

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410168

研究課題名(和文) ミスマッチDNA塩基の回転を利用したシーケンス選択的なメチル化解析

研究課題名(英文) DNA methylation analysis utilizing rotation of mismatched base

研究代表者

栗田 僚二 (KURITA, RYOJI)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：50415676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミスマッチDNA塩基の回転を利用して測定対象DNA中に含まれるシトシンのメチル化状態を迅速検知する新手法の提案を行い、基礎特性評価及びマイクロデバイス化を行った。従来、抗体を用いるメチルシトシン検出法は総量を測定可能であるものの、シーケンス内での位置情報が不明なため利用価値が乏しかった。そこでミスマッチ塩基の外向き回転を利用した位置選択的な抗体認識と、マイクロデバイス化による迅速計測に挑戦した。新規SPRチップ(エピジェネティクスチップ)の開発を行い、合成オリゴDNA並びに制限酵素による断片化と組み合わせることにより、小型SPR装置におけるゲノムDNAでのメチル化計測を実現した。

研究成果の概要(英文)：We proposed a new analytical method to detect the methylation state of cytosine in DNA utilizing the rotation of mismatched DNA bases, and evaluated properties and fabricated a micro-sensing device. Conventionally, although the total amount of methylcytosine can be measured with antibody, the utility value is poor due to unknown position information in the DNA sequence. We challenged sequence-selective antibody recognition utilizing outward turned mismatched bases and rapid measurement by micro-sensing device fabrication. We have developed a novel SPR chip (epigenetic chip) to realize methylation assessment of oligo- and genomic- DNAs in a small SPR instrument.

研究分野：分析化学

キーワード：エピジェネティクス マイクロ流路分析 イムノアッセイ

1. 研究開始当初の背景

DNA、特に CpG アイランドに存在するシトシンのメチル化による後天的遺伝子発現の変化(エピジェネティクス)が、ガン、精神疾患、生活習慣病等の多くの疾患に関与していることが明らかになり、詳細な解析が進められている。現在、エピジェネティックな遺伝情報に関するデータベースは構築されつつあるものの、その医療応用に関してはいくつかの課題が残る。その1つとして、現場で誰にでも測定できるような簡便で洗練されたエピゲノム検出法が無いことにある。そこで本研究では、ミスマッチ DNA 塩基の回転を利用して、測定対象 DNA 中に含まれるシトシンのメチル化状態を迅速検知する新手法の提案を行い、基礎特性評価及びマイクロデバイス化を行った。従来、抗体を用いるメチルシトシン検出法は総量を測定可能であるものの、シーケンス内での位置情報が不明なため利用価値が乏しかった。そこでミスマッチ塩基の外向き回転を利用した位置選択的な抗体認識と、マイクロデバイス化による迅速計測に挑戦した。これにより、Bisulfite 反応や PCR、電気泳動を必要としない新規メチルシトシン検出法を提案し、さらにそのマイクロデバイス化により、世界最速のシーケンス選択的メチル化 DNA 分析を目指した。まず、ミスマッチ塩基の外向き回転を利用したシーケンス選択的メチル/非メチルシトシン識別が、どの程度の感度・選択性を有するのか、様々なシーケンスにより既存 SPR 装置 (BIACORE) による相互作用解析を行った。これにより一塩基バルジが最も高効率に DNA2 本鎖からフリップアウトしていることを見出した。その後、一塩基バルジ形成プローブ DNA を用いて、新規 SPR チップ (エピジェネティクスチップ) の開発を行い、合成オリゴ DNA 並びに制限酵素による断片化と組み合わせることにより、小型 SPR 装置におけるゲノム DNA でのメチル化計測を実現した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ミスマッチ DNA 塩基の回転を利用して、測定対象 DNA 中に含まれるシトシンのメチル化状態を迅速検知する新手法の提案、基礎特性評価及びマイクロデバイス化を行うことである。従来、抗体を用いるメチルシトシン検出法は総量を測定可能であるものの、シーケンス内での位置情報が不明なため利用価値が乏しかった。本プロジェクトでは、ミスマッチ塩基の外向き回転を利用した位置選択的な抗体認識と、マイクロデバイス化による迅速計測に挑戦する。これにより、Bisulfite 反応や PCR、電気泳動を必要としない新規メチルシトシン検出法を提案し、さらにそのマイクロデバイス化により、世界最速のシーケンス選択的メチル化 DNA 分析を目指す。

