier MALDI-TOF mass analyses.

MALDI-TOF MS の基本条件のもと操作を行った。各 7 mM dNTPs 溶液を 3 μL ずつ添加し、420 μM dNTPs とし、1 mM AgNO_3 溶液を 2.5 μL 添加し、50 μM Ag^{I} とし、DNA polymerase は、0.4 units/ μL KF 溶液を 2 μL を加え、0.8 units KF とし、反応した。

反応生成物である full-length product の分子式並びに分子量の計算値及び実測値は以下に示した。

	分子式	分子量- H ⁺	
		計算値	実測値
Full-length product	C ₂₅₇ H ₃₁₆ N ₈₉ O ₁₄₇ P ₂₄	7746.2	7746.6

Figure 15. Effects of counter anion (nitrate anion) on the primer extension reaction by KF.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 200 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し、20 μM dNTPs とし、各 200 μM AgNO₃, NaNO₃, Mg(NO₃)₂ 溶液を 3 μL 添加し、30 μM AgNO₃, NaNO₃, Mg(NO₃)₂ とし、DNA polymerase は、0.15 units/μL KF 溶液を 2 μL を加え、0.3 units KF とし、反応した。

Figure 16. Amounts of the full-length product of metal ion-mediated reactions relative to that of Ag^I ion-mediated reaction.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。dNTPs は、各 200 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し、20 μM dNTPs とし、各 200 μM の AgNO₃, MnCl₂, FeCl₂, Fe(NO₃)₂, Co(NO₃)₂, Ni(NO₃)₂, CuCl, CuCl₂, Zn(NO₃)₂, Cd(NO₃)₂, AuCl, AuCl₃, Hg(ClO₄)₂, TlNO₃, Pb(NO₃)₂ 溶液を 3 μL 添加し、30 μM 金属イオン水溶液とし、DNA polymerase は、0.15 units/μL KF 溶液を 2 μL を加え、0.3 units KF とし、反応した。PAGE の結果を LAS-3000 Image Analyzer にて撮影後、Multi Gauge Ver 3.0 (FUJIFILM) により、各レーンの総蛍光強度に対する各レーンの full-length product の蛍光強度の割合を算出した。この操作を計 5 回繰り返して、算出された結果の平均値と標準偏差を示した。

Figure 17a. Primer extension reactions in the presence of Ag^I ions by Taq polymerase.

Figure 17b. Single nucleotide insertions at the site opposite C in the template by Taq polymerase.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った．各 500 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し，50 μM dNTPs とし，1000 μM AgNO_3 溶液を 2.0 μL 添加し，100 μM Ag^{I} とし，DNA polymerase は，1.25 units/ μL γTaq polymerase 溶液を 2 μL を加え，2.5 units γTaq polymerase とし，反応した．

Figure 18a. Primer extension reactions in the presence of Ag^{I} ions by KOD Dash polymerase.

Figure 18b. Single nucleotide insertions at the site opposite C in the template by KOD Dash polymerase.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った．各 200 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し，20 μM dNTPs とし，250 μM AgNO_3 溶液を 2.0 μL 添加し，25 μM Ag^{I} とし，DNA polymerase は，0.2 units/ μL KOD Dash polymerase 溶液を 2 μL を加え，0.4 units KOD Dash polymerase とし，反応した．

Figure 21. Distance of N1-N9 of Watson-Crick base pairs,

1-methylcytosine- Ag^{I} -9-methyladenine (*syn*) and 1-methylcytosine- Ag^{I} -9-methyladenine (*anti*) by DFT calculations.

Spartan の A-T 塩基対の template を用い，構造の最適化計算せず，N1-N9 間の距離を求めた．

Spartan で 1-methylcytosine- Ag^{I} -9-methyladenine (*syn*) 及び 1-methylcytosine- Ag^{I} -9-methyladenine (*anti*) を作成した．1-methylcytosine- Ag^{I} -9-methyladenine (*syn*) では，C4-N3-N7-C8 二面角を 180 度と，N3- Ag^{I} -N7 角度を 180 度に固定し，MMFF で最適化した．最適化後，固定した拘束を外し，DFT にて計算し，N1-N9 間の距離を求めた．1-methylcytosine- Ag^{I} -9-methyladenine (*anti*) では，C4-N3-N1-C2 二面角を 180 度と，N3- Ag^{I} -N1 角度を 180 度に固定し，MMFF で最適化した．最適化後，固定した拘束を外

し、DFT にて計算し、N1-N9 間の距離を求めた。

第二節の実験

Figure 22. Primer extension reaction at the various concentrations of Ag^{I} ions through the incorporation of dTTP or dCTP into the site opposite C or T in the template by KF exo-.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 200 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し、20 μM dNTPs とし、 AgNO_3 溶液を適当な濃度となるよう (Ag^{I} 濃度 0-500 μM)、DNA polymerase は、0.12units/ μL KF exo-溶液を 2 μL を加え、0.4 units KF exo-とし、反応した。

Figure 23. Single nucleotide insertions into the sites opposite C or T in the presence or absence of Ag^{I} ions by KF exo-.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 100 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し、10 μM dNTPs とし、200 μM AgNO_3 溶液を 1.5 μL 添加し、15 μM Ag^{I} とし、DNA polymerase は、0.1units/ μL KF exo-溶液を 2 μL を加え、0.2 units KF exo-とし、反応した。

Figure 24. MALDI-TOF mass spectrum of extension products obtained by the incorporation of dTTP into the site opposite C in the presence of Ag^{I} ions by KF exo-.

MALDI-TOF MS の基本条件のもと操作を行った。各 7mM dNTPs 溶液を 3 μL ずつ添加し、420 μM dNTPs とし、1 mM AgNO_3 溶液を 2.5 μL 添加し、50 μM Ag^{I} とし、DNA polymerase は、0.4units/ μL KF exo-溶液を 2 μL を加え、0.8 units KF exo-とし、反応した。

反応生成物である full-length product の分子式並びに分子量の計算値及び実測値は以下に示した。

	分子式	分子量- H ⁺	
		計算値	実測値
Full-length product	C ₂₅₇ H ₃₁₉ N ₈₀ O ₁₅₃ P ₂₄	7719.2	7718.6

Figure 25. MALDI-TOF mass spectrum of extension products obtained by the incorporation of dCTP into the site opposite T in the presence of Ag^I ions by KF exo-.

MALDI-TOF MS の基本条件のもと操作を行った。各 7mM dNTPs 溶液を 3 μL ずつ添加し、420 μM dNTPs とし、1 mM AgNO₃ 溶液を 2.5 μL 添加し、50 μM Ag^I とし、DNA polymerase は、0.4units/μL KF exo-溶液を 2 μL を加え、0.8 units KF exo-とし、反応した。

反応生成物である full-length product の分子式並びに分子量の計算値及び実測値は以下に示した。

	分子式	分子量- H ⁺	
		計算値	実測値
Full-length product	C ₂₅₈ H ₃₂₀ N ₇₉ O ₁₅₄ P ₂₄	7704.1	7704.9

Figure 26. Effects of counter anion (nitrate anion) on primer extension reaction through the incorporation of dTTP or dCTP into the site opposite C or T in the template by KF exo-.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 200 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し、20 μM dNTPs とし、各 200 μM AgNO₃, NaNO₃, Mg(NO₃)₂ 溶液を 1.5 μL 添加し、15 μM AgNO₃, NaNO₃, Mg(NO₃)₂ とし、DNA polymerase は、0.2units/μL KF exo-溶液を 2 μL を加え、0.4 units KF exo-とし、反応した。

Figure 27. Primer extension reactions in the presence of various metal ions, in which dTTP or dCTP is incorporated into the site opposite C or T in the template by KF exo-

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。dNTPs は、各 200 μ M dNTPs 溶液を 2 μ L ずつ添加し、20 μ M dNTPs とし、各 200 μ M の AgNO_3 , MnCl_2 , FeCl_2 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, CuCl_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, AuCl_3 , $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$, TlNO_3 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 溶液を 0.5 μ L 添加し、5 μ M 金属イオン水溶液とし、DNA polymerase は、0.2units/ μ L KF exo-溶液を 2 μ L を加え、0.3 units KF exo-とし、反応した。

Figure 28. Single nucleotide insertions into the site opposite T in the presence or absence of Hg^{II} ions.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 100 μ M dNTPs 溶液を 2 μ L ずつ添加し、10 μ M dNTPs とし、200 μ M $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ 溶液を 0.5 μ L 添加し、5 μ M Hg^{II} とし、DNA polymerase は、0.1units/ μ L KF exo-溶液を 2 μ L を加え、0.2 units KF exo-とし、反応した。

Figure 29. Primer extension reactions, in which dTTP or dCTP is incorporated into the site opposite C or T in the template by Taq polymerase.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 800 μ M dNTPs 溶液を 2 μ L ずつ添加し、80 μ M dNTPs とし、200 μ M AgNO_3 溶液を 3 μ L 添加し、30 μ M Ag^{I} とし、DNA polymerase は、1.5units/ μ L γ Taq polymerase 溶液を 2 μ L を加え、3 units γ Taq polymerase とし、反応した。

第三章の実験

第一節の実験

Table 5. T_m values of mismatch-containing duplexes and full-match duplexes in the presence and absence of Ag^{I} ions.

Figure 30. Melting profiles of C-A, C-T, and C-C mismatch-containing duplexes and T-A and C-G full-match duplexes in the presence and absence of 1 equivalent of Ag^{I} ions at 270 nm.

融解温度 (T_m 値) 測定の基本操作 (V-560 で測定) のもと操作を行った. Duplex 濃度は $2 \mu\text{M}$ とし, $100 \mu\text{M}$ AgNO_3 水溶液を適当な当量 (0 eq.: $0 \mu\text{L}$, 1 eq.: $60 \mu\text{L}$) となるように添加した.

Table 6. Melting temperatures (T_m) of fully matched and mismatch-containing duplexes in the presence of various amounts of Ag^{I} ion.

Figure 31. Melting profiles of C-A, C-T, and C-C mismatch-containing duplexes and T-A and C-G full-match duplexes in the presence of various equivalents of Ag^{I} ions at 270 nm.

融解温度 (T_m 値) 測定の基本操作 (V-560 で測定) のもと操作を行った. Duplex 濃度は $2 \mu\text{M}$ とし, $100 \mu\text{M}$ AgNO_3 水溶液を適当な当量 (0 eq.: $0 \mu\text{L}$, 0.25 eq.: $15 \mu\text{L}$, 0.5 eq.: $30 \mu\text{L}$, 0.75 eq.: $45 \mu\text{L}$, 1 eq.: $60 \mu\text{L}$, 1.5 eq.: $90 \mu\text{L}$, 2 eq.: $120 \mu\text{L}$) となるように添加した.

Figure 32. The first-derivative plots of the melting curves of duplex C-A, C-T and C-C.

Figure 31 で得られた C-A, C-T, C-C ミスマッチ塩基対を含んだ二重鎖 ODNs の融解曲線を一次微分し, プロットした.

Figure 33. CD spectra of C-A, C-T, and C-C mismatch-containing duplexes and T-A and C-G full-match duplexes in the presence of 0, 1 or 2 equivalents of Ag^{I} ions.

融解温度 (T_m 値) 測定の基本操作 (V-560 で測定) と同様のサンプル調製の操作を行い, サンプルを調製した. Duplex 濃度は $2 \mu\text{M}$ とし, $100 \mu\text{M}$ AgNO_3 水溶液を適当な当量 (0 eq.: $0 \mu\text{L}$, 1 eq.: $60 \mu\text{L}$, 2 eq.: $120 \mu\text{L}$) となるように添加した. これをアニーリングし, MILLIPORE 社製 Millex[®]-LG $0.20 \mu\text{m}$ で濾過後, 以下の条件で CD スペクトルを測定した.

機種 : JASCO 社製 J-820

感度 : Standard 測定波長 : $330 - 220 \text{ nm}$ データ取込間隔 : 0.1 nm

走査モード : continuous 走査速度 : 50 nm/min Response : 1 sec バンド幅 : 1 nm

積算 : 4 回 測定温度 : $25 \text{ }^\circ\text{C}$ Duplex : $2 \mu\text{M}$ Ag^{I} : 0, 1, 2 eq. ($0, 2, 4 \mu\text{M}$)

緩衝液 (final concentration) : 100 mM NaClO_4 , 10 mM MOPS ($\text{pH } 7.1$)

Table 7. Effects of metal ions on melting temperature (T_m) of duplexes C-A, A-C, C-T and T-C.

融解温度 (T_m 値) 測定の基本操作 (V-560 で測定) のもと操作を行った. Duplex 濃度は $2 \mu\text{M}$ とし, 金属イオンとして, $100 \mu\text{M}$ AgNO_3 , $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ 水溶液を $60 \mu\text{L}$, $200 \mu\text{M}$ MnCl_2 , FeCl_2 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, CuCl_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, AuCl_3 , TlNO_3 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 溶液を $30 \mu\text{L}$ 加えた.

第二節の実験

Table 9. T_m values of duplexes containing a mismatched base pair at the internal site in the presence and absence of one equivalent metal ions.

Table 10. T_m values of duplexes containing a mismatched base pair at the terminal site in the presence and absence of one equivalent metal ions

融解温度 (T_m 値) 測定の基本操作 (V-560 で測定) のもと操作を行った. 緩衝液は, 1 M NaClO_4 , 10 mM MOPS ($\text{pH } 7.1$) を使用した. Duplex 濃度は $5 \mu\text{M}$ とし, $100 \mu\text{M}$ AgNO_3 水溶液及び $100 \mu\text{M}$ $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ 水溶液を適当な当量 (0 eq.: $0 \mu\text{L}$, 1 eq.: $60 \mu\text{L}$) となるように添

加した.

第三節の実験

Figure 34b. PAGE analysis of single-nucleotide insertions into the sites opposite C in the template strands catalyzed by KF exo-.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った. 各 100 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し, 10 μM dNTPs とし, 200 μM AgNO_3 溶液を 1 μL 添加し, 10 μM Ag^{I} とし, DNA polymerase は, 0.1 units/ μL KF exo- 溶液を 2 μL を加え, 0.2 units KF exo- とし, 反応した.

Figure 34c. PAGE analysis of single-nucleotide insertions into the sites opposite C in the template strands catalyzed by KF exo-.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った. 各 100 μM dNTPs 溶液を 3 μL ずつ添加し, 10 μM dNTPs とし, 200 μM AgNO_3 溶液を 1 μL 添加し, 10 μM Ag^{I} とし, DNA polymerase は, 0.3 units/ μL KF exo- 溶液を 2 μL を加え, 0.6 units KF exo- とし, 反応した.

Figure 35. MALDI-TOF mass spectrum of extension products obtained by the incorporation of dCTP into the site opposite C in the presence of Ag^{I} ions by KF exo-.

MALDI-TOF MS の基本条件のもと操作を行った. 各 10 mM dNTPs 溶液を 5 μL ずつ添加し, 1 mM dCTP とし, 200 μM AgNO_3 溶液を 2.5 μL 添加し, 10 μM Ag^{I} とし, DNA polymerase は, 0.75 units/ μL KF exo- 溶液を 2 μL を加え, 1.5 units KF exo- とし, 反応した.

反応生成物である full-length product の分子式並びに分子量の計算値及び実測値は以

下に示した.

	分子式	分子量- H ⁺	
		計算値	実測値
Full-length product	C ₂₅₇ H ₃₁₇ N ₈₆ O ₁₅₀ P ₂₄	7753.2	7752.7

第四章の実験

第一節の実験

Figure 36. Hg^{II}-promoted primer extension reactions on the primed templates containing two T residues by KF.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 100 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し、10 μM dNTPs とし、200 μM $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ 溶液を 3 μL 添加し、30 μM Hg^{II} とし、DNA polymerase は、0.1 units/ μL KF 溶液を 2 μL を加え、0.2 units KF とし、反応した。

Figure 37. Hg^{II}-promoted primer extension reactions on the primed templates containing two consecutive T residues by KF.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 100 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し、10 μM dNTPs とし、200 μM $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ 溶液を 3 μL 添加し、30 μM Hg^{II} とし、DNA polymerase は、0.1 units/ μL KF 溶液を 2 μL を加え、0.2 units KF とし、反応した。

Figure 38. MALDI-TOF mass spectrum of extension products obtained by the incorporation of dTTP into the site opposite two consecutive T in the presence of Hg^{II} ions by KF.

MALDI-TOF MS の基本条件のもと操作を行った。各 7 mM dNTPs 溶液を 5 μL ずつ添加し、700 μM dNTPs とし、1 mM $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ 溶液を 2.5 μL 添加し、1 mM Hg^{II} とし、DNA polymerase は、0.6 units/ μL KF 溶液を 2 μL を加え、1.2 units KF とし、反応した。

反応生成物である full-length product の分子式並びに分子量の計算値及び実測値は以下に示した。

	分子式	分子量- H ⁺	
		計算値	実測値
Full-length product	C ₃₀₉ H ₃₇₈ N ₁₁₂ O ₁₈₂ P ₂₉	9470.3	9471.2

Figure 39. Hg^{II}-promoted primer extension reactions on the templates containing three, four five, seven and ten consecutive T residues by KF.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。各 100 μM dNTPs 溶液を 2 μL ずつ添加し、10 μM dNTPs とし、200 μM Hg(ClO₄)₂ 溶液を 3 μL 添加し、30 μM Hg^{II} とし、DNA polymerase は、0.1 units/μL KF 溶液を 2 μL を加え、0.2 units KF とし、反応した。

Figure 40. MALDI-TOF mass spectrum of extension products obtained by the incorporation of dTTP into the site opposite three consecutive T in the presence of Hg^{II} ions by KF.

MALDI-TOF MS の基本条件のもと操作を行った。各 7 mM dNTPs 溶液を 5 μL ずつ添加し、700 μM dNTPs とし、1 mM Hg(ClO₄)₂ 溶液を 2.5 μL 添加し、1 mM Hg^{II} とし、DNA polymerase は、1.0 units/μL KF 溶液を 2 μL を加え、2.0 units KF とし、反応した。

反応生成物である full-length product の分子式並びに分子量の計算値及び実測値は以下に示した。

	分子式	分子量- H ⁺	
		計算値	実測値
Full-length product	C ₃₁₉ H ₃₉₁ N ₁₁₄ O ₁₈₉ P ₃₀	9774.5	9774.8

Figure 41. Hg^{II}-promoted primer extension reactions on the templates containing the four consecutive T residues by KF.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。100 μM dGTP, dCTP 溶液を 2 μL ずつ添加し, 10 μM dGTP, dCTP とし, 1 mM dTTP 溶液を 2 μL ずつ添加し, 100 μM dTTP とし, 200 μM $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ 溶液を 3 μL 添加し, 30 μM Hg^{II} とし, DNA polymerase は, 0.1 units/ μL KF 溶液を 2 μL を加え, 0.2 units KF とし, 反応した。

Figure 42b. Hg^{II} -promoted primer extension reactions on the primed templates containing five consecutive T- Hg^{II} -T base pairs by KF exo-.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。ただし反応緩衝液を 0.5 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH7.9) を使用し, Mg^{2+} 非存在下で反応を行った。5 mM dTTP 溶液を 2 μL 添加し, 500 μM dTTP とし, 200 μM $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ 溶液を 3 μL 添加し, 30 μM Hg^{II} とし, DNA polymerase は, 1.0 units/ μL KFexo- 溶液を 2 μL を加え, 2.0 units KF exo- とし反応した。反応 60 min 後, 反応の進行を確認するため, 1 μL を取り, milliQ 水 9 μL と合わせた。残り反応溶液に 5 mM dGTP, dCTP 溶液を 2 μL ずつ添加し, 500 μM dGTP, dCTP とし, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 min 間反応させた。

Figure 42c. Hg^{II} -promoted primer extension reactions on the primed templates containing seven consecutive T- Hg^{II} -T base pairs by KF exo-.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。ただし反応緩衝液を 0.5M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH7.9) を使用し, Mg^{2+} 非存在下で反応を行った。5 mM dTTP 溶液を 2 μL 添加し, 500 μM dTTP とし, 200 μM $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ 溶液を 3 μL 添加し, 30 μM Hg^{II} とし, DNA polymerase は, 2.0 units/ μL KF exo- 溶液を 2 μL を加え, 4.0 units KF exo- とし反応した。反応 60 min 後, 反応の進行を確認するため, 1 μL を取り, milliQ 水 9 μL と合わせた。残り反応溶液に 5 mM dGTP, dCTP 溶液を 2 μL ずつ添加し, 500 μM dGTP, dCTP とし, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 min 間反応させた。

Figure 42d. Hg^{II}-promoted primer extension reactions on the primed templates containing ten consecutive T-Hg^{II}-T base pairs by KF exo-.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。ただし反応緩衝液を 0.5M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH7.9) を使用し, Mg²⁺ 非存在下で反応を行った。5 mM dTTP 溶液を 2 μL 添加し, 500 μM dTTP とし, 200 μM Hg(ClO₄)₂ 溶液を 3 μL 添加し, 30 μM Hg^{II} とし, DNA polymerase は, 2.0 units/μL KF exo- 溶液を 2 μL を加え, 4.0 units KF exo- とし反応した。反応 60 min 後, 反応の進行を確認するため, 1 μL を取り, milliQ 水 9 μL と合わせた。残り反応溶液に 5 mM dGTP, dCTP 溶液を 2 μL ずつ添加し, 500 μM dGTP, dCTP とし, 37 °C で 30 min 間反応させた。

Figure 43. Formation of ten consecutive T-Hg^{II}-T base pairs by KF exo- and Therminator DNA polymerase.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。ただし反応緩衝液を 0.5 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH7.9) を使用し, Mg²⁺ 非存在下で反応を行った。5 mM dTTP 溶液を 2 μL 添加し, 500 μM dTTP とし, 200 μM Hg(ClO₄)₂ 溶液を 3 μL 添加し, 30 μM Hg^{II} とし, DNA polymerase は, 0.15 units/μL Therminator 溶液を 2 μL を加え, 0.3 units Therminator とし, 70 °C で 60 min 間反応させた。60 min 反応後, 20 mM dGTP, dCTP 溶液を 0.5 μL 添加し, 500 μM dGTP, dCTP とし, 5.0 units/μL KF exo- 溶液を 1 μL を加え, 5.0 units KF exo- とし, 37 °C で 30 min 間反応させた。

Figure 44. Hg^{II}-promoted primer extension reactions on the primed templates containing twentyconsecutive T residues by Therminator DNA polymerase and KF exo-.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。ただし反応緩衝液を 0.5 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH7.9) を使用し, Mg²⁺ 非存在下で反応を行った。5 mM dTTP 溶液を 2 μL 添加し, 500 μM dTTP とし, 200 μM Hg(ClO₄)₂ 溶液を 3 μL 添加し,

30 μM Hg^{II} とし, DNA polymerase は, 0.3 units/ μL Therminator 溶液を 2 μL を加え, 0.6 units Therminator とし, 70 $^{\circ}\text{C}$ で 60 min 間反応させた. 60 min 反応後, 20 mM dGTP, dCTP 溶液を 0.5 μL 添加し, 500 μM dGTP, dCTP とし, 5.0 units/ μL KF *exo-* 溶液を 1 μL を加え, 5.0 units KF *exo-* とし, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 min 間反応させた.

