

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23750083

研究課題名（和文）微生物被メチル化塩基配列の汎用的分析基盤の創出

研究課題名（英文）Development of a novel method for analyzing various DNA methylation

研究代表者

鈴木 宏和（SUZUKI HIROKAZU）

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：80462696

研究成果の概要（和文）：

微生物におけるメチル化 DNA 塩基種としては、5-methylcytosine, N^6 -methyladenine, および N^4 -methylcytosine の 3 種が挙げられる。本研究では、抗メチル化塩基抗体を用いた DNA メチル化部位の汎用的分析手法の開発を目的とし、従来法では解析が困難であった I 型制限修飾系のメチル化部位分析手法の確立に取り組んだ。抗 5-methylcytosine 抗体を用いた分析手法各種（免疫沈降/PCR 法、被メチル化プラスミドライブラリー/HPLC 法、被メチル化プラスミドライブラリー/ウェスタンブロット法）を設計し、条件検討を重ねた結果、被メチル化プラスミドライブラリー/ウェスタンブロット法が、I 型制限修飾系メチル化部位の分析に適していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Microbes harbor various methylated DNA species, such as 5-methylcytosine, N^6 -methyladenine, and N^4 -methylcytosine, which are produced by DNA restriction-modification systems. Aiming at the development of a novel method for widely analyzing DNA methylation sites, I designed immunological methods to analyze N^6 -methyladenine sites arising from type I restriction-modification systems (immunoprecipitation/PCR, methylated plasmid library/HPLC, methylated plasmid library/western blot) and evaluated them. Detailed analysis suggested that the method "methylated plasmid library/western blot" was effective for analyzing type I methylation sites.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：バイオ分析

キーワード：メチル化塩基、メチル化部位分析、抗体

1. 研究開始当初の背景

多くの原核生物は DNA 制限修飾系を保有する。制限修飾系はフェージなどによる外来 DNA の侵略から微生物自身の遺伝情報を維持するための防衛システムとして理解されており、最もよく知られる II 型制限修飾系は、DNA 分解酵素（制限酵素）と DNA 修飾酵素（メ

チル化酵素）から構成される。制限酵素は外来 DNA を配列特異的に切断する役割を、メチル化酵素は宿主 DNA を同認識配列中においてメチル化することで制限酵素による切断から宿主 DNA を保護する役割を、各々担っている。II 型制限酵素は遺伝子組換え技術の中核として古くから利用されており、その需要は

今もなお変わらない。I 型および III 型制限修飾系は、分解酵素と修飾酵素が複合体を形成しているうえ、切断部位と認識配列が離れていることから、DNA 操作技術における需要は低い、その分子メカニズムについては活発な研究対象となっている。このような重用性にも関わらず、実験科学的に認識配列が決定された制限修飾酵素の数は極めて少ない。その理由の 1 つとして“制限修飾酵素の認識配列の汎用的分析法の不備”が挙げられる。認識配列の迅速決定法は、新規制限修飾酵素の発見や、任意微生物の高効率形質転換を容易にすると期待できる。

2. 研究の目的

一般に制限酵素の認識配列とメチル化酵素の認識配列は同じであるため、メチル化酵素の認識配列の解析は、対応する制限酵素の認識配列解析にもつながる。主にエピジェネティクス研究分野における需要から 5-methylcytosine の解析法は広く研究されてきた。しかしながら、その他のメチル化塩基種 (N^6 -methyladenine, N^4 -methylcytosine) にも対応し、汎用性と簡便性を兼ね備えた手法は未だ確立されていない。そこで本研究では、被メチル化塩基配列の新規汎用的分析法の確立を目的とした。主として従来法では解析が困難であった I 型制限修飾系のメチル化部位の解析を想定し、さらに

- (1) あらゆる被メチル化塩基配列に対応できること
- (2) 酵素調製を必要としないこと
- (3) DNA 標品から直接解析できること
- (4) 特殊装置やゲノム解析を必要としないこと

