

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 12 日現在

機関番号：82626
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23710152
研究課題名（和文） ナノホールアレイを用いた表面プラズモン共鳴法によるメチル化 DNA の迅速検知
研究課題名（英文） DNA methylation analysis by surface plasmon resonance on a micro-hole array
研究代表者
栗田 僚二（KURITA RYOJI）
独立行政法人産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 主任研究員
研究者番号：50415676

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、抗メチルシトシン抗体を用いたシーケンス選択的なメチル化 DNA の迅速な検出に向けた検討を行った。シーケンス選択性を持たせるため、測定対象のメチルシトシンを DNA バルジ領域に配置させ、その後当該 2 本鎖 DNA と抗メチルシトシン抗体とのアフィニティを計測することにより実現させた。一例として、MGMT（癌と関係する遺伝子の 1 つ）のプロモーター領域のメチル化状態を 1 塩基レベルで迅速に検出することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We report the sequence-selective discrimination of the cytosine methylation status in DNA with anti methylcytosine antibody for the first time. This was realized by employing an affinity measurement involving the target methylcytosine in a bulge region and anti methylcytosine antibody, following hybridization with a bulge-inducing DNA to ensure that the only the target methylcytosine is located in the bulge. By employing the difference between the affinity in the bulge and that in the duplex, we could determine selectively whether or not the target cytosine was methylated in an O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) promoter sequence with a single base level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：DNA、メチルシトシン、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

現在、血液や尿などの体液中に含まれる各種生体成分を検出することは、病気の早期発見や診断、さらには治療方針を決定する上で極めて重要である。さらに、個人の遺伝子情報を取得することで、より適切な治療を行う試みが提案され、倫理面での議論は進んでいる。特に近年では、DNA のメチル化による後天的遺伝子発現の変化(エピジェネティクス)が、ガン等の疾患に関与していることが明らかになってきた。しかしながら、シーケンサーによって遺伝情報に関する膨大なデータベースは構築されるものの、その医療応用に関しては広く普及しているとは言い難い。この一因として、現場で誰にでも測定できるような簡便で洗練された DNA センサが無いことにある。特にエピジェネティクスに深く関与するシトシンのメチル化検出には、バイサルファイトシーケンシング法以外に有効な測定手法が確立されていない。

研究代表者は表面プラズモン共鳴 (SPR) 法に着目し、血液や尿中に含まれる生体分子を計測するマイクロセンシングチップの研究開発を行ってきた。(Kurita et al, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 5525; Kurita et al, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 9572)これは、従来の分析装置で汎用されてきた蛍光・吸光法では測定感度が光路長に大きく依存するためチップ上での検出に不向きな点があるのに対し、SPR 法は表面反応であるため、微小流路深さには影響されず、むしろ検出部分での目的分子の捕捉率が向上し、高感度に検出可能なためである。また、研究代表者らは上記の研究成果に対して、基礎的な研究活動と並行して特許を取得するとともに(栗田ら、特許 4517081 号:栗田ら、特許 4581128 号:栗田ら、特許 4487049 号)、デスクトップサイズの大型機器であった SPR 測定装置をベッドサイドに適した小型化に成功しており、総重量 800g 以下の新書本サイズの装置を開発し、患者のベッドサイドで計測可能なダウンサイズ化を達成している(2006年7月5日;日刊工業新聞)。さらに、近年では従来の Kretschmann 配置に比べ、より簡便に検出可能なナノ構造基板を利用した SPR 法の研究を行ってきた。このナノ構造によってプリズムを用いることなくプラズモンを共鳴をさせることが可能になり、さらに簡便・迅速に検出できる見込みを得ている。(Nakamoto and Kurita et al., *Proceeding of μ TAS2010*, (2010) 1967)

しかしながら、SPR 技術によってシトシンのメチル化状態を検出することは極めて困難であり、有効な報告例はない。これは、2 本鎖形成を SPR 法により測定した場合には、メ

チルシトシンもシトシンも同様にグアニンと水素結合を形成するために、屈折率変化を検知する SPR 法ではメチル基 1 つの差異を検出できないためである。一方、抗メチルシトシン抗体を用いたメチルシトシンとシトシンの識別手法が報告されている。しかしながら、対象 DNA 中に含まれるメチルシトシンの量的情報は取得可能であるものの、DNA 中のどの領域がメチル化されているのかを判断できない。メチルシトシンの検出は、総メチル化量よりも、特定遺伝子発現に関与する任意のプロモーター領域を選択的に検出することが、疾病診断応用に重要なのは言うまでもない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DNA のメチル化状態を迅速検知する新手法の提案、基礎特性評価及びデバイス化を行うことである。従来、抗体を用いる手法では DNA メチル化の量的情報は得られるものの、位置情報を得られなかったため利用価値が乏しかった。そこで、2 本鎖 DNA の“歪み”を利用した位置選択的な抗体認識による迅速計測に挑戦する。これにより、測定対象 DNA 中に含まれる任意領域の迅速な DNA メチル化センシングデバイス開発を目指す。

