

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2009

課題番号：20014030

研究課題名（和文）

がんの個性の分子診断のための人工機能性核酸

研究課題名（英文）

Artificial nucleic acids for molecular diagnosis of cancer individuality

研究代表者

岡本 晃充 (Okamoto Akimitsu)

独立行政法人理化学研究所・岡本独立主幹研究ユニット・ユニットリーダー(独立主幹研究員)

研究者番号：60314233

研究成果の概要（和文）：

がん遺伝子研究に役立つ塩基識別型蛍光性核酸セットとシトシンメチル化検出プローブセットを開発した。とくに、メチル化シトシン特異的反応プローブ「ICON プローブ」をわれわれが開発し、これをシトシンメチル化検出プローブセットに応用した。また、次のステップとして、シトシンメチル化部位の可視化に向けて、メチル化部位に対して効果的に色づけするための手法の開発も進めた。

研究成果の概要（英文）：

For cancer research, we developed base-discriminating fluorescence nucleic acid systems and methylation detection systems. Particularly, we developed a conceptually new nucleic acid probe for methylcytosine-specific detection, 'ICON probe', and applied it for detection of methylcytosines. In addition, we studied on effective color imaging of methylcytosine toward methylated DNA visualization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,700,000	0	6,700,000
2009 年度	6,700,000	0	6,700,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,400,000	0	13,400,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：オスミウム、一塩基多型、メチルシトシン、蛍光、人工核酸

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の多様性と不安定性は、細胞の役割・機能の特徴づける。さらにそれが暴走した 1 形態として発がんとなって現れてくる。それらをもたらす遺伝子の変化・違いが多型であり、DNA メチレーションである。遺伝子多型は、明確な遺伝性があり、疾病のリス

クを代々受け継ぐ遺伝子配列の比較的静的な変化として知られる。一方、DNA メチレーションは、細胞のおかれた時空間環境に応じて常にダイナミックに変化する DNA 修飾である。これらの DNA の静的・動的な変化を総合的に解析し、診断するシステムを作成することは、各人の発がんのリスクと現状を把握する上で極めて重要である。

これまでこれら DNA の変化の解析は、DNA 断片のミニシーケンシングによって、もしくは試薬や酵素による変換反応・切断反応を組み合わせることによって行われてきた。1 塩基多型解析にはすでに蛍光ヌクレオチド伸長法やインベーター法など酵素機能に依存した方法が構築されているし、DNA メチレーション解析には亜硫酸水素塩によるシトシンの加水分解を基盤とした数多くの方法が報告されている。しかし、遺伝子上のわずかな違いを長鎖の核酸から検出することはそれぞれの標的に対する極めて厳しい条件の設定が必要であり、高い測定誤差を一元的に解決する系までは到達していない。これからの遺伝子研究で必要なのは配列の中の見たいところだけを見ることができるといえる手法であり、同時に時間短縮・省力化・高信頼性が期待されている。また、安定したデータを得るために解析の装置化が重要課題であり、メチレーション解析ではデータの定量性も課題になる。したがって、これら諸問題を解決するための新発想の方法の提案が必須である。

2. 研究の目的

新規人工核酸プローブを利用した 1 塩基多型・DNA メチレーション判定系の確立と新規がん判定システムの構築

(1) がん遺伝子研究に役立つプローブセットの開発

それぞれのがんに現れる遺伝子の特徴に関する情報を取りまとめ、それらに基づいたプローブセットを開発する。また、測定条件の最適化を行うことによって、そのキット化を目指す。

(2) がん診断チップの作成

(1) で得られた研究成果をもとにがん診断チップを作成する。プローブをガラスのような固相担体に固定化する技術を導入することにより 1 塩基多型・DNA メチレーション判定のチップを作成する。また、これらを用いたフィンガープリント判定システムにも応用したい。

3. 研究の方法

がん遺伝子研究に役立つプローブセットを開発する。まずは、がん関連遺伝子群に対しても十分にプローブが機能することを確認するため、がんとの相関が比較的分明になっている 1 塩基多型部位、シトシンメチレーション部位に対して検討を行う。具体的には、がんに関連する遺伝子群の中から *p53* 遺伝子や *Rb1* 遺伝子、BRCA1 遺伝子や MSH2 遺伝子などのがん抑制遺伝子を第 1 のターゲットとして設定し、それらの解析にフィットした解析プローブの作成と測定条件の最適化の検討をスタートする。*bcr/abl* などの転座遺伝子の検出（転座の有無、転座箇所の決定）

を行うためのプローブを設計したい。また、メチレーション解析では、まずは腫瘍壊死遺伝子のプロモーター領域配列に照準を合わせ、遺伝子発現制御に関する各シトシン塩基でのメチレーションの状態について定量的に解析できるようにする。それぞれの遺伝子の配列・特徴に関する情報を取りまとめ、それらに基づいたプローブセットをできる限り多く開発する。また、反応溶液の組成、温度、pH など測定条件の最適化が高感度な測定の達成に重要であるので、その検討を行う。加えて、キット化に向けて、アッセイの結果を速やかに解析するための手法の開発もおこなう。1 塩基多型解析については、このターゲットにはこのプローブ、といった設計パターンを確立する。数多くの配列を作成して S/N 比などの精度よい検出に必要なデータを集積する。また、メチレーション解析についても、温度条件や試薬濃度などの最適化についてまだ相当検討の余地があり、上記標的配列を用いながら、実際に可能性のある測定系を想定しつつ検討を重ねる。

4. 研究成果

本研究では、有機合成化学、光化学、分子生物学の手法を有効に活用して、これら諸問題を解決するための新発想の方法を提案することを目指した。がん遺伝子研究に役立つプローブセットを開発することを検討した。まずは、がん関連遺伝子群に対しても十分にプローブが機能することを確認するため、がんとの相関が比較的分明になっているシトシンメチレーション部位に対して検討を行った。具体的には、がんに関連する遺伝子群の中から *p53* 遺伝子や *Rb1* 遺伝子、BRCA1 遺伝子や MSH2 遺伝子などのがん抑制遺伝子を第 1 のターゲットとして設定し、それらの解析にフィットした解析プローブの作成と測定条件の最適化の検討を行った。特に、メチレーション解析では反応条件の最適化がまだ不十分であったので、反応の性質、例えば、反応時間、反応温度、反応の配列依存性などを、もう一度再構成し、各シトシン塩基でのメチレーションの状態について定量的に解析できるように試みた。加えて、キット化に向けて、アッセイの結果を速やかに解析するための手法の開発も必要であり、同時多項目解析を可能とする解析系の作製の検討も行った。

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 7 件) (全て査読有り)

1. Ikeda, S.; Okamoto, A.
Hybridization-Sensitive On-Off DNA Probe: Application of the Exciton Coupling Effect to Effective Fluorescence Quenching
Chem. Asian J. **2008**, 3 (6), 958-968.
2. Umemoto, T.; Okamoto, A.
Synthesis and characterization of the

- 5-methyl-2'-deoxycytidine glycol-dioxosmium-bipyridine ternary complex in DNA
Org. Biomol. Chem. **2008**, *6* (2), 269-271.
3. Tainaka, K.; Okamoto, A.
Synthesis of Bipyridine-Adenine Conjugates for Methylation Analysis
Coll. Symp. Ser. **2008**, *10*, 146-149.
 4. Ikeda, S.; Kubota, T.; Kino, K.; Okamoto, A.
Sequence Dependence of Fluorescence Emission and Quenching of Doubly Thiazole Orange-Labeled DNA: Effective Design of a Hybridization-Sensitive Probe
Bioconjugate Chem. **2008**, *19* (8), 1719-1725.
 5. Nomura, A.; Okamoto, A.
Heterogeneity of osmium oxidation efficiency at consecutive thymines
Org. Biomol. Chem. **2008**, *6* (21), 3905-3907.
 6. Okamoto, A.
Chemical approach toward efficient DNA methylation analysis
Org. Biomol. Chem. **2009**, *7* (1), 21-26.
 7. Okamoto, A.
Synthesis and Use of Osmium-DNA Complexes
J. Synth. Org. Chem. Jpn. **2009**, *67* (7), 680-686.
 8. Kubota, T.; Ikeda, S.; Yanagisawa, H.; Yuki, M.; Okamoto, A.
Hybridization-Sensitive Fluorescent Probe for Long-Term Monitoring of Intracellular RNA
Bioconjugate Chem. **2009**, *20* (6), 1256-1261.
 9. Ikeda, S.; Kubota, T.; Yuki, M.; Okamoto, A.
Exciton-Controlled Hybridization-Sensitive Fluorescent Probes: Multicolor Detection of Nucleic Acids
Angew. Chem., Int. Ed. **2009**, *48* (35), 6480-6484.
 10. Ikeda, S.; Yuki, M.; Yanagisawa, H.; Okamoto, A.
Doubly thiazole orange-labeled cytidine for functional expansion of a hybridization-sensitive probe
Tetrahedron Lett. **2009**, *50* (51), 7191-7195.
- Symposium 2008年6月18日 University of Pittsburgh 岡本晃充 DNA-Osmium Complex for DNA Methylation Analysis
2. 2008 Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience (KJFP 2008) 2008年9月26日 Ramada Hotel in Jeju Island, Korea 岡本晃充 Doubly Thiazole Orange-Labeled Nucleotide: Application to Hybridization-Sensitive DNA Probe
 3. 先端生命コロキウム2008 2008年11月12日 東京大学 岡本晃充 化学設計DNAによる核酸簡易解析の一例
 4. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「細胞光計測・制御のための新規バイオ技術形成クラスター」講演会 2009年2月25日 慶應義塾大学 岡本晃充 細胞内RNAの可視化技術
 5. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「疾患の基盤としてのエピジェネティクス」 2009年6月29日 大阪大学蛋白質研究所 岡本晃充 メチル化したDNAを高効率検出する新しい化学
 6. iCeMS Biomaterials at the interface of chemistry, physics, and biology 2009年7月27日 Kyoto University Clock Tower Centennial Hall, Kyoto 岡本晃充 Excitonic interaction: New photochemical control for nucleic acid imaging
 7. 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC 14) 2009年7月28日 Nagoya Congress Center, Nagoya 岡本晃充 Addition of Osmium to DNA Pyrimidine Bases
 8. 42nd IUPAC Congress "Chemistry for Solving Biological Problems" 2009年8月6日 The Scottish Exhibition and Conference Centre, Glasgow, UK 岡本晃充 Exciton-controlled probes for live cell RNA imaging
 9. The 13th Asian Chemical Congress 2009年9月14日 Shanghai International Convention Center, China 岡本晃充 Doubly Dye-Labeled Nucleotide: Toward Efficient RNA Imaging
 10. BIT 2nd Annual Congress and Expo of Molecular Diagnostics (CEMD-2009) 2009年11月21日 Beijing International Convention Center, China 岡本晃充 ICON probe: Osmium complexation for pin point detection of methylated cytosines

[学会発表] (計10件)

1. 31st National Medicinal Chemistry

〔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〕

ホームページ

<http://www.riken.jp/lab-www/okamotoiru/indexj.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 晃充 (Okamoto Akimitsu)

独立行政法人理化学研究所・岡本独立主幹研究ユニット・ユニットリーダー(独立主幹研究員)

研究者番号：60314233

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者