

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02457

研究課題名（和文）メチル化CpG結合蛋白質による等温DNA増幅反応阻害機構の解析およびその応用

研究課題名（英文）Analysis of the methylated CpG-binding protein-mediated inhibition mechanism of isothermal DNA amplification and its application

研究代表者

藤田 敏次 (Fujita, Toshitsugu)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10550030

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,400,000円

研究成果の概要（和文）：細胞の分化や増殖、がんなどの難治性疾患の発症に特定ゲノム領域のCpGメチル化が関与することがよく知られている。本研究では、等温DNA増幅反応であるRecombinase Polymerase Amplification (RPA) 法にメチル化CpG結合蛋白質を添加することで、バイサルファイト処理を必要とせずより簡便に短時間で鋳型DNAのCpGメチル化の有無を検出できる技術を開発した。また、メチル化CpG結合蛋白質によるRPA反応阻害様式を解析するとともに、ゲノムワイドな阻害効果も解析した。さらに、従来法と一線を画す、高速・高精度なリアルタイムCpGメチル化判定技術の技術基盤の確立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、バイサルファイト処理を必要とせずに、超高速・高精度にCpGメチル化を判定できる技術の開発に成功しており、分子生物学・医学分野でのCpGメチル化解析が飛躍的に進むとともに、CpGメチル化を指標とした癌細胞の検出技術として、医療分野への貢献も期待される。本研究成果は、多種類のエピジェネティック修飾を解析する技術に発展する可能性を秘めており、エピジェネティクス分野での波及効果が非常に高い。

研究成果の概要（英文）：CpG methylation in specific genomic regions is involved in cell differentiation and proliferation, as well as in the onset of intractable diseases such as cancer. In this study, we combined the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) method, which is an isothermal DNA amplification reaction, with methylated CpG-binding proteins to establish a bisulfite treatment-free, rapid, and simple method for evaluation of the CpG methylation status in template DNA. We also examined in detail the inhibition mode of the RPA reaction with methylated CpG-binding proteins, as well as the inhibitory effect on genome-wide scale. We also succeeded in establishing a rapid and accurate real-time CpG methylation evaluation technology.

研究分野：分子生物学

キーワード：メチル化DNA RPA 等温増幅反応 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

細胞の分化や増殖、また、がんなどの難治性疾患の発症に、特定ゲノム領域の CpG のシトシンのメチル化 (CpG メチル化) が深く関与することがよく知られている。とりわけ、多くのがんにおいて、癌抑制遺伝子のプロモーター領域の CpG が高度にメチル化されることで、遺伝子発現が抑制されることが古くから知られており (Esteller, *Oncogene*, 2002, 21, 5427-5440)、CpG メチル化を指標とした癌細胞の検出は、医学・臨床検査分野で注目されている。

CpG メチル化を検出するための鋭敏で特異性の高い技術として、バイサルファイト処理 (重亜硫酸塩処理) した DNA を鋳型とした PCR 法 (メチル化特異的 PCR 法) が広く用いられている。バイサルファイト処理によって、非メチル化シトシンはウラシルに変換され、メチル化シトシンはシトシンのまま維持されるため塩基配列に差異が生じる。そこで、塩基配列差異 (ウラシルまたはシトシン) が生じた領域に相補的なプライマーを用いたメチル化特異的 PCR 法を行うことで、標的 DNA 領域の CpG メチル化の有無を区別することができる (Herman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 9821-9826)。メチル化特異的 PCR 法以外にも、DNA シーケンス解析や制限酵素処理を用いた検出法等も利用されているが (Sommer Kristensen and Lotte Hansen, *Clin. Chem.*, 2009, 55, 1471-1483)、感度・コスト・時間の点では PCR 法が優れているため、メチル化特異的 PCR 法が臨床検査や研究現場で広く利用されている。

