

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14258

研究課題名(和文) シトシンバリエーションの網羅的解析法の開発と細胞評価への応用

研究課題名(英文) Development of a comprehensive analysis of cytosine variants for cellular evaluation

研究代表者

栗之丸 隆章 (Kurinomaru, Takaaki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：50769693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNAのメチル化は、細胞の性質を決定づける後天的化学修飾(エピジェネティクス修飾)であり、遺伝子発現制御などに重要な役割を担う。近年、DNAが脱メチル化する過程で生じる新たなシトシン修飾体(シトシンバリエーション)が発見され、疾患との関連性が高いことが報告されている。そのため、エピゲノム修飾の計測による医療診断や創薬開発に期待が高まり、各塩基の迅速検出法が世界規模で研究されている。本研究では、エピゲノム修飾の包括的な解析に向け、表面プラズモン共鳴(SPR)によるシトシンバリエーションの一括計測法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ELISA法などの従来の免疫アッセイでは、一つのDNAに含まれる2種類以上の標的を評価できないため、4種のシトシンバリエーションを一度に識別することが困難であった。本研究で開発したSPR免疫アッセイでは、同一DNAに含まれる4種のシトシンバリエーションを連続して検出することに成功した。本研究で開発した手法は、シトシンバリエーションの生物学的意義や産業的価値を明らかにする有用なツールになると期待できる。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation is considered to be an important epigenetic modification for controlling gene expression. Since the discovery of the active DNA demethylation pathway in mammals, numerous efforts have been made to distinguish epigenetic cytosine variants, including 5-methylcytosine (5mC), 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), 5-formylcytosine (5fC), and 5-carboxylcytosine (5caC). In this project, we developed a technique for the sequential multiple assessment of cytosine variants by a surface-plasmon-resonance (SPR)-based immunochemical assay.

研究分野：分析化学

キーワード：免疫アッセイ DNA エピジェネティクス シトシンバリエーション

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化は、細胞の性質を決定づける機構 (エピジェネティクス機構) であり、細胞の発生・分化などに重要な役割を担う。DNA のメチル化は疾患とも密接に関わっており、例えばがん組織のゲノム DNA は正常組織と異なるメチル化パターンを示す。従来、DNA のエピジェネティクス研究は専ら 5-メチルシトシン (5mC) を対象としていたが、近年では能動的脱メチル化機構で生じる中間体 (5-ヒドロキシメチルシトシン, 5hmC; 5-ホルミルシトシン, 5fC; 5-カルボキシルシトシン, 5caC) が新たに発見され、疾患との関連性が高いことが報告されている。そのため、複数のシトシンの化学修飾体 (シトシンバリエント) の計測による医療診断や創薬開発に期待が高まり、各種バリエントの迅速検出法が世界規模で研究されている。

現在、シトシンバリエントの簡易検出法として、抗体を用いた免疫化学的手法 (イムノアッセイ) が有力である。しかし、ドットブロットや ELISA などの従来法では、バリエント毎に別々のアッセイで評価し、全バリエント率を解析していた。そのため、従来のイムノアッセイでは必要なサンプル量が多く、各測定に数時間かかるため、全ゲノム中の各バリエントの網羅的解析が困難であった。化学的標識やナノポアシーケンスなどの次世代の手法も開発されているが、操作が煩雑であり、現状では定量的分析が困難である。したがって、イムノアッセイによるシトシンバリエントの網羅的解析を実現するために、各バリエントを一括検出する新しい手法の開発が不可欠である。

2. 研究の目的

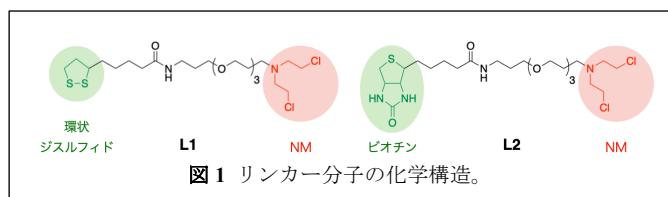
申請者はこれまでに、表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用したイムノアッセイの開発を進めてきた。従来、SPR 法を用いてシトシンバリエントを分析する場合、目的の DNA と相補的なプローブ DNA を準備する必要があるため、分析対象が特定の DNA 配列に限定されていた。これに対し、申請者のイムノアッセイでは、あらゆる配列の DNA を網羅的に固定化するリンカー分子 (L1) を開発し、SPR 法による 5mC の迅速検出を実現した。この独自技術を用いて、ゲノム DNA の全メチル化率を 10 分程度で計測することに成功した (*Chem. Commun.* 2017, 53, 8308-8311)。

