

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22651076

研究課題名（和文） 化学的なシトシン塩基メチル化法の開発

研究課題名（英文） Study in chemical methylation of cytosine base

研究代表者

兒玉 哲也（KODAMA TETSUYA）

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：00432443

研究成果の概要（和文）：発生や分化、感染へ防御などに関わる核酸塩基修飾であるシトシン塩基 5 位のメチル化を制御する三重鎖核酸形成オリゴ核酸を基盤とした化学的技術の開発を目指し、メチルスルホニウム基を持つオリゴ核酸の合成法を確立した。メチルスルホニウム基を持つオリゴ核酸を標的 DNA に作用させた結果、グアニン塩基上でのメチル化（アルキル化）に伴う DNA 断片が生成した。これは、アルキル化試薬-核酸複合体が標的 DNA をアルキル化に有用であることを示した例であり、シトシン 5 位のメチル化法の確立に向けた大きな一歩である。

研究成果の概要（英文）：Methylation of the cytosine base at C5 position was important modification concerning gene expression, cellular differentiation, virus infection and so on. Toward the development of the triplex-forming-oligonucleotide-based chemical technique that induces the methylation, a synthetic method of oligonucleotide conjugating a methylsulfonium group was established. As a result of the treatment of target DNA with a methyl sulfonium conjugating oligonucleotide, some DNA fragments derived from the methylation (alkylation) on the guanine bases were formed. It is important that triplex forming oligonucleotide conjugating an alkylating agent induced DNA alkylation, which is the first step toward the methylation of cytosine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	2,100,000	0	2,100,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,200,000	330,000	3,530,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：メチル化、オリゴヌクレオチド、複合体化、人工核酸、三重鎖形成核酸

1. 研究開始当初の背景

生命機能を維持するための大きなシステムの中で、遺伝子発現は実に巧妙に制御されている。そのメカニズムは未だに不明な点で覆い尽くされているが、例えば、DNA 中のシト

シン塩基 5 位のメチル化はエピジェネティクスと題されて世界中の研究者によって注目されている重要な遺伝子抑制機構の 1 つであり、細胞の発生・分化のほか、ウイルス感染やトランスポゾン（ゲノム上を動くことの出

来る配列) などから遺伝子が破壊されることを防ぐ機能を有していると考えられている。

(1) 5-メチルシトシン (mC) はヒト DNA 中に 1% 程度存在するマイナー塩基であり、CG (シトシン-グアニン) 配列に多く存在している。これは通常、 $5' - ^mCG - 3' / 3' - G^mC - 5'$ と二重鎖で対称に修飾され、一方のみがメチル修飾 (ヘミメチル化) されている配列はメンテナンスメチル化酵素に厳密に認識され、その CG 配列はメチル化を受け mCG となる。また、ゲノム中の $5' - CG - 3' / 3' - GC - 5'$ 配列をメチル化する酵素 Dnmt3 は、ES 細胞中多く見いだされ、必要なくなった遺伝子発現を抑制することで細胞の発生・分化を制御していると考えられている。

(2) mC が酸化されて生じる 5-ヒドロキシメチルシトシン (hmC) はメンテナンスメチル化酵素の基質となりにくいことから、修復酵素による除去に失敗すると、複製により CG 配列へと置き換わると考えられている。また研究開始当初には、 mC を hmC へと変換する酸化酵素と考えられる酵素が急性骨髄性白血病と関連している可能性が見いだされるなど、 mC の積極的酸化による hmC の生成が脱メチル化やがん化などと密接に関連していることが示唆されるようになってきた。

これらの事実は、特定のシトシン塩基のみのメチル化/脱メチル化を化学的に誘起する技術を開発することが出来れば、高度な遺伝子工学的な遺伝子改変操作技術を必要とせず、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構を制御できることを示唆しているが、望みとするシトシン塩基のみを標的としてメチル化や脱メチル化を行う技術はなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、遺伝子発現調節と密接に関連している DNA 中シトシン塩基 5 位でのメチル化を化学的に実施できる分子プローブの開発を目指すものである。高度に官能基化されている核酸上での位置選択的なアルキル化反応は非常に困難であることが想定されるが、発現制御困難な遺伝子をエピジェネティックに抑制する全く新しい科学技術としての発展が期待できることから、あえてその開発に挑戦する。

(2) 二重鎖核酸を配列特異的に認識して三重鎖を形成する三重鎖形成核酸は、標的とする配列中のシトシン塩基をその遺伝子の除去 (ノックアウト法) や RNA の分解や抑制 (RNAi 法やアンチセンス法) で行って来た遺伝子発現制御法に加え、メカニズムの異なる第三の遺伝子抑制法が加わることとなり、遺伝子工学や生命化学の分野に幅広く利用される技

術となることが期待できる。また、エピジェネティックに遺伝子の発現を抑制可能な核酸医薬として、例えば、何らかの原因で DNA の脱メチル化が進行しガン化した細胞を、選択的に修復できる医薬品へ繋がると考えられ、その応用範囲は極めて広い。

