

令和 2 年 9 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05897

研究課題名(和文) エピジェネティクス研究支援を指向する高精度低コストメチル化DNA検出法の開発

研究課題名(英文) Development of high-accuracy and low-cost DNA methylation detection method for supporting epigenetics research

研究代表者

高橋 透 (TAKAHASHI, Toru)

福井大学・学術研究院工学系部門・准教授

研究者番号：30361166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、生命科学に関連する多くの研究分野において、エピジェネティクスの重要性が注目されている。エピジェネティクス研究の基本はDNAの修飾＝メチル化を検出することにある。本研究計画では、エピジェネティクス研究を支援するための重要な研究ツールとして、新たなDNAメチル化検出法を提供することを目指した。申請者らが考案した核酸塩基のプロトン解離特性の差異を利用する等鎖長配列異性体一本鎖DNAのキャピラリー電気泳動(CE)分離法を基盤技術として用いることで、高精度かつ低コストな新規DNAメチル化検出法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命科学に関連する多くの研究分野においてエピジェネティクスの重要性が注目されている。エピジェネティクス研究の基本は、DNAのメチル化を検出することにある。このような背景から、DNAメチル化検出のための新規技術開発が国内外を問わず精力的に行われている。本研究計画は、エピジェネティクス研究支援のための重要な研究ツールとして、キャピラリー電気泳動分離に基づく高精度かつ低コストなDNAメチル化検出法を提供するものであり、その波及効果として、エピジェネティクス研究の進展によってもたらされる種々の研究成果が期待される。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the importance of epigenetics has attracted attention in many research fields related to life science. The basis of epigenetics research is to detect DNA modification, i.e. DNA methylation. In study, we aimed to provide a novel DNA methylation detection method as an important research tool to support epigenetics research. We have developed a new method for detecting DNA methylation with high accuracy and low cost based on the capillary electrophoretic separation method for sequence isomers of single-stranded DNA with same chain length, which utilizes the difference in the proton dissociation properties of nucleobases.

研究分野：分析化学

キーワード：DNAメチル化検出 キャピラリー電気泳動

1. 研究開始当初の背景

近年、多くの生命現象にエピジェネティクスが関与していることが次々に明らかにされ、生命科学に関連する多くの研究分野においてその重要性が注目されている。エピジェネティックな現象は、ゲノム DNA のシトシンのメチル化、ヒストンタンパク質の修飾によって発現するため、エピジェネティクス研究の基本はこれら DNA の修飾を検出することであり、中でも、ゲノム上の CpG サイト (CG の配列が繰り返し出現する領域) におけるシトシンのメチル化を検出することが重要な意味を持っている。従って、エピジェネティクス研究の効率を決めるものは DNA メチル化検出法の効率であると言っても過言ではない。このような背景から、DNA メチル化検出のための新規技術開発が国内外を問わず精力的に行われている。既存の主な DNA メチル化検出法は、いずれもバイサルファイト処理を伴う手法であり、リアルタイム PCR 法、次世代シーケンサーによるシーケンス解析、マイクロアレイ法などが挙げられる。次世代シーケンサー法、マイクロアレイ法ではゲノムワイドな DNA メチル化解析が可能であるが、コストが高く、日常的な分析法としての利用は困難である。一方、リアルタイム PCR 法は、他の 2 法と比較して低コストであり、配列が既知のゲノム DNA 断片のスクリーニングには有用であるが原理上回避し得ない誤診リスクを有していることは否めない。

2. 研究の目的

本研究計画では、エピジェネティクス研究において日常的な分析法として利用可能な、GE 分離に基づく高精度かつ低コスト DNA メチル化検出法の確立を目指す。現在報告されているほとんどの DNA メチル化検出法 (5-mC 検出法) ではバイサルファイト処理、すなわち、バイサルファイト (HSO_3^-) によるシトシンからウラシルへの選択的な塩基置換反応、の利用が前提となっている。これらバイサルファイト処理を利用する DNA メチル化検出法では、バイサルファイト処理後、PCR によって増幅されたアンチセンス鎖上において、ターゲット鎖のメチル化部位と対になる塩基が、アデニン (A) (=メチル化無し) とグアニン (G) (=メチル化有り) とのいずれかであるかによってメチル化の有無が識別される。

一方、当研究グループでは、核酸塩基のプロトン付加特性の差異を利用して配列上の一塩基変異の識別を実現する一本鎖 DNA (ssDNA) のキャピラリー電気泳動 (CE) 分離法を考案し、これを利用したハイブリダイズによらない一塩基多型検出・ジェノタイピング法を開発した。このような背景から、我々は、DNA メチル化検出のための A-G 変異の識別に特化した等鎖長配列異性 ssDNA の CE 分離系を基盤技術として用いる新規な DNA メチル化検出法の構築 (図 1) が可能であると考えた。

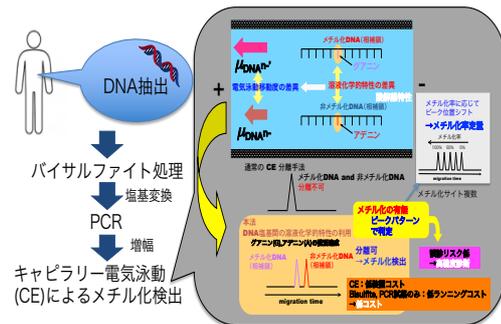


図1 本研究で提案するCE分離に基づくメチル化検出システムの概要

そのために、申請者らの以前の成果を踏まえ、DNA メチル化検出のための A-G 変異の識別に特化した核酸の溶液化学特性を利用する等鎖長配列異性体一本鎖 DNA の CE 分離系を確立した後、ヒトゲノム試料を用いて、バイサルファイト処理、PCR とのマッチングなど実用的観点に基づく検討を行い、エピジェネティクス研究を支援するための高精度低コスト DNA メチル化検出法として、DNA の溶液化学特性を利用する CE 分離 DNA メチル化検出システムの確立を目指す。また、バイサルファイト処理を介さず、直接 DNA メチル化を検出する方法に結びつけるための、新たなメチル化 DNA の分離法についても検討する。

3. 研究の方法

本研究計画では、エピゲノム研究支援を行うための CE 分離を基盤とする新たな実用的 DNA メチル化検出システムのプラットフォームを構築する。

本研究計画に先立ち、申請者は、核酸塩基のプロトン付加特性の差異を利用する等鎖長一塩基変異一本鎖 DNA の CE 分離を考案した。この成果を足がかりに、まず、DNA メチル化検出のための A-G 変異の識別に特化した核酸の溶液化学特性を利用する一塩基変異等鎖長一本鎖 DNA の CE 分離法システムを構築しより精密・高感度な分離・検出を達成し、これを基盤とした DNA メチル化検出システムを構築する。

ゲノム上には CpG サイトと呼ばれる CG の配列が繰り返し出現する領域があり、CpG サイトのシトシンのメチル化がエピゲノムな現象の発現に重要な意味を持っている。メチル化パターンには、注目する CpG サイトに含まれる全ての CpG シトシンがメチル化される「ホモなメチル化」と、一部の CpG シトシンだけがメチル化される「ヘテロなメチル化」とがある。そこで、ヘテロな

メチル化を想定し、ヘテロなメチル化のメチル化率を定量するためのCE分離系と定量のための方法論を検討する。

さらに、ゲノム上の特定のCpGサイトのホモなメチル化の検出を行うための検討を行う。本法をある種のがんの発症との関連が知られているヒトDNA断片上のCpGサイトのホモなメチル化検出へ結びつけるため、当該ゲノム断片の合成DNA試料をモデル系にCE分離系を確立した後、バイサルファイト処理した模擬ゲノム断片試料等での検討を行った後、実際の抽出ゲノム試料系へ応用を検討する。メチル化ゲノム試料の入手は難しいため、健康人の抽出ゲノム試料に対しMethyltransferaseでメチル化処理を行ったものを用いて実試料系への適用を検討する。また、これまでにない新しい試みとして、バイサルファイト処理無しに直接DNAメチル化を検出する方法へ結びつけるための新たなメチル化DNA分離法を考案する。

4. 研究成果

本研究計画では、DNAメチル化検出のためのA-G変異の識別に特化した核酸の溶液化学特性を利用する等鎖長配列異性体一本鎖DNAのCE分離法システムを構築し、より精密・高感度な分離・検出を達成し、これを基盤としたDNAメチル化検出システムを構築する。

一方、当研究グループでは、核酸塩基のプロトン付加特性の差異を利用して配列上の一塩基変異の識別を実現する一本鎖DNA(ssDNA)のキャピラリー電気泳動(CE)分離法を考案し、これを利用したハイブリダイズによらない一塩基多型検出・ジェノタイピング法を開発した。このような背景から、我々は、先述のようなDNAメチル化検出のためのA-G変異の識別に特化した等鎖長配列異性ssDNAのCE分離系を基盤技術として用いる新規なDNAメチル化検出法の構築が可能であると考えた。まず、その端緒としてCE分離システムの分離能の向上および迅速化について検討を行った。DNAメチル化には、ゲノム上の当該領域の塩基配列に含まれるすべてのシトシンがメチル化するホモなメチル化と、必ずしも全てのシトシンがメチル化されるわけではないホモなメチル化があり、本研究計画で提案する方法を用いてメチル化検出を行う場合、それぞれのメチル化状態に特化したCE分離条件を設定する必要がある。そこで、泳動緩衝溶液のpH、緩衝成分の種類、濃度、イオン強度、泳動緩衝液モディファイアの添加の有無に加え、キャピラリーへの試料注入法、試料注入量、泳動時の印可電圧といったCE分離の全てのパラメータを見直し、ホモおよびヘテロなメチル化に最適なCE分離条件を探索した。その結果、ヘテロなメチル化検出のためのCE分離条件として、8 M尿素を含む20 mMリン酸緩衝溶液(pH 3.0)が分離に適していることが分かった。さらに、この条件で、メチル化率を0-100%の間で変えた模擬メチル化DNA混合物のCE分離を試みたところ、40分以内にそれぞれ独立した5つのピークとして分離することができた(図2)。

```
メチル化率100%: 5' GATAACGACGACAATAAAAAACGACGCGAAAAACCCCGAAACGCAAAACACCAA-3
メチル化率75%: 5' GATAACGACGACAATAAAAAACGACGCGAAAAACCCCAAAACACAAACACCAA-3
メチル化率50%: 5' GATAACGACGACAATAAAAAACGACACAAAAACCCCAAAACACAAACACCAA-3
メチル化率25%: 5' GATAACGACAACAATAAAAAACAACCAAAAAACCCCAAAACACAAACACCAA-3
メチル化率0%: 5' AATAACAACAACAATAAAAAACAACAACAAAAACCCCAAAACACAAACACCAA-3
```

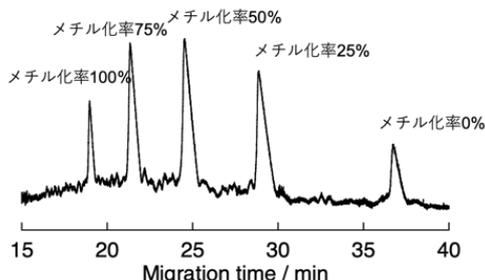


図2 メチル化率を0-100%の間で変えた模擬メチル化DNA混合物のCE分離

また、メチル化率を変えたDNAメチル化標準混合試料の電気泳動図を作成し、これをメチル化検出、メチル化率定量のための“スケール”すなわち、メチル化Ladderとして用いることにより、ヘテロなメチル化検出に加え、メチル化率の定量が可能であることを明らかにした。

次に、本法を実試料系へ適用するための取り組みの一環として、口腔内がんの発症との関連が知られているヒトDNA断片試料(hTERT遺伝子断片)のホモなメチル化検出を実現するための基礎的な検討を行った。本研究で提案する手法では、バイサルファイト処理を行った後、PCRによって増幅したDNAに対してCE分離によってメチル化検出を行うことを想定している。バイサルファイト処理により、非メチル化シトシンはウラシルに変換され、PCRの際ウラシルはチミンとして読み取られるので、それに対応する相補鎖上の部位はアデニンとして増幅される。一方、メチル化シトシンはバイサルファイト処理により変化せず、PCRの際それに対応する相補鎖上の部位は通常通りグアニンとして増幅される。従って、CE分離により、PCR後の相補鎖の配列上でメチル化部位に対応する箇所の塩基がアデニンかグアニンのいずれであるかを識別することができればメチル化検出が可能である。hTERT遺伝子から98塩基長の領域を選択し、ホモな非メチル化試料を想定(オリジナルの配列に対し、当該領域に含まれる5カ所のシトシンがウラシルに置換された)と想定した一本鎖DNA試料(ターゲット配列相補鎖の配列上で5カ所のグアニンをアデニンに変換したもの)とメチル化試料を想定した一本鎖DNA試料(グアニンからアデニンへ

の変換なし)を作成し、これらのCE分離を行い、相互分離を達成することができた(図3)。すなわち、本計画で提案するCE分離に基づく手法により、実際のDNA試料系においてホモなメチル化の検出が可能であることが示唆された。

上述したとおり、合成DNA断片試料による模擬メチル化試料を用いた基礎的な検討においてホモなメチル化の検出が可能であることが示唆されたことを受け、実際にヒトから採取したゲノム試料をメチル化処理し、本法によるそのホモなDNAメチル化検出を試みた。ヒトゲノムのhTERT遺伝子領域から5箇所のCpGサイトを含む84塩基長の遺伝子断片を選択し、ターゲットとした。ヒト口腔内粘膜から採取したゲノム試料をMethyltransferaseでメチル化処理し、メチル化ゲノム試料を作成した。メチル化ゲノム試料にバイサルファイト処理を行った後、PCRによりターゲット領域だけを増幅し、精製カラムを用いて精製したものに、非メチル化参照DNA試料を加えた試料を作成し、そのCE分離を行いメチル化ゲノム試料のhTERT遺伝子断片のDNAメチル化検出を試みた。得られた電気泳動図上に、非メチル化参照DNAの他にメチル化DNAのピークが観察され(図4)、本法によりヒトゲノム上のCpGサイトのホモなDNAメチル化検出できることが分かった。

一方、今年度、新たにバイサルファイト処理を介さず直接DNAメチル化を検出する方法論に結びつけるために、核酸塩基のプロトン付加特性の差異を利用する等鎖長一塩基変異一本鎖DNAのCE分離法によるメチル化DNAの直接分離法の基礎検討に取り組んだ。DNAメチル化酵素によるメチル化処理を行った標品DNA(h-TERT遺伝子断片)を、直接、上述のCE分離系に導入したところ、わずかながら未処理のDNAと分離できることがわかった。

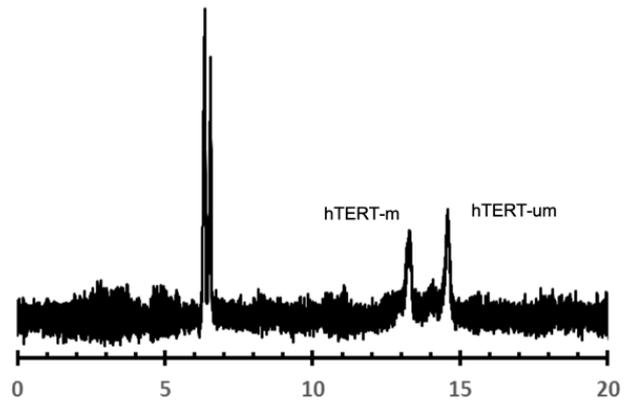


図3 hTERT遺伝子断片の模擬メチル化(hTERT-m)、非メチル化(hTERT-um) DNA資料のCE分離。泳動緩衝液: 0.1 M H₃PO₄ + 8 M 尿素(pH 2.9)。

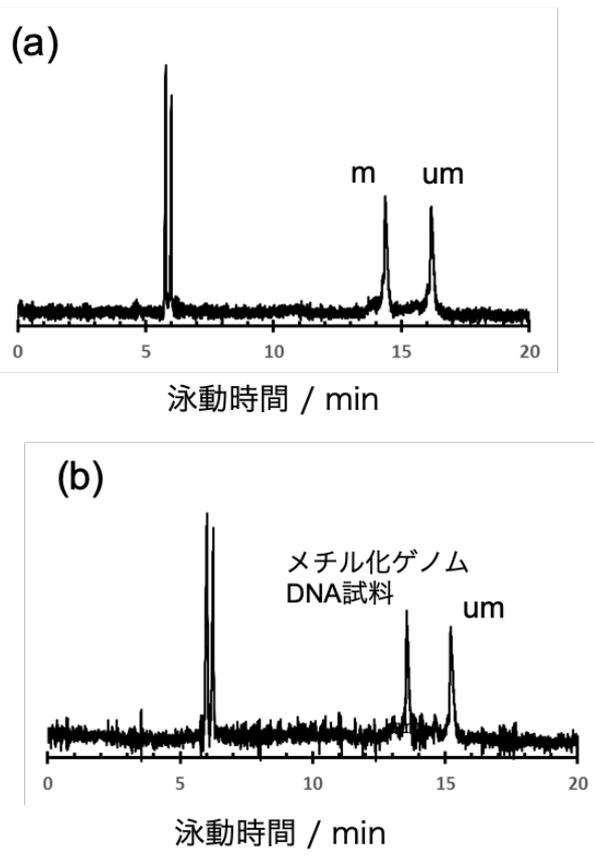


図4 hTERT遺伝子断片のメチル化(m)および非メチル化(um)標品DNA試料とMethyltransferaseでメチル化処理を行ったゲノム抽出DNA試料の電気泳動図。(a) 標品DNA (m, um)混合物, (b) メチル化ゲノムDNA試料, 標品DNA(um)混合物

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Toru Takahashi, Mayu Fukagawa, Takao Sakurai, Hitoshi Hoshino	4. 巻 43
2. 論文標題 Non hybridization single nucleotide polymorphism detection and genotyping assay through direct discrimination of single base mutation by capillary electrophoretic separation of single stranded DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Separation Science	6. 最初と最後の頁 657-662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jssc.201900897	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 -
1. 著者名 Y. Sasaki, Y. Sato, T. Takahashi, M. Umetsu, N. Iki	4. 巻 585
2. 論文標題 Capillary electrophoretic reactor for estimation of spontaneous dissociation rate of Trypsin-Aprotinin complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 113406-114311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2019.113406	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 -
1. 著者名 高橋 透	4. 巻 525
2. 論文標題 電気泳動分離に基づく核酸の分析法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ぶんせき	6. 最初と最後の頁 356-361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Takao Sakurai, Hitoshi Hoshino, Toru Takahashi	4. 巻 40
2. 論文標題 Separation of single-base sequential isomers of single-stranded DNA by capillary electrophoresis and its application in the discrimination of single-base DNA mutations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Separation Science	6. 最初と最後の頁 3153-3160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jssc.201700443	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村 祐輝, 高橋 透
2. 発表標題 キャピラリー電気泳動分離に基づくDNA メチル化検出法の開発
3. 学会等名 日本化学会近畿支部2019年度北陸地区講演会と研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 祐輝, 高橋 透
2. 発表標題 キャピラリー電気泳動分離に基づくDNA メチル化検出法の開発: CpG Methyltransferase 処理試料への適用
3. 学会等名 第39回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 祐輝, 高橋 透
2. 発表標題 一本鎖DNA のキャピラリー電気泳動分離に基づくDNAメチル検出法によるhTERT 遺伝子断のメチル化検出
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村祐輝, 橋谷一行, 高橋透
2. 発表標題 一本鎖DNAのキャピラリー電気泳動分離に基づくDNAメチル化検出の検討
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村祐輝, 高橋透
2. 発表標題 キャピラリー電気泳動分離に基づくDNAメチル化検出法のhTERT遺伝子断片のホモなメチル化検出への応用
3. 学会等名 第38回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 祐輝, 橋谷 一行, 村田 真未, 高橋 透
2. 発表標題 等鎖長配列異性一本鎖DNAのキャピラリー電気泳動分離にもとづくDNAメチル化検出の検討
3. 学会等名 第37回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔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
研究 分担者	壹岐 伸彦 (IKI Nobuhiko) (50282108)	東北大学・環境科学研究科・教授 (11301)	
研究 分担者	沖 昌也 (Oki Masaya) (60420626)	福井大学・学術研究院工学系部門・教授 (13401)	