

Accounts of Materials & Surface Research

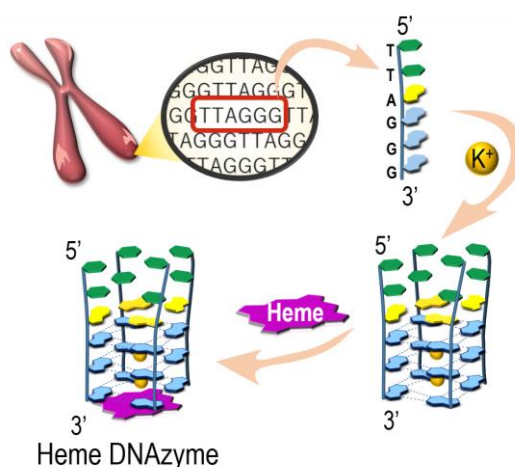
Catalytic Activities of Complexes between Heme and G-Quadruplex Nucleic Acids

Yasuhiko Yamamoto^{1*}, Atsuya Momotake^{1,2}

¹ Department of Chemistry, University of Tsukuba
1-1-1, Tennoudai, Tsukuba, 305-8571, Japan

² Tsukuba Research Center for Energy Materials Science (TREMS), University of Tsukuba
1-1-1, Tennoudai, Tsukuba 305-8571, Japan
yamamoto@chem.tsukuba.ac.jp

Heme is perhaps the most ubiquitous and abundant cofactor found in nature. Despite such ubiquitous occurrence of heme in nature, no functional role *in vivo* has yet been attributed to heme incorporated into nucleic acids. The RNA world hypothesis has provided a strong stimulus for exploring new catalytic properties of RNAs. Iron tetrapyrrole complexes such as heme are thought to be key compounds in the postulated RNA world, and hence the incorporation of heme into DNAs as well as RNAs is expected to contribute to such a study. In fact, heme-bound nucleic acids have been shown to exhibit at least two of the known catalytic functions of contemporary heme enzymes, i.e., peroxidase and peroxygenase activities. Hence, these heme-bound nucleic acids could be regarded as prototypes for redox-catalyzing ribozymes in the primordial RNA world.

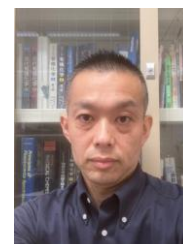


Keyword: Catalytic activity, G-quadruplex DNA, Heme, NMR, Water molecule

Yasuhiko Yamamoto received his Ph. D. from University of California, Davis, in 1986. He became an assistant professor at Tokyo Institute of Technology in 1986, and then an associate professor at University of Tsukuba in 1993. He was promoted to a professor of University of Tsukuba in 1999. He retired from this university and became a professor emeritus.



Atsuya Momotake is an associate professor at the Department of Chemistry, University of Tsukuba, Japan. He received his Ph.D. degree in 1999 at Chiba University. He worked at MCP Hahnemann University (USA) as a postdoctoral research fellow. Then he moved to the University of Tsukuba and was promoted to an assistant professor in 2005 and to an associate professor in 2020. His current major research interest is to develop functional bio-related materials.



ヘムとグアニン四重鎖の複合体の触媒作用

山本泰彦¹・百武篤也^{1,2}

¹ 筑波大学数理物質系化学域・² 筑波大学エネルギー物質科学研究センター (TREMS)

1. はじめに

ヘム(Figure 1A)は、鉄原子とポルフィリンの錯体であり、赤血球に含まれる血色素タンパク質ヘモグロビンなどのヘムタンパク質の補欠分子族として生物界に遍在している。さらに、最近の研究から、遺伝子の発現制御など、ヘムの多様な生理機能が次々に明らかになっており、生体内におけるヘムの役割に注目が集まっている[1, 2]。これまで、私共はヘムタンパク質の機能と構造の相関関係を研究し、ヘムの機能がタンパク質との相互作用を通して調節される分子機構を解明してきた[3-5]。一連のヘムタンパク質が示す多様な機能がヘムとタンパク質の相互作用によって生み出されることを考えると、タンパク質以外の生体高分子でもヘムを組み込めば新しい機能が創出できるのではと思ったことが、本稿で紹介する私共の研究のきっかけであった。

まず、生体高分子の中で、私共は核酸に着目した。RNA にはリボザイムとして知られる触媒作用を示す分子が存在することから[6]、RNA だけでなく DNA にもヘムを組み込むことができれば、核酸との相互作用を通してヘムの機能が調節できると考えたからである。ただし、DNA の立体構造として有名な二重らせん構造の核酸には、ヘムは結合しない。ヘムのアニオン性側鎖が、核酸主鎖のリン酸イオンと静電的に反発するからである。そこで、私共は、ヘムを組み込む核酸として、グアニン四重鎖[7] (四重鎖と言っても、実際には四重鎖らせん構造)に着目した。グアニン四重鎖の分子内部で形成される G カルテット(Figure 1B)は、ヘムのポルフィリン環との π - π スタッキング相互作用に適していると考えたからである(後述)。ところで、グアニン四重鎖は、真核生物の染色体末端のテロメアと呼ばれる領域に存在することが知られている[8, 9]。テロメアは、細胞の老化やガン化などに関連していると考えられている[10]。ヒトのテロメアでは、チミン(T)、アデニン(A) およびグアニン(G) からなる

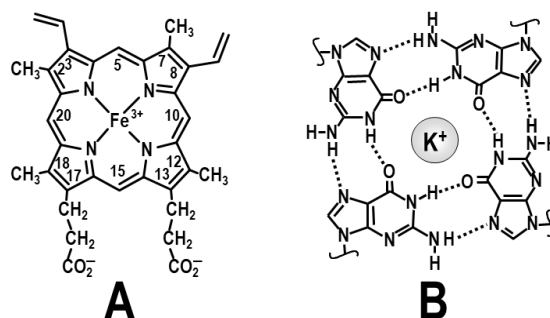


Figure 1. Molecular structures of heme(Fe^{3+}) (A) and G-quartet formed through a cyclic and coplanar association of four guanine bases through Hoogsteen hydrogen bonds (B).

d(TTAGGG) (DNA 鎖の 5'末端から 3'末端の方向に TTAGGG の順に 6 つの塩基がつながった塩基配列(Figures 2A & A'), “d”は DNA 鎖を表し、RNA 鎖の場合は“r”を付す)を基本単位とする塩基配列が何度も繰り返されている。テロメアのように G が豊富な領域は、四重鎖を形成する傾向が強いことが示されており、バイオインフォマティクス(Bioinformatics)からは、ヒトゲノムには四重鎖が形成可能な領域は数十万ヶ所は存在することが示唆されている[11]。したがって、グアニン四重鎖も、生物界に遍在していると言える。

私共は、いずれも生物界に遍在するヘムとグアニン四重鎖の相互作用の研究は、生物科学だけでなく物質科学においても新たな分野の開拓につながる可能性があるかと期待している。現生生物への進化の前に、原始地球上で、RNA からなる自己複製系が存在していたとする“RNA ワールド”仮説[12]が正しいとすると、ヘムの先祖と言えぬ錯体が RNA のグアニン四重鎖(四重鎖 RNA)に組み込まれて RNA ワールドを支える触媒分子として作用していた可能性があるかと私共は考えている。約 37 億年前の生命誕生の痕跡として知られるストロマトライトはシアノバクテリアの化石であると考えられていることから、当時からクロフィル類似化合物が光合成に利

