

学位論文要旨

平成 26 年 1 月 8 日

学位申請者

高梨 健太

学位論文題目

メチル化DNAのピンポイント検出法の開発

学位論文の要旨

本研究では、特定のシトシンのメチル化状態をピンポイントで識別できる新規メチル化DNA検出法の開発を試みた。

DNAのメチル化は、シトシンの5位にメチル基が付加される酵素反応により生じ、メチル化された5-メチルシトシンは、遺伝子発現を不活性化させる原因の一つであることが知られている。シトシンのメチル化は、哺乳類などの脊椎動物の場合、シトシンとグアニンが隣接したCpG配列中のシトシンがメチル化される。CpG配列は遺伝子のプロモーター配列に多く存在し、プロモーター領域内のCpG配列が過剰にメチル化されると転写因子などの結合を阻害するため、遺伝子発現が不活性化される。従って、遺伝子内のCpG配列におけるメチル化状態を簡便に検出する方法が開発できれば遺伝子の発現状態を予測することができ、がんの早期発見、術後の予後診断など遺伝子診断技術への応用やiPS細胞、エピジェネティクスの基礎研究への貢献が期待できる。

DNAのメチル化、5-メチルシトシンを検出する方法は既にいくつか報告されているが、簡便性や迅速性、汎用性など様々な問題がある。現在、一般的に使用されているメチル化DNA検出法の多くは、バイサルファイト法に基づいた化学的なアプローチによる検出法である。バイサルファイト法は、ゲノムDNAを高濃度の亜硫酸水素ナトリウム(NaHSO_3)で長時間、高温で処理することで非メチル化シトシンをウラシルへと変換させる。このとき、シトシンのみがウラシルへと変換され、5-メチルシトシンではウラシルへと変換されないため、バイサルファイト変換後の非メチル化DNAとメチル化DNAの異なる配列情報を利用してシトシンのメチル化を検出することができる。例えば、バイサルファイト変換後のDNA配列を解読、または変換後の非メチル化DNA配列もしくはメチル化DNA配列に対して特異的に結合するPCRプライマーやプローブを用いてPCR増幅することでDNAのメチル化を検出することができる。

しかし、従来のバイサルファイト法は、CpG配列以外にゲノムDNA中の全てのシトシンを反応させるため、高濃度の亜硫酸水素ナトリウムで長時間、高温で反応する必要がある。高温による長時間の反応は、95%以上のゲノムDNAで非特異的な損傷が生じるため、 μg オーダーの大量のゲノムDNAが必要となり、メチル化状態を解析するまでに2,3日かかる。バイサルファイト反応よりもマイルドな条件下でスムーズに促進する新しい化学反応および検出法が開発できれば迅速なメチル化DNA検出法への利用が期待できる。また、全てのシトシンを反応させるのではなく、特定のCpG配列を効率的に修飾する方法が開発できれば、迅速かつ簡便なメチル化DNA検出への応用が期待できる。特定の塩基を効率的に修飾または切断できる新たな化学

修飾法の開発は、遺伝子工学などへの利用も期待できる。

シトシンと5-メチルシトシンのメチル基の有無による化学反応性の違いを利用した検出法がいくつか報告されているが、本研究では、従来法で使用されている亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミン(NH_2OCH_3)などのアミノオキシ化合物(NH_2OR)を併用した反応に着目した。

酸性条件下で亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンを用いてシトシンを反応させると6位のスルホ基の付加反応と4位のアミノ基転移反応が生じ、シトシン誘導体、N4-methoxy-5,6-dihydrocytosine-6-sulfonateが形成されることが報告されている。また、この化学修飾されたシトシン誘導体がDNAポリメラーゼによる相補鎖合成を阻害することも報告されている。この反応は、バイサルファイト法と同様に、シトシン特異的であり、5-メチルシトシンでは生じないことから、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンで処理したDNA鎖を鋳型にDNAポリメラーゼによる相補鎖合成を行えば、その阻害の有無を指標としたメチル基の識別が可能であると考えられる。

まず、シトシンまたは5-メチルシトシンを1カ所含む短いDNA鎖を亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンで反応した後、HPLCを用いて生成物の単離とMSを用いて質量分析を行った。シトシンを1カ所含むDNA鎖を亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンで反応した後、254 nmにおける吸光度をモニタリングし、HPLC分析した結果、新たに2つのピークが確認された。それぞれのピークを質量分析した結果、質量数の変化からシトシンの4位と6位にメトキシアミンとスルホ基が1つずつ付加されたN4-methoxy-5,6-dihydrocytosine-6-sulfonateを形成していることが推測される。また、新たに確認された2つのピークは同じ質量数であったことから、スルホ基の向きの違いによる異性体、ジアステレオマーであると考えられる。一方、5-メチルシトシンを1カ所含むDNA鎖では、反応後もHPLCによるピークは1つであり、質量数の変化は確認されなかった。この結果から、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによる反応は、シトシン特異的であり5-メチルシトシンとの化学反応性の違いを利用したメチル基の識別が可能であることが示された。

