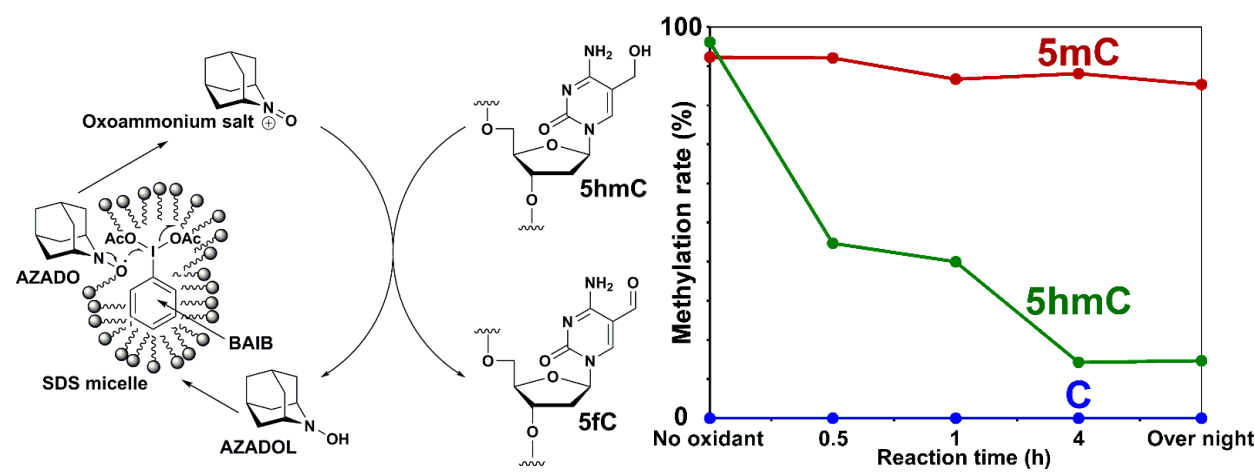


提出日：平成 28 年 5 月 12 日

平成 27 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名	5-ヒドロキシメチルシトシン検出・可視化技術の開発																									
研究代表者	氏名	福沢世傑																								
	所属機関名・部局名	東京大学・大学院理学系研究科																								
	職名	助教																								
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	<input type="radio"/>	共同研究員																								
	<input type="radio"/>	国際共同研究課題																								
	<input type="radio"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題																								
	<input type="radio"/>	客員フェロー																								
蛋白研受入担当教員名	田嶋正二教授																									
<p>5-ヒドロキシメチルシトシンを定量的に酸化し 5-ホルミルシトシンに変換後、続くバイサルファイト反応でウラシルへ誘導した。PCR でウラシルはチミンとして読み込まれるので、5-ヒドロキシメチルシトシンの一塩基レベルでの位置情報解析法の開発に成功した。オリゴヌクレオチド内の 5-ヒドロキシメチルシトシンのヒドロキシ基は立体障害が非常に大きく、反応性に乏しい。また DNA は酸化的分解を起こしやすいので、大きな立体障害を乗り越える強力な酸化力と基質 DNA の酸化的分解の回避を両立させた反応条件が必須である。この条件を満たすため、AZADOL を酸化触媒、BAIB を共酸化剤として用いた触媒的酸化反応を用いた。BAIB は疎水性が非常に強く、SDS ミセルとして可溶化することで有効濃度まで濃度を高めることができた。また、BAIB は AZADOL のみではなく基質 DNA をも酸化して分解させてしまうため、SDS ミセルに封入することで、溶解度の向上と基質 DNA との隔離を両立し、DNA の酸化的分解を最小限に抑制することができた。100bp のオリゴヌクレオチドに適用したところ酸化反応は 4 度 4 時間でほぼ終結し、5hmC の変換効率は 86.7%であった。</p>																										
 <p>The figure consists of two parts. On the left is a chemical reaction scheme showing the conversion of 5hmC to 5fC. It involves the oxidation of 5hmC by AZADOL (an oxoammonium salt) in the presence of BAIB (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) as a co-oxidant, all within an SDS micelle. The reaction proceeds through an intermediate to form 5fC. On the right is a line graph showing the methylation rate (%) over time (h). The y-axis ranges from 0 to 100. The x-axis shows 'No oxidant', 0.5, 1, 4, and 'Over night' hours. Three data series are shown: 5mC (red line) which remains near 100% throughout; 5hmC (green line) which starts at 100% and drops to approximately 13% by 4 hours; and C (blue line) which remains at 0%.</p> <table border="1"> <caption>Methylation rate (%) over time</caption> <thead> <tr> <th>Reaction time (h)</th> <th>5mC (%)</th> <th>5hmC (%)</th> <th>C (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>No oxidant</td> <td>100</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>100</td> <td>~60</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>~95</td> <td>~50</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>~90</td> <td>~13</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Over night</td> <td>~86.7</td> <td>~13</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>			Reaction time (h)	5mC (%)	5hmC (%)	C (%)	No oxidant	100	100	0	0.5	100	~60	0	1	~95	~50	0	4	~90	~13	0	Over night	~86.7	~13	0
Reaction time (h)	5mC (%)	5hmC (%)	C (%)																							
No oxidant	100	100	0																							
0.5	100	~60	0																							
1	~95	~50	0																							
4	~90	~13	0																							
Over night	~86.7	~13	0																							
<p>図 ミセル包含酸化剤による 5hmC の選択的酸化 (左) と 5hmC→5fC 変換効率 (右)</p>																										