3. 研究の方法

1) ミスマッチ塩基の外向き回転を利用したシーケンス選択的メチル/非メチルシトシン識別が、どの程度の感度・選択性を有するのか、様々なシーケンスにより既存 SPR 装置 (BIACORE) による相互作用解析を行う。また、ゲノム DNA への応用を見据え、制限酵素による断片化とビオチン化プローブ DNA による目的配列の回収実験を行う。
2) 最適化されたプローブ DNA を新規 SPR チップ (エピジェネティクスチップ) へ適用する。さらに、ナノ構造 SPR チップを用いた検討を行い、多項目化の検討を行う。
3) 制限酵素による断片化とビオチン化プローブ DNA による回収法を適用することにより、エピジェネティクスチップを用いた実サンプル計測を行い、加えて、従来法との相関について調査を行う。

4. 研究成果

本実験に用いたシーケンスを Table1 に示す。シーケンスはヒト MGMT プロモーター領域の一部である。まず、測定対象の ssDNA と 2 本鎖を形成し、かつ、測定対象のメチルシトシンが一塩基ミスマッチとなるように設計されたビオチン化 ssDNA とハイブリダイゼーションさせる。測定対象となるメチルシトシンが、アデニン、チミン、シトシン、脱塩基部位、バルジ内に配置されるように設計されている。その後、アビジンを固定化したマイクロタイタープレート、および、表面プラズモン共鳴センサ上に 2 本鎖 DNA を回収し、この 2 本鎖 DNA への抗体の結合量や結合速度を測定した。

Table 1 Upper; Sequence of a part of human MGMT promoter region. Bottom; Probe DNA sequence to form a duplex with and without mismatch region at a target methylcytosine.

Human MGMT promoter
5'- CTT TCC CGG AAT TA ^m C GCC CAG ATG AG -3'
3'- GAA AGG GCC TTA ATN CGG GTC TAC TC -5'(biotin)
(N = G, A, T, C, d-spacer or non (bulge))

図 2 にメチルシトシンのミスマッチを有する各種濃度の 2 本鎖 DNA への抗体結合量を調べた結果を示す。メチルシトシンがグアニンとペアを形成している場合 (Fullmatch) では、メチルシトシンは 2 本鎖の内側を向いており嵩高い抗体には全く認識されない。しかしながら、ミスマッチの場合には、抗体が結合していることがわかる。ミスマッチのメチルシトシンはグアニンと水素結合をしていないため、2 本鎖 DNA の外を向いている時間を有しているためと考えている。さらに、その結合量はミスマッチの状態により大きく異なり、バルジ内に配置させた場合に、最も抗体の結合量が多かった。これは、各種ミスマッチの中でも、バルジ内に配置することによりメチルシトシンの隣接塩基同士での

スタッキング効果により、メチルシトシンが2本鎖DNAの外に飛び出すためと考えられる。このようなメチルシトシンの飛び出し構造は、表面プラズモン共鳴センサによるカイネティクス解析結果や融解温度曲線からも示唆された。

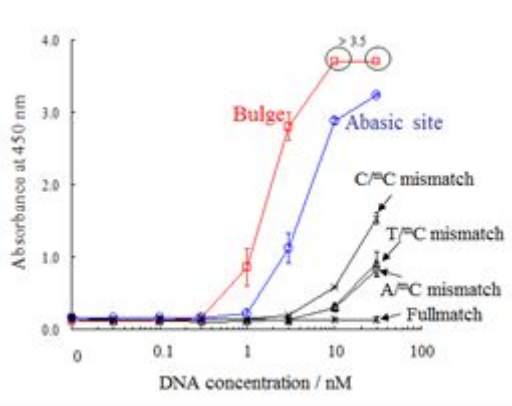


Fig.2 Variations in amount of bound antibody to DNA duplex including mismatch methylcytosine.