用されていた可能性がある。ポルフィリンは、アセチレン、アンモニア、ホルムアルデヒドのような、宇宙に普遍的に存在し、原始地球上で存在していたと考えられている簡単な分子からも合成されることが実証されている[13]。したがって、無生物的に合成されたポルフィリンに、地表付近に豊富に存在する鉄原子が組込まれたヘムの先祖と言える錯体が当時から存在していた可能性がある。ヘムの先祖と言える錯体が RNA ワールドの出現に一翼を担っていたかどうかを検証する研究は、生物科学の重要な研究課題である生命の起源を解明するための鍵となると考えられる。本稿では、ヘムとグアニン四重鎖の相互作用の研究が拓く物質科学として、ヘムと四重鎖 DNA の複合体が示す触媒作用の研究を紹介する。

2. ヘムとグアニン四重鎖

ヘムを構成するポルフィリンは、側鎖としてメチル基 4 つに加えて、ビニル基とプロピオン酸基がそれぞれ 2 つ結合しているプロトポルフィリン IX である(Figure 1A)。側鎖として結合する置換基の種類と数で名称がプロトポルフィリンと決まり、ローマ数字 IX は置換基の結合位置を表している。ポルフィリンは、 18π 電子系の複素芳香族化合物であり、可視領域に強い吸収を示すなど、特徴的な分光学的性質をもつ。さらに、鉄原子が組込まれたヘムの電子的および磁気的性質は、鉄原子の酸化状態、スピン状態、配位状態に依存する。特に、鉄イオンが不対電子をも

つ常磁性ヘムで $^1\text{H NMR}$ スペクトルを測定すれば、観測されるシグナルの常磁性シフトの解析を通して、ヘムの電子構造が解明できると共に、ヘム近傍の構造化学的環境に関する情報を原子レベルで得ることができる[14]。

四重鎖 DNA は、文字通り DNA 鎖 4 本により形成される。そして、四重鎖 DNA の内部では、グアニン塩基(G) 4 つが同一平面内で水素結合により環状に連結した G カルテットと呼ばれる特徴的な構造が形成されている[7] (Figure 1B)。G カルテットの平面性と大きさはいずれも、ヘムのポルフィリン環との π - π スタッキング相互作用に適している。実際、三価の鉄イオンをもつヘム(ヘム(Fe^{3+}))は、四重鎖 DNA の 3'末端 G カルテットに対して、親和性約 10^6 M^{-1} で結合する(Figure 2C) [15, 16]。核酸に対するヘムの結合は、ポルフィリン環と G カルテットの π - π スタッキング相互作用によってもたらされることを考慮すると、ヘムは四重鎖 DNA [15, 16]および四重鎖 RNA[17]に特異的に結合する錯体であると言える。

四重鎖 DNA の内部では、複数の G カルテット同士が π - π スタッキング相互作用により積層している(Figure 2B)。そして、積層する G カルテットのまわりの 4 本の DNA 鎖がどのように配向するかによって、平行型、逆平行型[18]、(3+1)ハイブリッド型[19]などいくつかのフォールディングが可能である(Figure 3)。四重鎖 DNA の安定性は、積層する G カルテットの枚数に依存する。例えば、4 本の DNA 鎖がすべて同一方向に配

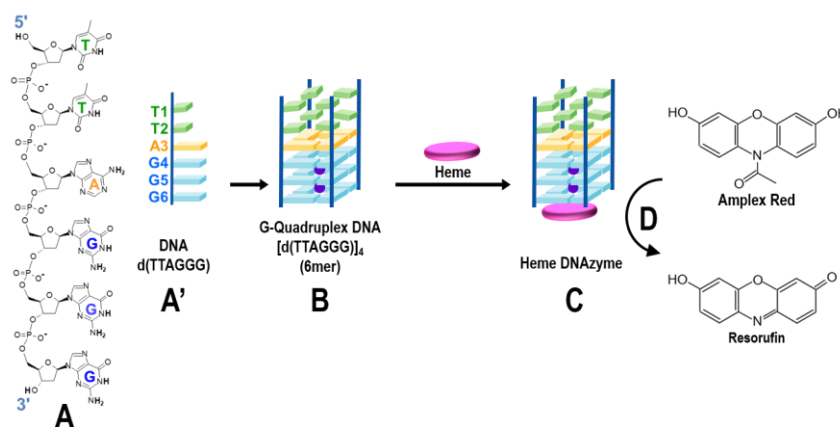


Figure 2. Structures of hexanucleotide d(TTAGGG) (A and A'), G-quadruplex DNA [d(TTAGGG)]₄ (6mer) (B), and a heme-DNAzyme formed between heme and 6mer (C), and oxidation reaction of Amplex red catalyzed by the heme-DNAzyme (D).

列する平行型四重鎖 DNA の立体構造の安定性を反映する変性温度は、Figure 3A に示す積層 G カルテットが 2 枚の四重鎖 DNA では室温以下であり、3 枚の四重鎖 DNA では約 55 °C、4 枚では約 85 °C、5 枚ではさらに高温になる。したがって、生体内で通常存在する四重鎖 DNA では積層 G カルテットが 3 枚であるのは、その安定性が生体内での利用に適しているためと考えることができる。G カルテットの π - π スタッキングで、隣接する G カルテットの間にはカリウムイオンなど一価カチオンが存在し、近接する 8 つのグアニンのカルボニル酸素原子間の電子的反発を低減している。したがって、一価カチオンが存在しなければ、G カルテットひいては四重鎖 DNA は形成しない。

私共が主に研究対象とするのは、平行型四重鎖 DNA である。塩基配列 d(TTAGGG) が 4 分子で生じる平行型四重鎖 DNA [d(TTAGGG)]₄ (Figure 2B) (以降、6mer と略記) などの分子構造はらせん軸に関して四回回転対称であるので、NMR による解析に好都合である[15, 20-33]。上述の通り、へムが π - π スタッキング相互作用によ

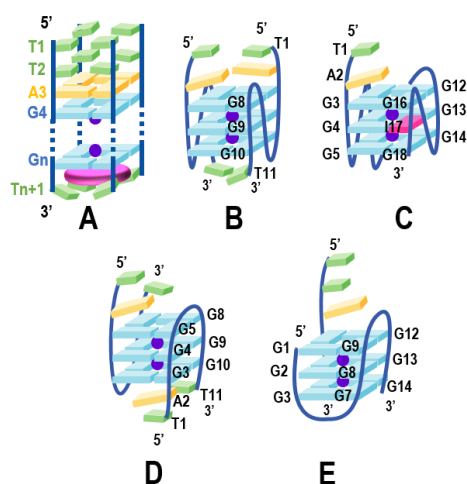


Figure 3. Schematic illustration of parallel G-quadruplex DNAs, [d(TTAG_nT)]₄ ($n = 2, 3, 4,$ or 5) (A), [d(TAGGGTTAGGGT)]₂ [18] (B), and d(TAGGGTGGGTTGGGTGIG) (C), an antiparallel one, [d(TAGGGTTAGGGT)]₂ [18] (D), and (3+1) hybrid one, d(GGGTTAGGGTTAGGG)/d(TTAGGG) [19] (E). The bases of T6, T7, and A8 in (B) and (D), those of T6, T10, T11, and T15 in (C), and those of T4, T5, A6, T10, T11, and A12 of the long fragment in (D) are omitted for clarity.

