

メチル化 DNA のピンポイント検出法の開発

高梨 健太

第 1 章 緒論	1
1-1 緒言	1
1-2 後天的な遺伝子制御機構	2
1-2-1 ヒストンの修飾	3
1-2-2 DNA のメチル化	3
1-3 エピジェネティクス変化およびメチル化 DNA と疾患の関連性	6
1-4 既知のメチル化 DNA 検出法	7
1-4-1 化学的なアプローチ法	8
1-4-1-1 バイサルファイト法	8
1-4-1-2 バイサルファイト法以外の化学的なアプローチ法	10
1-4-2 生化学的なアプローチ法	13
1-4-3 その他のアプローチ法	14
1-5 従来の合成 DNA プローブを用いた配列選択的な化学修飾法	14
1-6 DNA の高次構造を利用した一塩基選択的な化学修飾法	15
1-7 本研究の目的と意義	18
第 2 章 非メチル化シトシン特異的な化学修飾法の探索および検出法の確立	19
2-1 緒言	19
2-2 実験方法	20
2-2-1 試薬の調製	20
2-2-2 DNA 鎖の化学修飾	21
2-2-3 DNA 鎖の HPLC/MS 分析	22
2-2-4 プライマー伸長反応	22
2-2-5 マキサムギルバート法による A+G マーカーの調製	23
2-2-6 変性ポリアクリルアミドゲルの作製および泳動条件	24
2-3 結果及び考察	25
2-3-1 修飾前と修飾後の DNA 鎖における HPLC/MS 分析結果	25
2-3-2 修飾前と修飾後の DNA 鎖を鋳型としたプライマー伸長反応の比較	33
2-4 結言	37
第 3 章 DNA プローブを利用した一塩基選択的な化学修飾法の探索	38
3-1 緒言	38
3-2 実験方法	39
3-2-1 試薬の調製	39
3-2-2 TWJ プローブを用いた化学修飾	40
3-2-3 サイクリングプライマー伸長反応	41
3-2-4 様々な高次構造を形成する DNA プローブを用いた一塩基修飾法の比較	41
3-2-5 PCR 増幅によるメチル化 DNA の検出	42

3-3	結果及び考察	43
3-3-1	TWJ 構造を用いた一塩基修飾法の結果	43
3-3-2	各アミノオキシ化合物における伸長反応の阻害結果	47
3-3-3	各 DNA プローブにおける選択性と反応性の比較	49
3-3-3-1	TWJ 構造とバルジ DNA、ミスマッチ DNA の比較	50
3-3-3-2	バルジ DNA 構造を形成する DNA プローブの検討結果	52
3-3-3-3	TWJ 構造を形成する DNA プローブの検討結果	53
3-3-4	PCR 増幅の阻害結果	55
3-4	結言	56
第 4 章	リアルタイム PCR を用いた新規メチル化 DNA 検出法の構築	57
4-1	緒言	57
4-2	実験方法	58
4-2-1	試薬の調製	58
4-2-2	リアルタイム PCR 用の DNA サンプルの調製	58
4-3	結果及び考察	59
4-3-1	リアルタイム PCR を用いたメチル化 DNA のピンポイント検出	59
4-3-2	アミノオキシ化合物の検討	64
4-3-3	反応条件の検討	66
4-3-3-1	pH の検討	66
4-3-3-2	亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンの濃度比の関係	68
4-3-3-3	亜硫酸水素ナトリウムと CMH の濃度と未修飾標的 DNA 量の関係	71
4-3-3-4	反応時間と未修飾標的 DNA 量の関係	73
4-3-3-5	塩濃度(NaCl)と未修飾標的 DNA 量の関係	75
4-3-4	各 DNA プローブにおける未修飾標的 DNA 量の変化	77
4-4	結言	81
第 5 章	ヒトがん抑制遺伝子から成る合成 DNA を用いたメチル化解析	82
5-1	緒言	82
5-2	実験方法	83
5-2-1	<i>p16</i> プロモーター配列から成る 49 塩基の合成 DNA を用いたメチル化解析	84
5-2-2	<i>p16</i> プロモーター配列から成る二本鎖 DNA を用いたメチル化解析	85
5-2-3	96 塩基の合成 DNA を用いた 2 ヲ所のメチル化パターン解析	86
5-2-4	<i>p16</i> エキソン 1 から成る 92 塩基の合成 DNA を用いたメチル化解析	87
5-2-5	<i>RB1</i> エキソン 8 から成る 80 塩基の合成 DNA を用いたメチル化解析	88
5-3	結果及び考察	90
5-3-1	<i>p16</i> の部分配列から成る合成 DNA でのメチル化検出結果	90
5-3-1-1	<i>p16</i> プロモーター配列 1 (1863 番目の C)のメチル化検出結果	90

5-3-1-2	<i>p16</i> プロモーター配列 2 (1905 番目の C)でのメチル化検出結果	93
5-3-1-3	<i>p16</i> 合成 DNA(1905)の二本鎖標的 DNA を用いたメチル化検出結果	95
5-3-1-4	<i>p16</i> 合成 DNA(1905)の二本鎖標的 DNA を用いた検出限界の確認	97
5-3-1-5	<i>p16</i> 合成 DNA(1905)の二本鎖標的 DNA を用いたメチル化率の検出	98
5-3-1-6	2 ヲ所のメチル化パターン解析結果	100
5-3-1-7	<i>p16</i> エキソン 1 の部分配列を用いたメチル化検出結果	103
5-3-2	<i>RB1</i> エキソン 8 の部分配列を用いたメチル化検出結果	105
5-4	結言	109
第 6 章	ゲノム DNA を用いたメチル化解析	110
6-1	緒言	110
6-2	実験方法	110
6-2-1	メチル化 DNA のピンポイント検出	111
6-2-2	バイサルファイトシーケンシング	111
6-2-2-1	バイサルファイト変換	111
6-2-2-2	PCR 増幅	112
6-2-2-3	T/A クローニング	112
6-2-2-4	プラスミド DNA の精製	113
6-2-2-5	サイクルシーケンシング	113
6-3	結果及び考察	114
6-3-1	HCT116 ゲノム DNA のメチル化解析結果	115
6-3-2	バイサルファイトシーケンシング結果	116
6-3-3	非メチル化ゲノム DNA におけるメチル化率の定量	121
6-4	結言	123
第 7 章	結論	124
参考文献		128
業績		135
謝辞		136

第 1 章 緒論

1-1 緒言

全ての生物は細胞から構成されており、細胞は神経や皮膚、筋肉など様々な形態・機能をとるにも関わらず、ほぼ全て同一の遺伝情報から分化・発達している。これらの遺伝情報は DNA (デオキシリボヌクレオチド) の 4 種類(A, T, G, C)の塩基配列の並びによって決定されている。2003 年、ヒトゲノムプロジェクト(HGP)により塩基配列が解明され、ヒトゲノムは約 30 億塩基対から構成されており、およそ 22,000 個の遺伝子を内包していることが判明した。HGP 終了後、個人間での遺伝子多型、一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism: SNP)やハプロタイプの同定が行われた。これらの個人間における遺伝子多型に基づいた薬剤耐性や先天的な疾患の罹りやすさを指標としたテーラーメイド医療が進むなか、塩基配列による遺伝情報だけでは説明できない疾患・生命現象が多く発見された。遺伝子の塩基配列を解読することで表現型の予測は可能となったが塩基配列の解読のみでは、時空間的にどの細胞でどの遺伝子がいつ活性化しているのか、またはいつ不活性化されているのか、遺伝子発現の制御情報を正確に読み取ることが困難であった。そこで、塩基配列の並び以外に後天的に遺伝子発現を制御する機構、エピジェネティクスという学問に注目が集まった。

エピジェネティクスは、DNA の塩基配列に変化を起こすことなく遺伝子機能を変化させ分裂後の細胞にも伝達する機構である。エピジェネティクス修飾として DNA のメチル化、ヒストンのアセチル化などが知られている。これらの修飾により膨大な遺伝情報の内、細胞または時間ごとに必要な遺伝情報をタグ標識し、遺伝子発現の有無、発現量の強弱を精密に制御している。このように遺伝子をタグ標識することで細胞ごとの時空間的な遺伝子発現、タンパク質の発現量を制御し、同一な遺伝情報を持つ細胞での多様性を確保している。DNA のメチル化状態やヒストンのアセチル化によるエピジェネティクス制御の異常は、細胞のがん化を含む多くの疾患、様々な生命現象に深く関与している。エピジェネティクス制御の中でも遺伝情報の媒体である DNA をダイレクトに修飾する DNA のメチル化は遺伝子発現を制御するための最も重要な鍵であると考えられる。

DNA のメチル化は、シトシンの 5 位にメチル基が導入される酵素反応であり、5 位へのメチル基の導入は二重らせん構造の主溝(major groove)に付加されるため、Watson-Crick 型の塩基対間における水素結合の形成には関与しない。一方で、主溝に付加されたシトシンのメチル基は、メチル化感受性タンパク質や転写因子、RNA ポリメラーゼなど、タンパク質と DNA の相互作用に影響を及ぼす。メチル化された DNA 鎖とタンパク質との相互作用の変化により、遺伝子発現が不活性化されることがある。従って、遺伝子のメチル化状態を解析することができれば、遺伝子発現をプロファイリングすることができ、医療分野での応用、iPS 細胞などエピジェネティクスの基礎研究への応用が期待できる。

本研究では遺伝子の特定のシトシンにおけるメチル化状態をピンポイントで簡便に解析できる新規アッセイ法の構築を目指した。シトシンのメチル化は、SNP のような一塩基の差とは異なり、メチル基の有無というわずかな違いを正確に識別する必要がある。そこで、メチル基の有無を利用した化学的なアプローチ、非メチル化シトシン特異的な化学修飾によるメチル基識別法の開発、DNA の非二本鎖構造を利用した一塩基選択的な化学修飾法の確立を行った。簡便なメチル化 DNA 検出法の開発は、がんの早期発見、術後の予後診断、出生前診断など遺伝子診断技術への応用が期待でき、iPS 細胞やエピジェネティクスにおける基礎研究のツールとしても有用であると考えられる。また、新たな一塩基選択的な化学修飾法の開発は、遺伝子工学や近年発見された 5-ヒドロキシメチルシトシンなどの新しい修飾核酸の検出、機能解明のツールとしての利用が期待できる。

本章では、遺伝情報の後天的な変化に伴う遺伝子発現制御機構に関する既知の知見についてまとめ、メチル化 DNA と疾患の関連性、既知のメチル化 DNA 検出法ならびに従来の配列選択的な化学修飾法について概説し、最後に本研究の目的及び意義を述べる。

1-2 後天的な遺伝子制御機構

後天的な遺伝子制御機構は、DNA のメチル化やヒストンの修飾などが存在する。ヒストンの修飾、DNA のメチル化については 1-2-1 と 1-2-2 で詳細を述べる。これらの修飾は、DNA とタンパク質との相互作用に影響を与える。膨大な遺伝情報の内、修飾された遺伝情報を正確に読み取ることで遺伝子発現を時空間的に制御している。前述したように、これらの後天的(epi-)な遺伝学(genetics)は、エピジェネティクスと言い、塩基配列に変化を起こすことなく、遺伝子発現の制御情報を分裂後の細胞にも伝える機構である。エピジェネティクスは、後天的な遺伝情報の変化であり、X 染色体の不活性化やゲノムインプリンティング、一卵性双生児における生育環境の違いによって生じた体型の違いや疾患感受性の違いに関連している。エピジェネティクス異常はすでに診断や治療の標的として応用されはじめている^{1,2,3,4}。また、細胞の分化にも深く関与しており、近年注目を集めている iPS 細胞においても重要な役割を担っている。例えば、iPS 細胞において作製効率が著しく低いのは DNA のメチル化状態を初期化するリプログラミングが不完全であるとされている。後天的な遺伝子制御機構の解明は、医療分野をはじめ分子生物学や遺伝子工学における基礎研究に大きく貢献できる。

1-2-1 ヒストンの修飾

ヒストンタンパク質は八量体から形成されており、一つのヒストンタンパク質に約 146 塩基対の DNA 鎖が巻き付き、DNA とヒストンが密に折りたたまれたヌクレオソーム構造を形成することで遺伝情報が保存されている。DNA とヒストンの複合体が密に折りたたまれた状態では転写因子や RNA ポリメラーゼの結合を阻害するため、遺伝子発現が不活性化される。一方、ヌクレオソーム構造が緩み、ヒストンと DNA 鎖が解離した状態では、遺伝子発現が活性化される。

ヌクレオソーム構造の変化は、ヒストンタンパク質の N 末端尾部の修飾状態により左右される。例えば、N 末端のリシン残基がアセチル化されるとヒストンタンパク質の電荷が中和され、DNA との結合が部分的に弱くなり、ヌクレオソーム構造が緩まる。一方、脱アセチル化された場合、アセチル化された部位が加水分解され、アミノ基へ戻ることによって DNA 鎖との親和性が戻り、ヌクレオソーム構造が密に折りたたまれる。従って、脱アセチル化により遺伝子が不活性化される。このようにヒストンテイルの修飾状態により DNA との結合様式、ヌクレオソーム構造が変化することで遺伝子発現が活性化または不活性化される。ヒストンテイルの修飾状態を解析する手法として、質量分析やウエスタンブロット法、免疫染色法などがある。これらの手法を用いてヒストンの修飾状態をモニタリングすることで遺伝子発現を大雑把に予測することができる。しかし、遺伝子ごとの詳細な発現情報を解析することが困難である。ヒストンタンパク質の修飾には、アセチル化、リン酸化、メチル化、脱イミノ化など様々な修飾があり、全ての修飾状態、ヒストンテイルにおける修飾部位を特定するのは困難であるため、診断のマーカー分子としての利用が難しいと考えられる。一方、DNA の修飾は、シトシンのみであり、シーケンサーや PCR を用いてがん抑制遺伝子など特定の遺伝子におけるメチル化状態を簡便に解析できる可能性があるため、ヒストン修飾よりも有用なマーカー分子として期待できる。

