

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21750171

研究課題名（和文）新規シッフ塩基型核酸の開発とメチルシトシン識別への応用

研究課題名（英文）Discrimination of methylated nucleobases by a novel modified DNA forming Schiff base

研究代表者

堂野 主税 (DOHNO CHIKARA)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：60420395

研究成果の概要（和文）：DNA の核酸塩基とのシッフ塩基形成反応に基づく、新しい DNA のメチル化塩基識別法を開発した。ホルミル基を有する人工核酸塩基を含むプローブ DNA を用いると、対合する塩基との配列選択的シッフ塩基形成により、鎖間クロスリンクを生じる。本反応が有する、標的塩基上のメチル化の有無に対する高い感受性を用いることにより、DNA 中のシトシン、アデニンのメチル化識別を達成した。

研究成果の概要（英文）：We have developed a novel chemistry-based method to detect all types of natural DNA methylation. A DNA probe functionalized with a formyl group discriminates between non-methylated and methylated nucleobases, such as 5-methylcytosine, N4-methylcytosine, and N6-methyladenine, by the formation of a selective interstrand cross-link.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究代表者の専門分野：生物有機化学、核酸化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：バイオテクノロジー、メチル化核酸塩基、クロスリンク、DNA、分子認識、有機化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 修飾核酸プローブ

これまでに天然の核酸塩基を化学的に修飾することにより、さまざまな新規機能を有する人工核酸が生み出されてきた。核酸塩基がもつ最も基本的で重要な特徴は、非常に高い選択性をもつ AT、GC の相補的塩基対形成である。天然には存在しない、または、天然の塩基対以上の高い塩基選択性と安定な対形成能をもつ新しい核酸塩基対は、DNA チップやハイブリダイゼーションプローブなどの核酸検出やアンチセンス等のバイオツールとして有用である。研究代表者は、高い塩基選択性と強い対形成能を合わせもつ、水素結合に依らない塩基対モチーフとしてシ

ッフ塩基を介した塩基対をこれまでに提案している (*J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 16681)。アルデヒドとアミノ基を適当な位置に有する 2 種の修飾塩基を対合させると、イミン結合を介した「塩基対」が形成される。このシッフ塩基型塩基対は、共有結合で結ばれているため非常に安定であると同時に、加熱するとそのアルデヒドとアミンに解離する。シッフ塩基型塩基対を挿入した DNA 二本鎖は、共有結合でつながったクロスリンクでありながら、通常の水素結合対と同様に可逆的に二本鎖会合・解離が進行する。また、他のアミノ基を有する天然の核酸塩基 (A, C, G) とはシッフ塩基形成が進行せず、非常に高い塩基選択性をも有している。このように

シッフ塩基型の塩基対は、高い塩基選択性と安定性を併せ持っているが、2種類の修飾塩基を必要とすることから、その応用は極めて限定されていた。天然のアミノ基を有する核酸塩基 (A, C, G) とシッフ塩基形成を介して認識・結合する人工核酸の開発は新たな核酸プローブとして期待される。

(2) メチル化塩基の識別

DNA は遺伝を司る生体高分子であり CGTA 4 種の核酸塩基からなる。この4種の文字は全ての生物種で不変であるが、多くの生物種では、それら核酸塩基に化学修飾を加えることで更なる情報付加を行っている。ゲノム中には3種のメチル化核酸塩基、5-メチルシトシン、4-メチルシトシン、6-メチルアデニンが知られている。中でも5-メチルシトシンは、真核細胞中において、遺伝子サイレンシング、分化、エピジェネティクス、がん化などに深く関与しており、その機能・作用機序が非常に注目されている。近年、メチル化塩基の汎用的な識別、シーケンシング手法の開発が求められている。