上記のリンカー分子 L1 は、片側に DNA 架橋部位であるナイトロジェンマスタードを持ち、もう片側に基板に結合する固定部位を持つ。このリンカー分子を利用することで、ゲノム DNA をセンサーチップ上に強固に固定化できる。このため、抗体を解離させる過酷な洗浄液 (酸・アルカリ等) に暴露しても DNA は安定に固定化されるので、繰り返し測定に適している。申請者は、これまで開発したイムノアッセイを用いて、各バリエントを繰り返し検出することで、ゲノム DNA 中に含まれるバリエントを一度に計測できると考えた。この方法を実現すれば、標的 DNA の全バリエント率を 40 分程度で測定できることが期待される。この迅速かつ網羅的なバリエント計測法によって、従来困難であった細胞のエピジェネティックな変化のダイナミクスを評価可能である。エピジェネティクス情報に基づく細胞評価法へと展開できれば、本手法は医療診断および創薬開発・食品分析・環境分析などの多分野の発展に貢献できる。そこで本研究では、SPR 法によるシトシンバリエントの一括計測を実現し、エピジェネティックな変化に基づく細胞評価法へと応用することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、シトシンバリエントの連続一括計測法を構築し、実サンプルから抽出したゲノム DNA の全バリエント率を計測することで、細胞分化の評価や製剤の薬効評価などへ応用可能かどうかを明らかにする。具体的な計画を以下に示す。

これまでのイムノアッセイでは、SPR センサー基板上に DNA を効率的に固定化するために、片側にナイトロジェンマスタード (NM) をもち、もう片側に環状ジスルフィドを持つリンカー分子 (L1) を使用してきた (図 1)。



しかし、L1 を使用した実験系で

は抗体がセンサー基板へ非特異吸着する傾向があり、複数のシトシンバリエント計測に適さないことが考えられた。そこで、環状ジスルフィドをビオチンに置換した新規リンカー分子 (L2) を新たに開発した (図 1)。溶媒組成や濃度などを精査することで、最適な修飾条件を決定した。

次に、イムノアッセイによる各種シトシンバリエントの一括検出を試みた。まず、あらかじめバリエントの位置が決まっている合成オリゴ DNA を使用し、抗体が各バリエントを正しく認識することを確認した。その後、ゲノム DNA をサンプルとし、サンプルの全バリエント率を評価した。サンプルとして、4 種のシトシンバリエントを含有するゲノム DNA を *in vitro* で調製した。具体的には、非メチル化 λ DNA を CpG メチラーゼによって 5mC を導入し、さらに ten-eleven translocation (TET) enzyme によって 5mC を 5hmC/5fC/5caC に変換した。その後、上記で確立したイムノアッセイを用いて、各種臓器 (脳、腎臓、小腸) から抽出したゲノム DNA の評価を行った。ゲノム DNA は市販されているサンプルを使用した。各種ゲノム DNA を制限酵素で断片化し、リンカー分子 L2 で処理した後、センサーチップに固定した。固定したゲノム DNA に対して各種抗体を送液し、各種シトシンバリエントの含有率を計測した。

4. 研究成果

まず、合成オリゴ DNA を用いてアルキル化リンカー分子 **L2** の反応を評価した。二本鎖オリゴ DNA に任意濃度の **L2** を混合し、37°C で 30 分反応させた後、脱塩カラムを用いて精製を行った。得られた生成物を変性ポリアクリルアミド電気泳動で評価すると、添加した **L2** 濃度に伴い、2つの特徴的なバンドが確認できた(図 2)。未反応のオリゴ DNA に由来する 24 bp の上部に現れたシャープなバンド(約 27 bp)は、mono-adduct に由来するバンドであり、50–100 bp に現れたスミアなバンドは、interstrand-crosslink に由来することが示唆された。これらの結果から、**L2** を低濃度加えると mono-adduct がリッチに、高濃度加えると interstrand-crosslink がリッチになることがわかった。

