

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550198

研究課題名(和文)ヘミメチル化DNAを認識する人工蛋白質を用いたメチル化維持挙動の検出と制御

研究課題名(英文)Development of hemimethylated DNA recognition proteins for detection and control of DNA methylation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNAのメチル化はCpG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、分化の制御や細胞の老化や癌化に密接に関連している。DNAのメチル化維持機構の詳細は完全には解明されておらず、DNA複製時における片鎖のみがメチル化された非対称な“ヘミメチル化”二本鎖DNAの生成から消失挙動の解明はエピジェネティクス研究に重要な知見を与えられとされる。本研究はヘミメチル化DNAの検出技術を開発することを目的として、これを認識する人工蛋白質・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 and cellular differentiation. DNA methylation particularly appears at the 5'-position of cytosine residue in 5'-CpG-3' sequence. In addition, erroneous DNA methylation may contribute to the etiopathogenesis of tumorigenesis and aging. The inheritance of DNA methylation is coupled to the DNA replication process, however, the mechanisms in detail involving hemimethylation is not completely clarified, in which only one of two complementary strands is methylated. The development of a new detection method of hemimethylation should contribute to coming epigenetics research. In this study, an artificial protein/peptide has been developed that bind preferentially to a hemimethylated DNA rather than the full-methylated and unmethylated DNAs.

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'-CG-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、分化の制御や細胞の老化や癌化に密接に関連していることが知られている。ゲノム上に存在する多数の DNA メチル化・非メチル化のパターンは細胞の種類に特異的であり、細胞分裂のサイクルを通して DNA 複製時にも忠実に継承され、細胞分化状態を維持している。DNA 複製直後、鋳型 DNA 鎖はメチル化されているが、新生した相補的な DNA 鎖はメチル化されておらず、非対称な“ヘミメチル化”二本鎖になっている。従って、親細胞のメチル化パターンを維持するためにメチル化酵素 Dnmt1 が相補鎖 DNA をメチル化するが、その際、ヘミメチル化 DNA 結合タンパク質が SRA (SET and RING finger-associated) ドメインを介してヘミメチル化部位に特異的に結合し、これがメチル化酵素 Dnmt1 をリクルートすることが知られている。

このようにメチル化パターンの維持機構には SRA ドメインによるヘミメチル化 DNA の厳密な認識が必須であるが、メチル化維持機構の詳細は完全には解明されておらず、ヘミメチル化 DNA の生成から消失挙動の解明はエピジェネティクス研究に重要な知見を与えると考えられる。また、ゲノム上に存在する多数の DNA メチル化・非メチル化のパターンは細胞の種類に特異的であり、ES 細胞や iPS 細胞等の幹細胞と分化細胞とでは、そのメチル化パターンが大きく異なることから、分化誘導機構の解明や分化誘導法の開発が近年盛んに研究されている。これまでに ES 細胞を神経細胞や内胚葉系細胞、血球細胞等へ分化誘導する手法が報告されているが、今後、より効果的に任意のターゲット部位のメチル化維持機能を検出および制御できる技術の開発は、分化や発生の研究のみならず再生医療にも大きく貢献できると考えられ、重要性が高い。

2. 研究の目的

上記を鑑み、ヘミメチル化 DNA 結合タンパク質の SRA ドメインに着目した。SRA ドメインは約 200 アミノ酸残基から

なる比較的小さな蛋白質であること、および、構造や作製方法が既知であることから、プローブ化や機能を改変・導入した人工蛋白質やペプチドの設計が十分に可能であり、本研究の人工蛋白質の基本骨格として有望である。

本研究は、ヘミメチル化 DNA をターゲットとし、これを認識する人工蛋白質・ペプチドを作製し、ヘミメチル化 DNA の検出技術を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