また、修飾後のシトシンまたは5-メチルシトシンを含むDNA鎖を鋳型にプライマー伸長反応を行った結果、修飾後のシトシンを含むDNA鎖でのみDNAポリメラーゼによるプライマーからの伸長反応の阻害が確認された。5-メチルシトシンを含むDNA鎖では、伸長反応の阻害は確認されなかった。この結果から、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンで化学修飾したDNA鎖を鋳型として、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成の阻害の有無を指標としたメチル基の識別が可能であることが示された。また、本研究で新たに*Taq* DNAポリメラーゼでも相補鎖合成の阻害が確認されたことから、PCR増幅の有無を指標とした簡便なメチル基識別法の可能性が示唆された。しかしながら、シトシンを複数カ所含む長い標的DNA配列で亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによる反応を行った場合、CpG配列以外にDNA鎖中の全てのシトシンが化学修飾されてしまい、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成の有無を指標としたメチル基の識別が困難であることが判明した。そこで、特定のCpG配列のみを選択的に反応する新たな一塩基選択的な化学修飾法の開発を行った。

特定の塩基を効率的に修飾する方法として、DNAプローブの末端などに反応性官能基を修飾した特殊なDNAプローブを利用した配列選択的な化学修飾法が知られている。しかし、反応性官能基を修飾したDNAプローブは、反応部位ごとに特殊なDNAプローブを合成する必要があり、コストや手間がかかる。そこで、特殊な合成DNAプローブを使わない新たな一塩基選択的な化学修飾法の開発を行った。本研究では、DNAの分岐構造であるThree-way junction (TWJ) 構造に着目した。

TWJ構造は、分岐点上にナノスケール、直径1.2 nmの疎水性ポケットを形成しており、コール酸などのステロイド化合物やコカインを認識して特異的に結合する分子認識素子として知られている。また、TWJ構造はY字型の分岐構造を形成しているため、分岐点上に位置する塩基はスタッキングされておらず、四酸化オスミウム(OsO_4)により分岐点上に位置するチミンが選択的に酸化・切断されることが報告されている。従って、標的DNA配列に対して部分的に相補鎖を形成する2つのDNAプローブを利用して、TWJ構造を形成させた標的DNAを亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンで反応させれば、分岐点上に位置するシトシンを選択的に修飾できると考えられる。

実際に、シトシンを12カ所含む56塩基の標的DNAに2つのDNAプローブを結合させ、TWJ構造

を形成させた後、分岐点上に位置するシトシンを亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンで選択的に反応できるか実験を行った。反応後の標的DNAにプライマーを結合させ、サイクリングプライマー伸長反応を行い、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、伸長反応の阻害部位を確認した結果、TWJ構造を形成するDNAプローブ存在下では、分岐点上にシトシンが位置するときのみ分岐点付近で伸長反応の阻害が確認された。また、分岐点以外の二本鎖を形成しているシトシンでの伸長反応の阻害はほとんど確認されなかった。TWJプローブ以外にミスマッチDNAプローブやバルジDNAプローブなど5種類のDNAプローブを用いて同様の実験を行った結果、分岐点上の塩基が全て塩基対を形成したフルマッチTWJプローブが最も特定の塩基をピンポイントで修飾、検出するのに適したDNAプローブであることが示された。

TWJプローブを利用することで特定のCpG配列をピンポイントで修飾でき、サイクリングプライマー伸長反応の有無によりメチル基を識別できたことから、PCR増幅の阻害を指標とした簡便なメチル基識別法への応用が期待できる。TWJプローブを用いて標的DNAを化学修飾した後、リアルタイムPCRを用いてメチル化を簡便に検出できるか実験を行った。リアルタイムPCRを用いて修飾後の標的DNAを鋳型に、ある一定量のPCR産物が増幅されるまでのサイクル数、Ct (threshold cycle) 値を測定した結果、分岐点がシトシンの時、Ct値が著しく上昇し、5-メチルシトシンと比べ有意な差を確認することができた。TWJプローブを利用することで配列解析を行わずにリアルタイムPCRのCt値から特定のシトシンのメチル化状態をピンポイントで簡便に解析できることが示された。

メトキシアミン以外のアミノオキシ化合物 (NH_2OR) であるエチルヒドロキシルアミン ($\text{R}=\text{CH}_2\text{CH}_3$) やイソブチルヒドロキシルアミン ($\text{R}=\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、カルボキシメチルヒドロキシルアミン ($\text{R}=\text{CH}_2\text{COOH}$)、アリルヒドロキシルアミン ($\text{R}=\text{CH}_2\text{CHCH}_2$) でも同様の反応性を示した。様々なアミノオキシ化合物で同様の反応性を示したことから、蛍光またはビオチン標識されたアミノオキシ化合物を利用することでPCR増幅以外の検出系への応用も期待できる。また、TWJプローブを利用した一塩基選択的な化学修飾法は、従来の反応性官能基を修飾した方法とは異なり、容易に様々な試薬で反応を試せるため、汎用性に優れていることが示唆される。

ヒトがん抑制遺伝子である *p16* 遺伝子や *RBI* 遺伝子の部分配列からなる様々な合成DNAを用いて同様の実験を行った結果、全ての配列、異なるCpG部位でシトシンのメチル化をピンポイントで識別することに成功し、高い汎用性が確認された。また、約30億塩基対からなるゲノムDNAでも1ヵ所のシトシンのメチル化状態をピンポイントで識別することに成功した。本検出法は、1ステップの短い反応で従来法よりも簡便かつ迅速に遺伝子のメチル化状態を解析できるため、遺伝子診断技術などへ利用が期待できる。また、DNAのメチル化検出以外に、TWJ分子を利用した一塩基選択的な化学修飾法は、特定の塩基を効率的に修飾または切断できるため、遺伝子組み換えや点変異解析など遺伝子工学への利用も期待できる。