

平成 30 年 5 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02190

研究課題名(和文)生活習慣病に強相関する核酸メチル化の超高感度検出化学技術開発

研究課題名(英文)Development of highly sensitive chemical detection of the nucleic acid methylations strongly affecting lifestyle diseases

研究代表者

岡本 晃充 (Okamoto, Akimitsu)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：60314233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,900,000円

研究成果の概要(和文)：われわれが開発した化学反応を基礎にして、高効率なエピジェネティクス検出研究を進めた。成果は次の通り。課題(i) 腫瘍不均一性を解くためのDNA反復配列に現れるメチル化の超高輝度検出、課題(ii) 腫瘍術後診断を効率化するDNA脱メチル化特異的の反応生成物の超高性能分析、課題(iii) 遺伝子発現を制御するヒストン構造の化学的再現と解析

研究成果の概要(英文)：Based on the chemical reactions developed by us, the studies on highly efficient detection methods for epigenetic modifications have been carried out. The results are as follows: (i) Highly bright detection of methylation in DNA repeat sequences to understand heterogeneity in tumors, (ii) High performance analysis of the products in demethylation process to make prognostication for tumors efficient, (iii) Chemical reproduction and analysis of histone structures for control of gene expression.

研究分野：生物有機化学

キーワード：DNA メチル化 脱メチル化 ヒストン 金属反応 ペプチド合成

### 1. 研究開始当初の背景

がんや肥満などの生活習慣病は、その名の通り、遺伝的な影響による発病しやすさとは別の次元で発病へ至る経路がある。それは、核酸のメチル化の異常であり、良く知られた例ではピロリ菌代謝物質による胃の粘膜での DNA メチル化の蓄積によって引き起こされる胃がんがある。核酸に対するメチル化は、さまざまな生活習慣病抑制遺伝子の発現を抑制し発病へ至らしめる主要原因であり、メチル化・脱メチル化が核酸配列のどこで起こっているかを明らかにしたい。これができれば、まさにどの遺伝子が制御されているかが明確になり、生活習慣病診断に大きく役立てることができる。しかしながら、メチル基は、核酸構造と比べてはるかに微小であるだけでなく、他の官能基と強力な相互作用を形成することができない。さらには、特定の配列でのメチル化を検出することになると、検出の配列選択性だけでなく、元々対象となる核酸のコピー数の少なさから相当の検出感度が要求される。これらの理由から、従来の検出法の機能を遙かに超える別の発想での化学的再設計が必要とされている。

メチル化検出法は近年国内外で数多く知られてくるようになってきたが、疾病研究に直結した現実的な手法はバイサルファイト法や免疫沈降法などごく限られている。しかし、微量核酸からのメチル化核酸の検出には、非特異的分解や沈降回収効率の面などから適しておらず、別の手法を必要としている。また、検出の配列選択性、低侵襲性(少サンプル・高感度)、高効率性(低労力・短時間)、情報選択性を求める上で、これまでの手法には限界がある。一方、研究代表者らは、オスミウムを用いた 5-メチルシトシン検出法(J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 14511-14517) やタングステンを用いた 5-ヒドロキシメチルシトシン検出法(Chem. Commun. 2011, 47, 11231-11233) などの反応化学に立脚した新しい核酸メチル化検出の新機軸を打ち出している。きわめて革新的な反応である一方で、まだ化学ベースでのデモンストレーションのレベルであり、微量核酸を対象にした現実的な検出法へ到達していない。

### 2. 研究の目的

研究代表者が開発した化学反応を基礎にして、高効率なエピジェネティクス検出と診断のための新規方法を創出する。

研究対象となるエピジェネティクス検出研究は次の通り。

課題(i) 腫瘍不均一性を解くための DNA 反復配列に現れるメチル化の超高輝度検出(固定化サンプルに結合した核酸プローブからのシグナルを大量増幅する新反応の開拓)

課題(ii) 腫瘍術後診断を効率化する DNA 脱メチル化特異的反応生成物の超高性能分析(新規化学変換反応の開拓と効率的シーケンシングへの酵素探索)

課題(iii) 遺伝子発現を制御するヒストン構造の化学的再現と解析(ヒストンの化学合成法の確立)

