

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 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22656190

研究課題名（和文） Zn フィンガー蛋白質を用いたメチル化頻度解析法の開発

研究課題名（英文） Development of analysis method of methylation level using Zn finger protein

研究代表者

池袋一典（IKEBUKURO KAZUNORI）

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：70251494

研究成果の概要（和文）：本研究は、メチル化 DNA 結合蛋白質(MBD)と、Zn フィンガー蛋白質(Zif)融合ルシフェラーゼを用いて DNA のメチル化頻度の簡便な解析法を開発することを目的とし、下記の項目について研究を遂行した。

1) Zif-ルシフェラーゼと MBD 固定化ビーズを用いて、標的遺伝子領域のメチル化頻度解析方法を開発した。

2) がん化に関わるアンドロジェンレセプター遺伝子領域等のメチル化を解析できる Zif-ルシフェラーゼを設計・調製した。

3) 作製した Zif-ルシフェラーゼでアンドロゲンレセプター遺伝子領域のメチル化頻度を解析できることを確認した。更に p16 遺伝子についてもそのメチル化頻度を解析できる Zif-ルシフェラーゼを設計し、その結合特性を解析した。

以上の結果から、本手法は様々な遺伝子のメチル化頻度解析に応用できると期待される。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop the method to analyze the DNA methylation level using Methylated DNA Binding protein (MBD) and Zinc finger protein fused luciferase (Zif-luciferase) and carried out the research as follows;

1) We developed the novel method for analyzing the DNA methylation level using MBD and Zif-luciferase.

2) We designed and constructed the novel Zif-luciferase which enable us the analysis of DNA methylation level of the gene region of androgen receptor which relates to the canceration.

3) We succeed in the analysis of the DNA methylation level Zif-luciferase. We also succeed in the analysis of the DNA methylation level of the p16 gene region which suppressing canceration. Therefore we can say our method is expected for broad application of the DNA methylation analysis of various target gene region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	0	2,000,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生体機能・バイオプロセス

キーワード：DNA のメチル化、Zn フィンガー蛋白質、メチル化頻度解析、簡易迅速検出、メチル化 CpG、メチル化 DNA 結合蛋白質

1. 研究開始当初の背景

近年ゲノム中の特定の領域における異常なメチル化が癌等に関連することが報告され、DNA メチル化は疾患診断用マーカーとして注目されている。現在メチル化の解析手法として広く用いられている手法はバイサルファイト処理を必要とし、迅速性に欠け臨床への応用に適さない。当研究室ではルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質により迅速に PCR 産物を検出する方法が構築されている。

2. 研究の目的

本研究では迅速にゲノムの特定の領域のメチル化レベルを測定することを目的に、同検出法とメチル化 CpG 結合ドメイン(MBD)を組み合わせた手法の構築を試みた(図1)。

3. 研究の方法

1) DNA メチル化レベル測定法の構築

ジンクフィンガー蛋白質である Zif268 の認識配列を含み、前立腺癌において異常メチル化が起こる Androgen receptor (AR) 遺伝子プロモーター中の 85 bp の領域を標的領域とした。種々の濃度の標的領域と同じ配列の DNA (AR DNA) を対象に、ビオチン修飾プライマーで PCR を行い、アビジンコートされた磁性ビーズに増幅産物を固定し、Zif268 融合ルシフェラーゼで検出を行った。また二本鎖化した「メチル化されている種々の濃度の AR DNA」または「同 DNA と非メチル化 AR DNA を混合した種々のメチル化レベルの試料」に対し、グルタチオンを介して磁性ビーズに固定

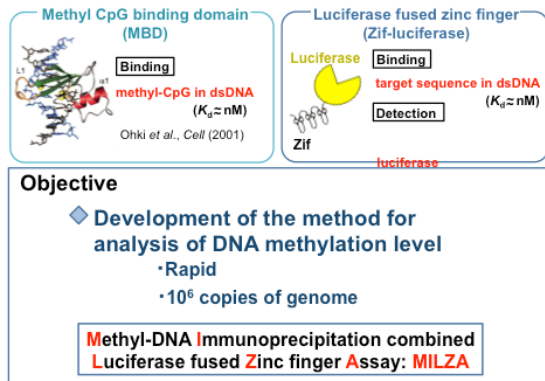


図1 研究目的と開発する方法の構成要素

した GST 融合 MBD でメチル化 DNA を回収し (MeDIP)、これを Zif268 融合ルシフェラーゼで検出する Methyl-DNA Immunoprecipitation combined Luciferase fused Zinc finger

Assay (MILZA) を行った (図2)。

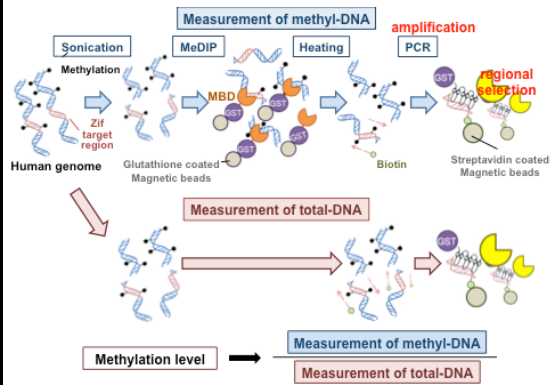


図2 開発したMELZA法の測定原理

2) MILZA を用いた実試料のメチル化レベルの測定

培養した種々の癌細胞あるいは健常ヒト男性または女性の全血から調製したゲノムを対象に、従来法であるバイサルファイトシークエンス法及び COBRA 法を用いて標的領域のメチル化レベルを解析した。数種類のゲノムを超音波処理により断片化し、これを対象に MeDIP を行い、定量 PCR で MeDIP の効率を調べた。また断片化した 10^6 copies の各種ゲノムまたは 2 種類のゲノムを混合した種々のメチル化レベルの試料に対し、MILZA を行った。得られたシグナルを、MeDIP を伴わない同様の操作で得られたシグナルで標準化した (Normalized signal)。

4. 研究成果

1) ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質及びメチル化 CpG 結合蛋白質を用いた DNA メチル化レベル測定法の開発

迅速にゲノム中の特定の領域のメチル化レベルを測定することを目的に、MELZA の構築を行った。そして同手法を用いて培養した

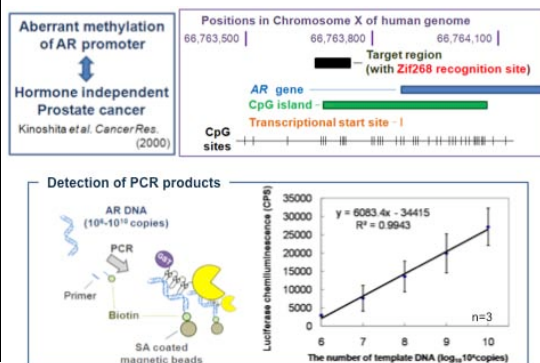


図3 アンドロゲンレセプターのプロモーター領域のメチル化

癌細胞及びヒト全血から調製したゲノム DNA を対象に 10^6 copies のゲノムの AR 遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化レベル (図 3) を定量的に測定できることを示した (図 4)。また従来法とも一致した結果を得られた。 10^6 copies は直径 1 mm の腫瘍から得られるゲノム量であり、臨床への応用を考えた場合には十分な感度を有していると考えられる。

