

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：平成21年度～平成22年度

課題番号：21710228

研究課題名 (和文) DNA内メチルシトシン塩基の光酸化反応機構の解明と
新規DNAメチル化検出系の探索研究課題名 (英文) Mechanistic Studies on the Photooxidation of Methylated Cytosine
in DNA and Its Application to Novel DNA Methylation Analysis

研究代表者

山田 久嗣 (YAMADA HISATSUGU)

京都大学・先端医工学研究ユニット・助教

研究者番号：80512764

研究成果の概要 (和文)：

DNA 中のメチル化シトシン(^mC)を高効率かつ高選択的に検出する新しい光機能分子システムの設計を目標とした。(1) アントラキノンを導入した DNA 二重鎖内で標的 ^mC が効率よく光酸化され、従来法に比べ約3倍の検出感度の向上に成功した。(2) ^mC での光反応に及ぼす重水素同位体効果を検討し、中間体の脱プロトン化過程が位置特異的 DNA 切断の鍵反応であることを明らかにした。(3) さらに、DNA 内ホール移動現象を応用して、複数の ^mC 部位を同時検出可能な分子システムの基礎を構築した。

研究成果の概要 (英文)：

Our interest focuses on the potential application of remarkable photooxidative reactivity of 5-methylcytosine (^mC) to methylation-mapping system and on further understanding the mechanism of photooxidation at ^mC in DNA. In the project, we revealed that (1) incorporation of an anthraquinone (AQ) sensitizer into a DNA strand enhanced one-electron photooxidation, leading to efficient strand cleavage at the ^mC site, (2) deprotonation at the C5-methyl group of an intermediate ^mC radical cation may occur as a key elementary reaction in the AQ-photooxidative strand cleavage at the ^mC , and (3) DNA strand cleavage at multiple ^mC residues was induced by AQ-photoinjected positive charge (hole) transfer through DNA duplex. The results obtained may provide a guide for the molecular design of highly sensitive and selective photochemical methods for the identification and analysis of ^mC in DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：機能性核酸・光増感反応・DNA内電荷移動反応・5-メチルシトシン・同位体効果

1. 研究開始当初の背景

(1) シトシン塩基の5位のメチル化はゲノムDNAとタンパク質との相互作用に影響を与え、遺伝子発現制御を司る。シトシンのメチル化による遺伝子発現制御は癌を含む様々な疾患と密接に

関わることを示唆されている。遺伝子内のメチル化度合いを解析する手法の開発は、臨床的に、また生物学的にも極めて重要な研究課題である。これまでに化学的アプローチによる様々なメチル化シトシン(^mC)検出法が開発されてきた。しか

し、従来法は遺伝子の化学修飾反応に長時間を必要とすること、またメチル化判定時の操作が煩雑であるという問題点も指摘されていた。

(2) 申請者は、DNA 内の ${}^m\text{C}$ が光増感剤 (1,4-ナフトキノン (NQ)) との光誘起一電子移動反応を経て選択的に光酸化され、アルカリ条件下で不安定な生成物を生じ、部位特異的な DNA 鎖切断に至ることを世界に先駆けて明らかにしてきた。また、 ${}^m\text{C}$ 部位での DNA 鎖切断をモニターすることにより、標的 DNA 中のメチル化を簡便に差別化可能であることを見いだしていた。この光酸化反応を用いるメチル化判定手法は、反応が 1~2 時間程度で終了するため、従来法に比べ非常に簡便・迅速な方法であるが、DNA 中の ${}^m\text{C}$ の光酸化反応効率が低いことが問題であり、微量であるゲノム DNA 中のメチル化検出系へと展開するには高効率・高選択的な光酸化反応系への拡張が必要であった。

2. 研究の目的

これら背景を踏まえて本研究では、光酸化反応中間体の挙動を解析することにより、DNA 中の ${}^m\text{C}$ 塩基の光酸化反応機構を明らかにするとともに、 ${}^m\text{C}$ 塩基の光酸化損傷と DNA 媒介正孔 (ホール) 移動反応の相関を検証し、DNA 中のメチル化を高効率かつ高選択的に検出する新しい光機能分子システムを設計することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 高効率な光酸化反応および DNA 鎖切断反応を達成するために、従来の NQ 光増感剤に代わる新たな光増感剤を探索した。

