

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 8 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22750162

研究課題名（和文）人工蛋白質を用いた DNA メチル化の検出および可視化技術の開発

研究課題名（英文）Detection and imaging of DNA methylation by artificial protein

研究代表者

野村 章子 (NOMURA AKIKO)

同志社大学・研究開発推進機構・特別研究員

研究者番号：40443006

研究成果の概要（和文）：

メチル化 DNA の検出方法の開発を目的として、メチルシトシンを特異的に認識する人工蛋白質・ペプチドの開発を行った。亜鉛フィンガー蛋白質を基本骨格として、分子モデリング計算からメチルシトシンとの相互作用を検討し、リン酸化チロシンを有する人工亜鉛フィンガーペプチドを得た。NMR 測定およびゲルシフトアッセイから人工亜鉛フィンガーペプチドの構造とメチル化 DNA 認識能を評価した。人工亜鉛フィンガーペプチドを蛍光分子でラベルし、蛍光偏光測定を用いて二本鎖 DNA のメチル化検出を行った。

研究成果の概要（英文）：

To develop a new detection method of methylated DNA, an artificial protein/peptide has been developed that bind preferentially to a methylcytosine rather than the unmethylated counterpart. Based on molecular modeling calculation of interaction between a methylcytosine and zinc finger proteins, the novel artificial peptide containing phosphotyrosine has been synthesized. Structure of the peptide and binding ability toward methylated DNA was evaluated by NMR and gel mobility shift assay, respectively. Detection of methylation in duplex DNA was examined by fluorescent anisotropy using the fluorescent-labeled artificial peptide.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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

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、細胞の癌化にも密接に関連していることが知られている。従って、メチル解析技術の開発は、生命現象の解明のみならず疾患の原因解明や医療への応用も期待され、重要性が高い。メチル化を検出する方法として、現在、メチル化感受性制限酵素法や亜硫酸水素塩法を用いた方法が広く用いられている。しかしながら、制限酵素法は検出可能な配列が酵素の認識配列に限定されること、亜硫酸水素塩法では副反応のデピリミジネーションとこれに続く鎖切断のために反応系中の DNA サンプルの 99.9% 以上が損失することなど、何れの方法にも課題が残されている。

これに対して研究代表者らは既に、オスミウム 6 価イオンが一本鎖あるいはバルジ構造のメチルシトシンと特異的に錯体形成し酸化することを見出し、メチルシトシン検出 (interstrand complexes formed by osmium and nucleic acids: ICON) 法として報告してきた (図 1)。

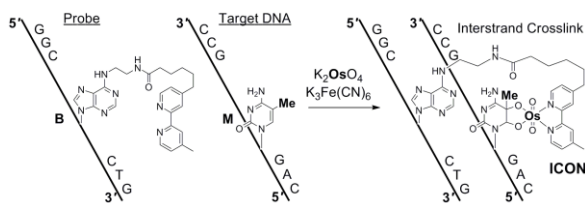


図 1. ICON 法 (Interstrand Complexes formed by Osmium and Nucleic acids)

ICON 法は比較的穏和な反応条件を用いるため従来法の問題点を解決する有望な方法ではあるが、オスミウムの高い毒性のため、取り扱いが容易ではない。さらに ICON 法は亜硫酸水素塩法と同様に一本鎖 DNA がターゲットであるため、標的 DNA を一本鎖に解離する煩雑性がある。従って、安全性が高く、穏和な条件で二本鎖 DNA のメチル化をそのまま簡便に検出する新規手法の開発はエピジェネティック研究において重要と考えられる。さらに、今後はエピジェネティクス解析や診断の次のステップとして、解析手法の開発のみならず、メチル化 DNA の可視化、エピジェネティクス機構の解明や制御に関する重要性も高まると考えられる。

2. 研究の目的

上記の課題を鑑み、穏和な条件で二本鎖

DNA のメチル化をそのまま簡便に検出するために、本研究は人工蛋白質を用いたメチル化二本鎖 DNA の可視化技術の開発を行う。亜鉛フィンガー蛋白質を基本骨格として二本鎖 DNA におけるメチルシトシンを特異的に認識する人工蛋白質を作製する。ラベルを導入した人工蛋白質を用いて、DNA メチル化の可視化・検出を目指す。