2. 研究の目的

(1) 生体内において核酸、いわゆる DNA や RNA は、膨大かつ複雑な仕事を精密に遂行している。この高精度な機能は、ワトソンクリック塩基対 (AT, GC) のもつ正確な相補的水素結合形成に多くを依存しており、近年では、このような DNA の特性を活かした様々なツールや技法が、研究・診断に用いられている。一方で DNA を基盤とした技術は、ATGC の4つの塩基がもつ能力により制限されているともいえる。新たな機能の付加や向上を目指して様々な人工核酸塩基も開発されてきた。研究代表者は、これまでに高い塩基選択性と強い対形成とを合わせもつ、水素結合に依らない塩基対モチーフとしてシッフ塩基を介した塩基対を提案している。しかしながら、DNA 鎖間シッフ塩基形成は、2種類の非天然人工核酸塩基の間でのみ進行するため、天然の DNA を標的とするような応用研究に対しては極めて限定されていた。本研究課題では、天然のアミノ基を有する核酸塩基 (A, C, G) とシッフ塩基形成を介して認識・結合する人工核酸の設計・合成・評価を行う。具体的には、標的となる核酸塩基のアミノ基近傍に、ホルミル基を配置可能な新規修飾核酸を設計することにより、シッフ塩基形成により鎖間クロスリンクする修飾核酸を獲得する。

(2) 合成したホルミル基含有シッフ塩基型核酸を新しい核酸型プローブとして活用し、メチル化塩基識別への応用を図る。ゲノム DNA 中のメチル化塩基としては、5-メチルシトシン、4-メチルシトシン、6-メチルアデニンの三種が知られているが、いずれもメチル基はアミノ基上、あるいは、アミノ基近傍に

付加されている。シッフ塩基形成はこれらアミノ基の求核反応を基盤としているため、メチル基の有無は、そのシッフ塩基形成効率を大きく変化させるものと予測される。例えば、シトシン4位のアミノ基とのシッフ塩基形成反応を5位のメチル基により制御できれば、5-メチルシトシンとシトシンの識別が可能になる。シトシンに対してシッフ塩基形成可能なホルミル基含有修飾核酸を開発し、その生物化学的重要性から注目されているシトシンのメチル化識別を達成する。本手法は、現在、方法論が確立していない他のメチル化修飾塩基識別にも適用可能である。アデニンに対するシッフ塩基形成を用いて、アデニンメチル化の識別を行う。

3. 研究の方法

(1) ホルミル基含有核酸の設計と合成

研究代表者が、以前に報告しているシッフ塩基型核酸を基盤として、求電子的なホルミル基をグアニンの6位に有する fG を、シッフ塩基形成可能な修飾核酸として合成する (図1)。反応効率と選択性を合わせ持つよう、ホルミル基とグアニン間には、適当な長さのメチレンリンカーを挿入する。通常の DNA 合成の条件下では、ホルミル基は望まない反応を引き起こすため、その前駆体を合成し、DNA 合成後にアルデヒドへと変換する。具体的には、ジオールの過ヨウ素酸開裂を用いる。常法の DNA 固相自動合成が可能である前駆体アミダイトを化学合成し、過ヨウ素酸を用いた DNA 合成後修飾法により、目的とする fG 含有 DNA へと変換する。

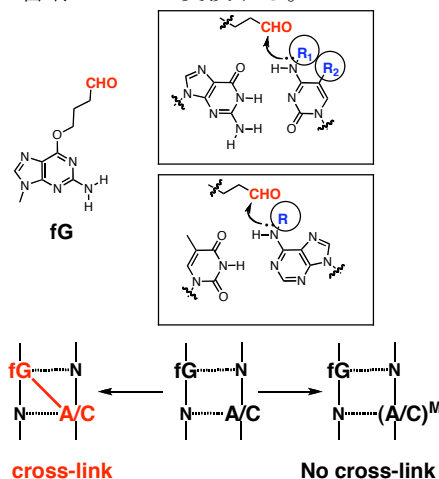


図1. ホルミル基含有核酸塩基 (fG) の設計

(2) 天然核酸塩基とのシッフ塩基形成を介した鎖間クロスリンク

合成した fG 含有 DNA を用いて、シッフ塩基形成によるクロスリンク反応を評価する。弱酸性から中性付近の緩衝液中で、fG 含有 DNA とシトシンもしくはアデニンを対面にもつ相補鎖とを混合し、シッフ塩基形成を融解

温度測定、HPLC、ゲル電気泳動、還元剤 (NaBH₃CN など) による固定、質量分析等の手法により詳細に分析する。標的とする塩基の位置や前後配列などを、様々変化させて上記実験を行い、シッフ塩基形成が最も効率よく進行する配列、反応条件を見出す。