3. 研究の方法

DNA メチル化酵素のメチル化機構は、ウラシル塩基をヒドロキシメチルウラシル塩基へと変換する有機合成反応に用いられる手法と類似しており、これらの相違点であるシトシン塩基 3 位の活性化 (プロトン化) がシトシン塩基上で同様のアルキル化反応を進行させる鍵であると考えた。即ち、(a) シトシン 6 位での付加脱離反応が可能な適度な求核性官能基 (チオールや 3 級アミン、アルコール、ホスフィンなど) と (b) その官能基の求核反応時に生じる電子密度の増加を緩和可能なプロトン源、そして (c) 炭素上でのメチル化反応のためのメチル化試薬をシトシン塩基近傍の適度な位置に設定可能であれば、これまで報告例がないシトシン塩基 5 位でのメチル化反応を達成可能であると考えられる。DNA 中のシトシンはグアニンと水素結合を形成しており、特に、電子密度の増加が予想されるシトシン 3 位窒素原子と 2 位カルボニル基が、それぞれ酸性なグアニン塩基 1 位および 2 位アミノ基と水素結合していることで、必要反応条件 (b) の基準を満たす可能性があると考え、「求核性官能基 (a) とメチル源 (c) を反応場に近づける」ことのできる三重鎖形成核酸を設計し用いることで残りの条件を満たす、全く斬新な DNA 上での有機化学を展開する。

(1) DNA メチル化酵素のメチル化機構を化学的に模した空間を三重鎖形成核酸により構築するために、二重鎖 DNA を強固に認識可能で、かつ求核性官能基やメチル化能を有する官能基で就職した化された三重鎖形成核酸を各種合成する。

① 二重鎖 DNA を強固に認識する三重鎖形成核酸の性質を多様化させることを目的として、多官能基化された人工核酸ユニットや糖部骨格を刷新した人工核酸ユニットなど、新たに数種類の人工核酸ユニットを創製し、その基本的性質を評価するとともに、三重鎖形成核酸としての機能を評価する。

② 報告例のなかった架橋型人工核酸 BNA のリバース合成用アミダイトユニットの合成法を確立する。これにより 5' 末端から 3' 末端方向にオリゴ核酸を合成することができるようになり、3' 末端から 5' 末端方向に合成する通常のオリゴ核酸合成用アミダイトでは達成が困難な、DNA 合成機上での DNA 合成後の 3' 末端官能基化を可能とする。

Det: A Ch1

107.2

10.07

17.348

14.842

分解した鎖

Cを含む標的鎖

メチルスルホニウム化オリゴ核酸

Gを含む相補鎖

5-メチル化体?

メチルスルホニウム化オリゴ核酸の自己分解により生じたスルフィド化オリゴ核酸

0 5 10 15 20 25 30 35 40

中のシトシン 5 位をメチル化した証拠を得ることはできなかったが、標的 DNA をアルキル化できる事を示すことができたことは、シトシン 5 位のメチル化法に向けた大きな一歩である。さらに、高反応性のカチオン性官能基をオリゴ核酸と複合体化する手法の構築や、複合体化の際に有用な人工核酸ユニットの創出に繋がったことは、当初目的とは別に大きな成果である。

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 3 件)

- ① Kazuto Mori, Tetsuya Kodama, Satoshi Obika, Design, synthesis and properties of boat-shaped glucopyranosyl nucleic acid. *Organic Letters*, 13, 2011, 6050-6053. 査読有
- ② Kazuto Mori, Tetsuya Kodama, Takeshi Baba, Satoshi Obika, Bridged nucleic acid conjugates at 6'-thiol: synthesis, hybridization properties and nuclease resistances. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9, 2011, 5272-5279. 査読有
- ③ Takeshi Baba, Tetsuya Kodama Kazuto Mori, Takeshi Imanishi, Satoshi Obika, A novel bridged nucleoside bearing a conformationally switchable sugar moiety in response to redox changes. *Chemical Communications*, 46, 2010, 8058-8060. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Tetsuya Kodama, Kazuto Mori, Takeshi Baba, Satoshi Obika, A new entry of thiol-containing nucleic acid monomer for conjugation chemistry. 6th Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology. 2011年9月4日-7日, Queens' College Cambridge, UK
- ② 森 和土、兒玉哲也、馬場 武、小比賀 聡、架橋部位にチオール基を有する新規人工核酸の合成及びその評価、第20回アンチセンスシンポジウム、2010年12月2日-3日、兵庫・甲南大学
- ③ Kazuto Mori, Tetsuya Kodama, Takeshi Baba, Satoshi Obika, A Novel Bridged Nucleic Acid Containing a Thiol Group in the Bridged Structure: Synthesis,

Conjugation with Functional Molecules and Hybridization Properties. The 37th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry. 2010年11月10-12日, 神奈川・はまぎんホールヴィアマーレ

- ④ 森 和土、兒玉哲也、馬場 武、小比賀 聡、架橋部位にチオール基を有する新規人工核酸の合成とコンジュゲート化への応用、第60回 日本薬学会近畿支部大会、2010年10月30日、大阪・摂南大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兒玉 哲也 (KODAMA TETSUYA)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：00432443