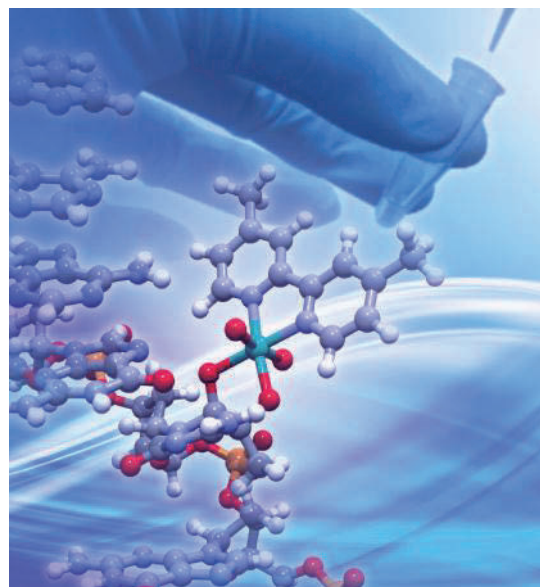


エピゲノム有機化学

東京大学 先端科学技術研究センター 岡本 晃充

1. エピゲノム有機化学

生体の各部位のはたらきは、それらを構成する細胞集団の機能に支配される。細胞個々の機能を決定づけるのは、元をたどれば、今まさに発現しているタンパク質の組み合わせであり、さまざまな RNA の動態であり、DNA の特定の部分から読みだされる情報である。それら一連の過程は、高次構造を有する有機高分子によって引き起こされる現象であり、それらの構造や化学反応を追究することにより解き明かすことが可能になる。ゲノム科学の次の段階である、DNA 配列を変えることなく発現系を多様化させるという細胞機能の本質を問うエピゲノム科学へ生命科学が急激に進化していく中で、これまでになく生命化学



の中での化学の占める位置が顕著になっている。

エピゲノム科学に対して有機化学は何ができるのだろうか？本講演では、(1) 遺伝子発現を抑制する DNA メチル化、(2) 遺伝子発現を再開させるといわれる DNA ヒドロキシメチル化、(3) それらの遺伝子制御を経て生じたメッセンジャー RNA の動態、それらを追跡するための有機化学について概説する。

2. メチル化した DNA を捕捉する化学反応¹⁾

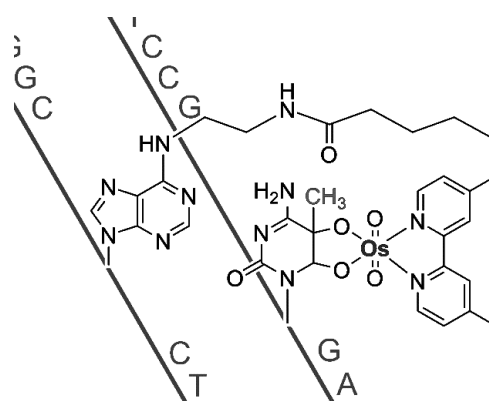
DNA メチル化、つまり DNA シトシン塩基の 5 位の炭素原子に対するメチル基の付加は、DNA が巻き付くヒストンの化学修飾とともに、代表的なエピジェネティックな修飾として遺伝子の発現の調節に著しい影響を及ぼしている。このメチル基は、巨大な DNA 二重らせん構造のメジャーグループに埋もれるほどの小さい官能基である。大きな DNA 配列の中の特定の位置の小さなメチル基を検出することは並大抵ではない。しかし、この DNA メチル化が DNA 配列のどこで生じているかを知ることは、その配列が細胞機能の決定にどの程度重要な役割を果たしているのか見積もるための大切な指標になる。最近では、それだけにとどまらず、胃がんや神経性疾患などの疾病に対する DNA メチル化の寄与が強く示唆されている。

現在用いられている DNA メチル化解析法を振り返れば、解析原理のバリエーションが少ないことに気づく。これらを大別すると、(i) 亜硫酸水素塩 (バイサルファイト) 法、(ii)

制限酵素法, (iii) 免疫沈降法に分類できる. これらは, それぞれに良い特徴を有しているものの, いずれも感度や特異性に影響する問題点を残しており, 微量試料の定量的解析を不得手としている. 非特異的な分解に起因する実験結果の再現性の低下についても悩まされることも少なくない. また, 原理の性質上, 配列選択的検出, 多検体処理, イメージングなど, 次世代 DNA メチル化解析で鍵になる技術へ直接的に展開することは難しい. これまでの方法についてそれはそれで DNA メチル化解析に有効であるといえるものの, エピジェネティクス研究の将来の一層の展開のためには, 解析原理にもっと多様性があったても良いだろう.