(3) 鎖間クロスリンク反応によるメチル化塩基識別

標的塩基へのシッフ塩基形成による鎖間クロスリンク形成反応を用いて、標的塩基のメチル化の有無を識別する系を構築する。上記研究方法にて最適化した^fG含有DNAの配列、反応条件を用いて、メチル基修飾の有無におけるシッフ塩基形成効率を比較する。メチル化塩基としては、最も代表的な5-メチルシトシンの他、4-メチルシトシン、6-メチルアデニンを検討する。

4. 研究成果

(1) ホルミル基含有核酸 (^fG) の合成

求電子的なホルミル基をグアニンの6位に有する^fGのDNAへの導入のため、^fG前駆体アミダイトの合成を行った(図2)。本アミダイト体を用い、常法のDNA固相自動合成、および、続く過ヨウ素酸を用いたDNA合成後修飾法により、目的とする^fG含有DNAを得た。MALDI-TOF-MSによる質量分析、酵素分解によるヌクレオシド単位のHPLC解析により、^fG含有DNAの合成を確認した。

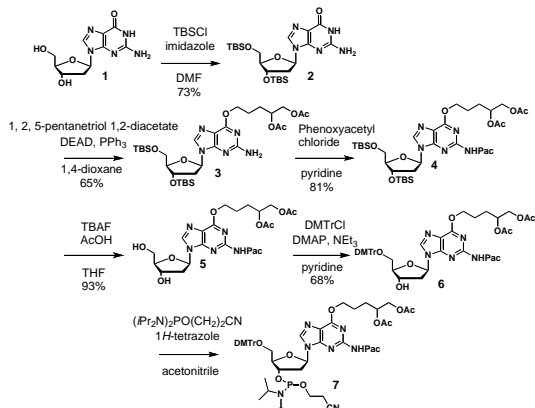


図2. ^fGアミダイトの合成

(2) 天然核酸塩基とのシッフ塩基形成を介した鎖間クロスリンク

①シトシンとのシッフ塩基形成

合成した^fG含有DNAを用いて、シトシンN4アミノ基とのシッフ塩基形成を評価した。^fG含有DNAに対して、様々な位置に標的とするシトシン塩基を含む配列を混合し、鎖間クロスリンク形成反応を、ゲル電気泳動により評価した。シッフ塩基形成に有利である弱酸性条件下(pH = 6)で反応を行った。その結果、鎖間クロスリンク形成が非常に高い配列選択性をもって進行することを確認した(図3a)。鎖間クロスリンク体は、

5'-^fGG-3'/5'-CN-3'の様な配列中に存在するシトシンでのみ進行する。また、HPLC解析により、収率11%(4h)でクロスリンク体が生成することを確認した。クロスリンク形成反応は可逆的であり、弱酸性条件下有利であることから、期待したようなシッフ塩基もしくはカルビノールアミン型のクロスリンク反応が考えられる。

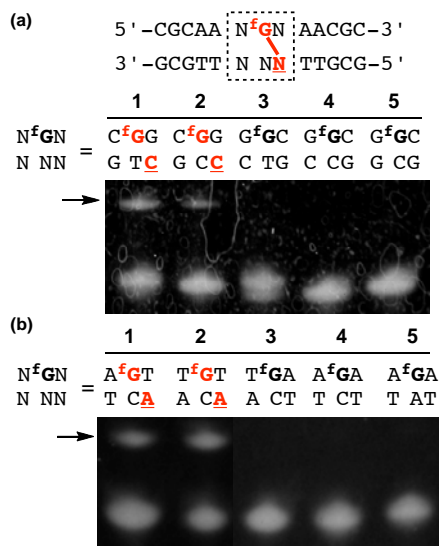


図3. ^fG含有DNAによる鎖間クロスリンク形成。(a) シトシン。(b) アデニン。

②アデニンとのシッフ塩基形成

アデニンのN6アミノ基を標的とする鎖間クロスリンク反応の評価を行った。シトシン同様に高い配列選択性を示し、5'-^fGT-3'/5'-AN-3'の様な配列中に存在するアデニンでのみ鎖間クロスリンク体が生成することが明らかになった(図3b)。鎖間クロスリンク体の物性はシトシンに対するものと同様であり、シッフ塩基もしくはカルビノールアミン生成に由来すると考えられた。クロスリンク生成反応は、シトシンより高収率(27%, 20h)で進行した。