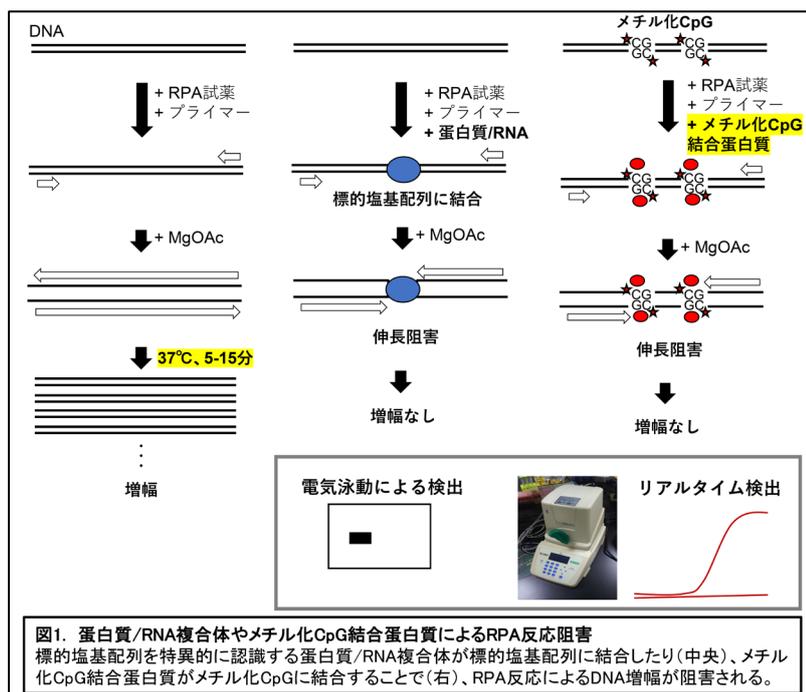
メチル化特異的 PCR 法は、検出感度の点で優れた方法であるが、次のような問題も指摘されている: (A) バイサルファイト処理後の配列に対するプライマーのデザインにノウハウを要する。 (B) プライマーのアニーリング温度に鋭敏に影響を受けやすく、偽陽性や偽陰性も多い。 (C) バイサルファイト処理に一般的に 4 時間以上の時間を要する。 (D) バイサルファイト処理は DNA を損傷するため、PCR 増幅に影響が出る。とりわけ、ホルマリン固定パラフィン包埋された組織検体から抽出した DNA や、血中に微量に存在するセルフリー DNA は既に DNA が断片化されており、そうした DNA を鋳型とする場合に DNA 損傷は大きな問題となる。

もし、バイサルファイト処理を必要とせず、より簡便に短時間で CpG メチル化を区別する検出法ができれば、分子生物学・医学分野での CpG メチル化解析がさらに進むとともに、CpG メチル化を指標とした癌細胞の検出技術として医療分野での利用も期待される。

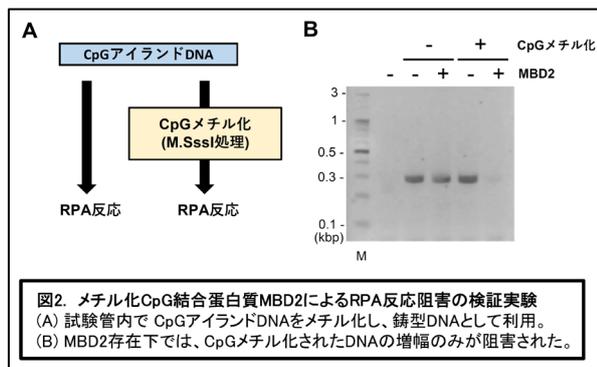
これまでに研究代表者は、メチル化特異的 PCR 法を利用することで、特定ゲノム領域における CpG メチル化状態を解析してきた (Fujita et al., *Sci. Rep.*, 2018, 6, 30485; Shimizu et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21, 5119)。また、これとは別に、等温 DNA 増幅反応である Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法を用いることで、遺伝子変異を検出する研究手法の開発に取り組んできた。RPA 法は、37°C 等温で、5~15 分程度の短時間で標的 DNA を増幅できる技術である (Piepenburg et al., *PLoS BIOLOGY*, 2006, 4, e204; Lubato and O'Sullivan, 2018, *TrAC*, 98, 19-35) (図 1 左)。近年、研究代表者は、RPA 法が、多くの蛋白質の至適温度である 37°C という反応温度を利用している

点に着目し、配列特異的に標的塩基配列に結合する蛋白質/RNA 複合体を RPA 反応液に添加することで、蛋白質/RNA 複合体の標的塩基配列を含む DNA 領域の増幅が阻害される (DNA ポリメラーゼ伸長が阻害される) 現象を発見した (図 1 中央)

(藤田敏次、藤井穂高、特許申請)。さらに、メチル化 CpG 結合蛋白質 MBD2 を RPA 法に添加することで、メチル化 CpG を含む DNA 領域の増幅が阻害される現象を発見し、MBDi-RPA 法と名付けた (図 1 右、図 2)。



