

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32692

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18278

研究課題名(和文) DNAメチル化反応を触媒するリボザイムの同定と領域特異的メチル化方法の開発

研究課題名(英文) Identification of ribozyme catalyzes DNA methylation to develop gene specific DNA methylation system

研究代表者

吉田 亘 (YOSHIDA, Wataru)

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号：10599806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではDNAメチル化反応を触媒するリボザイムをランダムRNAライブラリーから同定することを目的に、in vitro selection法を実施した。4ラウンドのスクリーニングの結果、ラウンドを重ねるごとにメチル化反応を触媒するRNA溶出量が増加した。つまり、この濃縮されたライブラリー中に目的のDNAメチル化反応を触媒するRNAが含まれることが示唆された。また、VEGFプロモーター中に含まれるDNA四重鎖構造がメチル化されるとその構造が安定化することを発見した。この特性を利用し、定量PCRを行うだけで標的遺伝子のメチル化レベルを測定できる方法の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：The research project aimed to identify ribozyme that catalyzes DNA methylation and develop gene specific DNA methylation system in vivo. To identify the ribozyme, in vitro selection has been performed using RNA random library that contains S-adenosylmethionine (SAM) binding RNA motif, because SAM is natural substrate of DNA methyltransferase. After 4th round selection, the RNA library was enriched, indicating that the ribozyme would be contained in the enriched RNA library. Moreover, we revealed that quadruplex structures in VEGF promoter were stabilized by DNA methylation. Using the property, q-PCR-based DNA methylation level detection system that requires neither sodium bisulfite treatment nor methylated DNA ligands was developed.

研究分野：核酸工学

キーワード：リボザイム DNAメチル化 In vitro selection DNA四重鎖

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の第一はがんである。現在のがん診断方法は画像診断やマーカー蛋白質を測定する方法であり、治療方法は外科治療、抗がん剤治療、放射線治療などの癌細胞を死滅・除去する方法である。しかし、これらの方法ですべてのがん患者を早期診断し治療できるのではなく、我が国では年間 30 万人が癌で亡くなっている。そのため、これまでとは全く異なる新たながん簡易診断方法とがん治療方法の開発が望まれている。そこで、本研究ではゲノムの DNA メチル化に着目した。

DNA メチル化とはゲノム中の CG 配列中のシトシンがメチル化される反応であり、生体内では DNA メチル化酵素によって触媒される。受精卵から特定の細胞に分化していく過程で、細胞特異的な DNA メチル化パターンが形成される。皮膚細胞から作製した iPS 細胞の DNA メチル化パターンは皮膚細胞とは異なるが、ES 細胞と類似していることが報告されている。つまり、ゲノム DNA のメチル化パターンはその細胞の特性を反映している。通常分化した細胞のメチル化パターンは複製する際に娘細胞にも維持される。一方、がん細胞などの異常な細胞ではそのメチル化パターンが異常になっている。つまり、この異常なメチル化を正常に巻き戻すことができれば、がん細胞を正常細胞に巻き戻すことができるのではないかと考えた。さらに、この異常な DNA メチル化はがんのバイオマーカーとなるため、これを簡便に測定できれば簡便ながん診断が可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究は DNA メチル化反応を触媒する機能性 RNA であるリボザイムを同定し、それを用いてヒトゲノム中の標的領域を特異的にメチル化する RNA を作製すること、がん関連遺伝子の異常メチル化を簡便に測定する方法を開発することを目的とした。

リボザイムとは特定の化学反応を触媒する RNA であり、ランダム RNA ライブラリーから同定可能である。つまり、DNA メチル化反応を触媒するリボザイムを同定し、そのリボザイムに標的ゲノム領域に結合する RNA を連結させれば、領域特異的にメチル化できる RNA を作製できると考えた。

