

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05911

研究課題名(和文) 酸化剤を用いたDNAメチル化率のピンポイント解析法の開発

研究課題名(英文) Development of a method for detection of single methylated cytosine

研究代表者

加藤 輝 (KATO, Teru)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：00367195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：がん抑制遺伝子などのプロモーター領域に存在するCpG配列のシトシンのメチル化は、がんの早期発見や悪性度評価、さらには、将来的な発がんリスク予測のためのマーカーとしての利用が期待されている。今後、CpGのメチル化をがんの診断マーカーとして広く臨床応用するためには、より迅速・簡便なメチル化検出法の開発が必要不可欠である。そこで、本研究は、(1)標的DNA中の特定のシトシンをピンポイントで識別し、(2)そのシトシンのメチル化を酸化反応を用いて迅速・簡便に検出する方法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本検出法は、DNAのthree-way junction (TWJ) 構造を利用して低濃度(数mM)のKMnO4で特定のメチルシトシンのみを酸化するため、酸化後に還元剤を加えればPCRが可能であり、脱塩カラム等による酸化剤の除去が不要なため迅速な検出が期待できる。さらに、検出対象のCpGがTWJの分岐点上に位置するようにプローブDNAの配列を設計することで、どのような標的配列にも対応可能なため、汎用性も備えている。すなわち、実用的な診断技術に求められる条件を満たしていると言える。本研究は様々ながんの診断法およびがんの基礎研究の発展に大きく貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Methylated DNA plays an important role in the epigenetic gene regulation and thus can be a promising biomarker for cancer diagnosis. Therefore, a simple method for the analysis of methylation ratio of cytosines in target gene is highly required. We herein report a new method for the pinpoint detection of 5-methylcytosine that is based on the selective oxidation of methylcytosine at the branching point of DNA three-way junction.

研究分野：バイオ分析

キーワード：エピジェネティクス メチル化 メチルシトシン がん診断

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化は、シトシンの 5 位にメチル基が導入される酵素反応である。遺伝子のプロモーター配列に多く見られる CpG 配列が過剰にメチル化されると遺伝子発現を抑制することが知られている。p16 などのがん抑制遺伝子での異常なメチル化は、細胞のがん化のマーカーとなる。したがって、メチル化 DNA 検出法の開発は、がん診断等への応用が期待できる。既知のメチル化 DNA 検出法で最も一般的なバイサルファイトシーケンシング法は、ゲノム DNA を亜硫酸水素ナトリウムで処理することで、非メチル化シトシンをウラシルへと変換させ、DNA のメチル化を検出する方法である。しかし、クローニングなどの煩雑な操作が必要であり、また、高濃度の亜硫酸水素ナトリウムで長時間反応するため、大半のゲノム DNA で非特異的な損傷を生じるなどの問題点がある。そのため、簡便且つ迅速なメチル化 DNA 検出法の開発が待たれている。

2. 研究の目的

研究代表者は、分子認識能を持つ 1 本鎖 DNA (DNA アプタマー) の研究を行っており、これまでに、図 1 のような、three-way junction (以下、TWJ と略す) と呼ばれる 3 本のステム (2 本鎖構造) からなる DNA の高次構造が、胆汁酸などのステロイドと結合することを見出している (In vitro selection of DNA aptamers which bind to cholic acid, T. Kato, et al., Biochim. Biophys. Acta (2000) 1493, 12-8)。さらに、TWJ の分岐点上の 3 つの塩基対が空孔 (ポケット) を形成しており、これら分岐点上の塩基が酸化剤 (四酸化オスミウム) やカルボニル化剤 (DEPC) に対して、非常に高い反応性を示すことを明らかにしている (Interaction of three-way DNA junctions with steroids, T. Kato, et al., Nucleic Acids Res. (2000) 28, 1963-8)。そこで、研究代表者は、図 2 のように、標的 DNA にプローブ DNA を結合させて TWJ を形成させ、標的 DNA 中の特定のシトシン/メチルシトシンを TWJ の分岐点上に位置させることにより、そのシトシン/メチルシトシンをピンポイントで化学的に識別できるのではないかと考えた。本研究では、TWJ 構造を形成するプローブ DNA を用いて、標的 DNA 中の特定のメチルシトシンを選択的に酸化後、定量的 PCR (リアルタイム PCR) により未酸化の標的 DNA を定量することで DNA のメチル化をピンポイントで簡便に検出する方法の開発を目的とした。