を満たす分析手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

抗メチル化塩基抗体を用いた以下 3 種のメチル化部位分析手法を設計した。市販されている抗メチル化塩基抗体 (抗 N^6 -methyladenine 抗体および抗 5-methylcytosine 抗体) を用いて、それらの有用性を評価した。

(1) 免疫沈降/PCR 法

本方法 (図 1) では、被メチル化部位を測定したい対象 DNA を Sau3AI で断片化し、リンカーを連結後、抗メチル化塩基抗体を用いてメチル化 DNA を特異的に沈降させる。その後、リンカー特異的な PCR プライマーを用いて免疫沈降した DNA 断片を増幅し、その配列を決定する。得られた配列情報に共通する塩基配列を解析することで、被メチル化 DNA サイトを決定する。

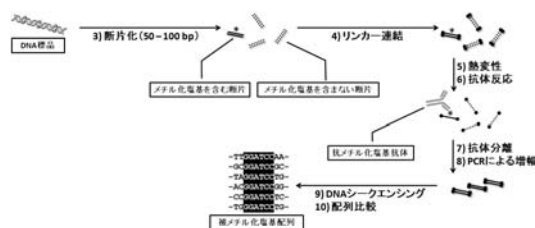


図 1 免疫沈降/PCR 法の概略図

(2) 被メチル化プラスミドライブラリー/HPLC 法

本方法 (図 2) では、(I 型) 制限修飾系のメチル化酵素遺伝子を導入した大腸菌 IR27 株 (メチル化酵素遺伝子欠損株) に、配列既知のプラスミドライブラリーを導入する。得られた大腸菌を培養し、プラスミドライブラリーを回収する。それらプラスミドはデオキシリボヌクレオシドにまで加水分解し、HPLC を用いて分析する。もしプラスミドに被メチル化部位があれば、回収したプラスミドは一定の比率でメチル化塩基を含む。もし被メチル化部位がなければ、回収したプラスミドはメチル化塩基を含まない。メチル化塩基を含むプラスミド配列を比較することで、被メチル化 DNA サイトを決定する。

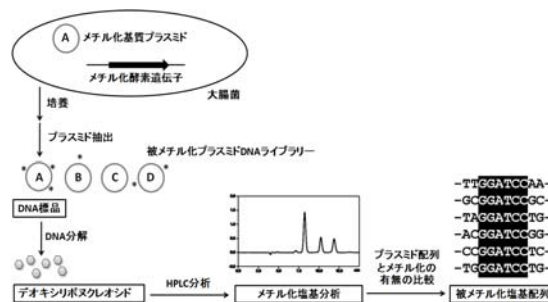


図 2 被メチル化プラスミドライブラリー/HPLC 法の概略図

(3) 被メチル化プラスミドライブラリー/ウェスタンブロット法

本方法 (図 3) では、(I 型) 制限修飾系のメチル化酵素遺伝子を導入した大腸菌 IR27 株 (メチル化酵素遺伝子欠損株) に、配列既知のプラスミドライブラリーを導入する。得られた大腸菌を培養し、プラスミドライブラリーを回収する。プラスミドをメンブレンにブロットし、アルカリ変性後、抗メチル化塩基抗体を用いてメチル化塩基の有無を解析する。メチル化サイトの数に依存し、シグナル強度は変化する。被メチル化部位が全くなければ、シグナルは出ない。メチル化塩基を含むプラスミドの配列を比較することで、被メチル化 DNA サイトを決定する。

