

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05195

研究課題名(和文) グアニンと脱塩基サイトに着目したターゲットリシーケンス法の確立

研究課題名(英文) Development of DNA sequencing method targeting on guanine and abasic site

研究代表者

呉 純 (Wu, Chun)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：90415646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：5-メチルシトシンの脱メチル化は、遺伝子の転写を調節するスイッチである。パーキットリンパ腫細胞の脱メチル化反応の中間体であるグアニン/脱塩基部位を分析するために、まず4-アジドフェニルグリオキサールを用いて脱塩基サイトにあるグアニンとの環化を行った。続いてアジド-シュタウディングアライゼーションを用いてDNA断片のビオチンを行った。さらに磁石ビーズによって回収されたDNA断片はPCRによって増幅された。次世代シーケンシングによる分析の結果、リンパ腫細胞のゲノムDNA中に多数のグアニン/脱塩基部位の存在が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、次世代シーケンサーによるパーキットリンパ腫細胞におけるゲノムDNA中のメチルシトシンからシトシンへの脱メチル化反応の中間体であるグアニン・脱塩基サイトの解析を行った。その結果、グアニン・脱塩基サイトが多数に存在することが検出された。リンパ腫に罹患した人の血液には、がん細胞に由来するゲノムDNA断片と正常な細胞死に由来するゲノムDNA断片が混在している。がん細胞に由来する微量のゲノムDNA断片を特異的に検出するのは、容易ではなかった。本研究の結果からリンパ腫細胞にグアニン・脱塩基サイトが多数存在することがわかったので、今後血液中のリンパ腫細胞の早期検出への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Demethylation of 5-methylcytosine is a switch that regulates gene transcription. In order to analyze the guanine/abasic site, which is an intermediate in the demethylation reaction, 4-azidophenylglyoxal was first used to modify guanine at the abasic site in genome DNA fragments prepared from Burkitt lymphoma cells in this study. The DNA fragment was biotinylated via azide-Staudinger ligation. Then the DNA fragments which were recovered by streptavidin beads, was amplified by PCR. Finally the mutation from guanine to adenine was detected by the next-generation sequencing. As a result, the presence of a large number of guanine/abasic sites were detected in the genomic DNA in Burkitt lymphoma cells.

研究分野：分析化学

キーワード：5-ヒドロキシメチルシトシン メチルシトシン グアニン塩基 ビオチン 次世代シーケンサー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物細胞のゲノム DNA は様々な原因で、一日 - 細胞あたりに 1 万個以上の塩基が失われる。このような DNA 塩基の損傷は細胞の持つ様々な遺伝子の変異を与えるのみならず、遺伝子の転写レベルの変化を引き起こす原因にもなる。例えば、遺伝子のプロモーター領域にある CpG アイランドにおける 5-メチルシトシン(5-mC)からシトシンへのエピジェネティクスな変化は塩基の喪失のステップが含まれる。このエピジェネティクスな変化はまず 5-mC が Ten-eleven translocation 1 (TET1) という酵素によって、5-ヒドロキシメチルシトシン(5-hmC)、5-フォルミルシトシン (5-fC) および 5-カルボキシルシトシン (5-caC)へ変換される。つぎに、DNA チミングリコシラーゼ (TDG) によって塩基が除去され、グアニンと脱塩基サイトが生成される。さらに、この脱塩基サイトは塩基除去修復機構によって修復されてシトシンに変わる。研究開始当初において、ゲノム中のグアニンと脱塩基サイトの特定に関する研究は全く報告されていなかった。本研究では、5-メチルシトシン(5-mC)からシトシンへの反応中間体である脱塩基サイトにあるグアニンと特異的に反応してビオチン化するプローブの開発を行いながら、次世代シーケンサーによるグアニンと脱塩基サイトの探索を試みることにした。

### 2. 研究の目的

遺伝子のプロモーター領域にある CpG アイランドにおける 5-mC からシトシンへの変換は遺伝子転写の再活性化の役割を果たすので、がん研究のホットスポットの一つとなっている。ゲノム DNA 中の 5-mC からシトシンへのゲノムワイドの解析法としてバイサルファイトシーケンス法が利用されている。これはゲノム中のシトシンがバイサルファイトによってウラシルに変換されるのに対して、5-mC は変換を受けないことから両者を区別できるからである。しかし、この方法にはいくつかの欠点があり、決して万能ではない。特に、バイサルファイト処理はアルカリ性条件での加熱を行うのでゲノム DNA 断片に大きくダメージを与えるので、大量の細胞からゲノム DNA を抽出する必要がある。また、大量な細胞から抽出したゲノム DNA の内、一部のゲノム DNA が次世代シーケンサーによって解析されるため、5-メチルシトシンとシトシンが混在している場合、少ない方の検出は非常に困難である。これに対して、本研究では、5-mC からシトシンへの反応中間体であるグアニンと脱塩基サイトをビオチン化し、ビオチンを介して濃縮される配列のみを次世代シーケンサーによる分析することによって、細胞中のダイナミク的な変化をより鋭敏に捉えることが期待されている。