研究代表者は、これまでの結果から、RPA法とメチル化 CpG 結合蛋白質 MBD2 を組み合わせることで、バイサルファイト処理を必要とせず、より簡便に短時間で鋳型 DNA の CpG メチル化の有無を区別できる高速・高精度な CpG メチル化判定技術の開発ができることを着想した。一方、MBD2 の RPA 反応阻害様式についてはこれまで研究されていない。



2. 研究の目的

本研究では、メチル化 CpG 結合蛋白質 MBD2 による RPA 反応阻害様式を詳細に解析するとともに、ゲノムワイドな RPA 反応における MBD2 の阻害効果についても解析する。さらに、他のメチル化 CpG 結合蛋白質による RPA 反応阻害効果や、他の等温 DNA 増幅反応阻害効果についても検討する。以上の解析を通して、MBD2 (及び他のメチル化 CpG 結合蛋白質) と等温 DNA 増幅反応を組み合わせた、従来の CpG メチル化検出技術と一線を画す、超高速・高精度な CpG メチル化判定技術の技術基盤を確立する。

3. 研究の方法

本申請では、特定 DNA 領域の増幅における MBD2 の RPA 反応阻害様式を明らかにするとともに、ゲノムワイドな DNA 増幅について評価した。また、MBD2 を用いた実験をもとに、他のメチル化 CpG 結合蛋白質が MBD2 と同様の作用機序によって RPA 法を阻害するか評価した。さらに、RPA 反応以外の等温 DNA 増幅反応における MBD2 (及び他のメチル化 CpG 結合蛋白質) の影響についても評価した。具体的には、以下の方法で研究を進めた。

(1) メチル化 CpG 結合蛋白質 MBD2 の RPA 反応阻害機序の解析

RPA 試薬は TwistDx 社から購入し、精製 MBD2 蛋白質はタカラバイオ社から購入した。鋳型 DNA は、CpG 部位を 1 カ所、2 カ所、5 カ所、10 カ所、20 カ所もつ塩基配列を人工 DNA 合成で準備し、CpG メチラーゼ M.ssI で人工的に CpG メチル化した。一般的な RPA 反応条件で反応させた際、CpG 部位が何個の場合に、MBD2 がメチル化 DNA の増幅を抑制するか評価した。さらに、反応温度などを変化させることで、CpG 部位と MBD2 による阻害効果の相関関係を詳細に解析した。

(2) 他のメチル化 CpG 結合蛋白質 MeCP2 やメチル化 CpG 認識抗体による RPA 反応阻害の検討

MBD2 以外のメチル化 CpG 結合蛋白質として、MeCP2 やメチル化 CpG 認識抗体を購入した。本工程では、(1) と同様の実験を行うことで、これら蛋白質も RPA 反応阻害効果を示すか評価するとともに、その阻害様式についても解析した。

(3) ゲノムワイドな RPA 反応におけるメチル化 CpG 結合蛋白質の阻害効果の解析

CpG 非メチル化ヒトゲノム DNA および CpG メチル化ヒトゲノム DNA をタカラバイオ社から購入した。この製品を用いて、次世代シーケンス (NGS) 解析用のゲノム DNA ライブラリーを作製した。このライブラリーを鋳型とし、研究方法 (1) (2) の解析結果をもとに MBD2 や MeCP2 存在下で RPA 反応を行い、増幅した DNA を NGS 解析した。さらに、HCT116 細胞から抽出したゲノム DNA を材料とし、MBD2 や MeCP2 存在下で RPA 反応を行い、増幅した DNA を NGS 解析した。以上を通して、ゲノムワイドな RPA 反応におけるメチル化 CpG 結合蛋白質の阻害効果を解析した。

(4) 高速・高精度な CpG メチル化判定技術の技術基盤の確立

標的 DNA 領域の CpG メチル化を判別するための、高速・高精度な CpG メチル化判定技術の確立を目指した。具体的には、リアルタイム蛍光検出によって DNA 増幅をモニタリングできる検出系を確立するとともに、CpG 非メチル化ヒトゲノム DNA および CpG メチル化ヒトゲノム DNA を用いて、CpG メチル化度合いを定量的に検出できる実験系を構築した。

(5) 他の等温 DNA 増幅反応におけるメチル化 CpG 結合蛋白質の影響の解析

30°C等温 DNA 増幅反応として、phi29 DNA ポリメラーゼを用いた方法が知られている。phi29 DNA ポリメラーゼを用いた CpG メチル化 DNA 増幅反応が、メチル化 CpG 結合蛋白質存在下で阻害されるかどうか検討した。反応時間やメチル化 CpG 結合蛋白質の添加量などを変化させながら阻害効果について解析した。

