

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23651188

研究課題名（和文） ゲノムDNA中に新規に発見された5-ヒドロキシメチルシチジンの配列決定法の開発

研究課題名（英文） Development of the new detection method for 5-hydroxymethylcytidine in genomic DNA

研究代表者

花見 健志 (HANAMI TAKESHI)

独立行政法人理化学研究所・LSA 要素技術開発ユニット・研究員

研究者番号：60392073

研究成果の概要（和文）：

5-hmdC を含む DNA オリゴマーを長鎖アルキルアンモニウム塩が共存する状態でアプロティックな溶媒に溶解させたうえで、5-hmdC 選択的な保護反応を行った。その結果、4位のアミンと5位のヒドロキシメチル基を架橋する形で保護する試薬と選択的に反応していることを示唆する結果を得ることが出来た。さらに、この保護基は脱アミン反応に対して安定であった。

研究成果の概要（英文）：

DNA oligomer containing 5-hmdC is react with protecting reagent with solvation to the aprotic solvent in the presence of long chain alkyl ammonium salt. The result showed that 5-hmdC is protected selectively by bridging 4'-amine and 5'-hydroxymethyl group. This protection group is stable under the condition of deamination reaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：

(1) 5-ヒドロキシメチルシチジン (2) 化学変換 (3) 配列決定

1. 研究開始当初の背景

ゲノムDNA上のシトシン(C)の5位のメチル化はメチル化酵素によってエピジェネティックに行われており、遺伝子内の CpG 配列の70～80%程度がメチル化されている。このメチル化は遺伝子発現の制御に大きく関わっており、バイサルファイト法によって、我々の研究室も含め解析が盛んに行われていた。しかしこれまで5-メチルシトシン(5-mC)以外のDNAのエピジェネティックな修飾については報告されていなかった。

2009年4月、米科学雑誌 Science に、これ

までに知られているヒトのゲノムDNAを構成する塩基アデニン(A)、グアニン(G)、C、チミン(T)とエピジェネティックな遺伝子制御を行う上で重要とされている5-mC以外に、5-hmCが存在しており、脳やプルキンエ神経細胞などに多く見られることを報告された。この知見はゲノムDNAのエピジェネティクスを考える上で重要な5-mC以外にも構成要素が存在する可能性を示すものである。この論文ではゲノムDNAの酵素分解物であるモノヌクレオチドの組成定量分析を行ってその存在を示しているが、実際に塩基配列上で

どのような位置に存在するかまでの配列解析には至っていない。さらに線虫で見つかったゲノム DNA 上の 5-ヒドロキシメチルウラシルをグルコシル化する酵素である JBP1 のヒトホモログである TET1 が、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞内において 5-mC を 5-hmC に変換する可能性を示す論文も報告された。これらの報告から、ヒトにおいても 5-hmC がゲノム DNA 上で酵素的に変換され、エピジェネティカルな制御の一躍を担っていることが示唆されていた。しかし 5-hmC がヒトゲノム DNA 上に存在するにも関わらず、その配列位置情報を解析することが出来ないという状況はエピジェネティクス研究を行う上で大きな問題であった。

通常、5-メチルシチジン (5-mdC) の配列位置情報の解析には、バイサルファイト法と呼ばれる化学的塩基コンバージョン後にシーケンシングを行うという手法がとられる。バイサルファイト法は、5-mdC と dC が存在する DNA に重亜硫酸ナトリウムを作用させて脱アミノ化する際の速度の違いを応用したもので、比較的容易に脱アミノ化されてデオキシウリジン (dU) に変換される dC と異なり、5-mdC はその反応に長時間を要するため、一定時間後に反応を止めることで、5-mdC を残したまま dC のみを dU に変換する方法である。しかし、2010 年 4 月にこの手法では 5-mdC と 5-ヒドロキシメチルシチジン (5-hmdC) の修飾の違いを認識することは出来ないことが報告されていた。つまり化学変換によるシーケンス法では 5-mdC と 5-hmdC を判別することは出来なかった。

2. 研究の目的

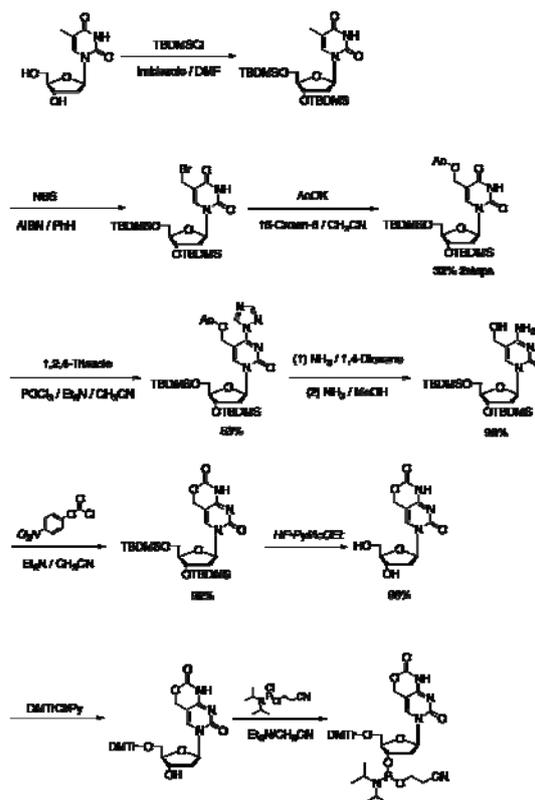
本研究では、シーケンサーで配列決定を可能とするために 5-hmdC 選択的な化学変換法の開発と、シーケンス反応への応用を目的とする。