(2) 得られた光増感剤を用いて DNA 中の ${}^m\text{C}$ 塩基の光反応機構、特に ${}^m\text{C}$ ラジカルカチオン (${}^m\text{C}^{+\bullet}$) 中間体からの脱プロトン化反応機構を明らかにするため、速度論的同位体効果が ${}^m\text{C}$ の光酸化反応に及ぼす影響を生成物分析により評価する計画を立てた。

(3) DNA 内ホール移動現象を応用して、複数の ${}^m\text{C}$ 部位を同時検出可能な光機能分子システムへと展開できると考えた。DNA 中 ${}^m\text{C}$ の光酸化反応と競争する DNA 媒介ホール移動反応を配列依存的に検討し、メチル化部位でのみホール捕捉される DNA 媒介ホール移動反応系の探索も併せて行った。

4. 研究成果

(1) 「アントラキノン光増感剤を用いた 5-メチルシトシン塩基部位での光酸化的 DNA 切断の高効率化」

まず、 ${}^m\text{C}$ 部の光酸化切断反応の高効率化を目指して光酸化剤を最適化するアプローチも試みた。光増感剤アントラキノン (AQ) は、励起三重項状態から種々の核酸塩基を効率良く一電子酸化する特性を有しており、これまでに DNA 内電荷移動反応機構を解明する研究分野で広

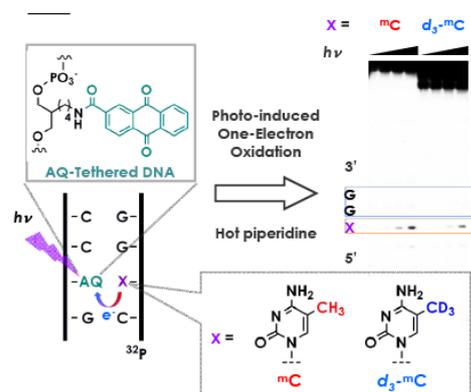
く活用されてきた。この特長に着目し、AQ を DNA 鎖内に導入した新たな光機能性核酸を設計・合成して、DNA 二重鎖内の光酸化反応を調べた。その結果、AQ と近接した ${}^m\text{C}$ 塩基が効率良く光酸化され、その光酸化切断効率が NQ の場合に比べて約 3 倍向上することを見出した。AQ を新たな光増感剤として用いることにより、 ${}^m\text{C}$ 部の光酸化切断反応の高効率化に成功した。

Sensitizers	Φ_{ISC}^a	$-\Delta G_{ET}^b$ (eV)	Cleavage yields (%)	$\Phi_{cleavage}^c$ ($\times 10^3$)
	> 0.9	0.42	11.2	2.0
	0.66	0.58	3.7	1.3

^a Ref. 9 The free energy changes of charge separation ($-\Delta G_{ET}$) for photooxidation of ${}^m\text{C}$ by ${}^1\text{AQ}^*$ and ${}^1\text{NQ}^*$ were estimated using Rehm-Weller's equation and the corresponding triplet excited state reduction potentials (${}^1\text{NQ}^*$: 2.31 and ${}^1\text{AQ}^*$: 2.30 V vs. NHE, respectively) and the oxidation potential of ${}^m\text{C}$ base (1.73 V vs. NHE). ^b The relative quantum yields were calculated from the strand cleavage efficiency of the ${}^m\text{C}$ site, using phenylglyoxylic acid as a chemical actinometer. The light flux was estimated to be 1.66×10^{19} quanta s^{-1} .

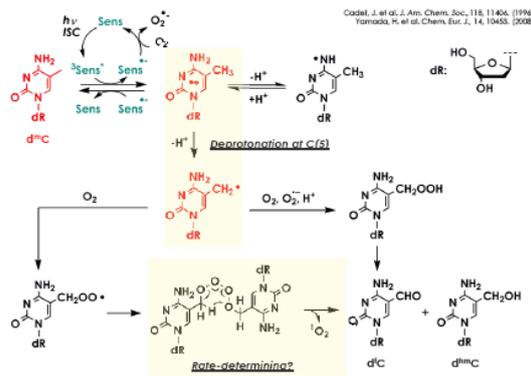
(2) 「DNA 内 ${}^m\text{C}$ 塩基の光一電子酸化反応に及ぼす速度論的同位体効果」

