

博 士 論 文

グアニン酸化損傷オキサゾロンに対する  
DNA ポリメラーゼ反応の解析

徳島文理大学大学院薬学研究科  
薬学専攻博士課程

鈴 木 雅 代

指導教授 宮澤 宏

平成二十八年提出

# 目次

要旨 .....	1
略語一覧 .....	4
第1章 序論.....	5
第2章 グアニン酸化損傷：グアニン塩基対の安定化エネルギー の計算 .....	10
第1節 背景.....	10
第2節 方法.....	12
第3節 結果と考察.....	13
第4節 結論.....	23
第3章 グアニン酸化損傷：グアニン塩基対を含む DNA 二本鎖の歪みの計算 .....	24
第1節 背景.....	24
第2節 方法.....	27
第3節 結果と考察.....	32
第4節 結論.....	42
第4章 Oz に対する塩基の取り込み解析.....	44
第1節 背景.....	44
第2節 実験方法 .....	46
第3節 結果と考察.....	56
第4節 結論.....	76
第5章 Oz を含む塩基対の安定性の DNA 伸長反応における影響.....	78
第1節 背景.....	78
第2節 実験方法 .....	80
第3節 結果と考察.....	85
第4節 結論.....	96

第 6 章 Oz 連続配列の DNA ポリメラーゼ反応に対する影響.....	97
第 1 節 背景.....	97
第 2 節 実験方法 .....	99
第 3 節 結果と考察.....	102
第 4 節 結論.....	112
第 7 章 総括.....	114
参考文献 .....	118
謝辞 .....	129

## 要旨

DNA は体内外からの様々な酸化ストレスに常に曝されており、特に DNA 塩基のうち、グアニンが最も酸化を受けやすい。そうして生成したグアニン酸化損傷に対するアデニンやグアニンの誤取り込みは、最終的にグアニンからチミンやシトシンへの点突然変異である G:C-T:A トランスバージョンおよび、G:C-C:G トランスバージョンの原因となる。これらの点突然変異は様々な遺伝子で検出されており、例として、がん抑制遺伝子である *p53* 遺伝子や、がん遺伝子である *K-ras* 遺伝子があげられる。特に、がん遺伝子である *K-ras* 遺伝子の活性型変異の原因となる codon 12 における G:C-C:G トランスバージョンや G:C-T:A トランスバージョンの発生は、大腸がんや膵がん、肺がんといった各種のがんで高頻度に検出されている。そのため、これらの点突然変異の発生メカニズムについて研究することは点突然変異により生じるがんの発症メカニズムの解明において重要である。

様々な条件下で生成する代表的なグアニン酸化損傷である 8-オキソグアニン (8-oxoG) は、最も研究が進んでおり、8-oxoG は G:C-T:A トランスバージョンを引き起こす損傷であると考えられている。一方、8-oxoG はグアニンとは塩基対を形成できず、相補鎖側にグアニンが挿入されない。つまり、G:C-C:G トランスバージョンは他のグアニン酸化損傷によって引き起こされると考えられる。

グアニンの酸化および 8-oxoG のさらなる酸化により生成するイミダゾロン (Iz) が加水分解されることでオキサゾロン (Oz) が生成する。これまでの研究から、Oz に対するグアニンの取り込みが DNA ポリメラーゼ (Pol)  $\alpha$  および Pol  $\beta$ 、Pol  $\gamma$ 、Pol  $\epsilon$ 、Pol  $\eta$ 、Pol IV、Klenow fragment exonuclease<sup>-</sup> (KF exo<sup>-</sup>) に共通することが明らかとなっており、Oz は G:C-C:G トランスバージョンの発生に関与するグアニン酸化損傷であると考えられる。

一方、Oz 以外にも G:C-C:G トランスバージョンの原因となる可能性があるグアニン酸化損傷として、8-oxoG のさらなる酸化の主生成物であるグアニジノヒダントイン (Gh) とその異性体のイミノアラントイン (Ia)、そしてスピロイミノジヒダントイン (Sp) が知られている。KF exo<sup>-</sup> はこれらの損傷に対してアデニンとグアニンを取り込み、その取り込み効率は Gh/Ia の方が Sp よりも高いことが明らかとなっている。また、Oz

に対するグアニンの取り込みやOzを乗り越えた伸長効率はGh/Iaの場合と比較すると良いことが明らかとなっており、Ozの方がGh/IaやSpよりもG:C-C:Gトランスバージョンを誘導しやすいことが示唆されている。

そこで、本研究ではG:C-C:Gトランスバージョンの発生機構の解明において重要な損傷としてOzに着目した。第2章と第3章では計算科学を用いて、OzおよびGh/Ia、Spとグアニンの塩基対の安定性やこれらの塩基対を含む二本鎖DNAの歪み度合いを算出し、DNAポリメラーゼによるグアニンの取り込み効率や損傷乗り越えDNA合成効率がOz > Gh/Ia > Spとなった以前の実験結果について考察した。その結果、2本の水素結合を有するOz:G塩基対は、3本の水素結合を有するIa:GやSp:G塩基対よりも不安定であることが示唆され、これは塩基対の安定性が水素結合の数に依存しているためであると考えられた。一方、 $sp^3$ 炭素をもつGh/IaやSpに対してOzは $sp^3$ 炭素をもたず、二本鎖DNAを歪めにくく、天然のDNAの構造と似ていることが予測された。つまり、その結果Gh/IaやSpを含む損傷DNAに比べると、Ozを含む損傷DNAにおけるDNAポリメラーゼのひっかかりが少なく、実際のDNAポリメラーゼ反応における塩基の取り込みや損傷乗り越えDNA合成の効率が良かったと考えられる。言い換えると、DNA複製におけるOzに対するグアニンの取り込みの影響は少なく、その結果誤った情報のまま複製が継続され、最終的に他の損傷に比べるとG:C-C:Gトランスバージョンを生じやすくなる。そのため、Ozを含む損傷DNAがどのような複製過程を経るのかを明らかにすることが必要とされる。

前述したように、これまでにPol  $\alpha$  および Pol  $\beta$ 、Pol  $\gamma$ 、Pol  $\epsilon$ 、Pol  $\eta$ 、Pol IV、KF exo<sup>-</sup>がOzに対して取り込む塩基については解析されてきた。しかし、Ozを含む損傷DNAの複製機構やDNA合成におけるOzの影響については未解明な部分も多い。そこで、第4章では、DNA複製の中心的役割を担うDNAポリメラーゼおよび損傷乗り越えDNA合成に関与するDNAポリメラーゼのうち、Ozに関して未解析であったPol  $\delta$ 、Pol  $\zeta$ 、Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$ 、REV1のOzに対する損傷乗り越え反応および塩基取り込み反応を解析した。また、第5章では、これまでにOzに対する塩基の取り込みを解析したDNAポリメラーゼのうち、REV1以外のDNAポリメラーゼが共通してグアニンを取り込むのは、Oz:G塩基対の安定性に寄与していると考え、Oz:GおよびOz:A、Oz:C、Oz:T塩基対の

塩基対の安定性を DNA ポリメラーゼ反応と熱変性実験により解析した。さらに、第 6 章では、グアニン連続配列がグアニン単体よりもさらに酸化されやすいことに着目し、KF exo<sup>-</sup>および Pol  $\alpha$ 、Pol  $\beta$ 、Pol  $\zeta$ 、Pol  $\eta$ 、Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$ 、REV1 を用いて Oz 連続配列に対する DNA ポリメラーゼ反応を解析した。

その結果、第 4 章および第 6 章の研究結果および以前の研究報告から、Oz に対するグアニンの取り込みが、Oz が単体の場合は REV1 を除く全ての DNA ポリメラーゼに共通しており、Oz 連続配列の場合は REV1 と KF exo<sup>-</sup>を除く DNA ポリメラーゼに共通していることが明らかとなった。以上に加え、第 5 章では Oz がグアニンと最も安定な塩基対を形成できることを明らかにしており、DNA ポリメラーゼによる塩基の取り込み解析の結果とともに、Oz が G:C-C:G トランスバージョンの原因となるグアニン酸化損傷であることを強く示唆している。そして、グアニン酸化損傷である Oz に対してシトシンを優先的に取り込む DNA ポリメラーゼは REV1 のみであることから、DNA 複製過程において、Oz が非常に強い変異原性を有していることが明らかとなった。さらに、Oz が連続配列として生成した場合、多くの DNA ポリメラーゼによる DNA 合成が阻害する重篤な損傷となり得ることが明らかとなった。

一方、Pol  $\zeta$  は Oz 単体だけでなく他の DNA ポリメラーゼによる DNA 合成を阻害するような Oz 連続配列でさえ、効率良く乗り越えて DNA を合成できることが明らかとなった。この結果より、Oz 連続配列が生成した場合でも、Pol  $\zeta$  がリクルートされることで、Oz 連続配列による DNA 複製の停止を回避できる可能性があるのではないかと考えている。また、REV1 は Oz に対してシトシンを優先的に取り込む唯一の DNA ポリメラーゼであり、この REV1 による Oz に対するシトシンの優先的な取り込みにより、Oz から生じる G:C-C:G トランスバージョンの発生を回避できることが示唆された。

今後は、様々な細胞を用いて Oz から生じる突然変異のスペクトルを解析することで、生体内における Oz の突然変異誘発能について詳細に解析することが必要となるだろう。そうして得られた結果と、本研究をはじめとした *in vitro* での研究結果を総合することで最終的に Oz から生じる点突然変異の発生機構の解明につながると考えられる。

## 略語一覧

8-oxoG	8-oxo-7,8-dihydroguanine (8 オキソグアニン)
2-ME	2-mercaptoethanol
BRCT	BRCA1 C-terminal
BSA	bovine serum albumin
CPD	cyclobutane pyrimidine dimer (シクロブタン型ピリミジンダイマー)
ct	calf thymus
DFT	density functional theory (密度汎関数理論)
Gh	guanidinohydantoin (グアニジノヒダントイン)
h	human
Ia	iminoallantoin (イミノアラントイン)
Iz	2,5-diamino-4 <i>H</i> -imidazol-4-one (イミダゾロン)
KF exo <sup>-</sup>	Klenow fragment exonuclease <sup>-</sup>
Oz	2,2,4-triamino-5(2 <i>H</i> )-oxazolone (オキサゾロン)
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
Pol	DNA polymerase (DNA ポリメラーゼ)
Pur	purine (プリン)
Pyr	pyrimidine (ピリミジン)
SCRF	self-consistent reaction field (自己無撞着反応場)
Sp	spiroiminodihydantoin (スピロイミノヒダントイン)
THF	tetrahydrofuran (テトラヒドロフラン)
$T_m$	melting temperature (融解温度)
XP	xeroderma pigmentosum (色素性乾皮症)
y	yeast

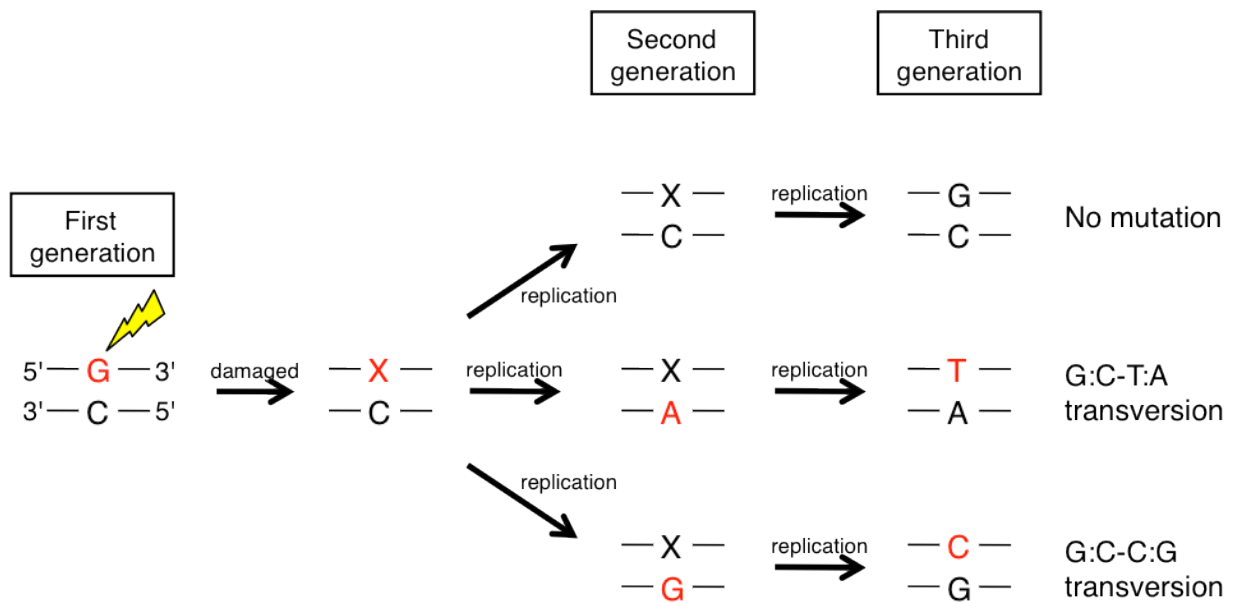
# 第1章

## 序論

DNAとは遺伝情報の継承と発現を担う高分子生体物質であり、このDNAの複製によって子孫を残すことができる。同時に、DNAは体内外からの様々な酸化ストレスに常に曝されており、化学物質であるDNAは酸化され損傷を受ける。この損傷DNAが修復されなかった場合、複製過程において誤った情報が複製され、突然変異を引き起こすことがある。この突然変異は、がんや老化をはじめ様々な遺伝病の引き金となる。

DNA塩基のうち、グアニンは他の塩基よりも酸化電位が低く、最も酸化を受けやすい<sup>1)</sup>。そうして生成したグアニン酸化損傷は、複製過程で相補鎖側にアデニンやグアニンが取り込まれた場合、最終的にグアニンからチミンやシトシンへの点突然変異であるG:C-T:Aトランスバージョンおよび、G:C-C:Gトランスバージョンが生じる (Fig.1)。特にこれらの突然変異が優先的に生じる酸化条件として、日光照射、ビタミンB<sub>2</sub> (リボフラビン) やビタミンK<sub>3</sub> (メナジオン) 存在下における紫外線照射、 $\gamma$ 線照射、メチレンブルー存在下における可視光照射、Fe<sup>2+</sup>の添加や過酸化水素の添加、ペルオキシラジカルを発生させる試薬の添加、エンドペルオキシドの添加、ジオキセタンの添加などがあげられる<sup>2)</sup>。また、ラットにおいては受動喫煙によってG:C-C:Gトランスバージョンが生じることが報告されている<sup>3)</sup>。グアニンのトランスバージョンによる点突然変異は様々な遺伝子で検出されている。例として、がん抑制遺伝子であるp53遺伝子のCpGサイトや、がん遺伝子である*K-ras*遺伝子のコドン12、13で高頻度に検出されている (Table 1)<sup>3-6)</sup>。特に*K-ras*遺伝子については、点突然変異によってGTPase活性が低下し、細胞増殖と生存に関わる下流のシグナル経路の持続的な活性化が持続され、腫瘍化タンパクとして作用することが既に明らかとなっている。そのため、これらの点突然変異について研究することは点突然変異により生じるがんの発症メカニズムの解明において重要である。



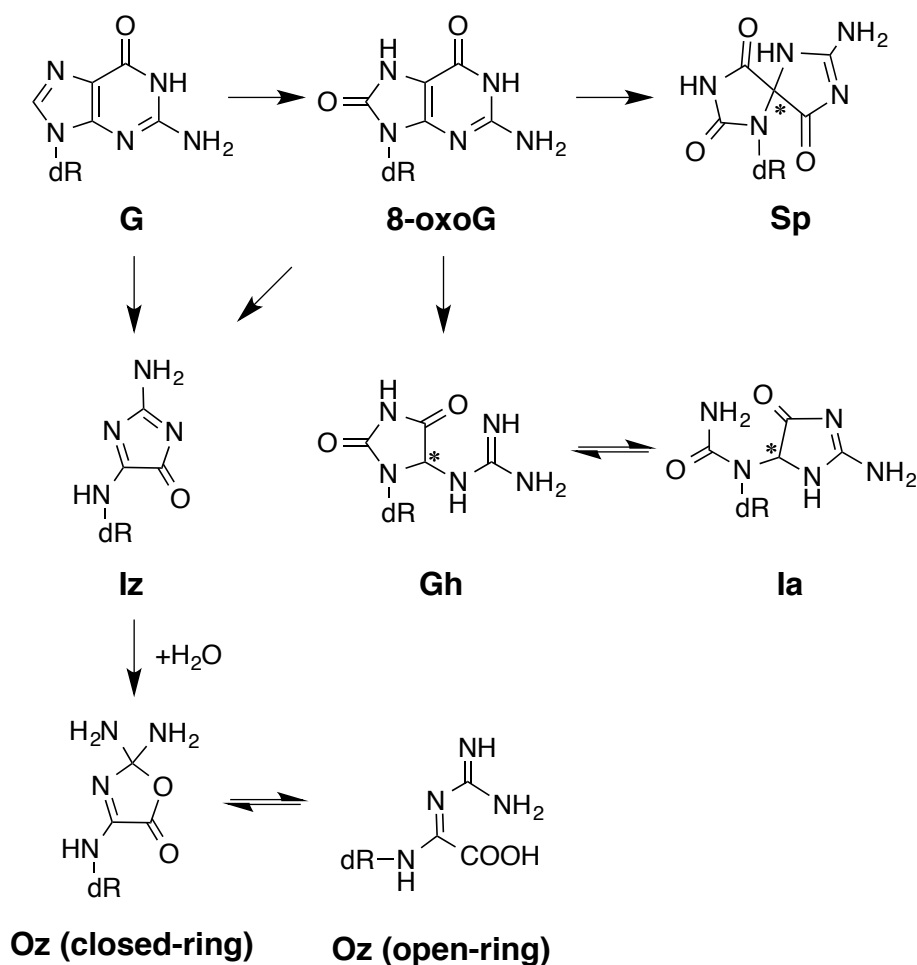


**Fig.1** The mutations caused from oxidatively damaged guanine.

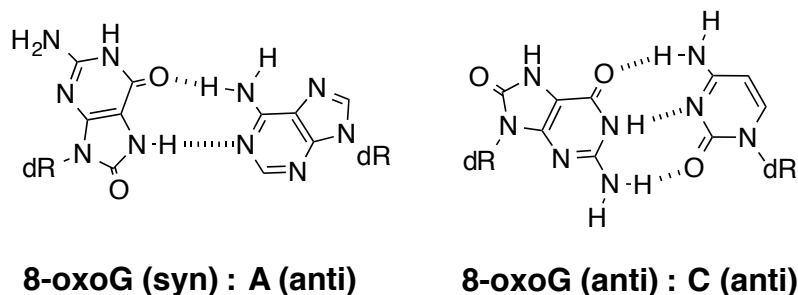
**Table 1** Type of genetic mutation in *K-ras* gene and its frequency in type of cancer <sup>6)</sup>.

mutation type		colon cancer	pancreatic cancer	lung cancer
codon 12 GGT (Gly)	<u>C</u> GT (Arg)	1.1%	12.2%	2.4%
	G <u>C</u> T (Ala)	6.3%	2.3%	6.3%
	T <u>G</u> T (Cys)	8.5%	3.3%	40.7%
	G <u>T</u> T (Val)	22.6%	29.7%	19.8%
codon 13 GGC (Gly)	<u>C</u> GC (Arg)	0.5%	0.1%	3.1%
	G <u>C</u> C (Ala)	0.2%	0.0%	0.1%
	T <u>G</u> C (Cys)	0.5%	0.1%	3.1%
	G <u>T</u> C (Val)	0.1%	0.1%	0.1%

8 オキソグアニン (8-oxo-7,8-dihydroguanine : 8-oxoG) は様々な条件下で生成する代表的なグアニン酸化損傷であり (Scheme 1)、最も研究が進んでいる。これまでに、8-oxoG に対する塩基の取り込み実験や細胞内における変異スペクトル解析だけでなく<sup>7)</sup>、結晶構造解析から実際に形成する 8-oxoG:A および 8-oxoG:C 塩基対の構造も明らかとなっている (Fig.2)<sup>8-10)</sup>、そのため、8-oxoG は G:C-T:A トランスバージョンを引き起こす損傷であると考えられている。一方、8-oxoG はグアニンとは塩基対を形成できず、相補鎖側にグアニンが挿入されない。実際に *K-ras* 遺伝子で見られるように、G:C-C:G トランスバージョンが生じているにもかかわらず (Table 1)<sup>3-6)</sup>、8-oxoG ではその発生を説明できない。つまり、G:C-C:G トランスバージョンは他のグアニン酸化損傷によって引き起こされると考えられる。



**Scheme 1** Oxidation products of guanine. Asterisk indicates the *sp*<sup>3</sup> carbon.



**Fig.2** The structures of 8-oxoG:A and 8-oxoG:C base pair<sup>8-10)</sup>.

グアニンの酸化だけでなく 8-oxoG のさらなる酸化によっても生成する損傷としてイミダゾロン (2,5-diamino-4*H*-imidazol-4-one : Iz) が知られている (Scheme 1)<sup>11-13)</sup>、Iz が一本鎖および二本鎖 DNA 中のグアニンの光酸化により生成すること<sup>13-15)</sup>、そして、Iz は *in vitro* および *in vivo* において主に G:C-C:G トランスバージョンを引き起こすことが明らかになっている<sup>16,17)</sup>。しかし、Iz は pH 7、37 °C 条件下では半減期 147 分で、徐々にオキサゾロン (2,2,4-triamino-5(2*H*)-oxazolone : Oz) へと加水分解される (Scheme 1)<sup>11)</sup>。実際に、肝臓の DNA サンプル中からグアニン 10<sup>7</sup> 個中に 2~6 分子の Oz が検出されている<sup>18)</sup>。また、最近の報告では、5-メチルシトシン存在下での光酸化により *p53* 遺伝子の CpG サイトにおける Oz の生成量が有意に増加することが明らかとなっている<sup>19)</sup>。以上より、Oz の生物学的な影響は Iz に比べると大きく、無視できないと考えられる。これまでの研究から、Oz に対するグアニンの取り込みが DNA ポリメラーゼ (DNA polymerase : Pol) α および Pol β、Pol γ、Pol ε、Pol η、Pol IV、Klenow fragment exonuclease<sup>-</sup> (KF exo<sup>-</sup>) に共通することが明らかとなっており<sup>20,21)</sup>、Oz は G:C-C:G トランスバージョンの発生に関与するグアニン酸化損傷であると考えられる。

一方、Oz 以外にも G:C-C:G トランスバージョンの発生に関与する可能性があるグアニン酸化損傷として、グアニジノヒダントイン (guanidinohydantoin : Gh) とスピロイミノジヒダントイン (spiroiminodihydantoin : Sp) が知られている (Scheme 1)。Gh は酸性条件下、Sp は塩基性条件下における 8-oxoG のさらなる酸化の主生成物である<sup>12, 22-24)</sup>。また、Gh の異性体としてイミノアラントイン (iminoallantoin : Ia) が知られているが (Scheme 1)<sup>25)</sup>、DNA ポリメラーゼ反応において、どちらの異性体に平衡が偏っているか

未だ明らかとなっていない。これらの損傷に対して KF exo<sup>-</sup>がアデニンとグアニンを取り込むことが報告されており、その取り込み効率は Sp よりも Gh/Ia の方が高いことも明らかとなっている<sup>26)</sup>。以上に加え、Oz に対するグアニンの取り込みおよび Oz を乗り越えた伸長効率は Gh/Ia よりも良いことが明らかとなっている<sup>20)</sup>。つまり、G:C-C:G トランスバージョンの発生への寄与度は Gh/Ia や Sp よりも Oz の方が高いことが示唆されている。

そこで、本研究では G:C-C:G トランスバージョンの発生機構の解明において重要となる損傷として Oz に着目した。第 2 章と第 3 章では計算科学を用いて、前述した以前の Oz や Gh/Ia、Sp に対する DNA ポリメラーゼによるグアニンの取り込み効率や損傷乗り越え DNA 合成効率の実験結果<sup>20, 26)</sup> について考察した。

前述したように、これまでに Pol  $\alpha$  および Pol  $\beta$ 、Pol  $\gamma$ 、Pol  $\epsilon$ 、Pol  $\eta$ 、Pol IV、KF exo<sup>-</sup> が Oz に対して取り込む塩基については解析されてきた。しかし、DNA 複製機構は DNA ポリメラーゼをはじめ、その他様々なタンパク質が関与する非常に複雑な機構であり、DNA 合成を触媒する DNA ポリメラーゼについては大腸菌では 5 種類、ヒトでは 15 種類も有している。そのため、Oz を含む損傷 DNA の複製機構や DNA 合成における Oz の影響については未解明な部分も多い。そこで、第 4 章から第 6 章では Oz を含む損傷 DNA に対する DNA ポリメラーゼ反応を解析した。

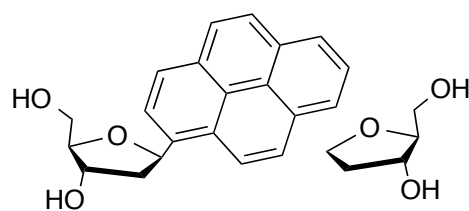
## 第2章 グアニン酸化損傷：グアニン塩基対の安定化エネルギー の計算

(本章の内容に関しては *Molecules*, 17, 6705-6715 (2012) に発表済み)

### 第1節 背景

第1章の序論でも述べたように、グアニンは他の塩基に比べて酸化されやすく、複製過程において、酸化されたグアニンに対してアデニンやグアニンが取り込まれると G:C-T:A および G:C-C:G トランスバージョンが生じる。本稿では、8-oxoG では説明できない G:C-C:G トランスバージョンの発生機構の解明を目的としている。この G:C-C:G トランスバージョンを引き起こす可能性のある損傷として Oz および Gh/Ia、Sp があげられる (Scheme 1)。これまでの研究から、Gh/Ia や Sp に対するグアニンの取り込みに比べ、Oz に対するグアニンの取り込み効率およびその後の伸長効率が低いことが明らかとなっている<sup>20, 26)</sup>。

ここで、DNA 損傷に対する塩基の取り込み反応の機構について述べる。DNA ポリメラーゼによる塩基の取り込み過程において、取り込まれる塩基が鋳型塩基と塩基対を形成することは重要である。しかし、DNA 塩基と糖鎖の N-グリコシド結合が開裂して生じた脱塩基損傷に対して、DNA ポリメラーゼがアデニンを優先的に取り込むが明らかとなっており、この現象は A-rule と呼ばれている<sup>27)</sup>。また、脱塩基損傷のミミック体であるテトラヒドロフラン (tetrahydrofuran : THF) に対して塩基ではないピレンが取り込まれることが明らかとなっている (Fig.3)<sup>28)</sup>。THF とピレンは水素結合を形成できないが、ピレンが通常の G:C 塩基対や A:T 塩基対と同じくらいの面積を有する (空間適合性) ことから、THF に対してピレンが取り込まれたと説明されている。この説明を参考にすると、脱塩基損傷に対してアデニンが取り込まれるという現象は、アデニンが最も空間適合性があるということになる。グアニンは脱塩基損傷に対して取り込まれないので、損傷に対してグアニンが取り込まれるという現象は、グアニンとの水素結合の形成が取り込みの重要な因子となっているといえる<sup>20)</sup>。



**Pyrene : THF**

**Fig.3** The structures of Pyrene:THF base pair <sup>28)</sup>.

そこで、本章では Oz:G および Ia:G、Gh:G、Sp:G 塩基対の安定性を比較することで、DNA ポリメラーゼ反応においてグアニンの挿入効率やその後の伸長効率が  $Oz > Gh/Ia > Sp$  となった以前の実験結果 <sup>20, 26)</sup> を説明することを試みた。以前に、量子化学計算によって Oz:G 塩基対は 2 本の水素結合もった平面構造であることが予測されている <sup>20)</sup>。一方、Ia:G と Sp:G についても形成する塩基対が予測されているが、これらの安定化エネルギーについては算出されておらず <sup>2)</sup>、Oz:G 塩基対との安定性も比較されていない。また、Gh:G 塩基対は Beckman らによって予測されている <sup>29)</sup>。本章では、密度汎関数理論 (density functional theory : DFT) および自己無撞着反応場 (self-consistent reaction field : SCRF) を用いて、Ia:G および Sp:G、Gh:G 塩基対の安定化エネルギーを算出し、Oz:G 塩基対の安定化エネルギーと比較した。

## 第2節 方法

計算時間短縮のため、酸化損傷とグアニンの塩基部分、2'-デオキシリボースの C1'位の炭素と C1'位の水素 1 つを除いて全ての原子を除き、その後 C1'メチンに水素原子を 2 つ付けることで、N-メチル化核酸塩基対とした。そして、Gaussian 03<sup>30)</sup> の最適化プログラムを用いて、B3LYP/6-31G\*\* レベルで収斂した構造を最適化構造とした。最適化構造を用いて真空中の安定化エネルギーを計算した。さらに、水中の安定化エネルギーを算出するために、Onsager reaction field 法 ( $\epsilon = 78.39$ ) を用いた。塩基対形成におけるエネルギーは式 (1) を用いて定義した。

$$\Delta E = E(\text{base pair complex 'X:Y'}) - [E(\text{isolated base 'X'}) + E(\text{isolated base 'Y'})] \quad (1)$$

真空中の最適化構造は GaussView を用いて可視化し、Fig.4, 6, 8, 9 に示した。

### 第3節 結果と考察

#### 3-1. Ia:G 塩基対の構造と安定化エネルギーの算出

Iaはグアニンと3本の水素結合により塩基対を形成できることがkinoらにより予測されている<sup>2)</sup>。本章では、この3本の水素結合を形成しながらIaがとり得る可能性のある8つのコンフォメーション (Ia1-Ia8) とグアニンの塩基対をB3LYP/6-31G\*\*レベルで求めた。Ia1:G-Ia8:Gそれぞれの最適化構造はFig.4に、また、これらのIa:G塩基対それぞれについて算出した安定化エネルギーはTable 2に示した。Ia1:Gの安定化エネルギーは真空中では29.5 kcal/molであり、同様に算出したワトソン・クリック型のC:G塩基対の安定化エネルギー (30.9 kcal/mol) と非常に近い値だった。これは、Ia:G塩基対とC:G塩基対の両方が3本の水素結合を形成することから考えると、驚くべきことではない。それに加え、Ia3:GやIa4:G、Ia5:G、Ia7:G、Ia8:Gの安定化エネルギーもまた29.5 kcal/molであり、水素結合に関与しない部分の安定化エネルギーに与える影響は小さいことを示している。

一方で、Ia2:GとIa6:Gは分子内水素結合 (O4-H8) (Fig.4B) を有しており、その安定化エネルギーは28.7 kcal/molだった。この二つの塩基対はO4位の電子密度の非局在化によって、他のIa:G塩基対よりも不安定化すると考えられる。つまり、グアニンとの水素結合に寄与する電子密度の低下によって、グアニンと形成した塩基対の安定化は低下すると思われる。

これら8つのIa:G塩基対の水中における安定化エネルギーをSCRF値として算出した。その結果、Ia1:Gの安定化エネルギーが24.1 kcal/molと最も高く、次に24.0 kcal/molとIa5:Gが高かった。Ia1は(+)-S配置をもち、Ia5は(-)-R配置である<sup>31)</sup>。Ia1とIa5の違いはS体かR体かの違いだけであるので、Ia5:GとIa1:Gがほとんど同じ安定性であることは驚くことではない。

水中におけるIa3:GとIa4:G、Ia7:G、Ia8:Gの安定性はIa1:GやIa5:Gよりも低かった。Onsager reaction field法においては、溶質は球状のキャビティ中に配置され、その周りには水分子で囲まれている。そして、キャビティの半径が大きいと、キャビティから水を除去するためにより多くのエネルギーが必要とされる。つまり、算出されるエネルギーは

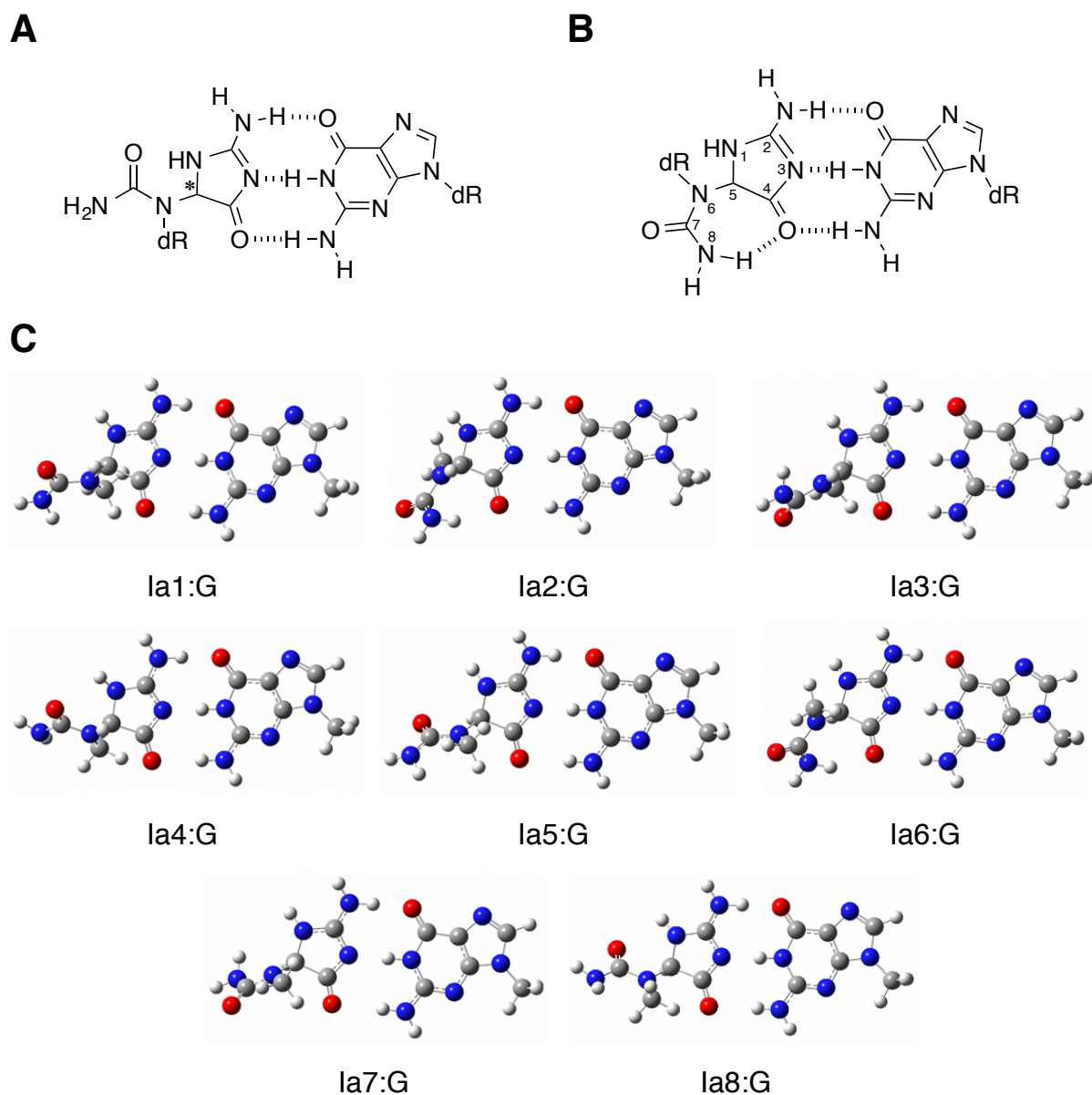


キャビティの大きさに依存しているので、キャビティが小さい程、塩基対の安定性が増す<sup>32)</sup>。S体の構造を比較すると、キャビティ半径の大きさは Ia3 > Ia4 > Ia1、一方、R体では Ia7 > Ia8 > Ia5 であった。それ故、Ia1:G および Ia5:G 塩基対が他の塩基対よりも安定である。これらの計算結果は、水中における不安定化は塩基対の分子サイズに依存することを示唆している。

**Table 2** Stabilization energies (kcal/mol) of base pairs, obtained from the B3LYP/6-31G\*\* -optimized geometries<sup>a</sup>. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *Molecules*, 17, 6705-6715 (2012) with permission from MDPI.

Base pair	$\Delta E^{\text{DFT}}$	$\Delta E^{\text{SCRF}}$	Base pair	$\Delta E^{\text{DFT}}$	$\Delta E^{\text{SCRF}}$
Ia1:G	29.5	24.1	Gh7:G	19.9	19.5
Ia2:G	28.7	19.3	Gh8:G	19.8	16.9
Ia3:G	29.5	17.0	Gh9:G	21.0	19.1
Ia4:G	29.5	23.5	Gh10:G	20.9	17.3
Ia5:G	29.5	24.0	Gh11:G	20.6	20.6
Ia6:G	28.7	19.7	Gh12:G	20.4	19.6
Ia7:G	29.5	18.1	Gh13:G	20.3	16.6
Ia8:G	29.5	22.6	Gh14:G	20.5	17.1
Gh1:G	21.0	18.9	Gh15:G	20.8	18.5
Gh2:G	20.9	16.7	Gh16:G	21.1	19.0
Gh3:G	20.5	21.4	Sp1:G	28.2	18.8
Gh4:G	20.4	19.5	Sp2:G	28.2	19.9
Gh5:G	20.4	18.2	Oz:G	20.7	16.3
Gh6:G	20.5	16.8			

<sup>a</sup>  $\Delta E^{\text{DFT}}$ , *in vacuo*;  $\Delta E^{\text{SCRF}}$ , SCRF = Dipole, dielectric = 78.39, in water

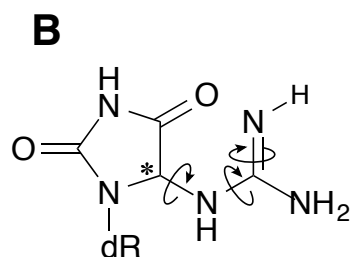
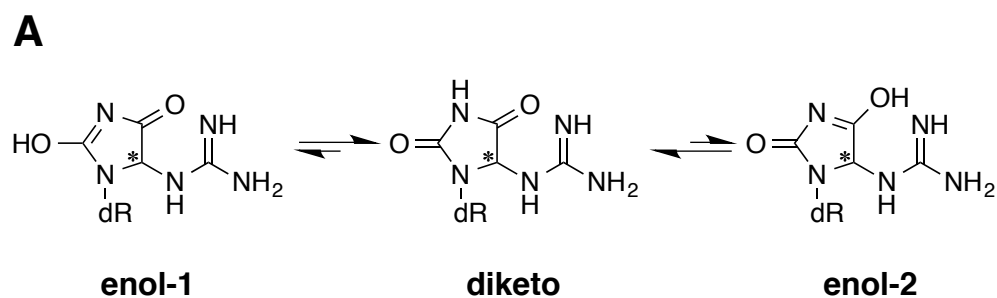


**Fig.4** The Ia:G base pairs. (A) The proposed Ia:G base pair. Asterisk indicates the  $sp^3$  carbon. (B) The proposed Ia:G base pairs and the associated hydrogen bonds. This numbering is the same as used in reference 25. (C) The geometries of Ia1:G-Ia8:G optimized by *ab initio* calculation. The stabilization energies are shown in Table 2. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *Molecules*, 17, 6705-6715 (2012) with permission from MDPI.

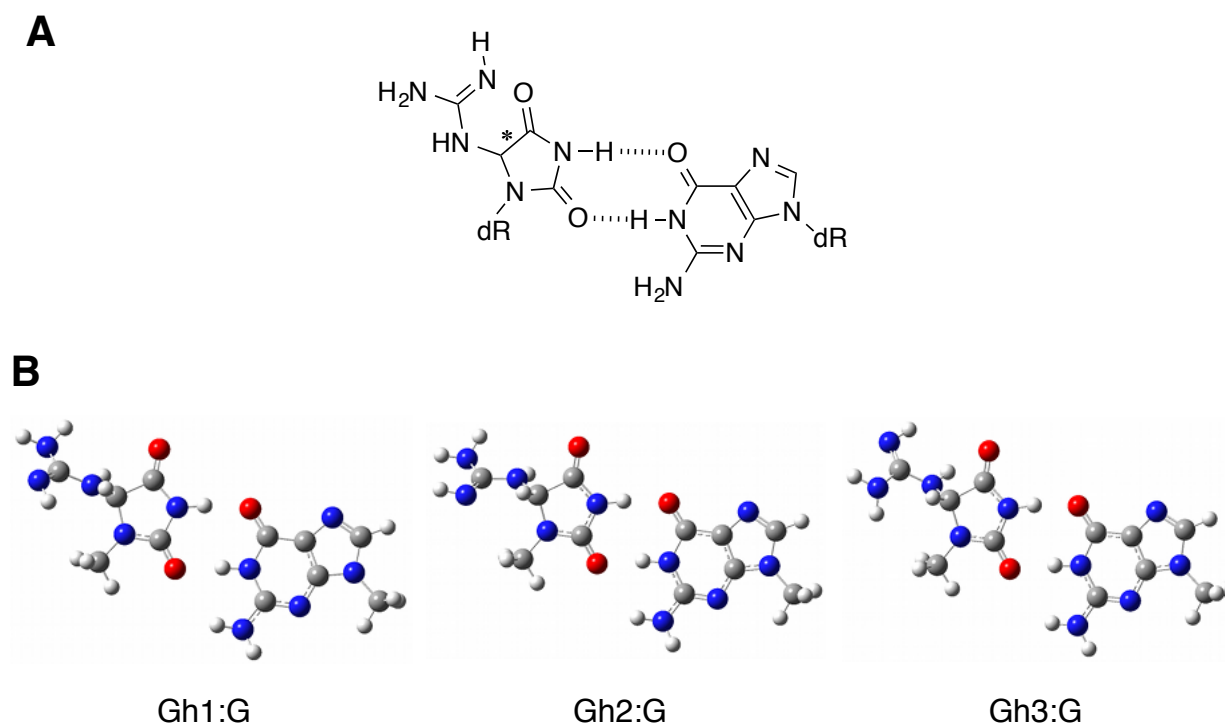
### 3-2. Gh:G 塩基対の構造と安定化エネルギーの算出

Beckman らは Gh:G 塩基対は 2 本の水素結合を形成すると予測しており<sup>29)</sup>、水溶液中では、ジケト体がエノール体 (Fig.5A) よりも安定だと推定されている<sup>33)</sup>。Gh は 3 つの回転軸とキラル中心を 1 つもっている (Fig.5B)、Beckman らの予測した Gh:G 塩基対を形成し得る構造は 16 通り (Gh1-Gh16) 考えられる。これらの Gh1:G-Gh16:G 塩基対の構造を求め、その後、安定化エネルギーを算出して比較した (Fig.6、Table 2)。Gh1-Gh16 のうち、Gh1-Gh8 は (-)-*S* 配置、Gh9-Gh16 は (+)-*R* 配置である。真空中における全ての Gh:G 塩基対の安定化エネルギーは ~2 kcal/mol だけしか差がなかった。これに対して、水中においては Gh3:G が最も高い安定化エネルギーを示し、21.4 kcal/mol であった。*S* 体の最も不安定な塩基対は 16.8 kcal/mol の Gh6:G だった。これらの結果は、上記の 3-1 で述べたキャビティの半径の差が、コンフォメーションの違いよりも安定性に大きな影響を有することを示している。従って、*S* 体の Gh:G 塩基対の中で最も小さいキャビティ半径である Gh3:G が最も安定だった。一方 Gh11:G は *R* 体の中で最も安定であり、その安定化エネルギーは 20.6 kcal/mol だった。Gh3 と Gh11 の違いは *S* 体か *R* 体かだけであり、これらは最も安定な異性体を示しており、驚くことではない。以上から、*S* 体の方が *R* 体よりもグアニンの取り込み効率が良いことを示唆している。*S* 体と *R* 体は互変異性体であるので、これらの立体異性体は水溶液内に共存していると考えられる<sup>12, 34)</sup>。以前、Aller らは DNA 二本鎖中において Gh の *S* 体の方が鋳型としてより良いことを提唱しており<sup>34)</sup>、これらの計算結果は Aller らの実験結果を説明できるものであった。

また、真空中と水中の両方における Gh:G の安定化エネルギーは Ia:G よりも低かった。予測される Ia:G 塩基対は三本の水素結合を有していることから、安定化エネルギーは水素結合の数に依存すると思われる。これらのことから、Gh/Ia に対してグアニンが挿入される際は、Gh は Ia に平衡が偏っているかもしれない。

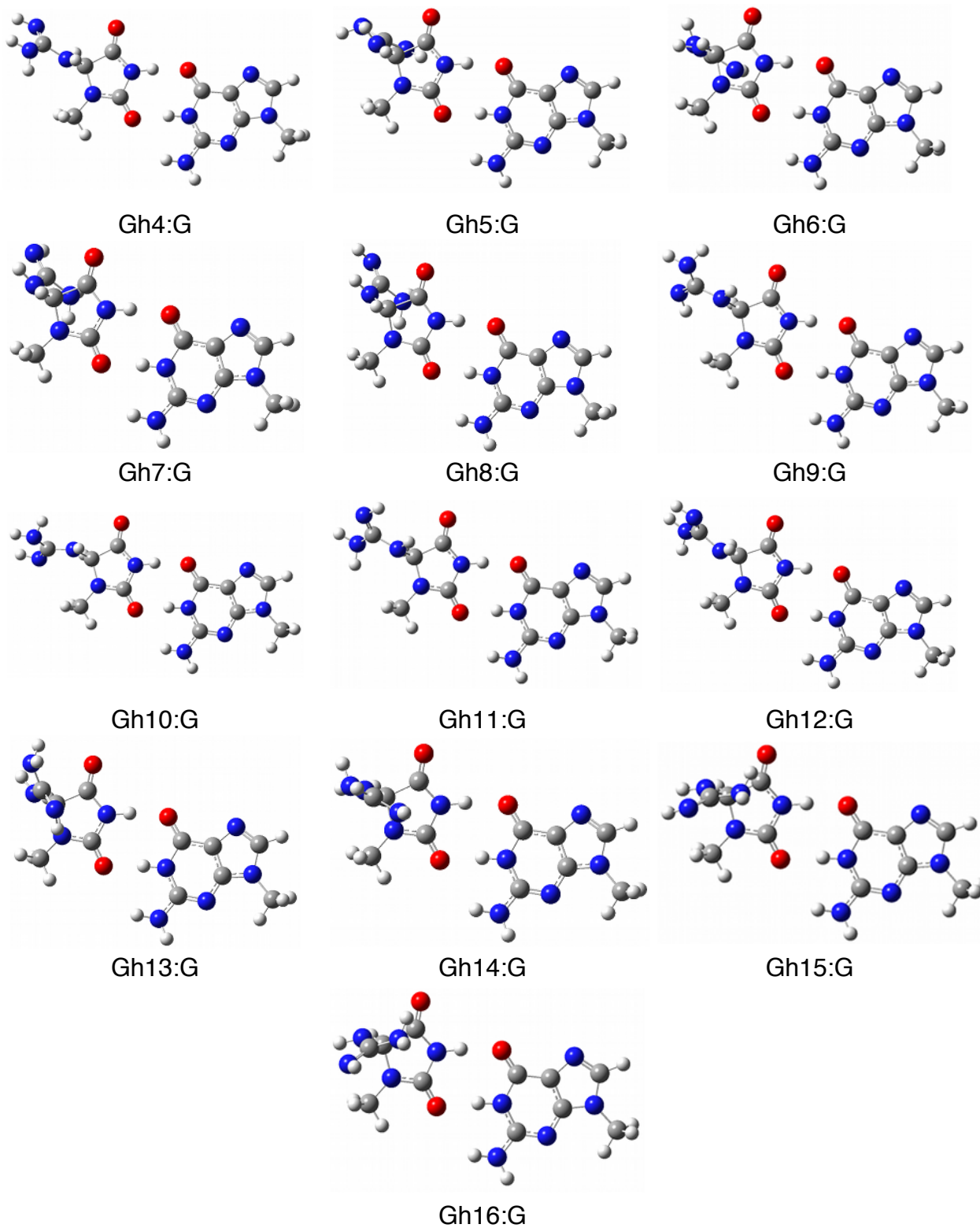


**Fig.5** The structure of Gh. (A) Neutral Tautomers of Gh shown by Verdolino *et al.*<sup>33)</sup> The diketo form showed only one form in here, which used Gh:G base pair proposed by Beckman *et al.*<sup>29)</sup> The enol tautomers showed three forms having the same guanidinium group as the diketo form used in Gh:G base pair. (B) The curly arrows indicate the rotation axis. Asterisk indicates the  $sp^3$  carbon and chiral center.



**Fig.6** *Cont.*

Fig.6 Cont.

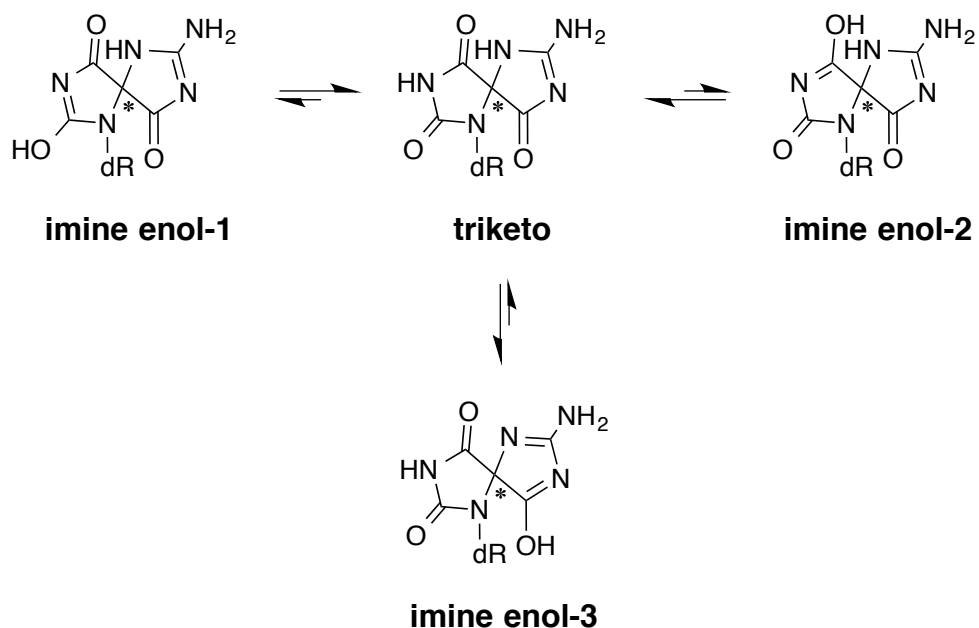


**Fig.6** The Gh:G base pairs. (A) The proposed Gh:G base pair. (B) The geometries of Gh1:G -Gh16:G optimized by *ab initio* calculation. The stabilization energies are shown in Table 2. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *Molecules*, 17, 6705-6715 (2012) with permission from MDPI.

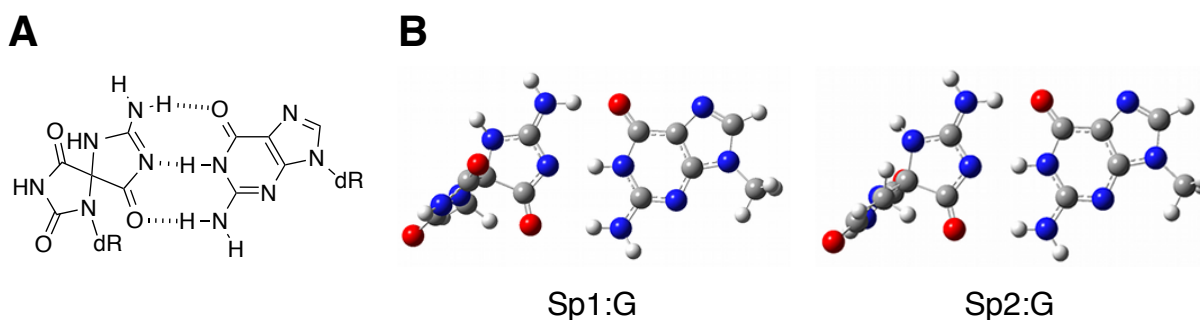
### 3-3. Sp:G 塩基対の構造と安定化エネルギーの算出

Sp とグアニンは Ia:G 塩基対と類似した 3 本の水素結合により、Sp:G 塩基対を形成すると予測されている<sup>2)</sup>。また、水溶液中においては、Sp のトリケト互変異性体 (Fig.7) が最も安定していると推定されている<sup>33)</sup>。Sp の 2 つの立体異性体である Sp1 と Sp2 については、Sp1 が (-)-S 配置、Sp2 が (+)-R 配置である。Sp1:G と Sp2:G の真空中における安定化エネルギーは共に 28.2 kcal/mol、水中では Sp1:G が 18.8 kcal/mol、Sp2:G が 19.9 kcal/mol だった (Fig.8、Table 2)。3-1 で述べたキャビティ半径の違いを考慮すると、Sp2:G は Sp1:G よりもキャビティ半径が小さいため、Sp2:G の方が安定であると考えられる。

また、真空中と水中の両方において、Sp:G 塩基対の安定化エネルギーは Ia:G 塩基対の中で最も安定であった Ia1:G 塩基対に比べると低かった。Kornyushyna らの報告では、Sp に対するグアニンの取り込み効率 Gh/Ia よりも低く、損傷乗り越え DNA 合成も Gh/Ia に比べ Sp は強くブロックされていた<sup>26)</sup>。以上をふまえると、ここで得られた計算結果は Kornyushyna らの実験結果と定性的に一致している。



**Fig.7** Neutral Tautomers of Sp shown by Verdolino *et al.*<sup>33)</sup> The diketo form showed only one form in here, which can form Sp:G base pair proposed by Kino *et al.*<sup>2)</sup> The imine enol tautomers showed two forms, and the position of their imine enol is at hydantoin ring. Asterisk indicates the  $sp^3$  carbon and chiral center.



**Fig.8** The Sp:G base pairs. (A) The proposed Sp:G base pair. (B) The geometries of Sp1:G and Sp2:G optimized by *ab initio* calculation. The stabilization energies are shown in Table 2. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *Molecules*, 17, 6705-6715 (2012) with permission from MDPI.

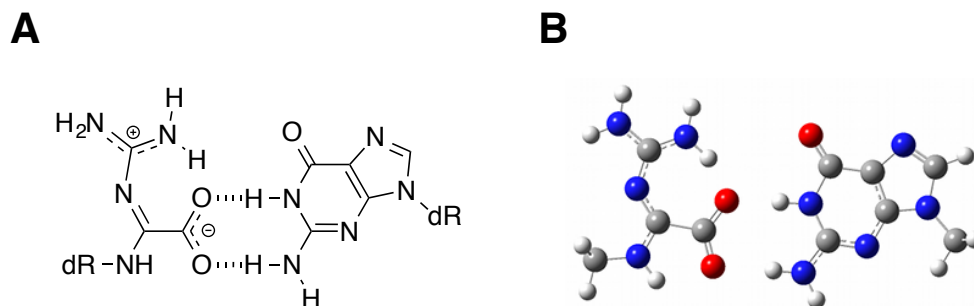
### 3-4. Oz:G 塩基対の安定化エネルギーの算出と Ia:G および Gh:G、Sp:G 塩基対との比較

Oz:G 塩基対については既に安定化エネルギーが予測されているが<sup>20)</sup>、改めてこれを本研究方法に基づいて計算後、安定化エネルギーを算出した。その結果、真空中では 20.3 kcal/mol、水中では 16.3 kcal/mol という値が得られた (Fig.9、Table 2)。この結果は、Ia:G 塩基対が 3 本の水素結合である一方、Oz:G 塩基対が 2 本の水素結合であるため、Ia:G 塩基対より不安定であることを示している。

しかしながら、これまでの実験結果によると、損傷乗り越え DNA 合成の効率は Oz > Gh/Ia > Sp であった<sup>20,26)</sup>。それでは、なぜ実験結果と本章における計算結果は矛盾するのだろうか。それはおそらく、Oz:G 塩基対が平面構造であるのに対して、Gh/Ia および Sp は  $sp^3$  炭素をもち、非平面構造であることが重要な違いであると考えられる。DNA 中における平面な塩基のスタッキングが DNA 二本鎖の安定性を増強するが、一方、 $sp^3$  炭素をもつ非平面な塩基対は DNA 二本鎖の不安定化を引き起こす。例えば、Sp を含む DNA 二本鎖の融解温度 (melting temperature:  $T_m$  値) は天然の DNA に比べ 20 °C 程低いことから、Sp は二本鎖の熱安定性を有意に低下させることが報告されている<sup>35)</sup>。つまり、DNA ポリメラーゼを用いた実験結果は損傷塩基対の水素結合の数とスタッキング効果を考慮することによって説明することができるだろう。

本章では、2'-デオキシリボース部をメチル基に置換したモデルを用いて、グアニン酸化損傷の安定化エネルギーを計算した。また、C1'炭素の位置を固定せずに構造を求めた。それに加え、実験的に算出されたワトソン・クリック型 C:G 塩基対は安定化エネルギーが 21.0 kcal/mol であるのに対して<sup>36)</sup>、DFT 計算によって算出した場合は 25.0 kcal/mol であり、実験値よりも 4.0 kcal/mol 高かった。この矛盾は B3LYP/6-31G\*\* レベルでの計算によるものである。C1'炭素の位置の固定とスタッキングは明らかに重要であるので、第 3 章で考察する。





**Fig.9** The Oz:G base pair. (A) The proposed Oz:G base pair. (B) The geometries of Oz:G optimized by *ab initio* calculation. The stabilization energies are shown in Table 2. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *Molecules*, 17, 6705-6715 (2012) with permission from MDPI.

#### 第4節 結論

水中において、Ia1:G-Ia8:G の中では Ia1:G が 24.1 kcal/mol、Gh1:G-Gh16:G の中では Gh3:G が 21.4 kcal/mol と最も安定であり、Ia と Gh の平衡体の中では Ia1:G が最も可能性のある塩基対構造である。つまり、Gh/Ia の相補鎖側にグアニンが取り込まれる際は Gh よりも Ia の方が有利だと考えられる。また、Sp:G 塩基対に関しては、Sp2:G 塩基対の方が Sp1:G 塩基対よりもわずかに安定であり、その安定化エネルギーは 19.9 kcal/mol だった。しかし、Ia:G 塩基対の安定化エネルギーと比較すると、Sp:G 塩基対の方が Ia:G 塩基対よりも安定化エネルギーが低く、Sp:G 塩基対が Ia:G 塩基対よりも不安定であることが示された。この安定性の違いは、Sp よりも Gh/Ia に対するグアニンの取り込みの効率が良いという実験結果<sup>26)</sup>を説明できるだろう。また、Oz:G 塩基対の安定化エネルギーは水中においては 16.3 kcal/mol であった。Kino らや Korniyushyna らの実験結果により、Gh/Ia や Sp と比較すると Oz に対するグアニンの取り込みは効率的であることが示されているが<sup>20, 26)</sup>、本章における計算結果は Oz:G 塩基対が Ia:G や Gh:G、Sp:G 塩基対より不安定であることを示した。つまり、DNA ポリメラーゼによる塩基の取り込み解析や伸長反応の解析結果を説明するためには、損傷塩基を含む塩基対の安定化エネルギーだけでなく、スタッキング効果をはじめとした他の物性を考慮することが必要であると考えられる。そして、それらを考慮することは本章において生じた Kino らや Korniyushyna らの DNA ポリメラーゼを用いた実験結果と本計算結果の不一致を解決するのに役立つと考えられる。

## 第3章

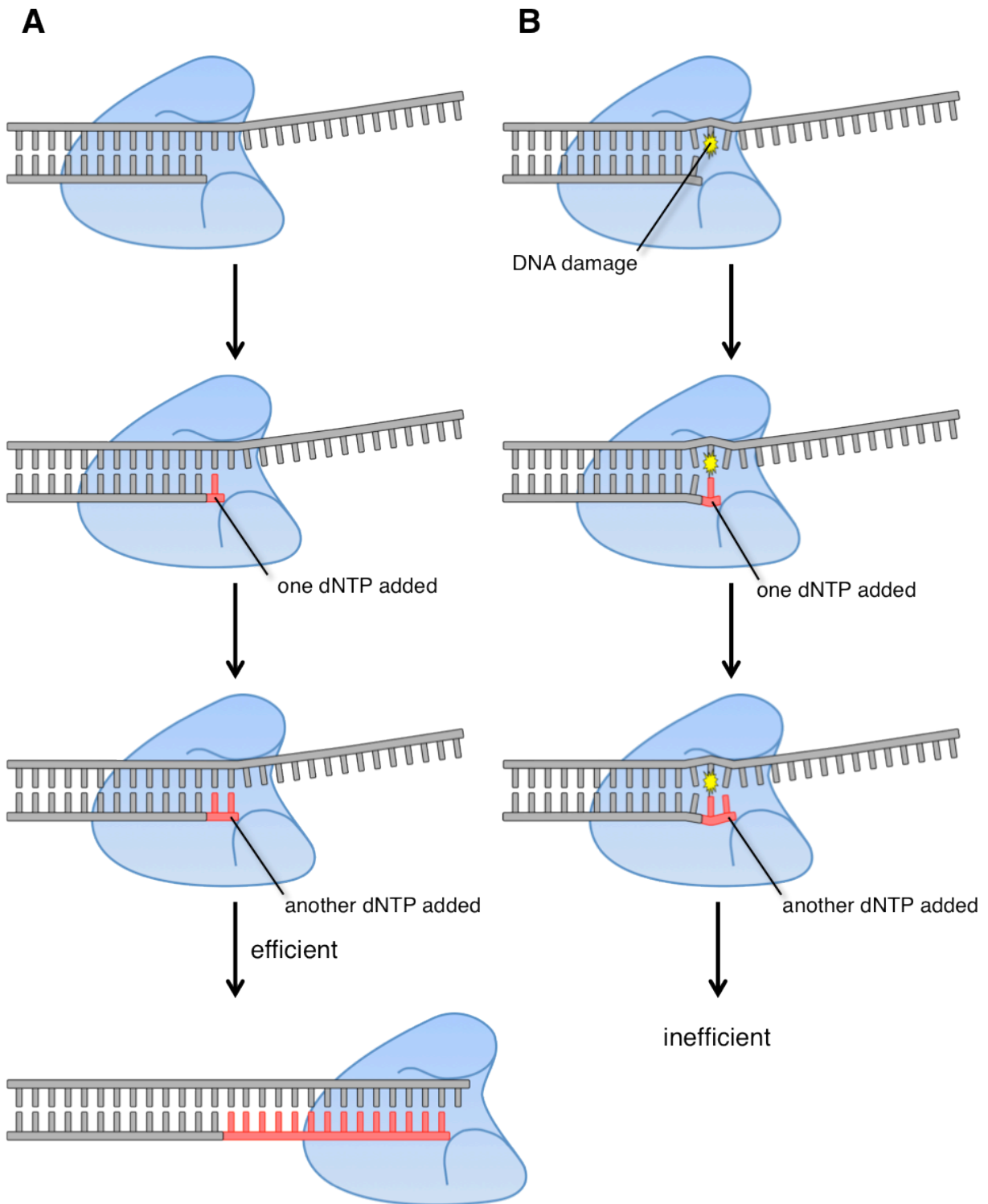
# グアニン酸化損傷：グアニン塩基対を含む DNA 二本鎖の歪みの計算

(本章の内容に関しては *Molecules*, 19, 11030-11044 (2014) に発表済み)

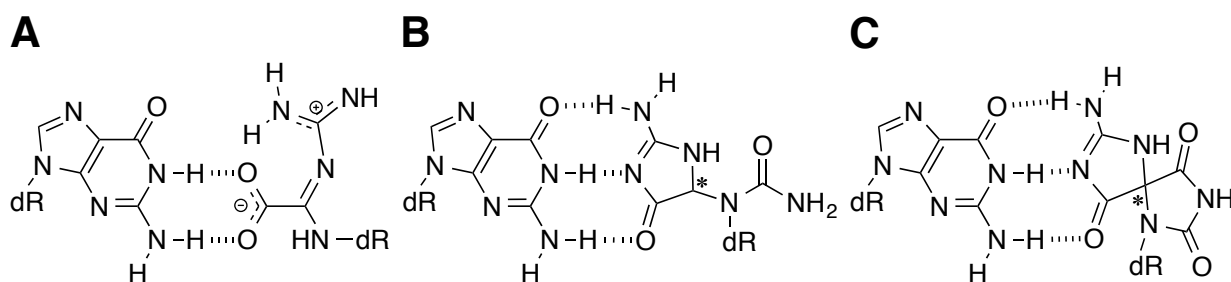
### 第1節 背景

前章ではG:C-C:G トランスバージョンを引き起こす可能性のあるグアニン酸化損傷である、Oz および Gh/Ia、Sp とグアニンの塩基対である G:Oz、G:Gh、G:Ia、G:Sp 塩基対の安定化エネルギーを量子化学計算により算出した。その結果、塩基対の安定性は水素結合の数に依存しており、これらの塩基対の安定性は  $G:Ia > G:Sp > G:Gh > G:Oz$  であることが予測された。しかしながら、第1章や第2章の背景で述べたように、DNA ポリメラーゼを用いた実験により、Oz に対するグアニンの取り込みは Gh/Ia や Sp よりも効率良く、その後の伸長反応においても Oz の方が Gh/Ia や Sp よりも効率良く行われることが明らかとなっている<sup>20,26)</sup>。つまり、前章において算出した塩基対の安定性だけでは、この実験結果<sup>20,26)</sup>を説明することはできていない。

実際の DNA ポリメラーゼによる塩基取り込み反応においては、塩基対の安定性だけではなく、損傷塩基による DNA 二本鎖の歪み度合いやスタッキング効果等の様々な物性による影響を受けている。一般的に、DNA 複製に関与する DNA ポリメラーゼは DNA 二本鎖の歪みに非常に感受性が高く、DNA 二本鎖を歪めるような DNA 損傷は DNA 複製されにくいといわれている<sup>37,38)</sup>。なぜなら、DNA 損傷によって歪められた DNA 二本鎖は、DNA 複製の際に DNA ポリメラーゼの滑走のひっかかりの原因となり、伸長効率の低下を招くからである (Fig.10)。過去の研究において、非平面の DNA 損傷を含む DNA 二本鎖は天然のワトソン・クリック塩基対の DNA に比べると不安定かつ歪みやすいことが報告されている<sup>39)</sup>。そこで、本章ではこの非平面の DNA 損傷が DNA 二本鎖を歪めやすく不安定になること<sup>39)</sup>、そして、複製過程においてはこの DNA 二本鎖の歪みが DNA の複製効率の低下を招く点に着目した<sup>37)</sup>。Fig.11 に示しているように、G:Oz 塩基対は  $sp^3$  炭素をもたず、平面構造であるが、G:Ia と G:Sp 塩基対は  $sp^3$  炭素をもつため非



**Fig.10** DNA synthesis by DNA polymerases. (A) DNA synthesis of undamaged DNA is efficient. (B) DNA synthesis of damaged DNA is inefficient.



**Fig.11** The proposed hydrogen bonding of (A) G:Oz, (B) G:Ia, and (C) G:Sp base pairs. Asterisk indicates the  $sp^3$  carbon.

平面構造である。つまり、Ia や Sp は  $sp^3$  炭素が隣接塩基対の平面性を崩すことで、その結果として Ia や Sp を有する DNA は Oz を有する場合に比べ、DNA の二本鎖が歪みやすくなると考えられる。そのため、これらの損傷塩基を含む DNA 二本鎖の歪み度合いの違いを考慮することで、DNA ポリメラーゼによるグアニンの取り込み効率や損傷乗り越え DNA 合成効率が Oz > Gh/Ia > Sp となった以前の実験結果<sup>20, 26)</sup> と前章の計算結果の矛盾を解決できると考えた。なお、前章でも述べたが、G:Ia 塩基対と G:Gh 塩基対の安定性の計算結果から、グアニンの取り込み過程においては Ia に平衡が偏ると予測しており、本章においては Ia のみを考慮した。

本章では、G:Oz または G:Ia、G:Sp 塩基対を含む二本鎖の安定性と歪み度合いの違いを算出することで、前述した以前の DNA ポリメラーゼを用いた実験結果<sup>20, 26)</sup> を説明することを試みた。これらの損傷塩基を含む DNA 二本鎖の安定性および歪み度合いの違いの算出には、hPol  $\beta$ -DNA モデル<sup>40)</sup> を用いて分子力学計算により構造最適化後に、それぞれの損傷塩基対を中心に含む 3 つの塩基対を抜き出した DNA 二本鎖モデルを用いた。

## 第2節 方法

### 2-1. 分子モデリング

本章では、hPol  $\beta$  の結晶構造 (PDB entry: 1BPY)<sup>40)</sup> を用いて、G:X 塩基対 (X = Oz または S-Ia、R-Ia、S-Sp、R-Sp) をそれぞれ1つ含む hPol  $\beta$ -DNA モデルを作成した。これらのモデルの構築方法の詳細について下記に示す。以前の DNA ポリメラーゼを用いた実験で用いたオリゴヌクレオチドでは、損傷の 5'側隣接塩基が T であり、Oz の次の塩基取り込みではこの T に対して dATP が取り込まれる<sup>20, 21)</sup>。そこで、元の hPol  $\beta$ -DNA モデル複合体中の塩基である dCTP を dATP に、dCTP のテンプレートである G を T に置換した。テンプレート-プライマーの 3'末端の G:C 塩基対は、第2章の量子化学計算で得られた5つの G:X 塩基対にそれぞれ置換した。アミノ酸と他の DNA 塩基配列は結晶構造のデータを用いた。そして、構築したモデルの G:X 塩基対のみ固定して、Macromodel 9.0 の OPLS2005/water を用いて構造最適化した。

### 2-2. *ab initio* 計算

Macromodel 9.0 を用いて最適化後の構造中から、G:X 塩基対および G:X 塩基対に隣接する2つの塩基対、そしてこれら全ての塩基の C1'位の炭素と C1'水素1つ以外の全ての原子を除いた。そして、C1'メチンに水素を2つつけることで、Nメチル化核酸塩基対とした (Fig.12)<sup>20)</sup>。2-1 で述べたように、“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>”および“G<sub>2</sub>X<sub>2</sub>”、“G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>”とした (Fig.12, Fig.15)。

そして、B3LYP/6-31G<sup>\*\*</sup> レベルで“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>”のエネルギーを算出するために、Gaussian 03<sup>30)</sup> を用いた。さらに、水中におけるエネルギーの算出には、Onsager reaction field 法 ( $\epsilon = 78.39$ ) を用いた。“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>”と同様に“G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>”および“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub> + G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>”のエネルギーも算出した。そして、それぞれの不安定化エネルギー ( $\Delta E_1$  および  $\Delta E_3$ ,  $\Delta E_{1+3}$ ) は式 (2)–(4) を用いて定義した。

$$\Delta E_1 = E(\text{"A}_1\text{T}_1\text{" of G:X complex (X = C)}) \quad (2)$$

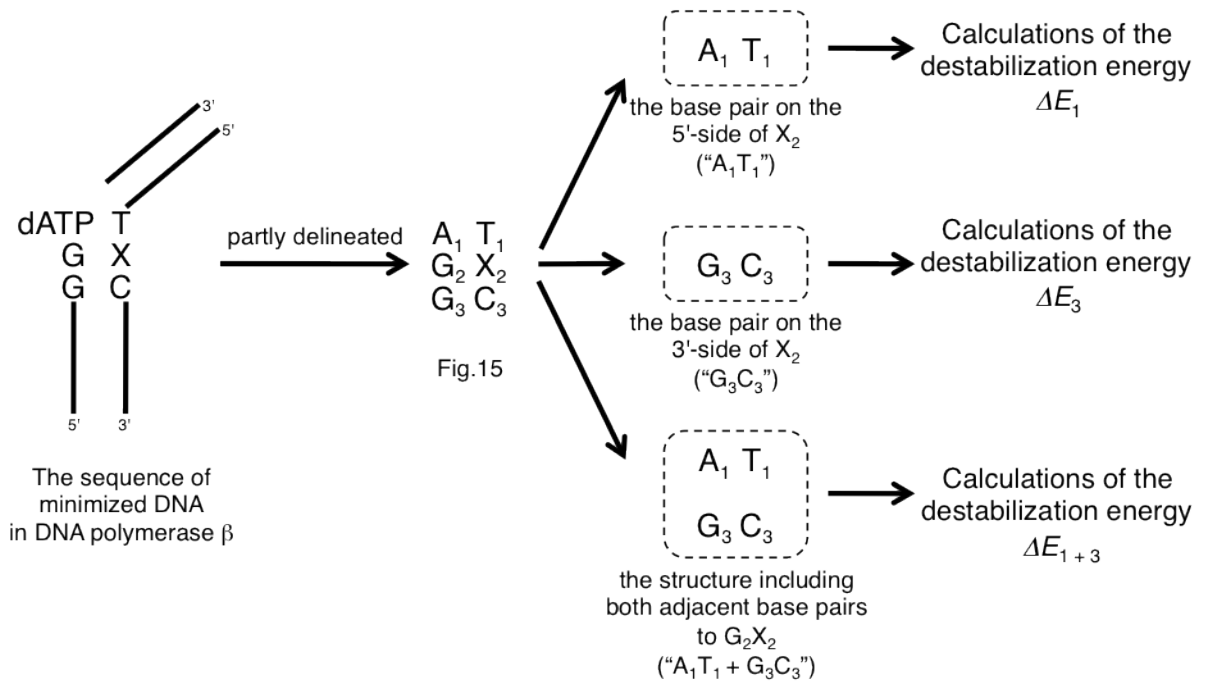
$$- E(\text{"A}_1\text{T}_1\text{" of G:X complex (X = Oz, S-Ia, R-Ia, S-Sp or R-Sp)})$$

$$\Delta E_3 = E(\text{"G}_3\text{C}_3\text{" of G:X complex (X = C)}) \quad (3)$$

$$- E(\text{"G}_3\text{C}_3\text{" of G:X complex (X = Oz, S-Ia, R-Ia, S-Sp or R-Sp)})$$

$$\Delta E_{1+3} = E(\text{"A}_1\text{T}_1 + \text{G}_3\text{C}_3\text{" of G:X complex (X = C)}) \quad (4)$$

$$- E(\text{"A}_1\text{T}_1 + \text{G}_3\text{C}_3\text{" of G:X complex (X = Oz, S-Ia, R-Ia, S-Sp or R-Sp)})$$

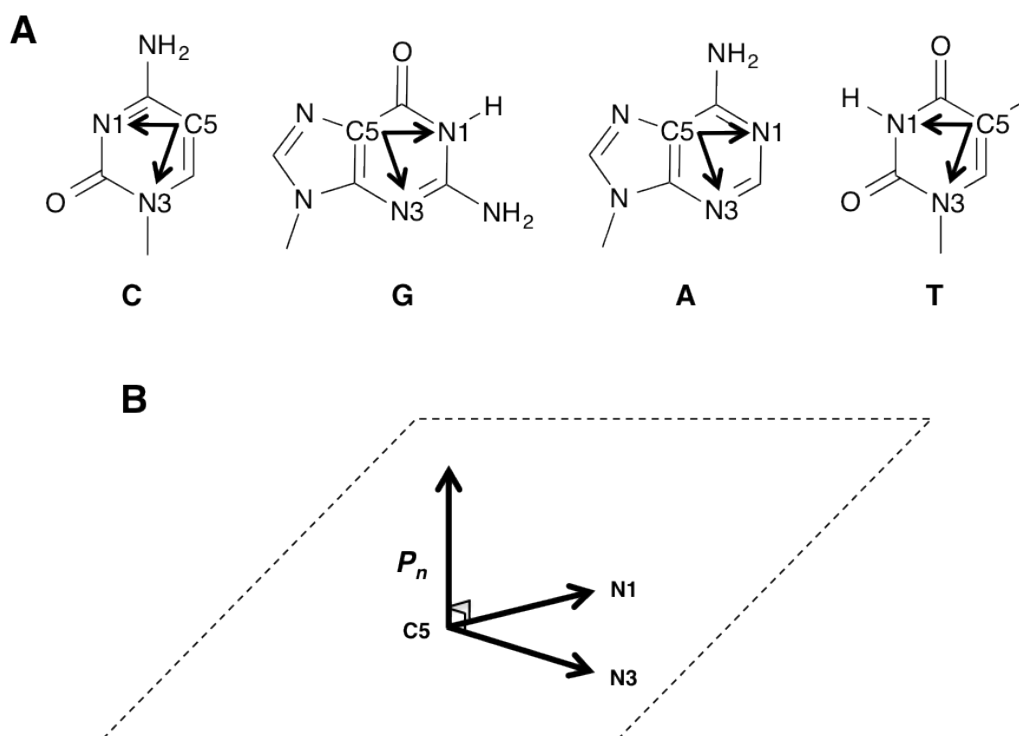


**Fig.12** An overview of calculating the destabilization energies of DNA duplexes. Each Pol  $\beta$ -DNA complex containing a G:X (where X = C, Oz, S-Ia, R-Ia, S-Sp or R-Sp) base pair was minimized. G:X and each base pair adjacent to G:X is delineated in Fig.15. A:T base pair on the 5'-side of X was designated "A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>", G:X base pair was designated "G<sub>2</sub>X<sub>2</sub>", and G:C base pair on the 3'-side of X was designated "G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>". The destabilization energies of "A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>" ( $\Delta E_1$ ), "G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>" ( $\Delta E_3$ ), and "A<sub>1</sub>T<sub>1</sub> + G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>" ( $\Delta E_{1+3}$ ) were calculated *ab initio* as the parts common to each model duplex; each G<sub>2</sub>X<sub>2</sub> base pair was excluded from the calculations. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *Molecules*, 19, 11030-11044 (2014) with permission from MDPI.

### 2-3. 歪み度合いの算出

それぞれ5つの塩基 (A<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>) の原子 C5 (x<sub>C5</sub>, y<sub>C5</sub>, z<sub>C5</sub>)、N1 (x<sub>N1</sub>, y<sub>N1</sub>, z<sub>N1</sub>)、N3 (x<sub>N3</sub>, y<sub>N3</sub>, z<sub>N3</sub>) を用いて、ベクトル **C5N1** とベクトル **C5N3** を算出した (Fig.13A)。法線ベクトル **P<sub>n</sub>** の算出にはこれら 2 つのベクトルを用い、式 (5) のように定義した (Fig.13B)。A<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, C<sub>3</sub> 塩基それぞれの法線ベクトル **P<sub>n</sub>** の別については、*n* で示した。

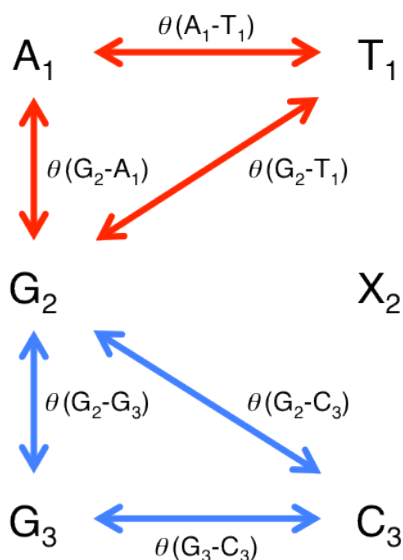
$$\begin{aligned}
 \mathbf{P}_n(x_n, y_n, z_n) &= \mathbf{C5N1} \times \mathbf{C5N3} \\
 &= (x_{N1} - x_{C5}, y_{N1} - y_{C5}, z_{N1} - z_{C5}) \times (x_{N3} - x_{C5}, y_{N3} - y_{C5}, z_{N3} - z_{C5}) \\
 &= ((y_{N1} - y_{C5}) \cdot (z_{N3} - z_{C5}) - (z_{N1} - z_{C5}) \cdot (y_{N3} - y_{C5}), \\
 &\quad (z_{N1} - z_{C5}) \cdot (x_{N3} - x_{C5}) - (x_{N1} - x_{C5}) \cdot (z_{N3} - z_{C5}), \\
 &\quad (x_{N1} - x_{C5}) \cdot (y_{N3} - y_{C5}) - (y_{N1} - y_{C5}) \cdot (x_{N3} - x_{C5}))
 \end{aligned} \tag{5}$$



**Fig.13** (A) Vector **C5N1** and vector **C5N3** in A, T, G, or C. (B) Normal vector **P<sub>n</sub>** was calculated from **C5N1** and vector **C5N3** (Equation (5)). Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *Molecules*, 19, 11030-11044 (2014) with permission from MDPI.



次に、 $G_2$  と  $A_1$  ( $\theta(G_2-A_1)$ )、 $G_2$  と  $T_1$  ( $\theta(G_2-T_1)$ )、 $A_1$  と  $T_1$  ( $\theta(A_1-T_1)$ )、 $G_2$  と  $G_3$  ( $\theta(G_2-G_3)$ )、 $G_2$  と  $C_3$  ( $\theta(G_2-C_3)$ )、 $G_3$  と  $C_3$  ( $\theta(G_3-C_3)$ ) 間の計 6 つの二面角を (Fig.14)、それぞれの塩基上の法線ベクトルを用いて計算した (式 (6)-(11))。



**Fig.14** Calculated dihedral angle  $\theta(G_2-A_1)$ ,  $\theta(G_2-T_1)$  and  $\theta(A_1-T_1)$  showed red arrows, and the calculated dihedral angle  $\theta(G_2-G_3)$ ,  $\theta(G_2-C_3)$  and  $\theta(G_3-C_3)$  showed blue arrows. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *Molecules*, 19, 11030-11044 (2014) with permission from MDPI.

$$\theta(G_2-A_1) = \arccos(\mathbf{P}_{G_2} \cdot \mathbf{P}_{A_1} / |\mathbf{P}_{G_2}| |\mathbf{P}_{A_1}|) \quad (6)$$

$$\theta(G_2-T_1) = \arccos(\mathbf{P}_{G_2} \cdot \mathbf{P}_{T_1} / |\mathbf{P}_{G_2}| |\mathbf{P}_{T_1}|) \quad (7)$$

$$\theta(A_1-T_1) = \arccos(\mathbf{P}_{A_1} \cdot \mathbf{P}_{T_1} / |\mathbf{P}_{A_1}| |\mathbf{P}_{T_1}|) \quad (8)$$

$$\theta(G_2-G_3) = \arccos(\mathbf{P}_{G_2} \cdot \mathbf{P}_{G_3} / |\mathbf{P}_{G_2}| |\mathbf{P}_{G_3}|) \quad (9)$$

$$\theta(G_2-C_3) = \arccos(\mathbf{P}_{G_2} \cdot \mathbf{P}_{C_3} / |\mathbf{P}_{G_2}| |\mathbf{P}_{C_3}|) \quad (10)$$

$$\theta(G_3-C_3) = \arccos(\mathbf{P}_{G_3} \cdot \mathbf{P}_{C_3} / |\mathbf{P}_{G_3}| |\mathbf{P}_{C_3}|) \quad (11)$$

DNA 二重鎖の歪みの指標として、歪み度合い  $\delta_1$  と  $\delta_3$  を式 (12) と式 (13) のように定義した。

$$\delta_1 = \theta(G_2-A_1) + \theta(G_2-T_1) + \theta(A_1-T_1) \quad (12)$$

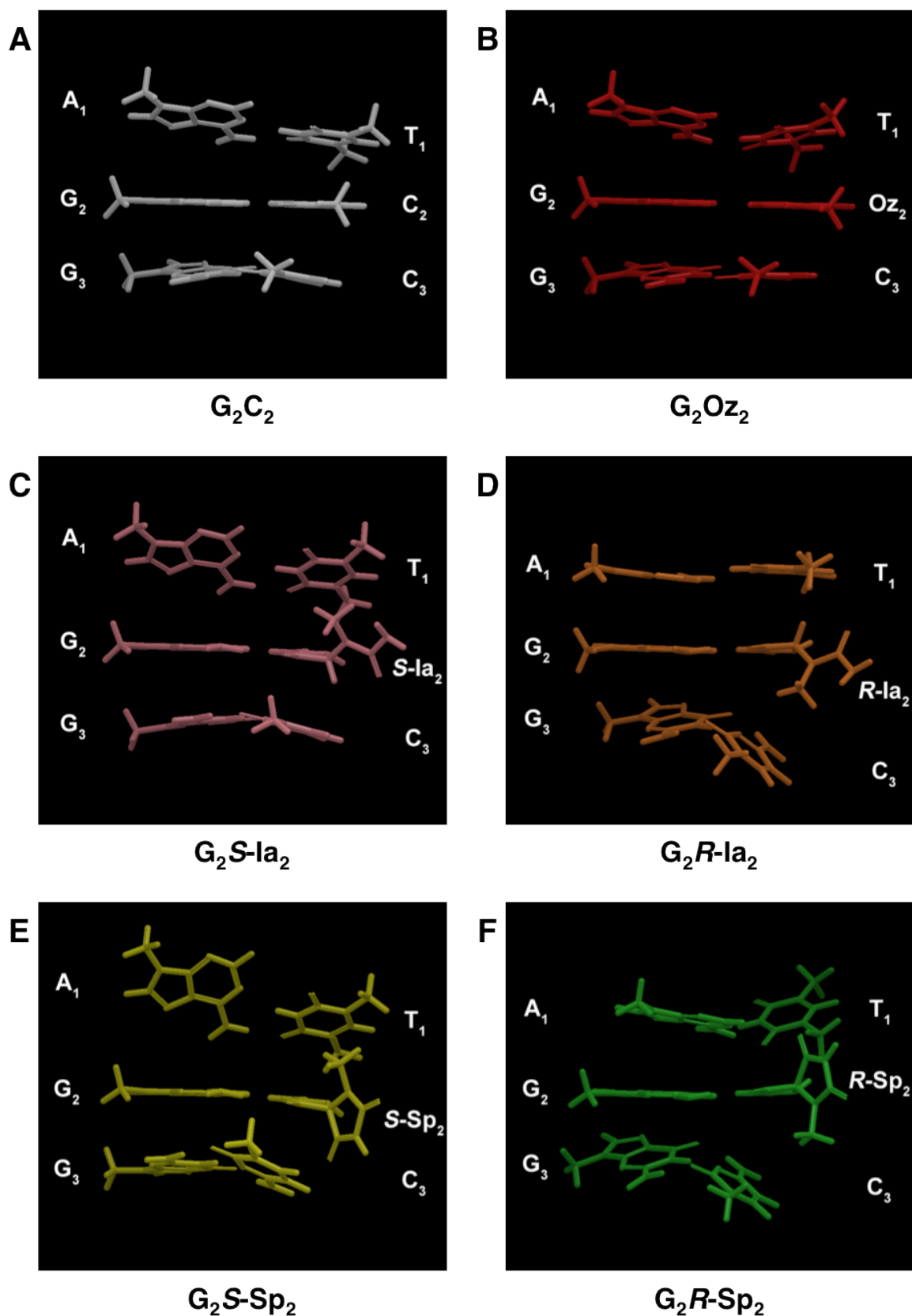
$$\delta_3 = \theta(G_2-G_3) + \theta(G_2-C_3) + \theta(G_3-C_3) \quad (13)$$

### 第3節 結果と考察

#### 3-1. G:X 塩基対を1つ含む DNA 二本鎖の構造最適化

第2章において、グアニン酸化損傷 (Oz または Ia、Sp) とグアニン塩基対の安定化エネルギーを計算した。Ia と Sp は  $sp^3$  炭素を有しているため、S 体と R 体がある。この計算結果は、“G:X (X = Oz または S-Ia、R-Ia、S-Sp、R-Sp)” 塩基対の安定性が  $G:S-Ia > G:R-Ia >> G:R-Sp > G:S-Sp >> G:Oz$  であることを第2章に示した。本章では、DNA ポリメラーゼの活性中心内における、G:X 塩基対を含む DNA 二本鎖の安定性の違いを明らかにすることを試みた。hPol  $\beta$  の結晶構造 (PDB entry: 1BPY)<sup>40)</sup> を用いて、G:X 塩基対をそれぞれ1つ含む hPol  $\beta$ -DNA モデルを作成した。また、G:X 塩基対の構造は第2章の計算結果において、最も安定であった塩基対構造を用いた。

量子化学計算は分子力学計算よりも定量性に優れている。本章では、最も重要である G:X 塩基対部分は第2章で得た最適化構造を用いた。しかし、hPol  $\beta$ -DNA モデルは非常に多くの原子を含んでいるため、量子化学計算による構造最適化は現実的な時間で計算できない。そこで、hPol  $\beta$ -DNA モデルの構造最適化には分子力学計算を用いた。つまり、最も重要な G:X 塩基対部分の構造にのみ量子化学計算を、hPol  $\beta$ -DNA モデル全体の構造最適化には分子力学計算を用いた。本章では、G:X 塩基対とその5'および3'側の隣接塩基対に着目した (Fig.12、Fig.15)。Fig.12 に示したように、中心の G:X 塩基対を“ $G_2X_2$ ”、X の5'側の A:T 塩基対を“ $A_1T_1$ ”、X の3'側の塩基対を“ $G_3C_3$ ”と以降は示す。また、得られた  $A_1T_1$ 、 $G_2X_2$ 、 $G_3C_3$  を Fig.15 に示した。この3つの塩基対からなる DNA 二本鎖のエネルギーを算出することで、 $X_2$  の影響を比較することを試みた。しかし、 $X_2$  は原子数の数がそれぞれ異なっているため、 $X_2$  塩基を含む構造のエネルギーは直接比較できない。そこで、それぞれの構造の中で共通する部分である  $A_1T_1$  と  $G_3C_3$  に着目した。この  $G_2X_2$  を除いた共通部分のエネルギーを算出し、比較することで、酸化損傷を含むことで生じる DNA 二本鎖の不安定化を評価した。



**Fig.15** Minimized geometries of “ $A_1T_1$ ,  $G_2X_2$ ,  $G_3C_3$ ” containing  $X_2 =$  (A) C, (B) Oz, (C) *S*-Ia, (D) *R*-Ia, (E) *S*-Sp, or (F) *R*-Sp as viewed from the minor groove. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *Molecules*, 19, 11030-11044 (2014) with permission from MDPI.

### 3-2. X の 5'側および 3'側の塩基対の不安定化エネルギー

損傷塩基による DNA 二本鎖の不安定化を評価するために、それぞれの損傷を含む DNA 二本鎖の“G<sub>2</sub>X<sub>2</sub>”塩基対を除いた共通する部分を用いて不安定化エネルギーを算出した。

#### 3-2-1. X の 5'側の塩基対の不安定化エネルギー

X<sub>2</sub> の 5'側塩基対である“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>”塩基対 ( $\Delta E_I$ ) の不安定化エネルギーは、式 (2) によって定義し、算出した (Table 3)。また、真空中の不安定化エネルギーは $\Delta E_I^{\text{DFT}}$ 、水中の不安定化エネルギーは $\Delta E_I^{\text{SCRF}}$  で示した。 $\Delta E_I^{\text{DFT}}$  と $\Delta E_I^{\text{SCRF}}$  はともに  $R\text{-Sp} > S\text{-Sp} > S\text{-Ia} > \text{Oz} > R\text{-Ia}$  であった。

Kornyushyna らは、速度論解析から、Gh/Ia に対するグアニンの取り込みは Sp よりも効率が良いことを報告している<sup>26)</sup>。この計算結果は損傷の 5'側塩基対である“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>”は、立体異性体に関係なく Ia の方が Sp よりも安定であり、Kornyushyna らの報告と一致していた。しかしながら、Oz については R-Ia よりも $\Delta E_I$  値が大きく、不安定であった。つ

**Table 3** Destabilization energies (kcal/mol) of “A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>” ( $\Delta E_I$ ), “G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>” ( $\Delta E_3$ ), and “A<sub>1</sub>T<sub>1</sub> + G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>” ( $\Delta E_{I+3}$ ), each value was calculated with minimized geometries. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *Molecules*, 19, 11030-11044 (2014) with permission from MDPI.

X <sup>a</sup>	A <sub>1</sub> T <sub>1</sub>		G <sub>3</sub> C <sub>3</sub>		A <sub>1</sub> T <sub>1</sub> + G <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	
	$\Delta E_I^{\text{DFT}}$	$\Delta E_I^{\text{SCRF}}$	$\Delta E_3^{\text{DFT}}$	$\Delta E_3^{\text{SCRF}}$	$\Delta E_{I+3}^{\text{DFT}}$	$\Delta E_{I+3}^{\text{SCRF}}$
Oz	1.3	1.1	-0.1	0.6	1.1	1.0
S-Ia	1.4	1.3	2.6	1.3	4.1	4.5
R-Ia	0.5	0.6	4.0	3.9	4.8	4.6
S-Sp	2.1	2.1	2.7	2.8	4.8	5.3
R-Sp	12.6	12.4	5.3	4.5	18.3	18.3

<sup>a</sup> X = the damage contained in the minimized structure.

まり、5'側塩基対である“ $A_1T_1$ ”の安定性だけでは、Ia よりも Oz の損傷乗り越え DNA 合成の方が効率的であった以前の実験結果<sup>20)</sup>を説明することはできなかった。そこで、次に3'側塩基対である“ $G_3C_3$ ”の不安定化エネルギーを計算することにした。

### 3-2-2. X の 3'側の塩基対の不安定化エネルギー

$X_2$  の 3'側塩基対である“ $G_3C_3$ ”塩基対 (真空中： $\Delta E_3^{DFT}$ 、水中： $\Delta E_3^{SCRF}$ ) の不安定化エネルギーは、式 (3) によって定義され、量子化学計算によって算出した (Table 3)。その結果、不安定化エネルギー $\Delta E_3^{DFT}$  および $\Delta E_3^{SCRF}$  はともに  $R-Sp > R-Ia > S-Sp > S-Ia > Oz$  となった。驚くべきことに、 $X_2$  の 3'側塩基対である“ $G_3C_3$ ”塩基対の不安定化エネルギーは Oz が最も小さい値であることから、“ $G_3C_3$ ”塩基対は Oz が最も安定であることが示された。

$X_2$  の 3'側塩基対である“ $G_3C_3$ ”塩基対の安定性は、Ia や Sp よりも Oz の損傷乗り越え DNA 合成の方が効率的であった以前の実験結果<sup>20, 26)</sup>と一致していた。しかし、計算結果は  $S-Sp$  の“ $G_3C_3$ ”も  $R-Ia$  の“ $G_3C_3$ ”よりも安定であることを示しており、 $X_2$  の 3'側塩基対である“ $G_3C_3$ ”塩基対の安定性を用いて過去の実験結果<sup>20, 26)</sup>を完全には説明できなかった。従って、次に  $X_2$  の 5'側および 3'側塩基対を含む構造を用いて不安定化エネルギーを算出した。

### 3-2-3. $G_2X_2$ を除いた X の 5'側および 3'側の塩基対を含む構造を用いて算出した不安定化エネルギー

$G_2X_2$  塩基対を除いた共通部分である“ $A_1T_1$ ”および“ $G_3C_3$ ”塩基対を含む“ $A_1T_1 + G_3C_3$ ” (真空中： $\Delta E_{1+3}^{DFT}$ 、水中： $\Delta E_{1+3}^{SCRF}$ ) の不安定化エネルギーを計算した。これらは式 (4) で定義した (Table 3)。 $\Delta E_{1+3}^{DFT}$  および $\Delta E_{1+3}^{SCRF}$  の値が最も小さいのは Oz であった。また Ia は Sp よりも $\Delta E_{1+3}^{DFT}$  および $\Delta E_{1+3}^{SCRF}$  の値が小さく、立体異性体に着目すると、Ia と Sp に共通して S 体の方が R 体よりも小さかった。以上をまとめると、 $\Delta E_{1+3}^{DFT}$  は  $R-Sp > S-Sp \sim R-Ia > S-Ia > Oz$ 、 $\Delta E_{1+3}^{SCRF}$  は  $R-Sp > S-Sp > R-Ia > S-Ia > Oz$  である。

Oz の“ $A_1T_1 + G_3C_3$ ”は他の損傷の“ $A_1T_1 + G_3C_3$ ”よりも安定であった。これは塩基対を含む DNA 構造が、他の損傷塩基対を含む DNA 構造に比べ、天然の塩基対を含む DNA 構

造に類似性が高いことを示している。背景でも述べたが、天然のワトソン・クリック塩基対により構成される DNA 二本鎖よりも、非平面の DNA 損傷を含む DNA ほど二本鎖構造が歪んで不安定化し<sup>39)</sup>、DNA ポリメラーゼは歪んだ DNA を複製しにくいことが知られている<sup>37)</sup>。つまり、ここで計算結果は、Ia や Sp よりも Oz の方が損傷乗り越え DNA 合成しやすいという実験結果<sup>20,26)</sup> を説明できるものであった。

R-Ia と S-Sp の  $\Delta E_{I+3}^{\text{DFT}}$  値については、実験結果<sup>26)</sup> と一致していなかった。しかし、実際の DNA 複製に関する研究は水溶液中で行われるため<sup>20, 26)</sup>、DNA 複製中における DNA 二本鎖の安定性は、水中における不安定化エネルギーである  $\Delta E_{I+3}^{\text{SCRF}}$  値に起因すると考えられる。実際にこれらの  $\Delta E_{I+3}^{\text{SCRF}}$  値をみると、R-Ia の方が S-Sp よりも低く、安定であることを示しており、以前の実験結果<sup>26)</sup> と一致する。さらに、S-Sp および R-Sp に関しては、*in vivo* において S-Sp の方が R-Sp よりもバイパス効率が良いという報告があり<sup>41)</sup>、本計算結果はこれを説明できるものであった。

以上をまとめると、 $X_2$  の 5'側塩基対である“ $A_1T_1$ ”塩基対または  $X_2$  の 3'側塩基対である“ $G_3C_3$ ”塩基対だけでは G:Oz または G:Ia、G:Sp 塩基対を 1 つ含む DNA 二本鎖の安定性を評価するには不十分であり、この両方の塩基対を含む構造である“ $A_1T_1 + G_3C_3$ ”を用いることが必要であることが導けた。次項において、中心に G:X 塩基対を含むそれぞれの DNA 二本鎖中において、Oz または S-Ia、R-Ia、S-Sp、R-Sp が“ $A_1T_1$ ”塩基対および“ $G_3C_3$ ”塩基対に与える影響について検討するため、DNA の歪みのパラメーター化を行った。

### 3-3. G:C 塩基対を含む DNA 二本鎖からの歪み度合い

Fig.15 から Oz または S-Ia、R-Ia、S-Sp、R-Sp を 1 つ含む DNA 二本鎖の歪み度合いに差があるような視覚的な印象を受けた。しかし、抽象的な視覚的印象では、各構造間の歪み度合いの違いを詳細に比較するには不十分であるため、それらの視覚的印象を具体的にパラメーター化することにし、式 (12) や式 (13) のような式で定義することとした。

#### 3-3-1. 5'側塩基対の歪み度合い

G<sub>2</sub>X<sub>2</sub> 塩基対の 5'側塩基対の歪み度合いを決定するため、G<sub>2</sub> と A<sub>1</sub> ( $\theta(G_2-A_1)$ )、G<sub>2</sub> と T<sub>1</sub> ( $\theta(G_2-T_1)$ )、A<sub>1</sub> と T<sub>1</sub> ( $\theta(A_1-T_1)$ ) 間の計 3 つの二面角を式 (6)-(8) を用いてそれぞれ計算した (Fig.14 の赤矢印)。そして、歪み度合い ( $\delta_I$ ) を式 (12) に示したように、 $\theta(G_2-A_1)$  と  $\theta(G_2-T_1)$ 、 $\theta(A_1-T_1)$  の合計値として定義した。算出した  $d_I$  は S-Sp > R-Sp > S-Ia > Oz > C > R-Ia となった (Table 4)。

$\delta_I$  の値から R-Ia に隣接する“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>”塩基対の歪みは最も小さく、この構造は天然の塩基対から構成される構造と類似していた (Table 4 および Fig.15A、15D)。従って、R-Ia の不安定化エネルギー  $\Delta E_I$  が最も低かったと考えられる。さらに、 $\Delta E_I$  の大きさ、S-Ia > Oz > R-Ia は歪み度合い  $\delta_I$  と一致していた。つまり、 $\delta_I$  が大きいと“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>”塩基対が顕著に歪んでいることを示しており、これは X<sub>2</sub> 塩基によって引き起こされることを示しているといえる。しかし、R-Sp と S-Sp の  $\Delta E_I$  値については、それぞれの損傷によって引き起こされる歪み度合い  $\delta_I$  では説明できなかった。さらに、Ia と Sp の両方に共通して、S 体の  $\Delta E_I$  値は R 体の  $\Delta E_I$  値よりも大きかった。S-Ia および S-Sp の C1'メチル基が“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>”塩基対の方向に向いており (Fig.15C、15E)、X<sub>2</sub> の 5'側においては S 体の影響は R 体よりも大きかった。以上から、歪み度合い  $\delta_I$  では以前の実験結果<sup>20,26)</sup> だけでなく、 $\Delta E_I$  値についても完全には説明できなかった。

**Table 4** Dihedral angles  $\theta(G_2-A_1)$ ,  $\theta(G_2-T_1)$ , and  $\theta(A_1-T_1)$  (red arrows in Fig.14), and the degree of distortion  $\delta_I$ . Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *Molecules*, 19, 11030-11044 (2014) with permission from MDPI.

X <sup>a</sup>	$\theta(G_2-A_1)$	$\theta(G_2-T_1)$	$\theta(A_1-T_1)$	$\delta_I$
C	25.2°	12.5°	13.3°	51.0°
Oz	19.4°	18.2°	18.0°	55.6°
S-Ia	38.3°	28.2°	11.3°	77.8°
R-Ia	3.3°	4.0°	4.0°	11.3°
S-Sp	56.1°	29.9°	26.4°	112.4°



<i>R</i> -Sp	10.9°	32.4°	43.2°	86.5°
--------------	-------	-------	-------	-------

---

<sup>a</sup> X = the damage contained in the minimized structure.

### 3-3-2. 3'側塩基対の歪み度合い

X<sub>2</sub> 塩基の 5'側塩基対の歪み度合い (3-3-1) と同様に、G<sub>2</sub> と G<sub>3</sub> ( $\theta(G_2-G_3)$ )、G<sub>2</sub> と C<sub>3</sub> ( $\theta(G_2-C_3)$ )、G<sub>3</sub> と C<sub>3</sub> ( $\theta(G_3-C_3)$ ) 間の計 3 つの二面角を式 (9)-(11) を用いてそれぞれ計算した (Fig.14 の青矢印)。また、歪み度合い ( $\delta_3$ ) を式 (13) に示したように、 $\theta(G_2-G_3)$  と  $\theta(G_2-C_3)$ 、 $\theta(G_3-C_3)$  の合計値として定義した。算出した  $\delta_3$  は R-Ia > R-Sp > S-Sp > S-Ia > C > Oz となった (Table 5)。

X<sub>2</sub> 塩基の 3'側塩基対の歪み度合い  $\delta_3$  は  $\delta_1$  とは異なり、Oz に隣接する“G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>”塩基対が最も歪みが小さく、天然の構造と最も類似していた (Table 5 および Fig.15A、15B)。さらに、 $\Delta E_3$  の大きさ、S-Sp > S-Ia > Oz は歪み度合い  $\delta_3$  の順と一致していた。3.3.1 の  $\delta_1$  と同様に、G<sub>3</sub>C<sub>3</sub> 塩基の不安定化は G<sub>2</sub>X<sub>2</sub> 塩基が原因となって生じる歪みによって説明することができた。一方、 $\delta_1$  とは異なり  $\delta_3$  値においては、Ia と Sp とともに R 体は S 体よりも大きく、R-Ia および R-Sp の C1'メチル基が“G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>”塩基対の方向に向いていた (Fig.15D、15F)。よって、R-Ia および R-Sp の C<sub>3</sub> が R-Ia および R-Sp の C1'メチル基によって特に歪められたことが示された。歪み度合い  $\delta_3$  は  $\delta_1$  と同様に、以前の実験結果<sup>20,26</sup> および  $\Delta E_3$  値を完全に説明することはできなかった。

**Table 5** Dihedral angles  $\theta(G_2-G_3)$ ,  $\theta(G_2-C_3)$ , and  $\theta(G_3-C_3)$  (blue arrows in Fig.14), and the degree of distortion  $\delta_3$ . Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *Molecules*, 19, 11030-11044 (2014) with permission from MDPI.

X <sup>a</sup>	$\theta(G_2-G_3)$	$\theta(G_2-C_3)$	$\theta(G_3-C_3)$	$\delta_3$
C	9.5°	8.0°	17.2°	34.6°
Oz	11.1°	3.1°	11.9°	26.1°
S-Ia	5.4°	13.9°	19.2°	38.5°
R-Ia	17.9°	42.6°	49.2°	109.7°
S-Sp	5.5°	25.7°	23.2°	54.4°
R-Sp	22.9°	36.2°	43.3°	102.5°

<sup>a</sup> X = the damage contained in the minimized structure.

### 3-3-3. 損傷塩基の5'側および3'側塩基対両方を考慮した総合的な歪み度合い

損傷塩基  $X_2$  の5'側および3'側塩基対両方を考慮し、 $\delta_1$  と  $\delta_3$  の合計値として総合的な歪み度合い (" $\delta_1 + \delta_3$ ") をここで新たに定義した。" $\delta_1 + \delta_3$ " は Table 6 に示したように、 $R\text{-Sp} > S\text{-Sp} > R\text{-Ia} > S\text{-Ia} > C > Oz$  となり、それぞれの損傷に関しては  $\Delta E_{1+3}$  と一致していた。総合的な歪み度合い " $\delta_1 + \delta_3$ " においては、 $Oz$  は  $C$  よりも値が小さく、 $Oz$  は天然の DNA よりも歪み度合いが少ないことが示されたが、 $\Delta E_{1+3}$  から " $G_2Oz_2$ " に隣接する " $A_1T_1 + G_3C_3$ " 塩基対は天然の " $G_2C_2$ " に隣接する " $A_1T_1 + G_3C_3$ " 塩基対よりも不安定であることが示されており、矛盾していた。つまり、この総合的な歪み度合い " $\delta_1 + \delta_3$ " でさえ、" $A_1T_1 + G_3C_3$ " の安定性を部分的にしか説明できなかった。

**Table 6** Total degree of distortion (" $\delta_1 + \delta_3$ "). Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *Molecules*, 19, 11030-11044 (2014) with permission from MDPI.

$X^a$	$\delta_1 + \delta_3$
C	85.6°
Oz	81.7°
S-Ia	116.3°
R-Ia	121.1°
S-Sp	166.8°
R-Sp	189.0°

<sup>a</sup> X = the damage contained in the minimized structure.

### 3-3-4. 各酸化損傷と天然の C の場合の歪み度合いの差を比較

3-3-3 で述べた " $G_2Oz_2$ " と " $G_2C_2$ " 間における歪み度合い " $\delta_1 + \delta_3$ " と " $A_1T_1 + G_3C_3$ " の安定性の不一致を解決することを試みた。単純に歪み度合いを示す " $\delta_1 + \delta_3$ " を比較する代わりに、不安定化エネルギーの算出と同様に C の " $\delta_1 + \delta_3$ " 値を基準とし、この基準とそれ

それぞれの損傷との差を算出した。その結果、C と S-Ia または R-Ia の“ $\delta_1 + \delta_3$ ”値の差は  $30.7^\circ$ 、 $35.4^\circ$ であった。これに対して、C と Oz の“ $\delta_1 + \delta_3$ ”値はわずか  $4.0^\circ$ の差しかなかった。つまり、“ $G_2Oz_2$ ”に隣接する“ $A_1T_1 + G_3C_3$ ”の歪みは、“ $G_2S-Ia_2$ ”または“ $G_2R-Ia_2$ ”に隣接する“ $A_1T_1 + G_3C_3$ ”よりも小さいことを示しており、Fig.15 における視覚的な印象とも一致していた。さらに、C と S-Sp または R-Sp の“ $\delta_1 + \delta_3$ ”値の差は  $81.1^\circ$ 、 $103.3^\circ$ であり、“ $G_2S-Sp_2$ ”または“ $G_2R-Sp_2$ ”に隣接する“ $A_1T_1 + G_3C_3$ ”が基準とした“ $G_2C_2$ ”から最も歪んでいることを示していた。これについても、Fig.15 の視覚的な印象と一致していた。この基準とした“ $G_2C_2$ ”からの歪み度合いに関する考察は、“ $G_2X_2$ ”に隣接する“ $A_1T_1 + G_3C_3$ ”の安定性を説明することができた。

前述した“ $\delta_1 + \delta_3$ ”値に加え、 $\delta_1$  値および  $\delta_3$  値に関しても C を基準とし、基準からの歪み度合いとして、それぞれの損傷について検討した。その結果、 $\delta_1$  値に関しては  $S-Sp > R-Ia > R-Sp > S-Ia > Oz$ 、 $\delta_3$  値では  $R-Ia > R-Sp > S-Sp > Oz > S-Ia$  となった。つまり、 $\delta_1$  値および  $\delta_3$  値に関しても C を基準に比較したが、視覚的印象と一致した“ $\delta_1 + \delta_3$ ”値とは異なって、 $\delta_1$  値および  $\delta_3$  値は視覚的印象とは一致しなかった。

以上をまとめると、 $\delta_1$  値および  $\delta_3$  値では部分的にしか説明できなかったが、“ $\delta_1 + \delta_3$ ”値は  $\delta_1$  値と  $\delta_3$  値を合計することで互いの弱点を補い合っており、以前の DNA ポリメラーゼを用いた実験結果<sup>20,26)</sup>と不安定化エネルギー  $\Delta E_{1+3}$  を説明することができた。計算結果によると、“ $G_2X_2$ ”塩基対に隣接する“ $A_1T_1 + G_3C_3$ ”の構造が損傷の非平面性による影響によって歪んだと考えられる。言い換えると、グアニン酸化損傷を含む DNA 二本鎖の安定性はそれぞれのグアニン酸化損傷の非平面性によって決まるといえるだろう。つまり、G:Oz 塩基対を含む DNA 二本鎖の歪みが他の損傷を含む DNA 二本鎖よりも小さいことは合理的であると考えられる。

#### 第4節 結論

DNA テンプレートが Oz のときの方が Ia や Sp のときよりも、グアニンの取り込み効率が良いことを過去の実験結果<sup>20, 26)</sup>が示しているが、第2章における量子化学計算によって算出した G:Oz および G:Ia、G:Sp 塩基対の安定性では、このグアニンの取り込み効率の違いを説明できなかった。そこで、本章では、これらの塩基対の平面性の違いに着目し、これらの塩基対を含む DNA 二本鎖の歪み度合いの差によってグアニンの取り込み効率を説明することを試みた。

本章では3塩基対からなり、中心に塩基対を“G<sub>2</sub>X<sub>2</sub>”含む DNA 二本鎖モデルを用いて、“G<sub>2</sub>X<sub>2</sub>”塩基対以外の共通部分を用いて、エネルギーの比較を行った。その結果、X<sub>2</sub> の5'側の“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>”塩基対の安定性については  $R-Ia > Oz > S-Ia > S-Sp > R-Sp$  であり、X<sub>2</sub> の3'側の“G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>”塩基対の安定性については  $Oz > S-Ia > S-Sp > R-Ia > R-Sp$  となった。これらの計算結果では過去の実験結果<sup>20, 26)</sup>を説明することはできなかった。そこで、“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>”および“G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>”塩基対を含む構造“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub> + G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>”の不安定化エネルギーを算出した。その結果、“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub> + G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>”の安定性は  $Oz > S-Ia > R-Ia > S-Sp > R-Sp$  となった。つまり、X<sub>2</sub> 塩基の5'側と3'側の両方に隣接する塩基対を考慮することで、過去の DNA ポリメラーゼを用いた実験結果<sup>20, 26)</sup>を説明することができた。

さらに、それぞれの損傷による影響を検討するため、DNA 二本鎖の歪み度合いをパラメーター化した。X<sub>2</sub> 塩基の5'側の歪み度合い $\delta_1$ と3'側の歪み度合い $\delta_3$ は、“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>”と“G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>”塩基対の安定性および過去の実験結果<sup>20, 26)</sup>を説明できなかった。しかし、X<sub>2</sub> 塩基の5'側と3'側両方の歪み度合いの合計値である“ $\delta_1 + \delta_3$ ”では、天然の G<sub>2</sub>C<sub>2</sub> 塩基対を含む DNA と比較することで、“ $\delta_1 + \delta_3$ ”値は  $R-Sp \gg S-Sp \gg R-Ia > S-Ia \gg Oz$  となった。この“ $\delta_1 + \delta_3$ ”値は、“A<sub>1</sub>T<sub>1</sub> + G<sub>3</sub>C<sub>3</sub>”の安定性と一致していた。以上をまとめると、非平面の損傷塩基を含む DNA は歪みやすく、不安定化しやすい。そして結果的に、非平面の損傷では平面な損傷よりも DNA ポリメラーゼのバイパス効率が低下すると考えられる。本章の結果から、G:Oz および G:Ia、G:Sp 塩基対に隣接する塩基対によって構成された構造を用いることは、これらの塩基対を含む DNA 二本鎖の安定性を評価するのに十分であることを示した。G:Oz 含む DNA 二本鎖構造の歪みは G:Ia や G:Sp を含む DNA の歪みよりも

小さかった。それ故、G:OzはG:IaやG:SpよりもDNAポリメラーゼによる損傷乗り越えDNA合成の効率が良かったと考えられる。

本章では、分子力学計算による構造最適化には、塩基対やタンパク質だけでなく、DNAのデオキシリボースおよびリン酸エステルも含むモデルを用いた。しかしながら、これらのモデルは非常に多くの原子を含んでおり、現実的な計算時間では量子化学計算を行うことができないため、量子化学計算にはDNAのデオキシリボースおよびリン酸エステルを含まないモデルを用いた。従って、これらのDNA損傷によって生じる歪みがDNAポリメラーゼによるDNA合成に与える正確な影響を説明するためには、塩基対内の歪みが糖の立体構造にどの程度の変化を引き起こすのかを考慮することが今後の検討課題である。

## 第 4 章

### Oz に対する塩基の取り込み解析

(本章の内容に関しては Chem. Res. Toxicol., 28, 1307-1316 (2015) に発表済み)

Reprinted (adapted) with permission from “Suzuki M., Kino K., Kawada T., Morikawa M., Kobayashi T., and Miyazawa H. (2015) Analysis of nucleotide insertion opposite 2,2,4-triamino-5(2*H*)-oxazolone by eukaryotic B- and Y-family DNA polymerases. Chem. Res. Toxicol., 28, 1307-1316. (DOI: 10.1021/acs.chemrestox.5b00114)”. Copyright 2015 American Chemical Society.

#### 第 1 節 背景

第 1 章でも述べたが、これまで DNA ポリメラーゼ反応解析結果から<sup>20, 26)</sup>、本研究では G:C-C:G トランスバージョンの発生機構解明における重要度が Gh/Ia や Sp よりも高い損傷として Oz に着目している。第 3 章の結果からも、Oz を含む損傷 DNA は天然の二本鎖 DNA の構造と類似していることが予測され、Oz に対するグアニンの取り込みにより G:C-C:G トランスバージョンが発生することが示唆された。そのため、G:C-C:G トランスバージョンの発生機構の解明において、Oz を含む損傷 DNA の複製機構を明らかにすることが重要となる。

DNA 複製に関与する DNA ポリメラーゼは大腸菌では 5 種類、ヒトにいたっては 15 種類存在するが、DNA ポリメラーゼによってその主な機能は異なっている。真核生物の DNA 複製は Pol  $\alpha$  および Pol  $\gamma$ 、Pol  $\delta$ 、Pol  $\epsilon$  によって行われている<sup>42, 43)</sup>。特に、Pol  $\alpha$ 、Pol  $\delta$ 、Pol  $\epsilon$  の 3 種類の DNA ポリメラーゼは染色体における DNA 複製の中心的役割を担っている (Table 7)<sup>42-44)</sup>。また、DNA ポリメラーゼはポリメラーゼ活性の活性中心の相同性からいくつかのファミリーに分類されており、Pol  $\alpha$  および Pol  $\delta$ 、Pol  $\epsilon$  は B ファミリーに属している<sup>42, 43)</sup>。Pol  $\alpha$ -プライマーゼ複合体はプライマーの合成と伸長に関与し<sup>42)</sup>、Pol  $\delta$  はラギング鎖の合成を<sup>45)</sup>、Pol  $\epsilon$  はリーディング鎖の合成を主に担っている<sup>46)</sup>。また、Pol  $\gamma$  は A ファミリーに属しており、ミトコンドリア DNA の複製を行う DNA ポリメラーゼである (Table 7)<sup>43)</sup>。一般的に、様々な要因によって生じる損傷 DNA は DNA ポリメラーゼによる DNA 合成を阻害し、DNA 複製機構を停止させてしまう。

そこで、DNA 複製の停止を回避するために、細胞は損傷を乗り越えて DNA を合成できる DNA ポリメラーゼを備えている。Pol  $\zeta$  および Pol  $\eta$ 、Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$ 、REV1 は真核生物において損傷乗り越え DNA 合成を担う DNA ポリメラーゼである (Table 7)<sup>43, 47, 48</sup>。Pol  $\zeta$  は B-ファミリーに<sup>42, 43, 48</sup>、Pol  $\eta$  および Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$ 、REV1 は Y ファミリーに分類されている (Table 7)<sup>42, 43, 48, 49</sup>。Oz を含む損傷 DNA の複製機構を明らかにするためには、まずは最初の研究課題として、DNA 複製を担う DNA ポリメラーゼと損傷乗り越え DNA 合成を担う DNA ポリメラーゼの両方の DNA ポリメラーゼによる損傷乗り越え反応解析および塩基取り込み解析が重要となる。

第 1 章でも述べたように、Pol  $\alpha$  および Pol  $\gamma$ 、Pol  $\epsilon$ 、Pol  $\eta$  の Oz に対する塩基の取り込み解析および損傷乗り越え反応は既に解析されている<sup>20, 21</sup>。Pol  $\alpha$  および Pol  $\epsilon$  は Oz に対してグアニンを、Pol  $\gamma$  はグアニンとアデニンを、Pol  $\eta$  はグアニンとアデニン、シトシンを取り込み、これら全ての DNA ポリメラーゼが Oz を乗り越えて DNA を合成することができる。本章では、Oz に関して未解析であった Pol  $\delta$ 、Pol  $\zeta$ 、Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$ 、REV1 の Oz に対する DNA ポリメラーゼ反応を行い、Oz に対する損傷乗り越え反応および塩基取り込み反応を解析した。

**Table 7** The function of DNA polymerases<sup>42, 43</sup>.

function	DNA polymerase	family
Replicative DNA polymerases	Pol $\gamma$	A-family
	Pol $\alpha$	B-family
	Pol $\delta$	
	Pol $\epsilon$	
DNA polymerases involved in translesion synthesis	Pol $\zeta$	Y-family
	Pol $\eta$	
	Pol $\iota$	
	Pol $\kappa$	
	REV1	

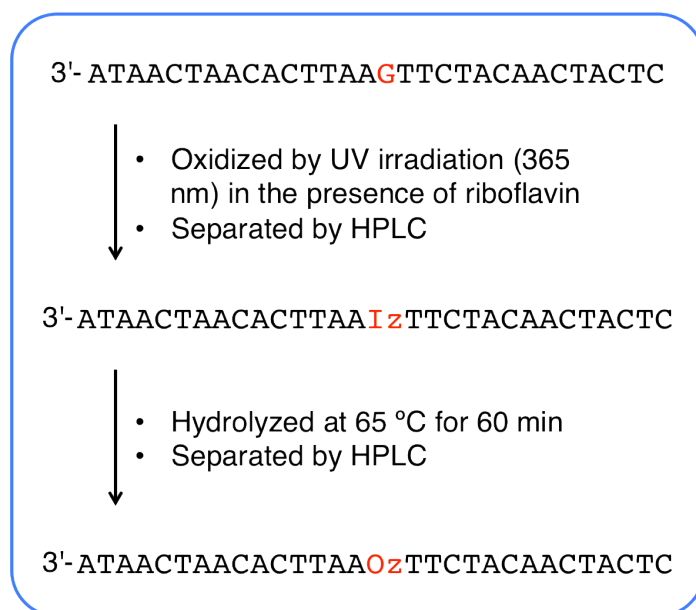


## 第2節 実験方法

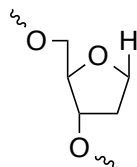
### 2-1. オリゴヌクレオチド

過去の文献<sup>20)</sup>を参考に、DNAポリメラーゼ反応に用いたOzを含む30-merのオリゴヌクレオチド (5'-CTCATCAACATCTTXAATTCACAATCAATA-3', X = Oz) を調製した (Fig.16)。一方、Ghを含む30-merのオリゴヌクレオチド (X = Gh) は喜納克仁准教授より提供を受けた<sup>22)</sup>。

DNAポリメラーゼ反応のコントロールとして用いたグアニンまたは8-oxoG、THF (Fig.17) を含む30-merのオリゴヌクレオチド (X = Gまたは8-oxoG、THF) および5'末端をAlexa680で標識化されたオリゴヌクレオチド(5'-\*TATTGATTGTGAATT-3') は日本バイオサービス (Saitama, Japan) より購入した。



**Fig.16** Outline of the preparation of 30-mer DNA containing the Oz lesion.



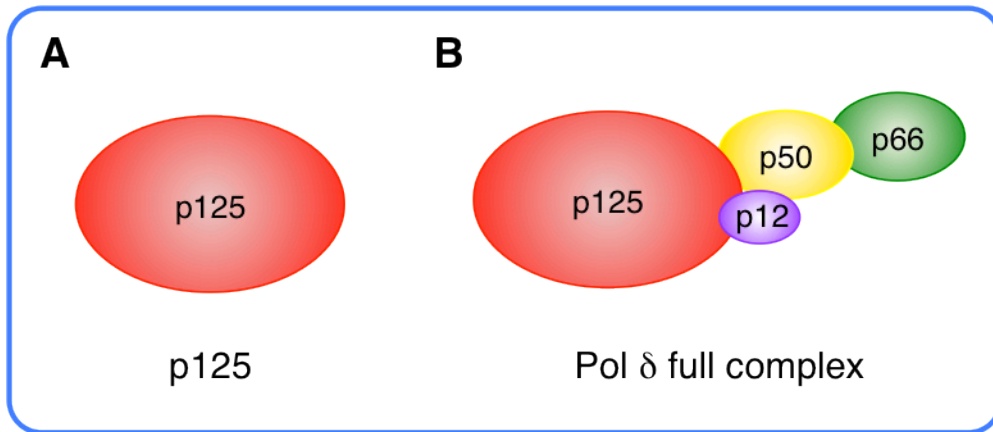
**Fig.17** Structure of THF.

## 2-2. DNA ポリメラーゼ

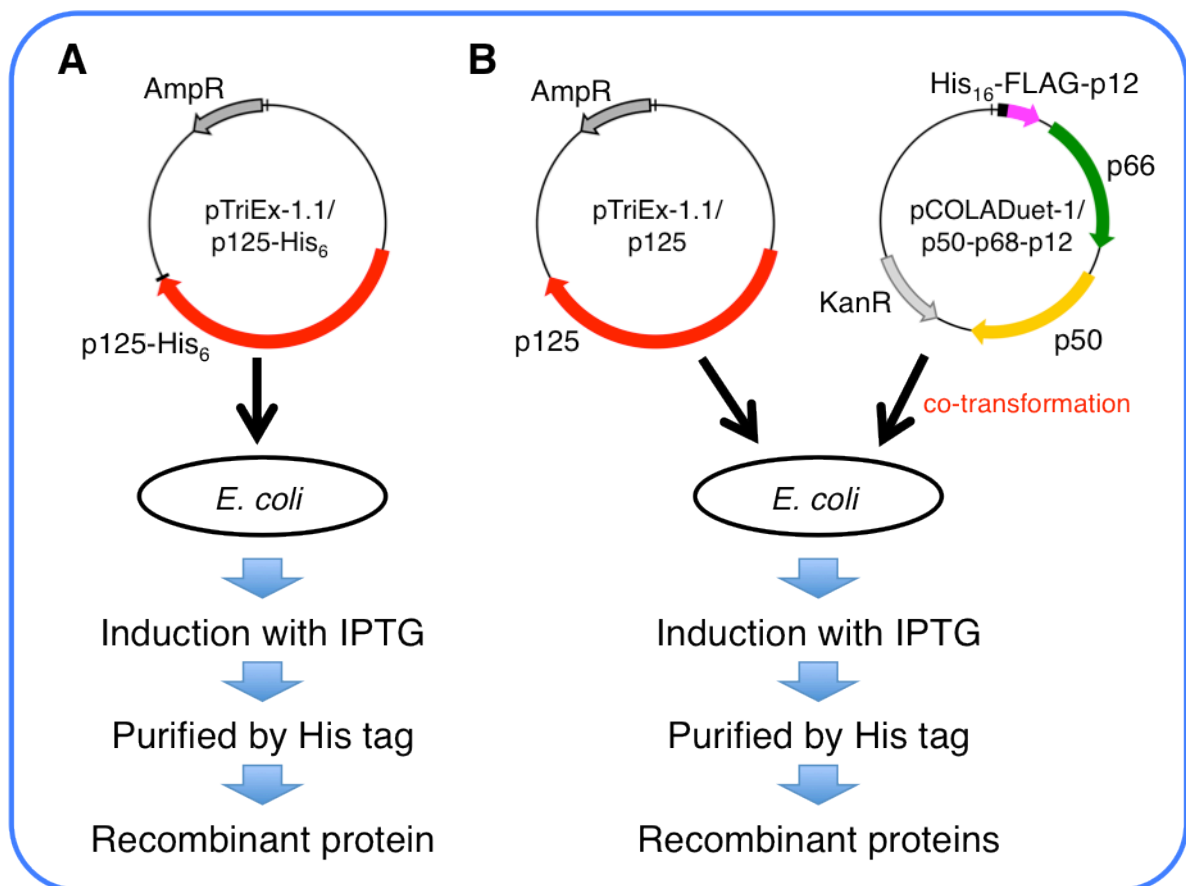
yeast Pol  $\zeta$  (yPol  $\zeta$ ) および yeast REV1 (yREV1)は Enzymax (Lexington, KY) から購入した。

Human Pol (hPol)  $\delta$  を構成する 4 つのサブユニット (p125、p50、p66、p12) は、それぞれ *POLD1*、*POLD2*、*POLD3*、*POLD4* によってコードされている。p125 のリコンビナントタンパクを作製するために (Fig.18)、C 末端に 6×His タグが融合した p125 をコードする、大腸菌発現用ベクター pTriEx-1.1/p125-His<sub>6</sub> を構築した (Fig.19A)。pTriEx-1.1/p125-His<sub>6</sub> を組み込んだ大腸菌 Rosetta2 (DE3) pLysS に 1 mM IPTG を加えて発現誘導した。発現誘導した大腸菌は 25 °C で 3 時間培養後、遠心分離により回収し、-80 °C に凍結保存した。凍結した大腸菌を lysis バッファー (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) に再懸濁し、超音波処理後、遠心分離によって細胞溶解液を得た。得られた細胞溶解液を HisTrap HP 1 ml (GE Healthcare, Tokyo, Japan) に充填し、P40 バッファー (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 0.5 M NaCl, 40 mM imidazole, 0.5 mM PMSF) で洗浄後、P500 バッファー (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole, 0.5 mM PMSF) を用いて溶出した。p125 を含む溶出液は vivaspin 15 (Sartorius, Tokyo, Japan) を用いた限外ろ過により hPol  $\delta$  保存用バッファー (25 mM Bis-Tris-HCl (pH 6.5), 0.5 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 20% glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) に置換し、少量ずつ分注して-80 °C に保存した。

hPol  $\delta$  複合体のリコンビナントタンパクは過去の文献<sup>50)</sup>を参考に作製した (Fig.18、Fig.19)。まず、p125 をコードする大腸菌発現用ベクター pTriEx-1.1/p125、N 末端に 16×His と FLAG タグが融合した p12 および p50、p66 をコードする大腸菌発現用ベクター pCOLADuet-1/p50-p66-p12 を構築した (Fig.19B)。pTriEx-1.1/p125 および pCOLADuet-1/p50-p66-p12 の 2 つの大腸菌発現用ベクターを組み込んだ大腸菌 Rosetta2 (DE3) pLysS に 1 mM IPTG を加えて発現誘導した。発現誘導した大腸菌は 16 °C で 12 時間培養後、遠心分離により回収し、-80 °C に凍結保存した。以降の操作は p125 と同様に行い、少量ずつ分注して-80 °C に保存した。

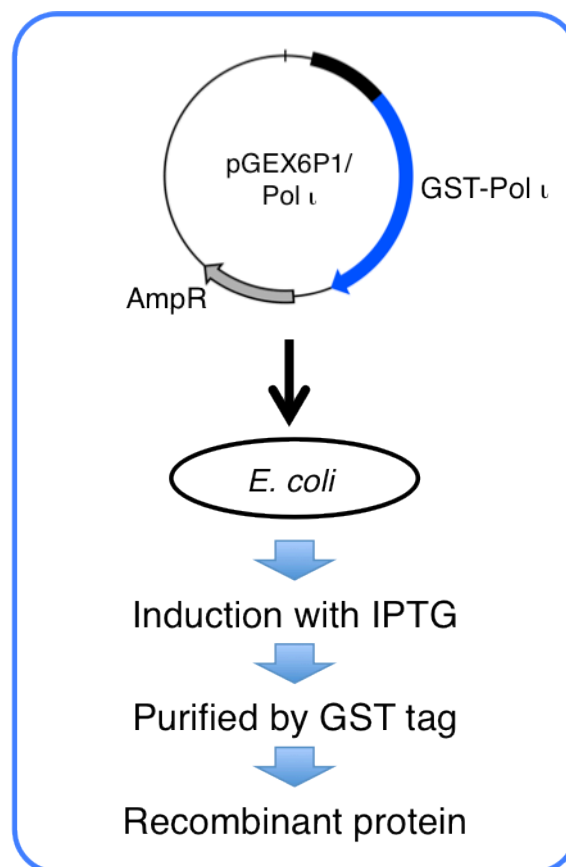


**Fig.18** Construction of recombinant hPol  $\delta$ . (A) p125 (without the p50, p66 and p12 subunits), and (B) hPol  $\delta$  full complex.



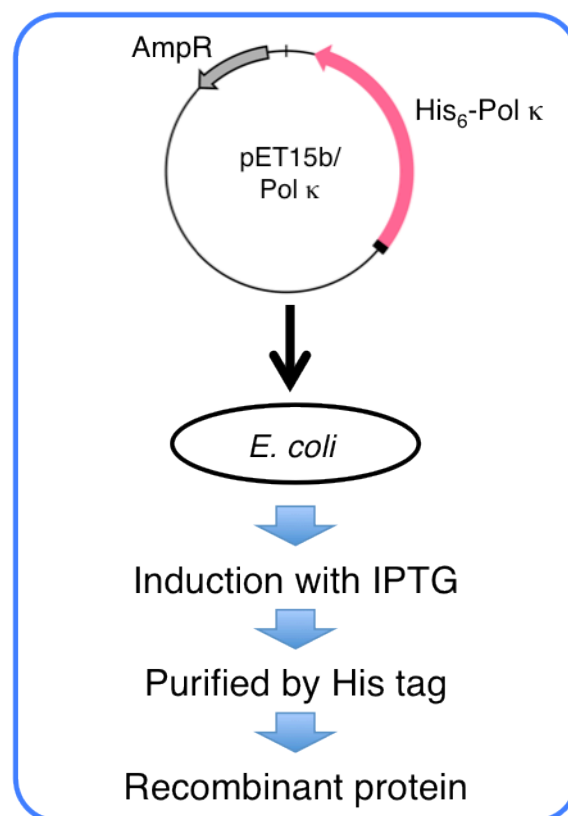
**Fig.19** Expression and purification (A) of p125 (without the p50, p66 and p12 subunits), (B) of hPol  $\delta$  full complex. hPol  $\delta$  subunits (p125, p50, p66, and p12) are encoded by cDNAs *POLD1*, *POLD2*, *POLD3*, and *POLD4*, respectively.

hPol  $\iota$  は *POLI* によってコードされており、その分子量は 83 kDa である。N 末端に GST タグが融合した hPol  $\iota$  をコードする大腸菌発現用ベクター pGEX6P1/hPol  $\iota$  を構築した (Fig.20)。pGEX6P1/hPol  $\iota$  を組み込んだ大腸菌 Rosetta2 (DE3) pLysS に 1 mM IPTG を加えて発現誘導した。発現誘導した大腸菌は 25 °C で 3 時間培養後、遠心分離により回収し、-80 °C に凍結保存した。凍結した大腸菌を binding バッファー (PBS (pH 7.3); 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM PMSF) に再懸濁し、超音波処理後、遠心分離によって細胞溶解液を得た。得られた細胞溶解液を GSTrap HP 1 ml (GE Healthcare) に充填し、binding バッファーで洗浄後、PG バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM reduced glutathione, 0.5 mM PMSF) を用いて溶出した。hPol  $\iota$  を含む溶出液は vivaspin 15 (Sartorius) を用いた限外ろ過により hPol  $\iota$  保存用バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol (2-ME), 0.5 mM PMSF) に置換し、少量ずつ分注して-80 °C に保存した。



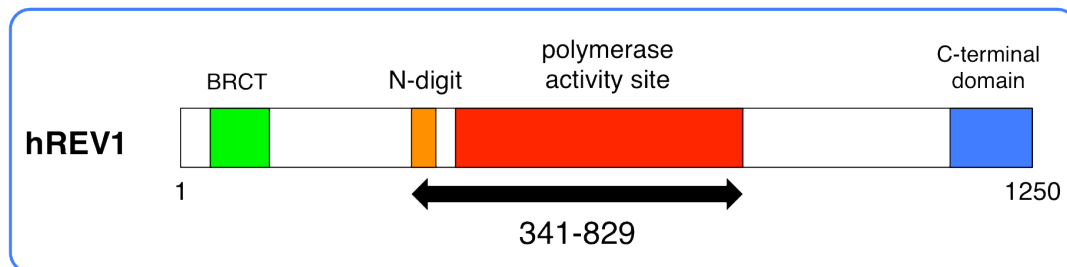
**Fig.20** Expression and purification of hPol  $\iota$ .

hPol  $\kappa$  は *POLK* によってコードされており、その分子量は 99 kDa である。N 末端に 6×His タグが融合した hPol  $\kappa$  をコードする大腸菌発現用ベクター pET15b/hPol  $\kappa$  を構築した (Fig.21)。pET15b/hPol  $\kappa$  を組み込んだ大腸菌 Rosetta2 (DE3) pLysS に 1 mM IPTG を加えて発現誘導した。発現誘導した大腸菌は 25 °C で 3 時間培養後、遠心分離により回収し、-80 °C に凍結保存した。凍結した大腸菌を lysis バッファーに再懸濁し、超音波処理後、遠心分離によって細胞溶解液を得た。得られた細胞溶解液を HisTrap HP 1 ml (GE Healthcare) に充填し、P40-T バッファー (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 0.5 M NaCl, 40 mM imidazole, 0.01% Triton X-100, 0.5 mM PMSF) で洗浄後、さらに P100-T バッファー (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 0.5 M NaCl, 100 mM imidazole, 0.01% Triton X-100, 0.5 mM PMSF) で洗浄した。その後 P200-T バッファー (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 0.5 M NaCl, 200 mM imidazole, 0.01% Triton X-100, 0.5 mM PMSF) を用いて溶出した。hPol  $\kappa$  を含む溶出液は vivaspin 15 (Sartorius) を用いた限外ろ過により hPol  $\kappa$  保存用バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 50% glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) に置換し、-20 °C に保存した。

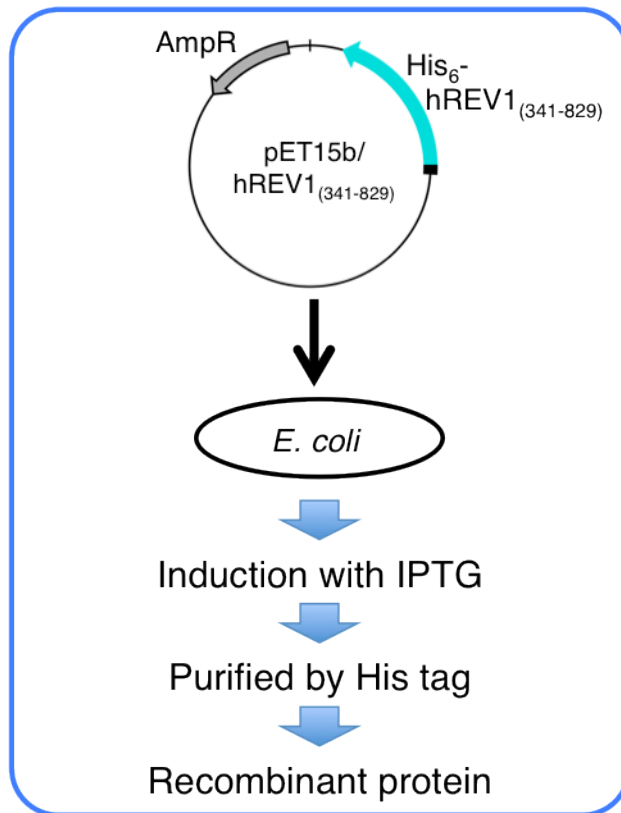


**Fig.21** Expression and purification of hPol  $\kappa$ .

Human REV1 (hREV1) は *REV1* によってコードされており、その分子量は 138 kDa である。REV1 は分子量が大きいため、大腸菌発現系を用いて全長からなる REV1 のリコンビナントを作製するには発現量が低いことが予測される。そこで、効率良く REV1 の活性をもつリコンビナントの作製には、過去の文献<sup>51)</sup>を参考に、341 から 829 のアミノ酸から構成される欠失変異体 hREV1<sub>(341-829)</sub> を作製した (Fig.22)。欠失変異体 hREV1<sub>(341-829)</sub> の分子量は 65 kDa である。N 末端に 6×His タグが融合した hREV1<sub>(341-829)</sub> をコードする大腸菌発現用ベクター pET15b/ hREV1<sub>(341-829)</sub> を構築した (Fig.23)。pET15b/ hREV1<sub>(341-829)</sub> を組み込んだ大腸菌 Rosetta2 (DE3) pLysS に 1 mM IPTG を加えて発現誘導した。発現誘導した大腸菌は 25 °C で 3 時間培養後、遠心分離により回収し、-80 °C に凍結保存した。以降の操作は Pol δ と同様に行い、hREV1<sub>(341-829)</sub> 保存用バッファー (50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 10% glycerol, 10 mM 2-ME, 0.5 mM PMSF) に置換し、少量ずつ分注して -80 °C に保存した。



**Fig.22** Structure of hREV1 and the region used for construction of recombinant of hREV1<sub>(341-829)</sub>.



**Fig. 23** Expression and purification of REV1<sub>(341-829)</sub>.

### 2-3. CBB 染色

作製した各リコンビナントに溶解バッファー (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 0.05 mg/ml bromophenol blue) を加え、5 分間 95 °C で処理した。SDS-PAGE で分離後、ゲルを CBB Stain One (nacalai tesque, Kyoto, Japan) で染色し、LAS3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて解析した。

### 2-4. ウェスタンブロッティング法

CBB 染色と同様に、作製した各リコンビナントに溶解バッファー (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 0.05 mg/ml bromophenol blue) を加え、5 分間 95 °C で処理した。SDS-PAGE で分離後、トランスファーバッファー (25 mM Tris, 189 mM glycine, 10% methanol) 中で Immobilon-P transfer membrane (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) に Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Hercules, CA) で転写した。5%スキムミルクでブロッキングした後、1 次抗体を室温で 1 時間、反応させた。0.1% PBS-T (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% Tween 20) で洗浄後、2 次抗体を室温で 1 時間、反応させた。0.1% PBS-T で洗浄後、Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate (Merck Millipore) で検出した。解析には LAS3000 (Fujifilm) を用いた。1 次抗体として、Anti-His-tag (MBL, Nagoya, Japan)、Anti-DNA polymerase  $\delta$  p125 catalytic subunit (MBL)、Anti-DNA polymerase  $\delta$  p50 small subunit (MBL)、抗 DNA ポリメラーゼ  $\delta$  サブユニット p66 抗体 (Bio Academia, Osaka, Japan)、ANTI-FLAG® M2 antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、Anti-GST (Mouse IgG2a- $\kappa$ ), Monoclonal (GS019), AS, POD Conjugated (nacalai tesque) を、2 次抗体として Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)、Goat F(ab')<sub>2</sub> Fragment Anti-Rat IgG (H+L)-Peroxidase (BECKMAN COULTER, Brea, CA) を使用した。





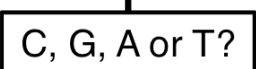
### 2-3. DNA ポリメラーゼ反応

DNA ポリメラーゼ反応に用いた反応液の組成を次に示す。p125 および hPol  $\delta$  複合体の反応液の組成は 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 100  $\mu$ g/mL bovine serum albumin (BSA) ; yPol  $\zeta$  および hPol  $\kappa$ 、hREV1<sub>(341-829)</sub>、yREV1 の反応液の組成は 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 100  $\mu$ g/mL BSA ; hPol  $\iota$  の反応液の組成は 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 10  $\mu$ g/mL BSA, 10% glycerol である。hPol  $\delta$  複合体および yPol  $\zeta$ 、hPol  $\iota$ 、hPol  $\kappa$ 、hREV1<sub>(341-829)</sub>、yREV1 の反応液は 100 fmol の DNA テンプレートおよび 50 fmol の 5'末端を Alexa680 で標識化したプライマーを、p125 の反応液は 100 fmol の DNA テンプレートおよび 50 fmol の 5'末端を [<sup>32</sup>P] で標識化したプライマーを含んでいる。それぞれの dNTP および DNA ポリメラーゼの濃度はそれぞれの図の説明文中に記載した。プライマー伸長反応および塩基の取り込み解析に用いた DNA テンプレートとプライマーおよび dNTP の組み合わせは Fig.24 に示した。以上を含む反応液は全量を 5  $\mu$ l とし、p125 および hPol  $\delta$  複合体、yPol  $\zeta$ 、yREV1 の反応液は 30  $^{\circ}$ C で 30 分間、hPol  $\iota$  の反応液は 30  $^{\circ}$ C で 15 分間、hPol  $\kappa$  の反応液は 37  $^{\circ}$ C で 30 分間反応を行い、5  $\mu$ l の stop バッファー (15 mM EDTA, 10% glycerol) を加えて反応を停止させた。そして、8 M 尿素を含む 16%ポリアクリルアミドゲルと 1 $\times$ TBE (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) バッファーを用いて、それぞれの反応後のサンプルのうち 2.5  $\mu$ l を 30 W で 90 分間電気泳動を行い分離した。電気泳動後、分離したゲルのうち 5'末端を Alexa680 で標識化したプライマーを含むサンプルは Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR, Lincoln, NE) を、5'末端を [<sup>32</sup>P] で標識化したプライマーを含むサンプルについては BAS2500 bioimaging analyzer (Fujifilm) を使用して解析した。

**Primer extension** (in the presence of dCTP, dGTP, dATP and dTTP)

Template : 3'– ATAAC TAACACTTAA **Oz** TTCTACA ACTACTC  
Primer : 5'– \*TATTGATTGTGAATT  ?

**Nucleotide selectivity** (in the presence of dCTP, dGTP, dATP or dTTP)

Template : 3'– ATAAC TAACACTTAA **Oz** TTCTACA ACTACTC  
Primer : 5'– \*TATTGATTGTGAATT   
  


**Fig.24** Experimental design of DNA polymerase assay. The 15-mer primer is labelled with Alexa 680 or [<sup>32</sup>P] indicated by ‘\*’.

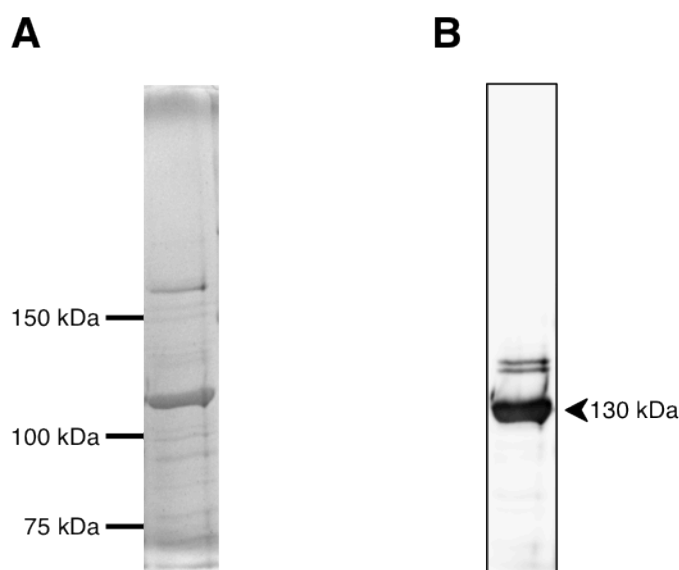
2-4. 速度論解析

過去の文献<sup>16)</sup>を参考に、hREV1<sub>(341-829)</sub>のGおよびOz、THF、8-oxoG、Ghに対するdCTPの取り込み効率を解析した。DNAポリメラーゼおよびdCTPは、dCTPの取り込みが4-20%の効率となるように濃度を調整した。速度論解析におけるDNAポリメラーゼ反応には2-3と同様の反応液の組成を用い、30℃で1分間または2分間反応を行った。反応後のサンプルは2-3と同様に解析した。K<sub>m</sub>値とV<sub>max</sub>値はDNAポリメラーゼ反応を2回または3回行った結果からラインウィーバー-バークプロットを用いて算出した。

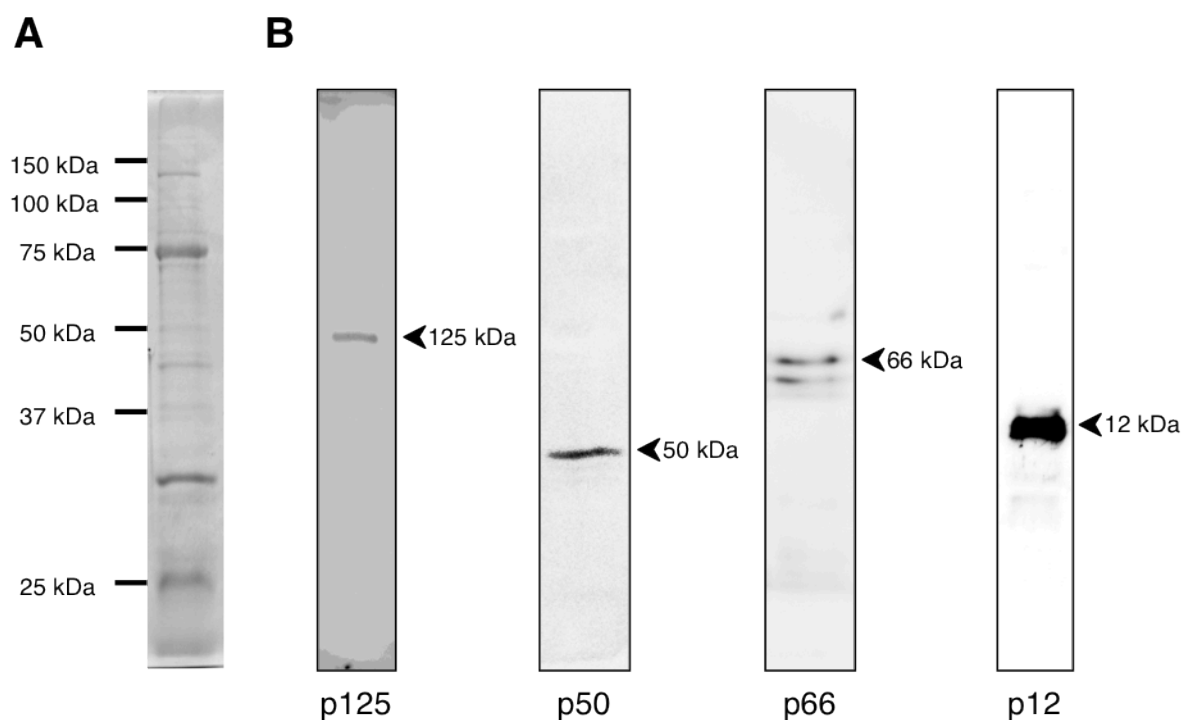
### 第3節 結果と考察

#### 3-1. hPol $\delta$ の Oz に対する DNA ポリメラーゼ反応解析

前述したように、Pol  $\delta$  は Pol  $\alpha$  や Pol  $\epsilon$  と同じ B ファミリーに属する DNA 複製の中心的役割を担う DNA ポリメラーゼである。hPol  $\delta$  は p125、p50、p66、p12 の4つのサブユニットからなる複合体であり、触媒サブユニットは p125 である<sup>52)</sup>。本研究では、触媒サブユニット単体である p125 および4つのサブユニットからなる hPol  $\delta$  複合体を用いて、Oz を乗り越えて DNA を合成できるかどうか、また、Pol  $\alpha$  や Pol  $\epsilon$  と同様に<sup>20)</sup>Oz に対して dGTP を取り込むかどうかを解析した。触媒サブユニット単体である p125 および4つのサブユニットからなる hPol  $\delta$  複合体は、リコンビナントを作製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の CBB 染色およびウェスタンブロットティング法にて確認した (Fig.25 と Fig.26)。作製した hPol  $\delta$  複合体の純度は低く、得られた量も少なかったため、各サブユニットの存在比については判定できなかった。

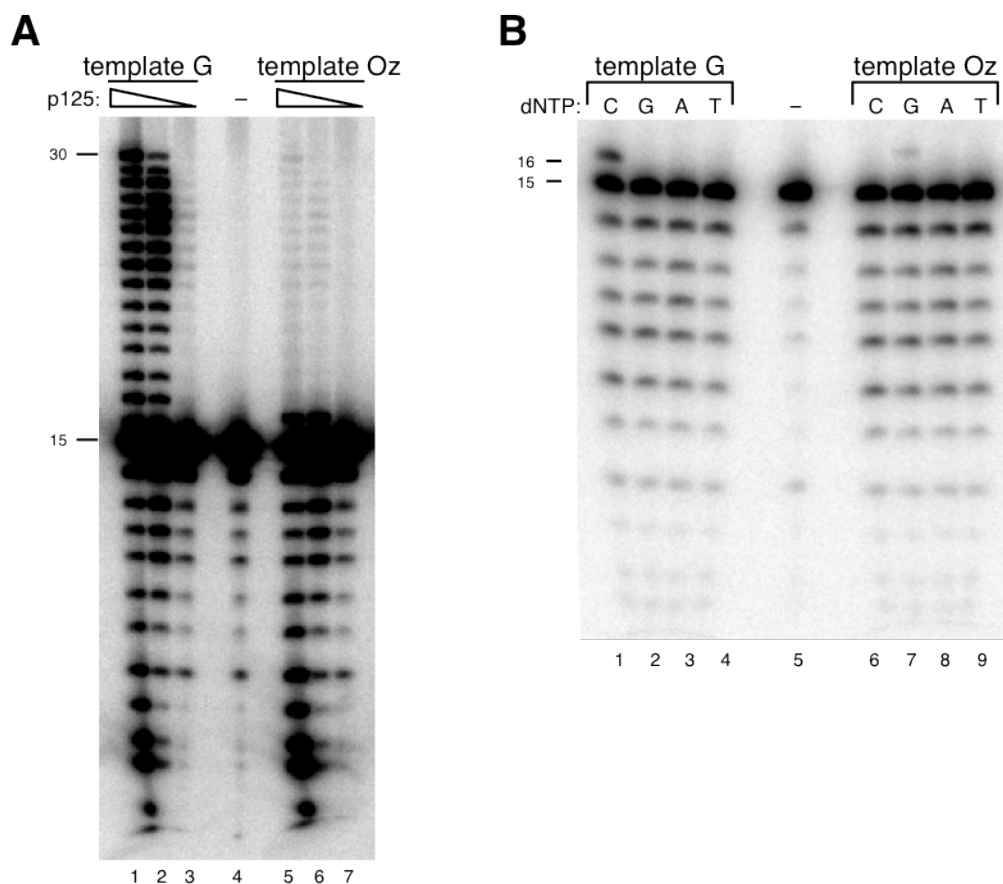


**Fig.25** Expression and purification of recombinant p125. (A) p125 was electrophoresed and stained with CBB. (B) p125 was identified by immunoblotting with anti-His antibody.

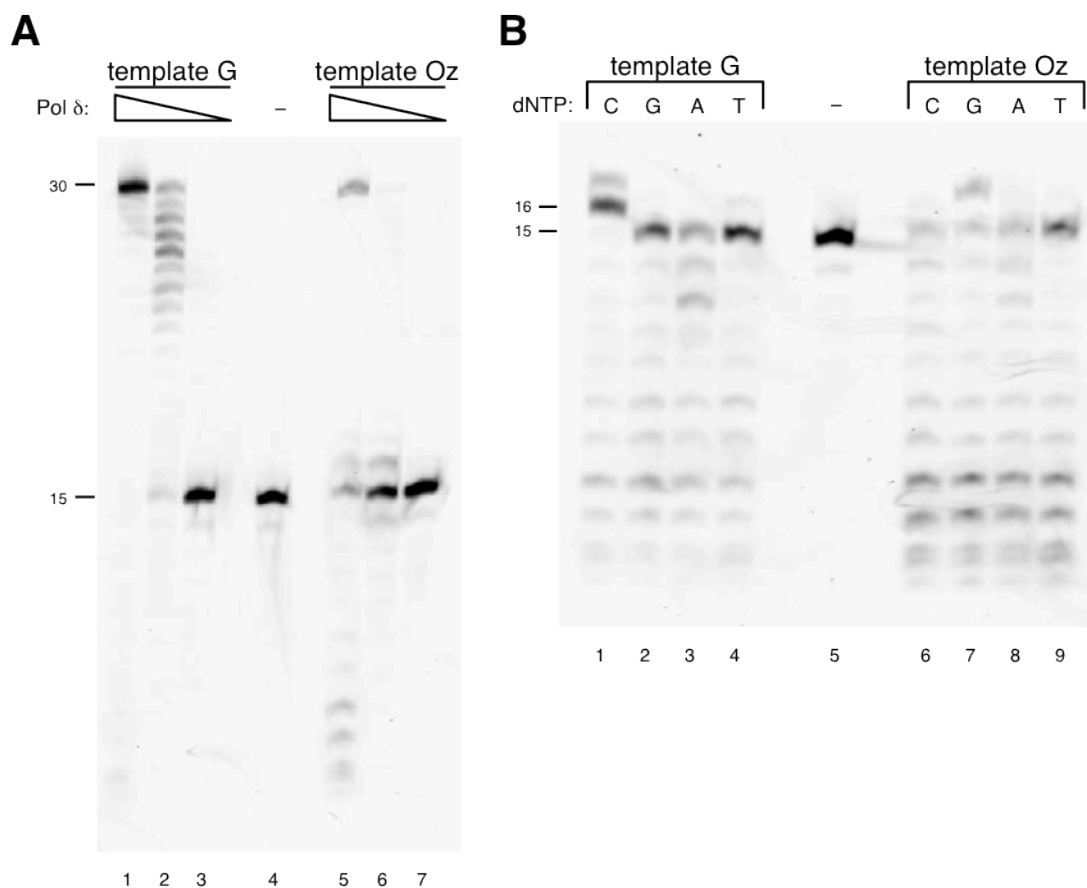


**Fig.26** Expression and purification of recombinant hPol  $\delta$  full complex. (A) hPol  $\delta$  full complex was electrophoresed and stained with CBB. (B) hPol  $\delta$  full complex was identified by immunoblotting with anti-p125, anti-p50, anti-p66, anti-FLAG antibody.

まず、触媒サブユニットである p125 を用いて解析したところ、非常に低効率ながら Oz を乗り越えて全長の 30-mer まで DNA を伸長していた (Fig.27A のレーン 5)。また、塩基の取り込み解析結果から、p125 単体では G に対して dCTP を正確に取り込むのに対して (Fig.27B のレーン 1)、Oz に対しては dGTP を取り込むことが明らかになった (Fig.27B のレーン 7)。さらに、hPol  $\delta$  複合体についても p125 単体の場合と同様に、Oz を乗り越えて全長の 30-mer まで DNA を伸長し (Fig.28A のレーン 5)、Oz に対しても dGTP を優位に取り込んでいた (Fig.28B のレーン 7)。つまり、hPol  $\delta$  は同じファミリーの Pol  $\alpha$  や Pol  $\epsilon$  と同様に<sup>20)</sup>、Oz に対して dGTP を取り込むことが明らかとなった。



**Fig.27** DNA synthesis with p125 across Oz. (A) Primer extension across Oz by p125. Decreasing amounts of p125 (96.5 ng in lanes 1 and 5, 9.65 ng in lanes 2 and 6, 0.965 ng in lanes 3 and 7) were incubated with template (containing G in lanes 1-4 and Oz in lanes 5-7) in the presence of each of the four dNTPs (500  $\mu$ M each). (B) Nucleotide selectivity of p125 opposite Oz. p125 (9.65 ng) was incubated with template (containing G in lanes 1-5, and Oz in lanes 6-9) in the presence of 500  $\mu$ M of a single dNTP (N = C, G, A or T) (lanes 1-4 and lanes 6-9). Copyright 2015 American Chemical Society.



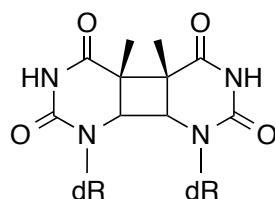
**Fig. 28** DNA synthesis with hPol  $\delta$  full complex across Oz. (A) Primer extension across Oz by hPol  $\delta$  full complex. Decreasing amounts of hPol  $\delta$  full complex (154 ng in lanes 1 and 5, 15.4 ng in lanes 2 and 6, 1.54 ng in lanes 3 and 7) were incubated with template (containing G in lanes 1-4 and Oz in lanes 5-7) and each of the four dNTPs (100  $\mu$ M each). (B) Nucleotide selectivity of hPol  $\delta$  full complex opposite Oz. hPol  $\delta$  full complex (154 ng) was incubated with template (containing G in lanes 1-5, containing Oz in lanes 6-9) and 100  $\mu$ M of a single dNTP (N = C, G, A or T) (lanes 1-4 and lanes 6-9). Lane 4 in panel A and lane 5 in panel B contained no enzyme and are negative controls. Copyright 2015 American Chemical Society.

触媒サブユニットである p125 は 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有しているため、hPol  $\delta$  は忠実度の高い DNA ポリメラーゼとして知られている。このエキソヌクレアーゼ活性は DNA 複製の校正や不適正塩基対の修正、岡崎フラグメントの成熟化などに関与している<sup>53)</sup>。本解析結果においても、G を含む DNA テンプレートの場合と比較すると Oz を含む DNA テンプレートの場合では、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性によって分解されたプライマーの量が増加していた (Fig.28A のレーン 5 と Fig.28A のレーン 1 を、Fig.28B のレーン 6-9 と Fig.28B のレーン 1-4 を比較)。つまり、hPol  $\delta$  の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性をもってしても、Oz を含む DNA の複製における誤取り込みを完全に校正することはできないことが示された。

背景でも述べたように、Oz はグアニンの酸化損傷であることから、Oz に対して dGTP が優位に取り込まれることにより、G:C-C:G トランスバージョンが引き起こされる。また、これまでの Oz に対する塩基の取り込み解析に用いられた DNA ポリメラーゼ全てに dGTP の取り込みが共通していることに加え<sup>20, 21)</sup>、第 2 章で示したように量子化学計算からも Oz と G が安定な塩基対を形成することを予測しており、hPol  $\delta$  が Oz に対して dGTP を取り込むことは予想通りであった。つまり、hPol  $\delta$  は Oz を含む DNA の複製において、G:C-C:G トランスバージョンを誘発することが示唆された。

### 3-2. yPol $\zeta$ の Oz に対する DNA ポリメラーゼ反応解析

Pol  $\zeta$  は誤りがちな損傷乗り越え DNA 合成に関与しており、UV による突然変異誘発において重要な役割を担っている DNA ポリメラーゼである<sup>47, 54, 55</sup>)。しかし、その DNA ポリメラーゼ活性は損傷によって異なるという特徴がある。例えば、Pol  $\zeta$  はチミンダイマー (6-4) 生成物を乗り越えて DNA 合成を行う<sup>56</sup>)。一方、8-oxoG や *O*<sup>6</sup>-メチルグアニン (*O*<sup>6</sup>-methylguanine: *O*<sup>6</sup>-MeG) については損傷塩基を乗り越えて DNA 合成を行うが、その効率は非常に低いことが報告されている<sup>57</sup>)。また、THF やシクロブタン型ピリミジンダイマー (cyclobutane pyrimidine dimer : CPD) (Fig.29) では、相補鎖側に塩基をほとんど取り込まず、損傷部位で DNA 合成が停止してしまうといった報告もある<sup>56, 58</sup>)。そこで、yPol  $\zeta$  が Oz を乗り越えて DNA 合成を行うかどうかについて解析した。

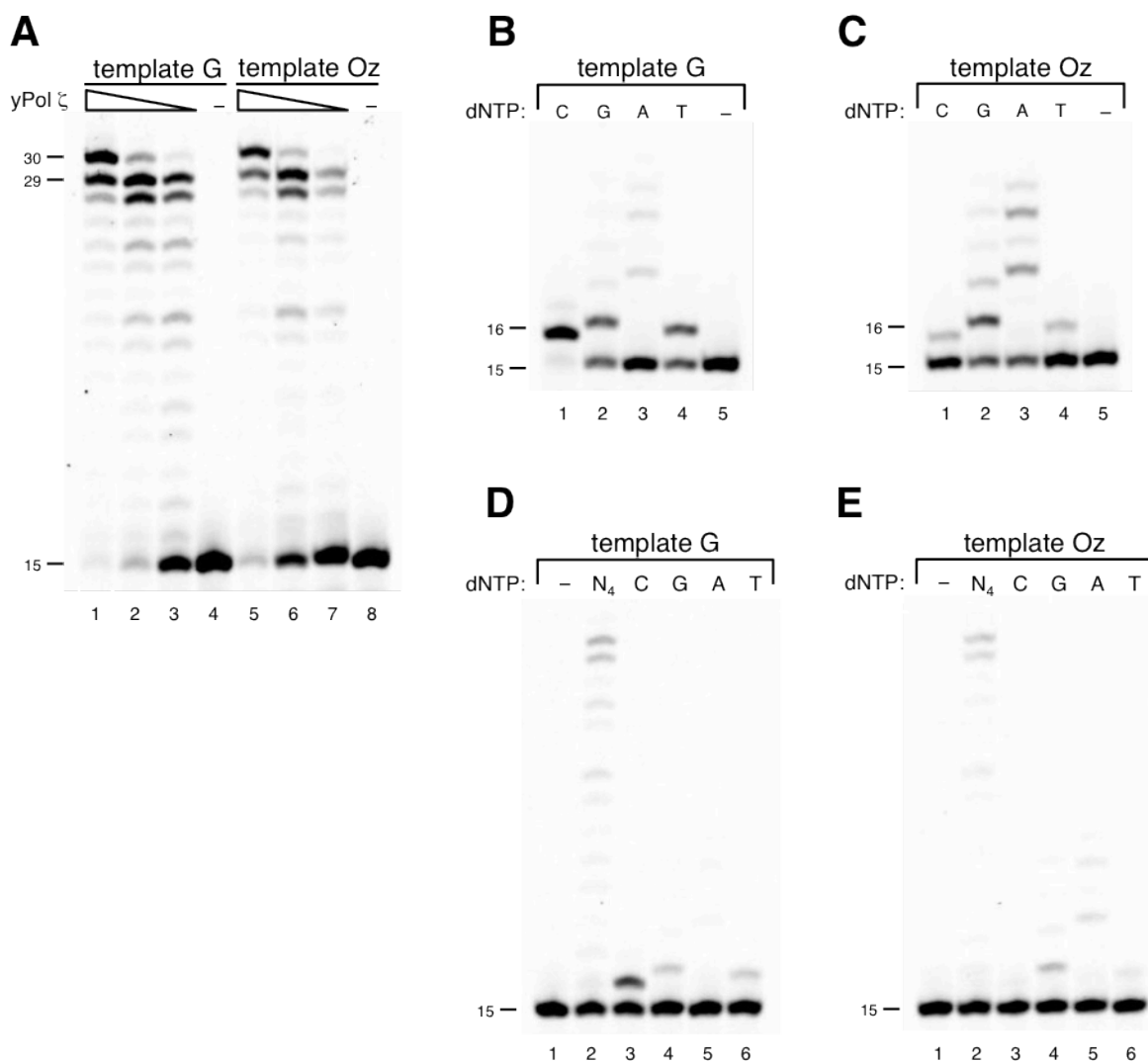


**Fig.29** Structure of CPD.

その結果、yPol  $\zeta$  は Oz を乗り越えて全長まで効率良く合成し (Fig.30A のレーン 5-7)、その効率は G を含む DNA テンプレートの場合との差はわずかであった (Fig.30A のレーン 5-7 とレーン 1-3 を比較)。以前の報告における他の DNA ポリメラーゼ<sup>20, 21</sup>) や前項の hPol  $\delta$  の場合では、Oz を乗り越えた DNA 合成効率は G を乗り越えた DNA 合成効率に比べると低く、これらの DNA ポリメラーゼに比べると yPol  $\zeta$  の結果は驚くべき結果であった。つまり、他の DNA ポリメラーゼとは異なり、Oz は Pol  $\zeta$  による DNA 合成効率にほとんど影響を与えないことが示唆された。

次に、yPol  $\zeta$  が Oz に対して取り込む塩基を解析した。コントロールとして用いた G を含む DNA テンプレートの場合、G に対して dCTP が最も優位に取り込まれ (Fig.30B





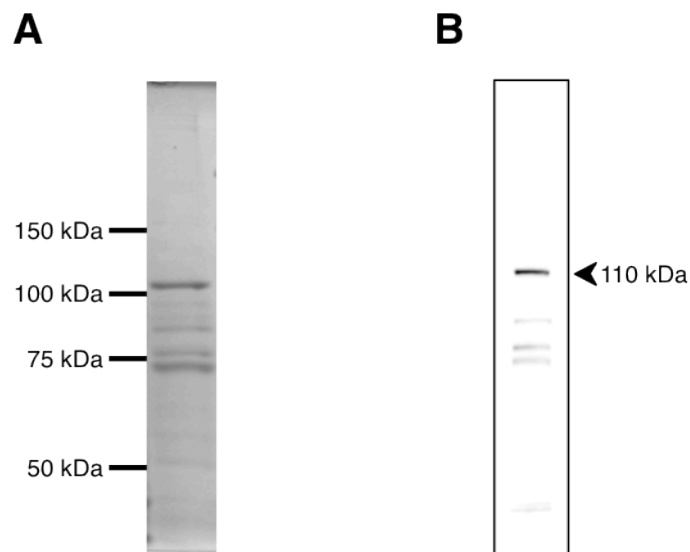
**Fig.30** DNA synthesis with yPol  $\zeta$  across Oz. (A) Primer extension across Oz by yPol  $\zeta$ . Decreasing amounts of yPol  $\zeta$  (50 ng in lanes 1 and 5, 17 ng in lanes 2 and 6, 5.0 ng in lanes 3 and 7) were incubated with template (containing G in lanes 1-4, containing Oz in lanes 5-8) and each of the four dNTPs (100  $\mu$ M). Lanes 4 and 8 contained no enzyme as the negative control. (B and C) Nucleotide selectivity of yPol  $\zeta$  opposite Oz. yPol  $\zeta$  (17 ng) was incubated with template (containing G in B, and Oz in C) and 100  $\mu$ M of a single dNTP (N = C, G, A or T) (lanes 1-4). Lane 5 contained no enzyme as the negative control. (D and E) Primer extension and nucleotide selectivity of yPol  $\zeta$  opposite Oz. yPol  $\zeta$  (1.7 ng) was incubated with template (containing G in D, and Oz in E) and 100  $\mu$ M of each of the four dNTPs (lane 2) or 100  $\mu$ M of a single dNTP (N = C, G, A or T) (lanes 3-6). Lane 1 contained no enzyme as the negative control. Copyright 2015 American Chemical Society.

のレーン 1)、dGTP と dTTP の取り込みもみられた (Fig.30B のレーン 2 と 4)。dATP の取り込みについては、18-mer または 20-mer まで伸長したバンドが検出された (Fig.30B のレーン 3)。これに対して、Oz を含む DNA テンプレートの場合は、Oz に対して dGTP が最も優位に取り込まれており、Oz の 5'側隣接塩基である T に対しても dGTP が少し取り込まれていた (Fig.30C のレーン 2)。Oz に対する dATP の取り込みは G を含む DNA テンプレートの場合と同様に 18-mer または 20-mer まで伸長したバンドが検出されており、その量は増加していた (Fig.30C のレーン 3)。一方、Oz に対する dCTP および dTTP の取り込みは減少した (Fig.30C のレーン 1 と 4)。酵素濃度を低下させた場合も、同様の傾向がみられた (Fig.30D と 30E)。これらの結果から、Pol  $\xi$  は G だけでなく Oz に対しても誤りがちな塩基取り込みを行うことが明らかとなった。

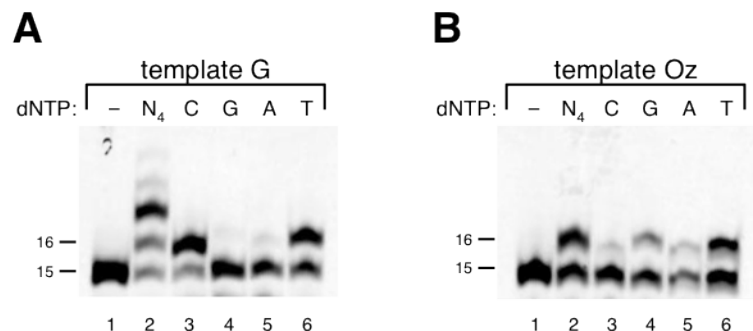
前述したように、Pol  $\xi$  は THF に対してほとんど塩基を取り込まない<sup>58)</sup>。また、8-oxoG や O<sup>6</sup>-MeG はグアニンと構造が似ているにもかかわらず、これらの損傷を乗り越えた DNA 合成効率は非常に低いことが明らかとなっている<sup>57)</sup>。つまり、Pol  $\xi$  は損傷の種類に関係なく、損傷塩基に対する塩基の取り込みは非効率的だと考えられている。実際に、これまでの多く研究結果から、損傷を乗り越えて DNA を効率的に複製するためには、Pol  $\xi$  以外の DNA ポリメラーゼが損傷に対して塩基を取り込む必要があり、その後 Pol  $\xi$  が DNA を伸長させることが示唆されてきた<sup>47, 56, 59-61)</sup>。しかしながら、本研究結果は驚くべきことに、yPol  $\xi$  が Oz に対して塩基を取り込んで、損傷を乗り越えて DNA を合成することを明らかにし、その効率が天然の G を含む DNA テンプレートを用いた場合とほぼ同程度であることを示した。このことから、yPol  $\xi$  がたとえ Oz に対して dCTP 以外を取り込む誤りがちな DNA ポリメラーゼであるとしても、Oz の損傷乗り越え DNA 合成において yPol  $\xi$  が重要な役割を担っているのかもしれない。

### 3-3. hPol $\iota$ の Oz に対する DNA ポリメラーゼ反応解析

Pol  $\iota$  は誤りがちな DNA 合成を触媒する DNA ポリメラーゼの 1 つである。これまでの研究から、*in vitro* での塩基取り込み解析では誤取り込みが見られており、例えば G に対する dTTP の取り込みである<sup>62-65</sup>)。また、Pol  $\iota$  の特徴的な活性として、平均して 2 塩基から 3 塩基程度しかプライマーを伸長しない点があげられる<sup>66</sup>)。そこで、作製した hPol  $\iota$  (Fig.31) が DNA ポリメラーゼ活性およびこれらの特徴を有しているかどうか、G を含む DNA テンプレートを用いて確認した。その結果、dCTP と dTTP を G に対して取り込んだこと (Fig.32A のレーン 3, 5)、およびプライマーを 2 塩基または 3 塩基伸長したバンドが確認され (Fig.32A のレーン 2)、作製した hPol  $\iota$  は、hPol  $\iota$  に特徴的な DNA ポリメラーゼ活性を有していた。



**Fig.31** Expression and purification of recombinant hPol  $\iota$ . (A) hPol  $\iota$  was electrophoresed and stained with CBB. (B) hPol  $\iota$  was identified by immunoblotting with anti-GST antibody.



**Fig.32** DNA synthesis with hPol  $\iota$  across Oz. hPol  $\iota$  (0.5  $\mu$ g) was incubated with template (containing G in A, and Oz in B) and 100  $\mu$ M of each of the four dNTPs (lane 2) or 100  $\mu$ M of a single dNTP (N = C, G, A or T) (lanes 3-6). Lane 1 contained no enzyme as the negative control. Copyright 2015 American Chemical Society.

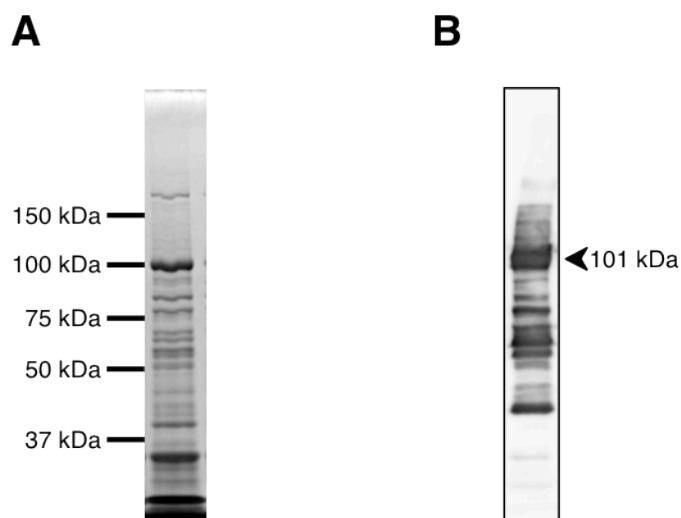
次に、Oz に対する Pol  $\iota$  の塩基の取り込み解析を行った。その結果、Oz に対する dGTP および dATP の取り込みが G を含む DNA テンプレートを用いた場合と比べると増加したが (Fig.32B のレーン 4, 5)、dCTP の取り込みは低下した (Fig.32B のレーン 3)。一方、dTTP の取り込みは G を含む DNA テンプレートを用いた場合とほぼ同程度であり (Fig.32B のレーン 6)、これは dTTP の取り込みが hPol  $\iota$  特有の活性であり、DNA テンプレートの種類に依存しないことを意味していた。また、以前の研究では、hPol  $\iota$  と同じ Y-family に属する hPol  $\eta$  が dGTP と dATP を取り込んでおり<sup>21)</sup>、hPol  $\iota$  が hPol  $\eta$  のパラログであることも考慮すると<sup>67)</sup>、hPol  $\iota$  が hPol  $\eta$  と同様に dGTP と dATP を取り込んだと考えられる。

hPol  $\iota$  は Oz に対して塩基を取り込んだが、その後の伸長反応は停止した (Fig.32B のレーン 2)。これまでの研究から、hPol  $\iota$  は 8-oxoG に対して塩基を取り込んだ後、8-oxoG の隣接塩基に対しても塩基を取り込むことができる一方、THF の場合は THF の隣接塩基には塩基を取り込むことができないことが報告されている<sup>68)</sup>。hPol  $\iota$  の Oz に対する DNA 伸長反応と THF に対する DNA 伸長反応の傾向は似ている。hPol  $\iota$  は Oz を乗り越えて DNA を合成できないことから、Oz を含む損傷 DNA の複製における hPol  $\iota$  の重要性は yPol  $\zeta$  よりも低いと考えられる。

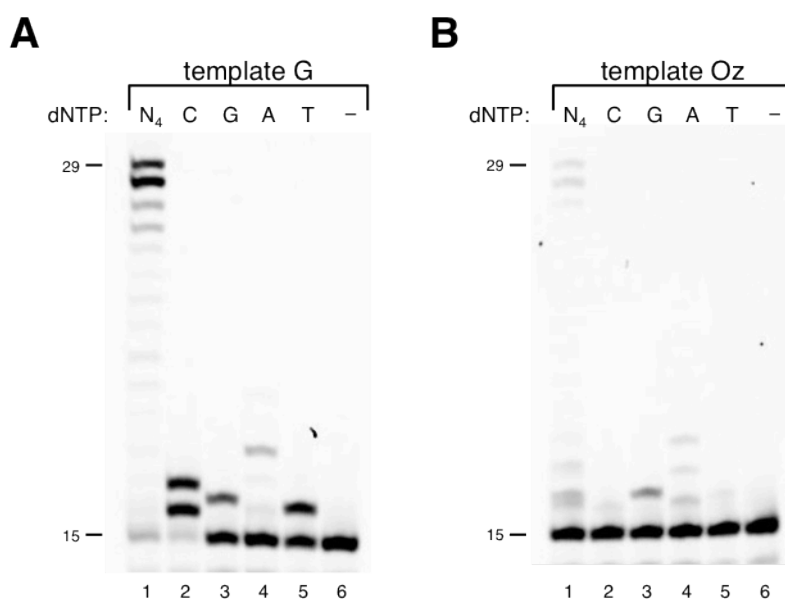
### 3-4. hPol $\kappa$ の Oz に対する DNA ポリメラーゼ反応解析

Pol  $\kappa$  には2つの特徴的な活性があることが、これまでの研究で明らかになっている。1つめは、Pol  $\kappa$  は DNA テンプレートの末端から1つまたは2つ手前で DNA 合成が停止する点である<sup>69-71)</sup>。この原因はプライマーと DNA テンプレートのミスアライメントであると Wolffe らによって報告されている<sup>72)</sup>。2つめは、塩基取り込み、特にグアニンに対する塩基の取り込みにおいて、Pol  $\kappa$  は正しい塩基と誤った塩基の両方を取り込む点である<sup>69-71)</sup>。もちろん、グアニンに対する dCTP の取り込みは dGTP や dATP、dTTP に比べるとより効率的であることが速度論解析から明らかとなっている<sup>70)</sup>。作製した hPol  $\kappa$  (Fig.33) の純度は高くないが、これらの2つの特徴的な活性を有していることを、G を含む DNA テンプレートを用いて確認した。その結果、作製した hPol  $\kappa$  全長 30-mer の DNA テンプレートの1塩基手前であるは 29-mer まで効率良く伸長していた (Fig.34A のレーン 1)。また、G に対して dCTP を取り込むのに加え (Fig.34A のレーン 2)、dGTP や dATP、dTTP も取り込んでおり (Fig.34A のレーン 3-5)、これまでの報告にある2つの特徴的な活性を有していることが確認された。

一方、Oz を含む DNA テンプレートを用いた場合は、29-mer まで伸長していたが (Fig.34B のレーン 1)、その効率は G を含む DNA テンプレートに比べて非常に低かった (Fig.34B のレーン 1 と Fig.34A のレーン 1 を比較)。また、Oz に対しては dGTP を最もよく取り込み (Fig.34B のレーン 3)、次に dATP が取り込まれやすかったが (Fig.34B のレーン 4)、dCTP や dTTP の取り込みは検出されなかった (Fig.34B のレーン 2 とレーン 5)。これらの結果は、Pol  $\iota$  と同様に Pol  $\kappa$  はそれぞれ単体では Oz を含む DNA の損傷乗り越え DNA 合成に関与しないと考えられる。しかし、他の DNA ポリメラーゼとのスイッチングにより損傷乗り越え DNA 合成に関与する可能性もあるため、これらについては今後考慮する必要がある。



**Fig.33** Expression and purification of recombinant hPol  $\kappa$ . (A) hPol  $\kappa$  was electrophoresed and stained with CBB. (B) hPol  $\kappa$  was identified by immunoblotting with anti-His antibody.

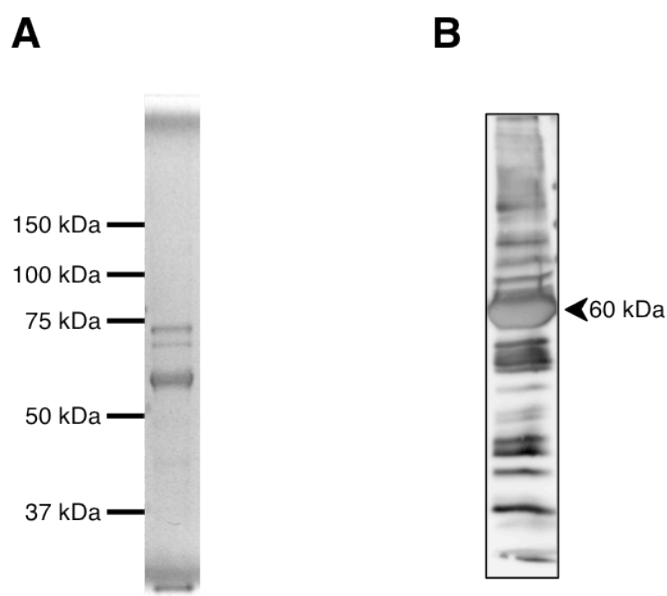


**Fig.34** DNA synthesis with hPol  $\kappa$  across Oz. hPol  $\kappa$  (9.2 ng in A and B) was incubated with template (containing G in A, and Oz in B) in the presence of 100  $\mu$ M of each of the four dNTPs (lane 1) or 100  $\mu$ M of a single dNTP (N = C, G, A or T) (lanes 2-5). Lane 6 contained no enzyme as the negative control. Copyright 2015 American Chemical Society.

### 3-5. hREV1<sub>(341-829)</sub>および yREV1 の Oz に対する DNA ポリメラーゼ反応解析

REV1 は Y ファミリーに属している DNA ポリメラーゼであり、デオキシシチジル酸トランスフェラーゼとしても知られている<sup>49, 73)</sup>。REV1 はこのデオキシシチジル酸トランスフェラーゼにより、G だけでなく A や C、T、さらには脱塩基損傷や 8-oxoG、N<sup>2</sup>-アルキルグアニンといった様々な損傷に対しても dCTP を取り込むことが明らかとなっている<sup>73-76)</sup>。また、hREV1 の R357 が dCTP と水素結合することで、dCTP を取り込む特徴的なメカニズムが結晶構造解析により明らかになっている<sup>77)</sup>。つまり、テンプレートとなる G と取り込まれる dCTP が直接水素結合しないので、REV1 はテンプレートの塩基に依存せず dCTP を取り込むことができるのである。

本研究では過去の文献を参考に、デオキシシチジル酸トランスフェラーゼ活性を示す 341 から 829 のアミノ酸から構成される欠失変異体 hREV1<sub>(341-829)</sub> を作製し (Fig.35)、DNA ポリメラーゼ反応解析に用いた。



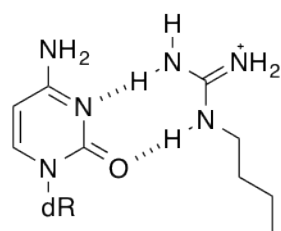
**Fig.35** Expression and purification of recombinant hREV1<sub>(341-829)</sub>. (A) hREV1<sub>(341-829)</sub> was electrophoresed and stained with CBB. (B) hREV1<sub>(341-829)</sub> was identified by immunoblotting with anti-His antibody.

まず、作製した hREV1<sub>(341-829)</sub>が G および THF、8-oxoG に対する塩基の取り込み解析により、これらの損傷に対して dCTP を優位に取り込むデオキシシチジル酸トランスフェラーゼ活性をもっていることを確認した (Fig.36B と 36D、36E のレーン 3)。次に、Oz に対する塩基の取り込みを解析した結果、これまでに解析された他の DNA ポリメラーゼとは異なり、hREV1<sub>(341-829)</sub>は Oz に対して dCTP を優位に取り込むことを明らかにした (Fig.36C のレーン 3)。さらに、Oz と同様に G:C-C:G トランスバージョンの原因となるグアニン酸化損傷の 1 つである Gh/Ia に対しても、hREV1<sub>(341-829)</sub>は dCTP を優位に取り込んだ (Fig.36F のレーン 3)。つまり、hREV1 はデオキシシチジル酸トランスフェラーゼ活性により Oz や Gh/Ia に対して dCTP を取り込むことで、Oz や Gh/Ia から生じる G:C-C:G トランスバージョンを回避できることが示唆された。

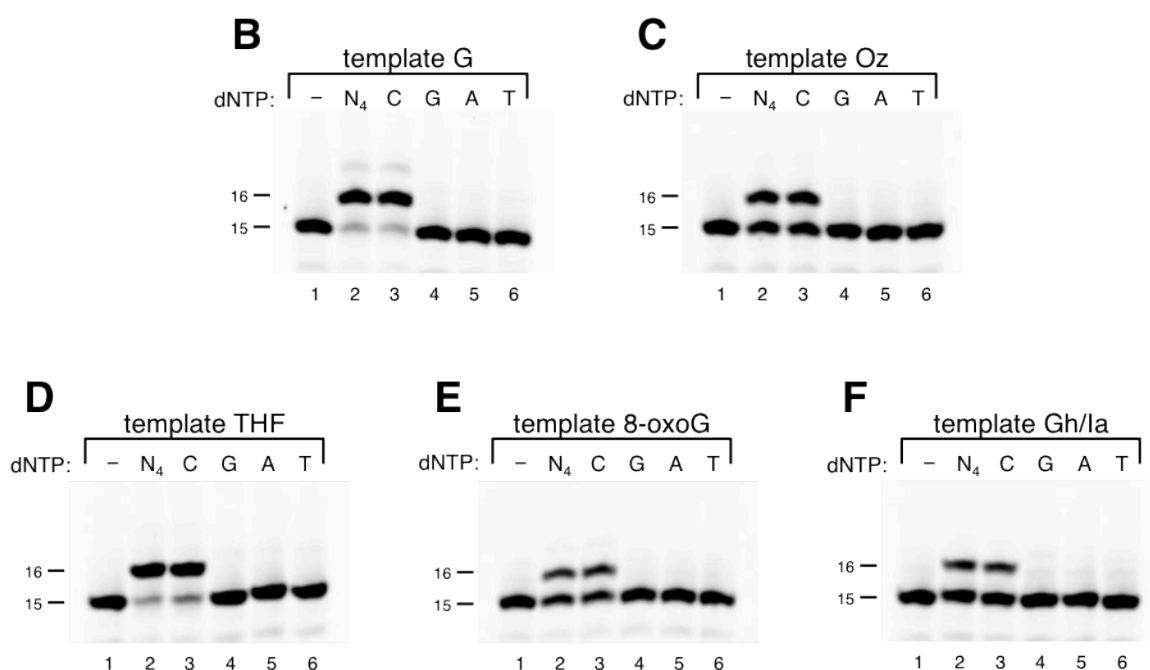
次に、dNTP の濃度を増加した場合の、G および Oz、THF、8-oxoG、Gh/Ia に対する塩基の取り込み解析から、REV1 による損傷ごとの反応性の違いの有無を明らかにすることを試みた。その結果、dNTP の濃度を増加した場合、hREV1<sub>(341-829)</sub>は G だけでなく G の 5'側隣接塩基に対しても dCTP を取り込み (Fig.37A のレーン 3)、dGTP や dTTP の誤取り込みも見られた (Fig.37A のレーン 4 と 6)。また、hREV1<sub>(341-829)</sub>は 8-oxoG の 5'側隣接塩基に対しても dCTP を取り込んでいた (Fig.37D のレーン 3)。一方、Oz や THF、Gh/Ia の場合は G の場合と同様に、dGTP と dTTP の誤取り込みも見られたが (Fig.37B および 37C、37E のレーン 4 と 6)、損傷塩基の 5'側隣接塩基に対する dCTP の取り込みはみられなかった (Fig.37B および 37C、37E のレーン 3)。つまり、損傷塩基の 5'側隣接塩基に対する塩基の取り込みは阻害されており、損傷部位で完全に DNA 合成が停止することが示唆された。また、これらの結果から、hREV1<sub>(341-829)</sub>の Oz と THF、Gh/Ia に対する塩基の取り込みの反応性は同じ傾向であることが明らかとなった。

さらに、yREV1 を用いて hREV1 と同様に Oz に対して dCTP を優位に取り込むかどうかを解析したところ、yREV1 も Oz に対して dCTP を優位に取り込むことが明らかとなった (Fig.38B のレーン 3)。また、その効率は THF に対する dCTP の取り込み効率よりもわずかに良かった (Fig.38B のレーン 3 と 38C のレーン 3 を比較)。以上から、REV1 はヒトか酵母かに依存せずに、Oz に対して dCTP を優位に取り込むことができ、Oz から生じる G:C-C:G トランスバージョンを回避できることが示唆された。

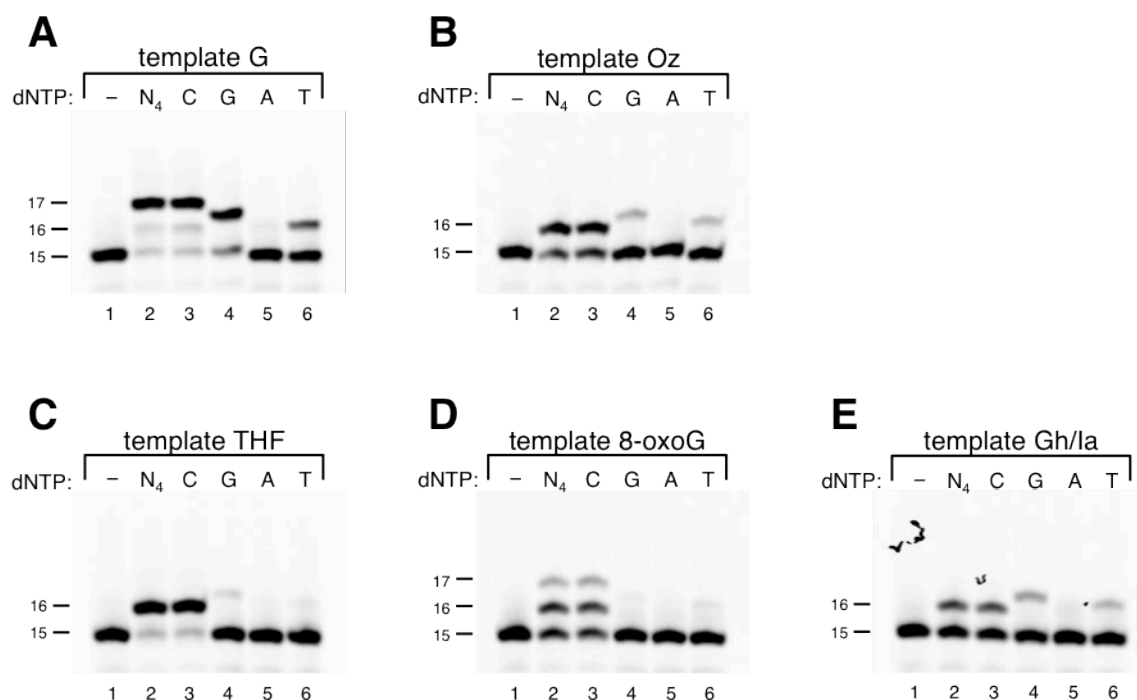




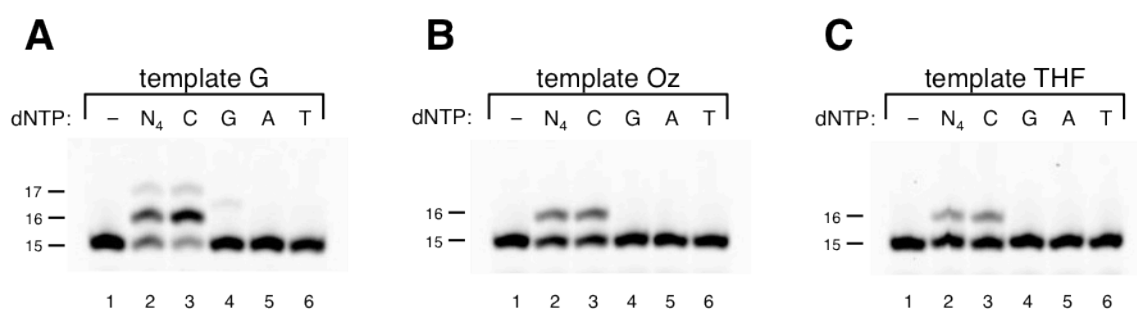
**dCTP : R357**



**Fig.36** DNA synthesis with hREV1<sub>(341-829)</sub> across Oz. (A) Interaction between incoming dCTP and R357 of hREV1. The structure of the dCTP:R357 pair was determined from the X-ray crystal structure of hREV1 in a ternary complex with DNA and dCTP<sup>77</sup>. (B-F) hREV1<sub>(341-829)</sub> (1.7 ng) was incubated with template (containing G in B, and Oz in C, THF in D, 8-oxoG in E, Gh/Ia in F) and 1 μM in B, C and F, 10 μM in D and E of each of the four dNTPs (lane 2) or 1 μM in B, C and F, 10 μM in D and E of a single dNTP (N = C, G, A or T) (lanes 3-6). Lane 1 contained no enzyme as the negative control. Copyright 2015 American Chemical Society.



**Fig.37** DNA synthesis with hREV1<sub>(341-829)</sub> across lesions with 100  $\mu$ M of dNTP. hREV1<sub>(341-829)</sub> (1.7 ng) was incubated with template (containing G in A, Oz in B, THF in C, 8-oxoG in D, Gh/Ia in E) and 100  $\mu$ M of each of the four dNTPs (lane 2) or 100  $\mu$ M of a single dNTP (N = C, G, A or T) (lanes 3-6). Lane 1 contained no enzyme as the negative control. Copyright 2015 American Chemical Society.



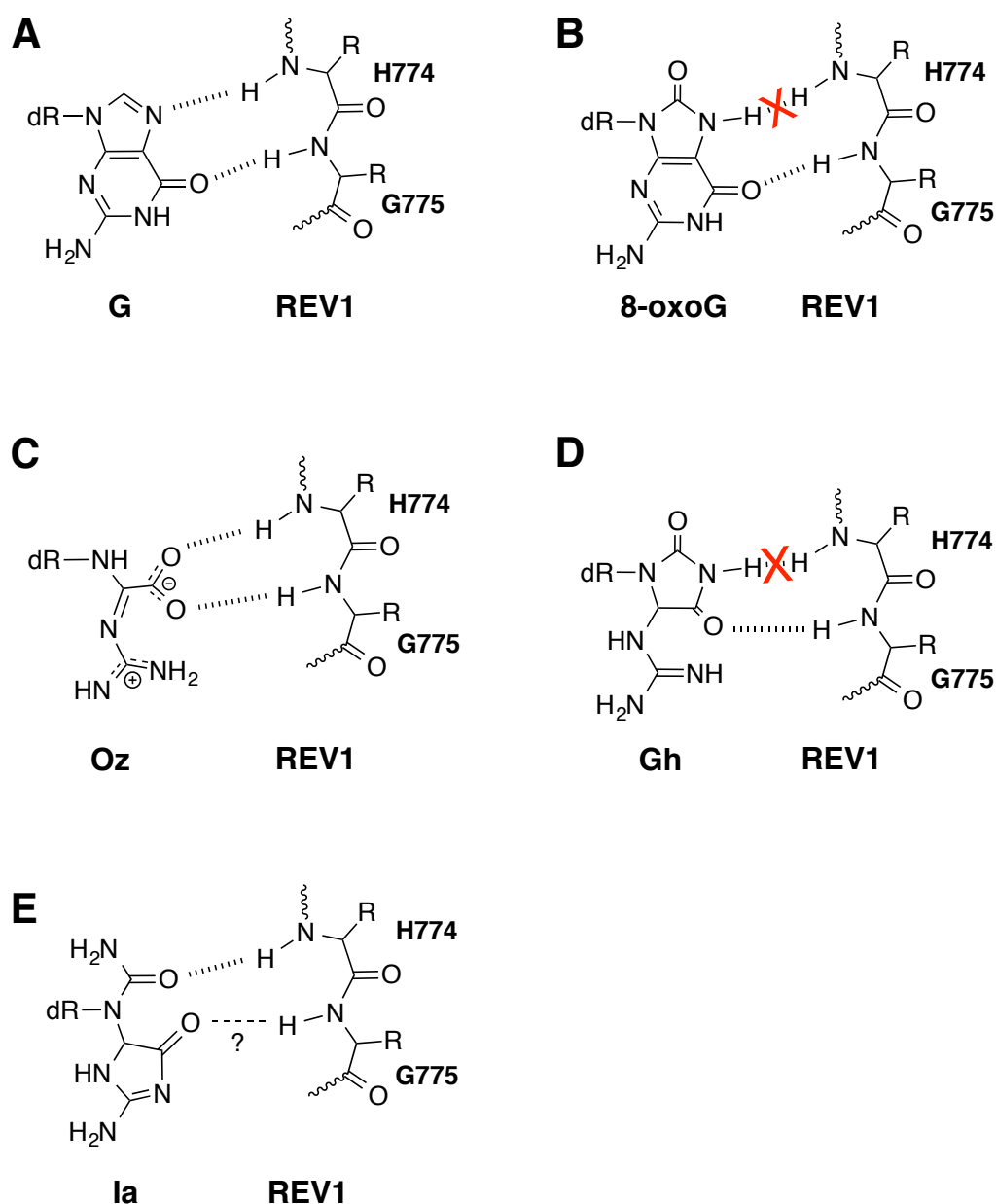
**Fig.38** DNA synthesis with yREV1 across lesions. yREV1 (12.5 ng) was incubated with template (containing G in A, Oz in B, and THF in C) and 100  $\mu$ M of each of the four dNTPs (lane 2) or 100  $\mu$ M of a single dNTP (N = C, G, A or T) (lanes 3-6). Lane 1 contained no enzyme as the negative control. Copyright 2015 American Chemical Society.

本研究により、これまでの解析に用いてきた DNA ポリメラーゼの中で REV1 が唯一 Oz に対して dCTP を優位に取り込む DNA ポリメラーゼであることが示された。そこで、REV1 の Oz に対する dCTP の取り込みという特徴を明らかにするために、速度論解析により G および Oz、THF、8-oxoG、Gh/Ia に対する dCTP の取り込み効率を明らかにした。各損傷塩基に対する dCTP の取り込み効率 ( $f_{\text{ins}}$ ) は G に対する dCTP の取り込み効率 ( $V_{\text{max}}/K_m$ ) との比として算出した。THF および 8-oxoG の  $f_{\text{ins}}$  はそれぞれ 0.03、0.01 であった (Table 8)。つまり、dCTP の取り込み効率は DNA テンプレートに含まれる塩基が G >> THF > 8-oxoG の順に良く、これは過去の報告<sup>51)</sup>と一致していた。これに対して、驚くべきことに Oz の  $f_{\text{ins}}$  は 0.19 と (Table 8)、THF や 8-oxoG の  $f_{\text{ins}}$  に比べると 6 倍もしくは 19 倍も高く、dCTP の取り込み効率は DNA テンプレートに含まれる塩基が Oz > THF > 8-oxoG の順に良いことが明らかとなった。さらに、Gh/Ia の  $f_{\text{ins}}$  は 0.12 であり (Table 8)、THF や 8-oxoG の  $f_{\text{ins}}$  に比べると高いが、Oz の  $f_{\text{ins}}$  よりも低かった。以上から、dCTP の取り込み効率は DNA テンプレートに含まれる塩基が Oz > Gh/Ia > THF > 8-oxoG の順に良いことが明らかとなった。

**Table 8** Steady-state kinetics parameters for dCTP insertion opposite Oz, THF, 8-oxoG, Gh/Ia, and unmodified control template G by hREV1<sub>(341-829)</sub>. Copyright 2015 American Chemical Society.

template	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}/K_m$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$f_{\text{ins}}^a$
G	$1.33 \times 10^{-2}$	$2.06 \times 10^{-2}$	$6.45 \times 10^{-1}$	1
Oz	$1.15 \times 10^{-2}$	$9.48 \times 10^{-2}$	$1.21 \times 10^{-1}$	0.19
THF	$1.35 \times 10^{-2}$	$6.18 \times 10^{-1}$	$2.18 \times 10^{-2}$	0.03
8-oxoG	$1.21 \times 10^{-2}$	1.70	$0.71 \times 10^{-2}$	0.01
Gh/Ia	$1.62 \times 10^{-2}$	$2.07 \times 10^{-1}$	$7.82 \times 10^{-2}$	0.12

続いて、REV1 による dCTP の取り込みの詳細なメカニズムを理解するために、Oz に対する dCTP の取り込み効率が Gh/Ia や THF、8-oxoG よりも良かった理由について考察した。hREV1 と yREV1 どちらも DNA テンプレートの G よりもむしろ自身のアミノ酸であるアルギニン (hREV1 は R357、yREV1 は R324) を利用して、dCTP を効率良く取り込むことが結晶構造解析から既に明らかとなっている<sup>77,78)</sup>。DNA テンプレート中の G は REV1 のロイシン (hREV1 は L358、yREV1 は L325) によって DNA ヘリックスから押し出され、さらには、DNA テンプレートの G のフーグスティーン面の  $N^7$  および  $O^6$  原子が hREV1 では H774 と G775、yREV1 では M658 と G686 の主鎖がそれぞれ水素結合することにより、REV1 の活性中心にある疎水性ポケットに固定されている (Fig.39A)<sup>77,78)</sup>。また、これまでに行われた速度論解析から、G と 8-oxoG に対する dCTP の取り込み効率は解離定数に強く依存しており、DNA テンプレートが G の場合に対する dCTP の結合力に比べると DNA テンプレートが 8-oxoG の場合は dCTP の結合力が有意に低下することが明らかとなっている<sup>51,79)</sup>。Howell らは以前、DNA テンプレート中の 8-oxoG の  $H^7$  と hREV1 の H774 の主鎖が水素結合できないことを予測している (Fig.39B)<sup>79)</sup>。 $K_m$  値は解離定数であるので、 $K_m$  値が大きければ DNA ポリメラーゼである REV1 との親和性が低いことを示している。Table 8 に示した速度論解析結果をみると、 $K_m$  値は 8-oxoG > Gh/Ia > Oz であり、dCTP の取り込み効率は Oz > Gh/Ia > 8-oxoG であった。つまり、Oz と hREV1 との相互作用は 8-oxoG に比べると強いことから、Oz は hREV1 のアミノ酸と二本の水素結合を形成できると予測した。そこで、Oz の構造をみてみると、Oz は同一平面上に G の  $N^6$  および  $O^6$  原子の代わりとなりうる 2 つのヘテロ原子をもっていることから、Oz のこれらの 2 つのヘテロ原子が G の場合と同様に hREV1 の H774 と G775 と水素結合できると予測した (Fig.39C)。さらに、Gh と hREV1 の相互作用様式は Gh と 8-oxoG の構造の類似性から、8-oxoG と hREV1 の相互作用様式と似ていることが予測できる (Fig.39D)。そのため、Gh に対する dCTP の取り込み効率は 8-oxoG に対する dCTP の取り込み効率と同程度となるはずであるが、実際には Table 8 に示したように、8-oxoG に対する dCTP の取り込みに比べると Gh に対する dCTP の取り込みは効率が良かった。第 1 章でも述べたが、Gh は Ia と平衡状態にあり (Scheme 1)、全ての pH において Gh と Ia は混合状態で存在することが報告されている<sup>25)</sup>。Ia は Oz のように hREV1



**Fig.39** Proposed interactions between template bases and the main-chain amides of H774 and G775 of hREV1. (A) The  $N^7$  and  $O^6$  atoms of template G (Hoogsteen edge) interact with the H774 and G775 main-chain amides of hREV1<sup>77)</sup>. (B) The interaction described by Howell *et al.*<sup>79)</sup> between an 8-oxoG and G775 of hREV1. Our proposed interaction between main-chain amides of hREV1 and Oz (C), Gh (D) and Ia (E). The red X shows that there is no hydrogen bond. Copyright 2015 American Chemical Society.

と相互作用可能な2つのカルボニル炭素を有しており、これにより Ia は hREV1 と二本の水素結合を形成し得ると考えられる (Fig.39E)。しかし、Ia は Oz とは異なり  $sp^3$  炭素を有しているため、Ia の  $O^7$  原子は同一平面上になく、この Ia の  $O^7$  原子と hREV1 の G775 間の水素結合は Oz と hREV1 の水素結合に比べると弱いと予測される。したがって、Gh/Ia に対する dCTP の取り込みが 8-oxoG に対する dCTP の取り込みよりも効率が良く、Oz に対する dCTP の取り込み効率よりも低かったのは、hREV1 が Gh/Ia に対して dCTP を取り込む際に、Gh/Ia の平衡は Ia 側に偏っているのではないかと考えている。以上の Oz および Gh/Ia、8-oxoG と hREV1 との相互作用に関する考察から、hREV1 による dCTP の取り込み過程の損傷塩基の疎水性ポケットへの固定においては、Oz が Gh/Ia や 8-oxoG よりも安定であることが示唆された。

本研究結果から、Oz に対して REV1 がリクルートされるとすると、REV1 がグアニン酸化損傷である Oz に対して dCTP を優位に取り込むことで、Oz から生じる G:C-C:G トランスバージョンをはじめとした点突然変異を回避できる可能性を見出した。これまで、Oz の修復に関する研究から、修復酵素である NEIL1 や NTH1 が Oz:C 塩基対だけでなく、Oz:G や Oz:A 塩基対からも Oz を取り除いてしまうことが明らかとなっていた<sup>80)</sup>。そのため、REV1 の Oz に対する dCTP の取り込みはこれらの Oz:C 塩基対からの Oz 除去という正確な修復においても重要となると考えられる。しかし、REV1 は Oz に対して dCTP を優位に取り込むが、dCTP を取り込んだ後の DNA 合成反応は停止してしまう。これまでの REV1 に関する研究報告から、REV1 の C 末端ドメインを介して、DNA の複製を担う Pol  $\delta$  や、REV1 と同様に損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼである Pol  $\zeta$  や Pol  $\eta$ 、Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$  と相互作用できることが明らかとなっている<sup>81-85)</sup>。今後の検討課題として、Oz から生じる G:C-C:G トランスバージョンを回避するメカニズムを明らかにするために、REV1 が Oz に対して dCTP を取り込んだ後の DNA 伸長反応を担う DNA ポリメラーゼの解析が必要である。

#### 第4節 結論

Pol  $\delta$  および Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$  は Oz に対して誤った塩基を取り込み、低効率ではあるが Oz を乗り越えて DNA を合成した (Table 9)。Pol  $\zeta$  は Oz に対して誤りがちな塩基取り込みを行うが、これまで解析された他の DNA ポリメラーゼとは異なり、天然の G の場合とほぼ同程度の効率で、Oz を乗り越えて DNA を合成することを明らかにした (Table 9)。一方、RVE1 は Oz に対して dCTP を優位に取り込むことから (Table 9)、グアニン酸化損傷である Oz から生じる G:C-C:G トランスバージョンをはじめとした点突然変異を回避できる可能性を秘めた DNA ポリメラーゼであることが明らかとなった。以上本研究結果は、REV1 と Pol  $\zeta$  が Oz を含む DNA の複製過程において関与する重要な DNA ポリメラーゼであることが示唆された。今後は、これらの DNA ポリメラーゼが実際に細胞の中で Oz を含む DNA の複製過程に関与するかどうか、また、そのメカニズムについて解析を進めることが必要であろう。

**Table 9** Summary of chapter 4 with previous results relating to Pols  $\alpha$ ,  $\epsilon$  and  $\eta$  <sup>20, 21)</sup>.

		Insertion	Extension
Replicative DNA polymerases	Pol $\alpha$	G <sup>20)</sup>	low efficiency <sup>20)</sup>
	Pol $\delta$	G <sup>20)</sup>	low efficiency
	Pol $\epsilon$	G	low efficiency <sup>20)</sup>
DNA polymerases involved in translesion synthesis	Pol $\zeta$	G, A, C, T	high efficiency
	Pol $\eta$	G, A, C <sup>21)</sup>	low efficiency <sup>21)</sup>
	Pol $\iota$	G, A, C, T	stall
	Pol $\kappa$	G, A	low efficiency
	REV1	C	stall

それぞれの DNA ポリメラーゼが Oz に対して取り込む塩基に着目すると、本章の研究結果および過去の報告<sup>20,21)</sup> から、REV1 を除く DNA ポリメラーゼが共通して Oz に対して dGTP を取り込むことが明らかとなった。特に、B ファミリーに属している忠実度の高い複製型の DNA ポリメラーゼが Oz に対して dGTP のみを取り込むことは、第 2 章および第 3 章に示したように、Oz と G の塩基対が安定であることに起因すると考えられる。一方、損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼについては、忠実度が低く、誤りがある DNA 合成を行う傾向があることが知られており、Oz に対して dGTP 以外の塩基も取り込まれたものと考えられる。そこで、次章では、Oz と G または A、T、C の塩基対の安定性について解析することとした。



## 第5章

# Ozを含む塩基対の安定性のDNA伸長反応における影響

(本章の内容に関しては J. Nucleic Acids, 2014, 178350 (2015) に発表済み)

### 第1節 背景

第2章では、Oz または Gh/Ia、Sp とグアニンの塩基対の安定性について述べた。また、第3章において、これらの塩基対を含むDNA二本鎖の不安定性と歪み度合いを算出し、その結果によって、DNAポリメラーゼによるグアニンの取り込み効率や損傷乗り越えDNA合成効率が  $Oz > Gh/Ia > Sp$  となった以前の実験結果<sup>20,26)</sup>を説明することができた。つまり、OzはDNA二本鎖中における安定性がGh/IaやSpよりも高く、G:C-C:Gトランスバージョンに關与する可能性が高いといえるだろう。

第2章および第3章ではOzに対して取り込まれる塩基としてグアニンについてのみ言及した。しかしながら、DNAポリメラーゼがOzに対して取り込む塩基はグアニンだけではない。実際に以前の研究結果<sup>20,21)</sup>および第4章の解析結果から、KF<sup>exo</sup>および、Pol $\gamma$ 、Pol $\kappa$ 、Pol IVはOzに対してグアニンとアデニンの両方を、Pol $\eta$ についてはグアニンとアデニンに加えシトシンも取り込み、Pol $\xi$ やPol $\iota$ に至ってはグアニン、アデニン、シトシン、チミンの全てを取り込むことが明らかとなっている。つまり、これらのDNAポリメラーゼにおいては、Ozに対してグアニンが取り込まれた後の伸長反応がアデニンやシトシン、チミンが取り込まれた場合に比べて効率的に行われる場合のみ、G:C-C:Gトランスバージョンが有意に引き起こされると考えられる。

一般的に、ミスマッチ塩基対であるプリン:プリン塩基対 (Pur:Pur) およびピリミジン:ピリミジン塩基対 (Pyr:Pyr) は Pur:Pyr および Pyr:Pur ミスマッチ塩基対よりもDNAが歪みやすく、不安定であり、DNA複製を担うDNAポリメラーゼはこのような歪んだDNAを複製しにくいといわれている。分子動力学シミュレーションによって、プライマー末端にミスマッチ塩基対 (G:G または C:C、C:A 塩基対) を含むDNAは歪むこと、そして、その歪み度合いは  $G:G > C:C > C:A$  であることがこれまでに示されている<sup>86)</sup>。また、以前 Beard らは、プライマー末端が Pur:Pyr または Pyr:Pur 塩基対の方が Pur:Pur お

よび Pyr:Pyr 塩基対よりも正確な塩基の取り込み効率が高いことを報告している<sup>87)</sup>。そのため、DNA ポリメラーゼの伸長反応の効率は、プライマー末端の塩基対の安定性に依存しているといえる。

これまでの研究結果<sup>20, 21)</sup>に加え、第4章の解析結果から、REV1を除く全てのDNAポリメラーゼが共通して Oz に対してグアニンを取り込むことが明らかとなっており、Oz と G が A や C、T よりも安定な塩基対を形成することが示唆された。また、量子化学計算によって Oz:G 塩基対が Oz:A 塩基対よりも安定な塩基対を形成することが予測されていることから<sup>20)</sup>、Oz に対してグアニンが取り込まれた後の伸長反応はアデニンが取り込まれた場合よりも効率的に行われると予測される。そこで、本章では、実際のDNA伸長反応中における Oz:G および Oz:A、Oz:C、Oz:T 塩基対の安定性を評価し、Oz:G 塩基対が最も安定であるかどうかを明らかにすることを試みた。この目的のために、本章ではプライマー伸長反応を用いて、プライマー末端の伸長反応サイトに Oz:G または Oz:A、Oz:C、Oz:T 塩基対をもつプライマーの伸長効率の違いを比較した。また、これまでの Oz に対する塩基の取り込み解析における結果との一貫性を評価するために、Oz に対する塩基の取り込みパターンが異なる3つのDNAポリメラーゼ(グアニンのみを取り込む Pol  $\beta$  およびグアニンとアデニンを取り込む KF  $exo^-$ 、グアニンとアデニン、シトシンを取り込む Pol  $\eta$ )を用いた。さらに、熱変性により  $T_m$  値を測定することで、DNA二本鎖の安定性および二本鎖中に含まれる塩基対の安定性を測定した。

## 第2節 実験方法

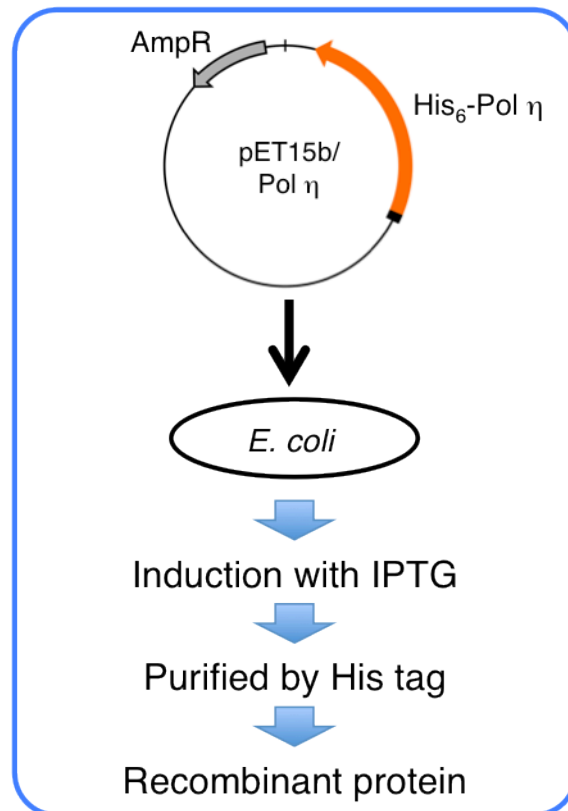
### 2-1. オリゴヌクレオチド

DNA ポリメラーゼによるプライマー伸長反応に用いた 30-mer の DNA テンプレート (5'-CTCATCAACATCTTXAATTCACAATCAATA-3', X = Oz) および、熱変性実験に用いた 9-mer の DNA オリゴマー (5'-TGCTXGCGT-3', X = Oz) は以前に述べられたように<sup>20)</sup> 調製した。プライマー伸長反応のコントロールに用いた DNA テンプレート (5'-CTCATCAACATCTTGAATTCACAATCAATA-3') および 5'末端の Alexa680 ラベル化プライマー (5'-TATTGATTGTGAATTN-3', N = C または G, A, T) は日本バイオサービスより購入した。熱変性実験に用いた 9-mer DNA オリゴマー (5'-TGCTNGCGT-3', N = C または T, および 5'-ACGCNAGCA-3', N = C または G, A, T) はホスホラミダイト法を用いて合成した。

### 2-2. DNA ポリメラーゼ

KF exo は Fermentas (Waltham, MA) から、hPol  $\beta$  は CHIMERx (Milwaukee, WI) から購入した。

hPol  $\eta$  は *POLH* によってコードされており、その分子量は 78 kDa である。N 末端に 6×His タグが融合した hPol  $\eta$  をコードする大腸菌発現用ベクター pET15b/hPol  $\eta$  を構築した (Fig.40)。pET15b/hPol  $\eta$  を組み込んだ大腸菌 Rosetta2 (DE3) pLysS に 1 mM IPTG を加えて発現誘導した。発現誘導した大腸菌は 37 °C で 3 時間培養後、遠心分離により回収し、-80 °C に凍結保存した。以降の操作は第 4 章の hPol  $\delta$  と同様に行い、hPol  $\eta$  保存用バッファー (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 10 mM 2-ME, 0.5 mM PMSF) に置換し、少量ずつ分注して -80 °C に保存した。



**Fig.40** Expression and purification of hPol η.

### 2-3. CBB 染色

作製した hPol η のリコンビナントに溶解バッファー (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 0.05 mg/ml bromophenol blue) を加え、5 分間 95 °C で処理した。その後は第 4 章と同様の方法で行った。

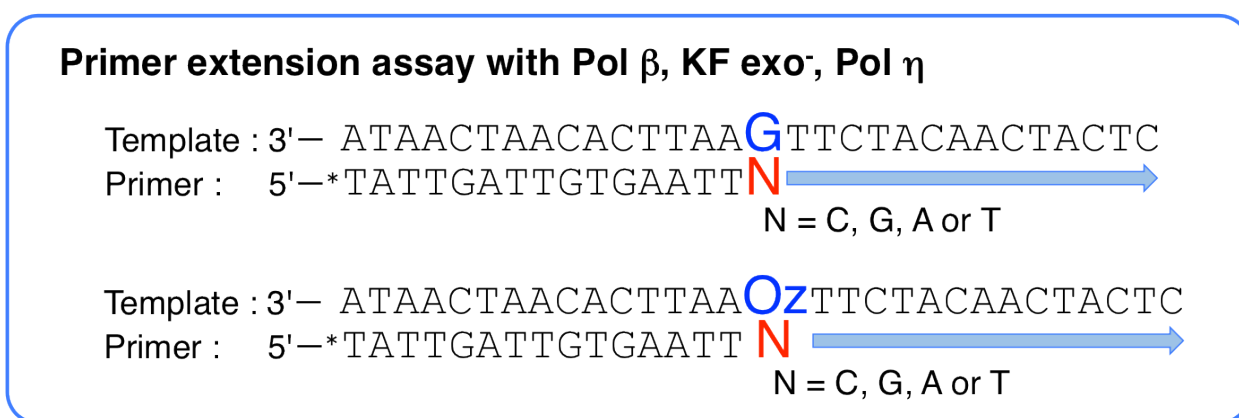
### 2-4. ウェスタンブロッティング法

ウェスタンブロッティング法は第 4 章と同様の方法で行った。1 次抗体として、Anti-His-tag (MBL) を、2 次抗体として Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) を使用した。

## 2-5. プライマー伸長反応

KF  $\text{exo}^-$  および hPol  $\beta$ 、hPol  $\eta$  の DNA ポリメラーゼ反応解析について次に示す。KF  $\text{exo}^-$  の反応液の組成は 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 100  $\mu\text{g/ml}$  BSA ; hPol  $\beta$  の反応液の組成は 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 400  $\mu\text{g/ml}$  BSA ; hPol  $\eta$  の反応液の組成は 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM DTT, 100  $\mu\text{g/mL}$  BSA である。KF  $\text{exo}^-$  および hPol  $\beta$ 、hPol  $\eta$  の反応液は 100 fmol の DNA テンプレートおよび 50 fmol の 5'末端を Alexa680 で標識化したプライマー、100  $\mu\text{M}$  dNTPs (dCTP、dGTP、dATP および dTTP) を含んでいる。それぞれ DNA ポリメラーゼの濃度はそれぞれの図の説明文中に記載した。また、プライマー伸長反応に用いた DNA テンプレートとプライマーの組み合わせは Fig.41 に示した。以上を含む反応液は全量を 5  $\mu\text{l}$  とし、KF  $\text{exo}^-$  および hPol  $\beta$ 、hPol  $\eta$  の反応液を 37  $^\circ\text{C}$  で 30 分間反応し、5  $\mu\text{l}$  の stop バッファーを加えて反応を停止させた。そして、8 M 尿素を含む 16%ポリアクリルアミドゲルと 1 $\times$ TBE バッファーを用いて、それぞれの反応後のサンプルのうち 2.5  $\mu\text{l}$  を 30 W で 60 分間電気泳動を行い分離した。電気泳動後、分離したゲルは Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) を使用して解析した。

また、伸長効率は式 (14) のように全長まで伸長したバンドの強度 ( $\text{Band}_{full}$ ) を、プライマーを含むバンド全体の強度 ( $\text{Band}_{total}$ ) で割った比率として定義し、算出した。

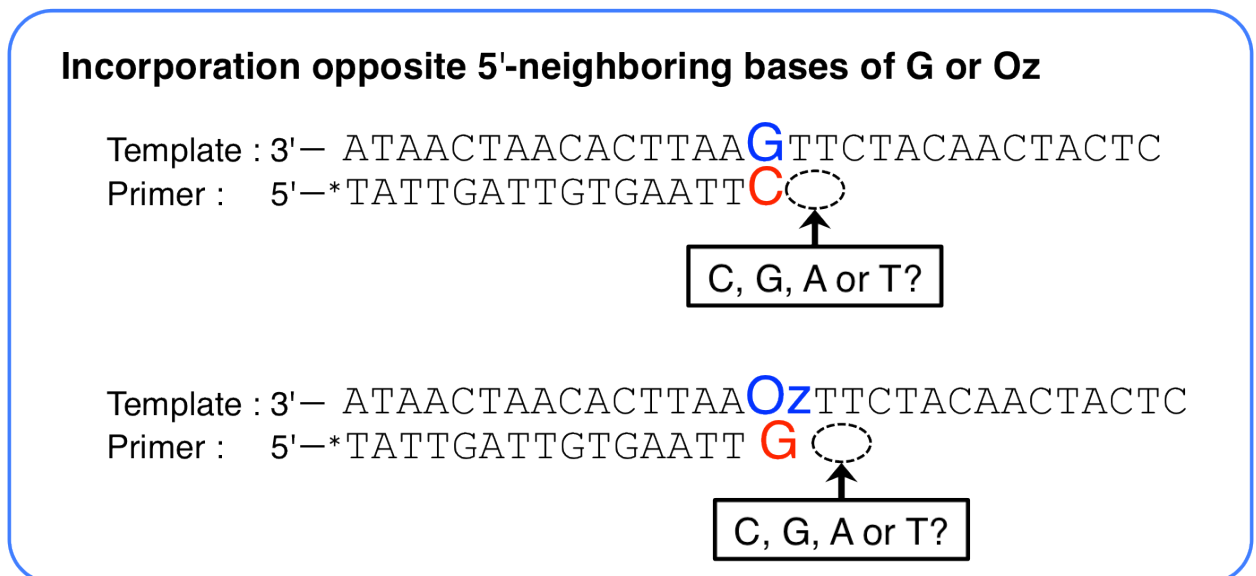


**Fig.41** Experimental design of DNA polymerase assay for primer extension. The 16-mer primer is labeled with Alexa 680 indicated by ‘\*’.

$$\text{Extension efficiency (\%)} = \frac{\text{Band}_{full}}{\text{Band}_{total}} \times 100 \quad (14)$$

## 2-6. G または Oz の 5'側隣接塩基に対する塩基取り込み解析

G または Oz に隣接する塩基に対する塩基の取り込みに関する塩基選択性の分析に用いた反応液の組成は、プライマーと dNTP 以外はプライマー伸長反応と同じである。20 nM DNA テンプレートが G の場合は 10 nM プライマー-5'-TATTGATTGTGAATTAC-3'、Oz の場合は 10 nM プライマー-5'-TATTGATTGTGAATTAG-3'を用いた。塩基の取り込み解析に用いた DNA テンプレートとプライマーの組み合わせは Fig.42 に示した。また、それぞれの反応液には 100 μM の dNTP 単体 (dCTP または dGTP、dATP、dTTP) を用いた。



**Fig.42** Experimental design of DNA polymerase assay for incorporation opposite 5'-neighboring bases of G or Oz. The 16-mer primer is labeled with Alexa 680 indicated by '\*'.

## 2-7. 熱変性実験

$T_m$  値を決定するために 9-mer の DNA (5'-TGCTXGCGT-3', X = C または T, Oz) と 9-mer の相補鎖 (5'-ACGCNAGCA-3', N = G または A, C, T) を用いて熱変性実験を行った。50 mM sodium phosphate (pH 7.0)、1 M NaCl 中に、9-mer の DNA と 9-mer の相補鎖のモル比は 1:1 で二本鎖の終濃度が 4  $\mu$ M となるように、サンプル (100  $\mu$ l) を調整した。それぞれのサンプル中に含まれる相補的なオリゴマーは、60  $^{\circ}$ C で 5 min 加熱後、室温まで徐々に冷却するアニーリングによって二本鎖を形成させた。全てのサンプルは加熱による蒸発を防ぐために、90  $\mu$ l のシリコンオイル (Life Technologies) で覆った。そして、Ultrospec 3100 pro (GE Healthcare) を用いて、アニーリング後のサンプルを 1  $^{\circ}$ C/min のペースで 20  $^{\circ}$ C から 80  $^{\circ}$ C まで加熱し、260 nm で吸光度をモニタリングした。それぞれの  $T_m$  値は、融解曲線の一次微分の最大値から決定した。

### 第3節 結果と考察

#### 3-1. hPol $\beta$ のプライマー伸長反応

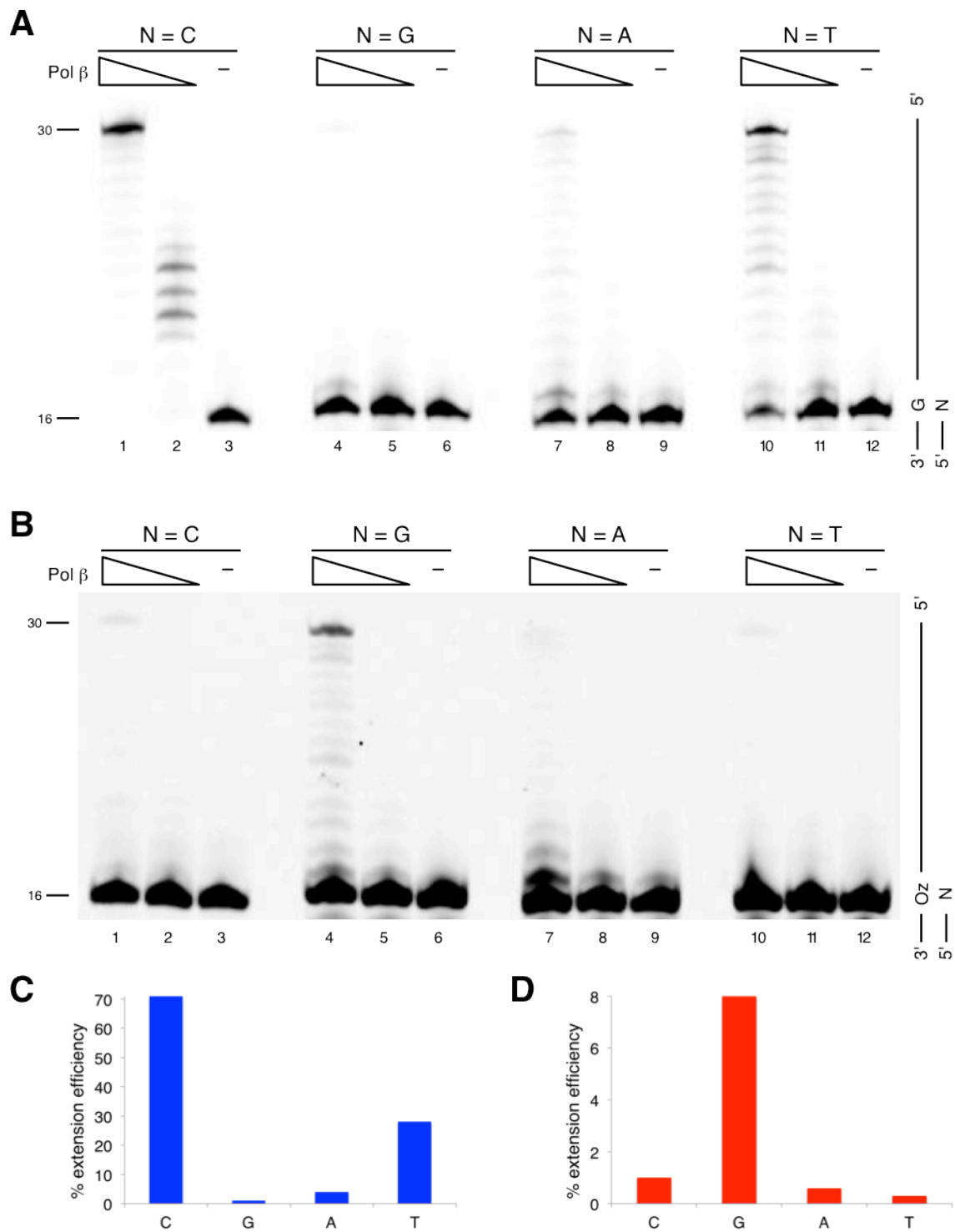
Ozに対してグアニンのみを取り込む hPol  $\beta$  の損傷を越えて伸長する効率を調べた。その解析には、30塩基からなる G または Oz を一塩基含む DNA テンプレートおよび、G または Oz の相補鎖側にあたるプライマーの 3'末端塩基がそれぞれ異なる 16塩基からなる 4種類のプライマーを用いた。

Gを含む DNA テンプレートの場合、hPol  $\beta$  はプライマーの 3'末端塩基が C のプライマーからの最も効率良く伸長し、その他のプライマー末端にミスマッチ塩基対をそれぞれ形成する他の 3つのプライマーの伸長効率は低かった (Fig.43A のレーン 1 とレーン 4 または 7、10 を比較)。つまり、ワトソン・クリック塩基対が最も安定であることを確認できた。プライマー末端における G:T ミスマッチは他の 2つのミスマッチよりは効率良く伸長していた (Fig.43A のレーン 10 とレーン 4 または 7 を比較、および Fig.43C)。これらは Pur:Pyr 塩基対が Pur:Pur 塩基対よりも安定である過去の報告<sup>87)</sup>と一致していた。

一方、Ozを含む DNA テンプレートでは、Oz の相補鎖側が G となるプライマーから最も効率良く伸長しており (Fig.43B のレーン 4 とレーン 1 または 7、10 を比較)、他のプライマーを用いた場合の少なくとも 8倍効率的に全長まで伸長していた (Fig.43D)。これらの結果は Ozに対してグアニンのみを取り込むという過去の実験結果<sup>20)</sup>と一致していた。それ故、hPol  $\beta$  Ozに対するグアニンの取り込みは Oz:G 塩基対の安定性に起因していると推測した。

さらに、Oz:G から全長までの伸長は G:G や G:A ミスマッチからの伸長よりも効率が良かった (Fig.43B のレーン 4 と 43A のレーン 4 または 7 を比較)。これらは、hPol  $\beta$  のような忠実度の高い DNA ポリメラーゼによる DNA 複製過程において、Oz:G 塩基対が Pur:Pur ミスマッチ塩基対よりも安定であることを示した。



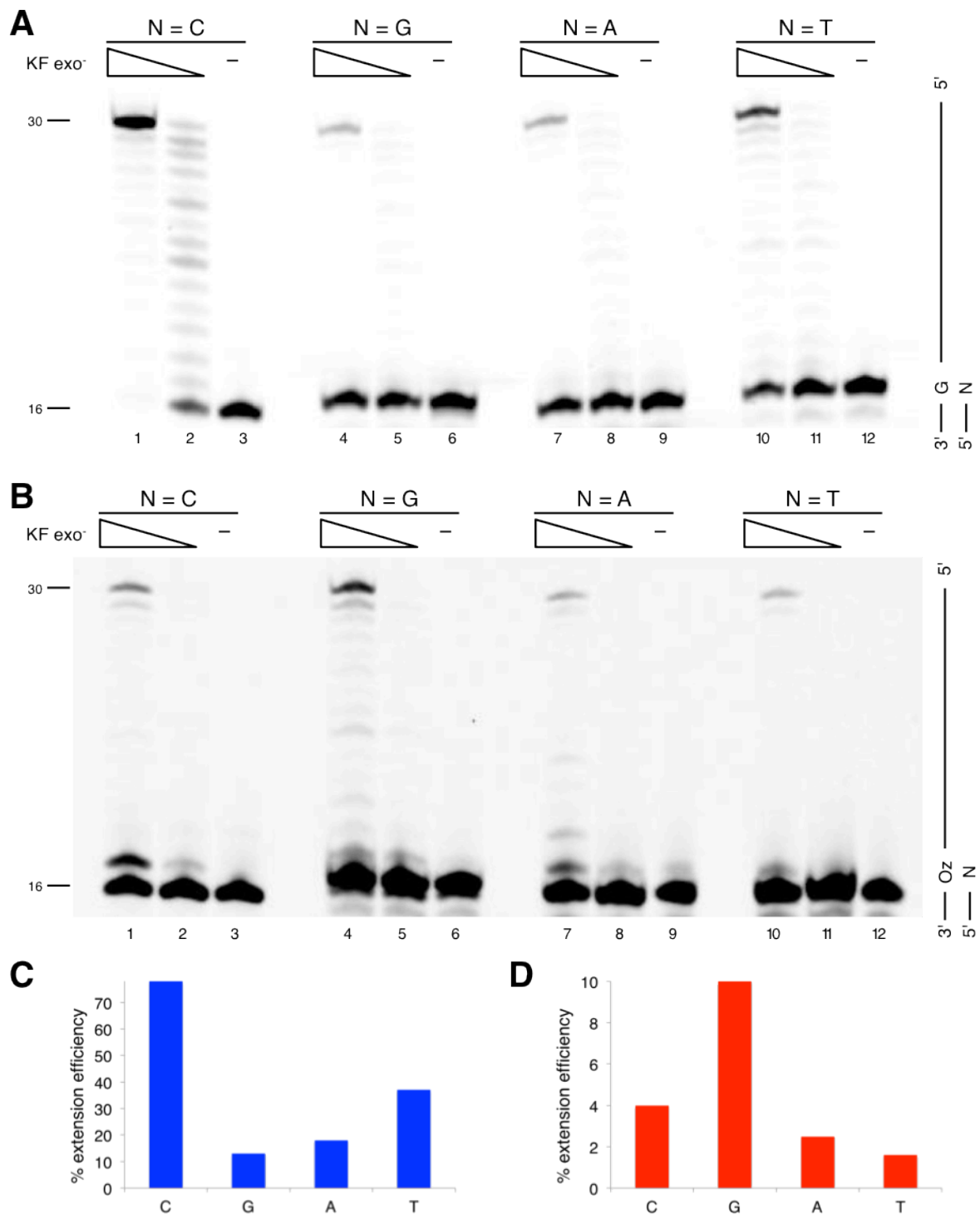


**Fig.43** Extension from primer ends by hPol  $\beta$ . Each primer contained a different nucleotide at the 3' end (indicated by N, where N was C, G, A, or T in lanes 1-3, 4-6, 7-9, and 8-12, respectively) opposite G (A) or Oz (B). The amount of hPol  $\beta$  was 25 mU in lanes 1, 4, 7, and 10 or 2.5 mU in lanes 2, 5, 8 and 11. The extension efficiency beyond G:C, G:G, G:A or G:T (C), and Oz:C, Oz:G, Oz:A or Oz:T (D). Reproduced from Suzuki M. *et al.*, J. Nucleic Acid, 2014, 178350, (2014) with permission from the Hindawi Publishing Corporation.

### 3-2. KF exo<sup>-</sup>のプライマー伸長反応

次に、KF exo<sup>-</sup>の活性について検討した (Fig.44)。KF exo<sup>-</sup>は hPol β と同様に、プライマー末端が G:C 塩基対となるプライマーの伸長効率が他の塩基対の場合に比べて良かった (Fig.44A のレーン 1 とレーン 4 または 7、10 を比較)。それに加えてプライマーの伸長効率が良かった 3'末端に位置する塩基対の順位は hPol β と同様に G:C > G:T > G:A > G:G であった (Fig.44A, C)。

KF exo<sup>-</sup>は Oz に対してグアニンとアデニンの両方を取り込むが<sup>20)</sup>、プライマーの伸長効率では驚くべきことに、3'末端が Oz:G 塩基対となるプライマーからの伸長効率が最も良かった (Fig.44B のレーン 4)。さらに、Oz:G 塩基対からの伸長効率は Oz:C や Oz:A、Oz:T 塩基対からの伸長よりも 2 倍以上高かった (Fig.44B のレーン 4 とレーン 1 または 7、10 を比較、および Fig.44D)。これは、プライマー伸長反応において、Oz:G 塩基対が Oz:A 塩基対よりも安定であることを示しており、この塩基対の安定性の違いは、量子化学計算による Oz:G 塩基対が Oz:A 塩基対よりも安定であるという以前の予測<sup>20)</sup>と一致していた。

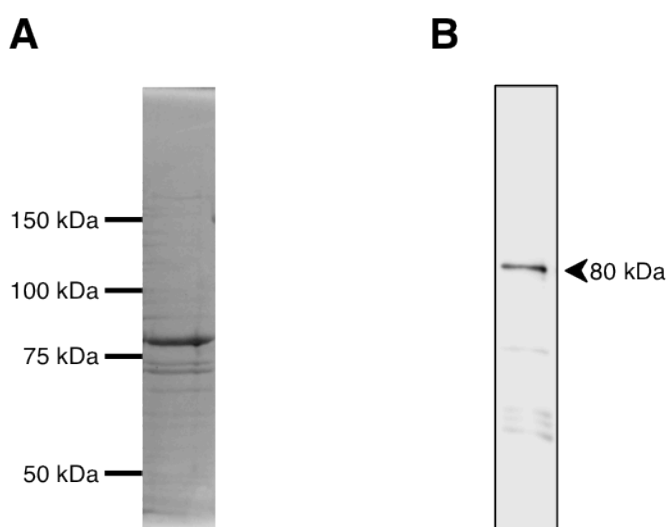


**Fig.44** Extension from primer ends by KF exo<sup>-</sup>. Each primer contained a different nucleotide at the 3' end (indicated by N, where N was C, G, A, or T in lanes 1-3, 4-6, 7-9, and 8-12, respectively) opposite G (A) or Oz (B). The amount of KF exo<sup>-</sup> was 250 mU in lanes 1, 4, 7, and 10 or 25 mU in lanes 2, 5, 8, and 11. The extension efficiency beyond G:C, G:G, G:A or G:T (C), and Oz:C, Oz:G, Oz:A or Oz:T (D). Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *J. Nucleic Acid*, 2014, 178350, (2014) with permission from the Hindawi Publishing Corporation.

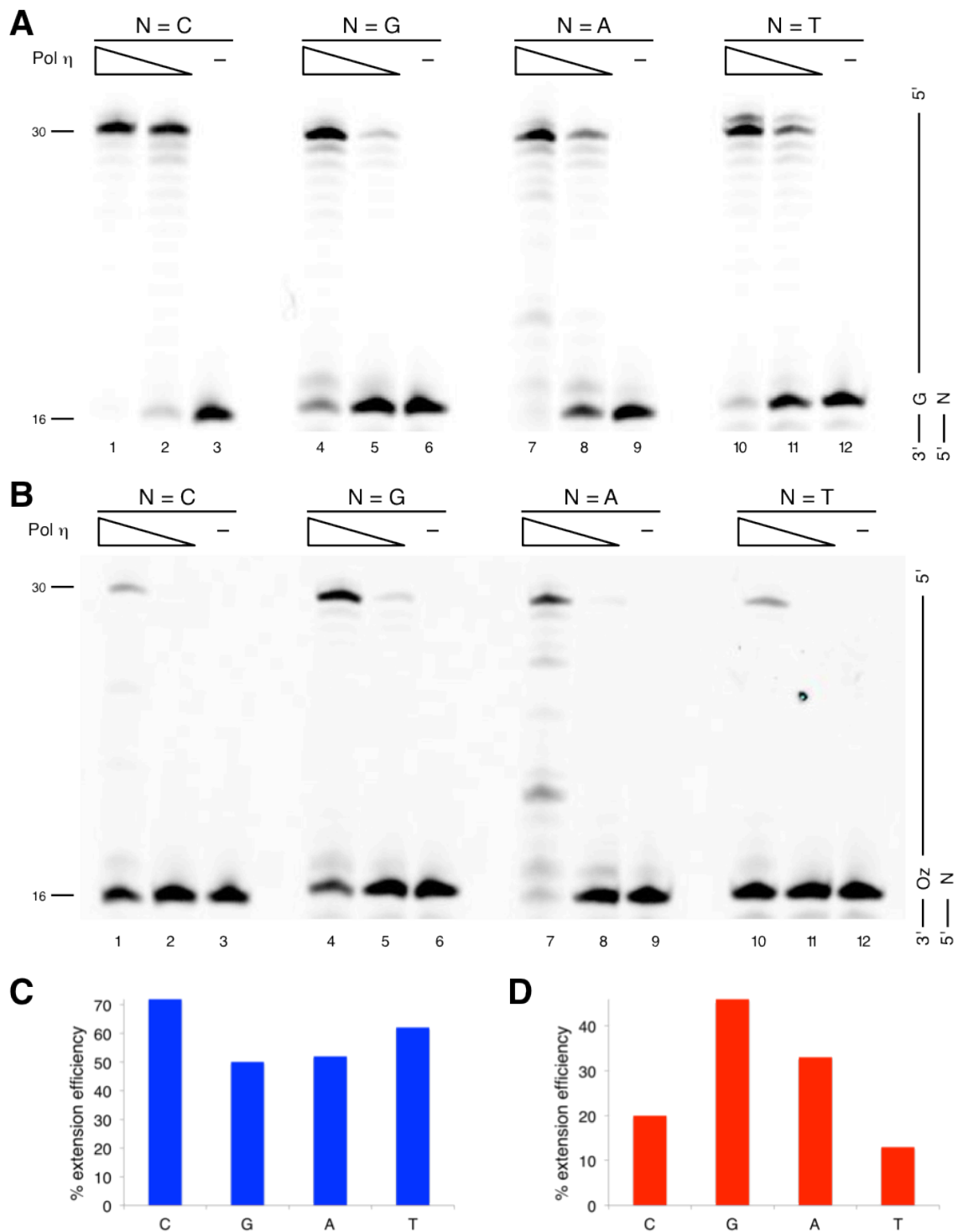
### 3-3. hPol $\eta$ のプライマー伸長反応

hPol  $\beta$  や KF  $\text{exo}^-$ と同様に、hPol  $\eta$  による G または Oz の後のプライマー伸長効率を解析した。hPol  $\eta$  についてはリコンビナントを作製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の CBB 染色およびウェスタンブロッティング法にて確認した (Fig.45)。hPol  $\eta$  も hPol  $\beta$ 、KF  $\text{exo}^-$ と同様に、プライマーの 3'末端が G:C 塩基対の場合が最も効率良く伸長していた (Fig.46A のレーン 1 とレーン 4 または 7、10 を比較)。ところが、hPol  $\beta$  や KF  $\text{exo}^-$ とは違って、プライマー末端にミスマッチ塩基対 (G:G または G:A、G:T) を含む場合でさえ、その伸長効率は 50%以上であった (Fig.46A のレーン 4 および 7、10、および Fig.46C)。この結果は、hPol  $\eta$  が未損傷の DNA 複製において誤りがちであるという報告<sup>88-90)</sup>と一致していた。

hPol  $\eta$  は Oz に対してグアニンとアデニン、シトシンを同程度取り込むことが既に明らかになっており<sup>20)</sup>、さらに hPol  $\eta$  は誤りがちな DNA 合成を行う DNA ポリメラーゼであることが知られているにもかかわらず<sup>88-90)</sup>、Oz:G 塩基対を 3'末端に含むプライマーは Oz:C や Oz:A、Oz:T を含むプライマーの伸長よりも約 2 倍効率的であった (Fig.46B のレーン 4 とレーン 1 または 7、10 を比較、および Fig.46D)。この結果は、Oz:G 塩基対が他の塩基対よりも安定であることを示しており、hPol  $\beta$  や KF  $\text{exo}^-$ の結果と一致していた。



**Fig.45** Expression and purification of recombinant hPol  $\eta$ . (A) hPol  $\eta$  was electrophoresed and stained with CBB. (B) hPol  $\eta$  was identified by immunoblotting with anti-His antibody.



**Fig.46** Extension from primer ends by hPol  $\eta$ . Each primer contained a different nucleotide at the 3' end (indicated by N, where N was C, G, A, or T in lanes 1-3, 4-6, 7-9, and 8-12, respectively) opposite G (A) or Oz (B). The amount of hPol  $\eta$  was 11.5 ng in lanes 1, 4, 7, and 10 or 1.15 ng in lanes 2, 5, 8, and 11. The extension efficiency beyond G:C, G:G, G:A (C) or G:T, and Oz:C, Oz:G, Oz:A or Oz:T (D). Reproduced from Suzuki M. et al., *J. Nucleic Acid*, 2014, 178350, (2014) with permission from the Hindawi Publishing Corporation.

### 3-4. Oz を含む DNA 二本鎖の熱安定性

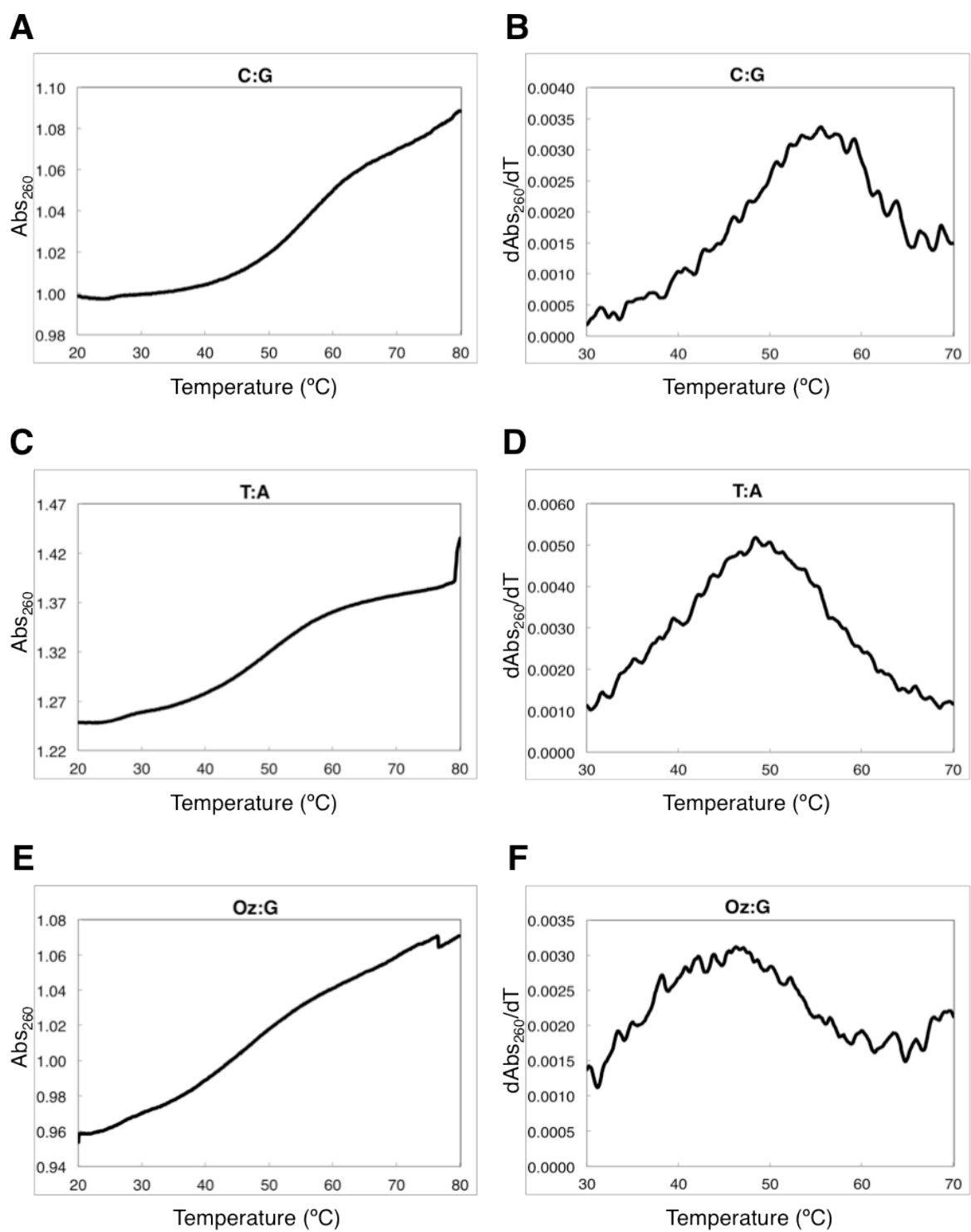
さらに、Oz:G または Oz:A、Oz:C、Oz:T 塩基対を含む DNA 二本鎖の  $T_m$  値を熱変性実験により解析した。しかし、DNA ポリメラーゼによるプライマー伸長反応に用いたオリゴヌクレオチドの量は熱変性実験を行うには不十分であった。Oz を含むオリゴヌクレオチドの合成では、オリゴヌクレオチドの長さが短い程収量が増加する。そのため、3-1 および 3-2、3-3 におけるプライマー伸長反応とは異なった短い配列を熱変性実験に用いることにした。

DNA 二本鎖の  $T_m$  値の測定結果から、C:G 塩基対を含む場合は 55.1 °C であり (Table 10) (Fig.47A と 47B)、A:T 塩基対では 48.9 °C であった (Table 10) (Fig.47C と 47D)。これは、C:G 塩基対が A:T 塩基対よりも熱力学的に安定であるということを示しており、これは、一般にそれぞれの塩基対を形成する水素結合の数の差に起因するという十分に確立された事実である。

Oz:G 塩基対を含む DNA 二本鎖の  $T_m$  値は 45.7 °C であった (Table 10) (Fig.47E と 47F)。一方、Oz:A または Oz:C、Oz:T 塩基対を含む DNA 二本鎖の  $T_m$  値は、明らかに検出限界以下 ( $T_m$  値 < 40.0 °C) であったため (Table 10) (Fig.47G-L)、 $T_m$  値を決定できなかった。つまり、Oz:G 塩基対は他の Oz:A や Oz:C、Oz:T 塩基対よりも有意に熱力学的に安定であった。

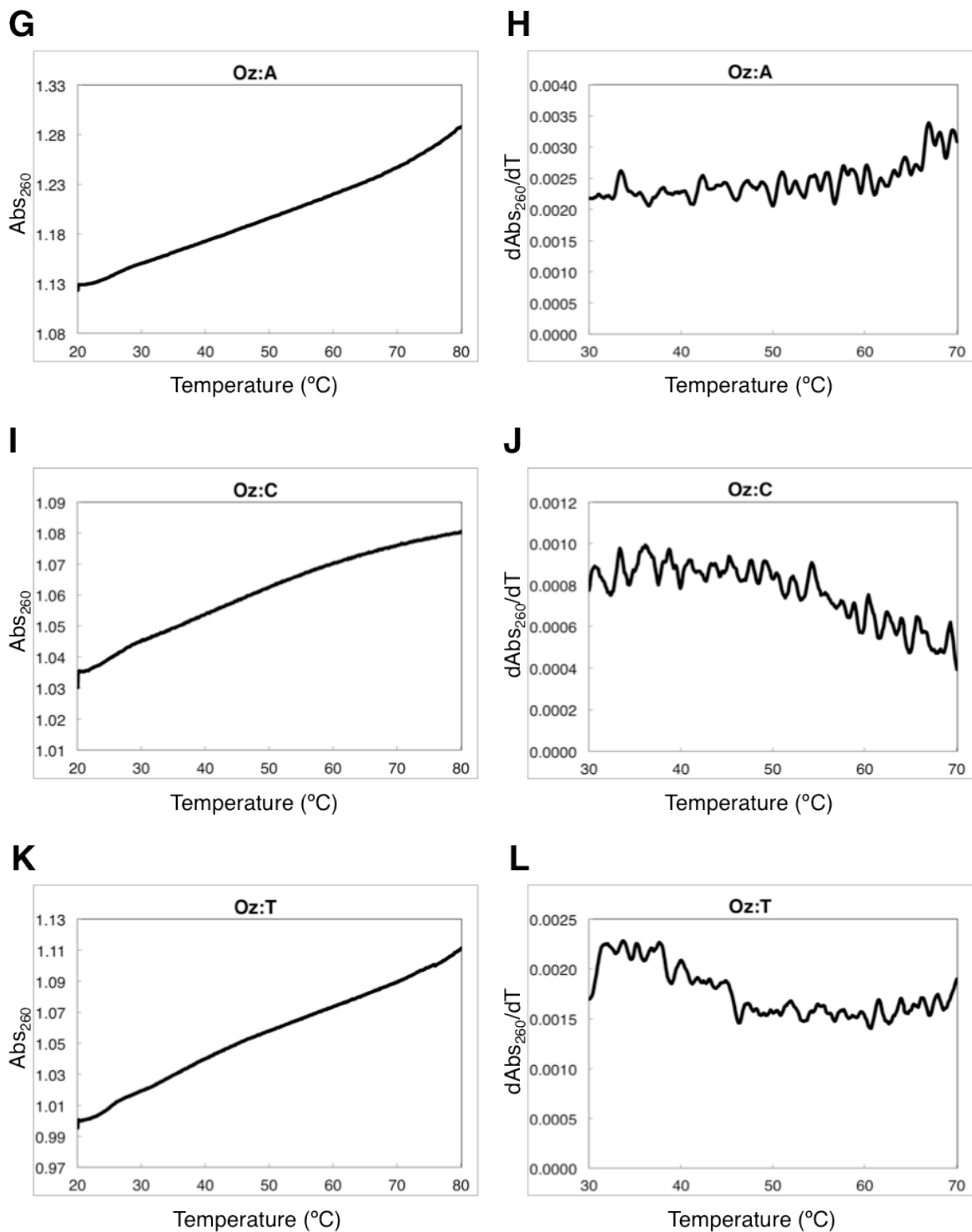
**Table 10** The  $T_m$  values of C:G, A:T, Oz:G, Oz:A, Oz:C and Oz:T.

base pair	$T_m$ value (°C)
C:G	55.1
A:T	48.9
Oz:G	45.7
Oz:A	< 40.0
Oz:C	< 40.0
Oz:T	< 40.0



**Fig.47 Cont.**

Fig.47 Cont.



**Fig.47** Melting curves of (A) C:G, (C) T:A, (E) Oz:G, (G) Oz:A, (I) Oz:C and (K) Oz:T 9-mer DNA duplexes at 4  $\mu$ M duplex concentration. The first derivative of the melting curve of (B) C:G, (D) T:A, (F) Oz:G, (H) Oz:A, (J) Oz:C and (L) Oz:T. Y-axis is the first derivative of absorbance at 260 nm with respect to temperature. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, J. Nucleic Acid, 2014, 178350, (2014) with permission from the Hindawi Publishing Corporation.

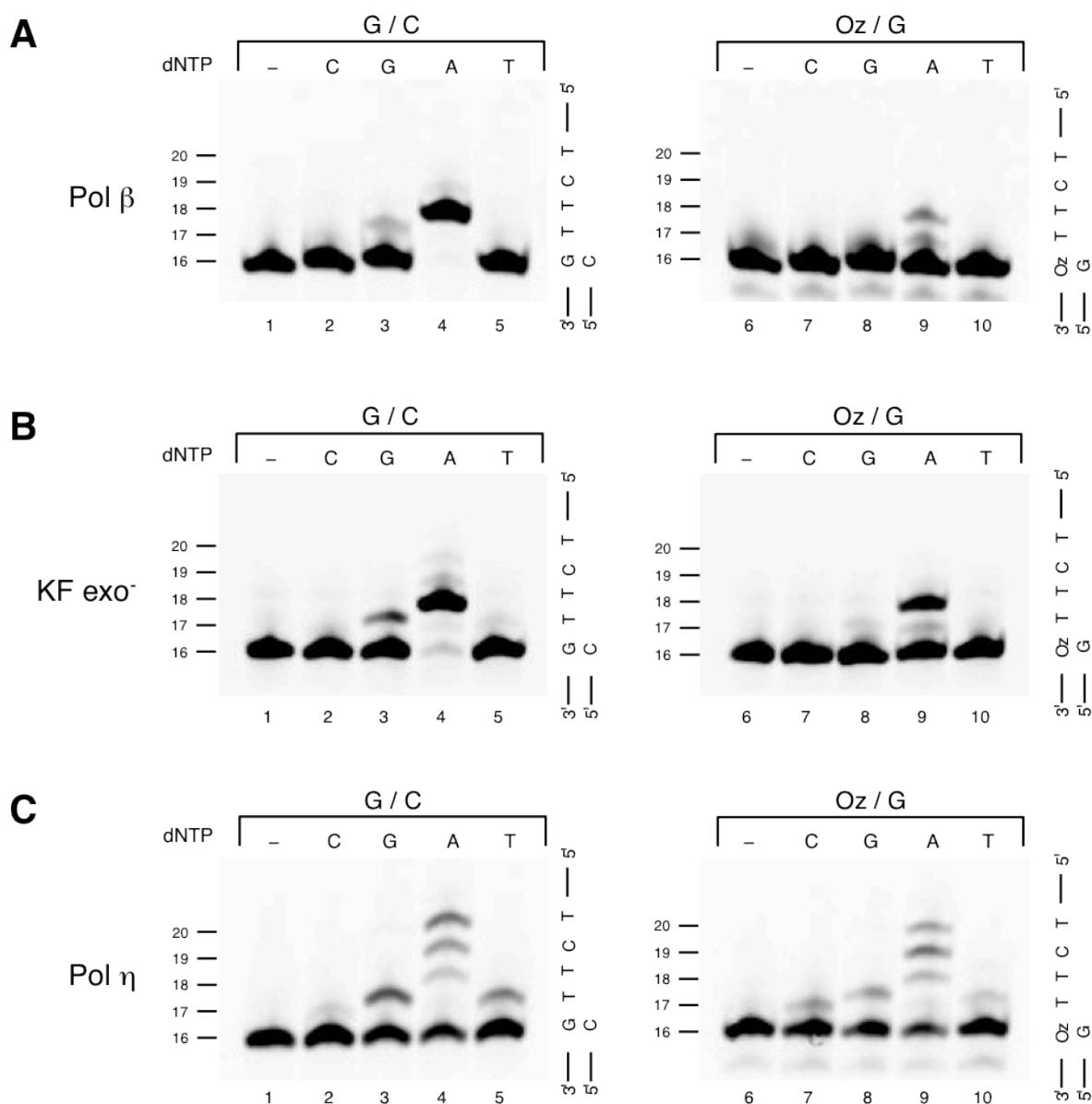


### 3-5. G または Oz の 5'側隣接塩基に対する塩基取り込み解析

プライマー伸長反応の解析から、hPol  $\beta$  や KF  $\text{exo}^-$ 、hPol  $\eta$  はプライマーの末端が Oz:A や Oz:C、Oz:T 塩基対よりも Oz:G 塩基対の方が効率良く伸長しやすいことを明らかにした。しかし、損傷乗り越え DNA 合成において、正しい塩基が挿入されていることが重要である。そこで、hPol  $\beta$  や KF  $\text{exo}^-$ 、hPol  $\eta$  が Oz:G 塩基対形成後の DNA 複製過程において、塩基を正確に取り込むかどうかを明らかにするために、G や Oz の 5'側隣接塩基に対する塩基の取り込み解析を行った。DNA テンプレートとプライマーについては、プライマー伸長反応において最も効率良く伸長したプライマーの末端が G:C または Oz:G 塩基対となる組み合わせを用いた。

G を含む DNA テンプレートの場合、hPol  $\beta$  および KF  $\text{exo}^-$  は G に隣接する 3'-TT-5'に対して、dATP を取り込んだ (Fig.48A と 48B のレーン 4)。しかし、G に隣接する T に対する dGTP の誤取り込みも少しみられた (Fig.48A と 48B のレーン 3)。一方、hPol  $\eta$  は hPol  $\beta$  や KF  $\text{exo}^-$  とは異なり、3'-TTCT-5'に対して dATP が取り込まれていたことに加え、G に隣接する T に対して dGTP と dTTP も取り込まれていた (Fig.48C のレーン 3-5)。これは hPol  $\eta$  の特徴である誤りがちな複製を行う活性<sup>88-90</sup>) によって生じたと考えられる。

Oz を含む DNA テンプレートの場合でも、hPol  $\beta$  および KF  $\text{exo}^-$  は Oz に隣接する 3'-TT-5'に対して、dATP を取り込んだが (Fig.48A と 48B のレーン 9)、G を含む DNA テンプレートの場合に比べてその効率は低かった。hPol  $\eta$  についても G を含む DNA テンプレートの場合よりも効率が低かったが、取り込んだ塩基の種類は G を含む DNA テンプレートの場合と同様に 3'-TTCT-5'に対して dATP が、Oz に隣接する T に対して dGTP と dTTP が取り込まれていた (Fig.48C のレーン 8-10)。これに加え、hPol  $\beta$  および KF  $\text{exo}^-$  とは異なって hPol  $\eta$  は、Oz に隣接する T に対する dCTP の取り込みも見られた (Fig.48C のレーン 7)。以上から、hPol  $\beta$  および KF  $\text{exo}^-$  は Oz を乗り越えた後の伸長反応においては、正しい塩基が取り込まれていた。これに対して、hPol  $\eta$  は DNA テンプレートが Oz の場合のみだけでなく、G の場合でも誤りがちな複製が行われていた。



**Fig.48** Nucleotide incorporation opposite the bases adjacent to G or Oz by hPol  $\beta$  (A), KF exo<sup>-</sup> (B), or hPol  $\eta$  (C). Left panels of (A), (B), and (C) show the control, which was extension of primers containing C opposite an undamaged G in the template. Right panels of (A), (B), and (C) show the extension of primers containing G opposite Oz in the template. The amount of hPol  $\beta$  or hPol  $\eta$  was 25 mU or 11.5 ng; the amount of KF exo<sup>-</sup> was 25 mU for the left panel, or 250 mU for the right panel. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *J. Nucleic Acid*, 2014, 178350, (2014) with permission from the Hindawi Publishing Corporation.

#### 第4節 結論

以前の研究結果<sup>20, 21)</sup> および第4章の解析結果から、DNAポリメラーゼがdGTP以外にOzに対して取り込む塩基はDNAポリメラーゼごとに異なっていることが明らかとなった。また、第2章に示したように量子化学計算によって、Ozはグアニンと安定な塩基対を形成することが予測された。本章では、Pol  $\beta$  およびKF  $\text{exo}^-$ 、Pol  $\eta$  を用いたDNAポリメラーゼ反応解析から、DNA伸長反応中における、Oz:GとOz:A、Oz:C、Oz:T塩基対間の安定性の違いを明らかにすることを試みた。

Pol  $\beta$  およびKF  $\text{exo}^-$ 、Pol  $\eta$  に共通して、Oz:G塩基対を越えて伸長する効率の方がOz:CやOz:A、Oz:Tの場合よりも高いことを見いだした。さらに、Oz:GまたはOz:C、Oz:A、Oz:T塩基対を1つ含む二本鎖の $T_m$ 値から、熱力学的な安定性においてもOz:G塩基対はOz:CやOz:A、Oz:T塩基対よりも有意に高いことが明らかとなった。

以上より、DNAポリメラーゼ反応および熱変性に関する実験において、Oz:Gが安定な塩基対であることを示した。これらの結果は、以前の量子化学計算から得たOz:G塩基対がOz:A塩基対よりも安定であるという予測<sup>20)</sup>と一致していた。つまり、本研究結果は、G:C-C:Gトランスバージョンに関与するグアニン酸化損傷としてのOzの重要性をより強化するものである。今後、Oz:G塩基対の構造解析が行われることで、より詳細にOz:G塩基対の安定性が明らかになるだろう。

## 第6章

### Oz 連続配列の DNA ポリメラーゼ反応に対する影響

(本章の内容に関しては J. Biochem., 159, 323-329 (2016) に発表済み)

#### 第1節 背景

前章までは、1つの Oz に着目し、塩基の取り込みや乗り越え DNA 合成について解析してきた。グアニンは連続配列として存在する場合、グアニン単体で存在する場合よりも、酸化電位が低下し、一電子酸化によって酸化されやすくなる<sup>91,92)</sup>。また、グアニン連続配列のグアニンは一電子酸化だけでなく、一重項酸素によっても酸化されることが明らかとなっている<sup>93)</sup>。つまり、高酸化条件下において、酸化され続けた場合、グアニン連続配列からグアニン酸化損傷の連続配列が生成する。このグアニンの連続配列は *K-ras* 遺伝子やテロメア配列といった重要なゲノム領域にも存在しており、DNA 複製過程における、グアニン酸化損傷の連続配列の影響を解析することが必要とされている。実際に、DNA 複製過程における 8-oxoG の連続配列の影響を解析した報告があり、8-oxoG 連続配列は Pol  $\alpha$  や Pol  $\beta$  の DNA 合成を阻害することが明らかとなっている<sup>94,95)</sup>。

一本鎖および二本鎖 DNA 中のグアニン連続配列 (5'-GG-3') を酸化させた際に、Iz 連続配列 (5'-IzIz-3') が生成することが既に明らかとなっている<sup>13)</sup>。Iz は徐々に加水分解されて Oz を生成することから<sup>11)</sup>、この Iz 連続配列から Oz 連続配列 (5'-OzOz-3') が容易に生成することは自明である。また、Iz はグアニンだけでなく 8-oxoG の酸化によっても生成することも考慮すると、Oz 単体だけでなく Oz 連続配列の生物学的な影響は無視できないと考えられる。

第4章および過去の報告から、DNA 複製の中心的役割を担う Pol  $\alpha$  や Pol  $\delta$ 、Pol  $\epsilon$  といった高い忠実度をもった DNA ポリメラーゼでも Oz が1つの場合は、乗り越えて DNA を合成できることが明らかとなっている。しかしながら、単体の場合には DNA 合成を阻害しないような Oz でも、連続配列として生成した場合は、Oz が1つの場合と比べると DNA 合成を阻害しやすくなるような重篤な損傷となることが予測される。そこで、本章では KF exo および calf thymus Pol (ctPol)  $\alpha$ 、hPol  $\beta$ 、yPol  $\zeta$ 、hPol  $\eta$ 、hPol  $\iota$ 、hPol  $\kappa$ 、

yREV1 が Oz 連続配列を乗り越えて DNA を合成できるかどうかを解析した。また、これらの DNA ポリメラーゼが Oz 連続配列に対して塩基を取り込んだ場合は、その塩基の種類を解析した。これまでの Oz に関する塩基の取り込み解析および損傷乗り越え DNA 合成反応解析から、DNA ポリメラーゼがヒト由来か酵母由来かどうかといった種差が影響しないことが既に明らかとなっていたため、本章では上記に示した DNA ポリメラーゼを用い、各 DNA ポリメラーゼの機能については Table 11 に示した。

**Table 11** The function of DNA polymerases used in this chapter <sup>42, 43</sup>).

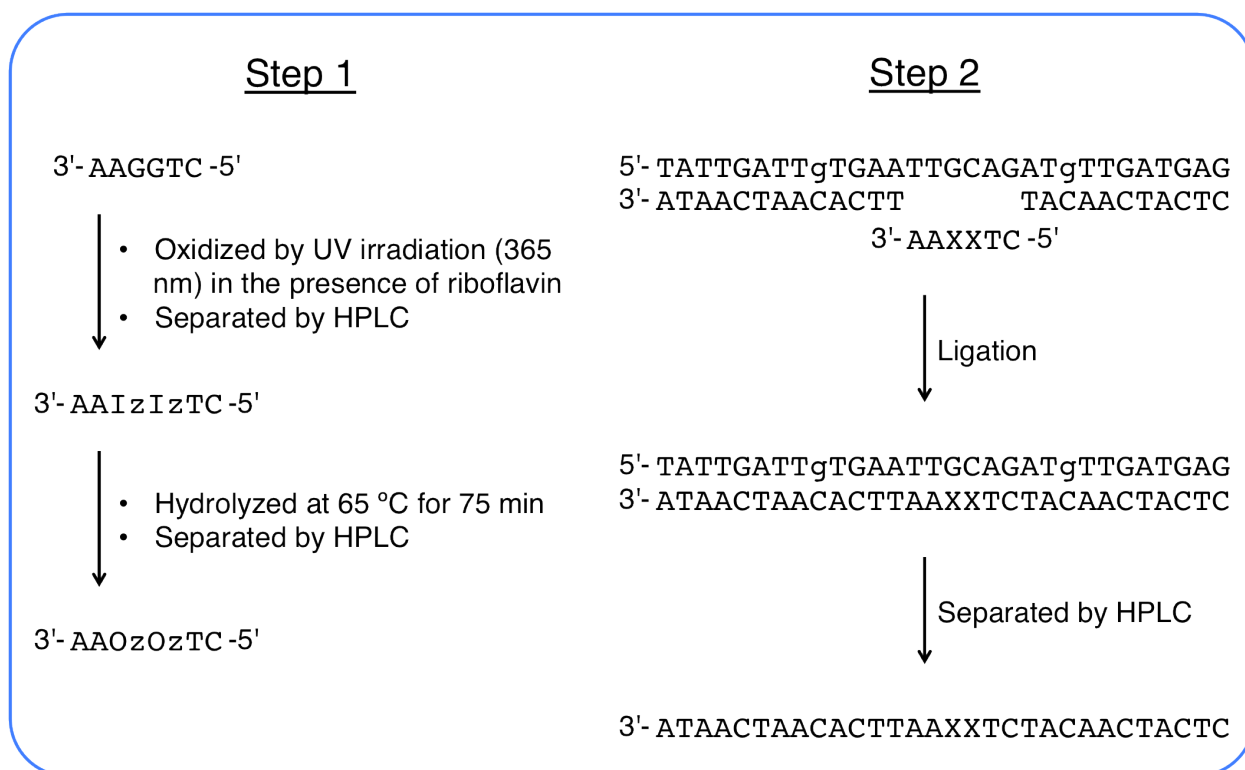
DNA polymerase	
Pol $\alpha$	Replicative DNA polymerases
Pol $\beta$	DNA polymerases involved in DNA repair
KF $\text{exo}^-$	
Pol $\zeta$	DNA polymerases involved in translesion synthesis
Pol $\eta$	
Pol $\iota$	
Pol $\kappa$	
REV1	

## 第2節 実験方法

### 2-1. オリゴヌクレオチド

DNA ポリメラーゼ反応に用いた Oz 連続配列を含む 30-mer のオリゴヌクレオチド (5'-CTCATCAACATCTXXAATTCACAATCAATA-3', XX = OzOz) は2つの段階に分けて調製した (Fig.49)。まず、過去の文献<sup>13)</sup>を参考に、グアニン連続配列を含む 6-mer のオリゴヌクレオチド (5'-CTGGAA-3') からリボフラビン存在下での UV (365 nm) 照射の光酸化により Iz 連続配列を含む 6-mer のオリゴヌクレオチド (5'-CTIzIzAA-3') を調製した。その後、65 °C で 75 分間加熱することで Oz 連続配列を含む 6-mer のオリゴヌクレオチド (5'-CTOzOzAA-3') へと加水分解した<sup>11)</sup>。次に、Oz 連続配列を含む 6-mer のオリゴヌクレオチド、および 13-mer オリゴヌクレオチド (5'-TTCACAATCAATA-3') を T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (New England Biolabs, Ipswich, MA) を用いて 5'末端をリン酸化した。そして、Oz 連続配列を含む 6-mer のオリゴヌクレオチドの 5'側に 11-mer オリゴヌクレオチド (5'-CTCATCAACAT-3') を、3'側にリン酸化した 13-mer オリゴヌクレオチドを T4 DNA リガーゼ (Takara Bio, Otsu, Japan) を用いてライゲーションした。その際、テンプレートとして 30-mer DNA-RNA キメラオリゴヌクレオチド (5'-TATTGATTgTGAATTGCAGATgTTGATGAG-3', “g” は 2'-デオキシグアノシンではなくリボ体のグアノシン) を用いた。最終的に、Oz 連続配列を含む 30-mer オリゴヌクレオチドは HPLC を用いて単離し、time-of-flight mass spectrometer (Bruker Daltonics K.K., Yokohama, Japan)により分子量から Oz 連続配列を含む 30-mer オリゴヌクレオチドであることを確認した。

DNA ポリメラーゼ反応のコントロールとして用いたグアニン連続配列または CPD を含む 30-mer のオリゴヌクレオチド (XX = GG または CPD) および 5'末端を Alexa680 で標識化されたオリゴヌクレオチド(5'-\*TATTGATTGTGAATT-3') は日本バイオサービスより購入した。



**Fig.49** Outline of the preparation of 30-mer DNA containing the OzOz lesion. XX represents OzOz. “g” represents guanosine, not deoxyguanosine. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, J. Biochem., 159, 323-329 (2016) with permission from the Oxford University Press.

## 2-2. DNA ポリメラーゼ

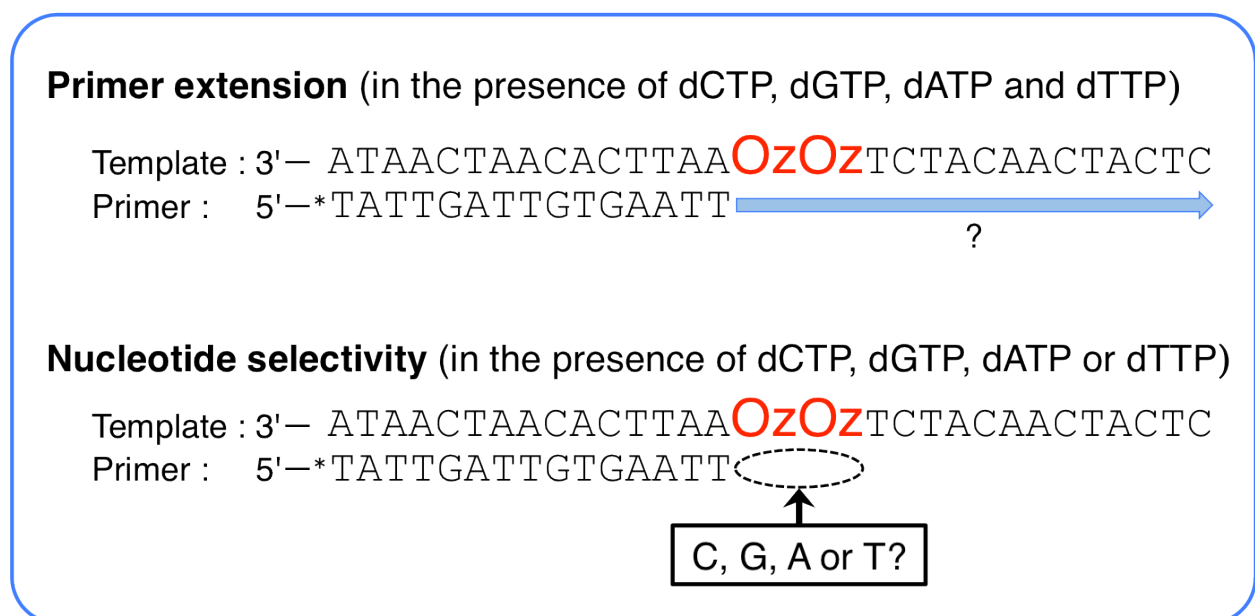
KF *exo*<sup>-</sup>は Fermentas から、*ctPol α* および *hPol β* は CHIMERx から、*yPol ζ* および *yREV1* は Enzymax から、購入した。

また、*hPol η* は第 5 章と、*hPol ι* および *hPol κ* は第 4 章と同様の方法で作製した。

## 2-3. DNA ポリメラーゼ反応

*yPol ζ* および *hPol ι*、*hPol κ*、*yREV1* の DNA ポリメラーゼ反応は第 4 章と、KF *exo*<sup>-</sup> および *hPol β*、*hPol η* の DNA ポリメラーゼ反応は第 5 章と同様の方法で解析した。また、*ctPol α* の DNA ポリメラーゼ反応解析について次に示す。*ctPol α* の反応液の組成

は 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 45 mM KCl, 10 mM DTT, 250 μg/ml BSA, 5% glycerol である。ctPol α の反応液は 100 fmol の DNA テンプレートおよび 50 fmol の 5'末端を Alexa680 で標識化したプライマーを含んでいる。それぞれの dNTP および DNA ポリメラーゼの濃度はそれぞれの図の説明文中に記載した。また、プライマー伸長反応および塩基の取り込み解析に用いた DNA テンプレートとプライマーおよび dNTP の組み合わせは Fig.50 に示した。以上を含む反応液は全量を 5 μl とし、ctPol α の反応液を 37 °C で 30 分間反応し、5 μl の stop バッファーを加えて反応を停止させた。そして、8 M 尿素を含む 16%ポリアクリルアミドゲルと 1×TBE バッファーを用いて、それぞれの反応後のサンプルのうち 2.5 μl を 30 W で 90 分間電気泳動を行い分離した。電気泳動後、分離したゲルは Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) を使用して解析した。



**Fig.50** Experimental design of DNA polymerase assay. The 15-mer primer is labelled with Alexa 680 indicated by '\*'.  
 101

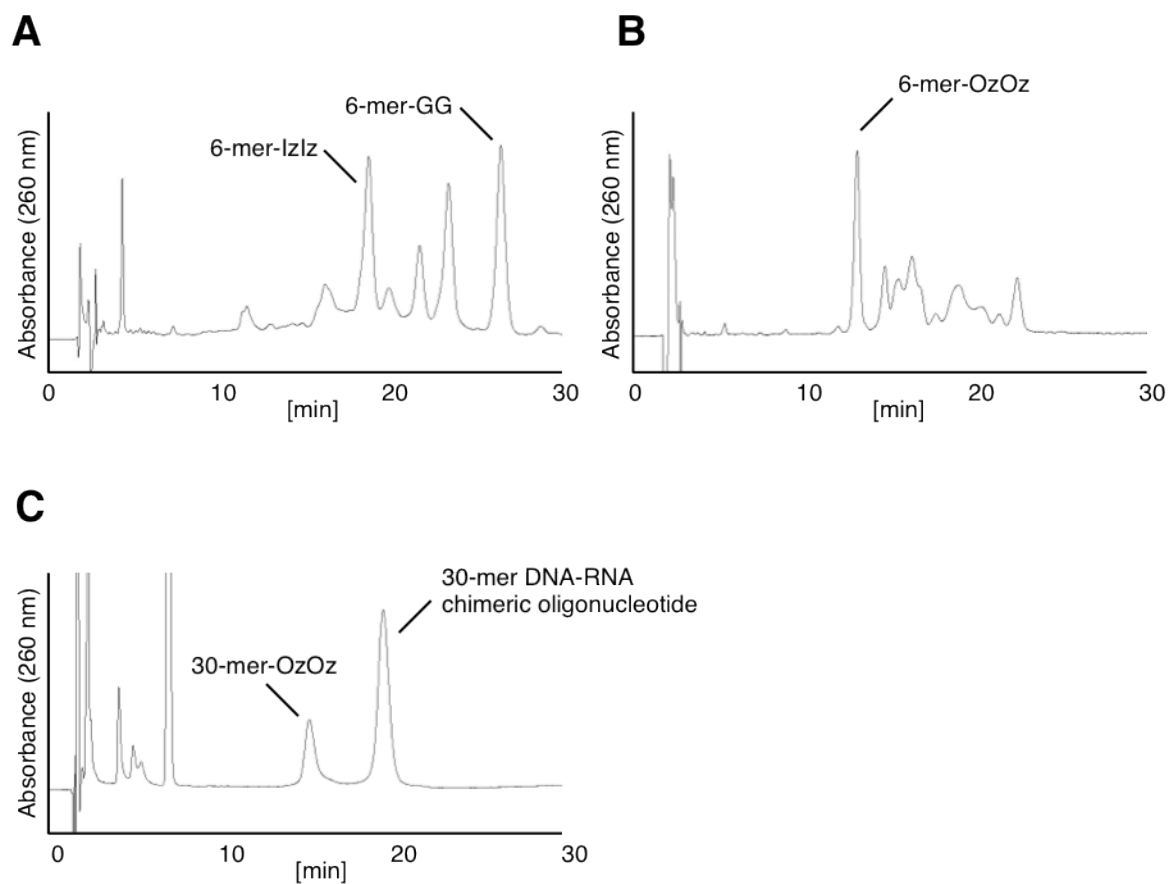


### 第3節 結果と考察

#### 3-1. Oz 連続配列を含む 30-mer の DNA テンプレートの調製

まず、過去の文献<sup>13)</sup>を参考に、グアニン連続配列を含む 6-mer のオリゴヌクレオチドから Iz 連続配列を含む 6-mer のオリゴヌクレオチドを調製した後 (Fig.51A)、熱分解により Oz 連続配列を含む 6-mer のオリゴヌクレオチドを得た (Fig.51B)。Oz 連続配列を含む 6-mer のオリゴヌクレオチドの収率は 1.3%であった。その後、Oz 連続配列を含む 6-mer のオリゴヌクレオチドの 5'側に 11-mer、3'側に 13-mer のオリゴヌクレオチドをライゲーションすることで、Oz 連続配列を含む 30-mer のオリゴヌクレオチドを作製し (Fig.48C)、DNA ポリメラーゼ反応解析に用いた。また、出発物質であるグアニン連続配列を含む 6-mer のオリゴヌクレオチドからみた Oz 連続配列を含む 30-mer のオリゴヌクレオチド収率は、0.12%であった。

Oz 連続配列を含む 6-mer のオリゴヌクレオチドの 5'側に 11-mer、3'側に 13-mer のオリゴヌクレオチドを連結するには、30-mer の DNA-RNA キメラオリゴヌクレオチドをテンプレートとして用いた。当初、30-mer の DNA からなるオリゴヌクレオチドを DNA テンプレートとして用いたが、連結後の Oz 連続配列を含む 30-mer のオリゴヌクレオチドとこの DNA テンプレートを HPLC では分離できなかった。そこで、テンプレートのオリゴヌクレオチドの一部に RNA を含むキメラオリゴヌクレオチドを用いて分離を試みたところ、HPLC にて Oz 連続配列を含む 30-mer のオリゴヌクレオチドと分離できることが明らかになった (Fig. 51C)。そのため、本研究では 30-mer の DNA-RNA キメラオリゴヌクレオチドを DNA 連結時のテンプレートとして用いた。



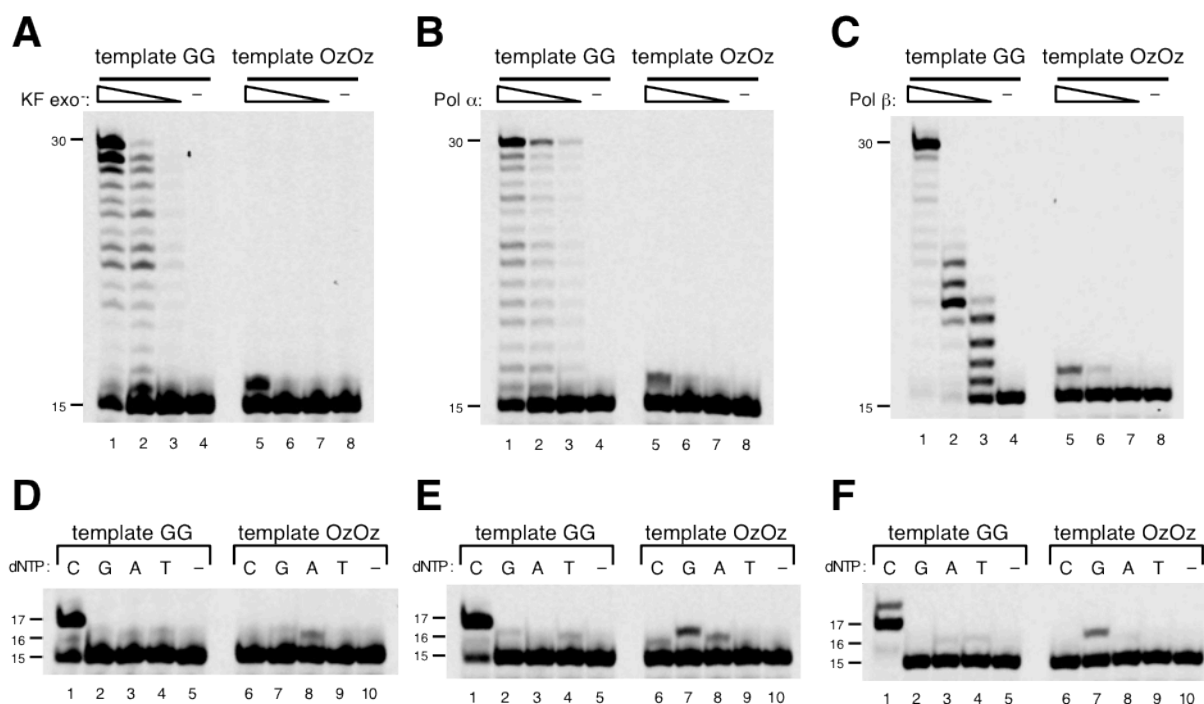
**Fig.51** HPLC analysis for preparation of 30-mer DNA template containing the OzOz lesion. HPLC isolated (A) 6-mer-IzIz, (B) 6-mer-OzOz, or (C) 30-mer-OzOz. Sample analyzed by HPLC with a CHEMCOBOND 5-ODS-H column (Chemcoplus, Osaka, Japan, 5 mm, 150 × 4.6 mm, elution with a solvent mixture of 50 mM TEAA (pH 7), (A, B) 6.2-7.2 % during 0-30 min, (C) 10-10.5% during 0-30 min, CH<sub>3</sub>CN at a flow rate of 1.0 ml min<sup>-1</sup>) and monitored at 260 nm absorbance.

### 3-2. KF exo<sup>-</sup>および ctPol $\alpha$ 、hPol $\beta$ の Oz 連続配列に対する DNA ポリメラーゼ反応解析

KF exo<sup>-</sup>および ctPol  $\alpha$ 、hPol  $\beta$  が Oz 連続配列を乗り越えて DNA を合成できるかどうか解析した。コントロールとして用いたグアニン連続配列を含む DNA テンプレートの場合は、KF exo<sup>-</sup>および ctPol  $\alpha$ 、hPol  $\beta$  は効率良く全長まで伸長していた (Fig.52A-C のレーン 1-3)。一方、Oz 連続配列を含む DNA テンプレートの場合は、KF exo<sup>-</sup>および ctPol  $\alpha$ 、hPol  $\beta$  全てにおいて、3'側の Oz に対する 1 塩基の取り込みのみ検出されており、この後の伸長反応は停止していた (Fig.52A-C のレーン 5)。

次に、KF exo<sup>-</sup>および ctPol  $\alpha$ 、hPol  $\beta$  が 3'側の Oz に対して取り込んだ 1 塩基を解析した。その結果、KF exo<sup>-</sup>は 3'側の Oz に対して dATP を優位に取り込んだ (Fig.52D のレーン 8)。一方、ctPol  $\alpha$  は 3'側の Oz に対して dGTP を優位に取り込んでおり (Fig.52E のレーン 7)、dGTP の取り込み効率よりは劣るが dATP と dCTP の取り込みもみられた (Fig.52E のレーン 6 と 8)。また、hPol  $\beta$  は dGTP を優位に取り込んでいた (Fig.52F のレーン 7)。以前の 1 つの Oz に対する塩基の取り込み解析では、KF exo<sup>-</sup>は Oz に対して dGTP と dATP を、ctPol  $\alpha$ 、hPol  $\beta$  は dGTP を優位に取り込むことが明らかとなっており<sup>20)</sup>、本研究結果から、Oz 連続配列の 3'側の Oz に対する塩基の取り込みにおいても、取り込む塩基の種類が似ていることが明らかとなった。

KF exo<sup>-</sup>と Pol  $\alpha$ 、Pol  $\beta$  は DNA の複製や修復に関与する DNA ポリメラーゼであり<sup>43)</sup>、これらの DNA ポリメラーゼ活性は中程度から高い忠実度をもっている。一般的に、KF exo<sup>-</sup>や Pol  $\alpha$ 、Pol  $\beta$  による DNA 合成は損傷によって影響を受けやすい。以前の研究結果から、Oz が 1 つの場合は KF exo<sup>-</sup>や Pol  $\alpha$ 、Pol  $\beta$  による DNA 合成が停止はしないことが明らかとなっていたが<sup>20)</sup>、Oz 連続配列ではこれらの DNA 合成が損傷部位で停止してしまった。このことから、DNA の複製や修復過程において、Oz の連続配列は DNA ポリメラーゼによる DNA 合成を停止する、より重篤な損傷となることが示唆された。



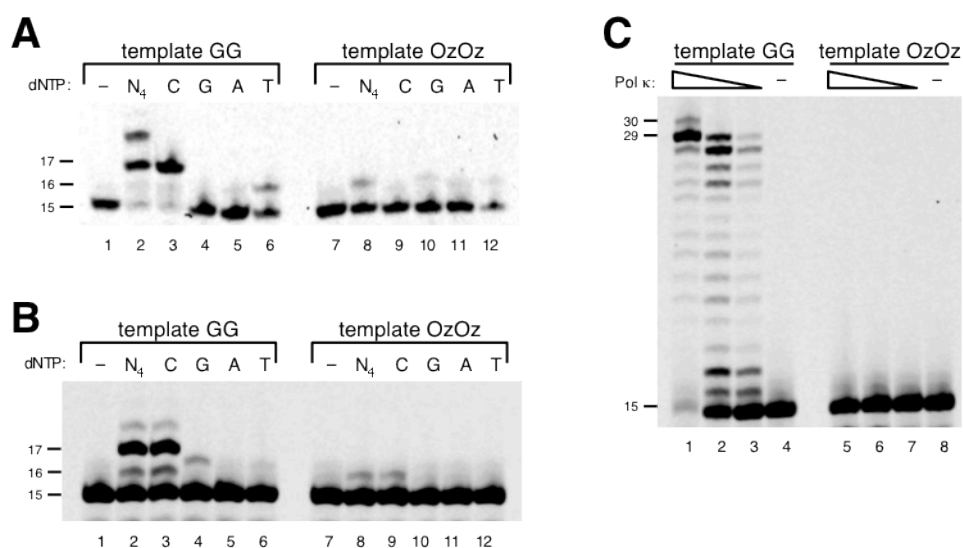
**Fig.52** DNA synthesis by KF exo<sup>-</sup>, ctPol α or hPol β across OzOz. (A-C) Primer extension across OzOz by KF exo<sup>-</sup> (A), ctPol α (B), or hPol β (C). Decreasing amounts of KF exo<sup>-</sup> (250 μU in lanes 1 and 5, 25 μU in lanes 2 and 6, 2.5 μU in lanes 3 and 7), ctPol α (100 mU in lanes 1 and 5, 33 mU in lanes 2 and 6, 10 mU in lanes 3 and 7) or hPol β (25 mU in lanes 1 and 5, 2.5 mU in lanes 2 and 6, 250 μU in lanes 3 and 7), was incubated with template (containing GG in lanes 1-4, containing OzOz in lanes 5-8) and 100 μM of each of the four dNTPs. Lanes 4 and 8 contained no enzyme as negative controls. (D-F) Nucleotide selectivity of KF exo<sup>-</sup> (D), ctPol α (E) or hPol β (F) opposite OzOz. KF exo<sup>-</sup> (250 μU), ctPol α (100 mU) or hPol β (2.5 mU) was incubated with template (containing GG in lanes 1-5, or OzOz in lanes 6-10) and 100 μM of a single dNTP (N = C, G, A, or T) (lanes 1-4 and 6-9). Lanes 5 and 10 contained no enzyme as negative controls. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, J. Biochem., 159, 323-329 (2016) with permission from the Oxford University Press.

### 3-3. hPol $\iota$ および hPol $\kappa$ 、yREV1 の Oz 連続配列に対する DNA ポリメラーゼ反応解析

hPol  $\iota$  および hPol  $\kappa$ 、yREV1 が Oz 連続配列を乗り越えて DNA 合成を行えるかどうかを解析した。第 4 章から hPol  $\iota$  と yREV1 は 1 つの Oz に対して一塩基のみ取り込み、その後は伸長しないことが明らかとなっている。そこで、hPol  $\iota$  と yREV1 は Oz 連続配列に対しても一塩基のみ取り込むことが予測されるため、Oz 連続配列の 3'側の Oz に対する塩基の取り込みを解析した。その結果、hPol  $\iota$  および yREV1 は、コントロールであるグアニン連続配列の 3'および 5'側の G に対して dCTP を効率的に取り込んだが (Fig.53A と 53B のレーン 3)、Oz 連続配列に対しては 3'側の Oz に対してさえ一塩基を少し取り込むのみであった (Fig.53A と 53B のレーン 8)。一方、hPol  $\kappa$  はコントロールであるグアニン連続配列を含む DNA テンプレートをを用いた場合には、全長または全長の一塩基手前まで伸長したのに対して (Fig.53C のレーン 1-3)、OzOz 連続配列を含む DNA テンプレートをを用いた場合は、全く塩基の取り込みが検出されなかった (Fig.53C のレーン 5-7)。

hPol  $\iota$  は Oz 連続配列の 3'側の Oz に対してわずかに dGTP や dATP、dTTP を取り込んだ (Fig.53A のレーン 9-12)。一方、yREV1 は Oz 連続配列の 3'側の Oz に対して低効率ながら dCTP を取り込んだ (Fig.53B のレーン 9)。Oz 連続配列の 3'側の Oz に対する塩基の取り込み効率はグアニン連続配列の場合と比較すると非常に低かった (Fig.53A および 53B のレーン 3-6 とレーン 9-12 を比較)。しかし、第 4 章より hPol  $\iota$  は Oz に対して全ての塩基を取り込み、yREV1 は dCTP を優位に取り込んだことから、hPol  $\iota$  と yREV1 が Oz 連続配列に対して取り込む塩基の傾向は一致していた。

Pol  $\iota$  および Pol  $\kappa$ 、REV1 は損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼとして知られており<sup>43, 96)</sup>、損傷塩基によって DNA の複製を担う DNA ポリメラーゼによる DNA 合成が停止した場合に、損傷塩基を乗り越えて DNA 合成を担う重要な役割を担っている。第 4 章の結果のように、Pol  $\iota$  および Pol  $\kappa$ 、REV1 は 1 つの Oz に対して中程度の効率で塩基を取り込み、Pol  $\kappa$  は 1 つの Oz を乗り越えて全長近くまで DNA を合成できることを明らかにしている。にもかかわらず、Pol  $\iota$  および Pol  $\kappa$ 、REV1 は Oz 連続配列の 3'側または 5'側の Oz 部位で DNA 合成反応が停止したことから、Oz 連続配列は DNA の複製や修復に関与する DNA ポリメラーゼに加え、いくつかの損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼによる DNA 合成も停止する非常に重篤な損傷であることが示唆された。



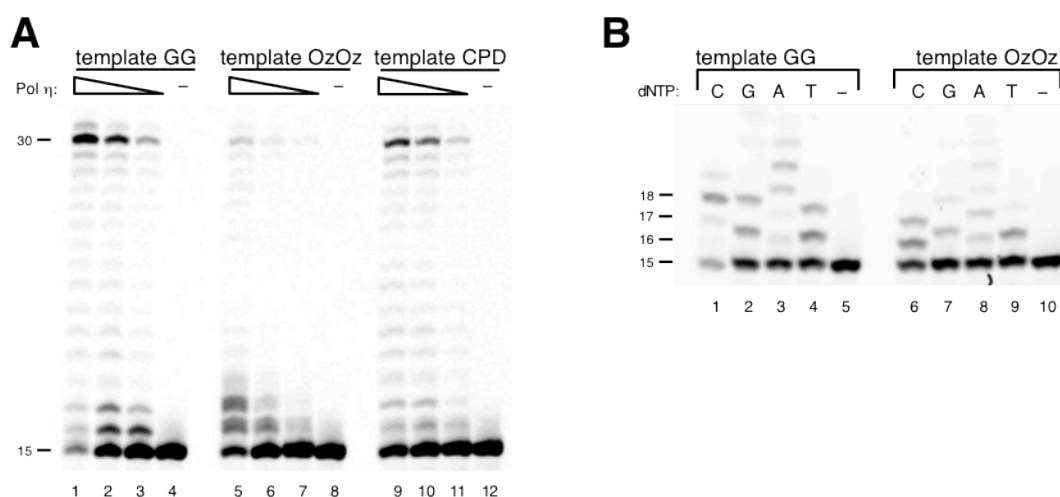
**Fig.53** DNA synthesis with hPol  $\iota$ , hPol  $\kappa$ , or yREV1 across OzOz. (A, B) Primer extension across OzOz and nucleotide incorporation opposite OzOz by hPol  $\iota$  (A) or yREV1 (B). hPol  $\iota$  (0.5  $\mu$ g) or yREV1 (4.2 ng) was incubated with template (containing GG in lanes 1-6, containing OzOz in lanes 7-12) and 100  $\mu$ M of each of the four dNTPs (lanes 2 and 8) or 100  $\mu$ M of a single dNTP (N = C, G, A, or T) (lanes 3-6 and 9-12). Lanes 1 and 7 contained no enzyme as negative controls. (C) Primer extension across OzOz by hPol  $\kappa$ . Decreasing amounts of hPol  $\kappa$  (31 ng in lanes 1 and 5, 9.2 ng in lanes 2 and 6, 3.1 ng in lanes 3 and 7) were incubated with template (containing GG in lanes 1-4, containing OzOz in lanes 5-8) and 100  $\mu$ M of each of the four dNTPs. Lanes 4 and 8 contained no enzyme as negative controls. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *J. Biochem.*, 159, 323-329 (2016) with permission from the Oxford University Press.

### 3-4. hPol $\eta$ の Oz 連続配列に対する DNA ポリメラーゼ反応

Pol  $\eta$  も損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼとして知られており<sup>43,96</sup>、誤りがちな複製を行う活性があるが<sup>88-90</sup>、DNA を歪めるような損傷である CPD に関しては正確かつ効率的に乗り越えて DNA を合成できる<sup>88</sup>。また、1 つの Oz も乗り越えて DNA を合成できることが明らかとなっている<sup>21</sup>。そのため、KF exo<sup>-</sup>や Pol  $\alpha$ 、Pol  $\beta$ 、Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$ 、REV1 による DNA 合成を停止させる Oz 連続配列についても、Pol  $\eta$  は乗り越えて DNA を合成できると考えた。解析の結果、hPol  $\eta$  が Oz 連続配列を乗り越えて全長まで DNA を合成したバンドが検出されたが (Fig.54A のレーン 5-7)、その効率はグアニン連続配列や CPD を用いた場合に比べると非常に低かった (Fig.54A のレーン 5-7 とレーン 1-3 または 9-11 を比較)。また、hPol  $\eta$  による DNA 合成の多くは Oz 連続配列の 3'または 5'側の Oz 部位で停止しているものが多く検出された (Fig.54A のレーン 5)。

hPol  $\eta$  はグアニン連続配列の 3'および 5'側の G に対して dCTP だけでなく、dGTP や dATP、dTTP を取り込んでおり (Fig.54B のレーン 1-4)、Oz 連続配列の場合でも同様に、dCTP と dGTP、dATP、dTTP を取り込んでいた (Fig.54B のレーン 6-9)。また、グアニン連続配列の場合に比べると Oz 連続配列における塩基の取り込み効率は低かった (Fig.54B のレーン 1-4 と 6-9 を比較)。塩基の取り込み解析から、hPol  $\eta$  はグアニン連続配列と Oz 連続配列の両方において誤りがちな DNA 合成を行うことが明らかとなった。

本研究結果は、CPD のような歪んだ DNA テンプレートを乗り越えられる hPol  $\eta$  できえ、Oz 連続配列を乗り越えて DNA を合成することがかなり困難であることを示した。しかしながら、Pol  $\eta$  は Oz 連続配列の 3'の Oz だけでなく 5'側の Oz に対して塩基を取り込んだという点では、これまで解析した KF exo<sup>-</sup>や Pol  $\alpha$ 、Pol  $\beta$ 、Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$ 、REV1 とは大きく異なっていた。この結果は、Oz 連続配列によって DNA 複製が停止したとしても、Pol  $\eta$  が Oz 連続配列に対して塩基を取り込み、その後他の DNA ポリメラーゼにスイッチングすることで、DNA の複製が再び開始できる可能性があることを示した。



**Fig.54** DNA synthesis with hPol  $\eta$  across OzOz. (A) Primer extension across OzOz by hPol  $\eta$ . Decreasing amounts of hPol  $\eta$  (12 ng in lanes 1, 5, and 9, 4.0 ng in lanes 2, 6, and 10, 1.2 ng in lanes 3, 7, and 11) were incubated with template (containing GG in lanes 1-4, containing OzOz in lanes 5-8, containing CPD in lanes 9-12) and 100  $\mu$ M of each of the four dNTPs. Lanes 4, 8, and 12 contained no enzyme as negative controls. (B) Nucleotide selectivity of hPol  $\eta$  opposite OzOz. hPol  $\eta$  (4.0 ng) was incubated with template (containing GG in lanes 1-5, and OzOz in lanes 6-10) and 100  $\mu$ M of a single dNTP (N = C, G, A, or T) (lanes 1-4 and 6-9). Lanes 5 and 10 contained no enzyme as the negative control. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *J. Biochem.*, 159, 323-329 (2016) with permission from the Oxford University Press.

