

平成30年6月18日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05572

研究課題名(和文)人工蛋白質を用いたヒドロキシメチルシトシン検出法の開発と脱メチル化挙動の解明

研究課題名(英文) Development of DNA recognition proteins for detection of 5-hydroxymethylcytosine and demethylation process

研究代表者

野村 章子 (Nomura, Akiko)

同志社大学・研究開発推進機構・嘱託研究員

研究者番号：40443006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：DNAのメチル化は細胞の発生や分化、癌化や様々な疾患に、DNAの脱メチル化は細胞の分化状態のリセットに関与していることが知られている。DNAメチル化はその機構が詳細に解明されている一方、脱メチル化にはいくつかの機構が提唱されてはいるが完全には解明されていない。脱メチル化機構においてヒドロキシメチルシトシンは重要な中間体として注目されているが、その存在量は細胞によって異なり、かつ絶対量がメチルシトシンと比較して少ないため、その検出は難易度が高い。本研究はヒドロキシメチルシトシンの検出を目的として、ヒドロキシメチルシトシンを認識するタンパク質・ペプチドを作製し、DNAとの相互作用を検討した。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation is involved in the regulation of many epigenetic processes, including embryonic development, cellular differentiation, the etiopathogenesis of tumorigenesis and aging. Demethylation of DNA contributes to cellular reprogramming. Many achievements involving DNA methylation mechanisms have been reported, while, the mechanisms of DNA demethylation is not completely clarified. 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC) is regarded as one of the most important intermediates in demethylation processes, however, detection of 5hmC is quite difficult because of its very low abundance. In this study, an artificial protein/peptide has been developed that bind preferentially to a 5hmC, and interaction between hydroxymethylated DNAs and the protein/peptide was investigated.

研究分野：生体関連化学

キーワード：DNA 蛋白質 ペプチド

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多く存在し、塩基配列の変化を伴わずに遺伝子機能を制御する可逆的なエピジェネティクス機構であり、細胞の発生や分化を制御し、細胞の癌化や様々な疾患にも密接に関連していることが知られている。一方、DNA の脱メチル化は分化した細胞が全能性を獲得する上で必要不可欠なステップであり、マウスの初期胚発生において、受精直後の精子由来ゲノムと始原生殖細胞にゲノム全体の DNA 脱メチル化が観測されている。DNA のメチル化はその機構が詳細に解明されている一方、脱メチル化にはいくつかの機構が提唱されているものの、完全には解明されていない。

もう1つのエピジェネティック修飾であるヒドロキシメチルシトシン (hmC) は近年、DNA 脱メチル化の鍵と考えられている。ヒドロキシメチルシトシンはメチルシトシン (mC) から TET (ten-eleven translocation) 蛋白質によってのみ産生する。TET 蛋白質は ES 細胞、始原生殖細胞、卵細胞に高発現しており、メチルシトシンのメチル基を水酸化してヒドロキシメチルシトシンを合成し、さらにホルミルシトシン (fC) 、カルボキシシトシン (caC) へと酸化する。ホルミルシトシン、カルボキシシトシンはチミン DNA グリコシラーゼ (TDG) によって切除され、一連のサイクルが ES 細胞で恒常的に進行していると考えられており、TET 蛋白質とヒドロキシメチルシトシンを含む一連のメチルシトシン酸化は細胞のリプログラミングに関与していると考えられる。

上記の理由から、ヒドロキシメチルシトシンはメチルシトシンの脱メチル化における重要な中間体として注目されている。ヒドロキシメチルシトシンは存在量が細胞によって異なり、かつ絶対量がメチルシトシンと比較して少ないため、その検出は難易度が高い。直接的検出法として、ヒドロキシメチルシトシン抗体を用いた免疫沈降法が一般的だが、抗体の特異性や結合強度、ロット間ばらつきが存在し、濃縮された DNA はヒドロキシメチルシトシン濃度と必ずしも直線関係がないため、定量や発生部位の特定は困難である。また、間接的検出法としては、ヒドロキシメチルシトシンを β -グルコシトランスフェラ

ーゼ (β -GT) でグルコシル化変換後に制限酵素で切断、あるいは修飾を導入してアフィニティーカラムで回収する方法や、TAB-seq 法 (ヒドロキシメチルシトシンを β -GT 処理後に TET による酸化、続けてバイサルファイト処理およびシーケンシングを行う。) 等が開発されており、定量や発生部位の特定が可能ではあるが、ステップ数が多く操作が煩雑である。特にバイサルファイト処理は、反応中の DNA 損失が 99.9%以上 (Okamoto, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17, 1912-1915.) であることから、絶対量が少ないヒドロキシメチルシトシンに用いるにはまだ問題点を残している。

2. 研究の目的

前項を鑑み、本研究はヒドロキシメチルシトシンの検出およびヒドロキシメチルシトシンを経由する脱メチル化挙動の解明を目指して、ヒドロキシメチルシトシンを認識するタンパク質を作製し、これを用いてヒドロキシメチル化 DNA の検出を行う。

3. 研究の方法

ヒドロキシメチルシトシンのヒドロキシメチル基は DNA のメジャーグループに位置している。DNA-TET 複合体の構造が既に報告されており (Xu et al, *Cell*, 2013, 155, 1545-1555.)、これを基にヒドロキシメチル化 CG 配列の認識に必要な相互作用および各相互作用間の効果的なネットワークを分子モデリング計算を用いて設計する。

上記検討から得た蛋白質およびペプチドと DNA との親和性を検討する。具体的には標的 DNA とのゲルシフト実験、および蛋白質・ペプチドとゲノム DNA を用いた蛍光偏光測定を行う。各実験から標的 DNA との相互作用を定量化し、評価する。併せて、NMR 等の分光測定から構造や相互作用に関する知見を得て分子設計にフィードバックする。

4. 研究成果

(1) ヒドロキシメチル化 DNA を認識する人工蛋白質・ペプチドの設計

ヒドロキシメチル化 DNA を作製する TET タンパク質に着目して、ヒドロキシメチルシトシンを認識する蛋白質の設計を行った。ヒ

ドロキシメチルシトシンのヒドロキシメチル基は DNA のメジャーグループに位置している。いくつかの DNA-TET 複合体の構造が報告されており (Xu et al., *Cell*, **2013**, *155*, 1545–1555.)、これらの知見を基にヒドロキシメチル化 CpG 配列の認識に必要な相互作用、および各相互作用間の効果的なネットワークを分子モデリング計算を用いて検討した。種々の芳香族性アミノ酸残基や疎水性アミノ酸残基に関する検討の結果、側鎖アミノ酸残基としてチロシンが有効であることが示唆された。

(2) 人工蛋白質・ペプチドの作製と分光学的性質の評価

分子設計から得られた結果を基にペプチドおよびタンパク質を作製した。得られたペプチドの分光学的特性を検討した結果、変異アミノ酸を導入しても天然型と同様にフォールディング構造を形成することを確認した。

(3) 標的 DNA との親和性の評価

作製および取り扱いが容易なペプチドを用いて、標的 DNA とのゲルシフト実験、およびゲノム DNA を用いた蛍光偏光測定を行い、疎水性アミノ酸残基側鎖のサイズと形状がヒドロキシメチルシトシンとの相互作用に影響を与えていることを見出した。さらに、得られた結果をフィードバックして水素結合等の複数の相互作用の設計を検討し、分子設計の最適化を行った。

本研究のペプチドは、メチル化、ヒドロキシメチル化、非メチル化 DNA を識別可能なことが明らかとなった。また、標的 DNA との化学反応による検出・観測を目指して、当該ペプチドをはじめとするプローブ分子と DNA との化学反応についても検討を行っている。また、蛍光ラベルを細胞内に導入し、共焦点レーザー顕微鏡 (共同利用機器) を用いて細胞内でのヒドロキシメチル化 DNA 観測の検討を行っている。

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 5 件)