4. 研究成果

(1) メチル化 CpG 結合蛋白質 MBD2 の RPA 反応阻害機序の解析

CpG 部位を 1 カ所、2 カ所、5 カ所、10 カ所、20 カ所もつ鑄型 DNA を用意し、試験管内で CpG メチル化した (図 3A、B)。MBD2 を用いた MBDi-RPA 法を行ったところ、20 カ所の CpG 部位がメチル化されている場合、DNA 増幅が抑制されることがわかった (図 3C)。至適反応温度を検討した結果、37°Cであった。

(2) 他のメチル化 CpG 結合蛋白質 MeCP2 やメチル化 CpG 認識抗体による RPA 反応阻害の検討

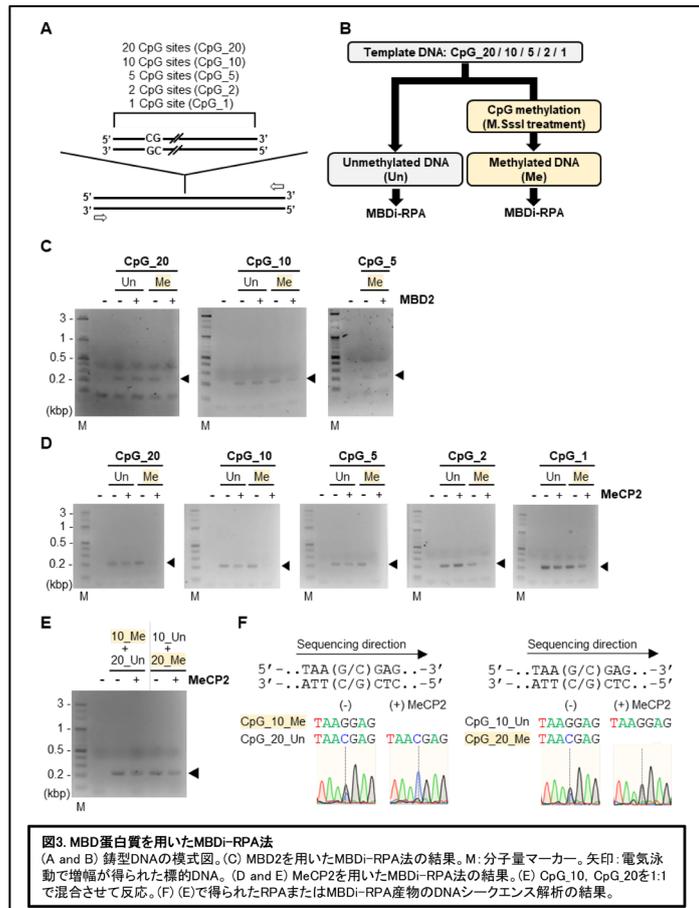
メチル化 CpG 結合蛋白質には MBD2 を含む 7 つのファミリー蛋白質が知られている。他のファミリー蛋白質である MeCP2 を用いて、MBD2 と同様の実験を行った。MeCP2 を用いた MBDi-RPA 法の結果、37°Cにおいて、僅か 2 カ所の CpG 部位がメチル化されている場合でも DNA 増幅が抑制されることがわかった (図 3D)。さらに、CpG を 10 カ所あるいは 20 カ所もつ鑄型 DNA を混合し、MBDi-RPA 法を行ったところ、CpG がメチル化された鑄型からの DNA 増幅のみが抑制されることも判明した (図 3E、F)。次に、メチル化 CpG 認識抗体を用いて同様の実験を行った。同じ反応条件で実験を行ったが、検討したメチル化 CpG 認識抗体では、明瞭な DNA 増幅抑制は見られなかった。以上の結果から、MeCP2 を用いた MBDi-RPA 法は、MBD2 を用いた MBDi-RPA 法よりも、より少数の CpG メチル化を精度よく区別できることが判明した。

(3) ゲノムワイドな RPA 反応におけるメチル化 CpG 結合蛋白質の阻害効果の解析

CpG 非メチル化ヒトゲノム DNA およびメチル化ヒトゲノム DNA を用いて、NGS 解析用のゲノム DNA ライブラリーを作製した。このライブラリーを鑄型とし、MBD2 あるいは MeCP2 を用いた MBDi-RPA 反応を行い、増幅した DNA を NGS 解析することで、ゲノムワイドな MBDi-RPA 法の条件検討を行った。次に、HCT116 ゲノム DNA を用いて同様の実験を行った結果、特定の CpG メチル化 DNA 領域において、DNA 増幅抑制の傾向がみられた。この結果から、MBD2 あるいは MeCP2 を用いた MBDi-RPA 法を用いることで、ゲノムワイドに CpG メチル化 DNA 領域を解析できる可能性が示唆された。