1-2-2 DNA のメチル化

DNA のメチル化は、DNA を構成する塩基の一つであるシトシンの 5 位にメチル基転移酵素により、S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体としてメチル基が付加されることによって生じる(Fig. 1-1)⁵。生殖細胞や細胞が分化する際には、メチル基転移酵素である Dnmt3a と Dnmt3b により新たなメチル化模様が描き込まれる。メチル基の有無は、グアニンとの水素結合に関与しないが、DNA 鎖の主溝に付加されたメチル基の存在は、1-2-1 のヒストンタンパク質と DNA の結合様式が変化するように、メチル基の有無により DNA とタンパク質との結合様式に影響を与える。例えば、DNA 鎖がメチル化されていると転写因子との結合が直接阻害される(Fig. 1-2)。または、メチル化感受性タンパク質がメチル化され

た DNA 鎖と特異的に結合することで転写因子や RNA ポリメラーゼの結合を阻害する。従って、メチル化された遺伝子は遺伝子発現が不活性化される。

ヒトなど哺乳類でのメチル化は、リン酸基を挟んでシトシンとグアニンが隣接した CpG 配列中のシトシンで頻繁に生じることが知られている。一方、植物の場合では CpNpG 配列でメチル化が生じる。生物種によりエピジェネティクスの制御機構が異なる。特にヒトなど高等生物種で複雑なエピジェネティクス制御が確認されている。CpG 配列のメチル化状態は、相補鎖側の同じ CpG 部位でも同様にメチル化されており、この相補的なメチル化状態は、複製後の新しい娘鎖 DNA にも維持メチラーゼ(Dnmt1)により伝達される(Fig. 1-3)。CpG 配列はハウスキーピング遺伝子のプロモーター領域に多く見られ、CpG アイランドと呼ばれる CpG 配列が密集した領域が形成されている。プロモーター領域内の CpG アイランドが過剰にメチル化されるとメチル基を特異的に認識して結合するメチル化感受性タンパク質がプロモーター領域を覆うことで、転写因子や RNA ポリメラーゼの結合を妨げ、遺伝子発現が不活性化される。DNA のメチル化は特定の遺伝子の活性化・不活性化状態を詳細に調べることができるため診断のマーカー分子として有用であると考えられる。例えば、がん抑制遺伝子など特定の遺伝子をターゲットとしてメチル化状態を解析することでがんを含む多くの疾患を早期発見、診断することができ、胃がんや乳がんなどがんの種類を同定できる可能性も期待できる。

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ためのトリガーであることが既に広く知られているが、メチル化された 5-メチルシトシンが脱メチル化され、遺伝子発現のスイッチがどのようにして OFF から ON に切り替わっているのか未だに不明な部分が多くある。近年、5-メチルシトシン以外にメチルシトシンが Tet タンパク質により酸化された 5-ヒドロキシメチルシトシンや 5-ホルミルシトシン、5-カルボキシルシトシンなどの新しい修飾核酸が発見された(Fig. 1-4)⁶。これらの核酸塩基は、脱メチル化や遺伝子発現の再活性化などに関与していると考えられている。例えば、5-ヒドロキシメチルシトシンに酸化された場合、メチル化感受性タンパク質がメチル基を認識できなくなるため、遺伝子発現が再活性化されると推測されている⁷。また、5-ホルミルシトシンや 5-カルボキシルシトシンは、脱メチル化過程の中間生成物であると考えられている^{8,9}。新しい修飾核酸の発見により、今後もエピジェネティクス修飾の研究が盛んになることが予測される。しかし、従来法の多くは、シトシン、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシンの3つの塩基を識別することが困難である¹⁰。また、5-メチルシトシン以外の修飾シトシンは、微量であるため検出が非常に困難である。近年、 β -グルコシルトランスフェラーゼと UDP-グルコースを用いて 5-ヒドロキシメチルシトシンを選択的にグルコシル化する方法が報告されている^{11,12}。しかし、この手法はゲノム DNA 全体での 5-ヒドロキシメチルシトシンの量を大雑把に定量するだけで配列選択的な解析が困難である。一塩基選択的な化学修飾法を利用した配列選択的な新しいメチル化 DNA 検出法の開発は、診断技術への応用以外にもこれらの新しい修飾核酸の検出や機能解明、エピジェネティクス研究への応用が期待できる。

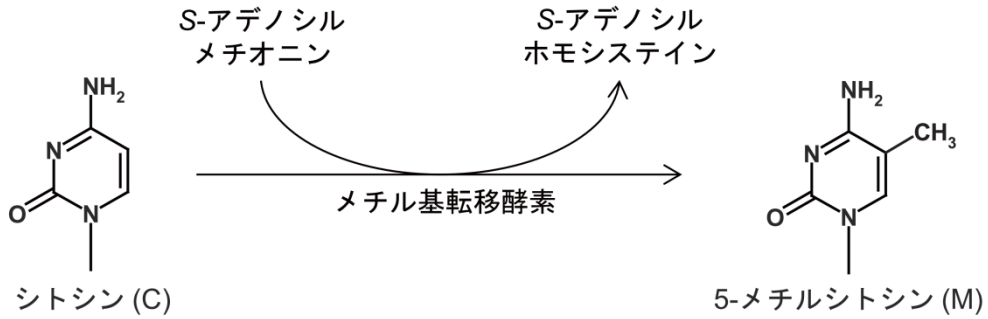


Fig. 1-1 シトシンのメチル化

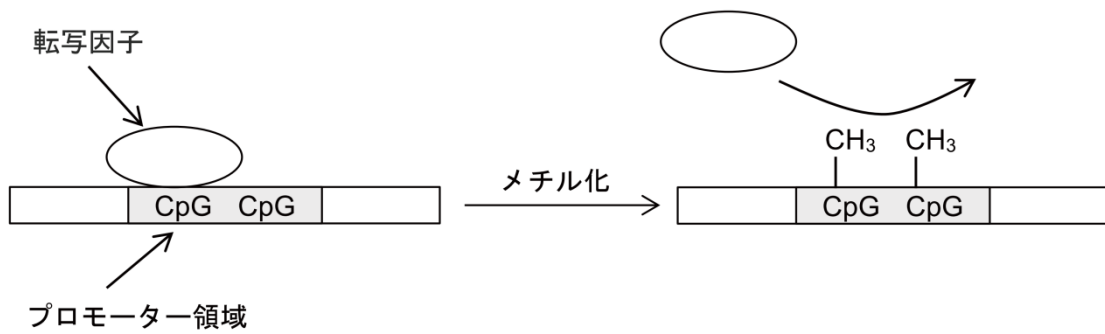


Fig. 1-2 メチル化異常による遺伝子発現の不活性化

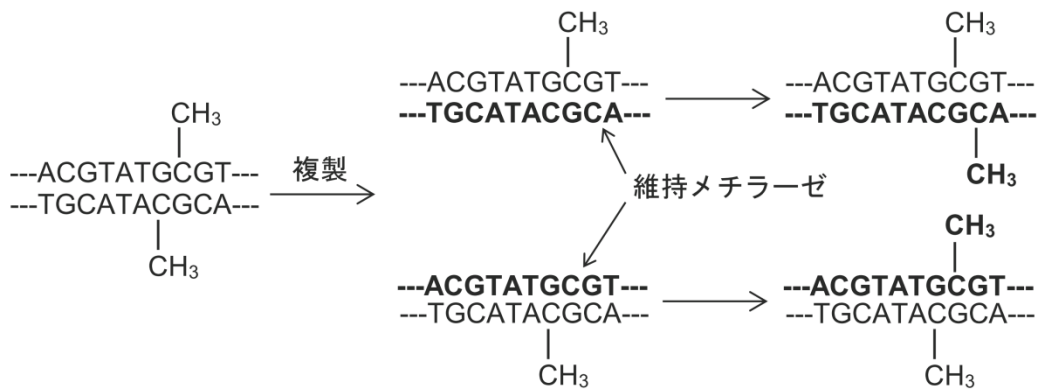


Fig. 1-3 複製後の DNA 鎖におけるメチル化状態の維持

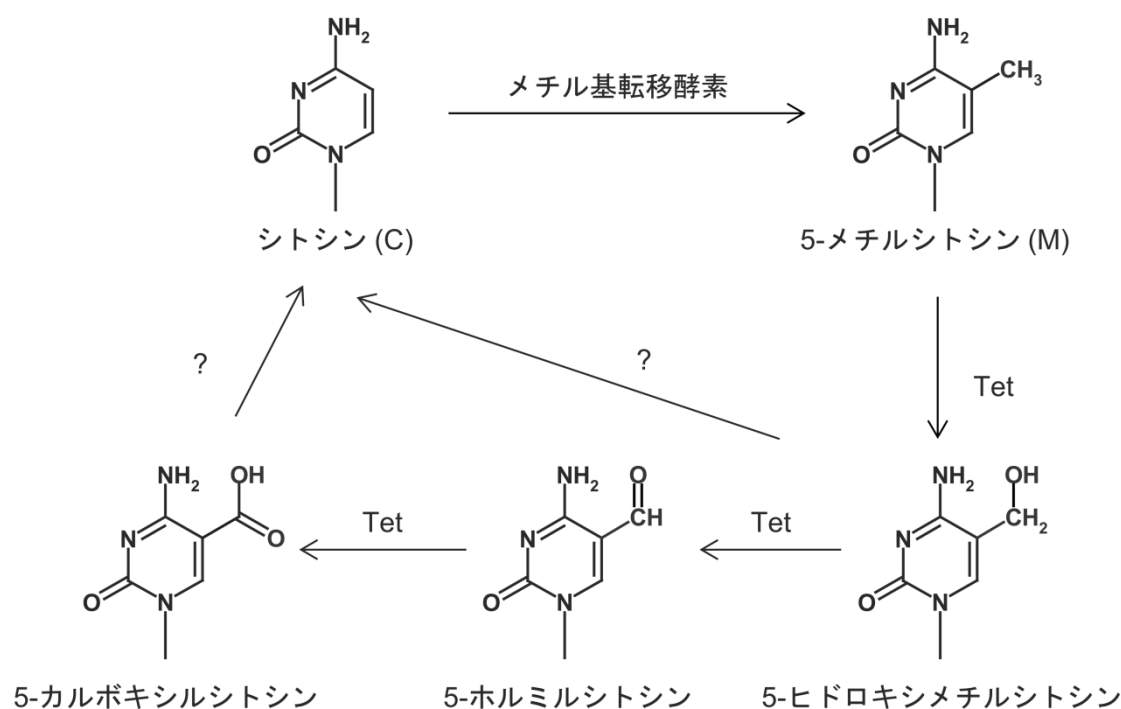


Fig. 1-4 シトシンのメチル化および5-メチルシトシンの酸化

1-3 エピジェネティクス変化およびメチル化 DNA と疾患の関連性

エピジェネティクス変化、DNA のメチル化は、加齢や生活習慣に伴って変化することが報告されている¹³。例えば、遺伝子配列がほぼ同一である一卵性双生児でも加齢や生活環境の違いによりメチル化状態などのエピジェネティクス修飾に差異が生じ、個体差として現れる。統合失調症や X 連鎖性副腎白質ジストロフィーなどは、一卵性双生児での発症不一致例が報告されており、加齢に伴うメチル化状態の差などが原因であることが示唆されている。加齢によるエピジェネティクス修飾の異常、CpG 配列のメチル化異常が細胞のがん化の主な原因の一つである。メチル化異常による細胞のがん化は、がん抑制遺伝子などの高メチル化による不活性化、またはゲノム DNA 全体での低メチル化によるがん遺伝子の活性化などが原因とされている。

がん抑制遺伝子の一つである *p16* 遺伝子は、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤の一つで、サイクリン D と Cdk4/6 複合体形成を阻害することによって細胞周期を制御している。*p16* 遺伝子のプロモーター領域に位置する CpG 配列が過剰にメチル化されると遺伝子発現が抑制され、細胞の増殖を制御・抑制することができず、細胞のがん化を導く。実際に、乳がん患者と健常者で、*p16* 遺伝子のメチル化状態を比較した結果、健常者では全くメチル化されていなかったのに対して、がん患者では *p16* 遺伝子のプロモーター領域が高メチル化状態であることが報告されている¹⁴。また、*p16* 遺伝子のメチル化異常は、乳がんや子宮頸がんなどいくつかの腫瘍形成の原因の一つであることが報告されている^{15,16}。メチル化異常はピ