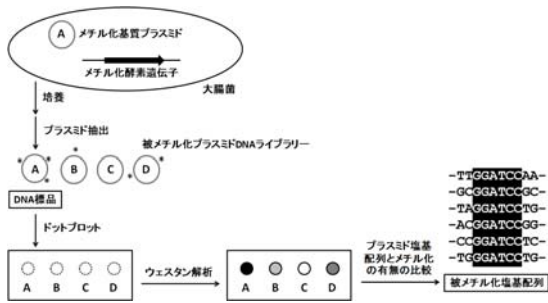


図 3 被メチル化プラスミドライブラリー/ウェスタンブロット法の概略図

4. 研究成果

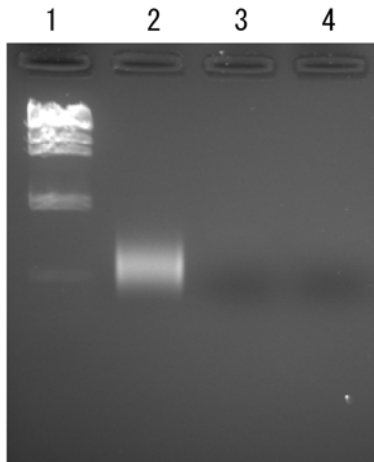


図 4 抗 5-methylcytosine 抗体を用いた Dcm メチル化 DNA の免疫沈降. レーン 1, λ HindIII マーカー; レーン 2, 免疫沈降 (+抗体) 標品の PCR 産物; レーン 3, 免疫沈降 (-抗体) 標品の PCR 産物; DNA なしの免疫沈降 (+抗体) 標品の PCR 産物

(1) 免疫沈降/PCR 法

抗 5-methylcytosine 抗体を用いて大腸菌 Dcm メチル化部位の分析をおこなった. 抗 5-methylcytosine 抗体依存的に DNA が免疫沈降した (図 4). 増幅フラグメントをクローン化し, それらの塩基配列を決定した. 解析された DNA フラグメント全てにおいて Dcm サイトが含まれ, 本手法の有効性が示唆された (図 5). しかしながら, Dcm サイトを 2 ヶ所以上含むフラグメントが有意に検出され, Dcm サイトが 1 ヶ所の短いフラグメントは少なかった. メチル化塩基が 1 ヶ所の場合, 結合する抗体が 1 分子に限られるのに対し, 2 ヶ所以上の場合には複数の抗体が複数の DNA フラグメントと共凝集するため, 沈降しやすくなるためと考えられる.

そこで次に, リンカーにメチル化塩基を導入することを検討した. 低頻度 N^6 -methyladenine をもつ大腸菌 JM110 (HsdM⁺) の染色体 DNA を Sau3AI で消化し,

N^6 -methyladenine 標識したリンカーを連結した. 得られた DNA を抗 N^6 -methyladenine 抗体を用いて免疫沈降し, リンカー特異的なプライマーを用いて PCR を行ったが, 有意な DNA 増幅は見られなかった. 先の実験 (1) の結果は, 有効な免疫沈降のためには 1 フラグメントあたり 3 ヶ所以上のメチル化部位が必要であることを示している. 実験 (2) では, 各フラグメント中の N^6 -methyladenine は最低でも 1 ヶ所以上となるが, HsdM メチル化は極めて低頻度であるため, 2 ヶ所以上にはならないと考えられる. これが, 実験 (2) でメチル化 DNA を免疫沈降できなかった理由と考察した.

以上の結果は, メチル化部位が低頻度である場合, 本手法によるメチル化部位の解析は困難であることを示唆している. またその一方で, メチル化部位が高頻度である場合, 免疫沈降したフラグメントに共通する配列候補が多くなるため, その後の解析が困難になる. 以上の結果より, 免疫沈降/PCR 法はメチル化部位分析に適さないと結論した.

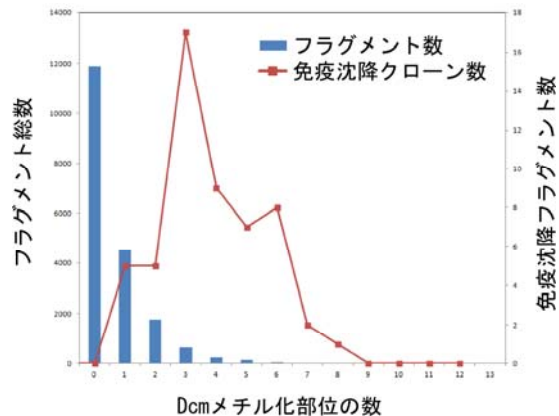


図 5 免疫沈降/PCR 法による Dcm メチル化 DNA の分析. 大腸菌染色体 Sau3AI 消化物を抗 C^5 -methylcytosine 抗体で免疫沈降させ, 沈降した DNA を分析した. 染色体 Sau3AI 消化で生じるフラグメント理論総数 (青) ならびに免疫沈降したフラグメント解析数 (赤) を, フラグメントに含まれる Dcm メチル化部位数によって分類した.