図3にミスマッチ塩基を有するDNA2本鎖の融解温度曲線と T_m 値を示す。様々な1塩基ミスマッチの中ではバルジ構造が最も熱的に安定であった。これは、上述したようにメチルシトシンの隣接塩基同士でのスタッキング効果を示している。

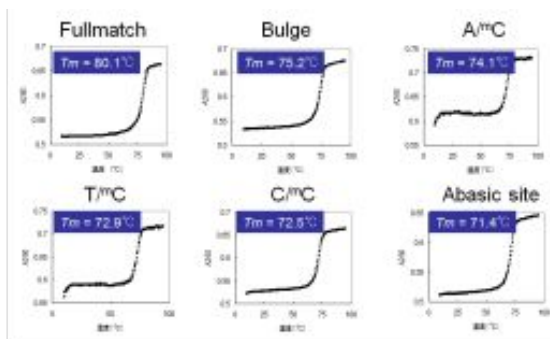


Fig.3 Melting curves of DNA duplexes with and without mismatch methylcytosine.

バルジ特異的免疫認識により、2つの金薄膜を有するマイクロチャネルというシンプルな設計でシーケンス特異的な免疫測定が可能である(図4)。マイクロチップ(18×18mm)は、20 μ mの深さの流路を有するPDMSと、SPR測定のための厚さ50nmの金薄膜を有するBK7ガラスプレートで構築した。金フィルムの1つをストレプトアビジンで修飾し、ビオチン化DNA二本鎖をトラップした。もう一方はカルボキシデカンチオールで修飾されており、非特異的吸収をモニターするためのリファレンスとして使用した。

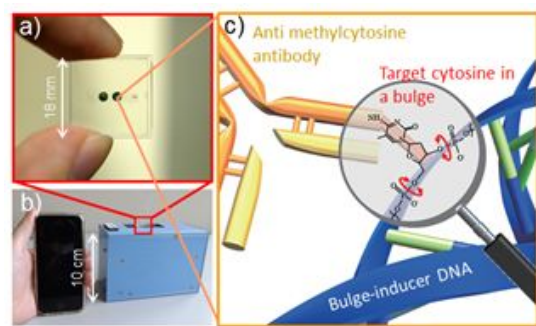


Figure 4 Photographs of a) a microchip for assessing the DNA methylation, and b) hand-held SPR equipment. c) Schematic of antibody binding with target methylcytosine in a DNA bulge region.

図5は測定手順の概略図である。まず、まず制限酵素を用いてゲノムDNAを断片化した後、ビオチン化プローブDNAを混合した。次に、混合液を加熱し、室温まで冷却してプローブとハイブリダイズさせることでバルジ領域を形成させた。この混合液をシリンジポンプで2 μ L/分の流速で30分間マイクロチップに注入し、ビオチン化二本鎖がストレプトアビジン表面に蓄積するようにした。DNA二重鎖の蓄積が完了した後、我々はSPR角を測定を開始し、抗メチルシトシン抗体を15分間注入し、抗体と二重鎖との間の免疫反応に起因するSPR角のシフト量を測定した。SPRシステムは、幅15cm、深さ7cm、高さ10cm、重量約740gと軽量小型である。

