

令和 6 年 9 月 27 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05562

研究課題名（和文）分離化学的アプローチによる新規なバイサルファイトフリーDNAメチル化検出法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel bisulfite-free DNA methylation detection method using a separation chemical approach

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：最近、がんの早期診断に有用な分子マーカーとして5-メチルシトシンが非常に注目されている。既往のほぼすべてのDNAメチル化検出法ではバイサルファイト（BS）処理の利用が前提となっている。本研究課題では、その開発が強く望まれている、BS処理を必要としない新規なBSフリーDNAメチル化検出法の開発を目指す。5-メチルシトシンとシトシンの直識別を達成するための手段として、申請者が独自に開発した等鎖長配列異性一本鎖DNAのキャピラリー電気泳動分離法をベースに、BSフリーDNAメチル化検出法の基盤技術となる、酸塩基平衡利用するDNAの精密分離法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既往のほぼすべてのDNAメチル化検出法ではバイサルファイト（BS）処理の利用が前提となっている。BS処理は重大な問題を抱えているが、有効な代替手段がないため使われ続けている。本研究の成果は、その開発が強く望まれている、BS処理を必要としない新規なBSフリーDNAメチル化検出法の基盤技術とを提供するものであり、同時に、CE分離を利用してメチル検出（5-mCとCの直接識別）を達成するという分離化学的アプローチそのものが本研究課題の学術的独自性である。

研究成果の概要（英文）：Recently, 5-methylcytosine has attracted much attention as a molecular marker useful for the early diagnosis of cancer. Almost all existing DNA methylation detection methods require the use of bisulfite (BS) treatment. In this research project, we aim to develop a new BS-free DNA methylation detection method that does not require BS treatment, which is highly desired. As a means to directly distinguish between 5-methylcytosine and cytosine, we have developed a precise DNA separation method that utilizes acid-base equilibrium, which will be the basic technology for the BS-free DNA methylation detection method, based on the applicant's original capillary electrophoretic separation method for isomeric single-stranded DNA of equal chain length.

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 バィサルファイトフリー

1. 研究開始当初の背景

男女ともに国民の死因の一位を占めるがんは、健康上の最大の関心事であり、その有効な治療法や診断法への社会的な要求は止むところがない。特に、個人のゲノム情報を用いるオーダーメイド医療の概念が提唱されて以降、がんの発症リスクを知る、あるいはその早期診断に対する関心が高まっている。近年、ある種のがんの発症と、ゲノム上の CpG サイトにおけるシトシン (C) の 5 位のメチル化との関連が明らかにされ、その早期診断に有用ながんの分子マーカーとして 5-メチルシトシン (5-mC) が注目されている。これを背景に、がんの早期診断を支える基盤技術として、5-mC をターゲットとする DNA メチル化検出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。核酸塩基としての C と 5-mC は、物性が酷似しており、両者を識別することは極めて難しい。また、両者ともにグアニンと塩基対を形成するため、ハイブリダイズ法では C と 5-mC を識別できない。それ故、次世代シーケンサーを含め、現在広く使用されているほぼすべての DNA メチル化検出法では、バイサルファイト (亜硫酸水素ナトリウム) 処理が前提になっている。すなわち、5-mC を直接検出するのではなく、バイサルファイト (BS) 処理による C からウラシルへの DNA 塩基の変換反応後、PCR で増幅されるアンチセンス鎖上の相補的塩基が、アデニン (=非メチル化) かグアニン (=メチル化) を識別することによって間接的にメチル化検出を行う。現在、BS 処理の利用が標準とされているが、BS 処理にはいくつかの致命的な問題があり、有用な代替手段が存在しないためにやむを得ず使われて続けているのが現状であるため、BS 処理を用いない、BS フリーな DNA メチル化検出法の開発に対する多大な要請がある。以上から、がんの早期診断を指向した DNA メチル化検出法の開発、および関連するエピジェネティクス研究分野において、BS 処理を用いずに、特殊な試薬を用いることなく、安価でシンプル、かつ、5-mC だけでなくその酸化誘導体群にも対応可能な汎用性の高い、C と 5-mC およびその酸化誘導体の「識別」を達成するための新規技術の開発、あるいは概念の創出が喫緊の研究課題、すなわち学術的「問い」となる。

2. 研究の目的

申請者らは、上で述べた当該研究分野の学術的「問い」に答えるべく、分離化学的アプローチによる 5-メチルシトシン(5-mC)とシトシン(C)との直接識別の達成と、これにもとづく新規な BS フリー DNA メチル化