5-メチルシトシン (mC) とメチル化されていないシトシン (C) を効果的に区別できる新規の解析法を設計するにあたって, シトシン塩基構造のどこに着目するかが成否の重要なポイントになる. われわれは, シトシン塩基の C⁵-C⁶ 二重結合に注目した. つまり, mC の C⁵-C⁶ 二重結合は三置換体であり, 二置換オレフィンである C に比べて酸化されやすい. 金属酸化を利用すると同時に, 金属配位子を用いて金属の酸化力を適切に制御することによって mC と C を効果的に区別することができるだろう. そこでわれわれは, C⁵-C⁶ 二重結合のオスmium酸化を通じた mC 選択的反応を設計した. この反応では, オスmium酸カリウムとこれを活性化するヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウムとともに, 反応を誘導・加速する二座配位子 2,2'-ビピリジンを用いて弱塩基性のトリス-塩酸緩衝液中へ加えた. これら試薬の存在下, DNA を 0°C, 5 分間インキュベーションすると, mC は反応し, 酸化生成物としてのメチルシトシングリコール-ビピリジン-ジオキソオスmiumの 3 成分から構成されるオスmium錯体を与えた. C に対するオスmium錯体形成反応は 400 倍以上遅く, この反応速度の差によってシトシンに対するメチル基の付加の有無が明確に区別できる.

この mC 選択的な反応をベースにしてオスmium錯体形成反応における反応点の絞込みを目指して, 新規人工 DNA 「ICON プローブ」 (ICON = Interstrand Complexation with Osmium for Nucleic acids) が開発された. われわれは, 標的配列を認識するための DNA 配列 (相補 DNA の断片) を配位子ビピリジンに対して連結した. アデニン N6 位のアミノ基へリンカーを介してビピリジンを連結した人工ヌクレオシドが標的シトシンの相手側の塩基として配置されるよう ICON プローブは設計されている. つまり, ICON プローブが標的 DNA と二本鎖形成した時に標的 mC と不安定な塩基対を形成して mC がオスmium錯体を作りやすい状態にするのと同時に, オスmiumに配位するビピリジンが二本鎖形成によって mC 近傍に位置取りされて標的の箇所が mC である場合にのみオスmium錯体形成 (鎖間クロスリンク) を誘導する. この反応系では, 非特異的な反応や鎖切断は起こらず, 不必要な副産物を生じない.



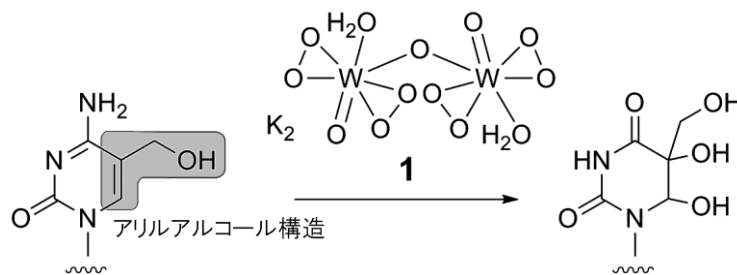
メチル化候補を含む任意の DNA 鎖に対して相補的な ICON プローブを, DNA/RNA 自動合成機を使って容易に合成できる. このプローブを使ってメチル化 DNA に対してオスmium錯

体形成反応を行ったあとには、蛍光、質量分析などさまざまな分析法が可能である。たとえば、ICONプローブによるオスミウム錯体の形成がDNAポリメラーゼによるDNA合成を強く阻害するのを利用して、定量PCR法によるDNAメチル化の定量が可能になる。この手法を用いて、マウスゲノムの器官（精巣・腎臓・脾臓・肝臓）ごとに異なる特定箇所のシトシンのメチル化量をそれぞれ定量することができた。また、スライドガラス上に固定した細胞に対して、ICONプローブを用いた蛍光 in situ ハイブリダイゼーション（FISH）法を適用すると、染色体の特定の領域のメチル化の様子を可視化できる（Me-FISH法）。例えば、マウスES細胞M期のメジャーサテライト領域のメチル化を、ICONプローブを介した蛍光標識を用いて蛍光顕微鏡観察することができた。