り結合するのは、平行型四重鎖 DNA の 3'末端 G カルテットであり、5'末端ではない。その理由は、次の通りに考えることができる。G カルテットの構造で、塩基部分だけを考えると、表側と裏側の区別はできないが、デオキシリボース環の配向も含めて考えると、表側と裏側に違いがあることが分かる(Figure 4)。平行型四重鎖 DNA の場合、4 つのリボース環の電子豊富な酸素原子(Figure 4A)はすべて 5'末端側に向く(Figures 4B & C)ため、それらの静電ポテンシャル(Figure 4D)がへム側鎖のプロピオン酸基の負電荷などと静電的に反発する。この反発を避けるため、へムは反対側の 3'末端側に結合すると考えられる。実際、3'末端側と 5'末端側それぞれに当該酸素原子が 2 つ存在する逆平行型四重鎖 DNA(Figure 3D)にはへムは結合しない[32]。なお、へムの分子構造はポルフィリン環の 5 位と 15 位の炭素原子を通る軸に関して擬 2 回回転

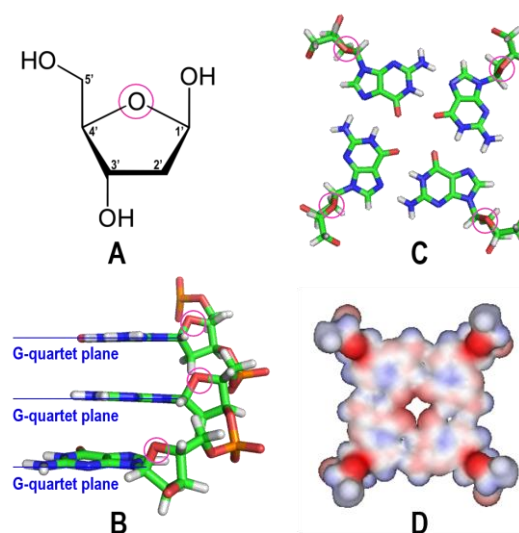


Figure 4. Molecular structure of deoxyribose (A), conformation of trinucleotide d(GGG) in a parallel G-quadruplex (B), and molecular structure and an electrostatic potential map of G-quartet, together with the deoxyribose moieties, in a parallel G-quadruplex DNA (C and D). In (A), (B), and (C), electron-rich ring oxygen atoms ($O_{\text{ring}}\text{s}$) are indicated by magenta circles. In (B), $O_{\text{ring}}\text{s}$ are on the 5-terminal side of the G-quartet plane. Due to the orderly arrangement of electron-rich $O_{\text{ring}}\text{s}$, with respect to the G-quartet plane, in a parallel G-quadruplex DNA, the electrostatic potential of the 5-terminal surface is highly negative, as indicated in red (D).

対称であるので(Figure 1A)、ヘムは G カルテットに対して“表と裏”の 2 通りの配向で結合する[27, 33]。

3. ヘムと四重鎖 DNA の複合体の触媒作用

D. Sen (Simon Fraser Univ. (カナダ))らは、DNA のランダムな塩基配列のライブラリを利用してヘム(Fe^{3+})に特異的に結合するアプタマー(Aptamer)を選び出すことに成功すると共に、DNA アプタマーとヘム(Fe^{3+})の複合体はヘムタンパク質類似の分光学的性質およびペルオキシダーゼ類似の酸化触媒作用を示すことを明らかにした[34-43]。D. Sen らのこの発見により、ヘムタンパク質においてヘムの機能がタンパク質との相互作用を通して調節されるように、四重鎖 DNA との相互作用によってもヘムの機能を調節することができることが実証され、ヘムと DNA の複合体を触媒(ヘム DNA 酵素)として応用する研究分野が開拓された。四重鎖 DNA は安定性が高く、80 °C以上の高温および有機溶媒との混合水溶液中でも利用可能[43]である上に、DNA 鑑定などで知られている通り、DNA の合成は簡便であることから、ヘム DNA 酵素は実用化の観点からも画期的な触媒であると言える。

まず、私共は、6mer がヘム(Fe^{3+})の酸化触媒活性に与える影響を計測した(Figure 2C)。なお、酸化触媒活性の計測は、Amplex red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine)を基質として用いて行った(Figure 2D) [44, 45]。Amplex red の酸化反応で生成する Resorufin(7-hydroxyphenoxazin-3-one)は波長約 570 nm に吸収を示すことを利用して Resorufin 濃度を決定した。そして、基質の酸化反応により生じる Resorufin の濃度の経時変化(Figure 5)を一次関数でフィッティングして得られた初速度(R_0)を指標として、酸化触媒活性を評価した。ヘム(Fe^{3+})単独でも Amplex red の酸化反応は進むが、6mer の添加により R_0 は約 6 倍に増大することが示され(Figure 5)、6mer への結合によりヘム(Fe^{3+})の酸化触媒活性が増大することが確認できた[44]。

4. ヘム DNA 酵素のヘムに軸配位子として結合する水分子

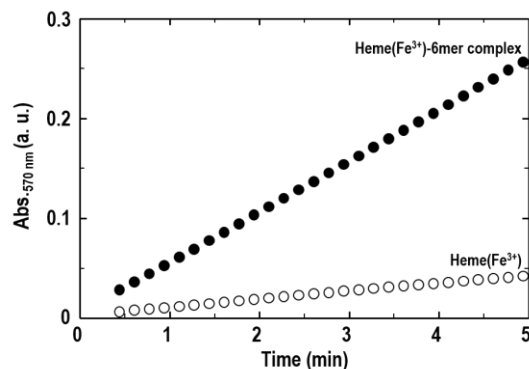


Figure 5. Time-evolution of 570-nm absorbance due to Resorufin produced from the oxidation of Amplex Red by heme(Fe^{3+}) in the absence (○) and presence of 1 equivalent $[\text{d}(\text{TTAGGG})_4$ (6mer) (●) in 300 mM KCl and 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.80, at 25 °C. The initial slope (R_0) of the plots for heme(Fe^{3+}) was increased by a factor of ~6 in the presence of 6mer.

ヘムタンパク質が示す多様な機能は、ヘムの電子構造およびヘム近傍の構造化学的環境により発現する。特に、ヘム鉄に結合する軸配位子の電子的性質は、ヘムの反応性に大きな影響を及ぼす。ヘム DNA 酵素(Figure 6A)のヘム鉄には特異な物理化学的性質をもつ水分子(H_2O)が軸配位子として結合しており(Figure 6B)、この水分子がヘム(Fe^{3+})の酸化触媒活性を増大している[33]。したがって、ヘムの触媒活性の変化は、四重鎖 DNA への結合のみによって生じる訳ではなく、G カルテットとヘムの間に存在し、ヘム鉄に結合する軸配位子により誘起されるのである[46]。

ヘム DNA 酵素のヘム(Fe^{3+})は、軸配位子として H_2O が 2 分子結合した六配位高スピン状態 ($S=5/2$)である(Figure 6C 左)。軸配位子として結合する 2 つの H_2O で、ヘムと G カルテットの疎水性接触界面に孤立する方を軸配位子 H_2O (AxH_2O)、ヘム平面を挟んで AxH_2O の反対側に存在する方を外部配位子 H_2O (ExH_2O)と呼んで区別する。ヘム DNA 酵素の AxH_2O は、ヘモグロビンやペルオキシダーゼなどにおける軸配位子ヒスチジン(軸配位子 His)に相当する役割を果たしている(後述)。 AxH_2O は疎水性空間に孤立することに加えて、酸素原子がヘム(Fe^{3+})に配位すると共に、水素原子 2 つは近接する G カルテットのカルボニル酸素原子と水素結合を形成

していると考えられる。 A_xH_2O は sp^2 混成軌道よりも sp^3 混成軌道によりヘム鉄に配位することが、ヘム(Fe^{2+})モデル化合物における計算化学により示された[27]。つまり、ヘム(Fe^{2+})と A_xH_2O の配位結合は、 Fe^{2+} の $3d_{z^2}$ 軌道への H_2O の σ 供与により形成する。さらに、 A_xH_2O の分極は通常の

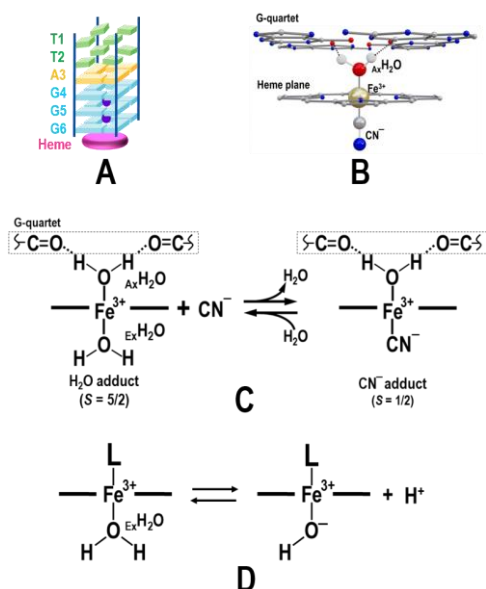


Figure 6. Schematic illustration of a heme(Fe^{3+})-6mer complex (A) and heme coordination structure in a cyanide ion (CN^-) adduct of the complex (B). In (B), axial H_2O (A_xH_2O) located in the hydrophobic interface between G6 G-quartet and heme is coordinated to heme(Fe^{3+}) and also forms hydrogen bonds with carbonyl oxygen atoms of the G-quartet. Only the porphyrin moiety of heme and four guanine bases of G-quartet are illustrated. Exchange reaction of external H_2O (ExH_2O) of the H_2O adduct with CN^- to form the CN^- adduct (C) and ionization of ExH_2O (D). In (D), L represents A_xH_2O . The equilibrium constant of the reaction is usually represented as “ pK_a ” in analogy with the ionization equilibrium of an acid. The pK_a can be used as a measure for assessment of electron density of the heme Fe atom (ρ_{Fe}) because the value decreases with decreasing ρ_{Fe} as a result of a decrease in the H^+ affinity of $ExOH^-$. In addition, apart from the ionization states of heme propionic side chains, heme(Fe^{3+}) with ExH_2O and $ExOH^-$ are cationic and neutral, respectively, and hence the latter is thought to be stabilized over the former in the hydrophobic heme environment, resulting in a decrease in the pK_a with decreasing polarity of the local heme environment.

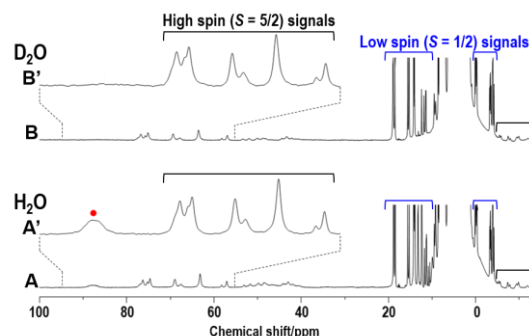


Figure 7. 600 MHz 1H NMR spectra of a heme(Fe^{3+})-6mer complex in the presence of 10 equivalent KCN in 90% H_2O /10% D_2O (A) or 100% D_2O (B), 200 mM KCl, and 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.85, at 25 °C. Portions, ~55–95 ppm, of the spectra of (A) and (B) are expanded in (A') and (B'), respectively. Since the time scale of the ligand exchange reaction between ExH_2O and CN^- (see Figure 6C) is slower than the NMR time scale, signals due to both the H_2O adduct with $S = 5/2$ and CN^- one with $S = 1/2$ are separately observed. Signals at ~88 ppm in (A'), indicated by a red circle, are assignable to A_xH_2O protons of the CN^- adduct.

水分子 H_2O より約 16 %大きいことが計算によって示され、水酸化物イオン(OH^-)の電子状態に近いことが示された。また、 H_2O の分極は、ヘム(Fe^{2+})への配位により約 3 %、Gカルテットのグアニン塩基のカルボニル酸素原子との 2 つの水素結合の形成により約 9 %、それぞれ増大することが示され、これらがそれぞれ単独で作用するよりも同時に作用する方が H_2O の分極の増大の程度が大きい、すなわち、 A_xH_2O の分極の増大は、ヘム(Fe^{2+})への配位と、カルボニル酸素原子への水素結合の相乗効果によることが示された。このような A_xH_2O の特異な電子状態は、ヘムのポルフィリン環とGカルテットの 2 つの π 平面に囲まれた疎水性環境により生み出されていると言える。 A_xH_2O のダイナミクスも特徴的である。 A_xH_2O は、ヘムおよびGカルテットの両方に関して、ヘム鉄との配位結合のまわりに回転している[27]。また、 A_xH_2O の水素交換は、著しく遅く、タイムスケールは $\ll 20 s^{-1}$ である[33]。このように、 A_xH_2O 分子は、フラーレン C_{60} 、 C_{70} のケージに内包された H_2O [47-49] などのように物理的に周囲から隔離されていないにも関わらず、水素交換が著しく遅いユニークな孤立 H_2O と見なすこと

ができ、さらなる物理化学的性質の解明が期待される。

ヘム DNA 酵素における A_xH_2O の検出は、 1H NMR により行った[33]。鉄三価高スピン状態($S = 5/2$)のヘム(Fe^{3+})と 6mer の複合体にシアニ化物イオン(CN^-)を添加すると、 A_xH_2O が保持された状態で、 E_xH_2O が CN^- に置換された鉄三価低スピン状態($S = 1/2$)の CN^- 付加物が生じる (Figures 6B & C)。このように、ヘム DNA 酵素では、 A_xH_2O に比べて、 E_xH_2O の置換は起こりやすい。例えば、ヘム(Fe^{3+})をもつヘム DNA 酵素にイミダゾール(Im)を添加すれば、 E_xH_2O が Im に置換された鉄三価低スピン状態($S = 1/2$)の Im 付加物が生成する[25]。また、一酸化炭素(CO)を吹き込んでヘム DNA 酵素のヘム鉄(Fe^{3+})を亜ジチオン酸ナトリウム $Na_2S_2O_4$ で還元すると、鉄二価低スピン状態($S = 0$)の CO 付加物が生成する[24, 26, 27]。

