

平成22年 5月28日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20750134

研究課題名 (和文) DNA 中メチル化変異を検出する光機能性人工核酸の開発

研究課題名 (英文) Detection of 5-methylcytosine in DNA by functionalized oligodeoxynucleotides

研究代表者

田邊 一仁 (TANABE KAZUHITO)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：40346086

研究成果の概要 (和文)：

申請者は、DNA 中メチル化シトシンの簡便検出法の開発を目的として、光反応を用いたメチル化シトシン選択的な鎖切断システムの構築を試みている。これまでに、ナフトキノン誘導体を光増感剤として使用すると、DNA 中のメチル化シトシン部が酸化されることを見出し、当該部分で選択的な鎖切断が起こることを明らかにしている。

本研究において、反応の詳細を調べたところ、メチル化シトシン塩基の光酸化に伴い、ホルミルシトシン誘導体が生成していることがわかった。続いて、反応メカニズムを考察したところ、一電子酸化反応に続く脱プロトン化とメチルラジカル生成が本酸化反応には関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Although the NQ-photosensitized oxidation accompanied by selective strand cleavage at  ${}^m\text{C}$  in DNA is an attractive method for identification of the methylation site in DNA, the relatively lower sensitivity of the detection method due to the less efficiency in the photooxidation of  ${}^m\text{C}$  still remains as a major subject to be improved for establishing a status of general availability. In this study, we characterized reaction mechanism of the NQ-photosensitized one-electron oxidation of 5-methyl-2'-deoxycytidine ( $\text{d}^m\text{C}$ ) in order to obtain insight into the design of photochemical system involving the  ${}^m\text{C}$ -selective strand cleavage with high sensitivity. We confirmed that deprotonation of  $\text{d}^m\text{C}$  radical cation and formation of methyl radical species are key reaction for the present photoreaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：生物有機化学

## 1. 研究開始当初の背景

分子生物学の研究の進展により、多くの疾患は遺伝子の異常と密接な関係にあるという認識が広く定着し、がんを含む病的細胞のゲノム DNA からは多様な遺伝子変異が検出されてきた。その遺伝子変異の検出技術には DNA ハイブリダイゼーション能を基盤とした直接的な手法が中心的に用いられ、正確かつ迅速に検出できるよう自動化へ向けて研究が展開されている。

近年、SNPs (一塩基多型) 等通常塩基の代替によって誘起される変異だけでなく、遺伝子塩基部の化学修飾である DNA メチル化が疾患誘発に大きく関わるようになってきた。DNA のメチル化とは、メチルトランスフェラーゼという酵素により遺伝子塩基部にメチル基が付加される哺乳類ゲノム DNA の唯一の生理的な修飾であり、特に、シトシン塩基 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、遺伝子発現のオン・オフ制御を司る。このメチル化による遺伝子発現制御が疾患と密接に関わることから、遺伝子中のメチル化シトシン (mC) を検出することは、臨床的に、また分子生物学的にも重要である。こうした背景に基づき、これまでいくつか mC の検出法が開発されてきた。mC は、通常のシトシンと同様にグアニンと水素結合を形成するため、DNA チップやモレキュラービーコンに代表されるハイブリダイゼーションを基盤とした遺伝子解析法では検出できない。そのため、シトシンと区別するには高度な技術が必要となる。これまでの報告例としては、ヒドラジンを用いた Maxam-Gilbert 化学修飾法、Sodium Bisulfite による化学修飾法、制限酵素による切断を用いる手法等が報告されている。しかし、これらの方法は複雑な操作や長い反応時間を必要としたり、検出に特殊な機器を必要とするといった問題点が指摘されている。こうしたことから、簡便で一般的なメチル化シトシンの検出方法の開発が大きな研究課題となっていた。

## 2. 研究の目的

メチル化シトシンは、1,4-ナフトキノンを用いた光増感酸化反応に極めて高い反応性を示す一方で、通常のシトシンはほとんど不活性である。すなわち、DNA 中の mC は、ナフトキノン共存下での光反応により酸化体へと変換され、アルカリ処理により DNA 鎖がメチル化部で切断されるのに対し、メチル化されていない場合は切断されない。申請者は、こうした光 DNA 鎖切断の有無をモニターす