ロリ菌感染による慢性胃炎とも密接な関係がある¹⁷。ピロリ菌感染により引き起こされた慢性胃炎は、胃粘膜のメチル化異常を誘発し、細胞のがん化を促進する。このように直接または間接的に、メチル化異常と細胞のがん化が関係しているケースが報告されている。特定のがん抑制遺伝子をターゲットとしてメチル化状態を解析することで乳がんや大腸がん、胃がんなどを早期発見することができるため、遺伝子のメチル化状態は、がん診断など様々な疾患において有用なマーカー分子として期待できる。

実際に、結腸直腸がん患者では、*Septin9* 遺伝子が過剰にメチル化されていることが報告されている¹⁸。そこで、結腸直腸がんの診断薬として *Septin9* のメチル化 DNA 検出キットの開発がドイツ Epigenomics 社で行われ、2011 年 12 月に欧州医薬庁に結腸直腸がんの診断薬としてバイサルファイト法を利用した「Epi proColon」の製造認可申請が行われた。DNA のメチル化状態は安定な情報であり、がん細胞から脱落して血中を循環しているゲノム DNA からでもメチル化情報を読み取れることが知られている^{19,20}。従って、血中のがん細胞由来の *Septin9* 遺伝子のメチル化状態を解析するだけで結腸直腸がんを簡便に診断することができる。血液サンプルによる診断は、腫瘍細胞を直接採取する方法に比べ検体への負担が小さく、血便などよりも簡単に行えるため普及しやすいなどの利点がある。しかし、Epi proColon は、数ミリリットルの大量の血液サンプルが必要であり、ゲノム DNA を抽出してから *Septin9* のメチル化状態を検出するまで 32 時間以上かかる。実際に、がん診断としてメチル化 DNA 検出キットの開発が行われ実用化が進められてきていることからメチル化 DNA 解析の意義や診断への応用が期待できるが、既存のバイサルファイト法では数ミリリットルの大量の血液サンプルが必要であり迅速な診断が行えないため、簡便かつ迅速な高感度メチル化 DNA 検出法の開発が求められる。バイサルファイト法については、1-4-1-1 で述べる。

1-4 既知のメチル化 DNA 検出法

DNA のメチル化はメチル基の有無という僅かな変化であり、SNP のような遺伝子変異とは異なり正確な識別が求められるため非常に検出が困難となる。また、通常の PCR や配列解析などの分子生物学的手法で直接検出することができないため、既存のメチル化 DNA 検出法の多くは、簡便性や迅速性、汎用性など様々な面で問題点が指摘されている。そのため、簡便かつ迅速なメチル化 DNA 検出法の開発が求められる。

既知のメチル化 DNA 検出法はメチル基の有無による求核剤または酸化剤に対する有機化学的反応性の違いを利用した化学的なアプローチ法、メチル基を特異的に認識する制限酵素やタンパク質、抗体などの分子認識能を利用した生化学的なアプローチ法、メチル基の有無による物性、質量数や極性の違いを利用して識別する物理学的なアプローチ法の 3 つに大別される。以下に既知のメチル化 DNA 検出法について述べる。

1-4-1 化学的なアプローチ法

シトシン(非メチル化シトシン)と 5-メチルシトシンの違いは、5 位のメチル基の僅かな差だけであるが、5-メチルシトシンではメチル基の電子供与性により、非メチル化シトシンと比べ 5 位と 6 位の炭素間の二重結合が酸化されやすいことが報告されている²¹。一方、非メチル化シトシンでは酸性条件下でシトシンの 3 位の窒素がプロトン化されることにより、6 位の炭素原子が求核剤に対して反応しやすくなるなどの有機化学的反応性の違いを示す (Fig. 1-5)。酸化剤を利用した 5-メチルシトシン選択的な化学修飾法の多くは、塩基特異性が低く、チミンやグアニンなど他の塩基も反応してしまうため反応制御が難しく、現代では亜硫酸水素ナトリウムを用いた非メチル化シトシン特異的な反応を利用したメチル基識別法が主流となっている。1-4-1-1 で最も一般的な亜硫酸水素ナトリウムを用いたバイサルファイト法について詳しく述べる。それ以外の求核剤や酸化剤を用いたメチル基識別法については 1-4-1-2 にまとめる。

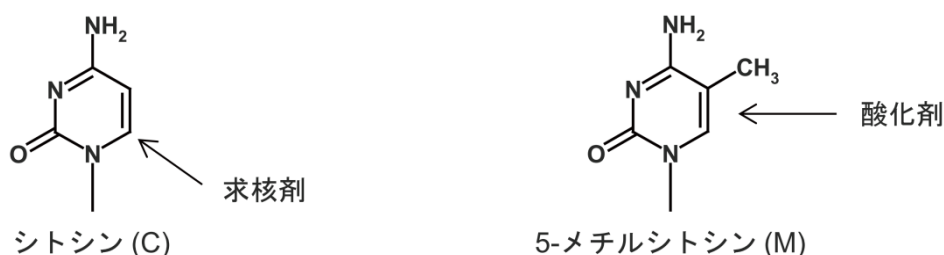


Fig. 1-5 シトシンまたは 5-メチルシトシンへの反応

1-4-1-1 バイサルファイト法

亜硫酸水素ナトリウム(NaHSO₃)を用いたバイサルファイト法は、ゲノム DNA を亜硫酸水素ナトリウム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、DNA のメチル化を検出している。亜硫酸水素ナトリウムによる求核反応は、まずシトシンの 6 位にスルホ基が付加された後、4 位の脱アミノ化反応が生じる。その後、アルカリ処理することで 6 位のスルホ基が除去され、ウラシルへと変換される (Fig. 1-6)。5-メチルシトシンではウラシルへの変換が著しく遅いため、変換後の配列情報の違い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²²。

バイサルファイトシーケンシング法は、DNA 鎖中のすべての非メチル化シトシンをウラシルへと変換させた後、配列解析し、シトシンからチミンへの変換部位を解析することで DNA のメチル化を間接的に調べる方法である²³。メチル化特異的 PCR (MSP)法は、非メチ

ル化シトシンがウラシルへと変換された配列とウラシルへと変換されずに 5-メチルシトシンのままの配列、それぞれの変換後の配列に対して特異的に結合する二組のプライマー配列を用いて、アニーリング温度と PCR 増幅の差からプライマー配列内のメチル化を検出する方法である²⁴。MSP 法と同様に、リアルタイム PCR など PCR 増幅産物をモニタリングする際に用いられる蛍光標識された TaqMan プローブなどを利用した MethyLight 法が報告されている²⁵。MethyLight 法は、バイサルファイト変換後の非メチル化 DNA とメチル化 DNA それぞれに対して特異的に結合するプローブ配列を用いることでプローブ内のシトシンのメチル化を検出する方法である。先述した Epi proColon も配列変換後のゲノム DNA と DNA プローブのアニーリング温度と PCR 増幅の差を利用して DNA のメチル化を検出している。これらの手法以外にもバイサルファイト変換後の配列情報の違いを利用した検出法がいくつか知られているが^{26,27,28,29}、基本的に亜硫酸水素ナトリウムを用いた全ての検出法は、初期の亜硫酸水素ナトリウムによるシトシンからウラシルへの反応効率が著しく悪く、脱ピリミジン化などによる損傷がボトルネックとされている。

バイサルファイト法はゲノム DNA 中の全てのシトシンを反応させなくてはならないため、高濃度の亜硫酸水素ナトリウムで長時間、高温で反応しなくてはならない。例えば、3.0 M の亜硫酸水素ナトリウムで 16 時間、55°C で反応しなくてはならないため、95% 以上の大半のゲノム DNA で非特異的な損傷が生じる。従って、DNA のメチル化を検出するのに数 μ g の大量のゲノム DNA が必要となり、検出するまでに 2, 3 日かかる。最近では、9.0 M の超高濃度の亜硫酸水素ナトリウムでの反応や 90°C の高温で反応することで検出時間の短縮化を図っている報告例もあるが劇的な改善法は未だに開発されていない³⁰。そのため、非特異的な損傷を抑えたマイルドな反応条件下でスムーズに行える新しい反応とメチル基識別法の開発が求められる。

また、バイサルファイト法の多くは、ゲノム DNA 中のすべての非メチル化シトシンをウラシルへと変換した後、PCR などの核酸分子増幅法を用いてメチル化を解析している。従って、バイサルファイト変換後の配列は、アデニン(A)とチミン(T)、グアニン(G)の 3 つの塩基に偏ってしまい、PCR などの核酸分子増幅法が困難な領域が生じてしまう。また、プライマーやプローブ配列の設計に制限がかかってしまう。例えば、バイサルファイトシーケンシング法の場合はプライマー配列内に CpG 配列を含まないように設計する必要がある。逆に、MSP や MethyLight 法の場合は、プライマーまたはプローブ配列内に CpG 配列を含む必要があり、CpG 配列が密集した領域でしか設計することができないため、配列設計に大きな制限がかかる。また、プライマーまたはプローブ配列内のシトシンのメチル化しか大雑把に識別することができない。

従って、反応部位を制御し、特定の CpG 配列のみを選択的に修飾する方法、またはバイサルファイト変換後の配列の偏りを解消できる反応方法を開発することができれば、従来法では検出が困難な領域をカバーすることができ、より詳細な遺伝子発現のプロファイリングが期待できる。

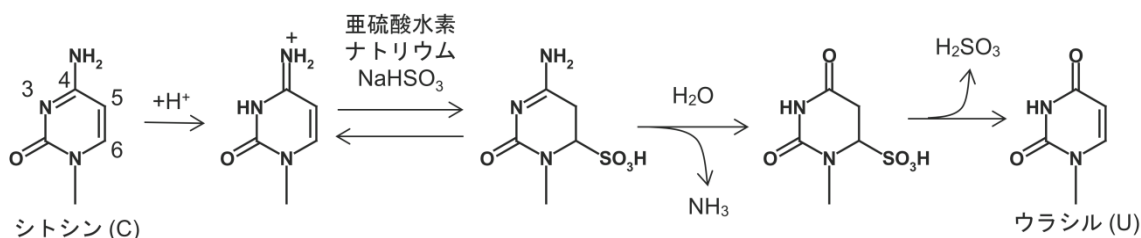


Fig. 1-6 シトシンの亜硫酸水素ナトリウムによるバイサルファイト変換

1-4-1-2 バイサルファイト法以外の化学的なアプローチ法

亜硫酸水素ナトリウムを用いたバイサルファイト反応は、非メチル化シトシンをウラシルへと変換させ、シトシンのメチル化を検出しているが、亜硫酸水素ナトリウム以外の求核剤を用いた非メチル化シトシン特異的な化学修飾法もいくつか報告されている^{31,32,33}。例えば、アミノオキシ化合物(NH₂OR)の一つであるアリルヒドロキシルアミン(NH₂OAllyl)でシトシンを化学修飾すると、シトシンの4位にアリルヒドロキシルアミンがアミノ基転移反応することが知られている(Fig. 1-7)。アリルヒドロキシルアミン以外に、ヒドロキシルアミン(NH₂OH)やメトキシアミン(NH₂OCH₃)など他のアミノオキシ化合物やアミノ基を持つヒドラジン(NH₂NH₂)でも同様の反応性を示す。

アリルヒドロキシルアミンでシトシンを化学修飾した場合、いくつかの異性体が生成される。Fig. 1-7のZイミノ異性体では、4位のアリルヒドロキシルアミンによりDNAポリメラーゼによる相補鎖合成を阻害することが知られている。また、アミノ異性体は、グアニンと塩基対を形成し、シトシンのように振る舞うのに対して、Eイミノ異性体はアデニンと塩基対を形成し、チミンのように振る舞うことが報告されている³¹。アリルヒドロキシルアミンによる反応は、非メチル化シトシンと5-メチルシトシンで反応生成物が異なり、アリルヒドロキシルアミンで処理したDNA鎖を鋳型にDNAポリメラーゼによる伸長反応の有無、またはパイロシーケンシングによる配列解析を行うことでシトシンのメチル化を検出することができる。しかし、アリルヒドロキシルアミンによって化学修飾されたシトシン誘導体は、異性体、シトシン誘導体の構造によって塩基としての挙動が異なるため、修飾後のシトシンを一つの検出系で調べるのが難しく、精確な定量が困難であると考えられる。

四酸化オスミウム(OsO₄)と2,2'-ビピリジン(C₁₀N₂H₈)を用いた反応ではシトシンに比べ、5位に電子供与性の高いメチル基を有する5-メチルシトシンが効率的に酸化されることが報告されている(Fig. 1-8)³⁴。しかし、オスミウムを用いた酸化反応では、メチル基を有するチミンでも同様の反応が生じてしまうなどの問題点がある³⁵。バナジウム(V)や過ヨウ素酸

ナトリウム(NaIO_4)を用いた反応でもオスミウムと同様に、5-メチルシトシンを酸化することができる。しかし、バナジウムや過ヨウ素酸ナトリウムを用いた酸化反応の場合、グアニンも同様に酸化されてしまうことが報告されている²¹。臭化リチウム(LiBr)存在下で過ヨウ素酸ナトリウムを用いて DNA 鎖を反応することで、効率的に 5-メチルシトシンを酸化反応できることが報告されているが、これらの酸化剤を利用した 5-メチルシトシン選択的な酸化反応は、5-メチルシトシンを効率的に反応させるための反応時間や温度などの精密な反応制御が求められる。従って、長時間反応した場合、5-メチルシトシン以外の塩基も反応してしまう可能性があるため、ゲノム DNA での検出が困難であり、精確性や定量性に欠ける。