(3) 鎖間クロスリンク反応によるメチル化塩基識別

①アデニンメチル化の識別

より高いクロスリンク効率を示したアデニンのメチル化識別を検討した。研究成果(2)より得られた、クロスリンクの至適配列中(5'-^fGT-3'/5'-AN-3')のアデニンを標的とし、N6メチル化された配列とされていない配列をもつDNAをそれぞれ調製した。鎖間クロスリンクは、メチル化されていないアデニンでのみ確認され、メチル化された配列ではクロスリンクは全く観測されなかった(図4a)。メチル化によるクロスリンク抑制は、塩基Nによらないため、任意の配列中のメチル化アデニンに対して、本手法は有効である。

さらに、大腸菌の相転移に関わる pap オペロン中のアデニンメチル化の識別を行った。標的二本鎖 DNA 中の一箇所のアデニンがメチル化されたものを識別することに成功した。

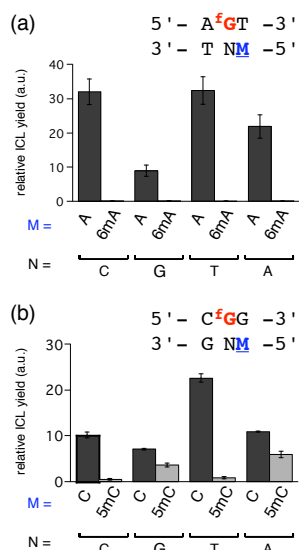


図 4. ^fG 含有 DNA によるメチル化塩基の識別. (a) 6-メチルアデニン. (b) 5-メチルシトシン.

②シトシン 5 位メチル化の識別

同様にシトシンのメチル化識別を検討した。至適配列中 (5'-^fGG-3'/5'-CN-3') のシトシン、5-メチルシトシンを標的とする鎖間クロスリンク反応より、識別能を評価した。鎖間クロスリンクは、メチル化されていないシトシンに対して高効率で進行し、5 位メチル化により強く抑制された (図 4b)。本メチル化識別は 5 位シトシンメチル化識別に有効であるが、対面塩基 N がプリン塩基の場合、反応性および選択性の減少が見られた。シトシンのメチル化は、主に 5'-CG-3' で観測されているため、この配列依存性は今後の応用に向け、改善の余地がある。

③^fG 含有 DNA によるメチル化塩基識別

本手法は、一部の原核細胞で見られるシトシン 4 位メチル化の識別にも有効であった。メチル化識別において鍵となる反応は、^fG のアルデヒドに対する核酸塩基 (シトシン、アデニン) のアミノ基による求核反応である。本反応による鎖間クロスリンク形成は、周辺メチル基の有無によって強く影響を受けることが明らかになった (図 1)。本手法は、新しいシンプルな DNA の化学反応に基づくメチル化識別法である。また、本手法は、現在知られているゲノム DNA 中全てのメチル化塩基 (5-メチルシトシン、4-メチルシトシン、6-メチルアデニン) の識別が可能であり、これらメチル化の役割・機能を調べる手法として有用である。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計5件)

- ① Dohno, C. (代表); Atsumi, H.; Nakatani, K. Ligand Inducible Assembly of a DNA Tetrahedron, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3499-3501, 査読有り
- ② Dohno, C. (代表); Shibata, T.; Nakatani, K. Discrimination of N6-methyl Adenine in a Specific DNA Sequence, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5530-5532, 査読有り

[学会発表] (計6件)

- ① Chikara Dohno (代表、招待講演)、Photoswitchable molecular glue for DNA Nanotechnology、International Symposium: Advanced Science and Technology for Single Molecular Analysis of DNA and Related Molecules (ISSMA2011)、2011.1.25、京都国際会議場 (京都)
- ② 柴田知範、堂野主税 (代表)、中谷和彦、Discrimination of methylated bases in the specific sequence、The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2010)、2010.12.17、ホノルル (米国)
- ③ 柴田知範、堂野主税 (代表)、中谷和彦、DNA cross-link generated by a novel modified DNA containing a formyl group、The sixth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry、2009年9月27日、高山市民文化会館 (岐阜県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堂野 主税 (DOHNO CHIKARA)
大阪大学・産業科学研究所・准教授
研究者番号: 60420395

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし