

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20750144  
 研究課題名（和文）オスミウム錯体導入によりメチルシトシンを特異的認識するDNA結合人工蛋白質の創製  
 研究課題名（英文）Development of Artificial DNA-binding Protein Having Osmium Complex as Specific Methylcytosine Recognition Unit  
 研究代表者  
 野村 章子 (Nomura Akiko)  
 独立行政法人理化学研究所・岡本独立主幹研究ユニット・ユニット研究員  
 研究者番号：40443006

## 研究成果の概要（和文）：

DNA メチル化の検出を目的として、メチルシトシンと非メチル化シトシンを認識する人工蛋白質・ペプチドの開発を行った。DNA 結合部位の基本骨格として亜鉛フィンガーモチーフに着目し、メチルシトシン認識部位としてオスミウム錯体を亜鉛フィンガーモチーフに導入して分子設計を行った。メチルシトシンとオスミウムとの反応性検討から得られた結果を基に亜鉛フィンガーを作製し、DNA 結合能を評価した。

## 研究成果の概要（英文）：

To develop a new detection method of methylated DNA, an artificial protein has been developed that contains the zinc finger motif as a DNA-binding moiety as well as an osmium complex since the latter can bind preferentially to a methylcytosine rather than the unmethylated counterpart. Based on detailed investigation of osmium complexation with a methylcytosine, the novel protein has been synthesized via a solid-phase synthesis method and its binding ability toward methylated DNA molecules was evaluated.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

## 研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：DNA、メチルシトシン、蛋白質、オスミウム

## 1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化はゲノム DNA の 5'-CpG-3' 配列上のシトシンによく見出され、塩基配列の変化を伴わずに遺伝子機能を制御

するエピジェネティックな機構として知られている。DNA メチル化は細胞の発生や分化を制御し、細胞の癌化にも密接に関連していることが知られている。したがって、メチル化解析技術の開発は、

生命現象の解明のみならず疾患の原因解明や医療への応用も期待され、重要性が高まっている。メチル化を検出する方法として、現在、メチル化感受性制限酵素法や亜硫酸水素塩法が広く用いられている。しかしながら、制限酵素法は検出可能な配列が酵素の認識配列に限定されること、亜硫酸水素塩法では副反応としてデピリミジネーションとそれに続く鎖切断のために反応系中の DNA サンプルの 99.9%以上が損失することや、特定のメチル化部位におけるメチル化 DNA と非メチル化 DNA との正確な量比を求めるのが困難であることなど、何れの方法にも課題が残されている。

これに対して我々の研究グループは、オスミウム 6 価イオンが一本鎖あるいはバルジ構造におけるメチルシトシンと特異的に結合し酸化することを見出し、メチルシトシンを検出する方法として報告してきた。オスミウム法は、オスミウム酸カリウムとそれを酸化するヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム、配位子としてピピリジンを用いることにより、メチルシトシンを効果的に検出できる。短時間かつ穏和な反応条件を用いるため、亜硫酸水素塩法などの従来法と比較してサンプル DNA の損傷が少ないという特徴がある。しかしながら、本法も含む従来法はシトシンメチル化を網羅的に検出可能ではあるが、細胞の種類によりメチル化の部位や状態は大きく異なるため、今後、遺伝子機能に重要な部位のメチル化検出やマッピングへの要求も高まることが予想される。

## 2. 研究の目的

本研究はメチルシトシン特異的認識錯体を蛋白質の任意の部位へ位置特異的に導入した人工蛋白質を創製し、特異的部位におけるメチル化検出を目的としている。具体的には、DNA 結合蛋白質、特に転写因子亜鉛フィンガー蛋白質に着目し、これにオスミウム錯体形成機能を導入することにより、二本鎖 DNA における部位特異的な認識を行い、遺伝子機能に重要な部位におけるメチルシトシン検出を目指す。

## 3. 研究の方法

DNA 結合部位の基本骨格として亜鉛フィンガーモチーフ、メチルシトシン認識部位としてオスミウム錯体 (図 1) に着目して分子設計を行う。

亜鉛フィンガー蛋白質は約 30 アミノ酸残基からなる  $\beta\alpha$  構造を有する DNA 結合モ

チーフが直列に連結した転写因子であり、その DNA 認識様式は  $\alpha$ -ヘリックス内の特定のアミノ酸残基が特定の DNA 塩基と 1:1 で相互作用している。X 線結晶構造解析や NMR から DNA との複合体の構造が解かれており、シトシン認識残基も見積もられている。この亜鉛フィンガー蛋白質にオスミウム錯体形成機能を付与することにより、遺伝子機能に重要な部位のメチル化を認識する人工蛋白質を作製する。

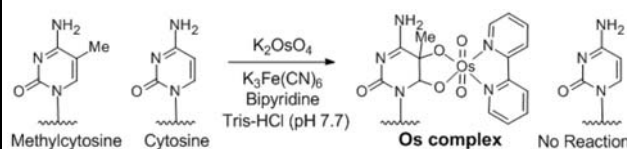


図 1. メチルシトシンとオスミウムとの反応

## 4. 研究成果

### (1) メチルシトシンとオスミウムとの反応性

メチルシトシンとオスミウムとの反応性に関して、基礎的な知見を得るために、オスミウム錯体形成の DNA 配列依存性について検討した。種々のピリミジン塩基、あるいはメチルシトシン近傍に一塩基ミスマッチを有する DNA 配列を用いて、オスミウム錯体形成反応を行い、オスミウムによって酸化された DNA をピピリジンで処理した。得られた反応生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果、隣接する核酸塩基がオスミウム錯体の形成反応に重要な役割を果たしているという新しい知見を見出した。

### (2) メチルシトシン認識能を有する亜鉛フィンガーの分子設計

DNA のメチル化は CpG 配列上のシトシンに存在するため、グアニンとシトシンに富んだ配列を認識する亜鉛フィンガー蛋白質を DNA 認識部位の基本骨格として選択した。CpG 配列上のシトシンと相互作用するアミノ酸残基 (図 2、赤で示したグルタミン酸) をターゲットとし、このアミ

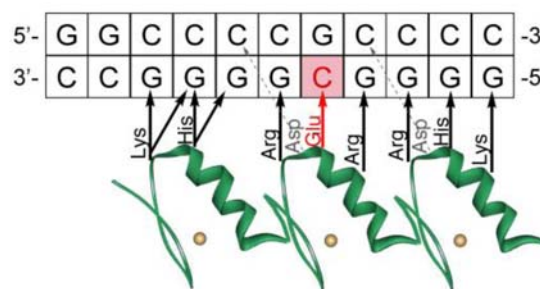


図 2. 亜鉛フィンガーと DNA との結合様式

ノ酸残基自身あるいは近傍のアミノ酸残基を中心にメチルシトシン認識能を導入する部位について、分子モデリング計算を行った。

### (3) メチルシトシン認識能を有する亜鉛フィンガーの作製および DNA 親和性の評価

分子モデリング計算およびオスmium錯体形成の反応性検討から得られた結果に基づいて、前項で述べた CpG 配列上のシトシンと相互作用するグルタミン酸残基に種々の非天然アミノ酸を導入した人工亜鉛フィンガーを Fmoc 固相合成法で作製した。得られた人工亜鉛フィンガーとメチルシトシンを有するメチル化 DNA との親和性をゲルシフトアッセイを用いて評価した。

オスmium錯体はメチルシトシン近傍にミスマッチやアベリック、あるいはバルジ構造を有する二本鎖 DNA や一本鎖 DNA に対しては十分な反応性を示したが、これらの構造を持たない完全な二本鎖 DNA に対しては、十分な親和性が得られなかった。しかしながら、先の分子設計から見出されたリン酸化チロシンを有する人工亜鉛フィンガーがメチル化 DNA に対して高い選択性を有することを見出した。

### (4) 人工亜鉛フィンガーとメチル化 DNA との相互作用

円偏光二色性 (CD)、紫外可視 (UV-vis)、および核磁気共鳴 (NMR) 測定を行い、人工亜鉛フィンガーの構造を検討した。導入したリン酸化チロシンは人工亜鉛フィンガーのフォールディング構造に殆ど影響を与えないことが確認された。さらに、リン酸化チロシンの芳香環とメチルシトシンのメチル基との相互作用やリン酸化チロシンのリン酸基が関与する水素結合によって、メチル化 DNA と亜鉛フィンガーとの複合体が安定化されていることが示唆された。

### (5) 人工亜鉛フィンガーの DNA 結合能の制御

人工亜鉛フィンガーによるメチル化 DNA 検出を制御するために、DNA 結合能を制御する手法について検討を行った。亜鉛フィンガーの N 末端にアゾベンゼンを導入し、アゾベンゼンの異性化により、光に応答して DNA との結合能をオンオフ可能な人工亜鉛フィンガーの開発に成功した。

以上、本研究はメチル化 DNA を認識する人工亜鉛フィンガーを開発し、その DNA 結合能の制御手法を開発した。亜鉛フィンガーはその DNA 結合モチーフが直列に連結し

ているため、制限酵素や二量体タイプの DNA 結合蛋白質とは異なり、回文構造の認識配列に限定されない。さらに、各フィンガーの種類や順序を組み換えることにより多様な認識配列に展開できるため有用性が高く、必要な部位のメチル化を効率的かつ迅速に検出できる。本研究から得られた成果は応用性が高く、幅広い研究の展開が見込まれる。

## 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 9 件)

1. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto  
Design of a novel methylcytosine-recognition zinc finger peptide.  
*Peptide Sci.* **2009**, **2010**, 345–346. 査読有り
2. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto  
Photoresponsive tandem zinc finger peptide.  
*Chem. Commun.*, **2009**, 1906–1908. 査読有り
3. Akiko Nomura, Kazuki Tainaka, Akimitsu Okamoto  
Osmium complexation of mismatched DNA: effect of the bases adjacent to mismatched 5-methylcytosine.  
*Bioconjug. Chem.*, **2009**, **20**, 603–607. 査読有り
4. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto  
DNA binding by photo-controllable zinc finger peptide.  
*J. Biol. Inorg. Chem.*, **2009**, **14** (Suppl. 1), S154. 査読無
5. Akiko Nomura, Kazuki Tainaka, Kazuo Tanaka, Tadashi Umemoto, Akimitsu Okamoto  
Addition of osmium to DNA pyrimidine bases.  
*J. Biol. Inorg. Chem.*, **2009**, **14** (Suppl. 1), S70. 査読無
6. Akiko Nomura, Kazuki Tainaka, Akimitsu Okamoto  
Osmium complex binding to mismatched methylcytosine: effect of adjacent bases.  
*Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2009**, **53**, 207–208. 査読無
7. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto

Photo-control of DNA-binding of a zinc finger peptide containing azobenzene.  
*Peptide Sci.* 2008, **2009**, 405–406. 査読有

8. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto  
Heterogeneity of osmium oxidation efficiency at consecutive thymines.  
*Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 3905–3907. 査読有
9. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto  
Reactivity of thymine doublet in single strand DNA with Osmium Reagent.  
*Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2008**, *52*, 433–434. 査読無

[学会発表] (計 8 件)

1. 野村 章子  
メチルシトシンを認識する新規亜鉛フィンガーペプチドの設計  
第 46 回ペプチド討論会  
平成 21 年 11 月 5 日、小倉
2. Akiko Nomura  
Osmium complex binding to mismatched methylcytosine: effect of adjacent bases.  
The 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry and 36th Symposium on Nucleic Acids Chemistry  
平成 21 年 9 月 28 日、高山
3. Akiko Nomura  
DNA binding by photo-controllable zinc finger peptide.  
14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry  
平成 21 年 7 月 27 日、名古屋
4. Akiko Nomura  
Control of DNA binding by a zinc finger peptide having an azobenzene photo-switch.  
The 4th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference  
平成 20 年 11 月 13 日、Korea
5. 野村 章子  
アゾベンゼン亜鉛フィンガーペプチドによる DNA 結合の光制御  
第 45 回ペプチド討論会  
平成 20 年 10 月 30 日、東京
6. 野村 章子

連続したチミン配列におけるオスミウム酸化反応の選択性  
第 58 回錯体化学討論会  
平成 20 年 9 月 21 日、金沢

7. 野村 章子  
亜鉛フィンガーペプチドの光機能制御  
第 58 回錯体化学討論会  
平成 20 年 9 月 20 日、金沢
8. Akiko Nomura  
Reactivity of thymine doublet in single strand DNA with Osmium Reagent.  
Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and 35th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry  
平成 20 年 9 月 11 日、京都

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)  
名称: メチル化 DNA 結合ペプチド  
発明者: 岡本 晃充、野村 章子  
権利者: 独立行政法人 理化学研究所  
種類: 特許出願  
番号: 2009-239657  
出願年月日: 平成 21 年 10 月 16 日  
国内外の別: 国内

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
野村 章子 (Nomura Akiko)  
独立行政法人理化学研究所・岡本独立主幹研究ユニット・ユニット研究員  
研究者番号: 40443006