3. 研究の方法

この研究は次の 3 点から構成される。(1) ゲノム DNA の構成塩基である 5-ヒドロキシメチルシチシン (5-hmC) の特異的な化学保護および脱保護法の開発 (2) 保護された 5-hmC 以外のシトシン、5-メチルシトシンのウラシルおよびチミンへの化学変換法の開発 (3) DNA オリゴマーを用いて 5-hmdC 検出のための化学変換法の適用とシーケンサーへの応用

(1-1) 5-hmdC の保護と反応性の検討のため、基準物質となるモノマーの合成を行った。さらに DNA オリゴマーの合成に用いるためのアミダイト体の合成、および 5-hmdC を含む DNA オリゴマーの合成を行った (式 1)。

(式 1)



(1-2) 5-hmdC が導入されたオリゴマーの化学合成を行い、長鎖アルキルアンモニウム塩存在下 DMSO のようなアプロティックな溶媒に溶解性について UV スペクトルから確認を行った。

(2-1) DMF 中に臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) 存在下、5-hmdC が導入されたオリゴマーにカルボニルジイミダゾールを反応させた。これを HPLC で精製したのちに酵素分解法によりモノマーに分解、これを HPLC で確認した。

(2-2) 亜硝酸ナトリウムによる塩基の化学変換検討を行い、塩基の脱アミン反応について HPLC による評価を行った。

(3) (2-1)、(2-2) で示した条件で長鎖のオリゴマー中に含まれる 5-hmdC 選択的な保護基の導入し、簡易カラム等で精製後シーケンスサンプルの調整を行ない、ライブラリの作成の検討を行った。

4. 研究成果

(1-1) では出発物質として安価なチミジンを用い、モノマーの合成、および DNA 合成機へ用いるためのアミダイト体の合成を達成した。この合成行程においてアセトニトリル等のアプロティックな溶媒で、5-hmdC のアミノ基と 5-ヒドロキシメチル基を架橋する形での

保護反応が進行することを確認した。これらの5-hmdCモノマーおよび誘導体はHPLC等での塩基に対する化学変換反応追跡のための基準物質とした。また5-hmdCを含むDNAオリゴマーの合成を行い、MASSにより5-hmdCが含まれているオリゴマーが合成されることを確認した。

(1-2) では、この溶液のUVスペクトルにDNAに由来する260 nm付近のピークが確認できたことから、溶解していることを示した。CTABの疎水性がDNAの可溶化に寄与していると考えられる。

(2-1) において、5-hmdCを含有するDNAオリゴマーを保護反応後の酵素分解反応産物を、保護反応前の酵素反応産物とHPLC解析により比較したところ、5-hmdCが選択的に反応したと考えられるピークが得られた。カルボニルジイミダゾールは水系では速やかに分解されてしまうが、アプロテックな溶媒にDNAを溶解させることによって5-hmdCを選択的に保護できていると考えられる。

(2-2) において、亜硝酸ナトリウムによる塩基の脱アミン反応は既に報告例がある。5-hmdCも亜硝酸ナトリウムによる反応がHPLCで確認されたが、カルボニルで保護することにより亜硝酸ナトリウムに対して安定であることがHPLCから示された。

(3) (2-1)、(2-2)で示した条件で長鎖のオリゴマー中に含まれる5-hmdC選択的な保護基の導入と亜硝酸ナトリウムによる塩基の脱アミン反応を行い、簡易カラム等で精製後シーケンスサンプルの調整を行ったが、ライブラリの作成までは至らなかった。残存している有機溶媒とCTABが何らかの悪影響を与えていると考えられる。シーケンス解析を行うためにはこれらを精密に除去する方法の開発が必要であると考えられる。

本研究では5-hmdCを含むDNAオリゴマーを長鎖アルキルアンモニウム塩が共存する状態でアプロテックな溶媒に溶解させることによって、カルボニルジイミダゾールのような水で分解してしまう試薬を5-hmdCの選択的に反応させる系を見いだした。この保護基は脱アミン反応に対して安定であることから、保護反応前後のDNA配列を比較することによって、5-hmdCの配列決定が出来ると期待される。今後は簡便な精製法等の開発を行い、この系を用いた5-hmdCの配列決定に発展させる。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]
○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
花見 健志 (HANAMI TAKESHI)
独立行政法人理化学研究所・LSA 要素技術開発ユニット・研究員
研究者番号：60392073

(2)研究分担者

伊藤 昌可 (ITO MASAYOSHI)
独立行政法人理化学研究所・オミックス制御
研究ユニット・ユニットリーダー
研究者番号：90344027

(3)連携研究者

なし