

Novel Fluorescence Reaction Specific for Cytosine (シトシンに特異的な新規蛍光反応)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 Shpend Dragusha

[目的]

シトシンは核酸を構成するピリミジン塩基である。哺乳動物の核酸の代謝経路において、シチジンはウリジンからシチジンデアミナーゼによって生合成されるため、通常、シトシンは生合成されない。しかし、先天性免疫不全症の患者では、尿中に多量のシトシンが排泄されることが報告されている。また生体内において、シトシンの5位の炭素は、メチル化されることが知られており、体細胞および生殖細胞のがん抑制遺伝子におけるシトシンのメチル化は、変異を誘発するため、細胞のがん化と関連している。

現在までに、生体試料中のシトシンの測定法として、HPLC、質量分析、表面増強ラマン散乱、微分パルスボルタンメトリーなどを用いた方法が開発されている。しかし、これらの方法は高価な測定装置、あるいは煩雑な操作を必要としており、より簡便、迅速、ハイスループットなシトシンの特異的定量法が求められている。

著者らは、4-(trifluoromethyl)benzamidoxime (4-TFMBAO)を用いた、シトシンに極めて特異的な蛍光誘導体化反応を開発し、この反応を病態診断用の尿中シトシンの簡易な検査法へ適用した。さらに、DNA中のメチル化シトシンの定量法へ応用した。

[結果および考察]

4-(Trifluoromethyl)benzamidoxime (4-TFMBAO)を用いたシトシンに特異的な蛍光誘導体化反応

当研究室では、benzamidoximeを用いたウラシルに特異的な蛍光反応を報告している。この反応をもとに、シトシンと発蛍光反応する化合物をスクリーニングしたところ、DMF存在下、4-(trifluoromethyl)benzamidoxime (4-TFMBAO)がシトシンと反応し、蛍光を発することを見出した。そこで、反応温度、試薬濃度などの反応条件の最適化を行い、本蛍光反応の特異性を調べた。その結果、本蛍光反応はシトシンに特異的であり、他の核酸塩基を含めた生体成分では蛍光を生じないことが分かった (Fig.1)。

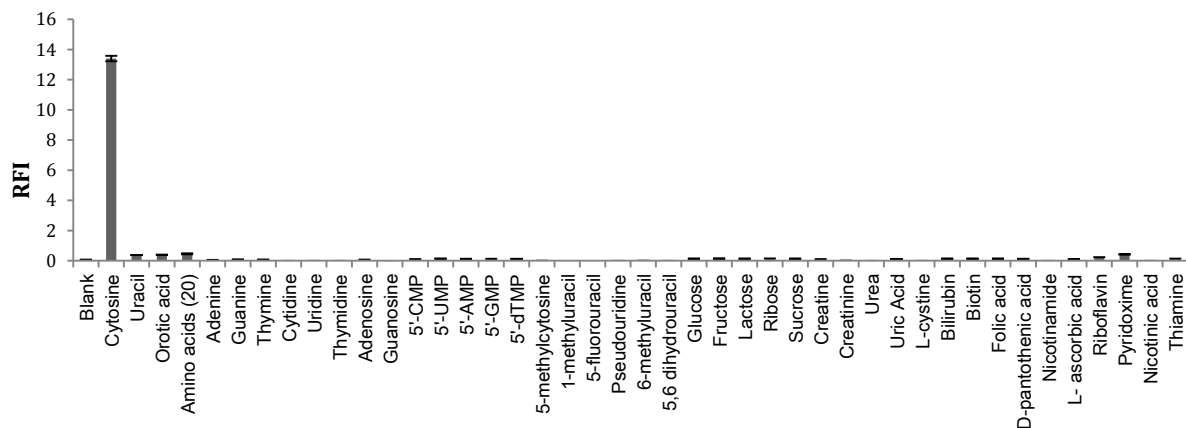


Fig. 1 Determination of reaction specificity.

シトシンの従来の蛍光試薬である 2-bromoacetophenone を用いた反応と比較したところ、4-TFMBAO 蛍光反応はブランクが低く、約 500 倍高感度であった。また、2-bromoacetophenone は、シトシンだけでなく、アデニンやこれらを含むヌクレオチドにも蛍光性を与えることが報告されている。これらの結果は、4-TFMBAO を用いる蛍光誘導体化反応は、シトシンに対して極めて特異的かつ高感度な検出反応であることを示している。

