論文　**Original Paper**

アデニンからヒポキサンチンへの脱アミノ化反応の理論的研究

小田井　圭*・梅崎　馨章*

Theoretical study of reaction coordinates from adenine to hypoxanthine

Kei Odai* and Keisho Umesaki*

Abstract: In the 1960s, Löwdin proposed a model for base pair mutations in DNA [*Rev. Mod. Phys.* 1963, 35, 724-732]. It was that tautomerization by double proton transfer (DTP) of base pairs causes transition after replication. We investigated the possibility of DPT occurring in A-T (adenine-thymine) base pairs in Watson-Crick type DNA. However, it was found that A-T base pairs have a low probability of DPT [*J. Phys. Chem. B* 2020, 124, 1715-1722]. Therefore, we are currently focusing on the fact that adenine is deaminated and converted to hypoxanthine. We suspect that the formation of hypoxanthine-thymine base pairs may be the cause of the transition of A-T base pairs. In this report, as the first step of our study, the reaction pathway in which adenine is converted to hypoxanthine by deamination was investigated by the density functional theory and transition state theory. As a result, it was found that the model consisting of adenine and one molecule of water has a low probability of transitioning to hypoxanthine by the deamination reaction.

Key words: base pair, deamination, adenine, hypoxanthine, intrinsic reaction coordinate

1. はじめに

DNAはプリン塩基であるアデニン（A）とグアニン（G）およびピリミジン塩基であるチミン（T）とシトシン（C）からなり，AはTと，GはCと塩基対を作り2重らせん構造を形成している。生理的な条件下において，細胞DNA中のアデニン（adenine）とシトシンのアミノ基は脱アミノ化反応をおこし，それぞれヒポキサンチン（hypoxanthine）とウラシルへと変化することが知られている。アデニンがヒポキサンチンへと変化する反応式は

$$\text{adenine} + H_2O \longrightarrow \text{hypoxanthine} + NH_3$$

である。

本来DNA中のAであった部分に生成したこのヒポキサンチンは，特異的なDNA N-グリコシラーゼにより除去される仕組みが備わっている。その結果，塩基が失われた脱塩基部位（apurinic/apyrimidinic sites；AP部位）が形成される。また，除去されずに残ったヒポキサンチンは複製されると，TではなくCと塩基対を形成する。そのため，元々A-Tペアだった部分が複製を経るとG-Cペアへ変異（transition）するものが現れることになる。塩基の脱アミノ化反応はDNAの突然変異や細胞死の原因の一つとなることが報告されている[1-4]。

塩基配列の変異については，2017年のScience誌に「ヒトがん細胞のDNA変異の原因は3分の2が塩基配列の突然変異であり，体外から入って来る発がん性化学物質や紫外線などの環境因子ではない」という報告が掲載された[5]。一方生体には，ダメージを受けた塩基を修復する機構も備わっており，この修復機構の研究成果は2015年のノーベル賞に繋がっている[6]。修復機構の存在にもかかわらず細胞のがん化はなぜ起こるのだろうか？

我々はDNA塩基対の変異の原因について，プロトン移動というミクロな現象に着目して，理論的なアプローチにより研究してきている。これまでに，(i) Watson-Crick G-C塩基対からG*-C*塩基対（G-C塩基対が二重プロトン移動（DPT）した塩基対）へ変化するプロセスを化学反応と見なし，G-Cから遷移状態を経てG*-C*へ至る反応座標（IRC：Intrinsic Reaction Coordinate）を決定した。同様に，A-Tから遷移状態を経てA*-T*（A-T塩基対が二重プロトン移動した塩基対）へ至るIRCも決定した；(ii) 遷移状態理論に基づいて反応速度定数を求め，反応によるG*-C*塩基対のモル濃度変化そしてA*-T*塩基対のモル濃度変化をそれぞれ計算した。これらの計算から次のことが明らかになった：G-C塩基対はDPTに起因する変異が起こる可能性が高く，しかもG*-C*塩

* School of Science and Engineering, Kokushikan University, Setagaya-ku, Tokyo 154-8515, Japan

基対は安定した分子構造を形成する。しかしA-T塩基対の場合は，DPTに起因する変異が起こる可能性は極めて低く，変異にはDPT以外のメカニズムが働いている可能性がある。このようにG-C塩基対については，DPTによる変異の可能性が示されたので，図1で示すG-C塩基対がDPTと2回の複製を経てA-T塩基対へ変異する確率を求め，それについて報告した[7]。

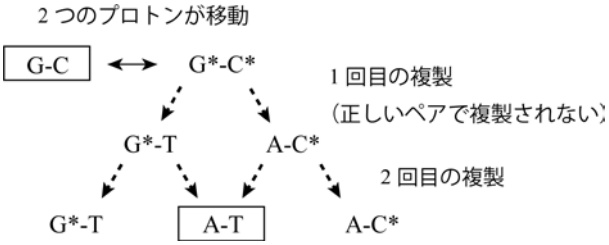

図1　Watson-Crick like base pairs appearing within twice replications from a G-C base pair by double proton transfers.