3. 研究の方法

二本鎖 DNA をターゲットとした新規メチル化検出・可視化技術として、本研究は DNA 結合蛋白質、特に亜鉛フィンガー蛋白質に着目した。亜鉛フィンガー蛋白質は、二本鎖 DNA を認識し、DNA との複合体の構造もよく解明されている上、研究代表者を含む複数の研究者によって種々の人工亜鉛フィンガー蛋白質が開発・利用されている点からも、本研究課題の有用な基本骨格と成り得る。CpG 配列のシトシンと結合するアミノ酸残基をメチルシトシン認識基に変換するため、メチルシトシンとの相互作用 (疎水性相互作用、CH- π 相互作用、分子のパッキングなど) を計算化学的手法を用いて検討する。得られた人工蛋白質を蛍光色素やナノ粒子でラベルし、蛍光偏光法などから検出・定量方法の開発を行う。短時間で省力的かつ簡便な検出・可視化方法を目指して、in situ 検出法の検討を行う。

4. 研究成果

(1) メチルシトシンを認識する人工蛋白質・ペプチドの設計

メチルシトシンのメチル基は DNA のメジャーグループに位置することが知られている。亜鉛フィンガー蛋白質は、各亜鉛フィンガーモチーフが直列に連結した転写因子であり、DNA のメジャーグループ側に配列特異的に結合する。その結合様式は特定のアミノ酸残基が特定の DNA 塩基と 1:1 で相互作用しており、CpG 配列におけるシトシン認識残基も見積もられている。ヒト転写因子 Sp1 は亜鉛フィンガーモチーフを有し、メチル化修飾を受ける CpG のシトシンに配列特異的に結合する (図 2) が、メチル化の有無に関わらず全く同様に結合し、DNA メチル化を区別することができない。従って、まずは亜鉛フィンガー蛋白質にメチルシトシン認識能を付与する必要がある。

シトシンのメチル化を認識するために、メチルシトシンと相互作用するアミノ酸残基

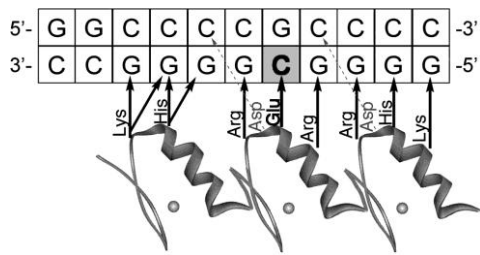


図 2. 亜鉛フィンガーと DNA の結合様式

の分子設計を分子モデリング計算を用いて行った。CH- π 相互作用によるメチルシトシンとの相互作用を狙って、アミノ酸側鎖に芳香環を導入した。さらに芳香環の配向固定やパッキング、周辺残基や標的 DNA との相互作用の向上を狙って、芳香環側鎖への置換基導入も検討した結果、グルタミン酸をリン酸化チロシンに置換した亜鉛フィンガーがメチル化 DNA を特異的に認識することを見出した。分子モデリング計算からは、メチルシトシンとリン酸化チロシン芳香環との CH- π 相互作用、パッキング、リン酸化チロシン近接アミノ酸残基-DNA 間の水素結合ネットワーク形成によって複合体の構造が安定化されていることが示唆された。

(2) 人工亜鉛フィンガーペプチドとメチル化 DNA との親和性の評価

分子設計の結果を基に 59 残基からなる人工亜鉛フィンガーペプチドを Fmoc 固相合成法で作製した。この亜鉛フィンガーペプチドとメチル化 DNA との親和性をゲルシフトアッセイを用いて評価した。ニトロ基、水酸基、スルホン酸等、種々の置換基を導入した芳香環側鎖を有するアミノ酸のうち、リン酸化チロシンがメチルシトシンを含む DNA に対して最も高い親和性を示し、メチル化 DNA を特異的に認識するペプチドを得た。

(3) 人工亜鉛フィンガーペプチドの構造

リン酸化チロシンを有する亜鉛フィンガーペプチドがメチル化 DNA に対して最も高い親和性を示した理由について、 ^{31}P -NMR 測定からリン酸化チロシンと近接アミノ酸残基との水素結合による芳香環側鎖の配向固定が示唆された。さらに、芳香環側鎖の配向が DNA との複合体形成にも関与していることも示唆され、これらの結果は分子モデリング計算の結果と非常に良い一致を示した。

