

ヒスチジンを含んだペプチド銅(II)錯体によるDNAの酸化的切断反応

研究代表者 千喜良誠 研究員

1. ヒスチジンを含んだペプチド金属錯体はヒスチジンの特異的な金属配位結合により、DNAとの結合様式がアミノ酸配列によって多様に変化する。本報告ではこれまでDNAファイバーESRの測定により明らかとなったFig. 1に示したペプチド銅(II)錯体の結合構造の多様性と酸化的切断反応との関連を総括する。

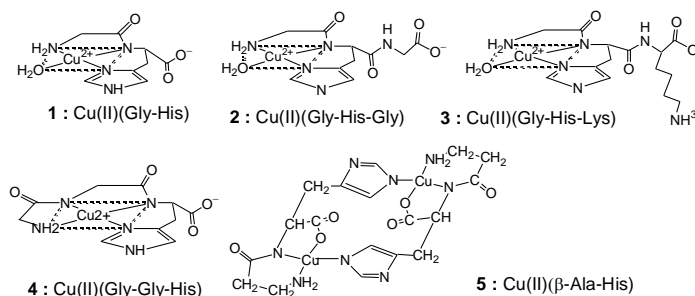


Fig. 1. Cu(II) peptide complexes.

2. DNAファイバーESRスペクトルによるペプチド銅(II)錯体とDNAとの結合構造の多様性の解析

ペプチド銅(II)錯体は一般にFig. 1に示した平面型の配位構造をとるが、錯体がDNAに結合すると、その配位面に垂直な軸とDNA二重らせん軸のなす角度(θ)によってESR線形はFig. 2のように変化する。ここで Φ はDNAファイバー軸と磁場のなす角度である。通常のアミノ酸やジペプチド銅(II)錯体では $\theta=0^\circ$ のときの線形に近い Φ 依存性を示すが、錯体1~3は $\theta=90^\circ$ の場合に対応したスペクトルを示し、銅(II)配位面がDNA二重らせん軸に平行に結合していることを示す。ただし錯体1は配向の乱雑さが2や3に比べて著しく大きい。ヒスチジンがC末端に位置するトリペプチドは錯体4のように4座配位となり、錯体はDNAの副溝に結合し、 $\theta=45^\circ$ の場合に近いスペクトルになる。一方、錯体5は溶液中で二核錯体を形成するが、DNAと結合すると一部単核錯体に解離する。二核錯体として結合している成分では、Cu-Cu軸は二重らせん軸と平行に近く配向する。

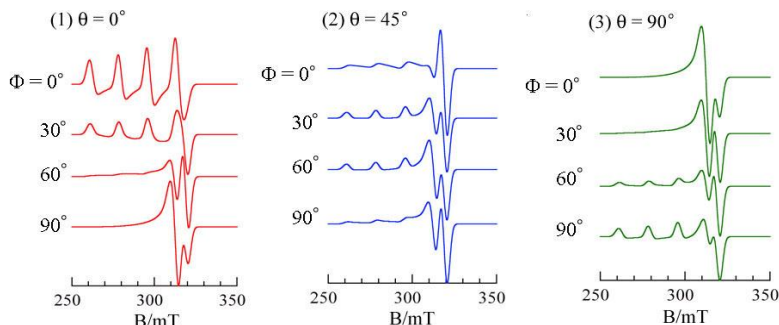


Fig. 2. Calculated ESR spectra of Cu(II) complexes oriented in DNA fiber.

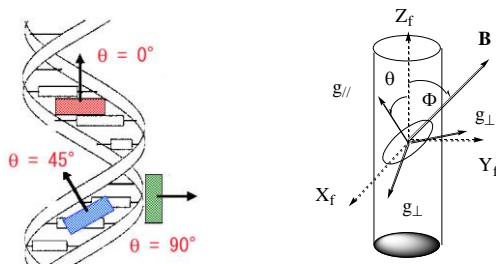


Fig. 3. $g_{//}$ axis of Cu(II) complex oriented in DNA fiber.

Fig. 4. Orientations of fiber axis (Z_f), magnetic field (B), and g tensor axes.

3. 過酸化水素存在下におけるDNAの酸化的切断反応

切断活性はアミノ酸配列により大きく変化する。錯体の濃度が低く配位子が過剰に存在するとき ($[\text{complex}]:[\text{DNA-bp}]=1:1$, $[\text{Cu}^{2+}]:[\text{peptide}]=1:2$)、二核錯体5のみで切断が進行した。錯体の濃度を2倍に増加させると (Fig.5(a)), 錯体3の切断活性が急激に増加し、ついで錯体4の切断活性が顕著に増加した。一方錯体1および2では切断活性はあまり増加していない。さらにFig.5(b)に示したように、錯体3は敏感に Cu^{2+} の濃度と配位子の濃度により活性が変化するが、錯体2は顕著な切断活性を示さない。錯体2と3は同様な結合様式でDNAに結合することがESRから示されているので、この切断活性の違いは、リシン側鎖の正電荷の効果によるDNAへの結合量の差と推定される。一方、錯体4や5では錯体2や3に比べ、DNA上で Cu^{2+} への解離が進行しやすいことから、切断活性が配位子濃度により大きく変化したものと考えられる。基本的には本研究で用いたペプチドはいずれも水和銅(II)イオンによる切断を阻害する機能を持ち、その機能には、DNAと錯体の結合制御と活性酸素の阻害の二つの要素が含まれることが明らかとなった。

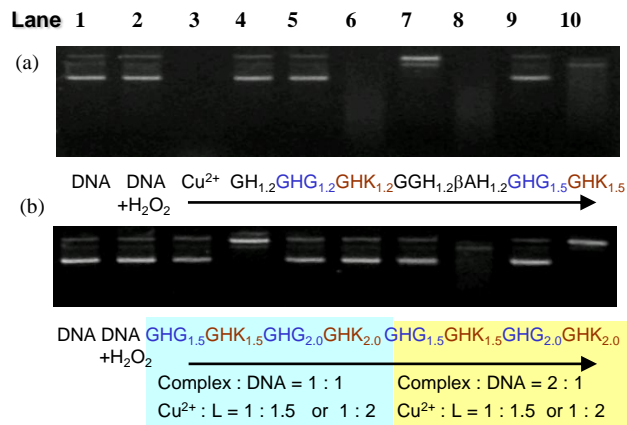


Fig. 5. Oxidative cleavage of pBR322(5 μM) in 10 mM-HEPES (pH7.4) with H_2O_2 (100 μM) and Cu(II)peptides. Reaction time 30 min. (a) $[\text{complex}]:[\text{DNA-bp}]=2:1$, $[\text{Cu}^{2+}]:[\text{peptide}]=1:1.2$ or $1:1.5$. (b) The comparison of complex 2 and 3 at various conditions.