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している。いくつかの DNA-SRA 複合体の構造が報告されており、フリップアウトしたメチルシトシン-アミノ酸残基間の疎水性相互作用および水素結合を介してメチルシトシンを認識することが知られている (Shirakawa et al., *Nature*, 2008, 455, 818-821., Jacobsen et al., *Genes Dev.*, 2011, 25, 137-152.)。これを基にヘミメチル化 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。メチルシトシンのフリップアウトによって生じたスペースに挿入されて相補鎖 DNA の塩基と相互作用するアミノ酸側鎖を設計する。DNA 二重鎖は塩基間の π スタッキングと水素結合によって安定化されているため、芳香族と水素結合が可能な置換基を併せ持つ側鎖を設計する。

上記検討から得た人工蛋白質と DNA との親和性をまずは *in vitro* 実験で検討する。具体的には標的 DNA と作製した蛋白質・ペプチドとのゲルシフト実験、および蛍光ラベルを導入した人工蛋白質とゲノム DNA を用いて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) ヘミメチル化 DNA を認識する人工蛋白質・ペプチドの設計

DNA-ヘミメチル化 DNA 結合タンパク質複合体の構造を基に、ヘミメチル化 CpG 配列を認識するアミノ酸を分子モデリング計算

を用いて設計した。メチルシトシンのメチル基および DNA のリン酸ジエステルとの相互作用を狙って、チロシンおよびリン酸化チロシンを用いることとした。フリップアウトしたメチルシトシンのメチル基と側鎖として導入したチロシン間に CH- π 相互作用、および、DNA のリン酸ジエステルとチロシン水酸基間に水素結合を形成し、DNA-蛋白質を安定化可能なことが示唆された。(図 1)

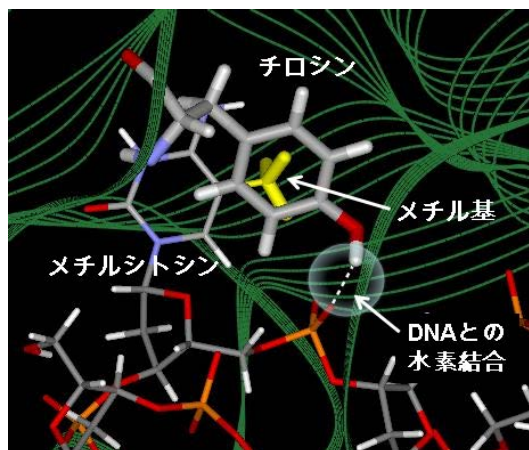


図 1. ヘミメチル化 DNA-人工蛋白質(SRA)複合体のモデル。フリップアウトしたメチルシトシンのメチル基とチロシンとの CH- π 相互作用および DNA リン酸ジエステルとチロシンとの水素結合を設計。

(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、基本骨格候補の蛋白質のうち、まずは、より分子量が小さく作製が容易なペプチドを作製した。フリップアウトしたメチルシトシン塩基との相互作用、あるいは、フリップアウトによって生じたスペースへの挿入と二重鎖 DNA の塩基との相互作用を狙い、前項で得たチロシン、リン酸化チロシンに加えて、疎水性アミノ酸残基を導入したペプチドも併せて作製した。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) 人工蛋白質・ペプチドとメチルシトシンとの親和性の評価

前項で作製したペプチドを用いて DNA との相互作用を検討した。ゲルシフト実験に

よりペプチドと DNA との親和性を評価した結果、疎水性アミノ酸残基を有するペプチドはメチルシトシンとシトシンを識別することが示された。さらに、メチルシトシンとの親和性は分子モデリング計算による分子設計から予測されたように、疎水性アミノ酸残基側鎖のサイズと形状に依存することが明らかとなった。

(4) 人工蛋白質・ペプチドによるヘミメチル化 DNA の検出

DNA との親和性の結果をフィードバックして、人工蛋白質・ペプチドの分子設計を再検討し、人工蛋白質、ペプチドの機能向上を図った。

作製が容易なペプチドを用いてヘミメチル化 DNA との相互作用を検討した結果、疎水性アミノ酸残基を有するペプチドは、メチル化 DNA とヘミメチル化 DNA に対して異なる親和性を示し、両者を識別することを確認した。さらに、当該ペプチドは非メチル化 DNA に対しては、親和性が大きく低下することも確認された。以上の結果から、本研究のペプチドは、メチル化、ヘミメチル化、非メチル化 DNA を識別可能なことが明らかとなった。