3. 研究の方法

測定対象となる DNA と 2 本鎖を形成する ssDNA を固定化する。この ssDNA シーケンスは、図 2(a)に示すような 1, 3, 5, 7 塩基バルジを形成する 2 本鎖 DNA 及び完全フルマッチの 2 本鎖 DNA を形成し、かつ測定対象のシトシン(もしくはメチルシトシン)がバルジ内に配置されるようにする。その後、抗メチルシトシン抗体、さらに西洋わさびペルオキ

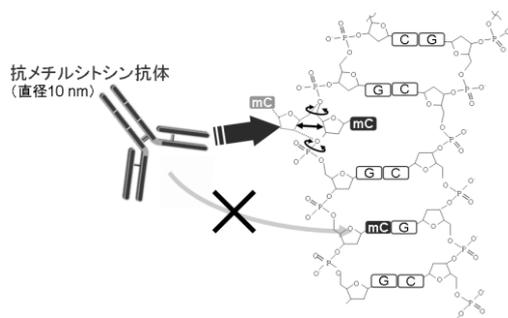


Fig. 1 Schematic of sequence-selective methylation analysis with an antibody in a target region and a non-target region. mC indicates methylcytosine. Methylcytosine in the bulge is recognized by the antibody owing to the rotation of the methylcytosine. In contrast, methylcytosine is not recognized in a hybridized region owing to the large antibody size.

シターゼを標識した2次抗体で検出を行った。

4. 研究成果

図 2(b) に各種大きさの DNA バルジを有する 2 本鎖 DNA 及び完全相補鎖の DNA に対する検量線を示す。完全相補鎖の DNA に対しては、2 本鎖の濃度の上昇に伴う抗体の結合量の増加は全く見られなかった。しかしながら、DNA バルジ内にメチルシトシンを有する 2 本鎖 DNA では、2 本鎖 DNA 濃度上昇に伴う抗体の結合が確認できた。これらの結果は、グアニンと塩基対を形成したメチルシトシンは抗体によって認識されないのに対し、DNA バルジ内に配置されたメチルシトシンは抗メチルシトシン抗体によって認識されることを明瞭に表している。完全相補鎖の DNA 中に含まれるメチルシトシンは全く検出されないのは、抗体の大きさが関与していると考えられる。抗体 (IgG) の分子量は概ね 150 kDa、直径は 10 nm 程度である。これは、2 本鎖 DNA の直径 2 nm に比べかなり大きい。この高さによって、DNA 2 本鎖の内側を向いたメチルシトシンは、全く認識されないと考えている。

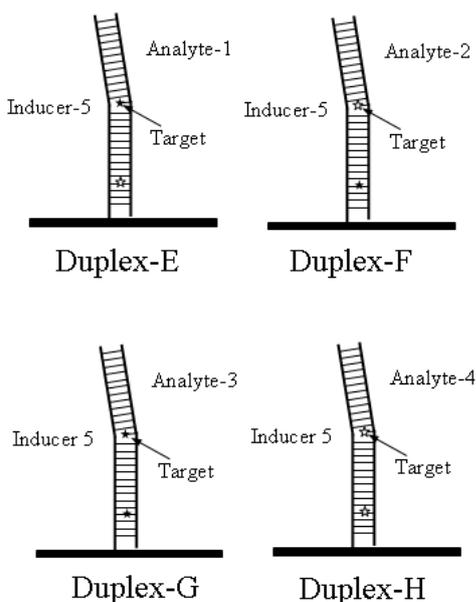


Fig.3 a) Schematics of duplex forms between Inducer-5 and Analyte-1~4. The filled star (★) indicates methylcytosine, and the open star (☆) indicates cytosine.

次に、2 本鎖 DNA 内に含まれる他のメチルシトシンの影響について調べた図 3(a) に本実験に用いた 2 本鎖 DNA の模式図を示す。Analyte 1~4 では、シーケンスはすべて同じだが、それぞれシトシンのメチル化パターンが異なる。Analyte-1 では測定対象のシトシン

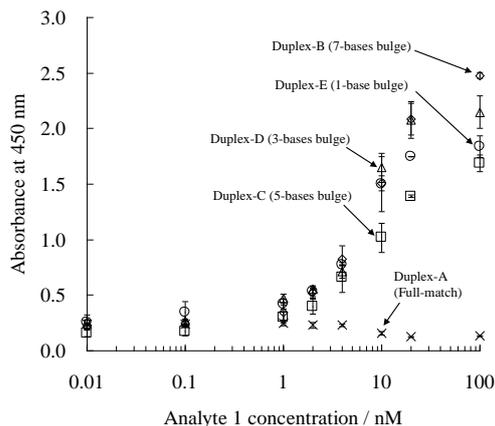


Fig. 2 (b) Calibration curves for Analyte-1 when the bulge size is varied. Methylcytosine is located in a 7-base (◇, Duplex-B), 5-base (□, Duplex-C), 3-base (△, Duplex-D) and 1-base (○, Duplex-E) bulge, respectively. In Duplex-A (×), methylcytosine is paired with guanine.