4-TFMBAO 蛍光誘導体化反応を用いた尿中シトシンの定量

本蛍光誘導体化反応を用いて、尿中シトシンの定量法について検討した。このとき、2人の健常者の尿にシトシンを添加(150 $\mu\text{mol/L}$ per mmol/L creatinine)した免疫不全症の模擬患者の尿を作製し、それぞれの尿中シトシンを定量した。その結果、健常者(2.06 および 6.80 $\mu\text{mol/L}$ cytosine per mmol/L creatinine)および模擬患者(155 および 159 $\mu\text{mol/L}$ cytosine per mmol/L creatinine)の尿中シトシンを容易に定量することができた (Fig. 2)。このことから、4-TFMBAO を用いる蛍光誘導体化反応は、ピリミジン代謝異常のハイスループットなスクリーニング検査法として応用できるものとする。

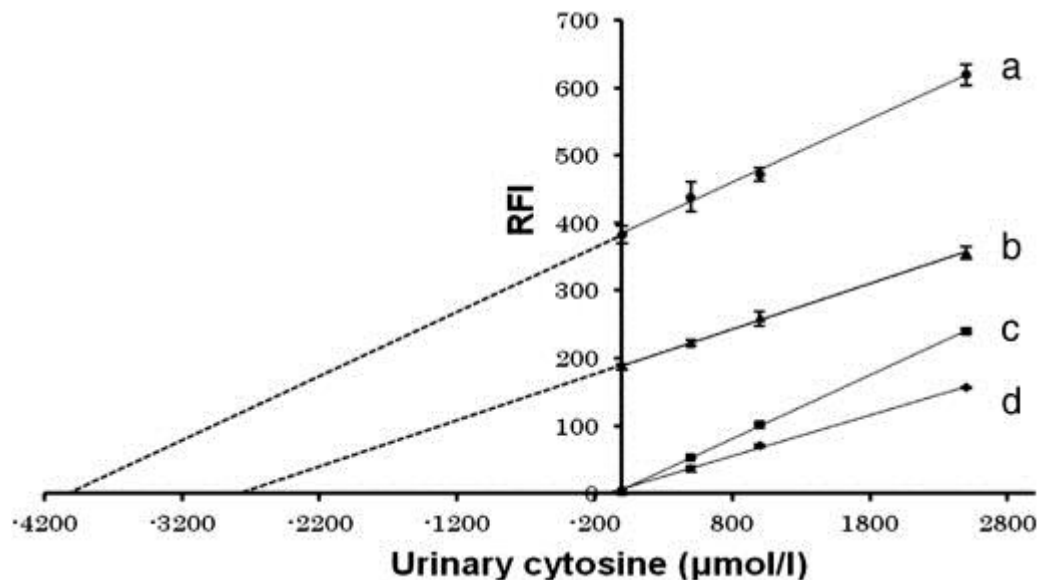


Fig. 2 Quantitative determination of urinary cytosine in pseudo-patient's (a and b) and healthy donor's (c and d) urines using standard addition assay.

4-TFMBAO 蛍光誘導体化反応を用いた DNA 中の 5-メチルシトシンの定量

4-TFMBAO は、非修飾型シトシンのみに対して発蛍光し、5-メチルシトシンには蛍光性を与えない (Fig. 1)。そのため、DNA 中のシトシンを 4-TFMBAO によって定量するとともにグアニン量を測定し、その差から DNA 中の 5-メチルシトシンが定量できると考えた。そこで、5-メチルシトシンを 5 残基含むオリゴヌクレオチド (CAGATTTO TTOCAATOACGTTGGOAGGTGTAGGTOCTAC: O = 5-methy-dC) および同配列の非修飾型オリゴヌクレオチドを用いて、4-TFMBAO 蛍光誘導体化反応によって、DNA 中の 5-メチルシトシンが定量できるか否かを調べた。まず、それぞれのオリゴヌクレオチドと相補鎖のオリゴヌクレオチドを混合し、2本鎖 DNA を調製した。次に、それぞれの 2本鎖 DNA を加水分解したのち、4-TFMBAO を用いて、各 DNA に含まれる非修飾型シトシンを定量した。また、各 DNA 中のグアニンおよびアデニンの定量は、phenylglyoxal (PGO) および chloroacetaldehyde (CAA) を用いた蛍光検出反

応によって行った。

その結果、非修飾型 DNA 中のシトシン濃度とグアニン濃度は同じであったが、5-メチルシトシンを含む DNA では、シトシン濃度は減少しており、この減少量は DNA 中の 5-メチルシトシン濃度と一致した (Fig. 3, Table 1)。また同様に、サケ精巣由来 DNA および HeLa 細胞由来 DNA 中の 5-メチルシトシンを、開発した本測定法により定量した結果、既報とほぼ同じ値が得られた (Table 1)。これらの結果は、4-TFMBAO 蛍光誘導体化反応を用いることで、DNA 中の 5-メチルシトシンが定量できることを示しており、本測定法は、がんや遺伝子疾患におけるエピジェネティクス解析に有用であると考えられる。