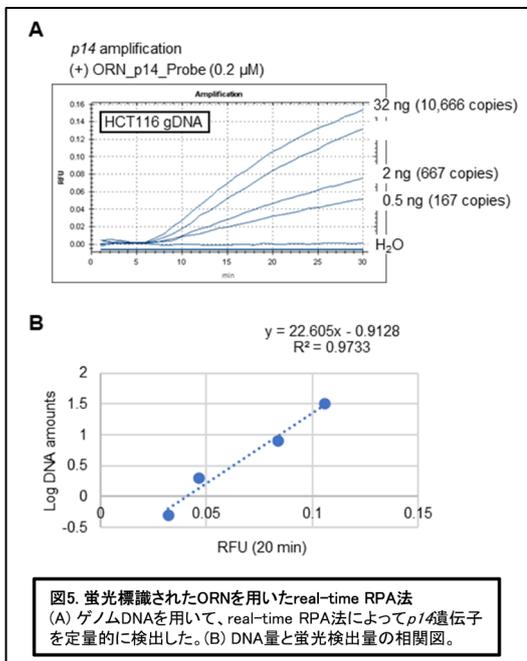
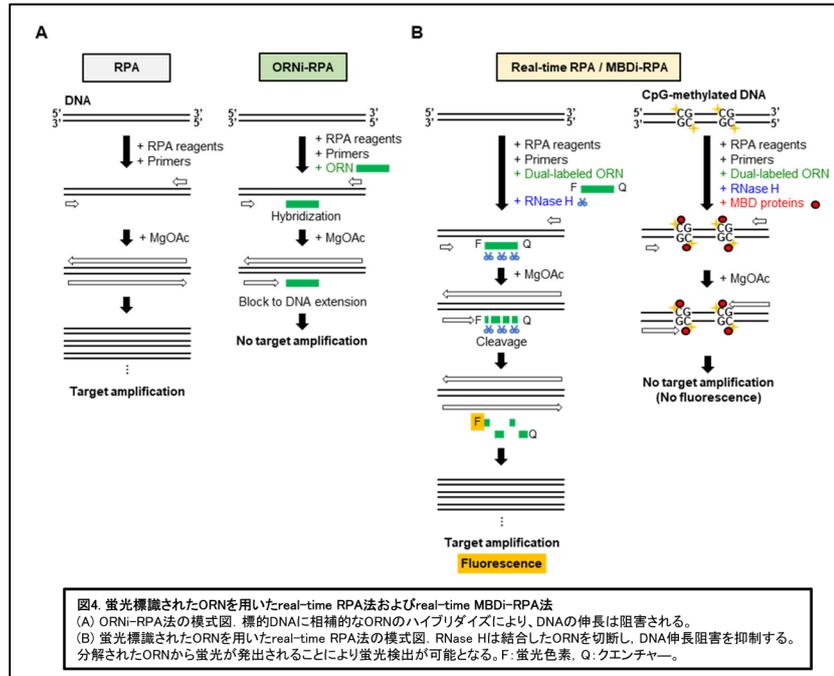
(4) 高速・高精度な CpG メチル化判定技術の技術基盤の確立

これまでの研究から、標的 DNA に相補的なオリゴヌクレオチド (ORN、短鎖 RNA) を RPA 反応に添加しておくこと、ORN が標的 DNA にハイブリダイズすることを発見している (ORNi-RPA、図 4A)。そこで、蛍光標識した ORN と RNase H を反応液に添加しておくことで、ハイブリダイズした ORN が切断され、蛍光の発出によって DNA 増幅を評価できる技術を着想した (図 4B 左)。モデル DNA を用いて本実験系を検討したところ、本技術が実用可能であることが判明した。さらに、ゲノム DNA を用いた実験で、反応液中のゲノム DNA の定量的な検出が可能であることが判明した (図 5)。



これまでの RPA 法はアガロースゲル電気泳動による DNA 増幅判定を行っていたが、本技術 (real-time RPA 法) は電気泳動を必要としない。本技術は、DNA 検出時間を大幅短縮するとともに、反応液中の鋳型 DNA 量を定量的に解析できる画期的な方法である。

