

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501037

研究課題名（和文）DNAメチル化のピンポイント検出法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for the pinpoint detection of methylated DNA

研究代表者

加藤 輝（KATO TERU）

東京工科大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：00367195

研究成果の概要（和文）：遺伝子のプロモーター領域に多く見られる CpG 配列におけるシトシンのメチル化は、遺伝子発現を抑制することが知られている。また、がん抑制遺伝子での過剰なメチル化は、細胞のがん化を誘発するため、DNA のメチル化を簡便かつ迅速に検出することが出来れば、新たな遺伝子診断技術やがんの早期発見への貢献が期待できる。そこで、本研究では、DNA の非二本鎖構造である Three-way junction (TWJ) 構造を用いて分岐点上に位置するシトシンのメチル化をピンポイントに検出する方法の開発を行った。

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 chemical modification of cytosine at the branching point of DNA three-way junction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：遺伝子、がん、メチル化、エピジェネティクス、腫瘍マーカー

## 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（図 1）。遺伝子のプロモーター配列に多く見られる CpG 配列（p はリン酸を示す）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、細胞のがん化を誘発す

る。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



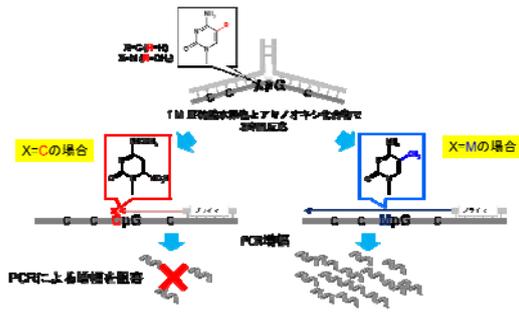


図4. 修飾後のPCRを利用したDNAメチル化のピンポイント検出法.

#### 4. 研究成果

##### (1) 亜硫酸水素ナトリウム/アミノオキシ化合物による化学修飾を利用したシトシンメチル化の検出

3 (1)の検討の結果、図5の電気泳動結果のレーン4のように、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンで化学修飾されたシトシンに対合する位置でTaq polによるプライマーの伸長が阻害されることが確認された(黄色の点線部分)。一方、メチルシトシンを含む標的DNAでは、レーン5のように伸長の阻害は全く確認されなかった。よって、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンで化学修飾した標的DNAにおける、Taq polによるプライマー伸長反応の有無を指標とすることで、メチル基の有無が識別可能であることが示された。

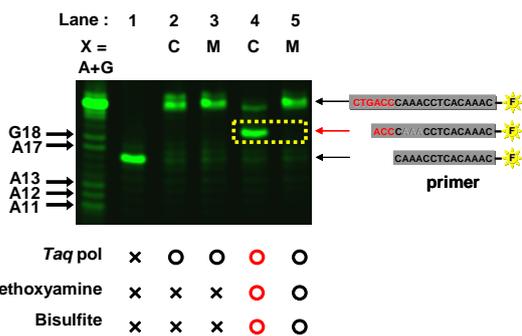


図5. プライマー伸長反応を用いたシトシンとメチルシトシンの識別

##### (2) TWJ構造を形成するプローブDNAを用いた標的DNA中のシトシンメチル化のピンポイント検出

3 (2)の検討の結果、分岐点がシトシンの場合でのみ、分岐点付近での伸長反応の阻害を確認することができた。また、メチルシトシンでは分岐点を含め、伸長反応の阻害は確認されなかった。次に、亜硫酸水素ナトリウムとCMHによる反応後に定量的PCRを用いて未修飾の標的DNA量を定量し、残存した未修飾DNA量を指標としたメチル化DNAの検出を試みた(図6)。その結果、TWJ構造を形成させた非メチル化標的DNA(TWJ(C))では、約20%しか未修飾の標的DNAが残存していなかったのに対して、メチル化標的DNA(TWJ(M))では、未修飾の標的DNAが約70%残存していた。

すなわち、TWJ構造を形成するプローブDNAを用い、特定のシトシンを選択的に化学修飾することでDNAのメチル化をピンポイントで検出することに成功した。最も識別が困難と考えられる、シトシンが隣接したCXpG配列を持つ標的DNAやがん抑制遺伝子であるp16のプロモーター配列(54mer)からなる合成DNAでもメチル化DNAをピンポイントで検出することに成功した。更に2本鎖DNA中のシトシンもTWJ構造を形成するプローブDNAを過剰に加えることでメチル化をピンポイントで検出することに成功した。

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(54塩基の合成DNA)をカルボキシメチルヒドロキシルアミンと亜硫酸水素ナトリウムで化学修飾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解析することに成功した。すなわち、DNAの分岐構造を利用したピンポイントなメチル化DNA検出法を確立した。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。

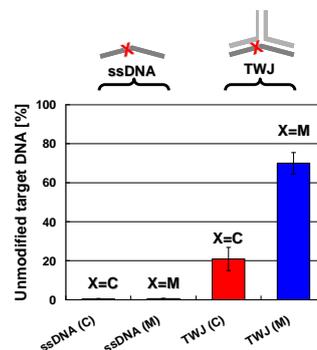


図6. リアルタイムPCRによる未修飾標的DNAの定量

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 6 件)

1. The 39th international Symposium on Nucleic Acids Chemistry (@名古屋大学), 「Development of a method for the pinpoint detection of methylated DNA」, Kenta Takanashi, Teru Kato, 平成 22 年 11 月 15 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 輝 (KATO TERU)

東京工科大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：00367195

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：