これまでの申請者ら結果を踏まえて、高効率および高選択的な ${}^m\text{C}$ 光酸化反応の鍵は ${}^m\text{C}^{+\bullet}$ 中間体からの脱プロトン化反応にあるだろうと仮説を立てた。そこで、C5 位メチル基の水素を全て重水素置換した ${}^m\text{C}$ 誘導体 ($d_3\text{-}{}^m\text{C}$) を含む DNA オリゴマーを新規に合成し、 ${}^m\text{C}$ 部位での光酸化切断反応に及ぼす C5 位の速度論的同位体効果を調べた。光増感剤として、前項で見出した AQ を含む光機能性 DNA オリゴマーを用いた。 ${}^m\text{C}$ および $d_3\text{-}{}^m\text{C}$ 部位での AQ-増感光酸化的 DNA 鎖切断をポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) により評価した結果、 ${}^m\text{C}$ 部位に比べ重水素化した $d_3\text{-}{}^m\text{C}$ 部位での切断効率は抑制された。



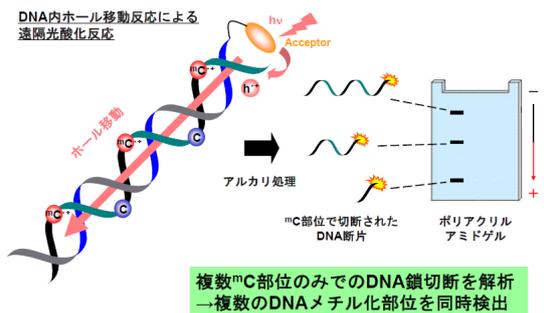
これらの結果から、切断反応全体に及ぼす同位体効果は小さいが、 ${}^m\text{C}^{+\bullet}$ からメチルラジカル中間体への C5 位脱プロトン化反応過程が DNA 内 ${}^m\text{C}$ の光酸化反応および部位特異的切断に関与することが強く示唆された。これは新しい知見である。最近、国外の研究グループから、DNA 内電荷移動が誘起するチミン連続部位での酸

化的 DNA 鎖切断反応においても、同様の脱プロトン化機構が提案された。



(3) 「DNA 内電荷移動反応による 5-メチルシトシン部位の一電子酸化と位置選択的 DNA 鎖切断」

① AQ 増感剤が光注入したホールの DNA 分子内移動反応を応用して、複数の ¹³C 部位を検出可能な分子システムの構築に成功した。AQ を 5'末端に導入した AQ-ODN と標的 DNA 二重鎖の光反応を追跡した結果、光注入されたホールが DNA 内を移動し、複数の標的 ¹³C 部位で選択的に切断されることを見出した。



具体的には、DNA の 5'末端に AQ を導入し、標的 DNA 配列内のシトシン (C) 部位の相補塩基としてイノシン (I) を配列中に配置した機能性 DNA オリゴマー (AQ-ODN) を設計した。本研究成果に繋がった特筆すべきポイントは、標的シトシン塩基の相補位置に通常グアニン (G) の代わりに、同様の水素結合様式かつ酸化電位の高い I を相補塩基として配置したことである。実際に、G を配置した AQ-ODN では ¹³C 部分での切断が抑制され、¹³C 部位を検出できなかった。

② DNA 鎖内に複数存在する ¹³C 部位での切断反応に及ぼす距離依存性を詳細に検討することで、光励起 AQ により注入されたホール移動反応および ¹³C 部位での DNA 鎖切断反応の詳細を明らかにした。¹³C を同一鎖内に 4 塩基配置した二重鎖に対する光反応を追跡し、増感剤からの距離に対して各 ¹³C 部位での切断効率がどのくらい変化するか検討した。その結果、末端 AQ からの距離の増加に伴って著しく減少し、DNA 内ホール移動反応に特徴的な距離依存性が認められた。すなわち、¹³C 部位での選択的