### 3. 研究の方法

グリオギザール化合物はグアニン基の N1 と N2 位の窒素と反応し、5 員環状化合物を作ることが古くから知られている。研究代表者はこれを利用して、グアニン・脱塩基サイトを有する二本鎖オリゴ DNA と反応させることによって脱塩基サイトにあるグアニン塩基にアセチレン基を導入することができた。それから、銅触媒の存在下でのクリック反応によってアセチレン基を介して DNA オリゴの脱塩基サイトのグアニン塩基をビオチン化することに成功した。面白いことに、ビオチン・アビジン結合によって精製されたオリゴ DNA を鋳型とする PCR 反応において脱塩基が大腸菌由来の DNA ポリメラーゼによる A-Tailing 反応を誘引し、グアニンからアデニンへの変異を与えたことが DNA シーケンスによって確認された。そこで、この方法を最適化し、ゲノム DNA 中のグアニンと脱塩基サイトの場所の探索を試みた。

### 4. 研究成果

(1) 銅イオンがゲノム DNA の切断を引き起こすため、銅イオンを必要としないビオチン化方法を開発した。ゲノム DNA 断片は、4-アジドフェニルグリオキサル反応と反応させたのちに、アジド-シュタウディンガーライゲーションを介して脱塩基サイトにあるグアニン基のビオチン化に成功した(図1)。

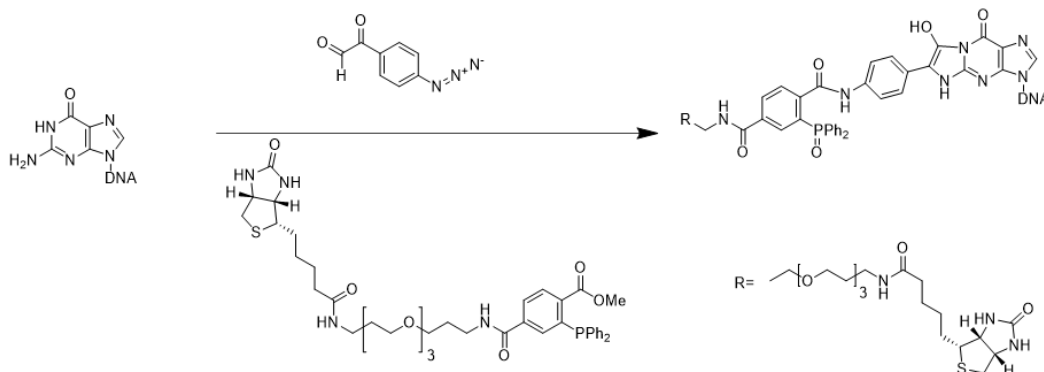


図1、グアニン塩基のビオチン化法

(2) ヒトパーキットリンパ腫細胞から抽出したゲノム DNA 中の脱メチル化の中間体である脱塩基・グアニンを含む断片の単離方法を確立した。実験は、まずゲノム DNA 断片化キットで平均サイズ 200 bp の DNA ライブラリーを作製した。次に、平滑末端の修復を行ってから、4-アジドフェニルグリオキサルと反応させ、アジド-シュタウディンガーライゲーションを介して DNA ライブラリー中の脱塩基サイトにあるグアニン基のビオチン化を行った。それから、DNA ライブラリーの両端にアデニンの付加や Y 字型アダプターとのライゲーションを行った。さらに、磁石ビーズを用いてビオチン断片を回収した。ビオチン化した断片を鋳型とする PCR 反応で得られた産物はアガロースゲル電気泳動にて分離し、マイクロチップ電気泳動にて分離された PCR 産物を確認できた (図 2)。