ンのみメチル化されており、他のシトシンはメチル化されていない。Analyte-2 では、測定対象のシトシンはメチル化していないが、非測定対象のメチルシトシンを含んでいる。Analyte-3 では、測定対象のシトシン及び非測定対象のシトシンがおのおのメチル化している。Analyte-4 にはメチルシトシンは含まれていない。図 3(b) に測定結果を示す。

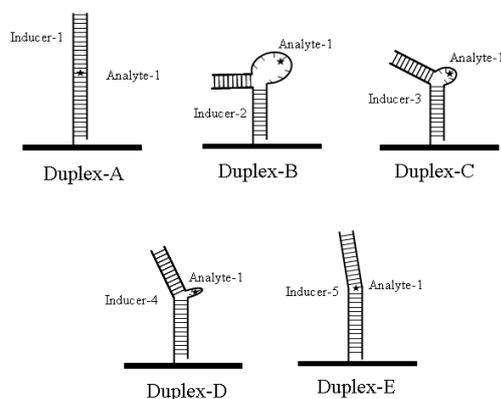


Fig. 2(a) Schematics of duplex forms between Analyte-1 and Inducer-1~5. Duplex-A forms a complementary full-match duplex. Duplex-B, C, D and E have 7, 5, 3, 1 base bulges in each duplex. The filled star (★) indicates the position of methylcytosine.

Analyte-1 および Analyte-3 では対象 DNA 濃度の増加に伴いシグナルの増加が確認された。一方、Analyte-2 および Analyte-4 ではシグナルの増加は見られなかった。これは Analyte-1 (Duplex-E) および Analyte-3 (Duplex-G) では、DNA バルジ内のシトシンが

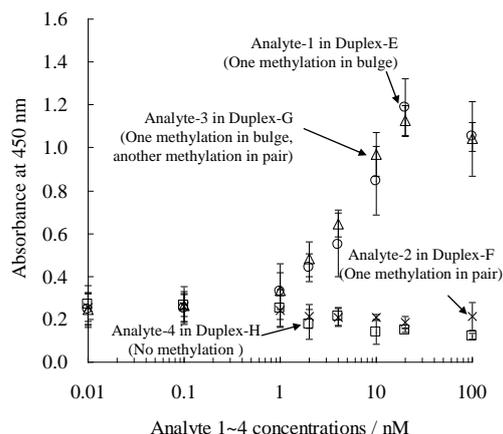


Fig.3 b) Calibration curves for fig.3 (a)

メチル化されているが、Analyte-2 (Duplex-F)およびAnalyte-4 (Duplex-H)ではDNA バルジ内のシトシンがメチル化されていないためである。重要なポイントとして、非測定対象のシトシンがメチル化されているAnalyte-2 (Duplex-F)ではシグナルの増加が見られなかったことである。理由は、上述したようにグアニンと塩基対を形成したメチルシトシンは抗体に認識されないためである。さらに、Analyte-1 (Duplex-E)とAnalyte-3 (Duplex-G)間では、ほぼ同等のシグナル強度が得られたことも重要である。これらの結果は、測定対象のシトシンがメチル化しているか否かを、非測定対象の影響を受けずに測定可能であることを明瞭に示している。これら結果は、DNA バルジを利用することによって、シーケンス選択的なメチルシトシンのイムノアッセイが可能であることを示唆している。

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 10 件)

- ① Ryoji Kurita and Osamu Niwa, DNA Methylation Analysis Triggered by Bulge Specific Immuno-Recognition, *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 7533-7538.
DOI: 10.1021/ac301702y
- ② Ryoji Kurita, Kumi Arai, Kohei Nakamoto, Dai Kato and Osamu Niwa, Determination of DNA Methylation using Electrochemiluminescence with Surface Accumulable Coreactant, *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 1799-1803.

[学会発表] (計 26 件)

- ① 栗田僚二、丹羽修、DNA バルジを利用したシーケンス選択的なメチルシトシン免疫測定法、電気化学会、2013年3月31日、東北大学(宮城県)
- ② Ryoji Kurita, Single methylation analysis in DNA by electrochemiluminescence and surface plasmon resonance, Pittcon2013, 2013年3月20日、Pennsylvania Convention Center Philadelphia(米国)
- ③ 栗田僚二、丹羽修、DNA バルジ特異的な抗体認識を利用したシトシンのメチル化診断、分析化学会、2012年9月19日、金沢大学(石川県)

[図書] (計 1 件)

栗田僚二、メチル化 DNA の迅速検出を目指して、化学とマイクロ・ナノシステム研究会誌、Vol. 12, No. 1 (2013), pp8-15

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：メチル化核酸検出法
 発明者：栗田僚二、加藤大、丹羽修
 権利者：同上
 種類：特許
 番号：特願 2011-098844
 出願年月日：平成 23 年 4 月 27 日
 国内外の別：国内

名称：メチルシトシン検出法
 発明者：栗田僚二、丹羽修
 権利者：同上
 種類：特許
 番号：特願 2013-051501
 出願年月日：平成 25 年 3 月 14 日
 国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等
http://unit.aist.go.jp/biomed-ri/biomed-nbd/member_kurita/kurita.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田 僚二 (KURITA RYOJI)
 独立行政法人産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 主任研究員
 研究者番号：50415676