な DNA 鎖切断が、光励起 AQ により注入されたホールの DNA 内移動反応に起因することが明らかとなった。本研究結果と過去の研究結果と併せて考えると、¹³C 部位での選択的切断反応は光注入されたホールが DNA 鎖内を移動して、¹³C ラジカルカチオン中間体 (¹³C•+) が生成した後、塩基性条件下で不安定な酸化体に変換された結果、¹³C 部位で選択的に切断されることが示唆された。一方、AQ の近傍に存在する ¹³C 部位での切断効率に顕著な差は認められなかった。これらの系では、電荷再結合反応がホール移動反応と競争的に進行すると予想される。すなわち、末端 AQ から比較的距離に近い ¹³C•+ から AQ ラジカルアニオンへの電荷再結合反応が優位に進行し、見かけの切断反応効率が低下したと推察された。

③ 次に、本 ¹³C 検出システムの適用範囲を拡げるため、G 連続配列が存在する二重鎖に対してホール移動による ¹³C 部位での光酸化切断を検討した。その結果、¹³C 部位における切断とともに、G 連続配列部位での切断バンドが観測され、G 連続配列が DNA 二重鎖内で酸化され易く、¹³C 部位と競争的な酸化切断が進行した。一般に、遺伝子内の ¹³C 部位は G を豊富に含む領域で形成され易い。G 残基を多数含む遺伝子配列内に存在する ¹³C 部位を検出するために、G 部位での非特異的な切断を抑制する新たな系を構築することにした。

④ 標的 DNA 内 G 塩基の相補部位として 5-フルオロシトシン塩基 (F) を導入した AQ 含有機能性オリゴマーを設計・合成した。5-フルオロシトシン塩基の N3 位におけるプロトン化平衡定数は $pK_a = 1.7$ であり、その相補位置で発生した G ラジカルカチオンの脱プロトン化反応 ($pK_a = 3.8$) を抑える効果を及ぼすと予想した。5-フルオロシトシンを配置した二重鎖に対する光酸化反応を評価したところ、相補塩基にシトシンを配置した二重鎖に比べて、対応する G 部位での切断が著しく抑制された。この結果は、G 部位に対する相補塩基の電子効果が有効に作用するような G 部位での切断を抑制し得ることを示している。以上の結果より、標的 DNA 内の G 部位に対する相補位置に電子求引性の官能基を導入した塩基を配置したプローブ用 DNA オリゴマーを用いれば、一電子酸化され易い G 塩基が存在しても複数の標的 ¹³C 部位を明瞭に検出可能であることが明らかとなった。

項目(3)で得られた一連の研究成果は、標的 DNA 内に存在する G 塩基には相補的な F 塩基を、C 塩基には相補的な I 塩基をそれぞれ導入した AQ-ODN を用いることにより、酸化され易い G 塩基が共存する系において DNA 内の ¹³C 部位を切断バンドとして複数同時に検出することに成功したことである。今後、¹³C を含む DNA 二重鎖内のホール移動反応に及ぼす配列依存性をさらに検討すれば、実在の遺伝子配列に適用可能な ¹³C 検出用分子システムの構築への展開

が可能になると期待される。

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 6 件)

- ① Tanabe, K.; Yamada, H.; Nishimoto S. "Preparation of Functionalized Oligodeoxynucleotides and Photochemical One-Electron Oxidation of 5-Methylcytosine in DNA" *J. Synth. Org. Chem.* **2011**, *in press*. 査読有
- ② Yamada, H.; Kitauchi, Y.; Tanabe, K.; Ito, T.; Nishimoto, S. "Anthraquinone-Sensitized Photooxidation of 5-Methylcytosine in DNA Leading to Piperidine-Induced Efficient Strand Cleavage" *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2225-2235. 査読有
- ③ Ito, T.; Uchida, T.; Tanabe, K.; Yamada, H.; Nishimoto, S. "Photoinduced Electron Injection into DNA by N-Cyclopropyl-1-aminonaphthalene" *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2011**, *219*, 115-121. 査読有
- ④ Ito, T.; Hayashi, A.; Uchida, T.; Tanabe, K.; Yamada, H.; Nishimoto, S. "Photo-Induced Electron Transfer Reaction in Diaminostilbene-Tethered DNA Duplexes" *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2009**, *53*, 201-202. 査読無
- ⑤ Yamada, H.; Kitauchi, Y.; Tanabe, K.; Ito, T.; Nishimoto, S. "Efficient Photooxidative Strand Cleavage at 5-Methylcytosine in DNA by Sensitization with 9,10-Anthraquinone-Tethered Oligonucleotides" *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2009**, *53*, 209-210. 査読無
- ⑥ Tanabe, K.; Yamada, H.; Ito, T.; Nishimoto, S. Photoelectrochemical Identification of 5-Methylcytosine Modification in DNA: Combination of Photosensitization and Enzymatic Cleavage, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2009**, *53*, 205-206. 査読無

[学会発表] (計 11 件)

- ① Kitauchi, Y.; Yamada, H.; Tanabe, K.; Ito, T.; Nishimoto, S., Efficient one-electron photooxidation and site-selective strand cleavage at 5-methylcytosine in DNA by oligonucleotide bearing 9,10-anthraquinone sensitizer, Pacificchem 2010 (Honolulu, USA, December, 19, 2010)
- ② Kurata, M.; Yamada, H.; Tanabe, K.; Ito, T.; Nishimoto, S., Selective trapping at cytosine derivatives of photosensitizer-injected and

migrated hole in DNA, Pacificchem 2010 (Honolulu, USA, December, 19, 2010)

- ③ Kurata, M.; Yamada, H.; Tanabe, K.; Ito, T.; Nishimoto, S., Efficient Hole Trapping at C(5)-Substituted Cytosine in the Photosensitizer-Injected Positive Charge Transfer through DNA Duplex, 7th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (Yokohama, Japan, November, 11, 2010)
- ④ Kitauchi, Y.; Yamada, H.; Tanabe, K.; Ito, T.; Nishimoto, S., One-Electron Oxidation at 5-Methylcytosine Induced by the Photosensitizer-Injected Positive Charge Transfer through DNA, 7th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (Yokohama, Japan, November, 11, 2010)
- ⑤ 山田久嗣、北内佑哉、田邊一仁、伊藤健雄、西本清一、メチル化DNAの光増感酸化反応に及ぼす重水素同位体効果、第90回日本化学会春季年会 (東大阪、3月27日、2010年)
- ⑥ 山田久嗣、光化学反応を利用したDNAメチル化検出法の開発、バイオ計測・試薬研究会「バイオ計測・試薬分野における若手科学者・技術者のシーズ・構想発表会」(京都、3月10日、2010年)
- ⑦ 藏田真之、山田久嗣、田邊一仁、伊藤健雄、西本清一、C(5)位に置換基を導入した修飾シトシン含有DNAオリゴマーの合成と四重鎖形成特性、第24回生体機能関連化学シンポジウム 若手フォーラム (福岡、9月、2009年)
- ⑧ 北内佑哉、山田久嗣、田邊一仁、伊藤健雄、西本清一、アントラキノ光増感剤を導入したオリゴDNA: 5-メチルシトシン塩基部位での選択的DNA切断、第24回生体機能関連化学シンポジウム (福岡、9月、2009年)
- ⑨ Yamada, H.; Kitauchi, Y.; Tanabe, K.; Ito, T.; Nishimoto, S., Efficient Photooxidative Strand Cleavage at 5-Methylcytosine in DNA by Sensitization with 9,10-Anthraquinone-Tethered Oligonucleotides, 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (Takayama, Japan, September, 2009)
- ⑩ Tanabe, K.; Yamada, H.; Ito, T.; Nishimoto, S., Photoelectrochemical Identification of 5-Methylcytosine Modification in DNA: Combination of Photosensitization and Enzymatic Cleavage, 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (Takayama, Japan, September, 2009)
- ⑪ Yamada, H.; Kitauchi, Y.; Tanabe, K.; Ito, T.; Nishimoto, S., Photochemical Approach to Discrimination of Methylated Cytosine in DNA: pH Effect on the

Naphthoquinone-Sensitized One-Electron
Photooxidation of 5-Methylcytosine, XXIV
International Conference on Photochemistry
(Toledo, Spain, July, 2009)

[その他]

学会発表②および③は、各学会ポスター賞を受賞。学会発表⑥は、奨励講演賞を受賞した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 久嗣 (YAMADA HISATSUGU)

京都大学・先端医工学研究ユニット・助教

研究者番号：80512764