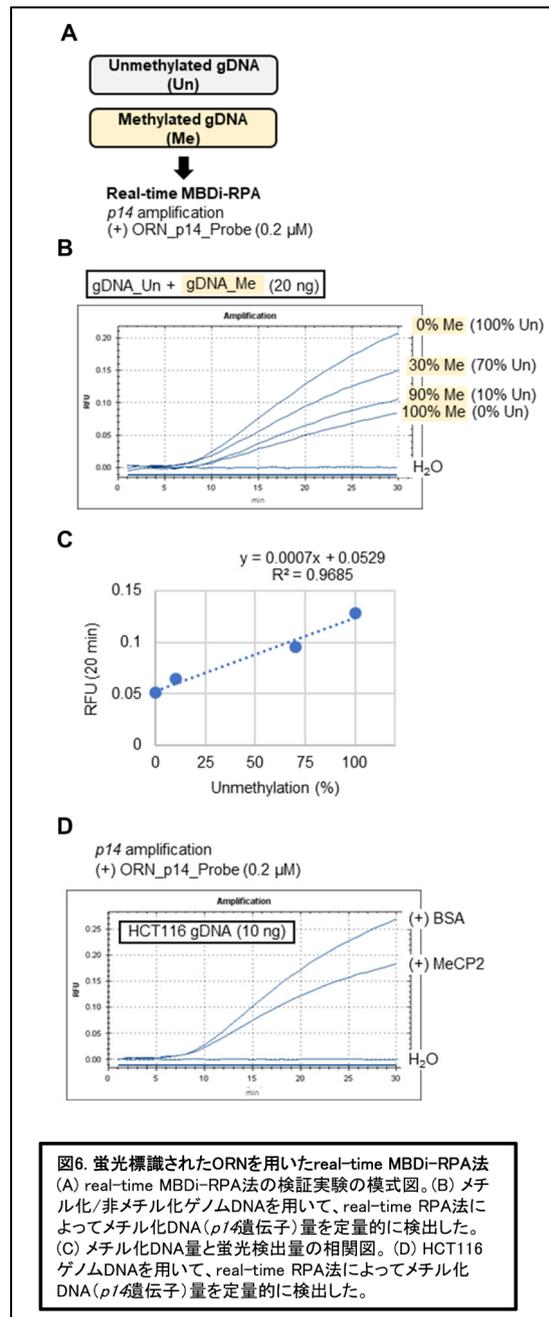
次に、real-time RPA 法を標的 DNA 領域の CpG メチル化判別に応用した。CpG 非メチル化ヒトゲノム DNA およびメチル化ヒトゲノム



DNA を用いて実験を行った結果、反応液中のメチル化 DNA の定量的な検出が可能であることが判明した (図 6A-C)。また、HCT116 細胞ゲノム DNA を用いた実験でも、標的 DNA 領域の CpG メチル化を定量的に判断できることが判明した (図 6D)。以上のように、本研究によって、高速・高精度な CpG メチル化判定技術の技術基盤を確立した (Ishidoya et al., Anal. Chim. Acta, 2024, 1302, 342486)。

(5) 他の等温 DNA 増幅反応におけるメチル化 CpG 結合蛋白質の影響の解析

phi29 DNA ポリメラーゼを用いた 30°C等温 DNA 増幅反応において、MBD2 および MeCP2 を添加することで CpG メチル化 DNA 増幅反応が阻害されるかどうか同様に検討を進めた。現在、反応条件の至適化等の実験を進めている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ishidoya Mina, Fujita Toshitsugu, Tasaka Sadatomo, Fujii Hodaka	4. 巻 1302
2. 論文標題 Real-time MBDi-RPA using methyl-CpG binding protein 2: A real-time detection method for simple and rapid estimation of CpG methylation status	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 342486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aca.2024.342486	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田敏次、藤井穂高
2. 発表標題 蛋白質やリボヌクレオ蛋白質を利用したブロックRPA法の開発および応用
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田敏次、藤井穂高
2. 発表標題 等温DNA増幅法を応用したメチル化・非メチル化DNAの選別法の開発
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石戸谷美奈、藤田敏次、田坂 定智、藤井 穂高
2. 発表標題 MeCP2蛋白質を利用したRPA法によるCpGメチル化状態の判別
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~bgb/>

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	元岡 大祐 (Motooka Daisuke) (10636830)	大阪大学・微生物病研究所・講師 (14401)	

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
---------	---------