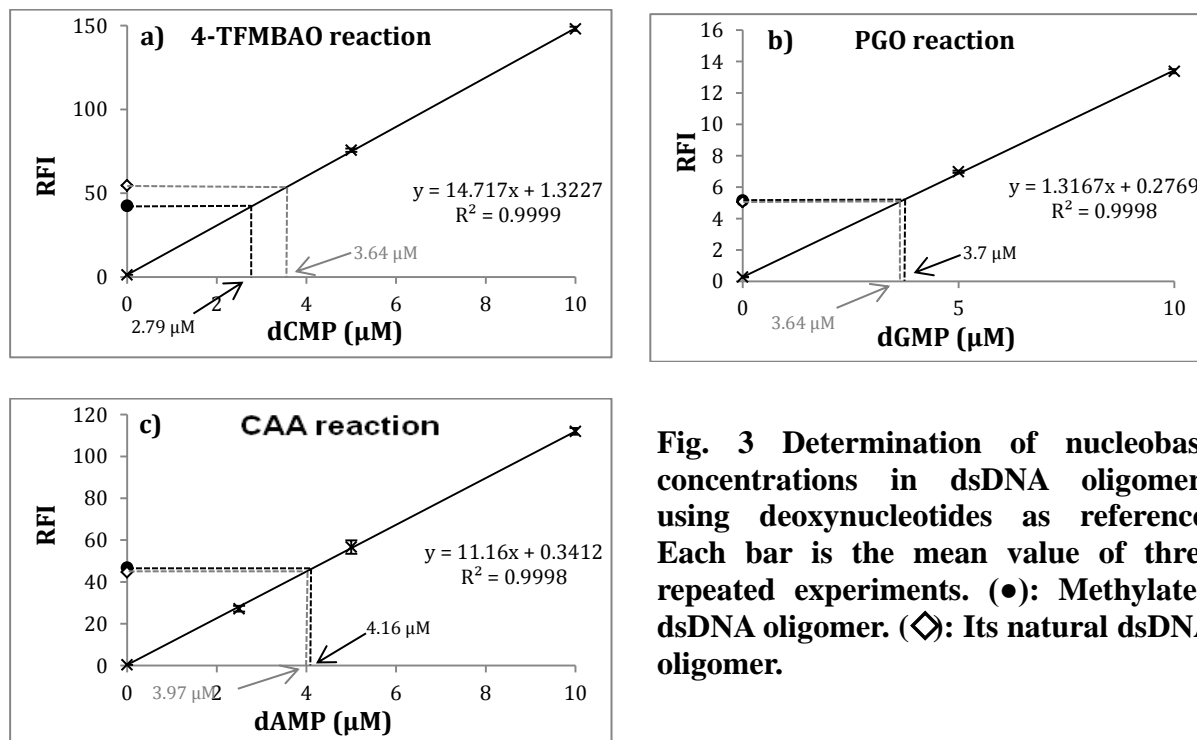


Fig. 3 Determination of nucleobase concentrations in dsDNA oligomers using deoxynucleotides as reference. Each bar is the mean value of three repeated experiments. (●): Methylated dsDNA oligomer. (◇): Its natural dsDNA oligomer.

Table 1 Measurement of cytosine, guanine and adenine concentrations hydrolyzed from synthetic dsDNA oligomers and two natural extracted DNAs, and of contents (%) of 5-methylcytosine (5-MC) determined by the present method.

DNA source	Cytosine (μM)	Guanine (μM)	Adenine (μM)	5-MC (%)	Total amount ($\mu\text{g/ml}$)
Natural oligomer	3.64 (3.8)**	3.64 (3.8)**	3.97 (4.0)**	0 (0)**	4.798 (4.8)**
Methylated oligomer	2.79 (2.8)**	3.7 (3.8)**	4.16 (4.0)**	24.6 (26.3)**	4.953 (4.8)**
Salmon sperm	9.68	10.27	10.6	5.75	7.128
HeLa cell	3.18	3.22	8.14	1.25	7.053

* The concentration was expressed in the final reaction mixture for fluorescence reaction.

** The values were obtained by calculation on the basis the DNA sequence.

[基礎となった学術論文]

1. Dragusha S, Shibata T, Yin S, Fujita JY, Kabashima T, Kai M. Selective, sensitive and fluorometric determination of urinary cytosine with 4-trifluoromethylbenzamidoxime and N,N-dimethylformamide. *Clin. Chim. Acta*, 2014, **429**, 123-128.