(2) 被メチル化プラスミドライブラリー/HPLC 法

従来法では解析が困難であった I 型制限修飾系のメチル化部位の解析に研究対象を絞り, 被メチル化プラスミドライブラリー/HPLC 法を設計した. 大腸菌染色体 DNA を HincII で消化し, pCR4Blunt-TOPO ベクターに連結した. 得られたプラスミドライブラリーを I 型修飾酵素をもつ大腸菌 JM110 (HsdM⁺) に導入した. 得られた大腸菌からプラスミドを回収し, デオキシリボヌクレオシドにまで

分解した。得られた標品を逆相 HPLC で分析した。Adenine あたりの N^6 -methyladenine モル比を計測し、理論値と比較した (表 1)。

表 1 被メチル化プラスミドライブラリー/HPLC 法によるメチル化の分析

プラスミド	N^6 -methyladenine/adenine	
	理論値%	実測値%
1	0.111	0.045
2	0.041	0.022
3	0.081	0.011
4	0.042	0.052
5	0.044	0.025
6	0.084	0.230
7	0.089	0.111
8	0.044	0.011
9	0.089	0.282
10	0.089	0.155
11	0.095	0.034
12	0.094	0.053
13	0.049	0.025
14	0.048	0.030
15	0.050	0.008
16	0.049	0.013

理論値と実測値が一致するものもあったが、全体的に誤差が大きかった。本分析には多量の DNA を必要としたため、アルカリブレイク法でプラスミド DNA を調製した。様々な精製過程を加えたが、RNA や染色体 DNA の混入が防げなかった。これが、理論値と実測値の差の大きな原因と考えられる。超遠心分離法やイオン交換カラムを用いてプラスミドを調製することで、より高純度な DNA が得られると考えられるが、コストパフォーマンスや簡便性の点から実用性が低くなるため、本手法はメチル化部位分析に適さないと結論した。

(3) 被メチル化プラスミドライブラリー/ウェスタンブロット法

実験(2)で構築したプラスミドライブラリーを、大腸菌 JM110 (HsdM⁺) から、市販のプラスミド調製キットを用いて調製した。得られた DNA 1 μ g をメンブレンにアルカリブロットし、抗 N^6 -methyladenine 抗体を用いて検出した (図 6)。ネガティブコントロールのスポットにも若干のシグナルが得られたが、有意なシグナルが得られることがわかった。メチル化部位の数に依存し、シグナル強度が変化した。吸引ブロッターを用いてブロットするプラスミド量を増やすことで、S/N 比が向上すると期待できる。また発色基質ではなく、化学発光基質を用いることでも、S/N 比を改善できると考えられる。総じて、本手法は、従来法では解析が困難であった I 型制限修飾系のメチル化部位の解析方法に繋がると期

待できる。



図 6 被メチル化プラスミドライブラリー/ウェスタンブロット法によるメチル化分析。メチル化プラスミド 1-24 と比メチル化プラスミド N をドットブロットし、抗 N^6 -methyladenine 抗体で検出した。

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)

[図書] (計 1 件)

1 . Hirokazu Suzuki. Host-Mimicking Strategies in DNA Methylation for Improved Bacterial Transformation. In: Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment (edited by Anica Dricu), InTech, Rijeka, Croatia, pp.219-236 (2012); available on line (in <http://dx.doi.org/10.5772/51691>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 宏和 (SUZUKI HIROKAZU)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 80462696

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし