

機関番号：13201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710201

研究課題名 (和文) 定量的バイサルファイト・シーケンシング法の開発

研究課題名 (英文) Development of Quantitative Bisulfite Sequencing

研究代表者

岡 芳美 (YOSHIMI OKA)

富山大学・事務局・特命助教

研究者番号：30470115

研究成果の概要 (和文) : DNA におけるシトシンのメチル化は発癌の一つのシグナルと見なされ、その検出定量は、発癌を予測する遺伝子診断技術へと応用展開が期待されている。メチル化シトシンの検出法は、バイサルファイト・シーケンシング法が一般的であるが、DNA を高温、強酸性条件下で、高濃度のバイサルファイト試薬と反応させるために起こる、最終的なメチル化の定量性が問題とされている。本研究では、DNA を低温、弱酸性、低濃度の試薬の存在下で反応させることによって、メチル化の定量性を改善しようと試みた。

研究成果の概要 (英文) : DNA methylation of cytosine is known to be one of the signals for cancer. The detection and quantification of methylcytosines have the possibility of leading to genetic diagnosis technology for prediction of cancer. Bisulfite sequencing is very famous method for detecting methylcytosines, which has problem in quantity of final methylation because of the reaction of DNA with high concentration of bisulfite at higher acidity and higher temperature. To develop the quantification, milder reaction was performed on DNA with low concentrations of reagents at lower acidity and lower temperature.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：ゲノム化学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：核酸、癌、ゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

DNA 配列の変化を伴うことなく後天的な DNA 修飾に起因するエピジェネティック的な遺伝子発現制御機構の研究が急速に進められており、癌などの疾患に対する診断や治療

への展開が待望されている。癌抑制遺伝子を不活性化する重要な機構として、遺伝子の転写調節領域に多く存在する CpG アイランドのシトシンのメチル化が知られている。シトシンのメチル化は発癌の一つのシグナルと見

なされ、その検出定量は、発癌を予測する遺伝子診断技術へと応用展開が期待される。メチル化シトシンの検出法は、亜硫酸水素ナトリウムを用いるバイサルファイト・シーケンシング法が一般的である。この方法は、DNAを亜硫酸水素ナトリウムで処理すると、一本鎖中のシトシンはウラシルに変換されるが、5-メチルシトシンは反応しないというシトシンに特異的な化学反応を利用している。その後のPCRによりメチル化依存的に、増幅産物の配列がCからTへと変換し、シーケンシングにより判別できる。この方法では、1) 化学反応率と2) 特異性 (C→T への変異) が課題となる。バイサルファイト法では、ウラシル-アデニン塩基対形成のため、特異性は充分であるものの、反応率を上げるために、ゲノムDNA一本鎖に融解した後、高温、酸性条件下、高濃度の亜硫酸水素ナトリウムと反応させる必要がある。その結果、反応後に回収されるDNA量が極端に低下するため、その増幅産物で評価したメチル化の割合がゲノムのメチル化を定量的に反映しているかどうか問題視されている。

## 2. 研究の目的

本研究で、DNAのメチル化シトシンの検出法として一般的なバイサルファイト・シーケンシング法の、定量性を格段に向上させることを目指した。一本鎖DNAをヒドロキシルアミン存在下で、低濃度のバイサルファイトと反応させることによって、0 °Cという低温でもシトシンが高い反応率で、ウラシル誘導体に変換されること、また、このウラシル誘導体が中性条件下で安定であること、5-メチルシトシンでは、同じ条件下で反応が進行しないことを確認していた。このヒドロキシルアミン存在下のバイサルファイトの反応を用いることにより、ゲノムDNAを一本鎖に融解後、温和な反応条件において(1) 化学反応率の大幅な向上によりDNAの損失を抑えることができるのではないかと考えた。また、このウラシル誘導体は、ウラシルと同じくアデニンと完全な水素結合の形成が可能であり、(2) PCRにおける取り込み塩基の特異性を満たすのではないかと期待した。適切な試薬、酵素、条件の選択により、この上記2点を達

成できれば、バイサルファイト・シーケンシング法の課題である定量性を格段に向上させることができるのではないかという着想に至った。

## 3. 研究の方法

研究目的を下記(1)及び(2)のフィードバックにより達成する。

(1) シトシンと温和な条件下で反応が進行する試薬や触媒試薬の探索

バイサルファイト反応時、ヒドロキシルアミンの劇的な加速触媒効果が認められた。ヒドロキシルアミン以外にも、バイサルファイトと共存させた時に、反応の触媒として作用する試薬、脱アミノ化の触媒として作用する試薬等を検討する。特に、脱アミノ化の触媒として作用する適切な試薬の発見は、シトシンを即座にウラシルに変換できる優れた方法を提供する。

(2) ウラシル誘導体対面への特異的塩基取り込み

ウラシル誘導体の対面にPCRにおいて取り込まれる塩基の特異性を確認する。ウラシル誘導体では、アデニンとの相補的な水素結合形成が期待されるため、ウラシル同様アデニンが特異的に取り込まれることが期待される。さらに、特異性の向上を目指してヒドロキシルアミンやPCRに用いるポリメラーゼの最適化を行う。

## 4. 研究成果

シトシン塩基のみと温和な条件下で反応が進行する試薬や触媒試薬の探索を行うことにより、バイサルファイト・シーケンシング法における、定量性を格段に向上させる方法の開発を目指し、下記の結果を得た。なお、得られた結果は、後述の国際論文、学会で報告した。

本研究において、一本鎖DNA中のシトシン(C)が、ヒドロキシルアミン存在下でバイ

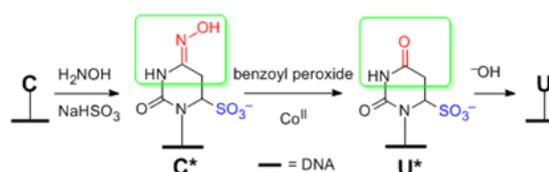


図1 DNA中におけるCからUへの変換

サルファイトと pH 6.0、0 °C において、高効率でシトシンオキシムスルホネート (C\*) に変換された。このとき 5-メチルシトシン (<sup>5m</sup>C) は同反応条件で未反応であった。これらの結果から、C\*をさらにウラシルスルホネート (U\*) に変換することにより、C からウラシル (U) への変換が期待された。デオキシシチジン (dC) のオキシムスルホネート誘導体 (dC\*) は、過去に報告例があるが、その後のウラシルスルホネート体 (dU\*) への報告はない。シンプルなケトオキシムからケトンへ変換する際の反応試薬を参考に、二価コバルト (Co<sup>II</sup>) 存在下で過酸化ベンゾイル (BPO) との反応により、一本鎖 DNA における C\*から U\*への選択的な変換とそれに続く U への変換を導いた (図 1)。

11 塩基配列の一本鎖オリゴヌクレオチド ODN1C, 5' -d(TAA ACG GAA AT)-3' をヒドロキシルアミン存在下でバイサルファイトと反応させることにより、ODN1C\*, 5' -d(TAA AC\*G GAA AT)-3' を得た。この ODN1C\*は、C6 位に対する 2つのジアステレオマーを含む。100 mM の塩化ナトリウムと 1 mM 塩化コバルト (II) を含有する 5%アセトニトリル 95%カゾジル酸バッファー (10 mM, pH 7.0) 中で、ODN1C\* (25 μM) を用事調整の BPO (250 μM) と 40 °C で 10 分間反応させた。HPLC プロファイルからは、反応がほとんど進行していないように見えるが、MALDI-TOF MS の結果から、生成物 ODN1U\*を確認できた。この ODN1U\*は、ODN1C\*

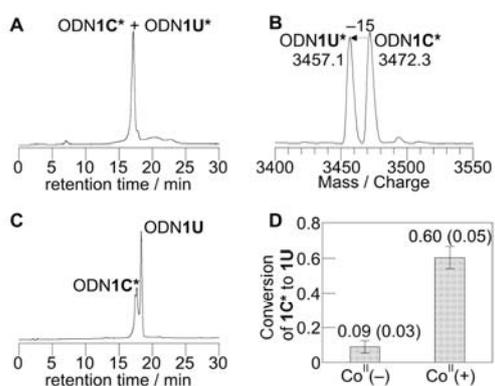


図 2 ODN1C\*から ODN1U への変換におけるマススペクトルと HPLC プロファイル

と HPLC では分離できなかったが、そのままさらに、ODN1U\*を 20 mM の水酸化ナトリウムと 25 °C で 10 分間反応させた。生成物を HPLC で分離し、MALDI-TOF MS により、ODN1Uであることを確認した。この結果から、Co<sup>II</sup> と BPO、続く水酸化ナトリウムとの反応により、ODN1C\*は、ODN1U\*を経由して ODN1U まで変換できた。一本鎖 DNA 中での BPO を用いた C\*から U\*への変換率は、Co<sup>II</sup> の存在下で 6 倍以上増加した。HPLC の結果より、C\*から U への変換率は非存在下では 9%、1 mM の Co<sup>II</sup> 存在下では 60%となった。長時間の反応 (1 時間) で変換率が増加した。C\*と Co<sup>II</sup>-BPO の反応について、さらに知見を得るために、ODN1C とバイサルファイトとの反応の際にメトキシヒドロキシルアミンを添加することにより、メトキシオキシムを含む ODN1C\*\*を得たのち、Co<sup>II</sup>-BPO との反応を調べた。ODN1C\*とは対照的に、ODN1C と ODN1C\*\*は Co<sup>II</sup>-BPO とは反応しなかった。このことは、C\*のヒドロキシル基が Co<sup>II</sup>-BPO との反応で不可欠な役割を果たすことを示している。ヌクレオシドに対する Co<sup>II</sup> の UV 滴定により、dC\*のときのみ選択的に Co<sup>II</sup> が吸収変化を示し、dC\*\*や他のヌクレオシドでは、吸収変化はみられない。Co<sup>II</sup> によって反応が 6 倍加速されることと Co<sup>II</sup> の滴定によって吸収変化があることから、Co<sup>II</sup> は C\*のヒドロキシル基に配位している可能性が高く、その後 BPO による酸化が Co<sup>II</sup> に配位した C\*で起こる。このことは、一本鎖 DNA で C\*から U\*への選択的な変換をするというこ

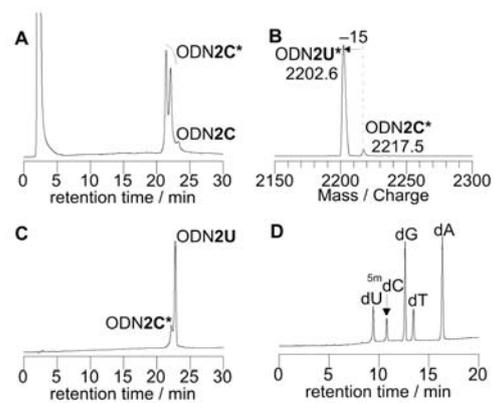


図 3 ODN2C\*から ODN2U への変換におけるマススペクトルと HPLC プロファイル

とに対する説明としてもっともらしいと考えられる。

次に、C から U への変換を CpG と <sup>5m</sup>CpG アイランドを含むモデルオリゴマーを用いて行った。順に(1)バイサルファイト-ヒドロキシルアミン、(2)Co<sup>II</sup>-BPO、(3)水酸化ナトリウムと反応させた。7塩基配列の一本鎖 DNA、ODN2C、5'-d(A<sup>5m</sup>CGACGT)-3' を用い(1)により ODN2C\*, 5'-d(A<sup>5m</sup>CGAC\*GT)-3' を2つのジアステレオマーとして得た。それぞれのジアステレオマーを(2)と 40 °C で1時間反応させた。それぞれの ODN2C\*ジアステレオマーから生成した ODN2U\*を MALDI-TOF MS で確認した。HPLC 上では、副生成物は見られなかった。続いて ODN2U\*を(3)と反応させることにより、ODN2U が得られたことを MALDI-TOF MS と酵素分解によりヌクレオシドを分析することにより確かめた。ヌクレオシドの成分 (2×dG, 2×dA, 1×dT, 1×dU, 1×<sup>5m</sup>dC) は、ODN2U そのものであり、元の ODN2C とは異なることを確認した。酵素分解により、ODN2C\*から ODN2U までの収率は 81%と算出した。

前述の(1)~(3)までの反応により、C から U までの変換に成功した。この方法により 5mC を検出するには、2つの大きな問題の可能性があり、1つめは、ゲノム DNA の融解についてであり、1段階目の反応で C から C\*への変換は非常に穏やかな条件で進行するにもかかわらず、ゲノム DNA の融解には適さないということである。2つめは、(2)の反応におけるグアニンの酸化損傷である。二重鎖 DNA の(2)による酸化は 5'-GG-3' の 5'側の G の位置で HOMO レベルが上がるために起こる。一本鎖 DNA では、(2)による G の酸化効率が下がる。G の酸化損傷を決定するために、ODN1C と(2)の反応で HPLC プロファイルを慎重に調べたが、明確な生成物は確認できなかった。ODN1C と(2)の反応後に MALDI-TOF MS で確認したが、可能性のある酸化物 8-oxo-G の混在は見られなかった。ODN2U は、ODN2C\*から(2)、(3)の反応により 81%生成し、その後の酵素分解によっても酸化グアニンの存在は確認できなかった。これらの実験結果から、C\*が U\*に変換する際の反応においてグアニンの酸化は少なくともマイナーな反応である。

dC\*が見つけれられてから 30年経過するが、一本鎖 DNA 中での C\*から U\*への変換に初めて成功し、その後 U へと至ることを確認した。C から U への C\*を経由する変換は、DNA 中のすべての C が変換する間 G は酸化されない場合 <sup>5m</sup>C シーケンシングに代わる可能性がある。C\*から U\*への変換において G の酸化損傷の可能性を防ぐためには、他の条件、試薬の探索が必要かもしれない。今回見つけた C から U への変換は、DNA に損傷を与えないより効率的な変換を可能とする新しい試薬の探索を促すものと考えられる。

#### 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3件)

- ① Yoshimi Oka, Fumie Takei, Kazuhiko Nakatani  
“Transformation of cytosine to uracil in single-stranded DNA *via* their oxime sulfonates”  
*Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3378-3380.  
(査読有)
- ② Yoshimi Oka, Tao Peng, Fumie Takei, Kazuhiko Nakatani  
“Synthesis and reaction of DNA oligomers containing modified cytosines related to bisulfite sequencing”  
*Org. Lett.* **2009**, *11*, 1377-1379. (査読有)
- ③ Yoshimi Oka, Fumie Takei, Kazuhiko Nakatani  
“Reaction of cytosine with bisulfite and hydroxylamine”  
*Nucleic Acids Symposium* **2009**, *53*, 215-216. (査読無)

[学会発表] (計2件)

- ① Yoshimi Oka, Fumie Takei, Kazuhiko Nakatani  
“Transformation of cytosine to uracil in single-stranded DNA *via* their oxime sulfonates”  
Post 5th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, 2010年6月11日, 大阪
- ② Yoshimi Oka, Fumie Takei, Kazuhiko Nakatani  
“Reaction of cytosine with bisulfite and hydroxylamine”  
The 6th International symposium on

Nucleic Acid Chemistry, 2009年9月28  
日, 高山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 芳美 (YOSHIMI OKA)  
富山大学・事務局・特命助教  
研究者番号: 30470115

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: