九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

DNA中の酸化損傷塩基の高感度検出を可能にする人工ヌクレオチドの開発

菊川, 誉也

https://hdl.handle.net/2324/1931851

出版情報：九州大学, 2017, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

DNA 中の酸化損傷塩基の高感度検出を可能にする人工ヌクレオチドの開発

生物有機合成化学分野　3PS15002Y 菊川　誉也

【目的】

核酸塩基は紫外線や活性酸素種により損傷を受けるが、中でもグアノシン（dG）の 8 位が酸化される 8-オキソグアノシン（8-oxo-dG）は酸化損傷塩基の代表例である（**図 1**）。8-oxo-dG はシチジン（dC）のみならず、一般的な核酸塩基と異なる *syn*-配座に配向しアデノシン（dA）と塩基対を形成することで、複製の段階で GC 塩基対から TA 塩基対へのトランスバージョン変異を誘導する（**図 2**）。そのため DNA 中の 8-oxo-dG の発生量は有用な酸化ストレスマーカーであり、DNA 中の 8-oxo-dG の発生位置は疾患との関連性が示唆されている。8-oxo-dG 配列選択的な検出が可能となれば、疾患の早期発見や新たな治療法の開発につながり、酸化損傷塩基を指標とした新しい診断技術、創薬研究へ展開できる。しかしながら既存の 8-oxo-dG 検出方法では、その塩基配列選択的な発生位置の検出には至っていない。その主な原因として DNA 中に発生する 1 つの 8-oxo-dG を高感度に検出することが難しいことが挙げられる。そこで本研究は DNA 中の 8-oxo-dG 発生位置と疾患の関連性を明らかにすることが可能な、高感度検出法の開発を目指した人工ヌクレオチドの開発を行うことにした。

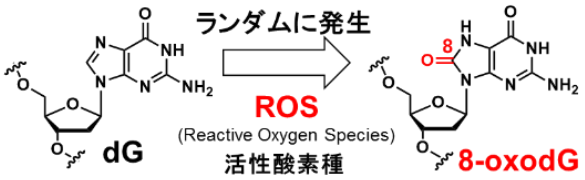

図 1 酸化損傷塩基 8-oxo-dG の発生

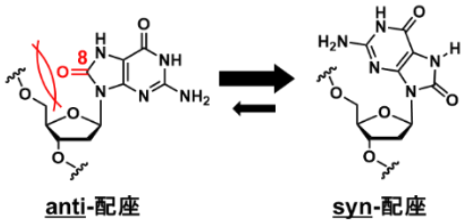

図 2 DNA 中の 8-oxo-dG の性質

【方法及び結果】

(1)一塩基伸長反応による 8-oxo-dG 配列選択的検出

当研究室では DNA 中の 8-oxo-dG の性質に着目し、アデノシン(dA)を基本骨格として 8-oxo-dG と多点型水素結合が可能な人工核酸（Adap: Adenosine-1.3-diazaphenoxazine）の開発に成功している(図 3)[1]。Adap を組み込んだ DNA は、相補的な位置に 8-oxo-dG がある条件にのみ、特異的な二本鎖融解温度の上昇とフェノキザジン由来の蛍光の消光作用により、8-oxo-dG の検出をした。この Adap を 8-oxo-dG の相補的な塩基の候補として、トリリン酸体（dAdapTP）へ誘導した。DNA 合成酵素として Klenow Fragment を用い、dAdapTP が反応基質として認識され、かつ 8-oxo-dG と dG の識別能を有するか検討した(**図 5**)。一塩基伸長反応液を変性ポリアクリルアミドゲルにアプライし、一塩基伸長したものと伸長していないプライマー鎖を分離し、それぞれを FAM の蛍光で検出する事で評価を行った。伸長したプライマー鎖は移動度が遅いバンドとして観察される。ゲルの結果より鋳型鎖の X の位置の 8-oxo-dG(ºG)に対して伸長反応が進行し G に対しては伸長反応が進行しなかった。このことは dAdapTP が

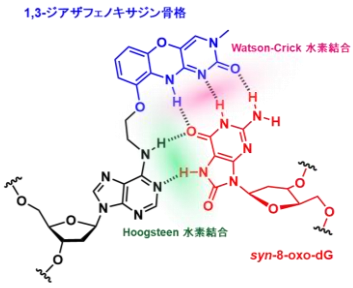

図 3 Adap : 8-oxo-dG 塩基対

ポリメラーゼの基質となり 8-oxo-dG の相補的な塩基として認識されたことを示している[2]（図 6）。

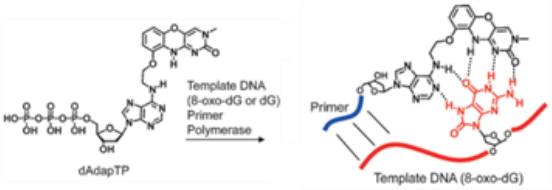

図 5 dAdapTP を用いた一塩基伸長反応による検出の概念図

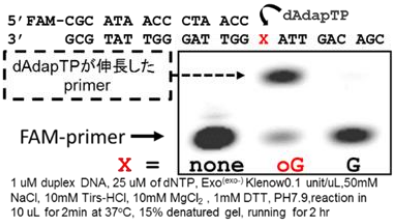

図 6 dAdapTP の一塩基伸長反

（2）遺伝子増幅法を用いた 8-oxo-dG の高感度検出

Klenow Fragment と dAdapTP を用いた一塩基伸長反応において、dG に対しては伸長反応が確認されず、8-oxo-dG を含む鎖に対してのみプライマー鎖の伸長が確認され、8-oxo-dG 鎖の検出に成功した。そこで一塩基伸長反応を繰り返すことによる PCR 様増幅反応に展開した。高温条件による二本鎖の解離、二本鎖の形成、伸長反応と PCR 様増幅反応(図 7)を 20 回 cycle 進行させた結果、8-oxo-dG 鎖及び dG の伸長したバンドが観測され、非選択的な増幅反応が進行した(図 8)。この原因として、反応時間が長いことに加え、二本鎖の解離のために Klenow fragment の至適温度（37°C）を超えた高温条件を繰り返すことで、Klenow fragment の塩基選択性が低下したと考えた。熱耐性のある酵素を検討したところ、Taq polymerase、Vent DNA polymerase、KOD DNA polymerase では伸長反応が進行しなかった。しかし *Bst* DNA polymerase は 8-oxo-dG と dG を完全には識別できないが、dAdapTP を反応基質として認識し伸長反応が進行することが明らかとなった(図 9)。そこで *Bst* DNA polymerase と新規 Adap 誘導体を用いて選択性の改善を検討することにした。

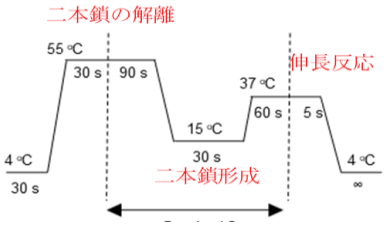

図 7 PCR 様増幅反応の温度変化の条件

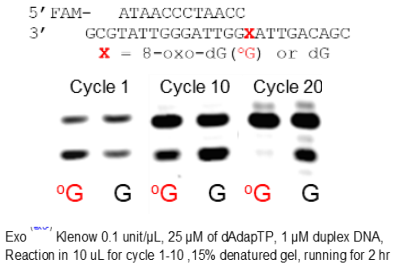

図 8 PCR 様増幅反応の結果

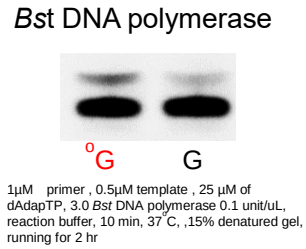

図 9 *Bst* DNA polymerase による一塩基伸長反応

新規 Adap 誘導体の合成と機能評価：核酸塩基の窒素原子を炭素原子に置き換えた誘導体は、酵素による取り込みの正確性に大きく影響を与える。そこで、Adap の基本骨格である dA の 6 位の NH を CH_2 に変換したプリン骨格を有する Pdap（Purine-1,3-diazaphenoxazine）さらに 1 位の N を CH に変換した 1-deaza-Pdap を設計し(図 10)、トリリン酸体へ誘導した。さらに、dPdapTP と *Bst* DNA polymerase を組み合わせた条件では、高い 8-oxo-dG と dG との認識能を有した。dPdapTP と *Bst* DNA polymerase を用いて PCR 様増幅反応を検討した。0.1μM の template に対して 10 倍等量の Primer を用いて増幅反応を行った結果、8-oxo-dG の発生位置を検出した Primer が 6.7 倍に増幅した(図 11)。1-deaza-dPdapTP は *Bst* DNA polymerase を用いた伸長反応において反応は進行しなかった。

Bst DNA polymerase を用いた遺伝子増幅反応を検討する過程で、この酵素に二本鎖 DNA の鎖交換反応を促進するような性質を発見した。この性質を利用し、等温条件による遺伝子増幅を検討した。100 nmol の鋳型鎖に対して 100 等量のプライマー鎖と dPdapTP を用い 55°C にて反応を行った結果、時間経過とともに 8-oxo-dG を含む鋳型鎖においてのみプライマー鎖が増幅されていることが観測され、