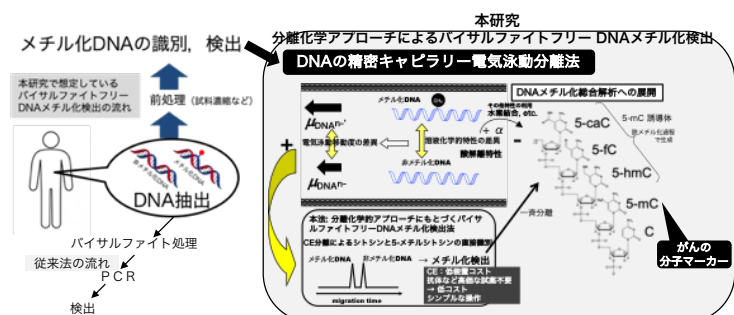


図1 本研究計画で提案する分離化学アプローチによるバイサルファイトフリー DNAメチル化検出法とDNAの精密キャピラリー電気泳動分離法の概念とその特徴

検出法の構築を目的とする。本研究で提案する手法の概要、特徴を図1に示す。5-mCとCの直接識別を達成するための手段として、申請者らが独自に開発した等鎖長配列異性一本鎖DNAのキャピラリー電気泳動(CE)分離をベースに、酸塩基平衡、水素結合をはじめとする種々の相互作用を導入して新たなDNAの精密分離法を開発し、BSフリーDNAメチル化検出法を構築する。我々が提案する分離化学的アプローチのコンセプトは、数十～百万段程度の理論段数を有する高性能分離法であるCEを用いて分離を行うことによってこれらDNAの諸物性の差異を増幅し、相互分離＝識別を達成する。

3. 研究の方法

本研究では5-mCとCの直接識別を達成するための手段として、申請者らが独自に開発した等鎖長配列異性一本鎖DNAのCE分離法を用いた。13箇所のCpGシトシンを持つ98塩基長のhTERT遺伝子断片にメチル化処理を施し模擬メチル化DNA試料を作成し、これとメチル化処理を行っていない非メチル化DNA試料との混合物を作成し、これを注入試料として等鎖長配列異性一本鎖DNAのCE分離法による非メチル化DNAと模擬メチル化DNAとの相互分離を試みた。

4. 研究成果

本研究では、mCとCの pK_a がそれぞれ4.60、4.43であり、極めてわずかな差はあるが酸解離平衡特性に差異があることに着目し、CE分離によるmCとCとの直接識別を行うことを着想した。すなわち、数十万～百万段程度の高い理論段数を持つCEを用いることでわずかな物性の差異を増幅できるのではないかと考えた。13箇所のCpGシトシンを持つ98塩基長のhTERT遺伝子断片にメチル化処理を施し模擬メチル化試料を作成した。メチル化試料(ht-mC: 5'ACTCmCGAACACCAmCGAATACmCGAAmCGTAAAAAAAAAAAAAmCGA AAAmCGmCGTAAAmCGmmCGACTAAAAAmCGAACmCGAAAAmCGC ATTACTCCCTAAAmCGAACA-3')と非メチル化標品DNA(ht-C: 5'ACTCCGAACACCACGAATACCGAACGTAAAAAAAAAAAAACGAAAACGCGTAAACG CGACTAAAAACGAACCCGAAAACGCATTACTCCCTAAACGAACA-3')を混合し泳動条件を変えてCE分離を行った。C、mCを含む配列がどれほどプロトン化し、電気泳動移動度が減少すれば分離できるほどの差が生まれるかを調べるため、A-G識別によるDNAメチル化検出を行った際の最適pHである0.1M H₃PO₄+8M尿素(pH 2.9)を用いて分離を試みた(図2 a)。図2でみられる2つのピークはメチル化する前のDNA試料(ht-C)、メチル化処理を行ったDNA(ht-mC)

由来のピークである。mCとCには pK_a の差がほとんどないため、12-14分付近に見られるピークにおいて分離が確認できず、先割れした二本のピークとなっている。そこで、泳動緩衝液のさらにpHを低下させることでmCとCとの相互分離を試みた。pHを2.9(図2 a)から、2.7(図2 b)、2.3(図2 c)と変化させたところ、分離に30分を超える時間がかかったものの、mCとCに由来する2本の独立したピークが観察され、ht-C、ht-mC混合物の相互分離を達成できた。またさらにpHを下げ、pH 2.2(図2 d)たところピーク分離度ではpH 2.3(図2 c)の泳動図と差がないが、泳動時間はさらに遅くなった。従って、これ以上pHを下げてても分離度合いは変わらず、また、pHを下げることでベースラインの乱れも確認されたことから、pH 2.3(図2 c)が最適であると判断した。

