

二重らせん DNA 分子の Hg(II)を介した塩基対形成

○田中好幸¹、織田修司¹、山口浩¹、根東義則¹、児嶋長次郎²、小野晶³

(¹ 東北大院薬、² 奈良先端大バイオ、³ 神奈川大学工)

tanaka@mail.pharm.tohoku.ac.jp

【序論】金属イオンは核酸分子が三次元構造を形成し機能を獲得するための必要不可欠な要素である。中でも核酸分子の特定の残基に結合して、三次元構造形成を助ける金属イオンは機能性核酸分子の活性発現に欠くことのできない補因子である（構造モチーフの形成）。このような例として、水銀イオンを介したチミジン-チミジン塩基対 (T-Hg^{II}-T) という新規構造モチーフを我々は最近報告した^{1,2}。過去にも本塩基対形成を示唆するデータは存在するが³、その構造決定には至っていない。そこで本研究においては T-Hg^{II}-T 塩基対様式の同定、および、その二重らせん構造に及ぼす影響について、多核多次元 NMR 分光法を用いて研究を行ったので報告する。

【結果】T-Hg^{II}-T 塩基対は図 1 に示すように、イミノプロトン 2 個と水銀イオン 1 個が交換することによって形成され则认为られている。したがってこの塩基対様式（化学構造）を証明するためには、窒素原子が水銀核によって架橋されていることを証明する必要がある。NMR 分光法ではこのような化学結合のつながりをスピン結合 (*J*-coupling) の有無（解析）によって判定することが可能である。しかし、本 N-Hg^{II}-N 結合周りにはプロトンが無い為、簡便なプロトンのスピン系解析による化学結合の同定ができない。そこで今回は ¹⁵N 核で部位特異的に安定同位体標識を行った核酸分子を用いて ¹⁵N 核間の *J*-coupling (²*J*_{NN}) の検出を試みることにした（図 1 右）。

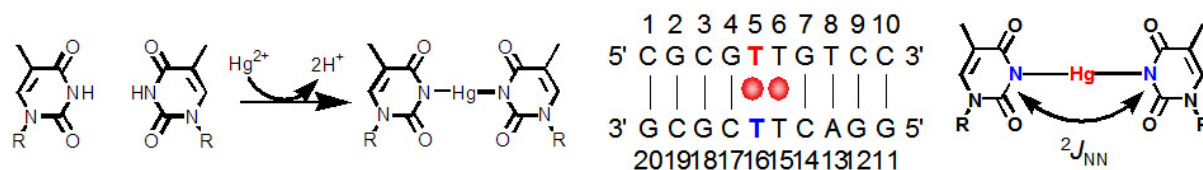


図 1 T-Hg^{II}-T 塩基対様式（仮説）および ¹⁵N NMR 分光法による検出原理（本実験に用いた DNA 配列）

図 1 中、赤色と青色で示したチミジン残基 (T5、T16) の N3 位を ¹⁵N 標識した DNA 二重らせん分子を化学合成した。このように向かい合うチミジン残基が ¹⁵N 標識されると、図 1 のようなスピン結合 (²*J*_{NN}) が検出され则认为られる。そこで本実験においては上記 DNA 分子を用いて ¹⁵N NMR 測定を行った。その結果、図 2 に示したような ¹⁵N NMR スペクトルが得られた。スペクトル中には予想通り ¹⁵N 核同士のスピン結合が観測された。以上の実験結果より、T-Hg^{II}-T 塩基対の化学構造は、図 1 に示した予想構造に一致することが初めて示された。

次に本 T-Hg^{II}-T 塩基対が DNA 二重らせん分子中にどのように取り込まれているかを、NOE データに基づく三次元構造計算により明らかにした。構造計算の結果、図 2 に示したよう

な標準的な B 型 DNA 二重らせん構造をとっていることが判った。さらに T-Hg^{II}-T 塩基対は二重らせん構造に歪みをもたらすことなく存在できることも判った。また、水銀核の二重らせん中での位置は、ほぼらせん軸近傍に位置しており、溶媒からは完全に遮蔽されていることが明らかとなった。従って、今回得られた ¹⁵N NMR データは T-Hg^{II}-T 塩基対が二重らせん中にスタックした状態のスペクトルと考えられる。

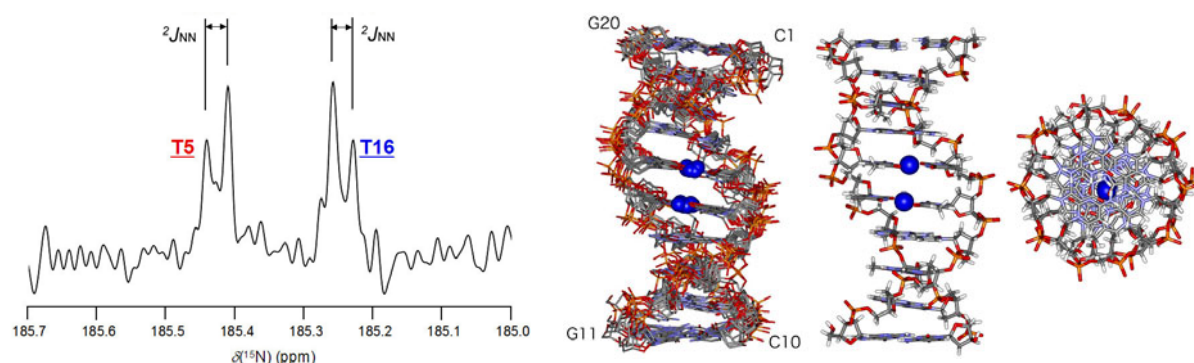


図2 ¹⁵N NMR スペクトルによる ²J_{NN} の検出、および、T-Hg^{II}-T 塩基対を含む DNA 二重らせん分子の溶液構造

【考察】T-Hg^{II}-T 塩基対は Watson-Crick 型塩基対より熱安定性が高いことが示されている¹。上記結果より、この熱安定性をもたらす第一の要因として、水銀核を介したチミジン同士の N-Hg^{II}-N 共有結合形成が挙げられる (²J_{NN} の観測から)。事実、T-T ミスマッチを含む DNA 二重らせん分子に対する水銀イオンの結合では ΔH が負となる (エンタルピー的に有利)。さらに興味深いことに、同時に正の ΔS が発生する (エントロピー的にも有利)。上述のように水銀核は水分子から隔離されており、水銀イオンの水和水の遊離により、正のエントロピーが発生したことが強く示唆される。また本構造決定により、水溶液中においても条件を整えばイミノ窒素も金属イオンの結合部位となり得ることが初めて示された。即ち、水溶液中のようなプロトン源が豊富な溶媒中においても、化学平衡上、一見不利なプロトン放出 (金属核結合に伴う) が起きうることが示された。また応用面においても、T-Hg^{II}-T 塩基対は水銀センサーへの応用が既になされているが⁴、T-Hg^{II}-T 塩基対自身が熱安定性に優れた二重らせん分子を形成することから、ナノワイヤー等への応用も期待できる機能素子と考えられる。以上総括すると、我々は核酸-水銀複合体形成において、プロトンと金属核が置換する、新規結合様式の存在を証明した。

1. Miyake, Y.; Togashi, H.; Tashiro, M.; Yamaguchi, H.; Oda, S.; Kudo, M.; Tanaka, Y.; Kondo, Y.; Sawa, R.; Fujimoto, T.; Machinami, T.; Ono, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 2172-2173.
2. Tanaka, Y.; Yamaguchi, H.; Oda, S.; Nomura, M.; Kojima, C.; Kondo, Y.; Ono, A. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2006**, in press.
3. (a) Yamane, T.; Davidson, N. *Biochim. Biophys. Acta* **1962**, 55, 780-782. (b) Katz S. *Biochim. Biophys. Acta.* **1963**, 68, 240-253. (c) Simpson, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 2059-2065. (d) Kosturko, L. D.; Folzer, C.; Atewart, R. T. *Biochemistry* **1974**, 13, 3949-3952. (e) Gruenwedel, D. W.; Cruikshank M. K. *Biochemistry* **1990**, 29, 2110-2116.
4. Ono A.; Togashi H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4300-4302.