上記で述べたように、非メチル化シトシンまたは 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はいくつか報告されているが、塩基特異性が低く反応制御が難しい場合や簡便な検出への応用が難しい場合が多い。従って、非メチル化シトシンまたは 5-メチルシトシンに対して高い特異性を示し、PCR やパイロシーケンシングなどの一般的な分子生物学的手法による簡便な検出系への応用が期待できる反応の開発、または特定の CpG 配列を選択的に化学修飾できる新たな手法の開発が求められる。

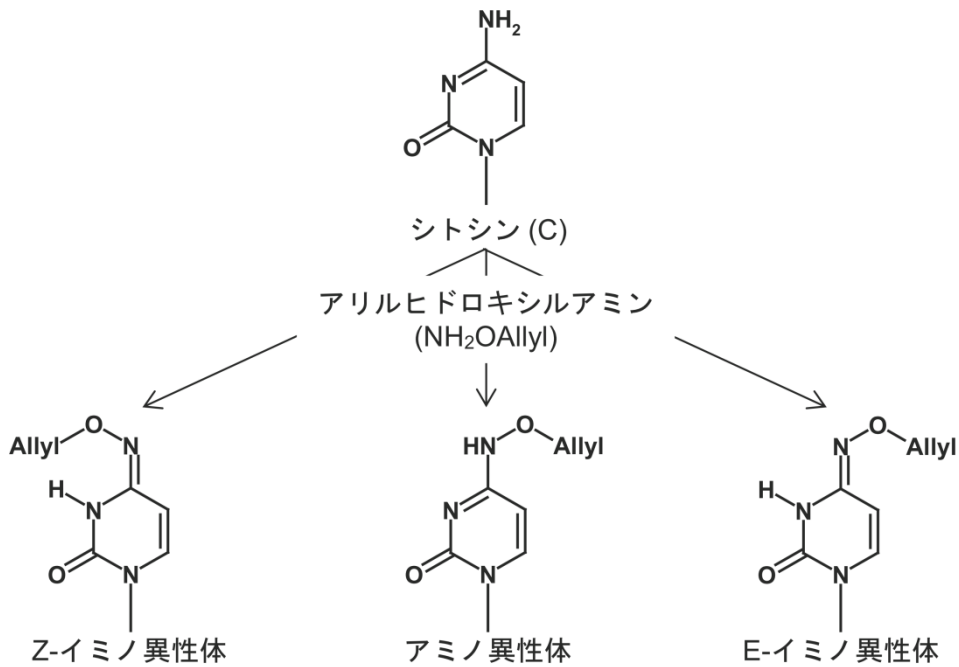


Fig. 1-7 アリルヒドロキシルアミンによるシトシンへの化学修飾

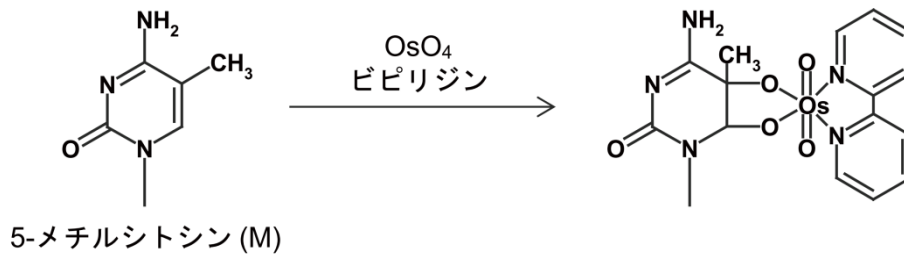


Fig. 1-8 四酸化オスミウムを用いた酸化反応

1-4-2 生化学的なアプローチ法

タンパク質や抗体、制限酵素の種類によってはシトシンのメチル基を特異的に認識する^{36,37}。例えば、メチル化感受性タンパク質と抗体はシトシンの5位に付加されたメチル基を認識して特異的に結合する。メチル化感受性制限酵素は認識配列内のシトシンがメチル化されていると DNA 鎖の切断が阻害される。これらの分子認識能を利用したメチル化 DNA 検出法がいくつか知られている。

メチル化感受性制限酵素を用いた方法では、制限酵素の認識配列内のシトシンがメチル化されていると DNA 鎖の切断が阻害されるため、制限酵素で処理した DNA 鎖をゲル電気泳動または PCR 増幅の有無を確認することで認識配列内のシトシンのメチル化を検出することができる³⁸。しかしながら、制限酵素法は認識配列の制限があるため汎用性に欠ける。

メチル化感受性タンパク質や抗体を用いた検出法は、ゲノム DNA 全体でのメチル化量しか定量することができないため、特定の遺伝子のメチル化状態を詳細に解析するには適していない。しかし、メチル化感受性タンパク質や抗体は、直接検出へ応用する以外に、メチル化 DNA を回収または濃縮する目的として幅広く利用されている。また、がん細胞ではゲノム全体でメチル化量が低下している場合があるため、用途によっては有用である。

従来のタンパク質や抗体、制限酵素を利用したメチル化 DNA 検出法の多くは、詳細な解析が困難であり、汎用性に欠けるため、現在では遺伝子または一塩基単位で詳細にメチル化状態を解析できるバイサルファイト法と配列解析を組み合わせたバイサルファイトシーケンシングが主流となっている。

これらの手法以外に、近年開発された一分子リアルタイム DNA シーケンサーを用いたメチル化 DNA の検出法が報告されている³⁹。一分子リアルタイム DNA シーケンサーは、ウェルの底に DNA ポリメラーゼを固定化し、ポリメラーゼにより DNA 鎖が複製される際に取り込まれる蛍光標識された塩基を蛍光観測することで塩基配列を解読する手法である⁴⁰。DNA ポリメラーゼにより塩基が取り込まれる際に、*N*-6-メチルアデニンや5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシンなどの修飾核酸が含まれていると塩基が相補鎖に取り込まれる際の時間が僅かに遅くなることが報告されている。従って、塩基が取り込まれる速度をモニタリングすることで一分子レベルでのメチル化 DNA、または修飾核酸をダイレクトに検出することができる。メチル化 DNA 検出ツールとして、一分子リアルタイム DNA シーケンサーは普及率や精確性などの問題点があるが今後の発展によりバイサルファイトシーケンシング法に代わりうる可能性も考えられる。

1-4-3 その他のアプローチ法

その他のアプローチ法として、シトシンのメチル基による質量の差、または極性の違いを利用した分析法がある。例えば、ゲノム DNA をモノマーに分解した後、各塩基、種類ごとの極性の違いを利用して HPLC (High Performance Liquid Chromatography) や TLC (Thin-Layer Chromatography) で分離し、質量数を分析することでゲノム全体でのメチル化量を定量することができる。これらの検出法は、ゲノム全体での大雑把なメチル化しか定量することができないが、近年あらたに発見された 5-ヒドロキシメチルシトシンや 5-ホルミルシトシン、5-カルボキシルシトシンなど新しい核酸塩基を発見するのに大変重要なツールである⁴¹。

また、科学技術の発展により近年ではナノポアシーケンシングなどの次世代シーケンサーによる修飾核酸検出法に注目が集まっている⁴²。ナノポアシーケンシングは、小孔を DNA 鎖が通過する際に生じる僅かな電位差を測定することで塩基配列を解読する手法であり、シトシンのメチル基による差も識別できることが報告されている^{43,44}。ナノポアシーケンサーは、一分子リアルタイム DNA シーケンサーと同様に一分子レベルでの修飾核酸をダイレクトに検出できる可能性があり、今後の発展によっては新しいメチル化 DNA 検出法のツールとして用いられる可能性も考えられる。しかしながら、現状では一分子リアルタイム DNA シーケンサーと同様にメチル基の有無による差が僅かであり、精度などの問題がある。

1-5 従来の合成 DNA プローブを用いた配列選択的な化学修飾法

1-4-1 で説明したバイサルファイト法やマキサムギルバート法など、DNA を修飾または切断する方法は既にいくつか知られている⁴⁵。しかし、これらの反応は、ゲノム DNA など長い配列中の全ての塩基を反応させるため、高濃度で長時間、高温で反応する必要があり、配列選択性がない。ゲノム DNA 中の全ての塩基を反応させるのではなく、特定の塩基を効率的に切断または修飾することができれば、遺伝子工学などへの応用が期待でき、特定の CpG 配列を効率的に修飾することができればメチル化 DNA 検出法への利用が期待できる。

従来の合成 DNA プローブを利用した配列選択的な化学修飾法を Fig. 1-9 に示す。DNA プローブは、相補的な標的 DNA または RNA 配列に対して特異的に結合するため、サザンブロットティングやノーザンブロットティングなど核酸検出のツールとして幅広く使われている。反応性官能基を修飾した合成 DNA プローブを利用した配列選択的な化学修飾法は、DNA プローブが標的配列に結合することで、DNA プローブの末端に修飾された反応性官能基と塩基との距離が物理的に近くなり、標的配列周辺の標的塩基を効率的に修飾または切断することができる⁴⁶。しかし、DNA プローブの末端に反応性官能基を修飾する方法は、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、手間やコストがかかる。また、末

端に修飾された反応性官能基は、配列選択性はあるが一塩基単位での精密な反応制御が難しく、汎用性に欠ける。

特殊な合成 DNA プローブを必要としない新たな一塩基選択的な化学修飾法の開発は、遺伝子工学への応用が期待でき、特定の遺伝子のメチル化状態を簡便に検出するツールとしても期待できる。

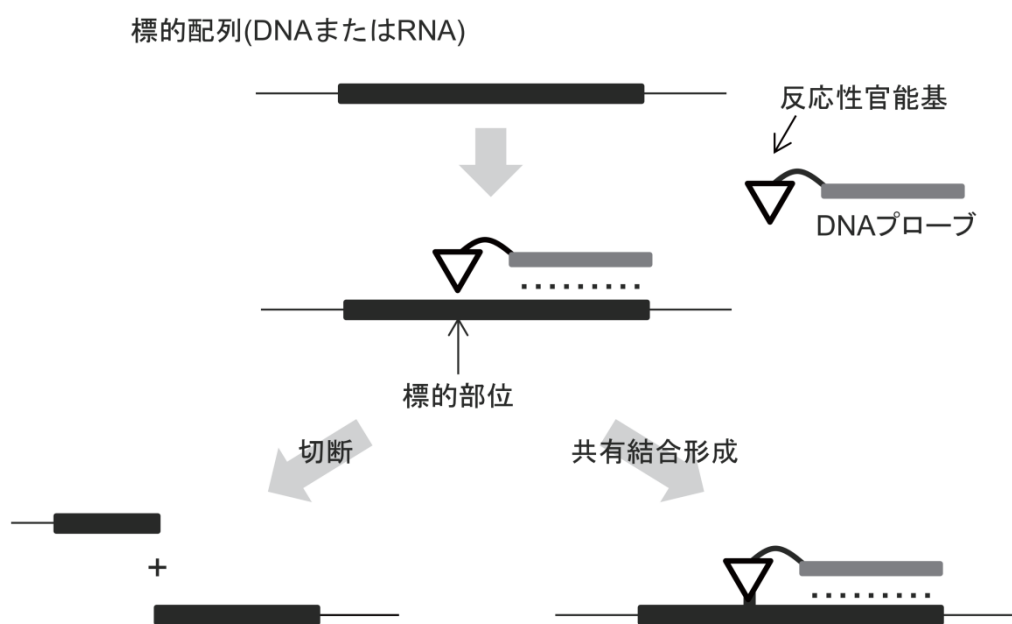


Fig. 1-9 合成 DNA プローブを利用した配列選択的な化学修飾法

1-6 DNA の高次構造を利用した一塩基選択的な化学修飾法

糖、リン酸、核酸塩基から成る DNA 鎖は、互いに相補的な塩基と水素結合を形成することで塩基を内側に巻き込み、糖とリン酸の主鎖からなる二重らせん構造を形成している。二重らせん構造の内側に位置する塩基は、塩基対間のスタッキング相互作用と主鎖により、変異原物質、酸化剤や求核剤などから護られている。

糖とリン酸からなる主鎖は、ある程度の柔軟性を持っており、周囲の配列や状況に応じて構造を変化させるフレキシブルな分子であることが知られている。例えば、ナフチリジンカルバミンダイマー(NCD)が DNA 鎖中の塩基対間にインターカレートした場合、部分的に主鎖が引き伸ばされ、一部の塩基が二重らせん構造の外側にフリップアウトされることが報告されている(Fig. 1-10)⁴⁷。このように、DNA 鎖は伸び縮みすることができるフレキシブルな分子であり、フリップアウトされた塩基は、スタッキング相互作用や主鎖によって

保護されていないため、酸化剤や求核剤などの試薬によって容易に修飾できることが知られている。NCDのような化合物を使わなくても DNA は、様々な非 Watson-Crick 構造を形成することが知られている。例えば、DNA プローブを利用することで標的 DNA 配列の任意の部位でバルジ、またはミスマッチ塩基対を容易に形成させることができる(Fig. 1-11)。