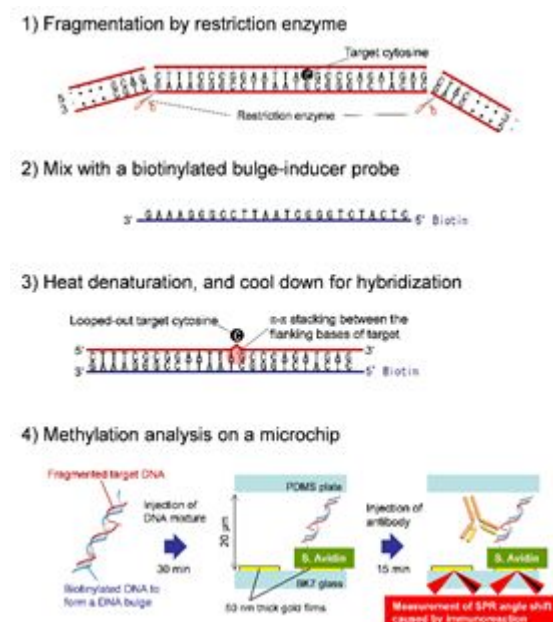


Figure 5 Schematic procedure for pretreatment and measurement of sequence-selective immunochemical epigenetic analysis on a micro-chip. a) Fragmentation by restriction enzyme b) Mixing with a biotinylated bulge-inducing probe DNA. The probe has a complementary sequence to hybridize with the

fragmented sequence of interest, however it lacks guanine paired with the target cytosine. 3) Heat denaturation at 95°C for 5 min followed by cooling to room temperature. 4) Injection of the mixture solution into a microchip for 30 min, and anti-methylcytosine antibody for 15 min.

次にメチル化および非メチル化ラムダ DNA の検量線を得た。ゲノム DNA をメチル化非感受性制限酵素 (AluI) で断片化し、次いでビオチン化プローブ DNA と混合して、標的シトシンに一塩基バルジを形成し、断片化標的配列とハイブリダイズさせた。図 6 (a) は、マイクロチップを用いたメチル化および非メチル化ラムダ DNA の検量線を示している。SPR 角は、メチル化 DNA の濃度が増加するにつれて増加した。図 6 (a) のメチル化 DNA の検量線の相対標準偏差 (RSD) は、6.3% (1pM) および 6.9% (10pM) であった。対照的に、非メチル化 DNA についてはほとんど増加がなかった。ラムダゲノム DNA の検出限界は約 0.1pM (0.19ng) であり、これはオリゴ DNA の検出限界と同じである。ビオチン化プローブ DNA が断片化されたゲノム DNA からの標的配列と十分にハイブリダイズし、標的シトシンに意図されたバルジが形成されることを示している。また、以下のようにマイクロチップを用いて標的シトシンにおけるメチル化率を推定することができる。メチル化および非メチル化ラムダ DNA を混合して、0, 25, 50, 75 および 100% のメチルシトシンを含むモデル DNA を形成した。DNA 中の標的シトシンのメチル化率は、COBRA による従来の部位特異的メチル化分析から確認した。図 6 (b) に示すように、ラムダ DNA 中の標的シトシンのメチル化率と SPR シグナル ($r^2 = 0.9942$) との間に高い相関が得られた。

このように本申請課題では、当初の目標通りゲノム DNA のメチル化率を正確に計測可能であることを示すことができた。

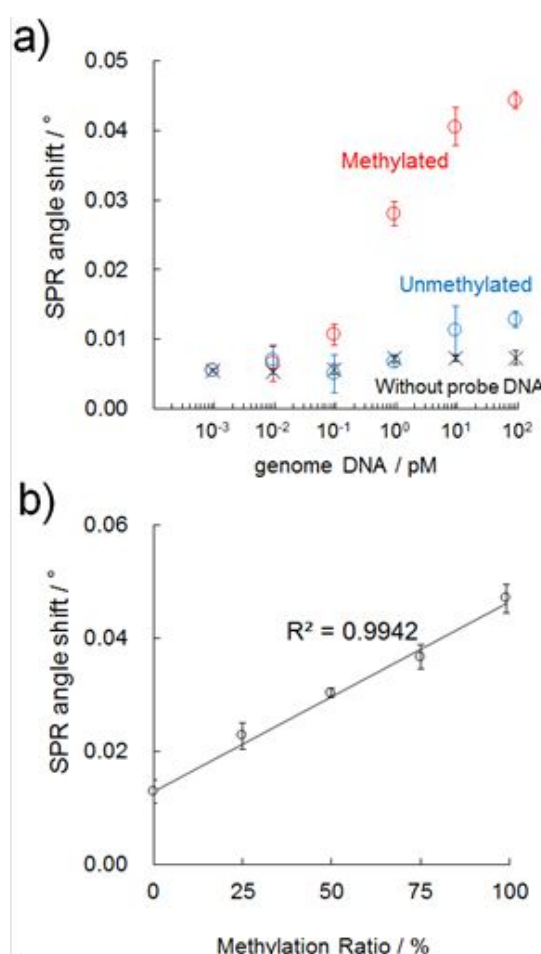


Figure 6. a) Calibration curves for methylated and unmethylated lambda DNAs. b) Results of a methylation ratio assessment of a target cytosine from genomic DNA. Methylated and unmethylated lambda DNAs were mixed to form a model DNA.

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5件)

- [1] Takaaki Kurinamaru, Ryoji Kurita, Bisulfite-free approaches for DNA methylation profiling, *Analytical Methods*, 9 (2017) 1537-1549. DOI:10.1039/C7AY00232G
- [2] Ryoji Kurita and Osamu Niwa, Microfluidic platforms for DNA methylation analysis, *Lab on a chip*, 16 (2016) 3631-3644. DOI:10.1039/C6LC00829A
- [3] Ryoji Kurita, Hiroyuki Yanagisawa, Kyoko Yoshioka and Osamu Niwa, Site-specific immunochemical methylation assessment from genome DNA utilizing a conformational

difference between looped-out target and stacked-in nontarget methylcytosines, Biosensors and Bioelectronics, 70 (2015) 366-371.
DOI:10.1016/j.bios.2015.03.061

- [4] Ryoji Kurita, Hiroyuki Yanagisawa, Kyoko Yoshioka and Osamu Niwa, On-Chip Sequence-Specific Immunochemical Epigenomic Analysis utilizing Outward Turned Cytosine in a DNA Bulge with Handheld Surface Plasmon Resonance Equipment, Analytical Chemistry, 87 (2015) 11581-11586.
DOI:10.1021/acs.analchem.5b03520
- [5] Hiroyuki Yanagisawa, Ryoji Kurita, Takehito Yoshida, Tomoyuki Kamata and Osamu Niwa, Electrochemical assessment of local cytosine methylation in genomic DNA on a nanocarbon film electrode fabricated by unbalanced magnetron sputtering, Sensors and Actuators B: Chemical, 221 (2015) 816-822
DOI:10.1016/j.snb.2015.07.030

〔学会発表〕(計5件)

- [1] 栗田 僚二、Microfluidic DNA methylation analysis without bisulfite conversion. Asian symposium for analytical sciences, 北海道大学、札幌、2016年9月29日
- [2] 栗田僚二、On-chip DNA electrochemical assessment of cytosine methylation status from genomic DNA with a combined bisulfite restriction analysis. MicroTAS2015, Hwabaek International Convention Center、慶州、Korea, 2015年10月27日
- [3] 栗田僚二、On-chip DNA methylation assessment by bulge-specific immune-recognition with portable surface plasmon resonance equipment, 7th International symposium on microchemistry and microsystems, 京都大学、京都、2015年6月10日
- [4] 栗田僚二、表面化学的アプローチによるマイクロバイオセンシングデバイスの開発、化学とマイクロナノシステム学会、京都大学、京都、2015年6月8日
- [5] 栗田僚二、柳澤博幸、吉岡恭子、丹羽修、DNAの二重らせん中に存在するミスマッチ塩基の免疫化学的な状態解析とエピゲノム計測への応用、電気化学会、横浜

国立大学、横浜、2015年3月16日

〔その他〕
ホームページ等
<https://unit.aist.go.jp/bmd/biomed-nbd/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田僚二 (KURITA, Ryoji)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
バイオメディカル研究部門
研究グループ長
研究者番号：50415676