ることにより、mC を検出できると考えた。また、遺伝子を検出する際に被検体遺伝子は、ごく少量で行なうことが望ましい。したがって、通常の変異検出は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR 法)を用いて、遺伝子のコピーを大量に作成した後、行なわれることがほとんどである。しかしながら、mC は、PCR 法を用いるとシトシンとしてコピーされるため、メチル化遺伝子を増幅することはできない。したがって、通常の PCR 法ではメチル化の状況を保持したまま被検体遺伝子の増幅ができず、単純に高感度検出は実現できない。即ち、メチル化検出には別法によるシグナル増幅が求められる。本研究では、高感度メチル化検出法の開発を目指し、mC 選択的 DNA 切断反応の高効率化を進めるとともに、蛍光発光によりメチル化を判別する分子システムの構築を試みた。

## 3. 研究の方法

従来の研究を通じて、申請者は DNA 中メチル化シトシン部選択的な光切断反応を見出している。これまでに得られた知見を利用して、メチル化遺伝子を高感度にかつ簡便に検出するシステムの構築を試みた。

従来までの知見から、1,4-ナフトキノン誘導体の光増感反応では、メチル化シトシン部が一電子酸化された後、生成するラジカルカチオン種に酸素が付加することによって、5-ホルミルシトシン(fC)が形成されることがわかっていった。一般的にホルミル基は、アミンやヒドラジン誘導体とカップリングしてイミンを形成することが知られている。従って、アミノ基あるいはヒドラジン部をもつ蛍光分子を光反応生成物であるホルミル体と縮合すれば、メチル化された遺伝子のみが蛍光分子でラベル化されると考えた。一方、非メチル化遺伝子では、ホルミル化されるメチル基は存在せず、蛍光分子を添加しても何も起こらないため、発光しない。すなわち、mC の有無を蛍光発光の有無で識別できると考えた。

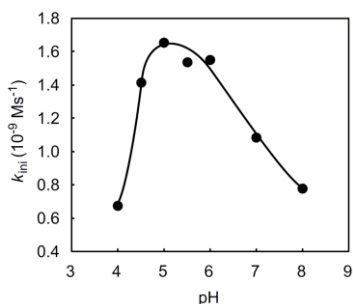
そこで、光酸化反応の高効率化を図ると共に、反応生成物と蛍光分子との縮合反応を調べた。

## 4. 研究成果

ナフトキノン光増感部を導入した DNA オリゴマーを合成し、その相補鎖との光反応を調べた。300–365 nm の光を照射したところ、原料の減少が確認されたため、反応後の生成物と蛍光分子 AMCA-hydrazide との縮合を試みた。ヒドラジン部をもつ蛍光色素が光反応に

より生成するホルミルシトシンと縮合することが期待されたが、反応生成物は得られず、想定した反応は進行しなかった。この原因として、光反応効率が低いことが考えられたため、ナフトキノン含有 DNA オリゴマーとメチルシトシン含有 DNA の光反応の詳細を調べることにした。

次に、各種 pH における光反応を検討した。分光学的手法による反応解析を行なったところ、pH4.5 以下の酸性条件ではメチルシトシン塩基はプロトン化され、酸化されにくくなることがわかった。一方、反応生成物の解析を行なったところ、H5.0-8.0 の範囲では、反応中間体のプロトン化・脱プロトン化が最終生成物の形成に大きな影響を与え、pH5 付近で最も効率よく反応が進行することが分かった。また、がん抑制遺伝子 p53 の部分配列を用いてシステムを検証したところ、従来の方法よりもメチル化シトシン部での切断効率が向上することがわかった。



mC-ナフトキノン光増感反応の pH 効果

さらに、反応メカニズムについて検討した。本反応ではメチルシトシンからホルミルシトシンが生成することから、一電子酸化反応に続く脱プロトン化とメチルラジカル生成が本酸化反応には関与している仮定した。これら反応メカニズムを検証するため、以下の実験を行った。まず、脱プロトン化が構造上不可能なジメチルシトシンを合成し、同じく光酸化反応を行ったところ、酸化反応は著しく効率が低下した。これらのことから、脱プロトン化反応が重要な鍵反応であることが示唆された。次に、メチルラジカルを別途生成する前駆体(allyl radical precursor)として、5 位に PhSe 基をもつメチルシトシン誘導体(PhSe-C)を合成した。PhSe-C に光照射(ラジカル生成反応)を行い、ホルミルシトシン形成を期待したが、反応は複雑となった。残念ながら、光酸化反応におけるラジカル生成は確認できなかった。