一方，A-T塩基対の変異はDPTのみのメカニズムではない可能性があるため，我々は今回，先述したアデニンがヒポキサンチンに変化するという事実に注目した。そこで，本論文では，アデニン分子が水分子と反応してヒポキサンチンへと変化する脱アミノ化反応の可能性について調査した。この反応の可能性について論じるために，密度汎関数法により反応座標を求め，遷移状態理論に基づきその遷移確率を求めた。その結果，アデニンと水1分子のモデルでは脱アミノ化反応の遷移確率は低いことが分かったので報告する。

2. 計算方法

全ての計算は，国士舘大学理工学部で導入したスーパーコンピュータSX-Aurora TSUBASAを利用した。計算には計算科学用ソフトウェアGaussian09[8]を利用し密度汎関数法（Density Functional Theory, DFT）法を採用した。交換汎関数と相関汎関数の組合わせはB3LYP（Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr）を用いた。基底関数系は6-311++g（d, p）を使用した。分子間の相互作用を扱うため，基底関数には分極関数だけでなく分散関数も考慮している。計算は全て気相中でのものである。

計算に用いたモデル構造を図2に示す。本来ヒポキサンチンでは1位の窒素に水素が結合している。図2に示す生成物ヒポキサンチン*は，その水素が6位に結合した酸素に結合してヒドロキシル基（水酸基）となった構造を持つ。DNA中のA-Tペアを組んだ状態でAが脱アミノ化すると，Tの相手としてポキサンチン*がWatson-Crick型の塩基対構造を保つことが可能である。今後の研究で塩基対のDPTを扱うことを想定しているため，今回は脱アミノ化の生成物としてヒポキサンチン*となる反応モデルを扱うことにした。

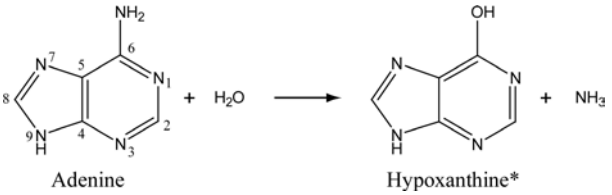

図2　Chemical reaction formula from adenine to hypoxanthine* by deamination.

図2の化学反応の反応座標を求めた後，遷移状態理論に基づき遷移確率を求めた。この反応のアデニン＋H_2Oを反応物と，ヒポキサンチン*＋NH_3を生成物とみなして，それぞれのモル濃度を［R］，［P］と表すと，遷移確率は

$$\frac{[P]_t}{[R]_0} = \frac{k_f}{k_f + k_r}\left[1 - e^{-(k_f + k_r)t}\right]. \tag{1}$$

で求められる。ここで，$[P]_t$は生成物の時刻tにおける濃度，$[R]_0$は初期時刻（$t = 0$）の反応物のモル濃度である。また，k_f，k_rはそれぞれ順反応速度定数と逆反応速度定数で，

$$k_\alpha = \kappa \frac{k_B T}{h} \frac{Z_{\mathrm{TS}}^{\ddagger}}{Z_\alpha} \exp\left(-\frac{E_\alpha}{k_B T}\right). \tag{2}$$

で表わされる。ここに$\alpha = f$は順反応を，$\alpha = r$は逆反応を表す。k_Bはボルツマン定数をそしてTは絶対温度を表す。そしてE_fは反応物と遷移状態との間のエネルギー差を，E_rは生成物と遷移状態との間のエネルギー差を表す。κはトンネル因子を表す。また$Z_{\mathrm{TS}}^{\ddagger}$は遷移状態の分配関数を，$Z_f$と$Z_r$はそれぞれ反応物と生成物の分配関数を表す。これらの分配関数は量子統計力学によるものを用いる[9]。トンネル因子κはIRC計算で得られたポテンシャル頂上付近の形状を考慮し，Wignerポテンシャル[10]を用いた。