Table 17. Melting temperatures (T_m) of fully matched and consecutive T-T mismatched-containing duplexes in the presence or absence of various amounts of Hg^{II} ion.

Figure 45. Melting profiles of duplexes containing of one, two, three, five, seven and ten consecutive T-T mismatched base pairs in the presence or absence of various equivalents of Hg^{II} ions at 260 nm.

融解温度 (T_m 値) 測定の基本操作 (V-660 で測定) のもと操作を行った. Duplex 濃度は 2 μM とし, 100 μM $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ 水溶液を適当な当量 (0 eq.: 0 μL , 1 eq.: 20 μL , 2 eq.: 40 μL , 3 eq.: 60 μL , 4 eq.: 80 μL , 5 eq.: 100 μL , 6 eq.: 120 μL , 7 eq.: 140 μL , 8 eq.: 160 μL , 9 eq.: 180 μL , 10 eq.: 200 μL) となるように添加した.

第二節の実験

Figure 47. Primer extension reactions in the presence or absence of Ag^{I} and/or Hg^{II} ions by KF *exo-*.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った. 200 μM dTTP 溶液を 3 μL 添加し, 30 μM dTTP とし, 20 μM $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ 溶液を 2 μL 添加し, 2 μM Hg^{II} とし, 20 μM AgNO_3 溶液を 2 μL 添加し, 2 μM Ag^{I} とし, DNA polymerase は, 0.2 units/ μL KF *exo-* 溶液を 2 μL を加え, 0.4 units KF *exo-* とし, 反応した.

Figure 48. MALDI-TOF mass analysis of the primer extension reaction with Ag^{I} and/or Hg^{II} ions.

MALDI-TOF MS の基本条件のもと操作を行った。各 10 mM dTTP 溶液を 4 μ L 添加し、800 μ M dTTP とし、200 μ M Hg(ClO₄)₂ 溶液を 2.5 μ L 添加し、10 μ M Hg^{II} とし、200 μ M AgNO₃ 溶液を 2.5 μ L 添加し、10 μ M Ag^I とし、DNA polymerase は、0.6 units/ μ L KF exo- 溶液を 2 μ L を加え、1.2 units KF exo- とし、反応した。

反応生成物である full-length product の分子式並びに分子量の計算値及び実測値は以下に示した。

	分子式	分子量- H ⁺	
		計算値	実測値
Full-length product	C ₃₃₃ H ₄₁₆ N ₈₈ O ₂₀₈ P ₃₁	9938.6	9939.6

Figure 49. Primer extension reactions in the presence or absence of Ag^I and/or Hg^{II} ions by KF exo-.

プライマー伸長反応／一塩基伸長反応の基本条件のもと操作を行った。200 μ M dTTP 溶液を 3 μ L 添加し、30 μ M dTTP とし、20 μ M Hg(ClO₄)₂ 溶液を 2 μ L 添加し、2 μ M Hg^{II} とし、20 μ M AgNO₃ 溶液を 2 μ L 添加し、2 μ M Ag^I とし、DNA polymerase は、0.2 units/ μ L KF exo- 溶液を 2 μ L を加え、0.4 units KF exo- とし、反応した。

引用文献

- 1) J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature*, **171**, 737-738 (1953).
- 2) a) K. Hoogsteen, *Acta. Cryst.*, **16**, 907-916 (1963); b) Y. Kyogoku, R. C. Lord, A. Rich, *Science*, **154**, 518 (1966).
- 3) a) H. S. Alvey, F. L. Gottardo, E. N. Nikolova, H. M. Al-Hashimi, *Nat. Commun.*, **5**:4786 (2014);
b) A. Rangadurai, H. Zhou, D. K. Merriman, N. Meiser, B. Liu, H. Shi, E. S. Szymanski, H. M. Al-Hashimi, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 11099-11114 (2018); c) Y. Xu, J. McSally, I. Andricioaei, M. Al-Hashimi, *Nat. Commun.*, **9**:1473 (2018).
- 4) a) J.-L. Mergny, J.-S. Sun, M. Rougée T. M.-Garestier, F. Barcelo, J. Chomiier, C. Hélène, *Biochemistry*, **30**, 9791-9798 (1991); b) A. J. Dingly, J. E. Masse, R. D. Peterson, M. Barfield, J. Feigon, S. Grzesiek, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6019-6027 (1999); c) D. Rhodes, H. J. Lipps, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8627-8637 (2015).
- 5) a) G. H. Clever, C. Kaul, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 6226-6236 (2007); b) G. H. Clever, M. Shionoya, *Coord. Chem. Rev.*, **254**, 2391-2402 (2010); c) Y. Takezawa, M. Shionoya, *Acc. Chem. Res.*, **45**, 2066-2076 (2012); d) S. Taherpour, O. Golubev, T. Lönnberg, *Inorg. Chem. Acta.*, **452**, 43-49 (2016); e) J. Müller, *Coord. Chem. Rev.*, **393**, 37-47 (2019); f) K. Tanaka, M. Shionoya, *J. Org. Chem.*, **64**, 5002-5003 (1999); g) S. Atwell, E. Meggers, G. Spraggon, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 12364-12367 (2001); h) K. Tanaka, Y. Yamada, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8802-8803 (2002); i) C. Switzer, S. Shinha, P. H. Kim, B. D. Heuberger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 1529-1532 (2005); j) K. Tanaka, G. H. Clever, Y. Takezawa, Y. Yamada, C. Kaul, M. Shionoya, T. Carell, *Nature Nanotechnol.*, **1**, 190-194 (2006); k) G. H. Clever, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 250-253 (2007); l) Y. Takezawa, W. Maeda, K.