がん関連遺伝子の異常メチル化を簡便に測定する方法を開発するために、DNA の特殊構造であるグアニン四重鎖 (G4) 構造と intercalated motif (i-motif) 構造に着目した。G4 構造とは 4 つのグアニンが水素結合を介して形成される平面構造がスタッキング相互作用によって重なり合っている四重鎖構造である。i-motif 構造と G4 構造形成配列の相補的塩基配列で形成される構造であ

り、シトシンとシトシンで形成される塩基対が互い違いに重なることでできる四重鎖構造である。いくつかの G4 構造や i-motif 構造はメチル化されるとその構造が安定化することが報告されている。つまり、メチル化によって構造が安定化する DNA 四重鎖構造を含む領域を PCR で増幅すると、メチル化されている場合は DNA 四重鎖構造が安定化するため DNA ポリメラーゼによる伸長反応が阻害されると考えた。つまり、PCR 増幅効率を測定するだけでメチル化レベルを測定することができると考えた (図 1)。

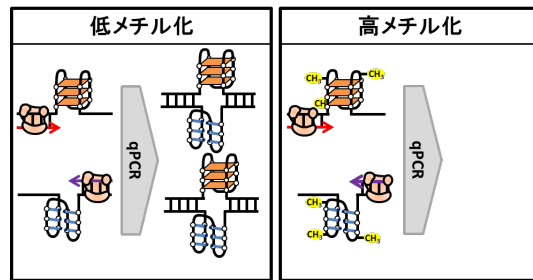


図 1. 定量 PCR を用いた DNA 四重鎖中のメチル化レベル測定法

3. 研究の方法

(1) DNA メチル化反応を触媒するリボザイムの同定

これまでに DNA メチル化酵素の基質となる S-アデノシルメチオニン (SAM) に結合する RNA が報告されていることから、この RNA の SAM 結合領域を保存し、他の領域をランダム化したライブラリーを用いれば、メチル化反応を触媒するリボザイムを同定できるのではないかと考えた。メチル化反応を触媒するリボザイムのスクリーニング方法を図 2 に示す。

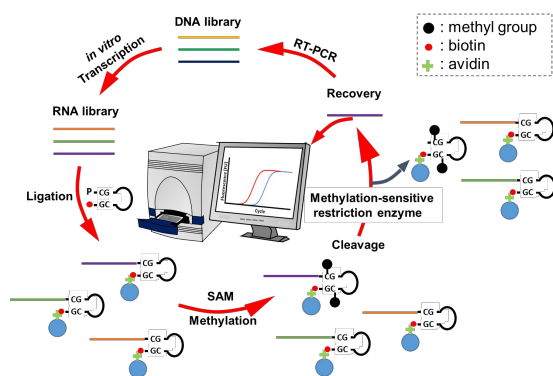


図 2. メチル化反応を触媒するリボザイムのスクリーニング方法

RNA ライブラリーは、ランダム配列を含む二本鎖 DNA を鋳型にし、in vitro transcription 法により調製した。次に、5' にリン酸を、3' 端にビオチンを修飾した CG 配列を含むステムループ DNA を合成し、この

ステム DNA と RNA ライブラリーを T4 DNA ligase を用いてライゲーションさせた (25 度 16 時間)。DNA-RNA ライブラリーをストレプトアビジン固定化ビーズ (Dynabeads My one streptavidin C1) に固定化し、SAM を添加後、37 度で 16 時間インキュベートした。メチル化反応を触媒する RNA はライゲーションされたステム DNA 部位をメチル化すると考えられる。そこで、メチル化された場合のみステムループ部位を切断する制限酵素 MspJI を、ビーズに固定化した DNA-RNA ライブラリーに加え、メチル化反応を触媒した RNA ライブラリーのみ回収した。回収した RNA ライブラリーを鋳型に、Thermo Script™ RT-PCR Systems を用いて逆転写反応を 55 度で 1 時間行い、cDNA を合成した。合成した cDNA を PCR により増幅した。この PCR 産物を鋳型にして RNA ライブラリーを合成し、これを次のラウンドに用い、合計 4 ラウンドのスクリーニングを実施した。また、各ラウンドで溶出した RNA ライブラリー量は RT-qPCR 法により定量した。

(2) がん関連遺伝子の異常メチル化を簡便に測定する方法を開発

血管内皮細胞増殖因子である VEGFA とがん原遺伝子である RET 遺伝子プロモーター中には DNA 四重鎖形成配列が含まれることが報告されている。そこで、これらの領域を PCR によって増幅した。PCR 産物を CpG メチル化酵素 M.SssI によってメチル化し、メチル化 PCR 産物と非メチル化 PCR 産物を混合することによって、メチル化レベルが 0, 20, 40, 60, 80, 100% となるように PCR 産物を調製した。これを鋳型とし、定量 PCR キット (SYBR Premix Ex TaqII, Takara) を用いて定量 PCR を行った。定量 PCR には 7900HT fast real-time PCR system (ABI) を用いた。尚、コントロール領域として DNA 四重鎖形成配列中に CpG 配列を含まない c-MYC 領域を用いた。

次に定量 PCR 条件の最適化を行った。定量 PCR 溶液 (25 mM TAPS (pH 9.3), 0.1 mM DTT, 2 mM MgCl₂, 0.5 U Ex Taq HS (Takara), 0.5 μM primer, 1 mM dNTPs, 20000-fold diluted SYBR Green I (Lonza)) に 1M Betaine, 5% DMSO 又は 0.1% TritonX-100 を添加し、メチル化した PCR 産物を鋳型に定量 PCR を行った。

最後にヒトゲノム DNA 中の VEGFA 遺伝子のメチル化レベルを測定できるか検討した。HeLa 細胞からヒトゲノム DNA を抽出し、DNA メチル化酵素 M.SssI を用いてヒトゲノム DNA 全体をメチル化した。HeLa ゲノム DNA とメチル化した HeLa ゲノム DNA の VEGFA 遺伝子のメチル化レベルをバイサルファイト法により解析し、HeLa ゲノム DNA では VEGFA 遺伝子は低メチル化状態であり、メチル化した HeLa ゲノム DNA では VEGFA 遺伝子は高メチル化状

態であることを確認した。そこで、これらのゲノム DNA を鋳型にし、VEGFA, c-MYC の DNA 四重鎖形成領域を対象に定量 PCR を行い、その増幅効率とメチル化レベルに相関があるか解析した。

4. 研究成果

(1) DNA メチル化反応を触媒するリボザイムの同定

合成した RNA ライブラリーとステムループ DNA をライゲーションした結果、約 50% の RNA ライブラリーがステムループ DNA にライゲーションされた。そこで、この DNA-RNA ライブラリーに SAM を加え、自己メチル化反応を触媒した DNA-RNA ライブラリーのみ、メチル化感受性制限酵素によって切断し、その RNA ライブラリーを回収した。回収した RNA ライブラリーから RT-PCR により DNA ライブラリーを合成し、さらに RNA ライブラリーを合成した。このサイクルを 4 ラウンド実施し、溶出した RNA 量を RT-qPCR 法により定量した (図 2)。1 ラウンド目における溶出した RNA ライブラリーの割合は 0.95×10^4 % であったのに対し、溶出量はラウンドを重ねるごとに増加し、4 ラウンド目では 0.1% まで増加した (図 3)。つまり、メチル化反応を触媒する RNA が濃縮され、このライブラリーの配列を解析すれば、メチル化反応を触媒するリボザイムが同定できることが示唆された。

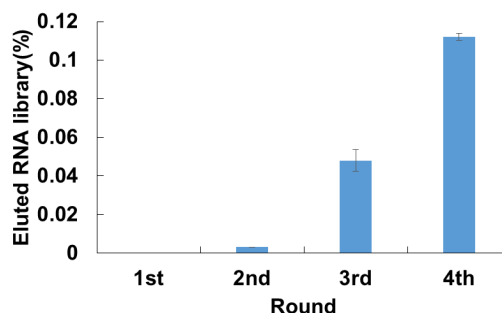


図 3. 各ラウンドにおける溶出した RNA ライブラリー量

(2) がん関連遺伝子の異常メチル化を簡便に測定する方法を開発

メチル化した PCR 産物を鋳型に定量 PCR を行い、その増幅効率を測定した結果、DNA 四重鎖構造に CpG 配列を含む VEGFA と RET の PCR 産物を鋳型にした場合はメチル化レベル依存的に PCR 増幅効率が減少することが示された。一方、DNA 四重鎖構造に CpG 配列を含まない c-MYC の PCR 産物を鋳型にした場合はメチル化レベルと PCR 増幅効率に相関はなかった。つまり、VEGFA と RET の DNA 四重鎖構造はメチル化されるとその構造が安定化し、それを鋳型とした場合 PCR による増幅効率が減少することが示された。

次に定量 PCR 溶液の組成の検討を行った。定量 PCR 溶液 (25 mM TAPS (pH 9.3), 0.1 mM DTT, 2 mM MgCl₂, 0.5 U Ex Taq HS (Takara), 0.5 μM primer, 1 mM dNTPs, 20000-fold diluted SYBR Green I (Lonza)) に 1M Betaine, 5% DMSO 又は 0.1% TritonX-100 を添加して定量 PCR を行った結果、0.1% Triton-X を添加した場合のみ *VEGFA* と *RET* の PCR 産物のメチル化レベル依存的に PCR 増幅効率が減少することが示された。

最後に本手法を用いてヒトゲノム中の *VEGFA* 遺伝子のメチル化レベルを測定できるか検討した。HeLa ゲノム DNA またはメチル化した HeLa ゲノム DNA を鋳型に、*VEGFA* 遺伝子領域の PCR 増幅効率を最適化した定量 PCR 溶液を用いて測定した。その結果、*VEGFA* 遺伝子領域の PCR 増幅効率はメチル化レベル依存的に減少することが示された。一方、DNA 四重鎖構造中に CpG 配列を含まない *c-MYC* 遺伝子領域は、メチル化レベルと PCR 増幅効率に相関はなかった。以上の結果から、定量 PCR を用いて PCR 増幅効率を測定するだけで、簡便にヒトゲノム中の *VEGFA* 遺伝子のメチル化レベルを測定できることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoshida W., Yoshioka H., Bay D.H., Iida K., Ikebukuro K., Nagasawa K., Karube I. Detection of DNA Methylation of G-Quadruplex and i-Motif-Forming Sequences by Measuring the Initial Elongation Efficiency of Polymerase Chain Reaction.

Anal. Chem. (2016) 88, 7101-7107

DOI: 10.1021/acs.analchem.6b00982

査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

吉岡仁美、飯田圭介、長澤和夫、池袋一典、軽部征夫、吉田亘

定量 PCR 法を用いた四重鎖中のメチル化 DNA 検出法の開発

第 39 回日本分子生物学会年会

2016 年 12 月 2 日

パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

吉岡仁美、飯田圭介、長澤和夫、池袋一典、軽部征夫、吉田亘

定量 PCR 法を用いた DNA 四重鎖中のメチル化 CpG 検出法の開発

第 10 回バイオ関連化学シンポジウム

2016 年 9 月 7 日

もてなしドーム地下イベント会場 (石川県金沢市)

吉岡仁美、飯田圭介、長澤和夫、池袋一典、軽部征夫、吉田亘

DNA 高次構造の安定性に着目した DNA メチル化検出法の開発

BMB2015

2015 年 12 月 1 日

神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 1 件)

吉田亘、馬場勇次、吉岡仁美、軽部征夫
メチル化 DNA の簡易計測法の開発

BIO INDUSTRY (2017) 53 ページ (44-52 ページを執筆)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 亘 (YOSHIDA, Wataru)

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号: 10599806