以上のように、本反応は光増感一電子酸化反応に続いて、脱プロトン化が関与していることが明らかとなった。また、最適 pH を調べたところ、弱酸性条件でもっとも効率よく反応が進行することが分かった。こうした知見

を元に、DNA 中のメチル化シトシンの効率的酸化反応と蛍光分子との縮合反応を再度検討し、メチル化変異の高感度検出系を今後構築していきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- Efficient photooxidative strand cleavage at 5-methylcytosine in DNA by sensitization with 9,10-anthraquinone-tethered oligonucleotides, Yamada, H.; Kitauchi, Y.; Tanabe, K.; Ito, T.; Nishimoto, S. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2009**, *53*, 209–210. (査読無)
- Photoelectrochemical identification of 5-methylcytosine modification in DNA: combination of photosensitization and enzymatic cleavage, Tanabe, K.; Yamada, H.; Ito, T.; Nishimoto, S. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2009**, *53*, 205–206. (査読無)
- Monitoring of biological one-electron reduction by  $^{19}\text{F}$ -NMR using hypoxia selective activation of a  $^{19}\text{F}$ -labeled indolequinone derivative, Tanabe, K.; Harada, H.; Narazaki, M.; Tanaka, K.; Inafuku, K.; Komatsu, H.; Ito, T.; Yamada, H.; Chujo, Y.; Matsuda, T.; Hiraoka, M.; Nishimoto, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15982–15983. (査読有)
- Preparation and Fluorescence Properties of Fluorophore-labeled Avidin-biotin System Immobilized on  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  Nanoparticles through Functional Indolequinone Linker, Hirata, N.; Tanabe, K.; Narita, A.; Tanaka, K.; Naka, K.; Chujo, Y.; Nishimoto, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3775–3781. (査読有)
- Radiolytic activation of cytarabine prodrug possessing 2-oxoalkyl group: one-electron reduction and cytotoxicity characteristics, Hirata, N.; Fujisawa, Y.; Tanabe, K.; Harada, H.; Hiraoka, M.; Nishimoto, S. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 651–654. (査読有)
- Radiolytic one-electron reduction characteristics of tyrosine derivative caged by 2-oxopropyl group, Tanabe, K.; Ebihara, M.; Hirata, N.; Nishimoto, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6126–6129. (査読有)
- Radiation- and photo-induced activation of 5-fluorouracil prodrugs as a strategy for the selective treatment of

- solid tumors, Ito, T.; Tanabe, K.; Yamada, H.; Hatta, H.; Nishimoto, S. *molecules* **2008**, *13*, 2370–2384. (査読有)
8. The pH effect on the naphthoquinone-photosensitized oxidation of 5-methylcytosine, Yamada, H.; Tanabe, K.; Ito, T.; Nishimoto, S. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 10453–10461. (査読有)
  9. Photoelectrochemical evaluation of pH effect on hole transport through triplex-forming DNA immobilized on a gold electrode, Haruna, K.; Iida, H.; Tanabe, K.; Nishimoto, S. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1613–1617. (査読有)
  10. One-Electron reductive template-directed ligation of oligodeoxynucleotides possessing disulfide bond, Tanabe, K.; Kuraseko, E.; Yamamoto, Y.; Nishimoto, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6302–6303. (査読有)
  11. Fluorometric identification of 5-methylcytosine modification in DNA: combination of photosensitized oxidation and invasive cleavage, Yamada, H.; Tanabe, K.; Nishimoto, S. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 20–23. (査読有)

[学会発表] (計 2件)

1. pH effect on the one-electron photooxidation of 5-methylcytosine with naphthoquinone sensitizer Yamada, H.; Tanabe, K.; Ito, T.; Nishimoto, S. 第35回核酸化学シンポジウム 京都 平成20年9月11日
2. DNA中メチル化シトシンの電気化学的検出 田邊一仁・山田久嗣・西本清一 第30回光医学・光生物学会 松江 平成20年7月11日

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページでの研究紹介

<http://www.ehcc.kyoto-u.ac.jp/eh32/home/web-content/index-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田邊 一仁 (TANABE KAZUHITO)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：40346086