3. 脱メチル化過程に印をつける化学反応²⁾

5-ヒドロキシメチルシトシン（hmC）は、TETタンパク質によるmCの酸化によって生じ、DNA脱メチル化経路の鍵物質であるといわれる。2009年に俄然注目を浴びるようになった核酸塩基である。CとmCからhmCを区別するための基本原理としてわれわれは、C⁶-C⁵二重結合の酸化を選択した。hmCとmCの構造の違いは、水酸基（OH）の存在である。最近では、hmC水酸基を化学物質や酵素によって化学変換する方法やmC結合性ペプチドの結合をhmC水酸基によって抑制する方法が、hmCの検出のために試みられている。しかし、化学的に活性な無数のOH、NH、SH基が核酸やタンパク質の中に存在しており、hmCの水酸基だけを反応の標的にすることは容易ではない。より広い視点からhmCの構造を考慮すると、hmCが特徴的なアリルアルコール構造（C⁶=C⁵-CH₂OH）を有していることに気づく。この構造は、生体分子の中ではまれである。タングステン系の酸化システムがアリルアルコールの二重結合の酸化において効果的であるので、hmCの特徴的なアリルアルコール構造がタングステン酸化剤のhmC選択反応の標的になるだろう。

CpG、mCpGまたはhmCpGジヌクレオチドを含むモデルDNA配列を用意し、これらに対してタングステン酸化剤をテストした。反応試薬選択の条件として核酸塩基に対する反応性、水溶性、入手のしやすさが考慮されて、最終的に最も効果的であったのが、二核ペルオキシタングステン酸カリウム塩、K₂[{W(=O)(O₂)(H₂O)}₂(μ-O)]·2H₂O (**1**)であった。この反応試薬**1**は、試料DNAを含むpH7の緩衝液の中に加えられ、5時間、50°Cで加熱された。反応した核酸塩基を検出するために、試料は、脱塩のあと、ピペリジンでの加熱処理による反応核酸塩基での鎖切断へ導き、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）を用いて解析された。このPAGE分析によって、DNAのhmCの箇所で鎖切断バンドが現れた。mCやCの箇所では、反応は観察されなかった。反応生成物のHPLCや質量分析、安定同位元素で標識された水（H₂¹⁸O）の中での反応解析によって、hmCからの反応生成物がトリヒドロキシル化されたチミン（T(OH)₃）であることが示された。T(OH)₃



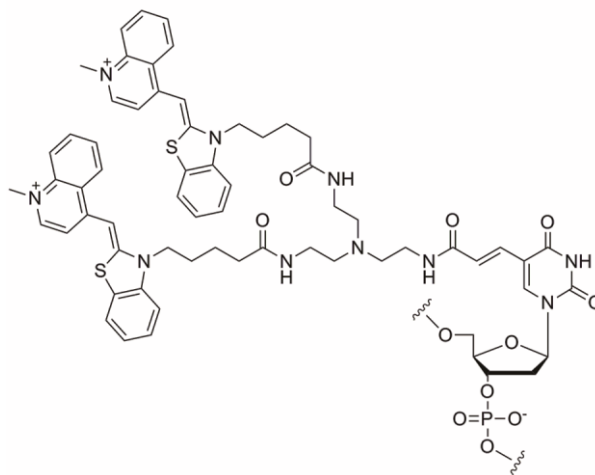
は、**1** による hmC のエポキシ化から始まり、エポキシドに対する水分子の付加と脱アミノ化を経由して生成することが確認された。

生成物 T(OH)₃ は、PCR 増幅とシーケンシングを通して hmC の効果的な検出を支援した。例えば、CpG, mCpG, hmCpG ジヌクレオチドを含むヒト TNF-β のプロモーター領域の DNA 断片を試薬 **1** とともに 50°C で 5 時間加熱したあとに、キャピラリー電気泳動による DNA 配列解析技術を用いて分析したところ、オリジナルの hmC の相補側にアデニンが取り込まれることが確認された。対照的に、mC や C の反対側の位置には、グアニンだけが取り込まれた。

4. 特定の RNA が細胞の中を動き回る様子を追跡する光化学³⁾

RNA は、細胞を構成する分子群の中でもきわめて重要な働きを担っていることはいまでもない。細胞内の RNA は常に質的・量的に変化し続けており、それを理解するためには、どのような配列・サイズの RNA が、いつ、細胞のどこで、どの位の量が発現し、どのような高次構造を持って働き、時間とともにどの程度増減しているかを効果的に追跡しなければならない。数多くの蛍光プローブが生細胞内の分子機能解析のために作成されてきたが、これまで RNA 検出のために設計されてきた蛍光プローブについては、蛍光タンパク質プローブのバラエティーと比較して大変貧弱である。さらには、生細胞内 RNA の効果的なモニタリングへ向けて、標的 RNA の増減に対してプローブの蛍光発光が鋭敏に応答すること、洗浄工程無しにバックグラウンドの蛍光を回避することが要求される。これらが可能になれば、時間情報を得ながら RNA の局在・発現量を捉えられる。

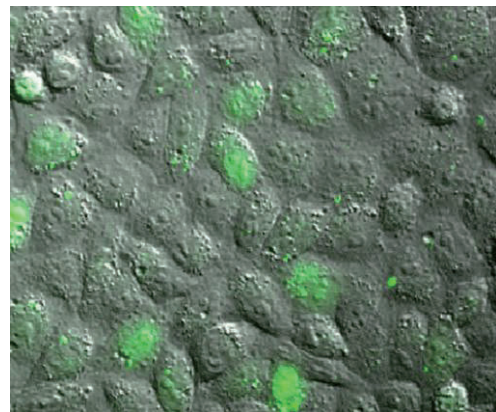
2008 年にわれわれが新たに報告した人工核酸「ECHO プローブ」(ECHO = Exciton-Controlled Hybridization-sensitive fluorescent Oligonucleotide) では、これまでにプローブの蛍光制御機構としてはあまり用いられてこなかった色素間励起子相互作用を利用した。ECHO プローブは、チミンまたはシトシン 5 位の炭素原子からリンカーを介して 2 分子のシアニン系色素が連結されたヌクレオチドを有している (一例として、蛍光ヌクレオチド D₅₁₄ は、チミン 5 位から 2 分子のチアゾールオレンジが連結された構造を有する (右下図))。ひとつのヌクレオチドに対してリンカーで連結された色素によって形成される分子内会合体 (H 会合体) は、色素の光物理学的特性を劇的に変えた。例えば、D₅₁₄ を有する ECHO プローブが未ハイブリダイゼーション状態にあったとき 480nm の吸収帯が強く現れた一方で、このプローブが相補的な核酸とハイブリダイゼーションしたとき 510nm の吸収帯が優勢になった。吸収帯のシフトは、未ハイブリダイゼーション状態のプローブにおいて色素間で会合体を形成し、それに起因する分子内色素間励起子相互作用が現れていることを示す。その結果、標的核酸とハイブリダイゼーションする前には蛍光発光が強く抑制された一方で、



ハイブリダイゼーションした後は、色素会合体の解離とそれらの核酸構造への緩やかな結合によって励起子相互作用が解除され、強い蛍光発光が現れた。

ECHOプローブの蛍光制御機構は、細胞中の特定のRNAを標的とした蛍光検出に有効である。われわれは、ECHOプローブをFISH法へ適用し、細胞の中で局在化したRNAの蛍光観察を試みた(ECHO-FISH法)。このFISH法は、従来型とは異なり、洗浄操作をほとんど必要とせず、固定化から観察までおよそ25分の工程で結果を得ることができる。バックグラウンド蛍光の強度が大変小さく、他の細胞構成要素と結合することによる非特異性の発光も現れないというECHOプローブの利点を最大に活用している。別の色素で標識したECHOプローブと併用したECHO-FISH法により、マウス海馬神経細胞の遠位樹状突起に局在化したmRNAを観察することができた。

ECHOプローブは、生きた細胞の中のmRNAの観察にも有効である(ライブセルRNAイメージング)。われわれは、mRNAの3'末端のpolyAテールを標的にするECHOプローブ5'-d(TTTTTT₅₄TTTTT)-3'を細胞内へ導入した。HeLa細胞核へプローブをマイクロインジェクションすると、488nm励起での蛍光が細胞核の核スペckルから観察され、mRNAの細胞内局在を示唆する結果が得られた。また、ケージングを施したECHOプローブを作成し、これを導入した細胞に対してピンポイントで光脱ケージング反応を行うと、細胞内の特定の地点からのmRNAの拡散の様子が時空間的に観測することができた。ほかにも、以下のような、生細胞内RNAの質的・量的多様性に対応したECHOプローブが作成されている。