### 3. 研究の方法

本研究では、生活習慣病に関連する核酸メチル化検出を目指して、次のオリジナルな化学的技術を一体的・包括的に推進した。

課題(i) 腫瘍不均一性を解くための DNA 反復配列に現れるメチル化の超高輝度検出

個体腫瘍内部には多様性・不均一性があることが指摘されている。連続反復配列ヒトサテライト II や サテライト、および散在反復配列 LINE-1 や Alu のメチル化の低メチル化を分析することが、腫瘍の不均一性を解くカギの一つである。腫瘍の不均一性を解くカギは、DNA のメチル化であるが、従来のメチル化分析の方法のように組織をすりつぶしては、不均一性の情報が失われる。配列特異的 DNA メチル化捕捉人工核酸「ICON プローブ」から開発した「MeFISH 法」(Nucleic Acids Res., 41 (19), e186, 2013) を用いて、腫瘍 DNA メチル化を可視化し、メチル化状態の解析に立脚した腫瘍内の不均一性の解析を行うための準備を進めた。まず初めに、LINE-1 と Alu と相補的な配列を持つ ICON プローブを二色の蛍光色素を用いてラベリングし、固定化細胞に対してハイブリダイズさせる FISH 法によって顕微鏡観察で蛍光パターンを観測した。続いて、プローブがハイブリダイズした状態のサンプル上でオスミウム酸化反応を起こし、クロスリンク体を形成していないプローブを洗い流すことでメチル化箇所のみを蛍光ラベリングする MeFISH を行い、得られた画像を FISH での観察と比較した。

課題(ii) DNA 脱メチル化特異的反応生成物の超高性能分析

5-ヒドロキシメチルシトシン(hmC)は、TET タンパク質による mC の酸化によって生じる DNA 脱メチル化経路の鍵物質である。グリオーマ、大腸がん、乳がん、メラノーマを含む固形腫瘍の多くで、5hmC レベルは低い。一方、腫瘍術後には、高メチル化が修正されるために hmC 量が増えると言われている。C と mC から hmC を区別するための基本原理として研究代表者らは、hmC のアリルアルコール構造( $C^6=C^5-CH_2OH$ )を標的にして、二核ペルオキシタングステン酸カリウム塩、 $K_2[\{W(=O)(O_2)_2(H_2O)\}_2(\mu-O)] \cdot 2H_2O$  による hmC 特異的化学反应を創出した。生成物として、トリヒドロキシル化されたチミン( ${}^3H$ T)が得られる。これを鋳型にして DNA 増幅反応を仕掛ければ、元々 hmC があつたところに T が入るので、C や mC と区別して高性能に検出することを目指して条件検討した。

### 課題(iii) 遺伝子発現を制御するヒストン構造の化学的再現と解析

DNA を細胞内でコンパクトに折りたたむためにヒストンタンパク質を用いてヌクレオソームを形成している。ヒストンタンパク質は、H2A、H2B、H3、H4 からなる 8 量体であり、特に H2A は様々なバリエーションを有しており、これらを入れ替えることによって遺伝子発現効率を巧みに制御している。また、H2A テール部分で様々なエピジェネティック修飾を受けており、H2A 機能を多様化させている。したがって、構造的にピュアな H2A を化学合成することによって H2A およびその修飾体やバリエーションの機能を明らかにすることができる。しかし、H2A は 129 アミノ酸長を有しており、全長を一度に合成することはできない。したがって、ペプチド固相合成、ネイティブケミカルライゲーション、脱硫反応を段階的に行うことによって、全長 H2A を合成することを目指した。