以上、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
Interaction between 5-Methylcytosine and Hydrophobic Amino Acid in DNA-Binding Peptide.
Peptide Science 2013, 2014, 463—466.
査読有り
2. Yutaka Hitomi, Akiko Nomura, Ryosuke Miyachi, Toshiyuki Takeyasu, Masahito Kodera

- Peptide Conjugates of Organoselenium Compounds with Glutathione Peroxidase-Like Activity. *Peptide Science* 2013, **2014**, 199—202. 査読有り
3. Akiko Nomura, Kaori Sugizaki, Hiroyuki Yanagisawa, Akimitsu Okamoto
Design of Hydroxymethylcytosine-distinguishable Phosphopeptide from Methylcytosine in DNA. *Peptide Science* 2012, **2013**, 305—308. 査読有り
 4. Yutaka Hitomi, Akiko Nomura, Shoko Matsuda, Akihiro Kashida, Masahito Kodera
Oxidative DNA Cleavage by Synthetic Mononuclear Nonheme Iron Complex Having Cationic Short Peptide Tail for DNA Binding. *Peptide Science* 2012, **2013**, 279—282. 査読有り
 5. Yutaka Hitomi, Toshiyuki Takeyasu, Shoko Matsuda, Akiko Nomura, Akihiro Kashida, Masanori Hayashi, Masahito Kodera
Synthesis and Characterization of Ratiometric Fluorescent Zinc Probe Having Cationic Short Peptide Tail. *Peptide Science* 2012, **2013**, 297—300. 査読有り
- [学会発表] (計7件)
1. Akiko Nomura, Yuji Iwamoto, Kengo Arakawa, Akihiro Kashida, Masahito Kodera, and Yutaka Hitomi
Oxidative Cleavage of DNA by Iron-Bleomycin Mimics.
The International Conference on Hydrogen Atom Transfer (iCHAT 2014)
平成26年6月22日～26日
Rome, Italy. (ポスター賞受賞)
 2. 麻生 健太、山田 仁、野村 章子、人見 穰、小寺 政人
低pH 領域で DNA に強く結合する二核銅および二核コバルト錯体による DNA の高速高効率加水分解
錯体化学第64回討論会
平成26年9月18日～20日
東京都文京区
 3. 麻生 健太、山田 仁、野村 章子、人見 穰、小寺 政人
tacn に基づく二核化配位子を用いた二核金属錯体によるDNAへの結合と加水分解
日本化学会第94春季年会
平成26年3月27日～30日
愛知県名古屋市
 4. 野村 章子、岡本 晃充
Interaction between 5-Methylcytosine and Hydrophobic Amino Acid in DNA-Binding Peptide
第50回ペプチド討論会 (4th Asia-Pacific International Peptide Symposium, APIPS2013)
平成25年11月6日～8日
大阪府吹田市
 5. 人見 穰、野村 章子、武安 俊幸、松田 尚子、小寺 政人
Peptide Conjugates of Organoselenium Compounds with Glutathione Peroxidase-Like Activity
第50回ペプチド討論会 (4th Asia-Pacific International Peptide Symposium, APIPS2013)
平成25年11月6日～8日
大阪府吹田市
 6. 野村 章子、岡本 晃充
ヒドロキシメチルシトシンとメチルシトシンを識別するリン酸化ペプチドの設計
第49回ペプチド討論会
平成24年11月7日～9日
鹿児島県鹿児島市
 7. Akiko Nomura、Akimitsu Okamoto

Discrimination between Hydroxy-
methylcytosine and Methylcytosine by
Metallopeptide

The 6th Asian Biological Inorganic
Chemistry Conference (AsBIC IV)

平成24年11月5～8日

Hong Kong

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