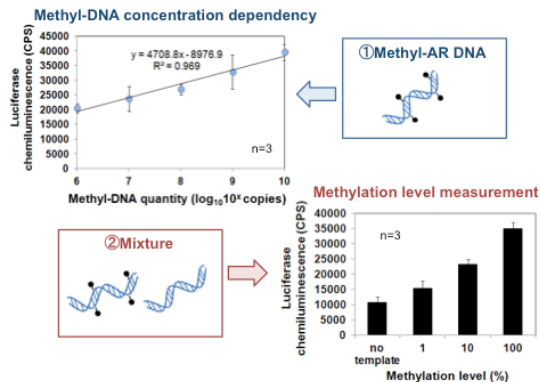


図4 MELZAによるAR遺伝子のメチル化の測定

本手法は今回の条件において、抽出したゲノムを対象とした場合、断片化に 20 分、MBD による捕捉で 1 時間、溶出に 20 分、PCR に 45 分、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質による検出に 1 時間 15 分の計 3 時間 40 分程度で測定を行えると考えられる。これは超音波処理の条件検討によって断片化の時間を 10 分に、また高速 PCR を用いることで DNA の増幅時間を 5 分以下に短縮でき、2 時間 50 分程度まで短縮できると考えられる。現在メチル解析技術として最も広く用いられているバイサルファイト処理を用いる方法は、処理自体に 5-6 時間かかり、その後シーケンスや PCR、制限酵素消化及び電気泳動といった解析を行う。それらの手法と比べると、本手法は半分以下の時間でメチル化レベルの測定を行え、迅速であると考えられる。従って本手法は迅速性に優れたメチル化レベル測定法であり、疾患の早期診断への応用が期待される。

2) p16 遺伝子のメチル化レベル測定のための新規ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質の作製

癌抑制遺伝子として知られる p16 遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化レベルを測定することを目的に、新規のルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を作製した。作製した Zif-p16 融合ルシフェラーゼは標的配列を認識して結合した (図 5)。Zif-p16 融合ルシフェラーゼの特異性をさらに改良し、MELZA に適用することで、p16 遺伝子のメチル化レベルが測定できると考えられる。

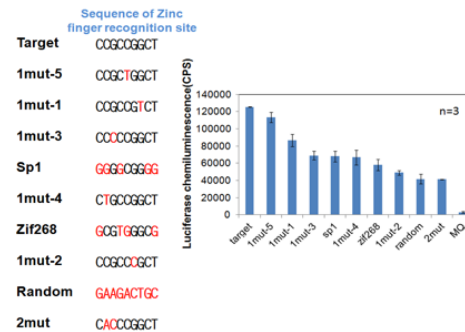


図5 新規作製したZif-ルシフェラーゼの結合特異性

今回構築した MELZA 法はバイサルファイト処理を必要としないため、条件を最適化することで 3 時間以内での迅速な測定が行えると考えられる。また 10^6 copies のゲノム量は直径 1 mm の腫瘍から得られるゲノム量であり、この量のメチル化レベルを定量的に測定できることは、腫瘍が良性か悪性かであることを早期の段階で判定することに応用できると考えられる。

今回は臨床診断への応用を考えて対象とするゲノム量を 10^6 copies 程度と想定し、その条件下における定量性を重視して条件を定めた。しかし本検出法は「メチル化 DNA を捕捉し、回収した後に PCR で増幅して、増幅産物をルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質によって検出する」という原理的に、PCR サイクル数を増やすことで高感度化が行いやすく、微量のメチル化 DNA の検出という用途にも応用できると考えられる。即ち、全血等からゲノムを調製する場合には正常細胞由来のゲノムが多数共存すると考えられるが、その中に含まれる、癌細胞由来で特定の領域が異常にメチル化されているような DNA を検出することができると考えられる。実際に当研究室では、病原性微生物のゲノムを 10 copies から検出できることを示しているため、高感度な異常メチル化 DNA の検出は可能であると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ①. 平岡大介、吉田亘、秦健一郎、池袋一典、「磁性ビーズを用いた DNA メチル化レベル評価法の開発」、第 63 回日本生物工学会大会、2011 年 9 月 27 日、東京農工

大学小金井キャンパス、口頭発表

- ②. 池袋一典、毛塚麻希、平岡大介、村上慶行、志村宣明、「ジンクフィンガー融合ルシフェラーゼを用いた病原性微生物の自動検出法の開発」、日本化学会第91春季年会、2011年3月11日(講演予稿集発行日)、神奈川大学横浜キャンパス、口頭発表 ※ただし、震災の影響で中止。
- ③. 平岡大介、村上慶行、吉田亘、秦健一郎、池袋一典、「メチル化 CpG 結合タンパク質を用いた新規メチル化頻度評価法の開発」、第62回日本生物工学会大会、2010年10月29日、宮崎シーガイアワールドコンベンションセンターサミット、ポスター発表

[その他]

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池袋 一典 (IKEBUKURO KAZUNORI)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：70251494

(2) 研究分担者

秦 健一郎 (HATA KENICHIRO)
国立成育医療研究センター研究所・周産期
病態研究部・部長
研究者番号：60360335

(3) 連携研究者 なし