#### 4. 研究成果

##### 課題(i) 腫瘍不均一性を解くための DNA 反復配列に現れるメチル化の超高輝度検出

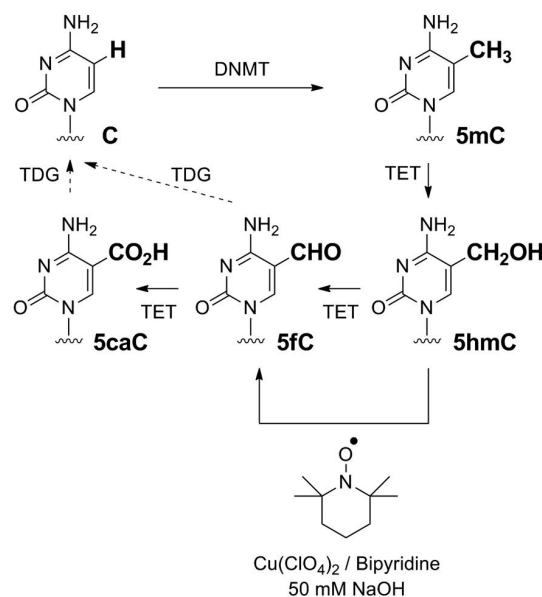
蛍光顕微鏡観察によって、FISH と MeFISH とともに細胞核中で二色の蛍光シグナルが観察された。また、画像解析ソフト ImageJ を用いて細胞個数あたりのシグナル量を定量したところ、MeFISH では FISH に比べて有意な蛍光シグナルの減少が見られた。また、MCF-7、HepG2、DLD-1 の三種類のがん細胞を用いて同じ実験を行ったところ、LINE-1 と Alu についてそれぞれ異なるシグナル個数比が確認された。次に、更なる正確な観察の為、Structured Illumination Microscopy (SIM) 超解像顕微鏡によるより高解像度での観察を行った。結果、FISH と MeFISH の両方において、LINE-1 と Alu の二種類のシグナルが細胞核全体に確認できた。プローブを加えていないコントロールのサンプルについては、蛍光が確認されなかった。また、脱メチル化剤である 5-アザシチジンで処理した細胞についても同様の実験を行ったところ、FISH においては WT の細胞と同様に強い LINE-1 と Alu の蛍光が確認出来たのに対して、MeFISH ではどちらもシグナル強度が著しく減少していることが顕微鏡観察によって確認された。

##### 課題(ii) DNA 脱メチル化特異的反応生成物の超高性能分析

まず、二核ペルオキソタングステン酸カリウム塩を用いた hmC 検出反応において、<sup>3</sup>H を含む DNA を鋳型にした DNA 増幅反応の条件を探索した。CpG、mCpG、hmCpG ジヌクレオチドを含むヒトゲノム DNA 断片を二核ペルオキソタングステン酸カリウム塩とともに 50 で 7 時間加熱する。その後、DNA 合成酵素を介した DNA 配列解析技術を用いて分析した。その結果、オリジナルの hmC の相補鎖側（つまり thT の相補鎖側）にアデニンが取り込ま

れることが確認された。対照的に、mC や C の反対側の位置には、グアニンだけが取り込まれた。さらには、次世代シーケンサを用いた系でも、hmC の導入箇所を決定することができた。

また、別種の反応も開発することができた。銅(II)と 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシル (TEMPO) を用いて、hmC を 5-ホルミルシトシン (fC) に変換する反応を見いだした(下図)。塩基性条件で反応させると、hmC 特異的に反応が進んだ。生成した fC は、ピペリジン処理やヒドラジン修飾、亜硫酸水素塩処理で検出することができた。特に、亜硫酸水素塩処理の後のシーケンシングでは、従来の過ルテニウム酸カリウムによる酸化法に比べて、反応効率が高く、一方で非特異的な分解が無いので、銅(II)-TEMPO 法は従来法に代わる優良な方法になりうると思われる。また、銅(II)-TEMPO 法は、二核ペルオキソタングステン酸カリウム塩の系とは hmC 検出における補完的な関係であると言える。



##### 課題(iii) 遺伝子発現を制御するヒストン構造の化学的再現と解析

まず H2A タンパク質全長を三フラグメントに分割する合成ルート設計を行い、ペプチド固相合成法とネイティブケミカルライゲーション法を組み合わせることで世界初の H2A の化学合成が達成された。H2A-H2B 二量体の作成ならびにヌクレオソームの再構成実験を通して、合成 H2A が大腸菌発現により得られた H2A と同様に機能することが示された。また、蛍光色素結合 H2A を作成し、これを用いた生細胞アッセイを行うことで、合成ヒストンの細胞導入法の検証および合成ヒストンの細胞内局在のイメージングについて示した。最後に、3 か所に異なる 3 種類の修飾（メチル化・アセチル化・リン酸化）を導入した H2A を合成し、これらの修飾がヌクレオソーム構造に与える影響を熱安定性評価により確かめた。