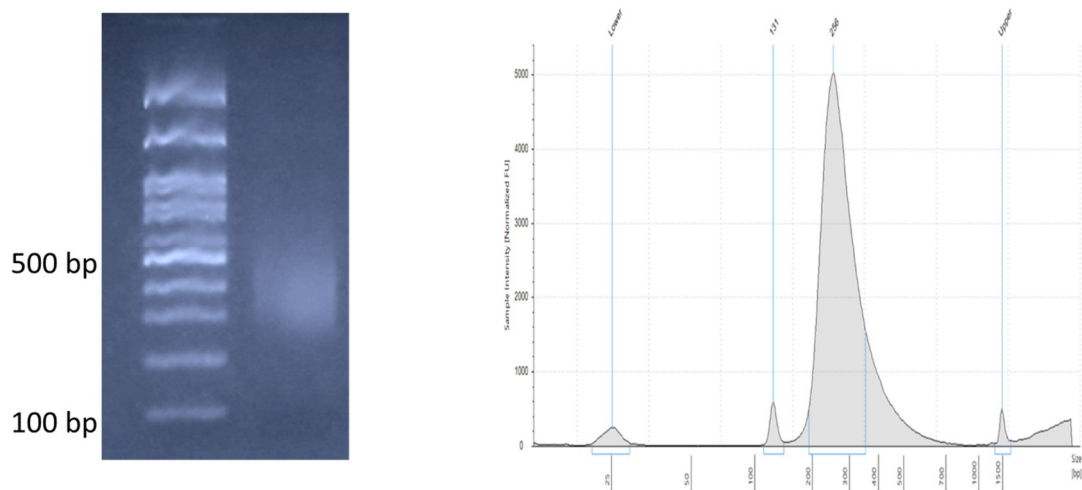


図 2、アガロースゲル電気泳動による PCR 産物の分離とマイクロチップ電気泳動による確認

(3) 次世代シーケンサーより取得したリード配列を公開されているヒトゲノム配列にアラインメントしたところ、1 番の染色体において 20000 ヶ所を超えるグアニンからアデニンへの変異配列が検出された。一日 - 細胞あたりに 600 ヶ所の脱ピリミジン塩基サイトと 12000 ヶ所の脱プリンサイトが生成されるという報告がある。今回のパーキットリンパ腫瘍細胞のほかの染色体の解析はまだ続いているが、従来想定されている 600 ヶ所の脱ピリミジン塩基サイトに比べて多くのグアニン・脱塩基サイトが生成されることが強く示唆された。

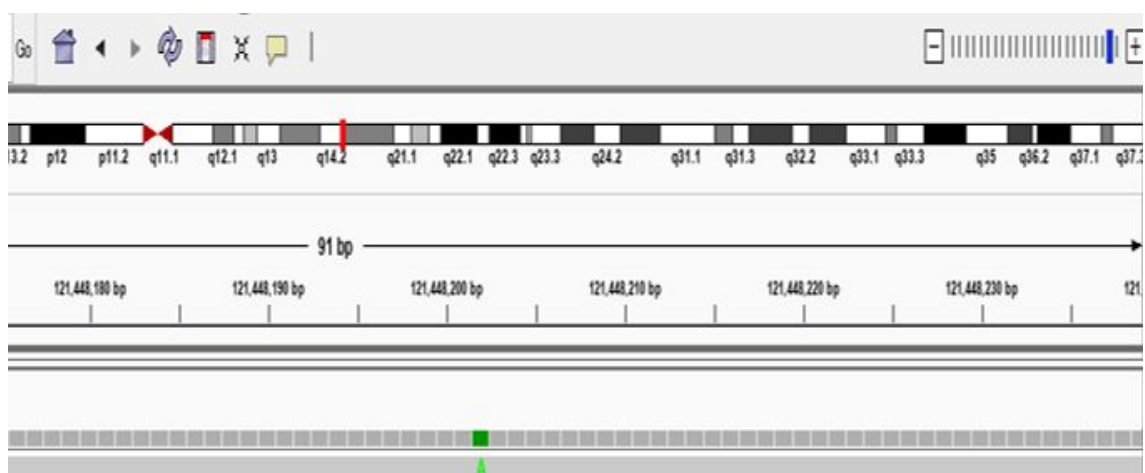


図 3、解読した配列をヒトゲノム配列にアラインメントした例。緑はグアニンからアデニンへの変異を示している。

(4) 本研究では、世界に先駆けてゲノム DNA 中の脱塩基サイトにあるグアニンをビオチン化し、次世代シーケンサーによるグアニンと脱塩基サイトの探索を行った。一方、最近海外の研究機関から本研究と同じ発想で一本鎖の RNA アプタマー中のフリーグアニン基をグリオギザール化合物と環化させてから、クリック反応による RNA 分子のビオチン化並びに次世代シーケンサーによる解析が発表された (引用文献)。同様に、グリオギザール化合物を生きた細胞の培地に添加し、ゲノム DNA の転写開始位置の二重らせんが RNA ポリメラーゼによって瞬間的にほどかれて膨らんだ状態、いわゆる転写バブルにあるグアニン基との環化並びにクリック反応によるビオチン化が達成され、次世代シーケンサーによる解析例も報告された (引用文献)。このようにグリオギザール化合物によるグアニン基のビオチン化と次世代シーケンサーによる DNA や RNA 分子の解析は新しいホットな研究領域となってきた。

<引用文献>

Nat Chem Biol. 2020 May;16(5): 489-492.  
Nat Methods. 2020 May ; 17(5): 515-523.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 WU Chun、KURINOMARU Takaaki	4. 巻 35
2. 論文標題 Development of the Bioluminescent Immunoassay for the Detection of 5-Hydroxymethylcytosine in Dinoflagellate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 301 ~ 305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.18P401	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------