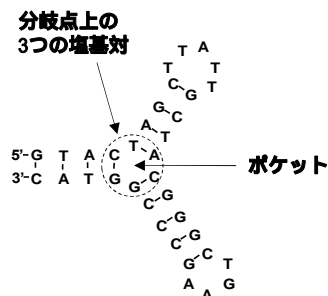


図 1. DNA の three-way junction (TWJ) 構造

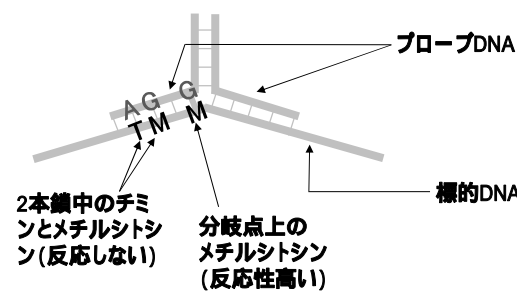


図 2. 標的 DNA と 2 本のプローブ DNA により形成された TWJ

3. 研究の方法

(1) 酸化されたメチルシトシンを含む標的 DNA の定量的 PCR による検出法の確立  
電気泳動不要のシトシン/メチルシトシン識別のために、定量的 PCR (リアルタイム PCR) によるシトシン/メチルシトシン識別のための最適な反応条件を検討した。p16 遺伝子由来の 2 種類の標的 DNA (それぞれ 64 塩基、75 塩基の鎖長) を使用した。標的 DNA 中の 1 塩基のシトシン/メチルシトシンが TWJ 構造の分岐点上に位置するように設計した 2 本のプローブ DNA (CpG メチル化検出用プローブ) を標的 DNA に結合させ、この状態で過マンガン酸カリウムを加えて分岐点上のメチルシトシンを 1 時間酸化した後、還元剤 DTT により過剰の過マンガン酸カリウムを分解し、標的 DNA を鋳型として定量的 PCR を行った (図 3)。  
過マンガン酸カリウムの酸化力は酸性

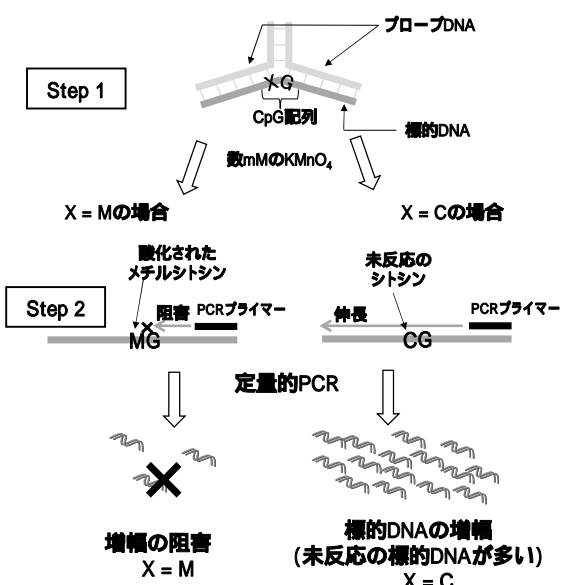


図 3. 定量的 PCR を用いたメチルシトシンのピンポイント検出法

で高いが、TWJ 構造を含めた DNA の高次構造は中性の pH で安定であり、バッファの塩濃度も DNA の高次構造の安定性に影響するため、バッファの pH と塩濃度を検討した。具体的には、酸化反応用バッファの pH を 4.5 ~ 6.0、ナトリウムイオン濃度を 100 ~ 1000 mM の範囲で検討した。

#### (2) コントロール DNA を必要としない検出法の検討

通常、メチル化特異的 PCR などの PCR を用いたメチル化解析法では、メチル化率を決定するためにメチル化 / 非メチル化された対照 DNA が必要となる。そこで、標的 DNA 配列中の CpG 以外の塩基が分岐点上に位置する対照プローブを用いることで、対照 DNA を必要としない検出法を検討した。TWJ 構造の分岐点上に標的 DNA 中の CpC (酸化されにくい) または CpT (T はメチルシトシン同様酸化されやすい) が位置するように設計された 2 種類の対照プローブと CpG メチル化検出用プローブで得られた Ct、Ct を比較した。

#### (3) 2 個のメチルシトシン検出用プローブの検討

これまで、標的 DNA 中の 1 個のメチルシトシンを CpG メチル化検出用プローブを用いて検出できることを確認したが、Ct は 5 程度だった。そこで、標的 DNA 中の 2 個の CpG が TWJ の分岐点上に位置する、すなわち、2 つの TWJ 構造を形成するように設計されたプローブ DNA を用いて、より明確なメチル化検出を検討した。

#### (4) ヒトゲノム DNA のメチル化検出

CpG メチル化検出用プローブを用いて、ヒトゲノム DNA の p16 遺伝子の CpG メチル化検出を行った。具体的には、HeLa 細胞から抽出した低メチル化ヒトゲノムと、それを DNA メチルトランスフェラーゼにより処理して得た高メチル化ヒトゲノムそれぞれ 50 ng に CpG メチル化検出用プローブを加えて過マンガン酸カリウムにより酸化した後、定量的 PCR により Ct を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 酸化されたメチルシトシンを含む標的 DNA の定量的 PCR による検出法の確立

メチルシトシンを含む標的 DNA の Ct (threshold cycle) が同じ位置にシトシンを含む標的 DNA より高い値となり、定量的 PCR による 1 塩基のシトシン / メチルシトシン識別に成功した。また、2 種類の標的 DNA 中の 1 塩基のシトシン / メチルシトシンを識別できることを確認した。酸化反応時の pH、ナトリウムイオン濃度と、酸化反応後の PCR 溶液調製時の希釈倍率を検討した結果、酸化反応時の pH5.0、ナトリウムイオン濃度 200 mM または 250 mM、酸化反応後の希釈倍率 5 倍 (PCR 溶液中のナトリウムイオン濃度 40 mM または 50 mM) で Ct 値の差が最大となり、最も顕著な差が得られた。

#### (2) コントロール DNA を必要としない検出法の検討

CpC 対照プローブでは、Ct は非常に小さく (CpG がメチル化されていても Ct にほとんど差がない) Ct は CpG がメチル化されていないときとほぼ同じ値となり、CpT 対照プローブでは、Ct は非常に小さく、Ct は CpG がメチル化されているときとほぼ同じ値となった。すなわち、これらの対照プローブを用いることで、対照 DNA が不要となる可能性が示された。

#### (3) 2 個のメチルシトシン検出用プローブの検討

標的 DNA 中の 2 個の CpG が TWJ の分岐点上に位置するように設計されたプローブ DNA を用いたところ、同プローブ DNA を用いることで、1 個の CpG を検出したときの約 2 倍の Ct が得られた。

#### (4) ヒトゲノム DNA のメチル化検出

高メチル化ヒトゲノムは低メチル化ヒトゲノムより大きな Ct となり、Ct は 4 ~ 5 であった。すなわち、ヒトゲノム中の 1 塩基のメチルシトシン検出に成功した。

以上より、TWJ 構造を用い、がん抑制遺伝子である p16 遺伝子のプロモーター配列 (64 塩基の合成 DNA およびヒトゲノム DNA) を過マンガン酸カリウムで酸化することで分岐点上のシトシンのメチル化をピンポイントで検出することに成功した。よって、従来の網羅的かつ煩雑なバイサルファイトシーケンシング法と比較し、簡便・迅速なメチル化 DNA 検出法を開発した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----