H2A の 57 番目チロシン残基になされるリン

酸化が有する機能について議論している。このリン酸化は転写の伸長に関わるとされており、ヌクレオソーム構造におけるチロシン残基の位置から、リン酸化が H2A-H2B 間の相互作用変化を促すのではないかと仮説を立て、その検証を行った。上記の手法を用いてリン酸化チロシンを有する H2A を合成し、試験管内アッセイに適用した。H2A-H2B 二量体の安定性評価実験から、リン酸化が二量体を不安定化することが示され、塩による静電遮蔽に大きく影響を与えていることが示唆された。また、ヌクレオソームを用いた同様の評価から、リン酸化がヌクレオソームからの H2A-H2B 二量体解離を促していることが明らかになった。一方で、酵素によるヌクレオソーム DNA の分解実験により、このリン酸化はヒストン-DNA 間の相互作用には寄与しないことが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Jeong, H. S.; Hayashi, G.; Okamoto, A.  
Diazirine Photocrosslinking Recruits Activated FTO Demethylase Complexes for Specific N6-methyladenosine Recognition  
*ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (6), 1450-1455.

Hayashi, G.; Sueoka, T.; Okamoto, A.  
In vitro and in cell analysis of chemically synthesized histone H2A with multiple modifications  
*Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4999-5002.

Hayashi, G.; Koyama, K.; Shiota, H.; Kamio, A.; Umeda, T.; Nagae, G.; Aburatani, H.; Okamoto, A.  
Base-Resolution Analysis of 5-Hydroxymethylcytosine by One-Pot Bisulfite-Free Chemical Conversion with Peroxotungstate  
*J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (43), 14178-14181.

Matsushita, T.; Moriyama, Y.; Nagae, G.; Aburatani, H.; Okamoto, A.  
DNA-friendly Cu(II)/TEMPO-catalyzed 5-hydroxymethylcytosine-specific oxidation  
*Chem. Commun.* **2017**, *53*, 5756-5759.

Hayashi, G.; Kamo, N.; Okamoto, A.  
Chemical synthesis of dual labeled protein via differently protected alkynes enables intramolecular FRET analysis  
*Chem. Commun.* **2017**, *53*, 5918-5921.

Sueoka, T.; Hayashi, G.; Okamoto, A.  
Regulation of the Stability of the Histone H2A-H2B Dimer by H2A Tyr57 Phosphorylation  
*Biochemistry* **2017**, *56*, 4767-4772.

Hayashi, G.; Tamai, M.; Okamoto, A.  
Hybridization-Sensitive Fluorescent Oligonucleotide Probe Conjugated with Cell-Penetrating Peptides for Enhanced Cellular Uptake  
*Chem. Lett.* **2017**, *46*, 1803-1806.

Kamo, N.; Hayashi, G.; Okamoto, A.  
Efficient peptide ligation between allyl-protected Asp and Cys followed by palladium-mediated deprotection  
*Chem. Commun.* **2018**, *54*, 4337-4340.

[学会発表](計 24 件)

松下 卓、岡本 晃充、「Cu/TEMPO 酸化を用いた新規 5-ヒドロキシメチルシトシン検出法の開発」、日本化学会第 96 春季年会、京都、2016 年 3 月 24 日 ~ 27 日

神山 健太、林 剛介、岡本 晃充、「過酸化タングステン酸を用いた 5-ヒドロキシメチルシトシンの高解像度検出法の開発」、日本化学会第 96 春季年会、京都、2016 年 3 月 24 日 ~ 27 日

一宇 杏里、林 剛介、岡本 晃充、「5-メチルシトシンの一分子検出を指向した FISH 法の高感度化」、日本化学会第 96 春季年会、京都、2016 年 3 月 24 日 ~ 27 日

林 剛介、岡本 晃充、「化学合成ヒストンを用いたクロマチン修飾解析プラットフォームの構築」、第 16 回日本蛋白質科学会年会、福岡、2016 年 6 月 7 日 - 9 日

Akimitsu Okamoto, "5-Hydroxymethylcytosine-Specific Oxidation: DNA-Friendly Cu(II)/TEMPO-Catalyzed Oxidation and Applications", The 22th International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (XXII IRT), Paris, July 18-22, 2016.

Kenta Koyama, Gosuke Hayashi, Akimitsu Okamoto, "Development of the Method to Detect 5-Hydroxymethylcytosine by Oxidation and Sequencing", The 22th International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (XXII IRT), Paris, July 18-22, 2016.

林 剛介・加茂 直己・岡本 晃充、「シリル保護アルキンを用いた化学合成タンパク質への機能性分子導入法」、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、金沢、2016 年 9 月 7 日-9 日

末岡 拓馬・林 剛介・岡本 晃充、「ヒストンタンパクの化学合成を基盤としたクロマチン修飾の機能解析」、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、金沢、2016 年 9 月 7 日-9 日

Anri Ichiu, Gosuke Hayashi, Akimitsu Okamoto, "Highly sensitive FISH with L-DNA-tagged PCR product", The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2016), Kumamoto, September 27-29, 2016.

Gosuke Hayashi, Kenta Koyama, Akimitsu Okamoto, "Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine by peroxotungstate-mediated oxidative C-to-T conversion", The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2016), Kumamoto, September 27-29, 2016.

Takuma Sueoka, Gosuke Hayashi, Daisuke Sakakibara, Akimitsu Okamoto, "Chemical synthesis of histone proteins and analysis of chromatin modifications", 第53回ペプチド討論会, 京都, 2016年10月26-28日

Naoki Kamo, Gosuke Hayashi, Akimitsu Okamoto, "Incorporation of various functional molecules into proteins using orthogonal silyl protecting groups of alkyne", 第53回ペプチド討論会, 京都, 2016年10月26-28日

加茂直己・林 剛介・岡本晃充, 「蛋白質化学合成における部位特異的官能基導入法の開発」, 日本化学会秋季事業 第6回CSJ化学フェスタ2016, 東京, 2016年11月14日-16日

林 剛介・末岡 拓馬・坂元 亮介・榊原 大輔・岡本 晃充, 「化学合成ヒストンを軸としたエピジェネティクス研究の展開」, 第39回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016年11月30日-12月2日

HAYASHI, Gosuke; OKAMOTO, Akimitsu, "Construction for epigenetic analysis platform by protein chemical synthesis", The 97th CSJ Annual Meeting, Yokohama, March 16-19, 2017.

SUEOKA, Takuma; HAYASHI, Gosuke; SAKAKIBARA, Daisuke; OKAMOTO, Akimitsu, "Application for epigenetics research using chemically synthesized histone H2A and H2B", The 97th CSJ Annual Meeting, Yokohama, March 16-19, 2017.

DEBNATH, Turja Kanti; OKAMOTO, Akimitsu, "Recognition of 5-methylcytosine and 5-methyluridine in RNA by Osmium Oxidation", The 97th CSJ Annual Meeting, Yokohama, March 16-19, 2017.

末岡 拓馬, 林 剛介, 榊原 大輔, 岡本 晃充, 「タンパク質化学合成を利用したヒストンH2A-H2B 研究への展開」, 日本ケミカルバイオ

ロジ-学会 第12回年会, 札幌, 2017年6月7~9日

林 剛介, 末岡 拓馬, 坂元 亮介, 榊原 大輔, 石橋 真帆, 岡本 晃充, 「化学合成ヒストンを用いたエピジェネティクス解析プラットフォームの構築」, 日本ケミカルバイオロジ-学会 第12回年会, 札幌, 2017年6月7~9日

林 剛介, 梁瀬 将史, 岡本 晃充, 「DNAを足場として用いた複数ペプチド断片の同時連結反応」, 第11回バイオ関連化学シンポジウム, 東京, 2017年9月7日~9日

加茂 直己, 林 剛介, 岡本 晃充, 「アリル保護基を用いた Asp-Cys 間の NCL 連結法の開発」, 第11回バイオ関連化学シンポジウム, 東京, 2017年9月7日~9日

G. Hayashi, N. Kamo and A. Okamoto, "Silyl-protected Alkynes for Multiple Labeling of Chemically Synthesized Protein", 25th American Peptide Symposium, Whistler, Canada, 17-22 June, 2017.

Takuma Sueoka, Gosuke Hayashi, Daisuke Sakakibara and Akimitsu Okamoto, "Evaluation of Histone H2A-H2B Dimer based on Protein Chemical Synthesis", 25th American Peptide Symposium, Whistler, Canada, 17-22 June, 2017.

M. Yanase, G. Hayashi and A. Okamoto, "Peptide Ligation on DNA Scaffold", 25th American Peptide Symposium, Whistler, Canada, 17-22 June, 2017.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本 晃充 (OKAMOTO, Akimitsu)  
東京大学・先端科学技術研究センター・教授  
研究者番号: 60314233