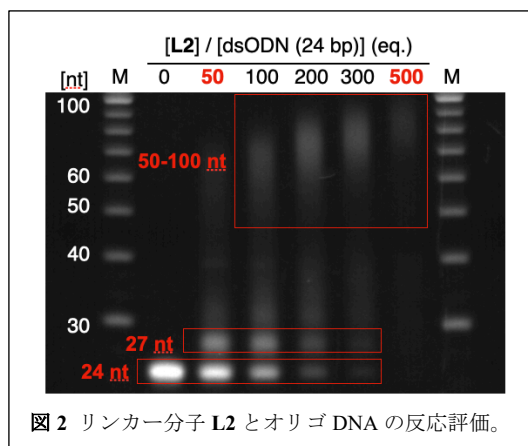


図 2 リンカー分子 **L2** とオリゴ DNA の反応評価。

固定部位を導入したオリゴ DNA を SPR によって評価した。ストレプトアビジンを表面修飾したセンサー基板上に上記のオリゴ DNA を送液したところ、**L2** で処理したサンプルは SPR レスポンスの増加が確認できた。DNA のビオチンと基板上的のアビジンが相互作用した結果、DNA が基板に固定化されたと考えられる。さらに、固定化した DNA に抗 5mC 抗体を送液すると、5mC を有するオリゴ DNA でレスポンスの増加が確認できた。**L1** を使用した系とは異なり、**L2** を使用した系では抗体の非特異吸着がほとんど生じなかった(図 3)。これは、基板表面にストレプトアビジンをコートしているため、有機物の非特異吸着が抑えられたと考えられる。この系では、シトシンバリエントをより選択的に認識できると考え、以降の実験では **L2** を用いた系で統一した。

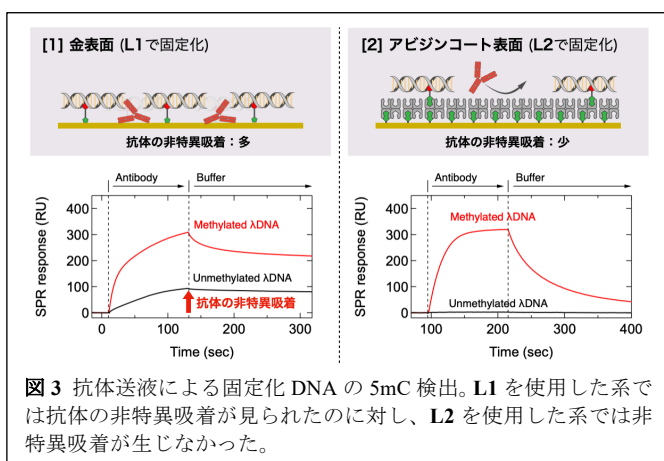


図 3 抗体送液による固定化 DNA の 5mC 検出。**L1** を使用した系では抗体の非特異吸着が見られたのに対し、**L2** を使用した系では非特異吸着が生じなかった。

興味深いことに、mono-adduct リッチな修飾体 (adduct 1) と interstrand-crosslink リッチな修飾体 (adduct 2) では、シトシンバリエントに対する抗体の近接性が異なることがわかった。Adduct 1 と 2 で抗体の結合レスポンスを評価すると、adduct 1の方が adduct 2よりも高い結合レスポンスを示した。一般的に、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA では抗体の近接性が異なり、塩基が露出している一本鎖は近接性が高く、塩基が埋もれている二本鎖 DNA では近接性が低いと言われている。今回の結果から、adduct 1 ではセンサー基板上で一本鎖となっているため、抗体の近接性が高くなったと考えられる。複数のシトシンバリエントを正確に評価する目的を考慮し、以降の実験では adduct 1 を採用した。

上記のように最適化した SPR イムノアッセイを用いて、5mC 以外のシトシンバリエントを識別できるかどうか検証した。異なるシトシンバリエントを持つオリゴ DNA を合成し、上記の方法で **L2** を反応させ、センサー基板上へ固定した。固定したオリゴ DNA に各種抗体を送液すると、それぞれの抗体によってシトシンバリエントを選択的に識別することに成功した(図 4)。その後、本手法の有用性を確かめるべく、TET1 による *in vitro* 酸化反応を評価した。TET1 は、CpG 中の 5mC を選択的に酸化する酵素で、5hmC/5fC/5caC まで変換する。任意濃度の TET1 で処理した λ DNA を SPR イムノアッセイで評価したところ、TET1 による 5mC の酸化が TET1 濃度依存的に進行することが確認できた(図 5)。以上より、同一 DNA を対

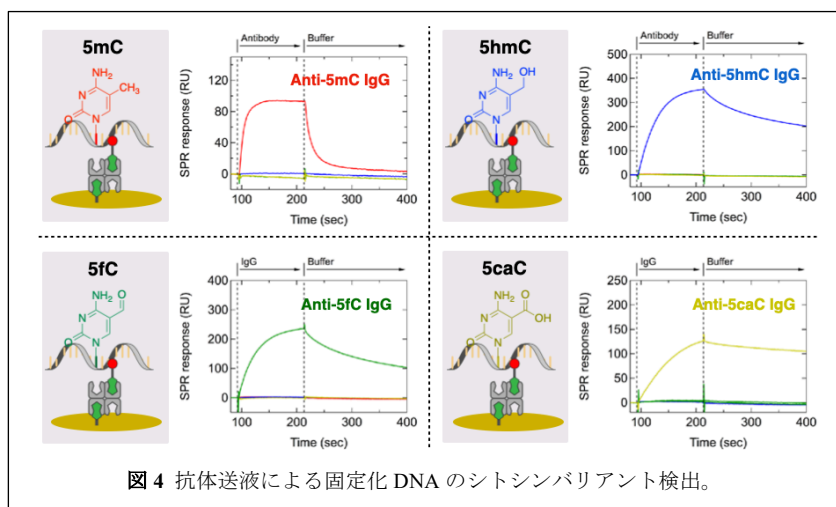


図 4 抗体送液による固定化 DNA のシトシンバリエント検出。

象に抗体を連続送液することで、シトシンバリエーションの網羅的計測を実現した (*Analytical Chemistry*, 2019, 91, 13933-13939)。

最後に、各種臓器 (脳, 腎臓, 小腸) から抽出したゲノム DNA の評価を行った。ゲノム DNA は市販されているサンプルを使用した。これらのゲノム DNA を上記の手法で測定したところ、5mC および 5hmC のシグナルが観察された。しかし、抗体による結合シグナルが非常に小さいため、各臓器間でのシトシンバリエーション含有率の差は確認できなかった。おそらく、実サンプルのゲノム DNA 中に含まれるシトシンバリエーション率がモデル DNA に比べて低かったため、抗体の結合レスポンスが十分に検出されなかったことに起因するだろう。

本研究で開発した SPR イムノアッセイは、あらゆる配列のゲノム DNA を分析対象にでき、各種バリエーションの一括計測を迅速かつ簡易に行える特徴を持つ。従来、DNA のエピジェネティクスの研究は専ら 5mC を対象としており、5mC を検出する手法が数多く開発されてきた。一方で、5mC と他のシトシンバリエーションを区別する手法は未だ発展途上である。本研究を進展させて SPR イムノアッセイを高精度化できれば、各バリエーションの生物学的意義や産業的価値を明らかにできる。現在、ゲノム DNA 中に含まれるシトシンバリエーションをより高感度に検出するための方法を模索している。

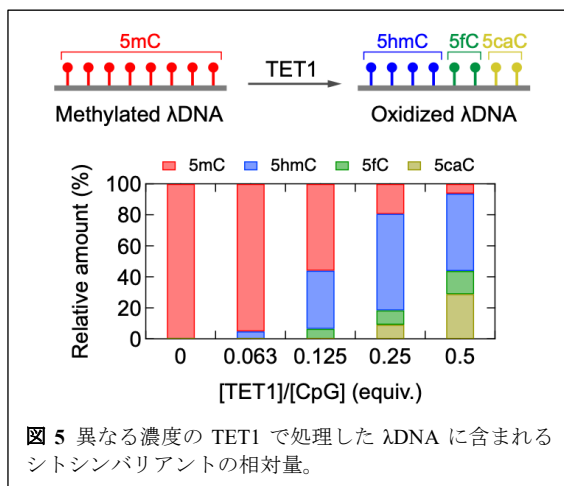


図 5 異なる濃度の TET1 で処理した λDNA に含まれるシトシンバリエーションの相対量。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Kurinomaru Takaaki, Kojima Naoshi, Kurita Ryoji | 4. 巻 91 |
| 2. 論文標題 Sequential Assessment of Multiple Epigenetic Modifications of Cytosine in Whole Genomic DNA by Surface Plasmon Resonance | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Analytical Chemistry | 6. 最初と最後の頁 13933 ~ 13939 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03423 | 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 Kurinomaru Takaaki, Kojima Naoshi, Kurita Ryoji | 4. 巻 77 |
| 2. 論文標題 Immobilization of DNA on Biosensing Devices with Nitrogen Mustard-Modified Linkers | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry | 6. 最初と最後の頁 e85 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1002/cpnc.85 | 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 Wu Chun, Kurinomaru Takaaki | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Development of the Bioluminescent Immunoassay for the Detection of 5-Hydroxymethylcytosine in Dinoflagellate | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Analytical Sciences | 6. 最初と最後の頁 301 ~ 305 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.2116/analsci.18P401 | 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 Kojima Naoshi, Suda Tomomi, Kurinomaru Takaaki, Kurita Ryoji | 4. 巻 1043 |
| 2. 論文標題 Immobilization of DNA with nitrogen mustard?biotin conjugate for global epigenetic analysis | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta | 6. 最初と最後の頁 107 ~ 114 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.aca.2018.09.008 | 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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 栗之丸 隆章 |
| 2. 発表標題 シトシンバリアントの迅速計測にむけたSPRイムノアッセイの開発 |
| 3. 学会等名 関西バイオ医療研究会 第8回講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ryoji Kurita, Takaaki Kurinomaru, Naoshi Kojima |
| 2. 発表標題 Microfluidic device for epigenome analysis |
| 3. 学会等名 The Second International Workshop by the 174th Committee JSPS on Symbiosis of Biology and Nanodevices |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takaaki Kurinomaru, Naoshi Kojima, Ryoji Kurita |
| 2. 発表標題 Detection of Cytosine Variants of DNA Using Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassay |
| 3. 学会等名 The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry / The 2st Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 栗田 僚二, 須田 友美, 栗之丸 隆章, 小島 直 |
| 2. 発表標題 エピゲノムのオンチップ分析に向けたアルキル化リンカーの創成と応用 |
| 3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第38回研究会 (CHEMINAS38) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 栗田 僚二, 栗之丸 隆章, 小島 直 |
| 2. 発表標題 エピゲノムのオンチップ分析に向けたアルキル化リンカーの創成 |
| 3. 学会等名 2018年電気化学秋季大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 栗之丸 隆章, 小島 直, 栗田 僚二 |
| 2. 発表標題 エピゲノム修飾の包括的評価にむけたSPRイムノアッセイの開発 |
| 3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小島 直, 栗之丸 隆章, 須田 友美, 栗田 僚二 |
| 2. 発表標題 核酸固定化試薬の開発とメチル化シトシンイムノアッセイへの応用 |
| 3. 学会等名 日本核酸医薬学会第4回年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 栗之丸 隆章, 小島 直, 栗田 僚二 |
| 2. 発表標題 シトシンバリエーションの一括計測に向けたSPRイムノアッセイの開発 |
| 3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第37回研究会 (CHEMINAS37) |
| 4. 発表年 2018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 |
|-------|-----------------------------|----------------------------------|----|
| 研究協力者 | 栗田 僚二 (Kurita Ryoji) | 国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長 | |
| 研究協力者 | 小島 直 (Kojima Naoshi) | 国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員 | |