3. 結　　果

(1) 反応座標

計算により得られた反応座標を図3に示す。反応機構は，(a) まず，H_2Oがアデニンのプリン骨格側面よりC6に近づき，その一つのプロトンをC6に結合しているアミノ基へ渡す。(b) OH^-が更にC6に近づくと共にNH_3がC6から外れる。(c) OH^-がC6に結合し，NH_3はC6から遠ざかる。(d) C6の横に結合したOH基がその位置をプリン骨格平面内へ向きを変えてヒポキサンチン*となる。という順序であった。

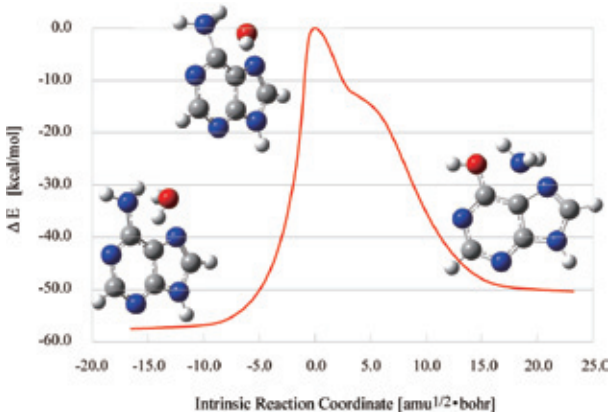

図3　Potential energy curve along the IRC of chemical reaction by deamination. The vertical axis represents energy with the transition state structure as the origin. The horizontal axis is the IRC with the transition state structure as the origin. The structures for the reactant (adenine+H_2O), product (hypoxanthine*+NH_3), and transition states are also depicted.

活性化エネルギーE_fは57.5kcal/molで，逆活性化エネルギーE_rは50.4kcal/molであった。E_rは熱エネルギー（300K）より84.5倍大きい。この値は，生成物であるヒポキサンチン*+NH_3が安定して存在することを表す。また，exp（$-E_f/k_BT$）は2.04×10^{-37}であった。活性化エネルギーは，Zhuらが報告している値[11]とほぼ同じであった。

遷移状態の構造を図4に示す。一般的に，アデニンの脱アミノ化反応では中間体としてC6にヒドロキシル基とアミノ基を持った四面体中間体（THI）構造を持つと考えらえている。我々の計算では，遷移状態でC6-O-N-Hがほぼその様な構造を取っていることが観察された。

(2)　遷移確率

表1にT＝300Kにおける脱アミノ化反応の遷移確率，反応速度定数，$\frac{Z^{\ddagger}_{TS}}{Z_{\alpha}}$，トンネル因子$\kappa$の値を示す。また，図5に式（1）より求めた遷移確率の時間変化を示した。

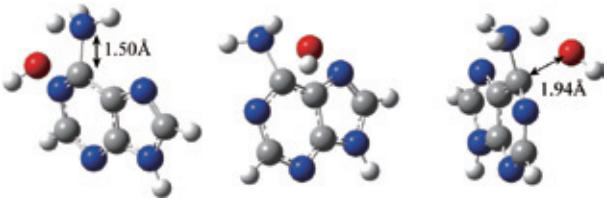

図4　Structure of transition state

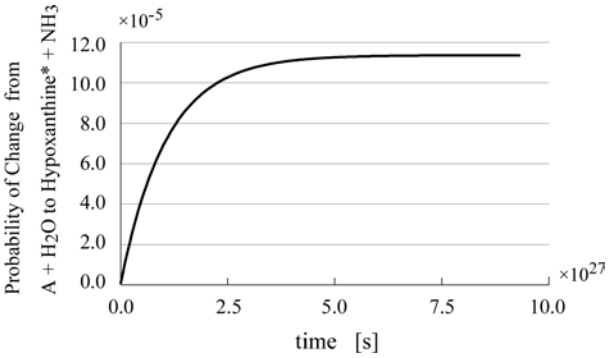

図5　Transition probability

アデニン+H_2O→ヒポキサンチン*+NH_3の反応が起こる確率は10^{-4}程度であるが，この値に達するまでには～10^{27}秒（～10^{19}年）かかる。確率が10^{-8}になる時間でも～10^{11}年であるため，この反応は現実的ではない結果となった。時間がかかる原因は，50kcal/molを越える活性化エネルギーの大きさである。

4. ま と め

AlrawashdehらはアデニンとOH^-およびnH2O（n＝0，1，2，3）の脱アミノ化反応について5つの経路を調査し，妥当なメカニズムは，アデニンと3H_2Oの脱アミノ化反応であると結論付けている[12]。しかし，活性化エネルギーE_fは70kcal/molである。Zhangらは B3LYP/6－31G** レベルの計算で，水分子が3または4つの場合，脱アミノ化反応が進行できると報告している[13]。この場合も，40kcal/molを越える活性化エネルギーであった。Wangらはアデニンと2分子の水モデルで溶媒効果を含めると遷移状態のエネルギーが下がることを報告している[14]。いずれの報告も，遷移確率を求めていない。

今回，我々はアデニンと1分子の水とのモデルで脱アミノ化反応を理論的に検討した。アデニンが水分子と反応してヒポキサンチン*とNH_3へ変化する反応座標を求めた。得られた反応座標より，この反応の遷移確率も算出した。その結果，活性化エネルギーが大きいためこの反応経路では反応が起こる可能性が低いことが分かった。

今後は，DNA2重らせん中のA-T塩基対という環境下での反応を検討する。反応に関与する水分子の数を増やすことも検討するとともに，アデニンの周りの環境を考慮するためQM/MM法による計算を実施してIRCを求める。その結果から，アデニンの脱アミノ化反応の可能性を調査する予定である。

表1　Transition probability, reaction rate constant, $\frac{Z^{\ddagger}_{TS}}{Z_{\alpha}}$ and tunnel factor（T＝300K）in Figure 1

遷移確率	k_f [s^{-1}]	k_r [s^{-1}]	$\frac{Z^{\ddagger}_{TS}}{Z_f}$	$\frac{Z^{\ddagger}_{TS}}{Z_r}$	κ
1.13×10^{-4}	1.05×10^{-31}	9.34×10^{-28}	9.63×10^{-3}	4.98×10^{-2}	1.38

参考文献

1）Lindahl, T.; Nyberg, B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 1972, 11, 3610-3617.
2）Friedberg, E. C.; Walkers, G. C.; Siede, W. *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press: Washington D.C. 1995.
3）Gentil, A.; Cabral-Neto, J. B.; Mariage-Samson, R.; Margot, A.; Imbach, J. L.; Sarasin, A. Mutagenicity of a unique apurinic/apyrimidinic site in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 1992, 227, 981-984.
4）Loeb, L. A.; Preston, B. D. Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Ann. Rev. Genet.* 1986, 20, 201-230.
5）Tomasetti, C. L. L.; Vogelstein, B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention, *Science* 2017, 355, 1330-1334.
6）Cressey, D. DNA repair sleuths win chemistry Nobel. *Nature* 2015, 526, 307-308.
7）Odai, K.; Umezaki, K. Kinetic Study of Transition Mutations from G-C to A-T Base Pairs in Watson-Crick DNA Base Pairs: Double Proton Transfers. *J.Phys.Chem.* A 2021, https://doi.org/10.1021/acs.jpca.1c05604.
8）Frish, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Peterson, G. A. et al. Gaussian 09, Revision A.02; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
9）Umesaki, K.; Odai, K., A kinetic approach to double proton transfer in Watson-Crick DNA base pairs. *J. Phys. Chem. B* 2020, 124, 1715-1722.
10）Klippenstein, S. J.; Pande, V. S.; Truhlar. D. G. Chemical Kinetics and Mechanisms of Complex Systems: A Perspective on Recent Theoretical Advances. *J. Am. Chem.* Soc. 2014, 136, 528-546.
11）Zhu, C.; Meng, F. Theoretical study on the hydrolytic deamination mechanism of adenosine. *Struct. Chem.* 2009, 20, 685-691.
12）Alrawashdeh, A. I.; Almatarneh, M. H.; Poirier, R. A. Computational study on the deamination reaction of adenine with OH−/nH2O（n＝0, 1, 2, 3）and 3H2O. *Can. J. Chem.* 2013, 91, 518-526.
13）Zhang, A.; Yang, B.; Li, Z. Theoretical study on the hydrolytic deamination reaction mechanism of adenine-（H2O）n（n＝1－4）. *J. Mole. Struct.: THEOCHEM* 2007, 819, 95-101.
14）Wang, H.; Meng, F. Theoretical study of proton-catalyzed hydrolytic deamination mechanism of adenine. *Theor. Chem. Acc.* 2010, 127, 561-571.