ヘム(Fe^{3+})をもつヘム DNA 酵素に CN^- が添加された場合、 E_xH_2O と CN^- の配位子交換反応 (Figure 6C) のタイムスケールは NMR のタイムスケールよりも遅いため、 1H NMR スペクトルには高スピン($S = 5/2$)と低スピン($S = 1/2$)それぞれの状態に対応する2組のシグナルが混在して観測される[33] (Figure 7)。そして、 CN^- 付加物の 1H NMR スペクトルで、約 88 ppm に常磁性シフトして観測されるシグナル(ほぼ等しい強度の2つのシグナルが重なっており、35 °C以上でそれらは分離して観測される)は、25 °Cでの線幅が約 2000 Hz であることからヘム(Fe^{3+})の近傍に存在するプロトンに由来することが明らかであると共に(Figure 7A'), 溶媒を重水 D_2O に置換することによりシグナルは消失することから(Figure 7B'), A_xH_2O のプロトンに由来すると帰属された[33]。

CN^- 付加物の 1H NMR スペクトルには、ヘム DNA 酵素における A_xH_2O とヘムの電子的相互作用が反映された[33] (Figure 8)。 CN^- 付加物のヘム側鎖メチルプロトン(CH_3)シグナルには、 A_xH_2O の水素(H)が重水素(D)に置換(H/D置換)されて生じる H_2O , HDO および D_2O それぞれの状態を反映する同位体シフトが観測された。この同位体シフトは、H/D置換が A_xH_2O の電子的性質に与える影響がヘム鉄からヘムのポルフ

リン環の π 電子系を介し、最終的には超共役により CH_3 水素原子の 1s 軌道に非局在化する不對電子密度に影響を与えることを示している。また、 A_xHDO に対応する CH_3 シグナルが観測されたことから、 A_xH_2O は単独で存在することも実証された。なお、観測された同位体シフトは約 0.03 ppm と小さいことから、ヘムの電子構造に著しく敏感な常磁性シフトしたシグナルでなければ、 A_xH_2O とヘムのこのようなユニークな電子的相互作用の検出は不可能であると言える。さらに、いずれの CH_3 シグナルでも、 A_xH_2O , A_xHDO , A_xD_2O それぞれの状態に対応するシグナルのシフト値の大小関係は、 $A_xH_2O < A_xHDO$

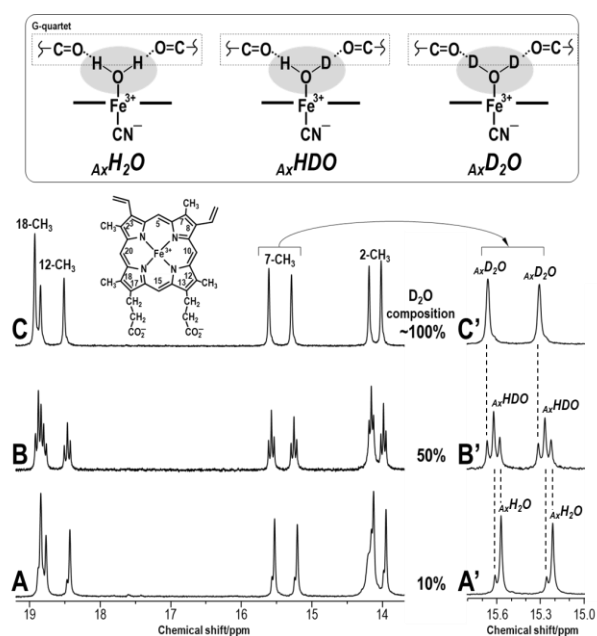


Figure 8. 600 MHz 1H NMR spectra, 13.7–19.2 ppm, of the CN^- adduct of the heme(Fe^{3+})-6mer complex in 200 mM KCl and 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.94–7.18, with various solvent D_2O (%): 10% (A), 50% (B), and ~100% (C), at 25 °C. The chemical shift ranges, 15.0–15.8 ppm, of traces (A)–(C) are expanded in traces (A')–(C'). Three resolved peaks associated with A_xH_2O , A_xHDO , and A_xD_2O , illustrated in the inset, were observed for each of the heme methyl proton signals. The doubling of heme methyl proton signals is due to the formation of two isomers possessing heme orientations differing by 180° rotation about the pseudo- C_2 axis, with respect to the interacting G-quartet. The structure of heme is also illustrated in the inset.

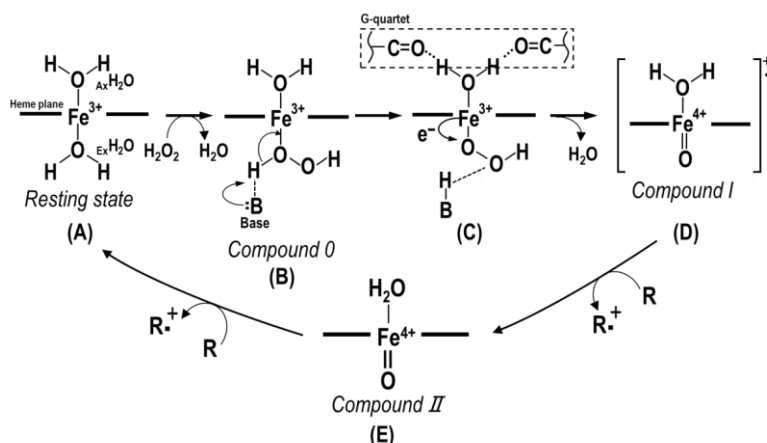


Figure 9. Catalytic cycle of a heme-DNAzyme. The catalytic cycle starts from the reaction of the ferric resting state (A) with hydrogen peroxide (H₂O₂) to form a ferric hydroperoxide intermediate named as compound 0 (B and C) and then a reactive oxoiron(IV) porphyrin π-cation radical species known as compound I (D) is produced. Compound I induces the first single-electron oxidation of a substrate (R) to form an oxoiron(IV) porphyrin species know as compound II (E), which returns to the ferric resting state (A) by the second single-electron oxidation of the substrate (R). In (B) and (C), B represents the base to promote the compound I formation, *i.e.*, adenine base in the heme-DNAzyme (see text).

< AxH₂O であることから、ヘム鉄への電子供与の程度は AxH₂O の場合が最も大きいことがわかる。

5. ヘム DNA 酵素の酸化触媒サイクル

ヘム DNA 酵素の酸化触媒サイクルの解明には、酸化反応活性種の特定が必要である。私共は、ヘム DNA 酵素の触媒サイクルで、Compound I と呼ばれる高い反応性をもつ反応中間体である、オキソ鉄四価ポルフィリン π カチオンラジカル錯体が生成することを明らかにした [50]。ヘム(Fe³⁺)をもつヘム DNA 酵素の電子スピン共鳴(ESR)スペクトルでは、典型的な六配位高スピン状態($S = 5/2$)のヘム(Fe³⁺)を反映するシグナルが g 値約 2 および約 6 に観測され、過酸化水素 H₂O₂ を添加すると $g = 2.00$ に Compound I に由来するシグナルが検出された。

ヘム DNA 酵素の酸化触媒サイクルで Compound I が生成するという知見に基づいて、ヘム DNA 酵素の触媒サイクルは本質的にペルオキシダーゼと同じであることが示された [50] (Figure 9)。まず、Resting state(A)の ExH₂O が H₂O₂ に置換され Compound 0(B)が生じ、ヘム鉄に結合した H₂O₂ の水素原子の引き抜き(B から C)および Fe³⁺から配位子への電子移動に伴う H₂O の放出(C から D)により Compound I(D)が

生成する。そして、Compound I(D)から Resting state(A)が再生される過程で、Compound II (E) を経由して基質(R) 2 分子が酸化される。この反応機構で、AxH₂O は弱いながらもヘム鉄に電子を供与することにより、ヘム鉄に結合した H₂O₂ の O-O 結合のヘテロリシスを促進し、その結果として、Compound I の生成が促進されると考えられる。

西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)では、ヒスチジン(His170)が軸配位子としてヘム鉄に結合し、ヘム平面を挟んで His170 の反対側のヘム鉄近傍には His42 およびアルギニン(Arg)38 が存在する [51] (Figure 10)。HRP における軸配位子 His170 は、アスパラギン酸(Asp)247 の側鎖との水素結合を通じた部分的な脱プロトン化によってイミダゾレートに近い状態にあるため、ヘム鉄への電子供与性が強く、Compound I 生成の促進に役立っている。また、His42 および Arg38 は、一般酸塩基触媒作用によりヘム鉄に結合した H₂O₂ の O-O 結合のヘテロリシスを促進する [52]。したがって、上述した通り、ヘム DNA 酵素における AxH₂O は、Compound I 生成において、HRP の His170 同様の電子的役割を果たしていると考えられる。そして、ヘム DNA 酵素のヘム近傍にアデニンの塩基が存在すれば、

その一般塩基触媒作用により、触媒活性は増大する(後述)。

6. ヘム DNA 酵素の酸化触媒活性に影響を与える因子

私共は、ヘムDNA酵素の酸化触媒活性に影響を与える因子として、ヘム鉄の電子密度(ρ_{Fe})とヘム近傍の構造化学的環境に着目し、それぞれが触媒活性に与える影響を解析すると共に、両者の触媒活性に対する影響における相乗効果の有無を解析した[45]。まず、 ρ_{Fe} は、ヘム(Proto)に加えて化学修飾ヘム 3,8-DMD および 2,8-DPF を利用して変化させた(Figures 11A, A' & A'') (以降、本節では Proto, 3,8-DMD および 2,8-DPF をひとまとめにしてヘムと呼ぶ)。これらのヘムの分子構造の違いは、ポルフィリン環に結合する2つの側鎖のみであり、Protoはビニル基、3,8-DMDはメチル基、2,8-DPFはトリフルオロメチル基(CF₃)をもつ。したがって、電子供与基のメチル基をもつ 3,8-DMD の ρ_{Fe} は、他の2種のヘムより大きいと考えられる。Proto の ρ_{Fe} は、ポルフィリン環の π 電子系に対するビニル基の配向に依存するが、ヘム DNA 酵素において G カルテットに π - π スタッキングする Proto では、ポルフィリン環とビニル基の2つの π 電子系は同一平面になるので、3,8-DMD よりも小さいと考えられる。さらに、電子求引性が強い CF₃をもつ 2,8-DPF の ρ_{Fe} は Proto よりも小さいと考えられる。したがって、 ρ_{Fe} の大小関係は 2,8-DPF < Proto < 3,8-DMD であると予想される[3, 4]。私共は、ヘ

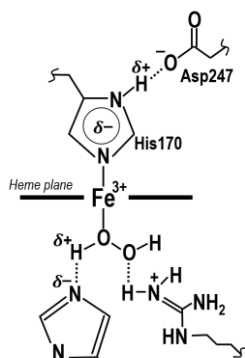
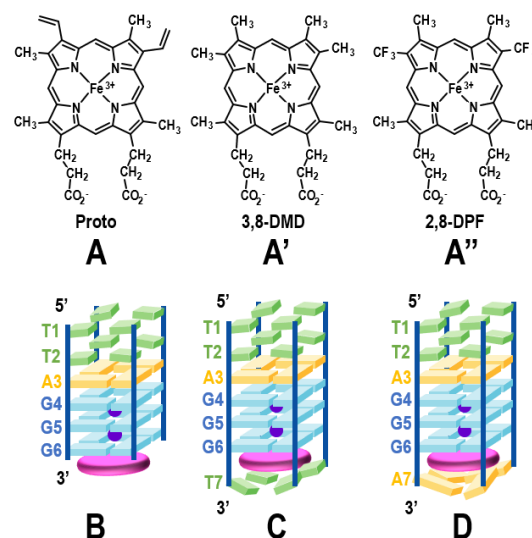


Figure 10. Schematic representation of the active site of horseradish peroxidase (HRP) involving in the “push-pull” mechanism [51].

ム DNA 酵素のヘム鉄(Fe^{3+})に結合する $\text{E}_x\text{H}_2\text{O}$

の電離反応の平衡定数($\text{p}K_a$)を指標として ρ_{Fe} を評価した[45] (Figure 6D)。ヘム(Fe^{3+})と 6mer の複合体の場合、2,8-DPF(Fe^{3+})、Proto(Fe^{3+})、3,8-DMD(Fe^{3+})それぞれの $\text{p}K_a$ は、 9.20 ± 0.02 、 8.91 ± 0.04 、 8.30 ± 0.05 と決定され、 ρ_{Fe} の大小関係が予想通りであることが確認できた。

ヘムDNA酵素におけるヘム近傍の構造化学的環境の評価にも、 $\text{p}K_a$ を指標として使うことができる[43]。6merの場合と同様に、[d(TTAGGGT)]₄ (6mer/T)、[d(TTAGGGA)]₄ (6mer/A)いずれに対しても、ヘムは3'末端 G カルテットの3'末端側に特異的にスタッキングして複合体を形成する。つまり、ヘムは、6mer/T では G6 と T7 の塩基の間、6mer/A では G6 と A7 の塩基の間に結合する(Figures 11B, C & D)。3,8-DMD(Fe^{3+})と 6mer、6mer/T、6mer/A それぞれの複合体の $\text{p}K_a$ は、それぞれ 9.20 ± 0.02 、 9.39 ± 0.01 、 9.93 ± 0.02 であり、6mer/T の複合体の $\text{p}K_a$ が 6mer の複合体よりも小さい理由としては、前者ではヘムが G6 G カルテットと T7 塩



基の間の疎水性空間に存在することが考えられ

Figure 11. Molecular structures of heme(Fe^{3+}) (Proto) (A), 3,8-dimethyldeutero-porphyrinatoiron(III) (3,8-DMD(Fe^{3+})) (A'), and 13,17-bis(2-carboxylatoethyl)-3,7,12,18-tetramethyl-2,8-bis(trifluoromethyl)-porphyrinatoiron(III) (2,8-DPF(Fe^{3+})) (A''), and schematic representation of complexes between heme and parallel G-quadruplex DNAs [d(TTAGGG)]₄ (6mer), [d(TTAGGGT)]₄ (6mer/T), and [d(TTAGGGA)]₄ (6mer/A), i.e., heme-6mer (B), heme-6mer/T (C), and heme-6mer/A complexes (D), respectively.

る。そして、6mer/A の複合体の pK_a がさらに小さい理由は、ヘムが G6 G カルテットと A7 塩基の間の疎水性空間に存在することに加えて、 ExH_2O が A7 塩基と水素結合を形成することが考えられる。

私共は、Figure 11 に示すヘムと四重鎖 DNA それぞれ 3 種の組合せで調製できる複合体 9 種について、 pK_a と酸化触媒活性の関係を解析した[45] (Figure 12)。まず、複合体を形成する四重鎖 DNA が同じであれば、触媒活性の大小関係は 2,8-DPF < Proto < 3,8-DMD であること、つまり p_{Fe} の大小関係と同一であることが示された。ペルオキシダーゼでは軸配位子からヘム鉄への電子供与が Compound I 生成の促進に寄与していることを考慮すると、複合体では p_{Fe} が大きい程触媒活性が大きいという結果は予想通りであると言える。また、いずれのヘムでも、触媒活性の大小関係は 6mer/T の複合体 < 6mer の複合体 < 6mer/A の複合体であった。6mer/T の複合体の触媒活性が 6mer の複合体よりも小さい理由としては、T7 塩基の立体障害によりヘムへの基質の接近が妨げられることが考えられる。また、6mer/A の複合体の触媒活性が大きいのは、A7 塩基が一般塩基触媒として作用し、Compound I の生成を促進するからであると考えられる。最後に、同一四重鎖 DNA でヘムが異なる複合体 3 種についての pK_a に対する酸化反応の初速度のプロットは右上がりの直性に載り、その直線の傾きは四重鎖 DNA には依存しないことが明らかになった。この結果は、 p_{Fe} の変化を通じた電子的影響とヘム近傍の構造化学的環境は、それぞれ独立して複合体の酸化触媒活性の調節に作用することを示している。したがって、ヘム DNA 酵素では、ペルオキシダーゼにおいて“Push-Pull”機構[53, 54]として知られる軸配位子からヘム鉄への“Push”機構とヘム近傍の一般酸塩基触媒作用による“Pull”機構の相乗効果による Compound I 生成の促進は観測されなかった。

7. 結語

本稿では、ヘムと四重鎖 DNA の複合体の立体構造と酸化触媒作用の分子機構について紹

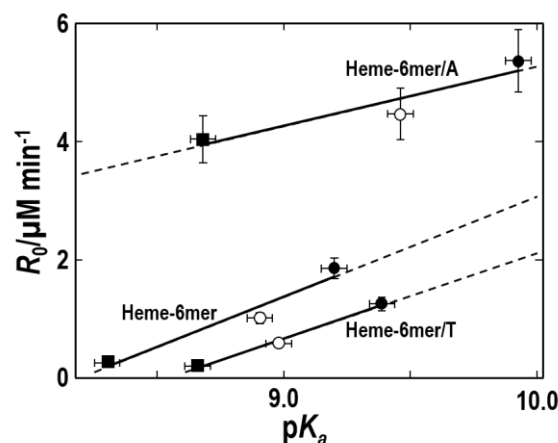


Figure 12. Plots of the initial slope (R_0), as a measure for the peroxidase activity, against the pK_a s, as a measure for the p_{Fe} , (pK_a - R_0 plots) of the heme(Fe^{3+})-6mer, heme(Fe^{3+})-6mer/T, and heme(Fe^{3+})-6mer/A complexes; 3,8-DMD (●), Proto (○), and 2,8-DPF (■) [45]. The similarity in the slope for the pK_a - R_0 plots among the three systems indicated that the “push mechanism” in the heme(Fe^{3+})-DNA complex is independent of the local heme environment.

介した。現生生物に存在するペルオキシダーゼの酸化触媒サイクルと本質的に同一の反応機構がヘムと四重鎖 DNA の複合体で実現されていることが明らかとなったことから、ヘム DNA 酵素も、ヘムタンパク質のような高い触媒活性を示す可能性が示された。今後、ヘム DNA 酵素におけるヘム近傍の構造化学的環境のさらなる多様化が実現できれば、ヘム DNA 酵素は思いもかけない触媒活性や機能を示すことが期待できると共に、原始地球上で無生物的に合成されたヘムのような錯体が生命誕生の一翼を担っていた可能性を検証することもできると考えられる。また、ヘムは遺伝情報の伝達においても重要な役割を担っていることが明らかになりつつあることから、私共の研究により解明されたヘムと核酸の特異的な結合は、遺伝子の発現制御におけるヘムの役割のさらなる理解にも有用であると考えられる。さらに、G カルテットには、ヘムだけでなく、環状テトラピロール類の分子骨格をもつポルフィリンやフタロシアニンなども特異的に結合することが明らかになっていることから、がんの治療法として期待されている光線力学療法 (PDT) の光増感剤として有用な四重鎖 DNA を

標的とする環状テトラピロール類の分子設計にも本研究が役立つこと示されている[55, 56]。ヘムとグアニン四重鎖の相互作用の研究が拓く生物科学と物質科学の今後の発展に期待したい。

8. 謝辞

本稿で紹介した研究成果は、筑波大学生物無機化学研究室のスタッフと学生、根矢三郎千葉大学名誉教授、鈴木秋弘長岡工業高等専門学校教授、筑波大学の小島隆彦教授および小谷正弘博士をはじめとする多くの共同研究者の方々の長年にわたる日々の努力の賜物であります。ここに心よりの謝意を表したいと思えます。また、長年にわたって研究をサポートいただいた文部科学省および日本学術振興会に感謝いたします。

参考文献

1. L. T. Gray, E. P. Lombardi, D. Verga, A. Nicolas, M. Teulade-Fichou, A. Londoño-Vallejo, N. Maizels, *Cell Chem. Biol.*, **2019**, 26, 1681.
2. G. Canesin, A. Di Ruscio, M. Li, S. Ummerino, A. Hedblom, R. Choudhury, A. Krzyzanowska, E. Csizmadia, M. Palominos, A. Stiehm, A. Ebraldize, S. Chen, M. A. Bassal, P. Zhao, E. Tolosano, L. Hurley, A. Bjartell, D. G. Tenen, B. Wegiel, *Cell Rep.*, **2020**, 32, 108181.
3. T. Shibata, S. Nagao, M. Fukaya, H. Tai, S. Nagatomo, K. Morihashi, T. Matsuo, S. Hirota, A. Suzuki, K. Imai, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 6091.
4. T. Shibata, D. Matsumoto, R. Nishimura, H. Tai, A. Matsuoka, S. Nagao, T. Matsuo, S. Hirota, K. Imai, S. Neya, A. Suzuki, Y. Yamamoto, *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 11955.
5. M. Watanabe, Y. Kanai, S. Nakamura, R. Nishimura, T. Shibata, A. Momotake, S. Yanagisawa, T. Ogura, T. Matsuo, S. Hirota, S. Neya, A. Suzuki, Y. Yamamoto, *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 14269.
6. A. J. Zaug, M. D. Been, T. R. Cech, *Nature*, **1986**, 324, 429.
7. D. Sen, W. Gilbert, *Nature*, **1988**, 334, 364.
8. R. W. Frenck. Jr., E. H. Blackburn, K. M. Shannon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 5607.
9. H. J. Lipps, D. Rhodes, *Trends Cell Biol.*, **2009**, 19, 414.
10. G. Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.*, **2013**, 5, 182.
11. V. S. Chambers, G. Marsico, J. M. Boutell, M. Di Antonio, G. P. Smith, S. Balasubramanian, *Nat. Biotechnol.*, **2015**, 33, 877.
12. W. Gilbert, *Nature*, **1986**, 319, 618.
13. P. Rothmund, *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, 58, 625.
14. Y. Yamamoto, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, **1998**, 36, 1.
15. K. Saito, H. Tai, H. Hemmi, N. Kobayashi, Y. Yamamoto, *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 8168.
16. Y. Yamamoto, H. Araki, R. Shinomiya, K. Hayasaka, Y. Nakayama, K. Ochi, T. Shibata, A. Momotake, T. Ohyama, M. Hagihara, H. Hemmi, *Biochemistry*, **2018**, 57, 5938.
17. K. Hayasaka, T. Shibata, A. Sugahara, A. Momotake, T. Matsui, S. Neya, T. Ishizuka, Y. Xu, Y. Yamamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2020**, 93, 621.
18. A. T. Phan, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 15021.
19. W. Fu, H. Jing, X. Xu, S. Xu, T. Wang, W. Hu, H. Li, N. Zhang, *Nucleic Acids Res.*, **2021**, 49, 10717.
20. Y. Wang, D. J. Patel, *Biochemistry*, **1992**, 31, 8112.
21. T. Mikuma, T. Ohyama, N. Terui, Y. Yamamoto, H. Hori, *Chem. Commun.*, **2003**, 1708.
22. Y. Kato, T. Ohyama, H. Mita, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 9980.
23. T. Ohyama, Y. Kato, H. Mita, Y. Yamamoto, *Chem. Lett.*, **2006**, 35, 126.
24. K. Saito, H. Tai, M. Fukaya, T. Shibata, R. Nishimura, S. Neya, Y. Yamamoto, *J. Biol.*

- Inorg. Chem.*, **2012**, *17*, 437.
25. Y. Suzuki, H. Tai, K. Saito, T. Shibata, M. Kinoshita, A. Suzuki, Y. Yamamoto, *J. Porphyr. Phthalocyanines*, **2014**, *18*, 741.
26. H. Shimizu, H. Tai, K. Saito, T. Shibata, M. Kinoshita, Y. Yamamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2015**, *88*, 644.
27. Y. Yamamoto, M. Kinoshita, Y. Katahira, H. Shimizu, Y. Di, T. Shibata, H. Tai, A. Suzuki, S. Neya, *Biochemistry*, **2015**, *54*, 7168.
28. M. Kinoshita, S. Takaya, T. Shibata, H. Hemmi, Y. Yamamoto, *Chem. Lett.*, **2015**, *44*, 1107.
29. T. Shibata, Y. Nakayama, Y. Katahira, H. Tai, Y. Moritaka, Y. Nakano, Y. Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta*, **2017**, *1861*, 1264.
30. M. Uchiyama, C. Okamoto, A. Momotake, T. Ikeue, Y. Yamamoto, *J. Inorg. Biochem.*, **2020**, *213*, 111270.
31. H. Araki, S. Hagiwara, R. Shinomiya, A. Momotake, H. Kotani, T. Kojima, T. Ochiai, N. Shimada, A. Maruyama, Y. Yamamoto, *Biomater. Sci.*, **2021**, *9*, 6142.
32. C. Okamoto, A. Momotake, Y. Yamamoto, *J. Inorg. Biochem.*, **2021**, *216*, 111336.
33. Y. Nakajima, A. Momotake, A. Suzuki, S. Neya, Y. Yamamoto, *Biochemistry*, **2022**, *61*, 523.
34. Y. Li, D. Sen, *Chem. Biol.*, **1998**, *5*, 1.
35. P. Travascio, Y. Li, D. Sen, *Chem. Biol.*, **1998**, *5*, 505.
36. D. Sen, C. R. Geyer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1998**, *2*, 680.
37. P. Travascio, A. J. Bennet, D. Y. Wang, D. Sen, *Chem. Biol.*, **1999**, *6*, 779.
38. P. Travascio, P. K. Witting, A. G. Mauk, D. Sen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 1337.
39. P. K. Witting, P. Travascio, D. Sen, A. G. Mauk, *Inorg. Chem.*, **2001**, *40*, 5017.
40. P. Travascio, D. Sen, A. J. Bennet, *Can. J. Chem.*, **2006**, *84*, 613.
41. L. C.-H. Poon, S. P. Methot, W. Morabi-Pazooki, F. Pio, A. J. Bennet, D. Sen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 1877.
42. D. Sen, L. C. Poon, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **2011**, *46*, 478.
43. T. D. Canale, D. Sen, *Biochim. Biophys. Acta*, **2017**, *1861*, 1455.
44. R. Shinomiya, Y. Katahira, H. Araki, T. Shibata, A. Momotake, S. Yanagisawa, T. Ogura, A. Suzuki, S. Neya, Y. Yamamoto, *Biochemistry*, **2018**, *57*, 5930.
45. S. Hagiwara, A. Momotake, T. Ogura, S. Yanagisawa, A. Suzuki, S. Neya, Y. Yamamoto, *Inorg. Chem.*, **2021**, *60*, 11206.
46. N. Shumayrikh, Y. C. Huang, D. Sen, *Nucleic Acids Res.*, **2015**, *43*, 4191.
47. S. Iwamatsu, T. Uozaki, K. Kobayashi, S. Re, S. Nagase, S. Murata, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 2668.
48. K. Kurotobi, Y. Murata, *Science*, **2011**, *333*, 613.
49. R. Zhang, M. Murata, T. Aharen, A. Wakamiya, T. Shimoaka, T. Hasegawa, Y. Murata, *Nat. Chem.*, **2016**, *8*, 435.
50. R. Shinomiya, H. Araki, A. Momotake, H. Kotani, T. Kojima, Y. Yamamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2019**, *92*, 1729.
51. M. Gajhede1, D. J. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith, T. L. Poulos, *Nat. Struct. Biol.*, **1997**, *4*, 1032.
52. G. I. Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szöke, A. Henriksen, J. Hajdu, *Nature*, **2002**, *417*, 463.
53. T. H. Yosca, J. Rittle, C. M. Krest, E. L. Onderko, A. Silakov, J. C. Calixto, R. K. Behan, M. T. Green, *Science*, **2013**, *342*, 825.
54. X. Wang, R. Ullrich, M. Hofrichter, J. T. Groves, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2015**, *112*, 3686.
55. M. Uchiyama, A. Momotake, T. Ikeue, Y. Yamamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2020**, *93*, 1504.
56. C. Okamoto, A. Momotake, M. Kobayashi, Y. Yamamoto, *Chem. Lett.*, **2021**, *50*, 1278.