(i) **多色化**. ヌクレオチドに結合する2分子の色素をチアゾールオレンジからその類縁体色素へ変えることによってECHOプローブの多色化(紫外～近赤外領域)を達成した。これらは、ハイブリダイゼーションに依存した色素間励起子相互作用のスイッチングを示し、細胞内RNA観察の多色化と複数RNAの同時観察を可能にした。

(ii) **長時間安定化**. DNA骨格は、エキソヌクラーゼやエンドヌクラーゼによって分解されやすいだけでなく、RNAとハイブリダイゼーションしたときにRNase Hによって標的RNAの分解をもたらす。ECHOプローブへ2'-O-メチルRNA骨格を導入することにより、高いヌクラーゼ耐性が得られ、その結果として長時間生細胞モニタリング(48時間の観察も可能)が可能になり、細胞分裂過程でのRNAの動態も観察することができた。

(iii) **高効率二本鎖形成**. ECHOプローブの一部にLNAヌクレオチドを混ぜると、高次構造や塩基多型を含むRNAを蛍光検出することが容易になった。RNAに対するLNAの高い熱的安定性や配列特異的結合性が、ECHOプローブのRNA配列認識能を大きく高めた。

(iv) **タグテクノロジー**. 高次構造を含むRNAや発現量の少ないRNAを解析する方法としてRNAタグを用いる方法が有効かもしれない。標的RNAの3'非翻訳領域にECHOプローブが繰り返し結合できる配列をタグとして繰り返し導入する。このRNAを発現させると、ECHOプローブがタンデムに結合して極めて明瞭に目的のRNAの局在化を観察できるようになっ

た。この方法は、mRNA からタンパク質への翻訳を阻害しない。

5. これから

化学が技術の進歩によって、巨大分子を合成することができ、さらには、それらの分子数が少なかったとしてもそれらを詳細に解析することができるようになってきた。一方で、生命科学では、生体分子の機能が化学修飾によって多岐に変化し、その結果として疾病に至ることが判明してくることで、俄然化学の重要性に注目され始めた。今まさに、化学と生命科学がクロスオーバーする現実の中で、生物の模倣にとどまらない、真に生命科学に寄与する次の世代の分子をデザインすべき時が来ていると感じている。

<参考文献>

1. **Chemistry for mC detection:** *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (1), 21-26; *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (9), 1638-1640; *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (4), 1615-1621; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (17), 5612-5620; *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26* (10-12), 1601-1604; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (46), 14511-14517; *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (2), 269-271; *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (21), 3905-3907; *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (3), 603-607; *Biochemistry* **2011**, *50* (16), 3376-3385; *J. Nucleic Acids* **2011**, *2011*, 480570; *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2011**, 8.7.1-8.7.17; *Chem. Biodiv.* **2012**, *9* (9), 2000-2007.
2. **Chemistry for hmC detection:** *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (11), 4176-4181; *Chem. Commun.* **2011**, *47* (29), 8277-8279; *Chem. Commun.* **2011**, *47* (40), 11231-11233.
3. **ECHO probes:** *Chem. Rec.* **2010**, *10* (3), 188-196; *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (12), 5815-5828; *J. Photochem. Photobiol. C-Photochem. Rev.* **2012**, *13*, 112-123; *Chem. Asian J.* **2008**, *3* (6), 958-968; *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (8), 1719-1725; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2009**, *82* (1), 110-117; *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (6), 1256-1261; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48* (35), 6480-6484; *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (51), 7191-7195; *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (3), 546-551; *Hum. Mutat.* **2010**, *31* (2), 208-217; *PLoS ONE* **2010**, *5* (9), e13003; *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (12), 2276-2281; *Photomed. Photobiol.* **2010**, *32*, 37-38; *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (11), 4199-4204; *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (19), 6598-6603; *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (8), 1625-1630; *Photomed. Photobiol.* **2011**, *33*, 45-46; *ChemBioChem* **2011**, *12* (18), 2871-2880; *RNA* **2012**, *18* (1), 166-175; *J. Luminescence* **2012**, *132*, 2566-2571; *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (2), 362-371.