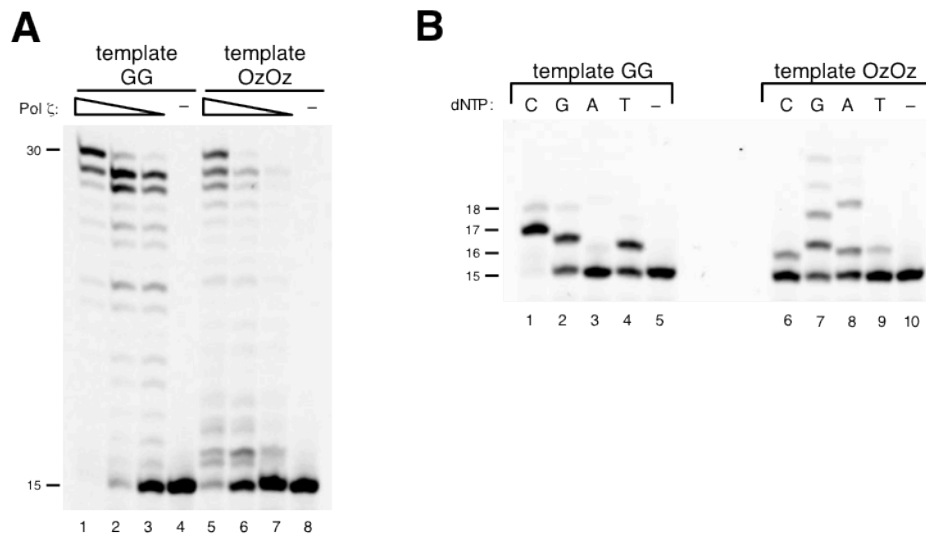


### 3-5. yPol $\xi$ の Oz 連続配列に対する DNA ポリメラーゼ反応

Pol  $\xi$  も損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼであるが<sup>43)</sup>、他の DNA ポリメラーゼと同様に Oz 連続配列で DNA 合成が停止するのか、それとも Oz 連続配列を乗り越えて DNA 合成を行うことができるのを解析した。驚くべきことに、yPol  $\xi$  は他の DNA ポリメラーゼとは異なり、Oz 連続配列を乗り越えて全長まで DNA 合成を効率良く行うことができた (Fig.55A のレーン 5-7)。しかし、コントロールとして用いたグアニン連続配列の場合と比較すると、Oz 連続配列を乗り越えた伸長効率は低かった (Fig.55A のレーン 5-7 とレーン 1-3 を比較)。

コントロールとして用いたグアニン連続配列を含む DNA テンプレートの場合、Pol  $\xi$  は dCTP のみ存在下でも 17-mer までプライマーを伸長し (Fig.55B のレーン 1)、dGTP や dTTP もグアニン連続配列の 3'側の G に対して取り込んだ (Fig.55B のレーン 2 と 4)。一方、Oz 連続配列の場合は、3'および 5'側の Oz に対する dGTP の取り込みが見られた (Fig.55B のレーン 7)。3'側の Oz に対する dCTP と dTTP の取り込みもみられたが (Fig.55B のレーン 6 と 9)、グアニン連続配列の場合よりも減少していた (Fig.55B のレーン 6 および 9 とレーン 1 および 4 を比較)。一方、Oz 連続配列に対する dATP の取り込みはグアニン連続配列の場合よりも増加していた。 (Fig.55B のレーン 8 とレーン 3 を比較)。これらの結果は、Pol  $\xi$  は Oz が 1 つでも連続配列でも関係なく、誤りがちな塩基の取り込みを行うことを示した。

Pol  $\xi$  は損傷ごとに DNA ポリメラーゼ活性様式が異なる損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼであり、UV による突然変異誘発において重要な役割を担っていることが知られている<sup>47, 54, 55)</sup>。また、第 4 章では、Pol  $\xi$  は 1 つの Oz に対して効率良く乗り越えて DNA を合成し、その効率は G を含む DNA テンプレートを用いた場合とほぼ同程度であることが明らかとなっている。以上から、Oz 連続配列を Pol  $\xi$  が効率良く乗り越えられることから、Oz が 1 つか連続しているかに関係なく、Pol  $\xi$  が Oz の損傷乗り越え DNA 合成において重要な役割を担っているのではないかと考えている。



**Fig.55** DNA synthesis with yPol  $\zeta$  across OzOz. (A) Primer extension across OzOz by yPol  $\zeta$ . Decreasing amounts of yPol  $\zeta$  (50 ng in lanes 1 and 5, 17 ng in lanes 2 and 6, 5.0 ng in lanes 3 and 7) were incubated with template (containing GG in lanes 1-4, containing OzOz in lanes 5-8) and 100  $\mu$ M of each of the four dNTPs. Lanes 4 and 8 contained no enzyme as negative controls. (B) Nucleotide selectivity of yPol  $\zeta$  opposite OzOz. yPol  $\zeta$  (17 ng) was incubated with template (containing GG in lanes 1-5, and OzOz in lanes 6-10) and 100  $\mu$ M of a single dNTP (N = C, G, A, or T) (lanes 1-4 and 6-9). Lanes 5 and 10 contained no enzyme as negative controls. Reproduced from Suzuki M. *et al.*, *J. Biochem.*, 159, 323-329 (2016) with permission from the Oxford University Press.

## 第4節 結論

KF  $\text{exo}^-$ や Pol  $\alpha$ 、Pol  $\beta$ 、Pol  $\iota$ 、REV1 は Oz 連続配列の 3' の Oz に対して一塩基取り込み、その効率はグアニン連続配列の場合よりも低く、Oz 連続配列の 5' の Oz に対する塩基の取り込みは強く阻害されることが明らかとなった (Table 12)。また、Oz 連続配列の 3' の Oz に対して取り込む塩基はそれぞれの DNA ポリメラーゼによって異なっていた。一方、Pol  $\kappa$  は Oz 連続配列の 3' の Oz できえ塩基の取り込みは見られず、Oz 連続配列は Pol  $\kappa$  による DNA 合成を完全に阻害することが明らかとなった (Table 12)。これらの結果から、Oz 連続配列は、損傷乗り越え DNA 合成を担う DNA ポリメラーゼも含め、多くの DNA ポリメラーゼによる DNA 合成を停止させる損傷であることが示された。

CPD を効率良く乗り越えて DNA を合成できる Pol  $\eta$  では、Oz 連続配列を乗り越えた DNA 合成も検出されたが (Table 12)、その多くは Oz 連続配列の 3' または 5' 側の Oz で停止していることが明らかとなった。以上から、Oz は連続配列として生成すると、変異原性の高さよりもむしろ、DNA 合成を阻害するような非常に重篤な損傷となることが示唆された。

これに対して、Pol  $\xi$  は Oz 連続配列に対して誤りがちな塩基を取り込むが、他の DNA ポリメラーゼとは異なり、Oz 連続配列を乗り越えて効率良く DNA を合成できることが明らかとなった (Table 12)。本研究結果は、Oz 連続配列を乗り越えた DNA 合成を効率良く行うことができる DNA ポリメラーゼとしての Pol  $\xi$  の可能性を初めて示した。これにより、Oz 連続配列が生成した場合に、他の DNA ポリメラーゼによる DNA 合成が Oz 連続配列部位で停止したとしても、そこへ Pol  $\xi$  がリクルートされると DNA 合成の停止を回避できることが示唆された。そのため、今後は Oz 連続配列に関する損傷乗り越え DNA 合成の詳細なメカニズムの解析が必要であると考えられる。

以上に加え、Oz 連続配列に対して取り込まれる塩基に着目した場合、Oz に対する dGTP の取り込みが REV1 と KF  $\text{exo}^-$ を除く全ての DNA ポリメラーゼに共通していた。これまでの研究報告<sup>20, 21)</sup> および第4章における Oz 単体に対する塩基の取り込みにおいても、REV1 を除く全ての DNA ポリメラーゼにおいて Oz に対する dGTP の取り込みが

共通していたことも考慮すると、Oz は特に真核生物において Oz が G:C-C:G トランスバージョンの発生に関与するのではないかと強く考えている。

**Table 12** Summary of chapter 6.

		Insertion		Extension
		opposite 3' Oz	opposite 5' Oz	
Replicative DNA polymerases	Pol $\alpha$	G, A, C	—	stall
DNA polymerases involved in DNA repair	KF $\text{exo}^-$	A	—	stall
	Pol $\beta$	G	—	stall
DNA polymerases involved in translesion synthesis	Pol $\zeta$	G, A, C, T	G, A	high efficiency
	Pol $\eta$	G, A, C, T	G, A, C, T	low efficiency
	Pol $\iota$	G, A, T	—	stall
	Pol $\kappa$	—	—	stall
	REV1	C	—	stall

## 第7章 総括

大腸がんや膵がん、肺がんといった各種のがんでは、がん遺伝子である *K-ras* 遺伝子の codon 12 において G:C-C:G トランスバージョンが生じており、G:C-T:A トランスバージョンとともに、*K-ras* 遺伝子の活性型変異の原因となっている (Table 1) <sup>6)</sup>。この G:C-C:G トランスバージョンの原因として、グアニンの酸化により生成する Oz や Gh/Ia、Sp といった、いくつかの DNA 損傷が知られている。その中でも、Oz はグアニンの酸化により直接生成する経路と 8-oxoG の酸化により生成する経路の 2 つの生成経路があり <sup>11-13)</sup>、DNA ポリメラーゼによる塩基の取り込み反応や損傷乗り越え DNA 合成反応の効率も良いことから <sup>20, 26)</sup>、Oz は Gh/Ia や Sp に比べると G:C-C:G トランスバージョンの発生の原因となる可能性が高いと考えられている。

第2章および第3章では、Oz および Gh/Ia、Sp とグアニンの塩基対の安定性やこれらの塩基対を含む二本鎖 DNA の歪み度合いについて計算科学を用いて構造の違いから考察した。塩基対の安定性は水素結合の数に依存しており、2 本の水素結合を形成すると予測される Oz:G 塩基対は、3 本の水素結合を形成すると予測される Ia:G や Sp:G 塩基対よりも不安定であることが示唆された。一方、*sp*<sup>3</sup>炭素をもたない Oz は *sp*<sup>3</sup>炭素をもつ Gh/Ia や Sp に比べると、二本鎖 DNA を歪めにくく、天然の DNA の構造と似ていることが予測された。つまり、その結果 Oz を含む損傷 DNA における DNA ポリメラーゼのひっかかりは Gh/Ia や Sp を含む損傷 DNA の場合に比べると少なく、実際の DNA ポリメラーゼ反応において塩基の取り込みや損傷乗り越え DNA 合成効率が良かったと考えられる。言い換えると、Oz に対してグアニンが取り込まれた場合は DNA 複製に与える影響は少なく、誤った情報のまま複製が継続され、他の損傷に比べると最終的に G:C-C:G トランスバージョンを生じやすくなる。そのため、Oz を含む損傷 DNA がどのような複製過程を経るのかを明らかにすることが必要とされる。

第4章および第6章の研究結果および以前の研究報告から、Oz に対するグアニンの取り込みが、Oz が単体の場合は REV1 を除く全ての DNA ポリメラーゼに共通しており、Oz 連続配列の場合は REV1 と KF *exo*<sup>-</sup>を除く DNA ポリメラーゼに共通していることが

明らかとなった。また、以上に加え、第 5 章では Oz がアデニンやシトシン、チミンではなくグアニンと最も安定な塩基対を形成できることを明らかにしており、DNA ポリメラーゼによる塩基の取り込み解析の結果とともに、Oz が G:C-C:G トランスバージョンの発生に関与する重要なグアニン酸化損傷であることを強く示唆している。そして、グアニン酸化損傷である Oz に対してシトシンを優先的に取り込む DNA ポリメラーゼは REV1 のみであることから、DNA 複製過程において、Oz が非常に強い変異原性を有していることが明らかとなった。さらに、Oz が連続配列として生成した場合、多くの DNA ポリメラーゼによる DNA 合成が阻害されやすく、Oz 連続配列が重篤な損傷となり得ることが明らかとなった。

本稿では DNA 複製を中心に DNA ポリメラーゼを用いた反応系に着目した研究を行ってきたが、生体内には損傷 DNA が修復するための酵素が存在し、この修復酵素によって突然変異を回避する機構が備えられている。しかし、損傷 DNA から生じる突然変異を回避するためには、正確に修復される必要があり、正確に修復されなかった場合はむしろ突然変異を誘発してしまう。例えば、以前、修復酵素であるヒト NEIL1 や NTH1 が Oz:C 塩基対から Oz を除去修復することを報告している。しかしながら、Oz:C 塩基対からのみではなく、Oz:A や Oz:G 塩基対からも同程度の効率で Oz が除去されてしまう<sup>80)</sup>。つまり、Oz:A や Oz:G 塩基対から Oz が除去されてしまった場合は、修復というよりはむしろ、Oz から生じる突然変異を固定化してしまうのである。以上から、Oz に対してシトシンが有意に取り込まれることは、Oz から生じる突然変異の回避機構を考える上で非常に重要となる。そこで、本研究より明らかとなった REV1 の Oz に対するシトシンの取り込みが、Oz を正確に修復する経路においても重要な役割を担っている可能性がある。

DNA ポリメラーゼによる損傷 DNA に対する正確な塩基の取り込みは点突然変異を引き起こさないという点で非常に重要であり、各損傷に対して正確に働く DNA ポリメラーゼを見出すことは、上述したような点突然変異の回避機構の解明だけでなく、特定のがんなどの疾患の原因などを明らかにする上でも重要となる。実際に、紫外線への暴露により非常に高い確率で皮膚がんを発症する、色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum ; XP) の V 型を引き起こす原因遺伝子として Pol  $\eta$  が同定されている<sup>97)</sup>。Pol  $\eta$  は CPD

を正確にかつ効率良く乗り越えることにより、紫外線の暴露により生成した DNA 損傷が原因となる DNA 複製の停止を回避できる。そのため、Oz をはじめとしたグアニン酸化損傷に対してシトシンを正確に取り込むことができる REV1 が欠損した場合に、突然変異の発生頻度の上昇が引き起こされるかどうかを解析することが次の検討課題である。さらに、REV1 にはシトシンを優位に取り込むだけでなく、他の Pol  $\zeta$  や Pol  $\eta$ 、Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$  といった他の損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼなどと相互作用できることから<sup>81-85)</sup>、足場タンパクとしても着目されている。つまり、REV1 と Oz だけの関係性ではなく、他の相互作用する DNA ポリメラーゼを含めた損傷乗り越え DNA 合成機構における Oz を含む損傷 DNA の複製を解析していく必要がある。

今後は、Oz の G:C-C:G トランスバージョンの発生への関与について、より詳細に検討するため、細胞を用いて Oz から生じる突然変異スペクトルの解析を行う必要がある。本研究を含め、これまでの研究では、Oz に対する各 DNA ポリメラーゼや各修復酵素の反応性について解析してきた。しかし、実際は細胞によって DNA ポリメラーゼや修復酵素の発現量や、発現している各酵素の種類などは異なるはずである。事実、Pol  $\zeta$  の mRNA は正常な精巣や骨格筋では発現量が高いが、骨髄細胞や肺がん細胞ではその発現が検出されなかったという報告がある<sup>98)</sup>。一方、REV1 の mRNA はその発現量にやや差はあるものの、脳や心臓、腎臓、肝臓をはじめとした 16 の臓器全てにおいて発現していることが報告されている<sup>99)</sup>。つまり、細胞内における変異スペクトル解析では、DNA ポリメラーゼや修復酵素といった様々な因子の影響を受けた合計値として結果が得られ、解析に用いる細胞ごとにその傾向は異なると予測される。そのため、様々な細胞を用いて Oz から生じる突然変異のスペクトルを解析することで、生体内における Oz の突然変異誘発能について詳細に解析することが必要となるだろう。そうして得られた結果と、本研究をはじめとした *in vitro* での研究結果を総合すると最終的に Oz から生じる点突然変異の発生機構が明らかになると考えられる。

なお、Oz は 8-oxoG のように電気化学的な検出ができず、多環式芳香族化合物のような特徴的な吸収もない。さらに、Oz は酸や塩基によってすみやかに分解されることもあり、Oz を特異的に検出する方法が全く確立されておらず、これまでに生体内から抽出した DNA サンプルを用いて Oz の検出を試みられた報告は 1 報しかない<sup>18)</sup>。そのため、

細胞や生体内において Oz を検出する方法の確立が急がれる。8-oxoG を認識する抗体が既に作製されていることから、Oz についても Oz を特異的に認識する抗体の作製が期待される。または、Oz 特異的に結合するアプタマーの開発により、Oz の検出方法が確立できるだろう。細胞や生体内における Oz の検出方法が確立されれば、Oz が生成しやすい臓器や条件などを明らかにすることができると考えられる。つまり、Oz により生じる点突然変異の発生機構や、その回避に関与する DNA ポリメラーゼや修復酵素に関する研究が進むと同時に、Oz の検出方法の確立により Oz が生成しやすい臓器や条件が明らかになれば、将来的にはがんをはじめとした点突然変異が原因となる疾患のうち、Oz が原因となる疾患の特定へとつながると考えられる。



## 参考文献

- (1) Steenken, S., and Jovanovic, S. V. (1997) How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.*, *119*, 617-618.
- (2) Kino, K., and Sugiyama, H. (2005) UVR-induced G-C to C-G transversions from oxidative DNA damage. *Mutat. Res.*, *571*, 33-42.
- (3) Khaled, H. M., Bahnassi, A. A., Zekri, A. R., Kassem, H. A., and Mokhtar, N. (2003) Correlation between p53 mutations and HPV in bilharzial bladder cancer. *Urol. Oncol.*, *21*, 334-341.
- (4) Maehira, F., Miyagi, I., Asato, T., Eguchi, Y., Takei, H., Nakatsuki, K., Fukuoka, M., and Zaha, F. (1999) Alterations of protein kinase C, 8-hydroxydeoxyguanosine, and K-ras oncogene in rat lungs exposed to passive smoking. *Clin. Chim. Acta*, *289*, 133-144.
- (5) Giaretti, W., Rapallo, A., Geido, E., Sciutto, A., Merlo, F., Risio, M., and Rossini, F. P. (1998) Specific K-ras2 mutations in human sporadic colorectal adenomas are associated with DNA near-diploid aneuploidy and inhibition of proliferation. *Am. J. Pathol.*, *153*, 1201-1209.
- (6) Sugio, K. (2009) *Ras* mutation 検出法のバリデーシヨンの現状. *がん分子標的治療*, *7*, 195-202.
- (7) Suzuki, M., Kino, K., and Miyazawa, H. (2012) グアニン酸化損傷に対する DNA ポリメラーゼの塩基選択性. *Rad. Biol. Res. Comm.*, *47*, 137-164.
- (8) Oda, Y., Uesugi, S., Ikehara, M., Nishimura, S., Kawase, Y., Ishikawa, H., Inoue, H., and Ohtsuka, E. (1991) NMR studies of a DNA containing 8-hydroxydeoxyguanosine. *Nucleic Acids Res.*, *19*, 1407-1412.
- (9) McAuley-Hecht, K. E., Leonard, G. A., Gibson, N. J., Thomson, J. B., Watson, W. P., Hunter, W. N., and Brown, T. (1994) Crystal structure of a DNA duplex containing 8-hydroxydeoxyguanine-adenine base pairs. *Biochemistry*, *33*, 10266-10270.
- (10) Lipscomb, L. A., Peek, M. E., Morningstar, M. L., Verghis, S. M., Miller, E. M., Rich, A.,

- Essigmann, J. M., and Williams, L. D. (1995) X-ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *92*, 719-723.
- (11) Cadet, J., Berger, M., Buchko, G. W., Joshi, P. C., Raoul, S., and Ravanat, J.-L. (1994) 2,2-Diamino-4-[(3,5-di-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-*erythro*-pentofuranosyl)amino]-5-(2*H*)-oxazolone: A novel and predominant radical oxidation product of 3',5'-di-*O*-acetyl-2'-deoxyguanosine. *J. Am. Chem. Soc.*, *116*, 7403-7404.
- (12) Luo, W., Muller, J. G., and Burrows, C. J. (2001) The pH-dependent role of superoxide in riboflavin-catalyzed photooxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine. *Org. Lett.*, *3*, 2801-2804.
- (13) Kino, K., Saito, I., and Sugiyama, H. (1998) Product analysis of GG-specific photooxidation of DNA via electron transfer: 2-aminoimidazolone as a major guanine oxidation product. *J. Am. Chem. Soc.*, *120*, 7373-7374.
- (14) Morikawa, M., Kino, K., Oyoshi, T., Suzuki, M., Kobayashi, T., and Miyazawa, H. (2013) Product analysis of photooxidation in isolated quadruplex DNA; 8-oxo-7,8-dihydroguanine and its oxidation product at 3'-G are formed instead of 2,5-diamino-4*H*-imidazol-4-one. *RSC Adv.*, *3*, 25694.
- (15) Morikawa, M., Kino, K., Oyoshi, T., Suzuki, M., Kobayashi, T., and Miyazawa, H. (2014) Analysis of guanine oxidation products in double-stranded DNA and proposed guanine oxidation pathways in single-stranded, double-stranded or quadruplex DNA. *Biomolecules*, *4*, 140-159.
- (16) Kino, K., and Sugiyama, H. (2001) Possible cause of G-C $\rightarrow$ C-G transversion mutation by guanine oxidation product, imidazolone. *Chem. Biol.*, *8*, 369-378.
- (17) Neeley, W. L., Delaney, J. C., Henderson, P. T., and Essigmann, J. M. (2004) *In vivo* bypass efficiencies and mutational signatures of the guanine oxidation products 2-aminoimidazolone and 5-guanidino-4-nitroimidazole. *J. Biol. Chem.*, *279*, 43568-43573.
- (18) Matter, B., Malejka-Giganti, D., Csallany, A. S., and Tretyakova, N. (2006) Quantitative analysis of the oxidative DNA lesion, 2,2-diamino-4-(2-deoxy- $\beta$ -D-*erythro*-

- pentofuranosyl)amino]-5(2*H*)-oxazolone (oxazolone), *in vitro* and *in vivo* by isotope dilution-capillary HPLC-ESI-MS/MS. *Nucleic Acids Res*, *34*, 5449-5460.
- (19) Ming, X., Matter, B., Song, M., Veliath, E., Shanley, R., Jones, R., and Tretyakova, N. (2014) Mapping structurally defined guanine oxidation products along DNA duplexes: influence of local sequence context and endogenous cytosine methylation. *J. Am. Chem. Soc.*, *136*, 4223-4235.
- (20) Kino, K., Sugawara, K., Mizuno, T., Bando, T., Sugiyama, H., Akita, M., Miyazawa, H., and Hanaoka, F. (2009) Eukaryotic DNA polymerases  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\epsilon$  incorporate guanine opposite 2,2,4-triamino-5(2*H*)-oxazolone. *ChemBioChem*, *10*, 2613-2616.
- (21) Kino, K., Ito, N., Sugawara, K., Sugiyama, H., and Hanaoka, F. (2004) Translesion synthesis by human DNA polymerase  $\eta$  across oxidative products of guanine. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 171-172.
- (22) Kino, K., Morikawa, M., Kobayashi, T., Kobayashi, T., Komori, R., Sei, Y., and Miyazawa, H. (2010) The oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine by iodine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, *20*, 3818-3820.
- (23) Luo, W., Muller, J. G., Rachlin, E. M., and Burrows, C. J. (2000) Characterization of spiroiminodihydantoin as a product of one-electron oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine. *Org. Lett.*, *2*, 613-616.
- (24) Ye, Y., Munk, B. H., Muller, J. G., Cogbill, A., Burrows, C. J., and Schlegel, H. B. (2009) Mechanistic aspects of the formation of guanidinohydantoin from spiroiminodihydantoin under acidic conditions. *Chem. Res. Toxicol.*, *22*, 526-535.
- (25) Luo, W., Muller, J. G., Rachlin, E. M., and Burrows, C. J. (2001) Characterization of hydantoin products from one-electron oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine in a nucleoside model. *Chem. Res. Toxicol.*, *14*, 927-938.
- (26) Korniyushyna, O., Berges, A. M., Muller, J. G., and Burrows, C. J. (2002) *In vitro* nucleotide misinsertion opposite the oxidized guanosine lesions spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin and DNA synthesis past the lesions using *Escherichia coli* DNA polymerase I (Klenow Fragment). *Biochemistry*, *41*, 15304-15314.

- (27) Shibutani, S., Takeshita, M., and Grollman, A. P. (1997) Translesional synthesis on DNA templates containing a single abasic site. A mechanistic study of the “A rule”. *J. Biol. Chem.*, 272, 13916-13922.
- (28) Matray, T. J., and Kool, E. T. (1999) A specific partner for abasic damage in DNA. *Nature*, 399, 704-708.
- (29) Beckman, J., Wang, M., Blaha, G., Wang, J., and Konigsberg, W. H. (2010) Substitution of Ala for Tyr567 in RB69 DNA polymerase allows dAMP and dGMP to be inserted opposite Guanidinohydantoin. *Biochemistry*, 49, 8554-8563.
- (30) Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Montgomery, J. A., Vreven, T. J., Kudin, K. N., and Burant, J. C. *et al.* *Gaussian 03*, Revision C.02; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2004.
- (31) Ding, S., Jia, L., Durandin, A., Crean, C., Kolbanovskiy, A., Shafirovich, V., Broyde, S., and Geacintov, N. E. (2009) Absolute configurations of spiroiminodihydantoin and allantoin stereoisomers: comparison of computed and measured electronic circular dichroism spectra. *Chem. Res. Toxicol.*, 22, 1189-1193.
- (32) Wong, M. W., Frisch, M. J., and Wiberg, K. B. (1991) Solvent effects. 1. The mediation of electrostatic effects by solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 4776-4782.
- (33) Verdolino, V., Cammi, R., Munk, B. H., and Schlegel, H. B. (2008) Calculation of pKa values of nucleobases and the guanine oxidation products guanidinohydantoin and spiroiminodihydantoin using density functional theory and a polarizable continuum model. *J. Phys. Chem. B*, 112, 16860-16873.
- (34) Aller, P., Ye, Y., Wallace, S. S., Burrows, C. J., and Doublet, S. (2010) Crystal structure of a replicative DNA polymerase bound to the oxidized guanine lesion guanidinohydantoin. *Biochemistry*, 49, 2502-2509.
- (35) Chinyenetere, F., and Jamieson, E. R. (2008) Impact of the oxidized guanine lesion spiroiminodihydantoin on the conformation and thermodynamic stability of a 15-mer DNA duplex. *Biochemistry*, 47, 2584-2591.
- (36) Yanson, I. K., Teplitzky, A. B., and Sukhodub, L. F. (1979) Experimental studies of

- molecular interactions between nitrogen bases of nucleic acids. *Biopolymers*, *18*, 1149-1170.
- (37) Prakash, S., and Prakash, L. (2002) Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. *Genes Dev.*, *16*, 1872-1883.
- (38) Morikawa, M., Kino, K., and Miyazawa, H. (2010) DNA 損傷の発生と細胞への影響に関する化学的視点. *Rad. Biol. Res. Comm.*, *45*, 268-285.
- (39) Wu, M., Yan, S., Patel, D. J., Geacintov, N. E., and Broyde, S. (2002) Relating repair susceptibility of carcinogen-damaged DNA with structural distortion and thermodynamic stability. *Nucleic Acids Res.*, *30*, 3422-3432.
- (40) Sawaya, M. R., Prasad, R., Wilson, S. H., Kraut, J., and Pelletier, H. (1997) Crystal structures of human DNA polymerase  $\beta$  complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry*, *36*, 11205-11215.
- (41) Neeley, W. L., Delaney, S., Alekseyev, Y. O., Jarosz, D. F., Delaney, J. C., Walker, G. C., and Essigmann, J. M. (2007) DNA polymerase V allows bypass of toxic guanine oxidation products *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, *282*, 12741-12748.
- (42) Garg, P., and Burgers, P. M. (2005) DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, *40*, 115-128.
- (43) Pavlov, Y. I., Shcherbakova, P. V., and Rogozin, I. B. (2006) Roles of DNA polymerases in replication, repair, and recombination in eukaryotes. *Int. Rev. Cytol.*, *255*, 41-132.
- (44) Rothwell, P. J., and Waksman, G. (2005) Structure and mechanism of DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.*, *71*, 401-440.
- (45) Nick McElhinny, S. A., Gordenin, D. A., Stith, C. M., Burgers, P. M., and Kunkel, T. A. (2008) Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Mol. Cell*, *30*, 137-144.
- (46) Pursell, Z. F., Isoz, I., Lundstrom, E. B., Johansson, E., and Kunkel, T. A. (2007) Yeast DNA polymerase  $\epsilon$  participates in leading-strand DNA replication. *Science*, *317*, 127-130.
- (47) Zhu, F., and Zhang, M. (2003) DNA polymerase  $\zeta$ : new insight into eukaryotic mutagenesis and mammalian embryonic development. *World J. Gastroenterol.*, *9*,

1165-1169.

- (48) Yang, W., and Woodgate, R. (2007) What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *104*, 15591-15598.
- (49) Ohmori, H., Friedberg, E. C., Fuchs, R. P., Goodman, M. F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T. A., Lawrence, C. W., Livneh, Z., Nohmi, T., Prakash, L., Prakash, S., Todo, T., Walker, G. C., Wang, Z., and Woodgate, R. (2001) The Y-family of DNA polymerases. *Mol. Cell*, *8*, 7-8.
- (50) Fazlieva, R., Spittle, C. S., Morrissey, D., Hayashi, H., Yan, H., and Matsumoto, Y. (2009) Proofreading exonuclease activity of human DNA polymerase  $\delta$  and its effects on lesion-bypass DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.*, *37*, 2854-2866.
- (51) Piao, J., Masuda, Y., and Kamiya, K. (2010) Specific amino acid residues are involved in substrate discrimination and template binding of human REV1 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, *392*, 140-144.
- (52) MacNeill, S. A., Baldacci, G., Burgers, P. M., and Hubscher, U. (2001) A unified nomenclature for the subunits of eukaryotic DNA polymerase  $\delta$ . *Trends Biochem. Sci.*, *26*, 16-17.
- (53) Jin, Y. H., Garg, P., Stith, C. M., Al-Refai, H., Sterling, J. F., Murray, L. J., Kunkel, T. A., Resnick, M. A., Burgers, P. M., and Gordenin, D. A. (2005) The multiple biological roles of the 3'-->5' exonuclease of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase  $\delta$  require switching between the polymerase and exonuclease domains. *Mol. Cell. Biol.*, *25*, 461-471.
- (54) Lawrence, C. W. (2002) Cellular roles of DNA polymerase  $\zeta$  and Rev1 protein. *DNA Repair (Amst)*, *1*, 425-435.
- (55) Lawrence, C. W. (2004) Cellular functions of DNA polymerase  $\zeta$  and Rev1 protein. *Adv. Protein Chem.*, *69*, 167-203.
- (56) Guo, D., Wu, X., Rajpal, D. K., Taylor, J. S., and Wang, Z. (2001) Translesion synthesis by yeast DNA polymerase  $\zeta$  from templates containing lesions of ultraviolet radiation and acetylaminofluorene. *Nucleic Acids Res.*, *29*, 2875-2883.

- (57) Haracska, L., Prakash, S., and Prakash, L. (2003) Yeast DNA polymerase  $\zeta$  is an efficient extender of primer ends opposite from 7,8-dihydro-8-oxoguanine and  $O^6$ -methylguanine. *Mol. Cell. Biol.*, *23*, 1453-1459.
- (58) Haracska, L., Unk, I., Johnson, R. E., Johansson, E., Burgers, P. M., Prakash, S., and Prakash, L. (2001) Roles of yeast DNA polymerases  $\delta$  and  $\zeta$  and of Rev1 in the bypass of abasic sites. *Genes Dev.*, *15*, 945-954.
- (59) Gan, G. N., Wittschieben, J. P., Wittschieben, B. O., and Wood, R. D. (2008) DNA polymerase zeta (pol  $\zeta$ ) in higher eukaryotes. *Cell Res.*, *18*, 174-183.
- (60) Andersen, P. L., Xu, F., Ziola, B., McGregor, W. G., and Xiao, W. (2011) Sequential assembly of translesion DNA polymerases at UV-induced DNA damage sites. *Mol. Biol. Cell*, *22*, 2373-2383.
- (61) Xie, W., Yang, X., Xu, M., and Jiang, T. (2012) Structural insights into the assembly of human translesion polymerase complexes. *Protein Cell*, *3*, 864-874.
- (62) Tissier, A., Frank, E. G., McDonald, J. P., Iwai, S., Hanaoka, F., and Woodgate, R. (2000) Misinsertion and bypass of thymine-thymine dimers by human DNA polymerase  $\iota$ . *EMBO J.*, *19*, 5259-5266.
- (63) Johnson, R. E., Washington, M. T., Haracska, L., Prakash, S., and Prakash, L. (2000) Eukaryotic polymerases  $\iota$  and  $\zeta$  act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature*, *406*, 1015-1019.
- (64) Zhang, Y., Yuan, F., Wu, X., and Wang, Z. (2000) Preferential incorporation of G opposite template T by the low-fidelity human DNA polymerase  $\iota$ . *Mol. Cell Biol.*, *20*, 7099-7108.
- (65) Choi, J. Y., and Guengerich, F. P. (2006) Kinetic evidence for inefficient and error-prone bypass across bulky  $N^2$ -guanine DNA adducts by human DNA polymerase  $\iota$ . *J. Biol. Chem.*, *281*, 12315-12324.
- (66) Tissier, A., McDonald, J. P., Frank, E. G., and Woodgate, R. (2000) pol $\iota$ , a remarkably error-prone human DNA polymerase. *Genes Dev.*, *14*, 1642-1650.
- (67) McDonald, J. P., Tissier, A., Frank, E. G., Iwai, S., Hanaoka, F., and Woodgate, R.

- (2001) DNA polymerase  $\iota$  and related rad30-like enzymes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond Ser. B*, 356, 53-60.
- (68) Zhang, Y., Yuan, F., Wu, X., Taylor, J. S., and Wang, Z. (2001) Response of human DNA polymerase  $\iota$  to DNA lesions. *Nucleic Acids Res.*, 29, 928-935.
- (69) Zhang, Y., Yuan, F., Wu, X., Wang, M., Rechkoblit, O., Taylor, J. S., Geacintov, N. E., and Wang, Z. (2000) Error-free and error-prone lesion bypass by human DNA polymerase  $\kappa$  *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, 28, 4138-4146.
- (70) Zhang, Y., Yuan, F., Xin, H., Wu, X., Rajpal, D. K., Yang, D., and Wang, Z. (2000) Human DNA polymerase  $\kappa$  synthesizes DNA with extraordinarily low fidelity. *Nucleic Acids Res.*, 28, 4147-4156.
- (71) Choi, J. Y., Angel, K. C., and Guengerich, F. P. (2006) Translesion synthesis across bulky  $N^2$ -alkyl guanine DNA adducts by human DNA polymerase  $\kappa$ . *J. Biol. Chem.*, 281, 21062-21072.
- (72) Wolfle, W. T., Washington, M. T., Prakash, L., and Prakash, S. (2003) Human DNA polymerase  $\kappa$  uses template-primer misalignment as a novel means for extending mispaired termini and for generating single-base deletions. *Genes Dev.*, 17, 2191-2199.
- (73) Nelson, J. R., Lawrence, C. W., and Hinkle, D. C. (1996) Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein. *Nature*, 382, 729-731.
- (74) Zhang, Y., Wu, X., Rechkoblit, O., Geacintov, N. E., Taylor, J. S., and Wang, Z. (2002) Response of human REV1 to different DNA damage: preferential dCMP insertion opposite the lesion. *Nucleic Acids Res.*, 30, 1630-1638.
- (75) Masuda, Y., and Kamiya, K. (2002) Biochemical properties of the human REV1 protein. *FEBS Lett.*, 520, 88-92.
- (76) Choi, J. Y., and Guengerich, F. P. (2008) Kinetic analysis of translesion synthesis opposite bulky  $N^2$ - and  $O^6$ -alkylguanine DNA adducts by human DNA polymerase REV1. *J. Biol. Chem.*, 283, 23645-23655.
- (77) Swan, M. K., Johnson, R. E., Prakash, L., Prakash, S., and Aggarwal, A. K. (2009) Structure of the human Rev1-DNA-dNTP ternary complex. *J. Mol. Biol.*, 390, 699-709.



- (78) Nair, D. T., Johnson, R. E., Prakash, L., Prakash, S., and Aggarwal, A. K. (2005) Rev1 employs a novel mechanism of DNA synthesis using a protein template. *Science*, *309*, 2219-2222.
- (79) Howell, C. A., Prakash, S., and Washington, M. T. (2007) Pre-steady-state kinetic studies of protein-template-directed nucleotide incorporation by the yeast Rev1 protein. *Biochemistry*, *46*, 13451-13459.
- (80) Kino, K., Takao, M., Miyazawa, H., and Hanaoka, F. (2012) A DNA oligomer containing 2,2,4-triamino-5(2H)-oxazolone is incised by human NEIL1 and NTH1. *Mutat. Res.*, *734*, 73-77.
- (81) Murakumo, Y., Ogura, Y., Ishii, H., Numata, S., Ichihara, M., Croce, C. M., Fishel, R., and Takahashi, M. (2001) Interactions in the error-prone postreplication repair proteins hREV1, hREV3, and hREV7. *J. Biol. Chem.*, *276*, 35644-35651.
- (82) Ohashi, E., Murakumo, Y., Kanjo, N., Akagi, J., Masutani, C., Hanaoka, F., and Ohmori, H. (2004) Interaction of hREV1 with three human Y-family DNA polymerases. *Genes Cells*, *9*, 523-531.
- (83) Kim, M. S., Machida, Y., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., Pang, Y. P., and Machida, Y. J. (2013) Regulation of error-prone translesion synthesis by Spartan/C1orf124. *Nucleic Acids Res.*, *41*, 1661-1668.
- (84) Acharya, N., Johnson, R. E., Pages, V., Prakash, L., and Prakash, S. (2009) Yeast Rev1 protein promotes complex formation of DNA polymerase  $\zeta$  with Pol32 subunit of DNA polymerase  $\delta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *106*, 9631-9636.
- (85) Kikuchi, S., Hara, K., Shimizu, T., Sato, M., and Hashimoto, H. (2012) Structural basis of recruitment of DNA polymerase  $\zeta$  by interaction between REV1 and REV7 proteins. *J. Biol. Chem.*, *287*, 33847-33852.
- (86) Yang, L., Beard, W., Wilson, S., Roux, B., Broyde, S., and Schlick, T. (2002) Local deformations revealed by dynamics simulations of DNA polymerase  $\beta$  with DNA mismatches at the primer terminus. *J. Mol. Biol.*, *321*, 459-478.
- (87) Beard, W. A., Shock, D. D., and Wilson, S. H. (2004) Influence of DNA structure on

- DNA polymerase  $\beta$  active site function: extension of mutagenic DNA intermediates. *J. Biol. Chem.*, 279, 31921-31929.
- (88) Masutani, C., Kusumoto, R., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2000) Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase  $\eta$ . *EMBO J.*, 19, 3100-3109.
- (89) Matsuda, T., Bebenek, K., Masutani, C., Rogozin, I. B., Hanaoka, F., and Kunkel, T. A. (2001) Error rate and specificity of human and murine DNA polymerase  $\eta$ . *J. Mol. Biol.*, 312, 335-346.
- (90) Kano, C., Hanaoka, F., and Wang, J. Y. (2012) Analysis of mice deficient in both REV1 catalytic activity and POLH reveals an unexpected role for POLH in the generation of C to G and G to C transversions during Ig gene hypermutation. *Int. Immunol.*, 24, 169-174.
- (91) Sugiyama, H., and Saito, I. (1996) Theoretical studies of GG-specific photocleavage of DNA via electron transfer: significant lowering of ionization potential and 5'-localization of HOMO of stacked GG bases in B-form DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 7063-7068.
- (92) Saito, I., Nakamura, T., Nakatani, K., Yoshioka, Y., Yamaguchi, K., and Sugiyama, H. (1998) Mapping of the hot spots for DNA damage by one-electron oxidation: efficacy of GG doublets and GGG triplets as a trap in long-range hole migration. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 12686-12687.
- (93) Hirakawa, K., Kawanishi, S., Hirano, T., and Segawa, H. (2007) Guanine-specific DNA oxidation photosensitized by the tetraphenylporphyrin phosphorus(V) complex via singlet oxygen generation and electron transfer. *J. Photochem. Photobiol. B*, 87, 209-217.
- (94) Jaloszynski, P., Masutani, C., Hanaoka, F., Perez, A. B., and Nishimura, S. (2003) 8-Hydroxyguanine in a mutational hotspot of the *c-Ha-ras* gene causes misreplication, 'action-at-a-distance' mutagenesis and inhibition of replication. *Nucleic Acids Res.*, 31, 6085-6095.
- (95) Jaloszynski, P., Ohashi, E., Ohmori, H., and Nishimura, S. (2005) Error-prone and inefficient replication across 8-hydroxyguanine (8-oxoguanine) in human and mouse *ras* gene fragments by DNA polymerase  $\kappa$ . *Genes Cells*, 10, 543-550.
- (96) Washington, M. T., Carlson, K. D., Freudenthal, B. D., and Pryor, J. M. (2010)

- Variations on a theme: eukaryotic Y-family DNA polymerases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1804, 1113-1123.
- (97) Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., and Hanaoka, F. (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase  $\eta$ . *Nature*, 399, 700-704.
- (98) Xiao, W., Lechler, T., Chow, B. L., Fontanie, T., Agustus, M., Carter, K. C., and Wei, Y. F. (1998) Identification, chromosomal mapping and tissue-specific expression of hREV3 encoding a putative human DNA polymerase  $\zeta$ . *Carcinogenesis*, 19, 945-949.
- (99) Lin, W., Xin, H., Zhang, Y., Wu, X., Yuan, F., and Wang, Z. (1999) The human REV1 gene codes for a DNA template-dependent dCMP transferase. *Nucleic Acids Res.*, 27, 4468-4475.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、徳島文理大学香川薬学部分子生物学講座 宮澤宏教授には、日々の研究だけでなく、学会発表や博士論文をはじめ各種論文の作成等、多くのご指導を賜り深く感謝するとともに、心から御礼申し上げます。また、准教授の喜納克仁先生には、研究に向かう姿勢をはじめ日頃から実験手法および研究結果に関する考察等、研究の基礎を教えて頂きました。また、各種論文の作成においては、論文の構成や執筆方法といった細やかな点まで熱心なご指導を頂き、心から感謝申し上げます。

実験手法の指導や、研究室運営および、研究報告会や学会発表における有益なアドバイスを度々頂いた助教の小林隆信先生に深く感謝申し上げます。

徳島文理大学香川薬学部分子生物学講座の皆様には公私にわたり有益なご意見を頂き、研究室での生活を明るく楽しいものにして頂きました。特に、先輩である森川雅行さんには忙しい中、機器の使用法はじめ、研究を行う上で多大なご助言、ご協力頂きました。深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、独立行政法人に本学術振興会より研究奨励金、および科学研究費補助金(特別研究員奨励費)を頂きました。ここに感謝申し上げます。

学部から現在に至るまで多くの先生に数多くの知識や示唆、アドバイスを頂きました。また、博士研究員の向井理紗さんには公私ともに有益なアドバイスを頂きました。また、科研費の使用をはじめとする各種手続きに関して大学事務の方々には度々お世話になりました。

最後に、私の研究生生活を見守り、いつも支えてくれる家族に感謝の意を表して謝辞と致します。