6 時間後では 74 倍まで増幅された（**図 12**）。

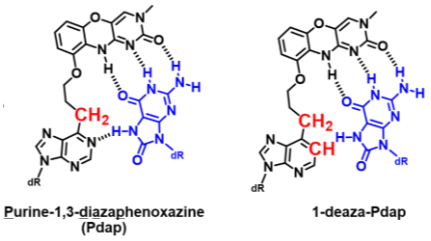

図 10 Pdap 及び 1-deaza-Pdap の分子設計

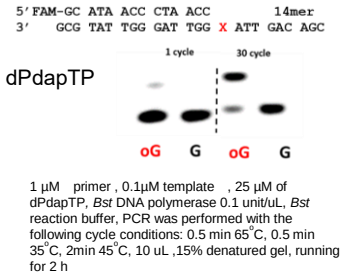

図 11 *Bst* DNA polymerase の PCR 様増幅反応の結果

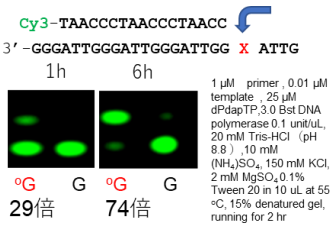

図 12 *Bst* DNA polymerase の等温条件の増幅反応の結果

（3）dG を含む過剰の DNA 鎖存在下での 8-oxo-dG の存在の検出

生体中の組織では一部の細胞の DNA のみ酸化損傷を受けるため、その他多くの細胞には損傷塩基が存在しない。そのため、サンプリングした際に dG を含む過剰の DNA 存在下で損傷を受けた 8-oxo-dG を含む DNA を検出しなければならない。dPdapTP と *Bst* DNA polymerase で dG 鎖、8-oxo-dG 鎖混合条件で増幅反応を検討した。モデル実験としての 1μM primer に対して 1μM の template (dG 鎖と 8-oxo-dG 鎖の存在比率が 1 対 1, 9 対 1, 99 対 1, 999 対 1)に調整し、dG と 8-oxo-dG の混合条件においても検出可能か検討を行った。37℃で 1 時間後のゲル電気泳動の結果より、dG と 8-oxo-dG の混合比が 1 対 1, 9 対 1,において dPdapTP が取り込まれ伸長したバンドが観測された。しかしながら、dG と 8-oxo-dG の混合比が 99 対 1, 999 対 1 の条件ではほとんど伸長したバンドが観察されなかった。そこで、反応時間を 6 時間に延長したところ、dG 鎖のみの条件でも伸長したバンドが観測され、99 対 1, 999 対 1 の条件の場合と大きな差は見られなかった。以上の結果より、8-oxo-dG が微量の条件での増幅反応では、更なる検討が必要であることが明らかとなった。長時間の伸長反応条件下で観測される dG 鎖に対する望まない伸長反応を抑制するために、プライマーの 3’末端に 2’,3’-dideoxycytidine を組み込んだ ddC-primer を用いることにした（**図 13**）。ddC の構造の特徴として糖部分の 3’位の水酸基が欠如しているため酵素反応による伸長反応が進行しない、さらに dG に対して通常の塩基対を組むため dG が存在する鎖に対して primer よりも安定な 2 本鎖を形成し、dG 鎖への望まぬ伸長反応が抑制されることを期待した。この ddCprimer を用い反応を 12 時間 37℃にて増幅反応を検討した結果、dG 鎖に対して 1000 分の 1 の 8-oxo-dG 鎖を 370 倍に増幅し、特異的な検出に成功した（**図 14**）。

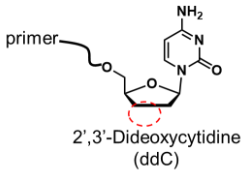

図 13 ddC primer

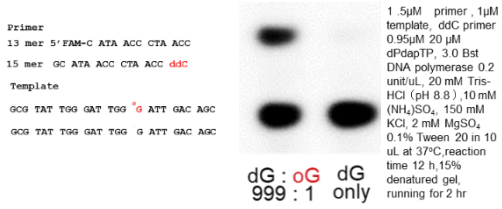

図 14 ddC primer を用いた 8-oxo-dG の高感度検出

(4)γ-アミドトリリン酸を用いた任意配列中の 8-oxo-dG の検出

dAdapTP の一塩基伸長反応、dPdapTP の増幅反応により配列選択的な 8-oxo-dG の検出に成功した。更なる検出へ展開として、天然塩基のトリリン酸（dNTP）を共存させた条件をおいて Pdap トリリン酸が template の 8-oxo-dG の相補的な塩基として伸長反応が進行出来れば、DNA 鎖中の任意の位置に発生する 8-oxo-dG の検出も可能となることが期待される。(**図 15**）そこで dATP、dGTP、TTP、dCTP の各塩基と dPdapTP を共存下において、8-oxo-dG に対してどのように伸長反応が進行するかを検討した。**図 16** では dATP と dPdapTP の混合条件において 8-oxo-dG へ一塩基伸長反応を行った結果である。レーン 2 の dPdapTP のみの条件では、伸長反応したバンドが確認できるが、レーン 3 の dATP と

dPdapTP の混合条件では、8-oxo-dG に対する dPdapTP の伸長反応が阻害される結果が得られた。また dGTP、TTP、dCTP を用いた条件においても、同様の結果が得られた。そこで天然塩基対同士の塩基選択性に影響せず、取り込み効率を低下させる必要がある。トリリン酸部のγ位をアミノ化したアミドトリリン酸(dNTP$_N$)は取り込み効率が低下することが知られている(図 **17**）[3]。そこで各天然塩基をγ-アミドトリリン酸体 dATP$_N$ 、dGTP$_N$、TTP$_N$、dCTP$_N$ へと誘導した。図 **18** の dATP$_N$ と dPdapTP の混

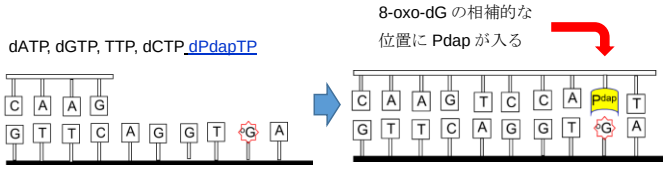

図 **15** 天然塩基と Pdap トリリン酸用いて伸長反応した条件

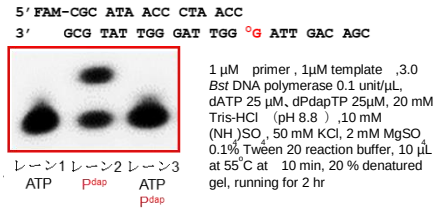

図 **16** dATP と dPdapTP の混合条件

合条件レーン 3 では、dPdapTP の伸長反応が進行したバンドが確認され、8-oxo-dG 選択的な伸長反応を構築に成功した。続いて 4 種のγ-アミドトリリン酸を用い連続した伸長反応をすることで、任意の配列の 8-oxo-dG の検出を検討した。FAM で蛍光標識された 17mer の primer を用い、二本鎖を形成した際に+3 伸長した位置に X = 8-oxo-dG(°G)または dG を組み込んだ template を用いた。レーン 4 の条件では全長の DNA のバンドが観察された。レーン 5 では全長の DNA は観察されず、途中で伸長が止まったバンドが観察された。この DNA を HPLC にて分取し、MALDI-TOF MS にて解析した結果、8-oxo-dG の相補的な位置に Pdap が伸長し、その後伸長が停止した DNA であることが明らかとなった。この結果よりγ-アミドトリリン酸体と dPdapTP の用いることにより、伸長反応が停止することで 8-oxo-dG の位置の検出に成功した。

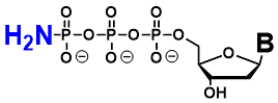

図 **17** γ-アミドトリリン酸

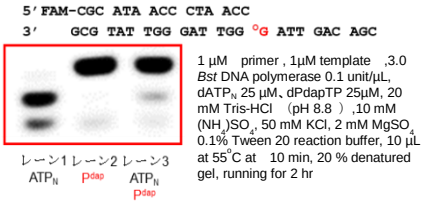

図 **18** dATP$_N$ と dPdapTP の混合条件

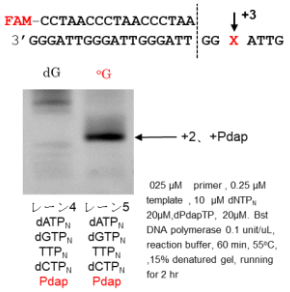

図 **19** dNTP$_N$ と dPdapTP の伸長

【結論】

本発表では、配列選択的な 8-oxo-dG の検出法の開発を目指し、酵素反応と人工ヌクレオチドを用いた検出法の報告をする。Adap と Klenow Fragment の一塩基伸長反応による 8-oxo-dG の検出に成功した。また dPdapTP と 1-deaza-dPdapTP の合成に成功し、*Bst* DNA polymerase と dPdapTP を用いることで、増幅反応による特異的な DNA 中の 8-oxo-dG の存在の検出に成功した。γ-アミドトリリン酸体と dPdapTP を用いた条件では、8-oxo-dG の相補的な位置に Pdap が伸長し、伸長反応が停止することで 8-oxo-dG の位置の検出に成功した。

【引用文献及び発表論文】

1. Y. Taniguchi, R. Kawaguchi, S. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**,*133*,7272

2. Y. Taniguchi, Y. Kikukawa, S. Sasaki, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 5147

3. I. Hirao, M, Kimoto. T, Mitui. T, *et al*,. *Nature methods*., **2006**, *3*, 729

4. Y. Taniguchi, K. Fukabori, Y.Kikukawa, Y.Koga, Sasaki,S., *Bioorg. Med. Chem*.,**2014**, *22*, 1634

5. Y. Koga, Y. Taniguchi, Y. Kikukawa, S, Sasaki, *Bioorg. Med. Chem*. **2016**, *24*,1308