1. Akiko Nomura, Masahito Kodera, Yutaka Hitomi
Development of Artificial Bleomycin: Pentadentate Monocarboxylamide Ligand Having a Spermine Tail for DNA Binding.
Peptide Science, **2018**, 154–155. 査読有り
2. Natsumi Ohashi, Akiko Nomura, Masahito Kodera, Yutaka Hitomi
Structurally Simple Cell-permeable Porphyrins: Efficient Cellular Uptake and Photo-toxicity of Porphyrins with Four Peripheral Primary amine terminated Oligo(ethylene oxide) Chains.
Chemistry Letters, **2017**, *46*, 1754–1756. DOI: 10.1246/cl.170821, 査読有り
3. Akiko Nomura, Yuji Iwamoto, Kengo Arakawa, Akihiro Kashida, Masahito Kodera, and Yutaka Hitomi
DNA Cleavage through Reductive Dioxygen Activation by Iron-Bleomycin Mimics with Carboxamido Ligation: Correlation between DNA Cleavage Efficacy and Redox Potential.
Chemistry Letters, **2017**, *46*, 1109–1111. DOI: 10.1246/cl.170354, 査読有り
4. Akiko Nomura, Akihiro Kashida, Masahito Kodera, Yutaka Hitomi
Oxidative DNA Cleavage by Synthetic Mononuclear Nonheme Iron Complex Having Cationic Short Peptide Tail for DNA Binding.
Peptide Science, **2017**, 173–174. 査読有り
5. Akiko Nomura, Natsumi Ohashi, Ryosuke Miyachi, Masahito Kodera, Yutaka Hitomi
Effect of central metal ions on the cytotoxicity of metalloporphyrins

having a cationic peptide tail.
Peptide Science, **2016**, 261—264. 査読
有り

[学会発表] (計 9 件)

1. 野村 章子、坂井 僚介、岩本 勇次、
小寺 政人、人見 穰
DNA二重鎖を切断する人工ブレオマイ
シンの合成
日本薬学会 第138年会、2018年
2. Akiko Nomura, Ryosuke Sakai, Yuji
Iwamoto, Masahito Kodera, Yutaka
Hitomi
Development of artificial bleomycin
analogue: Pentadentate carboxamide
ligand having spermine moiety for
DNA binding.
The 54th Japanese Peptide
Symposium, 2017年
3. 野村 章子、奥田 夏未、岩本 勇次、
加藤 俊介、小寺 政人、小野田 晃、
林 高史、人見 穰
鉄ブレオマイシン機能モデル錯体を用
いた酸素の還元的活性化による酸化的
DNA切断
第11回バイオ関連化学シンポジウム、
2017年
4. 坂井 僚介、野村 章子、小寺 政人、
人見 穰
ヒドロペルオキシド鉄(III)錯体の生成と
その反応性に関する研究
2017年度先端錯体工学研究会(SPACC)
年会、2017年
5. Akiko Nomura
DNA cleavage by iron-bleomycin
mimics.
8th Asian Biological Inorganic
Chemistry Conference (AsBIC8)、
2016年
6. Akiko Nomura, Akihiro Kashida,
Masahito Kodera, Yutaka Hitomi

Cellular Application of Cell-membrane
Permeable Fluorescent Zinc Probe
Having a Cationic Peptide Tail.
The 53th Japanese Peptide
Symposium, 2016年

7. Akiko Nomura
DNA cleavage through reductive
dioxxygen activation by iron-bleomycin
mimics.
2015 International Chemical Congress
of Pacific Basin Societies (Pacifichem
2015), 2015年
8. Natsumi Ohashi, Akiko Nomura,
Ryosuke Miyachi, Masahito Kodera,
Yutaka Hitomi
Effect of central metal ions of cellular
uptake and cytotoxicity of a series of
metalloporphyrins having a cationic
peptide tail.
The 52th Japanese Peptide
Symposium, 2015年
9. 麻生 健太、福井 克樹、野村 章子、
人見 穰、小寺 政人
DNA の特異的切断：Minor groove
binder を模倣した二核金属錯体の開発
第5回CSJ化学フェスタ、2015年
6. 研究組織
(1) 研究代表者
野村 章子 (NOMURA, Akiko)
同志社大学・研究開発推進機構・研究員
研究者番号：40443006