- Tanaka, M. Shionoya, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 1081-1084 (2009); m) S. Johannsen, N. Megger, D. Böhme, R. K. O. Sigel, J. Müller, *Nat. Chem.*, **2**, 229-234 (2010); n) Y. Takezawa, K. Nishiyama, T. Mashima, M. Katahira, M. Shionoya, *Chem. Eur. J.*, **21**, 14713-14716 (2015); o) I. Sinha, C. Fonseca Guerra, J. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 3603-3606 (2015); p) N. Santamaria-Diaz, J. M. Méndez-Arriaga, J. M. Salas, M. A. Galindo, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 6170-6174 (2016); q) J. Biswarup, J. Müller, *Chem. Eur. J.*, **23**, 17166-17178 (2017); r) Y. Takezawa, J. Müller, M. Shionoya, *Chem. Lett.*, **46**, 622-633 (2017); s) O. Nakagawa, A. Fujii, Y. Kishimoto, Y. Nakatsuji, N. Nozaki, S. Obika, *ChemBioChem*, **19**, 2372-2379 (2018); t) B. Jash, J. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 9524-9527 (2018); u) B. Jash, J. Müller, *J. Inorg. Biochem.*, **186**, 301-306 (2018).
- 6) a) K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shionoya, *Science*, **299**, 1212-1213 (2003); b) G. H. Clever, S. J. Reitmeier, T. Carell, O. Schiemann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 4927-4929 (2010).
- 7) S. Liu, G. H. Clever, Y. Takezawa, M. Kaneko, K. Tanaka, X. Guo, M. Shionoya, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 8886-8890 (2011).
- 8) a) J. Liu, Y. Lu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 7587-7590 (2007); b) L. Qi, Y. Zhao, H. Yuan, K. Bai, Y. Zhan, F. Chen, Y. Dong, Y. Wu, *Analst*, **137**, 2799-2802 (2012).
- 9) F. Li, Y. Fang, S. Liu, B. Tang, *Chem. Commun.*, **47**, 6347-6349 (2011).
- 10) a) M. Wang, K-H. Leung, S. Lin, D. S.-H. Chan, C.-H. Leung, D.-L. Ma, *J. Mater. Chem. B*, **2**, 6467-6471 (2014); b) W. Gao, L. Zhang, R-P. Liang, J-D. Qiu, *Chem. Eur. J.*, **21**, 15272-15279 (2015).
- 11) J. Liu, Y. Liu, *Chem. Sci.*, **4**, 1858-1863 (2013).
- 12) a) R. Freeman, T. Finder, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 7818-7821 (2009); b) W. T. Huang, Y. Shi, W. Y. Xie, H. Q. Luo, N. B. Li, *Chem. Commun.*, **47**, 7800-7802 (2011); c) X.

- Zhu, H. Xu, X. Gao, X. Li, Q. Liu, Z. Lin, B. Qiu, G. Chen, *Chem. Commun.*, **47**, 9080-9082 (2011); d) W. Y. Xie, W. T. Huang, N. B. Li, H. Q. Luo, *Chem. Commun.*, **48**, 82-84 (2012); e) G. Zhang, W. Lin, W. Yang, Z. Lin, L. Guo, B. Qin, G. Chen, *Analyst*, **137**, 2687-2691 (2012); f) H. Pei, L. Liang, G. Yao, J. Li, Q. Huang, C. Fan, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 9020-9024 (2012); g) N. Kanayama, T. Takarada, M. Fujita, M. Maeda, *Chem. Eur. J.*, **19**, 10794-10798 (2013); h) N. Cheng, P. Zhu, Y. Xu, K. Huang, Y. Luo, Z. Yang, W. Xu, *Biosens. Bioelectron.*, **84**, 1-6 (2016).
- 13) Z-G. Wang, J. Elbaz, I. Willner, *Nano. Lett.*, **11**, 304-309 (2011).
- 14) a) J. Kondo, Y. Tada, T. Dairaku, Y. Hattori, H. Saneyoshi, A. Ono, Y. Tanaka, *Nat. Chem.*, **9**, 956-960 (2017); b) S. Vecchion, M. C. Capece, E. Toomey, L. Ngyuyen, A. Ray, A. Greenberg, K. Fujishima, J. Urbina, I. G. Paulino-Lima, V. Pinheiro, J. Shih, G. Wessel, S. J. Winf, L. Rothschild, *Sci. Rep.*, **9**:6942 (2019).
- 15) a) S. J. Kim, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6164-6171 (2006); b) Z. Lin, X. Li, H.-B. Kraatz, *Anal. Chem.*, **83**, 6896-6901 (2011); c) A. Ono, H. Togashi, *Angew. Chme. Int. Ed.*, **43**, 4300-4302 (2004); b) J.-S. Lee, M. S. Han, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4093-4096 (2007); d) Z. Wang, J. H. Lee, Y. Lu, *Chem. Commun.*, 6005-6007 (2008); e) Y.-H. Lin, W.-L. Tseng, *Chem. Commun.*, 6619-6621 (2009); f) L. Zhang, T. Li, B. Li, J. Li, E. Wang, *Chem. Commun.*, **46**, 1476-1478 (2010); g) G. M.-Piperberg, R. T.-Vered, J. Elbaz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 6878-6879 (2010); h) Y. Wen, F. Xing, S. He, S. Song, L. Wang, Y. Long, D. Li, C. Fan, *Chem. Commun.*, **46**, 2596-2598 (2010); i) W. Y. Xie, W. T. Huang, N. B. Li, H. Q. Luo, *Analyst*, **136**, 4130-4133 (2011); j) J. Zhao, Q. Fan, A. Duan, Y. Yin, G. Li, *Biosens. Bioelectron.*, **39**, 183-186 (2013); k) L. Qi, M. Xiao, F. Wang, L. Wang, W. Ji, T. Man, A. Aldalbahi, K. M. Naziruddin, G. Periyasami, M. Rahaman, A. Alrohaili, X. Qu, H. Pei, C. Wang, L. Li, *Nanoscale*, **9**, 14184 –14191 (2017).

- 16) a) Y.-W. Lin, H.-T. Ho, C.-C. Huang, H.-T. Chang, *Nucleic Acids Res.*, **36**, e123 (2008); b) H. Torigoe, A. Ono, T. Kozasa, *Transition Met. Chem.*, **36**, 131-144 (2011); c) B. Jash, J. Müller, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 3857-3861 (2017).
- 17) a) A. Kuzuya, Y. Sakai, T. Yamazaki, M. Komiyama, *Nat. Commun.*, **2**:449 (2011); b) X. Xing, Y. Feng, Z. Yu, K. Hidaka, F. Liu, A. Ono, H. Sugiyama, M. Endo, *Chem. Eur. J.*, **25**, 1446-1450 (2018).
- 18) a) Y. Miyake, H. Togashi, M. Tashiro, H. Yamaguchi, S. Oda, M. Kudo, Y. Tanaka, Y. Kondo, R. Sawa, T. Fujimoto, T. Machinami, A. Ono, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2172-2173 (2006); b) Y. Tanaka, S. Oda, H. Yamaguchi, Y. Kondo, C. Kojima, A. Ono, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 244-245 (2007); c) H. Torigoe, A. Ono, T. Kozasa, *Chem. Eur. J.*, **16**, 13218-13225 (2010); d) H. Yamaguchi, J. Šebera, J. Kondo, S. Oda, S. T. Komuro, T. Kawamura, T. Dairaku, Y. Kondo, I. Okamoto, A. Ono, J. V. Burda, V. Sychrovský, Y. Tanaka, *Nucleic acids Res.*, **42**, 4094-4099 (2014); e) J. Kondo, T. Yamada, C. Hirose, I. Okamoto, Y. Tanaka, A. Ono, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 2385-2388 (2014).
- 19) a) A. Ono, S. Cao, H. Togashi, M. Tashiro, T. Fujimoto, T. Machinami, S. Oda, Y. Miyake, I. Okamoto, Y. Tanaka, *Chem. Commun.*, 4825-4827 (2008); b) H. Torigoe, I. Okamoto, T. Dairaku, Y. Tanaka, A. Ono, T. Kozasa, *Biochemie*, **94**, 2431-2440 (2012); c) J. Kondo, Y. Tada, T. Dairaku, H. Saneyoshi, I. Okamoto, Y. Tanaka, A. Ono, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 13323-13326 (2015); d) T. Dairaku, K. Furuita, H. Sato, J. Severa, K. Nakashima, J. Kondo, D. Ymanaka, Y. Kondo, I. Okamoto, A. Ono, V. Sychrovsky, C. Kojima, Y. Tanaka, *Chem. Eur. J.*, **22**, 13208-13031 (2016).
- 20) a) A. Ono, H. Torigoe, Y. Tanaka, I. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 5855-5866 (2011); b) Y. Tanaka, J. Kondo, V. Sychrovsky, J. Šebera, T. Dairaku, H. Saneyoshi, H. Urata, H. Torigoe, A. Ono, *Chem. Commun.*, **51**, 17343-17360 (2015).

- 21) H. Urata, E. Yamaguchi, Y. Nakamura, S. Wada, *Chem. Commun.*, **47**, 941-943 (2011).
- 22) H. Liu, F. Shen, P. Haruehanroengra, Q. Yao, Y. Chen, Y. Chen, C. Yang, J. Zhang, B. Wu, Q. Luo, R. Cui, J. Li, J. Ma, J. Sheng, J. Gan, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56**, 9430-9434 (2017).
- 23) a) H. Liu, C. Cai, P. Haruehanroengra, Q. Yao, Y. Chen, C. Yang, Q. Luo, B. Wu, J. Li, J. Ma, J. Sheng, J. Gan, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 2910-2918 (2017). b) O. P. Schmidt, A. S. Benz, G. Mata, N. W. Luedtke, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 6470-6479 (2018).
- 24) S. A. Green, H. R. Montgomery, T. R. Benton, N. J. Chan, H. M. Nelson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58**, 16400-16404 (2019).
- 25) S. Johannsen, S. Paulus, N. Düpre, J. Müller, R. K. O. Sigel, *J. Inorg. Biochem.*, **102**, 1141-1151 (2008).
- 26) a) N. Å. Frøystein, E. Sletten, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 3240-3250 (1994); b) S. Steinkopf, W. Nerdal, A. Kolstand, E. Sletten, *Acta. Chem. Scand.*, **50**, 775-782 (1996).
- 27) E. Ennifar, P. Walter, P. Dumas, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2671-2682 (2003).
- 28) a) B. Krajewska, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **23**, 535-542 (2008); b) D. Karthiga, A. Rajeshwari, S. Chakravarty, N. Chandrasekaran, A. Mukherhee, *Anal. Methods*, **8**, 3756-3762 (2016).
- 29) a) G. L. Eichhorn, Y. A. Shin., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 7323-7328 (1968). b) R. B. Martin, *Acc. Chem. Res.*, **18**, 32-38 (1985). c) J. Duguid, V. A. Bloomfield, J. Benevides, G. J. Thomas Jr., *Biophys. J.*, **65**, 1916-1928 (1993). d) J. G. Duguid, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides, G. J. Thomas Jr., *Biophys. J.*, **69**, 2623-2641 (1995). e) J. V. Burda, J. Šponer, J. Leszczynski, P. Hobza, *J. Phys. Chem. B.*, **101**, 9670-9677 (1997).
- 30) a) M. A. Sirover, D. K. Dube, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.*, **254**, 107-111 (1979); b) W. S. El-Deiry, K. M. Downey, A. G. So, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7378-7382 (1984).
- 31) J. Šponer, M. Sabat, J. V. Burda, J. Leszczynski, P. Hobza, B. Lippert, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4**,

- 537-545 (1999).
- 32) R. Jastrzab, Z. Hnatejko, T. Runka, A. Odani, L. Lomozik, *New J. Chem.*, **35**, 1672-1677 (2011).
- 33) M. Schreiber, L. González, *J. Comput. Chem.*, **28**, 2299-2308 (2007).
- 34) S. Menzer, M. Sabat, B. Lippert, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4644-4649 (1992).
- 35) a) F.-A. Polonius, J. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 5602-5604 (2007); b) D. A. Megger, C. F. Guerra, J. Hoffmann, B. Brutschy, F. M. Bickelhaupt, J. Müller, *Chem. Eur. J.*, **17**, 6533-6544 (2011).
- 36) D. A. Megger, C. F. Guerra, F. M. Bickelhaupt, J. Müller, *J. Inorg. Biochem.*, **105**, 1398-1404 (2011).
- 37) a) F. X. Wilhelm, M. Daune, *Biopolymers*, **8**, 121-137 (1969); b) H. Arakawa, J. F. Neault, H. A. Tajmir-Riahi, *Biophysical J.*, **81**, 1580-1587 (2001).
- 38) N. Peyret, Nicolas, P. A. Seneviratne, H. T. Allawi, J. SantaLucia, Jr., *Biochemistry*, **38**, 3468-3477 (1999).
- 39) S. Taherpour, H. Lönnberg, T. Lönnberg, *Org. Biomol. Chem.*, **11**, 991-1000 (2013).
- 40) Schmidt OP, Benz AS, Mata G, Luedtke NW., *Nucleic Acids Res.*, **46**, 6470-6479 (2018).
- 41) H. Urata, S. Ogawa, S. Wada, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**, 2909-2911 (2013).
- 42) S. J. Johnson, L. S. Bees., *Cell*, **16**, 803-816 (2004).
- 43) Jeffrey G. Bertram, K. Oertell, J. Petruska, M. F. Goodman., *Biochemistry*, **49**, 20-28 (2010).
- 44) N. Peyret, P. A. Seneviratne, H. T. Allawi, J. SantaLucia, *Biochemistry*, **38**, 3468-3477 (1999).
- 45) a) T. J. Matary, E. T. Kool, *Nature*, **399**, 704-708 (1999); b) I. Hirao, M. Kimoto, T. Mitsui, T. Fujiwara, R. Kawai, A. Sato, Y. Harada, S. Yokoyama, *Nat. Methods*, **3**, 729-735 (2006); c) I. Hirao, M. Kimoto, R. Yamashige, *Acc. Chem. Res.*, **45**, 2055-2065 (2012)
- 46) a) M. Takeshita, C.-N. Chang, F. Johnson, S. Will, A. P. Grollman, *J. Biol. Chem.*, **262**,

- 10171-1017 (1987); b) H. Ide, H. Murayama, S. Sakamoto, K. Makino, K. Honda, H. Nakamuta, M. Sasaki, N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, **23**, 123-129 (1995).
- 47) a) G. Zhu, Y. Li, C.-y. Zhang, *Chem. Commun.*, **50**, 572-574 (2014); b) X. Zhou, Q. Su, D. Xing, *Analytica Chimica Acta*, **713**, 45-49 (2012).
- 48) a) C. Kaul, M. Müller, M. Wagner, S. Schneider, T. Carell, *Nat. Chem.*, **3**, 794-800 (2011); b) E. Kyong, C. Switzer, *ChemBioChem*, **14**, 2403-2407 (2013).
- 49) a) K. S. Park, C. Jung, H. G. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 9757-9760 (2010); b) D.-L. Ma, S. Lin, L. Lu, M. Wang, C. Hu, L. J. Liu, K. Ren, C.-H. Leung, *J. Mater. Chem. B*, **3**, 4780-4785 (2015).
- 50) H. Urata, E. Yamaguchi, T. Funai, Y. Matsumura, S. Wada, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 6516-6519 (2010).
- 51) T. Funai, Y. Miyazaki, M. Aotani, E. Yamaguchi, O. Nakagawa, S. Wada, H. Torigoe, A. Ono, H. Urata, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 6464-6466 (2012).
- 52) T. Funai, J. Nakamura, Y. Miyazaki, R. Kiriū, O. Nakagawa, S. Wada, A. Ono, H. Urata, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 6624-6627 (2014).
- 53) T. Funai, M. Aotani, R. Kiriū, J. Nakamura, Y. Miyazaki, O. Nakagawa, S. Wada, H. Torigoe, A. Ono, H. Urata, *ChemBioChme*, DOI:10.1002/cbic.201900450
- 54) T. Funai, N. Adachi, M. Aotani, S. Wada, H. Urata, *Nucleotide, Nucleoside and Nucleicacids*, DOI:10.1080/15257770.2019.1658116