(4) メチル化認識配列の多様化

メチル化認識配列の多様化を目指して、

前年度にモデリング計算から得た亜鉛フィンガー-DNA 複合体の構造を基に、 α -ヘリックス領域のアミノ酸残基を改変したペプチドを作製した。メチル化 DNA の認識能をゲルシフトアッセイを用いて評価した結果、アミノ酸改変前の標的配列とは結合せず、異なる標的配列に対して十分なメチル化認識能を示した。本手法を用いることにより、多様なメチル化配列を標的とした配列特異的メチル化 DNA 検出が期待できる。

(5) メチル化 DNA 検出法の開発

迅速かつ簡便なメチル化 DNA 検出法の開発を目指して、メチル化配列を有するゲノム DNA を用いて蛍光偏光測定を行った。コントロールにはゲノム DNA を脱メチル化処理した非メチル化 DNA を使用した。蛍光ラベルしたペプチドにゲノム DNA を添加すると、DNA の増加に伴い蛍光異方性が大きく増大した。一方、非メチル化 DNA では蛍光異方性の変化は認められなかった。プラスミド DNA を用いた実験でも同様の結果が得られ、蛍光異方性の増大量はメチル化配列の含有数に依存した。

従来法では何れの方法においてもメチル化の検出には数時間から数十時間を要するのに対し、本研究はサンプル DNA に人工亜鉛フィンガーペプチドを添加した後、10 分間で測定可能である。さらに、サンプルの前処理や後処理も不要であり、本研究の人工亜鉛フィンガーペプチドを用いることにより、“mix-and-read”の簡便な検出方法の開発に成功した。

本研究から得られる成果はエピジェネティクス解析、エピジェネティクス制御などの研究分野へ多くの貢献が期待できる。

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, Akimitsu Okamoto, Detection of methylation status of DNA by designed phosphopeptide. *Peptide Sci.* 2011, 2012, 323–324. 査読有り
2. Yukata Hitomi, Akihiro Kashida, Akiko Nomura, Masanori Hayashi, Masahito Kodera, Synthesis and characterization of zinc chelator

conjugated with cationic peptide. *Peptide Sci.* 2011, **2012**, 319–322. 査読有り

3. Akiko Nomura, Kaori Sugizaki, Hiroyuki Yanagisawa, Akimitsu Okamoto, Discrimination between 5-hydroxy methylcytosine and 5-methylcytosine by a chemically designed peptide. *Chemical Communications*, 47, **2011**, 8277–8279. DOI: 10.1039/C1CC12131F, 査読有り
4. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto, Phosphopeptides designed for 5-methyl cytosine recognition. *Biochemistry*, 50, **2011**, 3376–3385. DOI: 10.1021/bi102053d, 査読有り
5. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto, Recognition of methylcytosine in duplex DNA by artificial zinc finger peptide. *Peptide Sci.* 2010, **2011**, 226. 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

1. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto, Detection of Methylated DNA by Designed Zinc Finger Peptide. The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry. 平成23年11月9日, Sapporo, Japan
2. 野村 章子、岡本 晃充、リン酸化ペプチドによる DNA メチル化の検出、第 48 回ペプチド討論会、平成 23 年 9 月 28 日、札幌
3. 人見 穰、榎田 暁洋、野村 章子、林 真規、小寺 政人、リン酸化ペプチドによる DNA メチル化の検出、第 48 回ペプチド討論会、平成 23 年 9 月 27 日、札幌
4. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto, Recognition of methylcytosine in duplex DNA by artificial zinc finger peptide. 5th International Peptide Symposium, 平成22年12月9日, Kyoto, Japan
5. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto,

Photocontrol of DNA binding by zinc finger peptide. The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 平成 22 年 11 月 10 日, Yokohama, Japan

6. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto, Artificial zinc finger peptide for recognition of methylated DNA duplex. The 5th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 平成22年11月4日, Kaohsiung, Taiwan
7. Akiko Nomura, Akimitsu Okamoto, Recognition of methylated DNA by zinc finger peptide. The 60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry in OSAKA, 平成22年9月27日, Osaka, Japan
8. 野村 章子、岡本 晃充、メチル化DNAを認識するペプチドの設計、第4回バイオ関連化学シンポジウム、平成22年9月26日、大阪

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：メチル化 DNA 結合ペプチド
発明者：岡本 晃充、野村 章子
権利者：独立行政法人 理化学研究所
種類：PCT
番号：JP2010/068194
出願年月日：平成22年10月15日
国内外の別：外国

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・特別研究員
研究者番号：40443006