図2の各電気泳動図中で観察される2本のピークは、ht-C、ht-mCに由来するものであることはわかっているが、ht-C、およびht-mCのいずれのものであるかは判明していない。そこで、ht-C、ht-mCの混合比を変えたht-C、ht-mC混合試料を用いて、それぞれのピークの同定を行った。ht-mCのみ(図3 a)から、ht-Cを加えその比率を増加させていくことで前のピークが出現し、そのピークが大きくなっていくことが分かる(図3 b, c)。従って、泳動時間の早いピークが配列のCpGシトシンがメチル化していないht-Cであり、泳動時間の遅いピークがメチル化したシトシンを持つht-mCだとわかる。これはCの pK_a がmCよりも小さいことからmCのほうがプロトン化し、泳動時間が遅くなるという予想とも一致する。

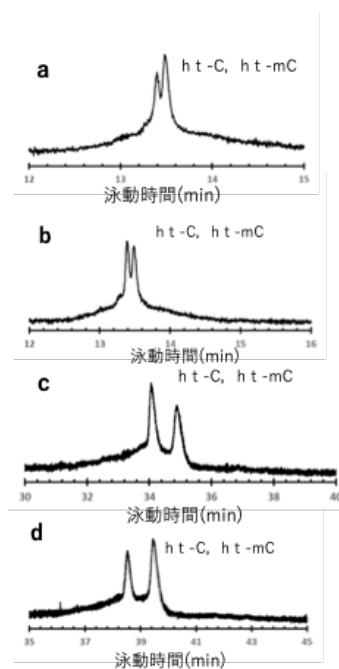


図2 非メチル化(ht-C)およびメチル化(ht-mC)処理試料の電気泳動図 a. 0.1M H_3PO_4 +8M 尿素(pH2.9) b. 0.2M H_3PO_4 +8M 尿素 (pH2.7) c. 0.5M H_3PO_4 +8M 尿素 (pH2.3) d. 0.6M H_3PO_4 +8M 尿素(pH2.2)

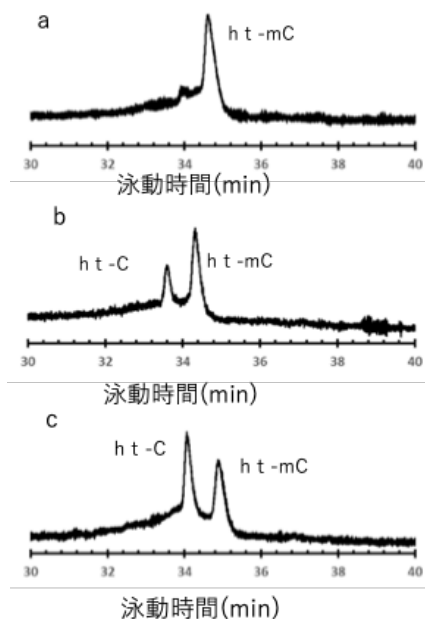


図3 混合比を変えた非メチル化(ht-C)およびメチル化(ht-mC)処理試料の電気泳動図 a.ht-mCのみ b. ht-mC : ht-C = 0.5 : 1 c. ht-mC : ht-C = 1 : 1

以上のことから核酸塩基の酸解離平衡特性を利用する CE 分離による mC の直接分離が可能であることがわかった。これは DNA 塩基の酸解離平衡特性を利用する一本鎖 DNA の CE 分離法により mC と C の直接識別が可能であり、これを用いたバイサルファイトフリーな DNA メチル化検出法を実現できる可能性を示している。そもそも、上述の本研究の成果を含め、mC と C との直接識別を達成した例は極めて少ないことに加え、特に、CE を用いた分離アプローチによる報告例としては本研究の成果が唯一のものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 志田 匠、木村 祐輝、高橋 透
2. 発表標題 キャピラリー電気泳動分離法に基づくDNAメチル化検出法によるhTERT遺伝子断片のDNAメチル化検出
3. 学会等名 日本分析化学会 第70年会
4. 発表年 2021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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------