バルジ部位やミスマッチ部位も塩基対間のスタッキング相互作用が弱まるため、酸化剤や求核剤により容易に切断または修飾できることが報告されている^{48,49,50}。DNA プローブを利用して、バルジまたはミスマッチ塩基対を形成させた標的 DNA を四酸化オスミウムとビピリジンで反応させることで、バルジ部位またはミスマッチ部位に位置する 5-メチルシトシン(M)を選択的に酸化・切断できることが報告されている³⁴。DNA の高次構造を利用した化学修飾法は、非 Watson-Crick 塩基対を形成している特定の塩基を選択的に切断または修飾することができ、他の二重らせん構造を形成している部位での反応を抑制することができるため、一塩基選択的な化学修飾法への利用が期待できる^{51,52,53}。

ミスマッチ塩基対部位に位置する 5-メチルシトシンがオスミウムとビピリジンにより選択的に酸化されることから、岡本らは DNA プローブのミスマッチ部位に反応性官能基、ビピリジンを修飾した ICON (Interstrand Complexes formed by Osmium and Nucleic acids) プローブを用いた 5-メチルシトシン検出法の開発を行った(Fig. 1-12)。DNA プローブのミスマッチ部位に修飾されたビピリジンは、標的配列に結合することでミスマッチ部位に位置する 5-メチルシトシンを選択的に酸化、修飾することができる。従って、ミスマッチ部位のシトシンのメチル化を検出することができる⁵⁴。しかし、ICON プローブ法は、1-5 と同様に標的配列ごとにビピリジンを修飾した特殊な DNA プローブを合成する必要があり汎用性が低く、手間やコストがかかる。

バルジ DNA プローブやミスマッチ DNA プローブのような非二本鎖構造を形成する DNA プローブを利用して、NCD の様な化合物や ICON プローブのような特殊な合成プローブを使わない汎用性と選択性に優れた新たな一塩基選択的な化学修飾法が開発できれば、ピンポイントなメチル化 DNA 解析ツールとして期待できる。また、一塩基選択的な反応制御は、ケミカルバイオロジーにおいても重要なツールとなる。例えば、5-ヒドロキシルメチルシトシンなど新たに発見された修飾核酸の検出や機能解明、遺伝子の特定の部位を変異または切断するためのツールとして有用であり、遺伝子工学など様々な研究への応用が期待できる。

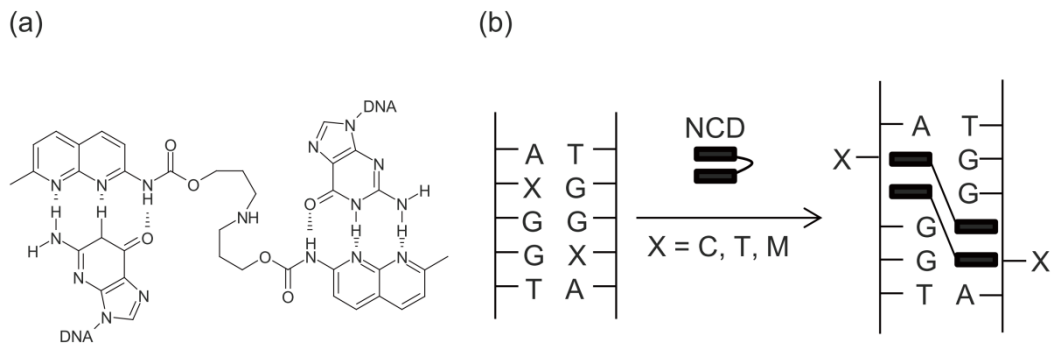


Fig. 1-10 ナフチリジンカルバミンダイマーによる DNA 構造の変化

(a) ナフチリジンカルバミンダイマー(NCD)と2つのグアニンにおける水素結合の模式図

(b) NCD がインターカレートした場合の DNA 鎖の構造変化

(A). バルジDNA



(B). ミスマッチDNA



Fig. 1-11 非 Watson-Crick 構造の模式図

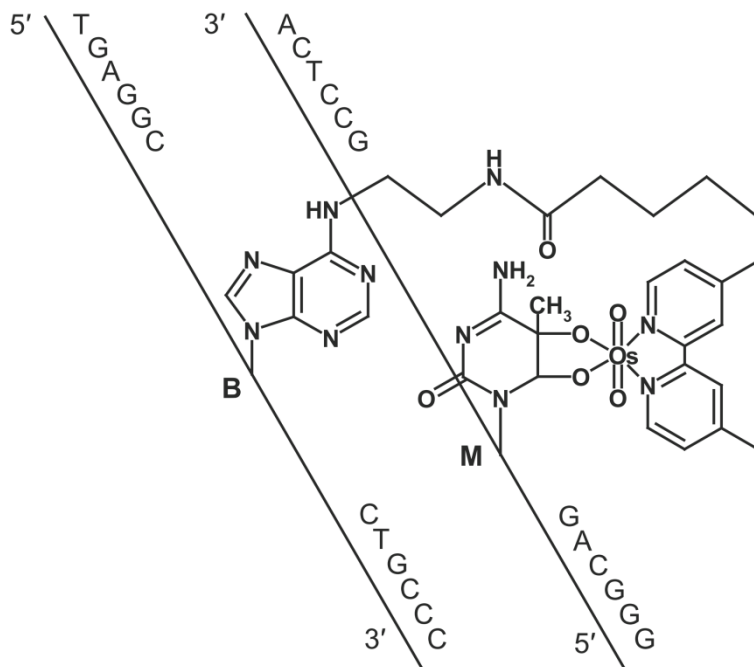


Fig. 1-12 ICON プローブを用いた一塩基選択的な酸化反応

1-7 本研究の目的と意義

本研究では、シトシン特異的な化学修飾法の探索及び検出法の開発と新たな一塩基選択的な化学修飾法の開発を行い、遺伝子の後天的な修飾である DNA のメチル化をピンポイントで簡便に検出する方法の開発を行った。DNA のメチル化は、シトシンの 5 位にメチル基が導入される酵素反応であり、メチル基の僅かな差を正確に識別しなくてはならないため、従来の遺伝子診断技術や一般的な分子生物学的手法での検出が困難である。簡便なメチル化 DNA 検出法の開発は、がんの早期発見や術後の予後診断など遺伝子診断への応用が期待でき、医療分野での貢献が期待できる。新しい検出法の開発は、新たに発見された 5-ヒドロキシメチルシトシンや 5-ホルミルシトシン、5-カルボキシルシトシンなどを識別するためのツールとしても期待できるため、エピジェネティクスの基礎研究においても重要な意味がある。また、DNA の高次構造を利用した一塩基選択的な化学修飾法の開発は、DNA のメチル化以外に RNA などの修飾核酸を検出するツール、ナノケミカルデバイスとしても有用であり、遺伝子の特定の部位を変異または切断できるため、ケミカルバイオロジー分野での利用も期待できる。

以下に本論文の構成を示す。

第 2 章では、非メチル化シトシンまたは 5-メチルシトシンを 1 ヶ所含む短い DNA 鎖を用いた非メチル化シトシン特異的な化学修飾法の確立と修飾後の DNA 鎖を利用したメチル基識別法の開発を行う。

第 3 章では、DNA プローブを用いた一塩基選択的な化学修飾法の確立とピンポイントなメチル基識別法の開発を行う。

第 4 章では、リアルタイム PCR を用いた簡便なメチル化 DNA 検出法の開発を行う。

第 5 章では、ヒトがん抑制遺伝子からなる様々な合成 DNA 配列を用いてメチル化 DNA の検出を行い、汎用性の確認を行う。

第 6 章では、ゲノム DNA を用いてピンポイントなメチル化 DNA の検出を行う。また、従来法であるバイサルファイトシーケンシングを行い解析結果の比較を行う。

第 7 章は総括であり、本研究を要約して得られた研究成果をまとめた。

第2章 非メチル化シトシン特異的な化学修飾法の探索および検出法の確立

2-1 緒言

本章では、非メチル化シトシンとメチルシトシンのメチル基の有無を明確に識別するための非メチル化シトシン特異的な化学修飾法の探索および検出法の確立を行う。

非メチル化シトシンと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修飾法は、1-4-1 で述べたように、バイサルファイト法である亜硫酸水素ナトリウム(NaHSO_3)やアミノオキシ化合物(NH_2OR)を用いた非メチル化シトシン特異的な化学修飾、四酸化オスmium(OsO_4)などの酸化剤を用いたメチルシトシン選択的な酸化反応が知られている。酸化剤を用いた反応では、他の塩基でも酸化されてしまうため、偽陽性の問題などが考えられる。そこで、本研究では塩基特異性の高い亜硫酸水素ナトリウムを用いた反応とアミノオキシ化合物を用いた反応に着目した。

亜硫酸水素ナトリウムによる反応は、酸性条件下でシトシンの6位にスルホ基が付加された後、4位の脱アミノ化反応が生じる。バイサルファイト法では、この脱アミノ化されたシトシンをアルカリ処理し、6位のスルホ基を除去した後、ウラシルへと変換することでシトシンのメチル化を識別している。しかし、バイサルファイト反応は、脱アミノ化反応が律速段階であるため、高濃度で長時間、高温で反応する必要がある。従って、脱アミノ化反応の際に、より求核性の高い試薬を併用することで、バイサルファイト法よりも温和な条件下でスムーズに反応を促進することができると考えられる。実際に、亜硫酸水素ナトリウムでシトシンを化学修飾する際に、メトキシアミン($\text{R} = \text{CH}_3$)やヒドロキシルアミン($\text{R} = \text{H}$)などのアミノオキシ化合物やアミノ基を持つヒドラジン(NH_2NH_2)などを併用することで4位のアミノ基転移反応が生じ、温和な条件下で反応が促進されることが報告されている^{55,56}。

亜硫酸水素ナトリウムとアミノオキシ化合物を併用した反応は、バイサルファイト反応と同様に6位にスルホ基が付加されるが、4位の脱アミノ化反応のかわりにアミノオキシ化合物による4位のアミノ基転移反応が生じる(Fig. 2-1)。また、亜硫酸水素ナトリウムとアミノオキシ化合物により化学修飾されたシトシン誘導体は、DNAポリメラーゼなどによる相補鎖合成を阻害することが報告されている⁵⁷。ヒドラジンなどを用いた反応でも同様のアミノ基転移反応が生じることが報告されているが、アミノオキシ化合物と異なり構造が不安定で6位のスルホ基が脱離することが報告されている。スルホ基が脱離した場合、ポリメラーゼによる相補鎖合成を阻害しない可能性がある。また、ヒドラジンよりもアミノオキシ化合物の方が、塩基性が低い求核剤であるため、本研究ではアミノオキシ化合物を併用した反応を用いることにした。亜硫酸水素ナトリウムとアミノオキシ化合物で化学修飾されたシトシン誘導体は、スルホ基の向きの違いによるジアステレオマーを生じるが、両方の異性体でDNAポリメラーゼによる相補鎖合成を阻害することが報告されているため、

緒論で述べたアリルヒドロキシルアミンのみによる反応よりも定量的かつ簡便にシトシンのメチル基を識別できると考えられる。

本章では、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによる反応が非メチル化シトシン特異的であるか、シトシンまたはメチルシトシンを1カ所含む短いDNA鎖を用いてHPLCと質量分析を行い確認する。また、修飾後のシトシン誘導体のDNAポリメラーゼによる相補鎖合成の阻害を指標としたメチル基の識別が可能であるか確認する。

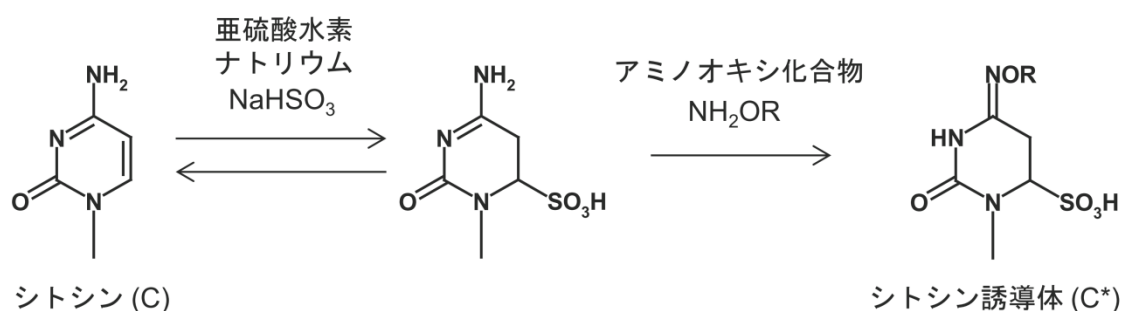


Fig. 2-1 亜硫酸水素ナトリウムとアミノオキシ化合物によるシトシンへの化学修飾

2-2 実験方法

2-2-1 試薬の調製

すべてのオリゴヌクレオチド、標的 DNA およびプライマーは、つくばオリゴサービスにより合成され逆相 HPLC カラムによって精製された DNA を使用した。合成されたオリゴヌクレオチドは全て滅菌水に溶解させ 100 μ M に調製した後、-20°C の冷凍庫で保管した。

2.08 g の亜硫酸水素ナトリウム (NaHSO₃, Wako) を滅菌水に溶解させ、水酸化ナトリウム (Wako) を用いて pH5.0 に調製した後、滅菌水を加え 4.0 M の亜硫酸水素ナトリウム水溶液を 5 ml 作製した。亜硫酸水素ナトリウム水溶液は遮光した後、冷蔵庫で保存した。また、亜硫酸水素ナトリウム水溶液は一週間ごとに新しく作り直した。同様に、メトキシアミン塩酸塩 (NH₂OCH₃·HCl, SIGMA-ALDRICH)、1.25 g を滅菌水に溶解させ、ジエチルアミン (C₄H₁₁N, SIGMA-ALDRICH) を用いて pH5.0 に調製した後、滅菌水を加え 3.0 M のメトキシアミンを 5 ml 作製した。調製したメトキシアミンは冷蔵庫で保存した。

400 mM 2-[4-(2-Hydroxymethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES, DOJINDO) /NaOH, 1.0 M NaCl (Wako), pH6.0 の HEPES 緩衝液 1 を作製した。実験ではこの HEPES 緩衝液 1 を 8 倍希釈して 50 mM HEPES/NaOH, 125 mM NaCl, pH6.0 の HEPES 緩衝液中で実験を行った。

2-2-2 DNA 鎖の化学修飾

シトシン(C)またはメチルシトシン(M)を1カ所含む12塩基の標的DNA (Table 2-1, DNA1とDNA2)を用いて実験を行った。100 μ Mの標的DNA1またはDNA2を3 μ l (300 pmol)、0.2 mlのPCRチューブ(QSP)に加え、体積が10 μ lになるように滅菌水とHEPES緩衝液1を加えた。この時、DNAサンプルの濃度が30 μ Mになるように調製した。DNAサンプルをサーマルサイクラー(TaKaRa, PCR Thermal cycler Dice)にセットし、95°Cで5分間熱変性を行った。その後、氷上で冷却させた。熱変性を行ったDNAサンプルに、4.0 Mの亜硫酸水素ナトリウム水溶液(pH5.0) 7.5 μ l、3.0 Mのメトキシアミン(pH5.0) 10 μ l、HEPES緩衝液1を2.5 μ l加えた。その後、25°Cで30分間、サーマルサイクラーでインキュベーションした。この時、最終体積を30 μ lとしてDNAとそれぞれの試薬の最終濃度が10 μ M DNA、1.0 M 亜硫酸水素ナトリウム、1.0 M メトキシアミンになるように調製した。反応後、DNAサンプルは脱塩カラム(GE Healthcare, NAPTM-5 Columns)を用いて粗精製した。

脱塩カラムは、使用前に滅菌水500 μ lで10回洗浄してから使用した。洗浄後、30 μ lのDNAサンプルと滅菌水470 μ lを加え、カラムからフロースルーしてきた溶液を1.5 mlチューブ(BM Bio)に回収した。再び、滅菌水を500 μ l加えフロースルーした溶液を新しい1.5 mlチューブで回収した。この操作を5回繰り返し行った後、回収した各フラクションの吸光度を測定した。吸光度は、吸光光度計(GE Healthcare)を用いて260 nmの波長を測定し、DNAが含まれるフラクションを確認した。吸光度を確認したフラクションを遠心エバポレーター(TOMY, Micro VacTM)で乾燥させた。乾燥させたDNAサンプルに滅菌水15 μ lを加え、再懸濁させた後、冷凍庫で保管した。

Table 2-1. HPLC と MS 解析で使用した DNA 配列

Oligo DNAs
Target DNA1 (T12-C1, 12mer) 5'-GACTGATAGATG-3'
Target DNA2 (T12-M1, 12mer) 5'-GAMTGATAGATG-3'

2-2-3 DNA 鎖の HPLC/MS 分析

2-2-2 で作製した DNA サンプルと逆相 HPLC カラム(Waters, Symmetry® C₁₈ 5 μm 4.6mm×250 mm Column)を用いて反応生成物の単離を行った。HPLC 展開液には展開液 A 【50 mM トリエチルアミン(Wako)/酢酸(Wako), pH7.0】と展開液 B 【50%アセトニトリル(Wako), 50 mM トリエチルアミン(Wako)/酢酸(Wako), pH7.0】を使用した。展開液は以下のグラジエントで行った【展開液 B: 10%→18%(10 分後)→18%(40 分後)→36%(60 分後)】。DNA サンプルをインジェクションする前に、展開液 B を 10%の状態に 20 分間安定化した。その後、DNA サンプルをインジェクションし、測定を開始した。DNA サンプルを注入後、254 nm の吸光度をモニタリングし、フラクションの回収を行った。回収したフラクションは遠心エバポレーターで乾燥させた後、滅菌水 30 μl に再懸濁させ、冷凍庫で保管した。

上記で単離した DNA サンプルを用いて質量分析を行った。質量分析は、LC-TOF MS (日本電子株式会社製)を用いて行った。測定条件は以下に記す【イオン化モード:ESI-, 測定範囲: 500~2000 *m/z*, ニードル電圧: -2000 V, リングレンズ電圧: -10 V, オリフィス 1 電圧: -25 V, オリフィス 2 電圧: -5V】。また、測定は 70%メタノール(Wako)と 1%アンモニア水(NH₃, Wako)を含む混合溶液、流速 0.2 ml/min の条件下で行った。

2-2-4 プライマー伸長反応

2-2-2 で行った操作を C または M を 1 ヶ所含む 20 塩基の標的 DNA (Table 2-2, DNA3 と DNA4)を用いて同様の実験を行った。まず、10 μM 標的 DNA (DNA3 または DNA4) 3 μl (30 pmol)を HEPES 緩衝液 1 に溶解させ、体積が 10 μl になるように調製した後、熱変性を行った。この時、DNA の濃度が 3.0 μM になるように調製した。熱変性後、4.0 M の亜硫酸水素ナトリウム水溶液(pH5.0)を 7.5 μl、3.0 M のメトキシアミン(pH5.0)を 10 μl、HEPES 緩衝液 1 を 2.5 μl 加え、25°C で 5 時間反応を行った。この時、最終体積を 30 μl として DNA と試薬の最終濃度がそれぞれ 1.0 μM DNA、1.0 M 亜硫酸水素ナトリウム、1.0 M メトキシアミンになるように調製した。反応後、エタノール沈殿を行った。

DNA サンプル 30 μl を 1.5 ml のチューブに移し、滅菌水 270 μl と 100%エタノール 750 μl、3.0 M 酢酸ナトリウム(pH5.2) 30 μl を加え、ボルテックスでよく攪拌してから冷凍庫で 5 分間、静置させた。その後、15,000 rpm で 30 分間、4°C で遠心した。遠心後、すみやかに上清みをデカンテーションで除去した。上清みを除去した後、70%エタノールを 1 ml 加え、再び 15,000 rpm で 10 分間、4°C で遠心した。遠心後、上清みをデカンテーションで除去した後、15 分間、遠心エバポレーターで乾燥させた。乾燥後、15 μl の滅菌水に再懸濁させた。

反応前の標的 DNA を 30 pmol として、滅菌水に再懸濁させた DNA サンプル 10 μl (20

pmol)と 5'末端が Cy5 で蛍光標識された 10 μ M のプライマー(Table 2-2, Primer) 1 μ l (10 pmol)を混合し、TaKaRa から購入した Ex Taq に付属する試薬、2.5 mM dNTP mixture 6 μ l (15 nmol)と 10 \times Ex Taq Buffer 3 μ l を加え、最終体積が 30 μ l になるように滅菌水を加えた。このとき最終濃度が 1 \times Ex Taq Buffer、0.5 mM dNTP mixture になるように調製した。調製したサンプルに 5.0 U/ μ l の Ex Taq 0.4 μ l (2.0 U)を加え、サーマルサイクラーを用いて以下のプログラムでプライマー伸長反応を行った【95 $^{\circ}$ C:5 分 \rightarrow 4 $^{\circ}$ C:5 分 \rightarrow 52 $^{\circ}$ C:1 時間】。反応後、サンプルに 0.5 M EDTA-NaOH (pH8.0)を 5 μ l 加え、酵素反応を停止させた。反応を停止した DNA サンプルは、エタノール沈殿を行い粗精製した。エタノール沈殿後、ローディング緩衝液【ホルムアミド(Wako) 24 μ l と 1 \times TBE 緩衝液 6 μ l】を加え再懸濁させた。再懸濁させたサンプルをヒートブロックで 5 分間、95 $^{\circ}$ C で加熱した後、氷上で 5 分間冷却した。

Table 2-2. プライマー伸長反応で使した DNA 配列

Oligo DNAs
Target DNA3 (T20-C1, 20mer) 5'-GACTGGGTTTGGAGTGTTC-3'
Target DNA4 (T20-M1, 20mer) 5'-GAMTGGGTTTGGAGTGTTC-3'
Primer (P14-Cy5, 14mer) 5'-Cy5-CAAACACTCCAAAC-3'
A+G Marker (T20-comp-Cy5, 20mer) 5'-Cy5-CAAACACTCCAAACCCAGTC-3'

2-2-5 マキサムギルバート法による A+G マーカーの調製

マキサムギルバート法を用いて DNA マーカーの作製を行った。マキサムギルバート法は、DNA を構成する A (アデニン)、T (チミン)、G (グアニン)、C (シトシン)の 4 つの塩基の内、特定の塩基を化学修飾し、特異的に分解・切断した後にポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うことで塩基配列を解読する手法である。本実験では、標的 DNA の相補鎖から成る DNA 鎖(Table 2-2, A+G Marker)の A と G の部位で切断した A+G マーカーの作製を行った。

30 μ M の A+G マーカーを 10 μ l (300 pmol)と滅菌水 14 μ l を混合した後に、1 M のピペリジンフォルメイト(ギ酸を 10 M のピペリジンで pH2.0 に調製した溶液) 4 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 90 分間加熱した。その後、0.3 M の酢酸ナトリウム(pH7.0)を 240 μ l、冷凍庫(-20.0 $^{\circ}$ C)で冷却しておいた 100%エタノール 900 μ l を加え、冷凍庫で 5 分間冷却した後に 15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心し、上澄み液を除去した。その後、0.3 M の酢酸ナトリウム(pH5.2) 300

μl と100%エタノール(-20.0°C) 900 μl を加え、同様に冷却・遠心を行った。上澄みを除去し、100%エタノールを900 μl 加え、同様の遠心を行い、溶液を乾燥させた後に、1 M ピペリジン水溶液を100 μl 加え、90°Cで180分間加熱し、遠心エバポレーターで一晩溶液を乾燥させた。乾燥後、滅菌水を20 μl 加え、30秒間攪拌した後に、10秒間遠心し、40分間遠心エバポレーターで乾燥を行った。この操作を2回繰り返した後に、1×TBE緩衝液20 μl に溶解させ、ホルムアミドで8倍に希釈し、電気泳動用のA+Gマーカーとして泳動した。

2-2-6 変性ポリアクリルアミドゲルの作製および泳動条件

Acrylamide (Wako) 38 gと*N,N'*-Methylene-bis (BIS, Wako) 2 gを19:1の割合で量り取り、超純水に溶解させ、100 mlにメスアップすることで40%(w/v)のアクリルアミドストック溶液を調製した。アクリルアミドストック溶液は、遮光して冷蔵庫で保存した。

続いて、このアクリルアミドストック溶液11.875 mlに10×TBE緩衝液2.5 ml、変性剤としてUrea (Wako) 10.51 g、重合促進剤として10% (w/v) Ammonium Peroxodisulfate (APs, Wako)水溶液250 μl を加えた後、超純水で25 mlへとメスアップすることで最終的に1×TBE緩衝液に溶解した7 M Ureaを含む19%の変性ポリアクリルアミドゲル溶液を調製した。この溶液に重合開始剤として*N,N,N',N'*-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED, Wako)を12.5 μl 加え、一晩重合反応を進めることで19%(w/v)ポリアクリルアミドゲルを作製した。なお電気泳動を行う前には100 V、20 mAで30分間の予備電気泳動を行った。

作製した7 M Ureaを含む19%の変性ポリアクリルアミドゲルにDNAサンプル6 μl 、A+Gマーカー6 μl をそれぞれアプライした。電気泳動は以下の条件で行った【300 V, 20 mA, 150分間】。泳動槽の緩衝液には1×TBE緩衝液を使用した。

電気泳動後のゲルは、蛍光イメージ分析装置、Typhoon9400 (GE Healthcare)により、解析した。蛍光は、プライマーの5'末端に標識されたCy5を検出した。蛍光スキャンは以下の条件で行った【Acquisition mode: Fluorescence, Laser: 633, Emission filter: 680BP30, PMT: 600 V, Focal plane: +3 mm, Image analysis: ImageQuant】

2-3 結果及び考察

2-3-1 修飾前と修飾後の DNA 鎖における HPLC/MS 分析結果

シトシン(C)またはメチルシトシン(M)を 1 ヲ所含む DNA 鎖を 1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M のメトキシアミン(pH5.0)で 30 分間、25°Cで反応した後、HPLC 分析と TOF-MS を用いて質量分析を行い、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによる反応が非メチル化シトシン特異的であり、メチルシトシンでは反応しないことを確認した。反応前と反応後の C を 1 ヲ所含む DNA 鎖の構造変化を Fig. 2-2、M を 1 ヲ所含む標的 DNA の反応前と反応後の構造を Fig. 2-3 に示す。

反応前の C を 1 ヲ所含む 12 塩基の標的 DNA (DNA1)を HPLC 分析した結果を Fig.2-4 に示す。また、Fig. 2-4 の 254 nm におけるピーク 1 を回収し、質量分析した結果を Fig. 2-5 に示す。反応前の C を 1 ヲ所含む 12 塩基の標的 DNA1、5'-GACTGATAGATG-3'の分子式は $C_{119}H_{148}N_{49}O_{69}P_{11}$ であり、ChemDraw で計算した DNA1 の質量数は 3707.67 である。また、DNA のリン酸基などが 3 ヲ所プロトン化された 3 価の質量数は 1235.22 である。Fig. 2-4 のピーク 1 を TOF-MS で質量分析した結果、質量数は 1235.07 であり、3 価の計算値 1235.22 とほぼ一致していることが確認された(Fig. 2-5)。

次に、反応後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M のメトキシアミン(pH5.0)で 30 分間反応した DNA1 の HPLC 結果を Fig. 2-6 に示す。反応前の DNA1 と異なり、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 DNA1 は新たに 2 つのピークが確認された。それぞれのピーク 1~3 を回収して質量分析した MS スペクトル結果を Fig. 2-7, -8, -9 に示す。

ピーク 1 の MS スペクトル、Fig. 2-7 では、5 価と 6 価の状態が強く観測された。DNA1 の 5 価の計算値は 740.73 で、実際に検出された質量数は 740.67 であり、計算値と実測値がほぼ一致していることから Fig. 2-6 のピーク 1 は未反応の DNA1 であることが確認できる。また、Fig. 2-7 の拡大した MS スペクトルに複数のシグナルが確認されたが、それぞれアンモニウムイオンまたはナトリウムイオンが付加されたピークであることを確認した。反応後のピーク 2 と 3 の MS スペクトルを Fig. 2-8 と Fig. 2-9 に示す。ピーク 2 と 3 が亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンにより化学修飾されたシトシン誘導体、スルホ基とメトキシアミンが 1 つずつ付加された N^4 -methoxy-5,6-dihydrocytosine-6-sulfonate を形成していると推測した場合、DNA1 の分子式が $C_{119}H_{148}N_{49}O_{69}P_{11}$ から $C_{120}H_{152}N_{49}O_{73}P_{11}S$ に変化し、質量数が 3707.67 から 3819.65 へ増大することが予測される。実際に、反応後のシトシン誘導体を含む DNA1 ($C_{120}H_{152}N_{49}O_{73}P_{11}S$)の 4 価の計算値は 954.16 であり、ピーク 2 と 3 のそれぞれの実測値は 954.10 と 954.06 であった。従って、ピーク 2 と 3 は、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによりシトシンの 4 位にメトキシアミン、6 位にスルホ基が付加された N^4 -methoxy-5,6-dihydrocytosine-6-sulfonate を形成していることが推測

される。ピーク 2 と 3 が同じ質量数であるのは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。また、2 つ以上のスルホ基やメトキシアミンが付加された場合のピークおよび MS スペクトルが確認されなかったことから、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによる DNA への化学修飾は、シトシン特異的な反応であることが示唆される。

次に、M を 1 ヲ所含む DNA2 でも同様の実験を行った。反応前の DNA2 の HPLC 結果を Fig. 2-10 に示す。また、Fig. 2-10 のピーク 1 における質量分析の結果を Fig. 2-11 に示す。DNA2、5'-GAMTGATAGATG-3'の分子式は、メチル基が 1 つ付加された $C_{120}H_{150}N_{49}O_{69}P_{11}$ である。また、ChemDraw で計算した DNA2 の質量数は 3721.68 である。Fig. 2-10 のピーク 1 を質量分析した結果、質量数 743.43 と 619.36、530.80 のシグナルが強く確認された (Fig. 2-11)。これらのシグナルはそれぞれ DNA2 が 5 価(743.53)、6 価(619.44)、7 価(530.80)の時の計算値とほぼ一致している。

続いて、反応後の DNA2 の HPLC 結果を Fig. 2-12 に示す。また、Fig. 2-12 のピーク 1 の質量分析結果を Fig. 2-13 に示す。HPLC と MS スペクトルから M を 1 ヲ所含む DNA2 では、反応前と反応後ともにピークが 1 つであり、MS スペクトル結果からも同一の分子であることが確認された。この結果から、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム水溶液(pH5.0)と 1.0 M のメトキシアミン(pH5.0)で 30 分間、25°Cで反応した場合、メチルシトシンは全く反応しないことがわかる。これらの結果から、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによる化学修飾は、非メチル化シトシン特異的であり、メチルシトシンを含め他の 3 つの塩基(A, T, G)では反応しないことが示された。従って、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによる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。

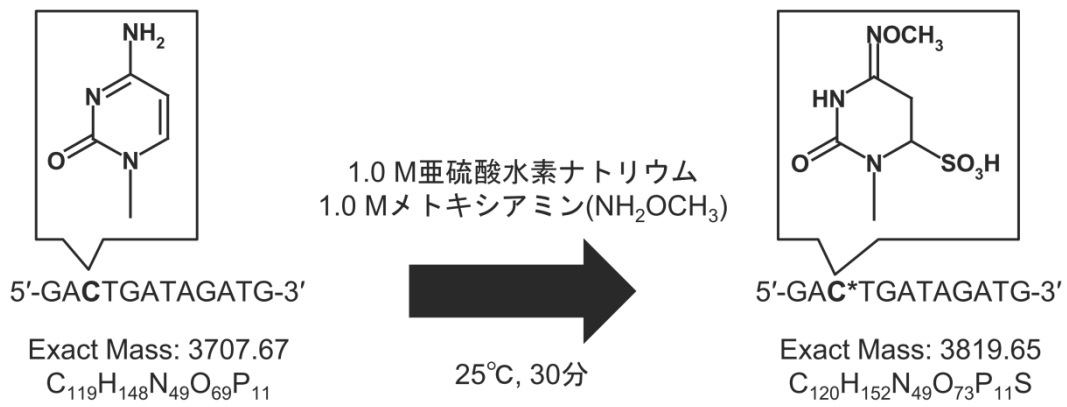


Fig. 2-2 C を 1 ヲ所含む DNA 鎖の反応前と反応後の構造

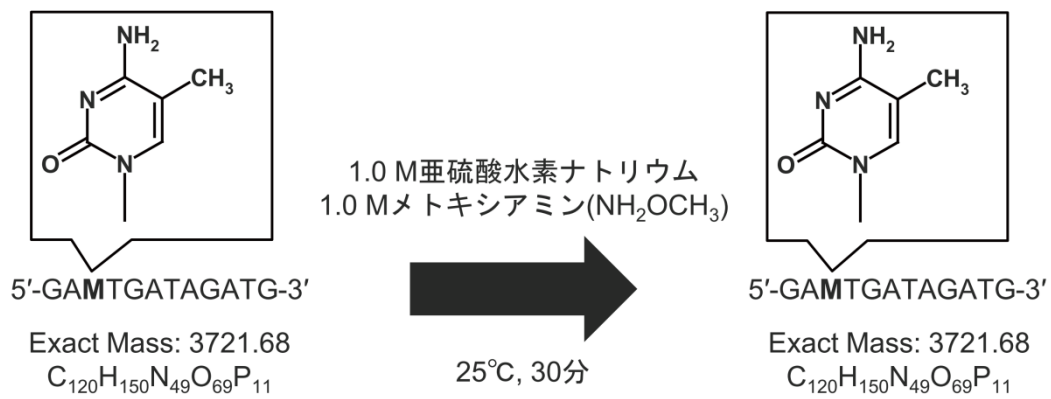


Fig. 2-3 M を 1 ヲ所含む DNA 鎖の反応前と反応後の構造

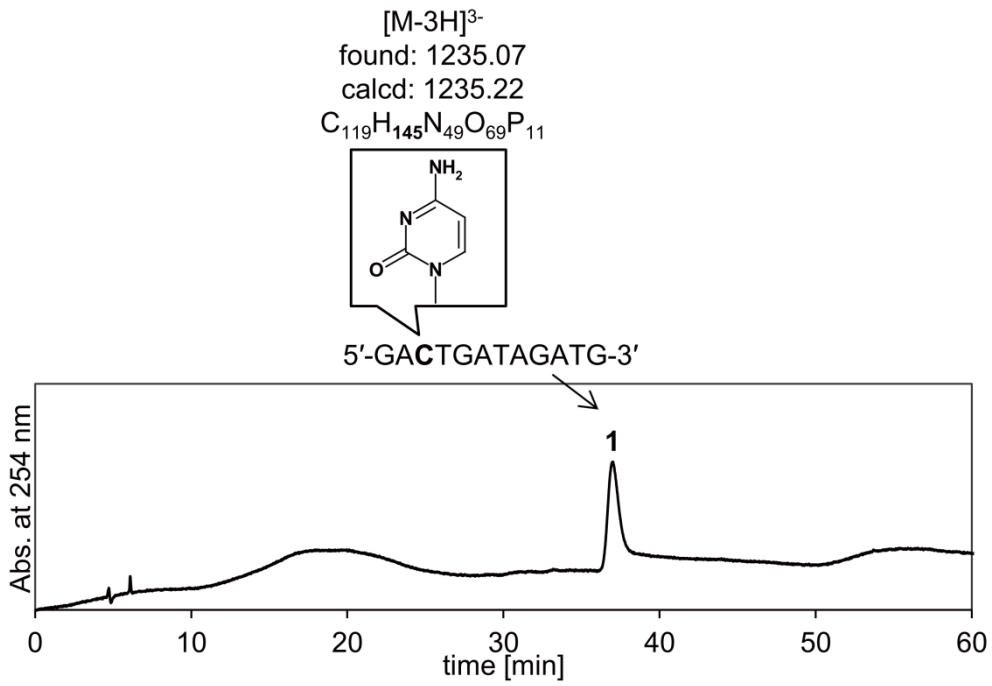


Fig. 2-4 反応前の DNA1 の HPLC 結果

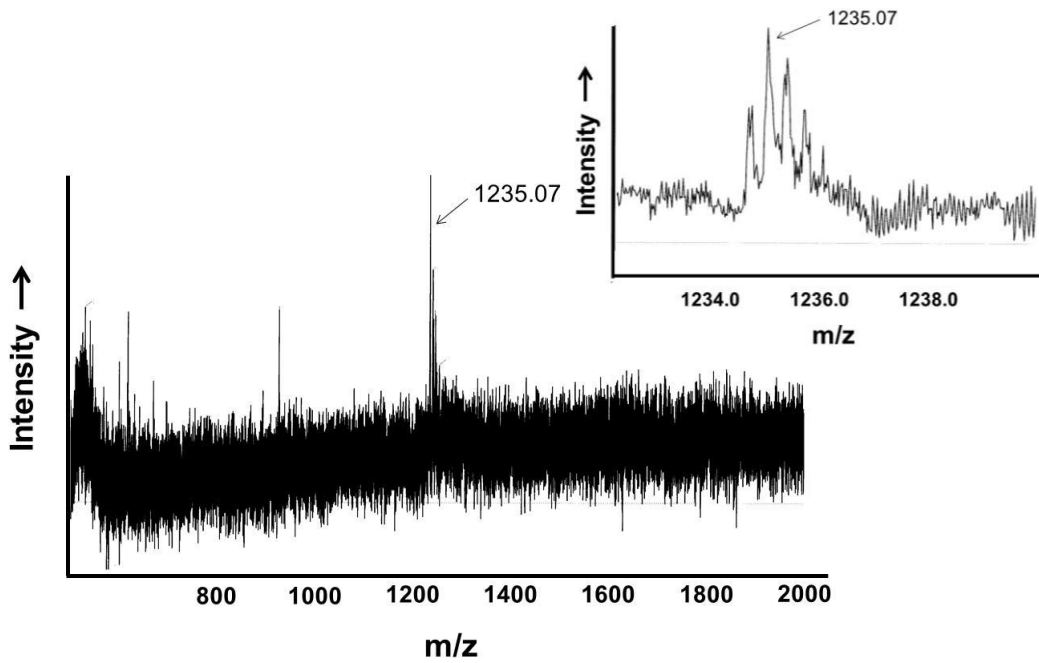


Fig. 2-5 反応前の DNA1 のピーク 1 における MS スペクトル結果

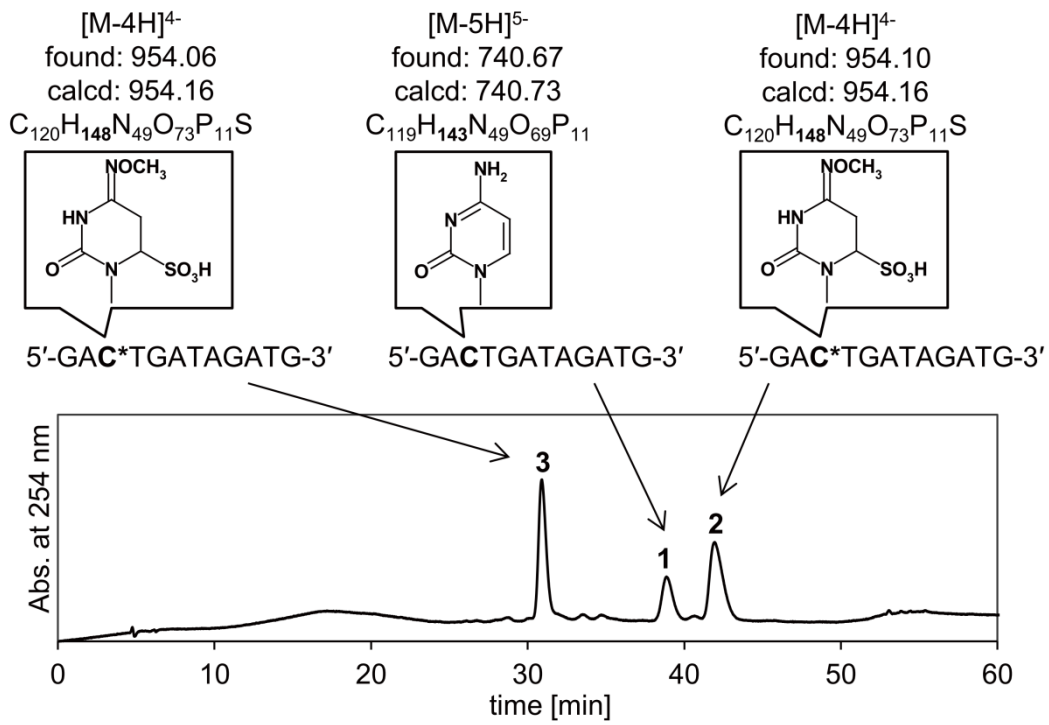


Fig. 2-6 反応後の DNA1 の HPLC 結果

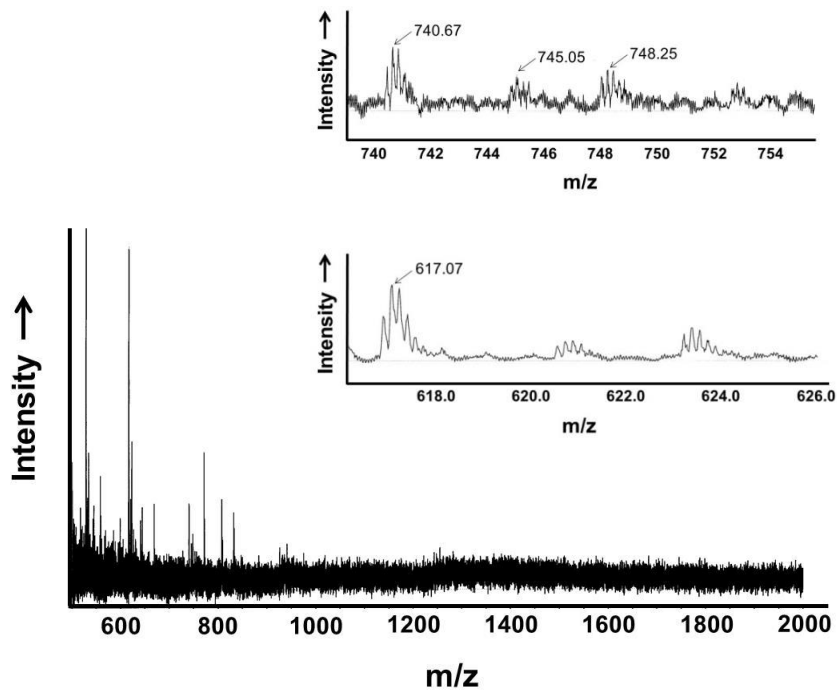


Fig. 2-7 反応後の DNA1 のピーク 1 における MS スペクトル結果

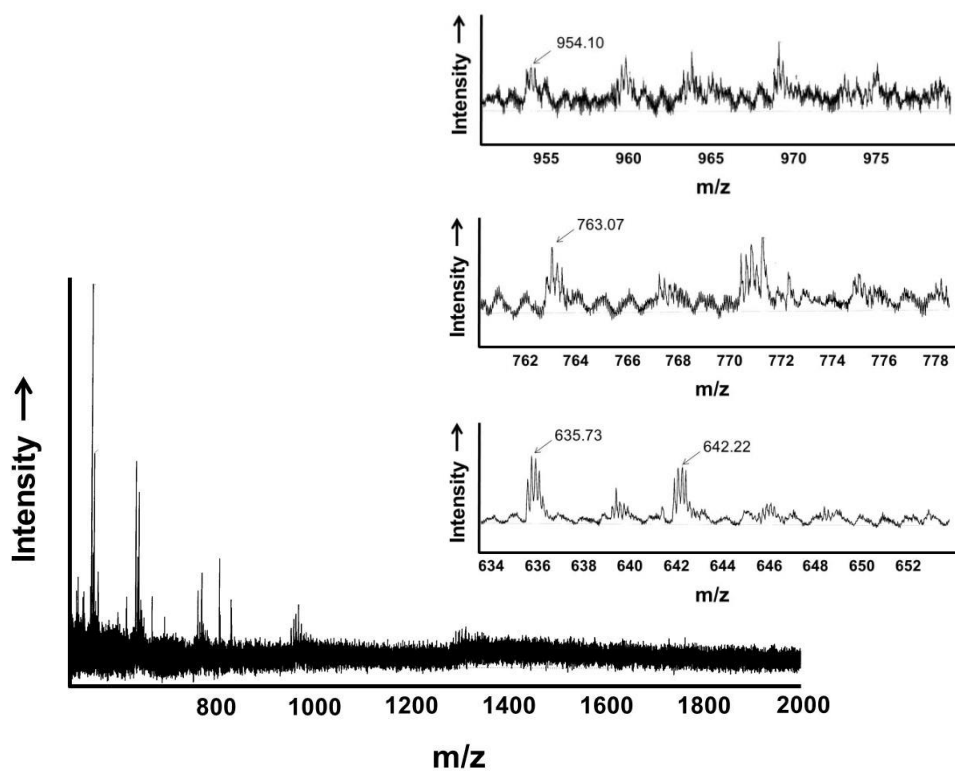


Fig. 2-8 反応後の DNA1 のピーク 2 における MS スペクトル結果

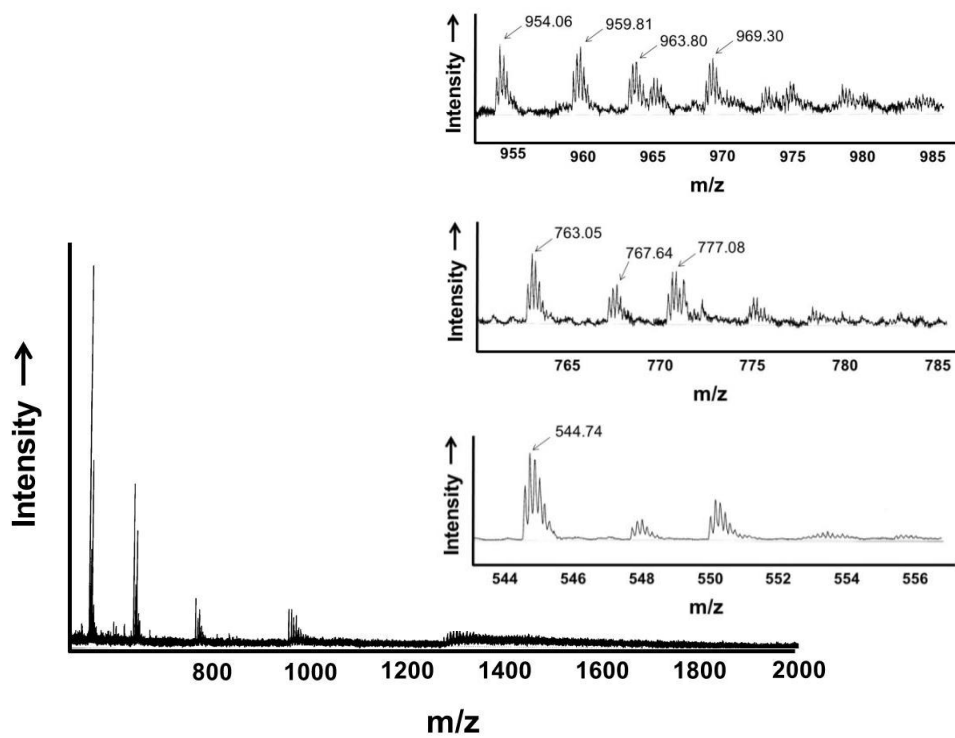


Fig. 2-9 反応後の DNA1 のピーク 3 における MS スペクトル結果

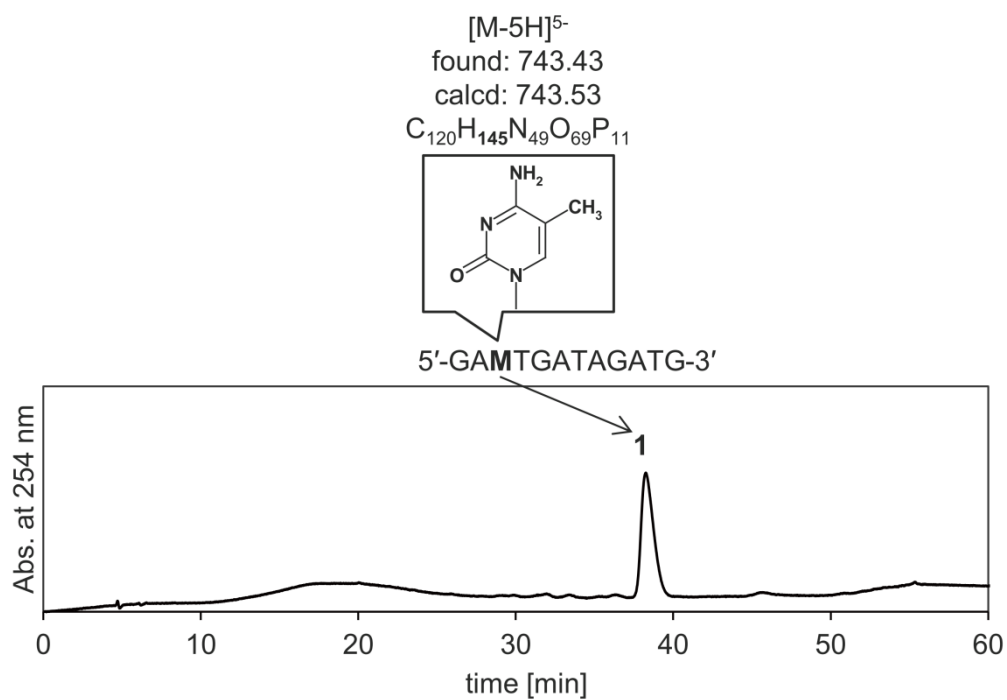


Fig. 2-10 反応前の DNA2 の HPLC 結果

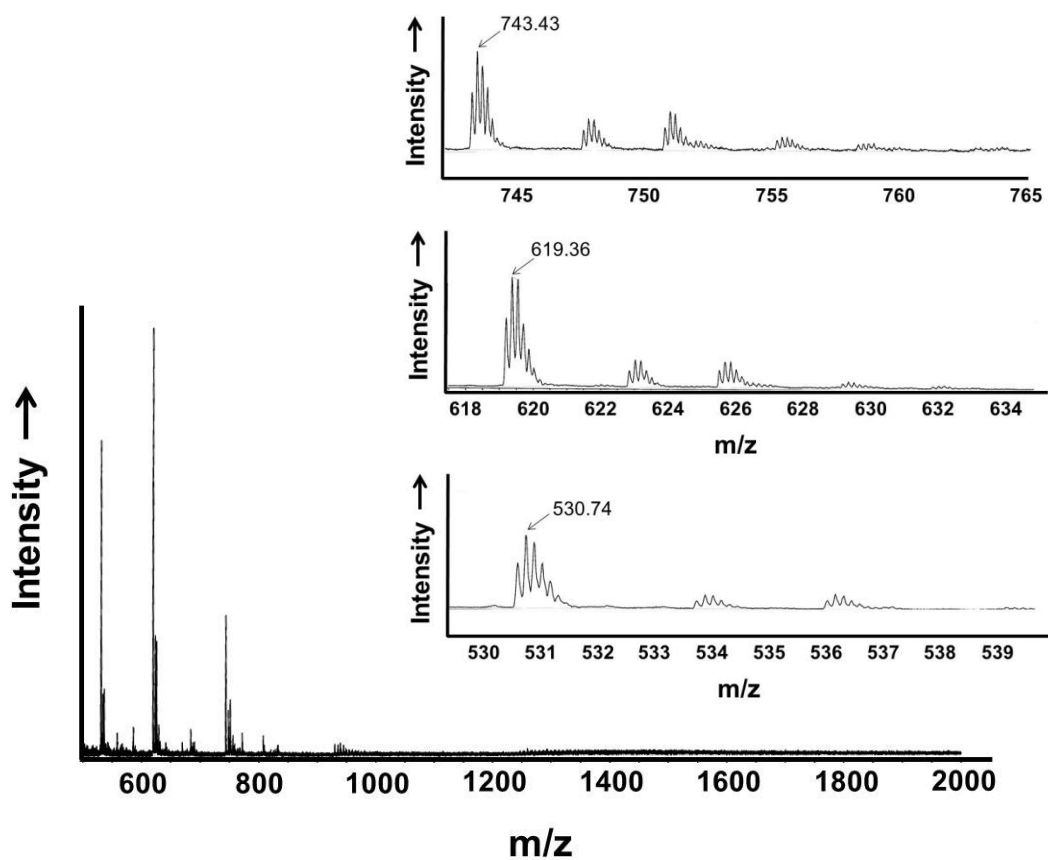


Fig. 2-11 反応前の DNA2 のピーク 1 における MS スペクトル結果

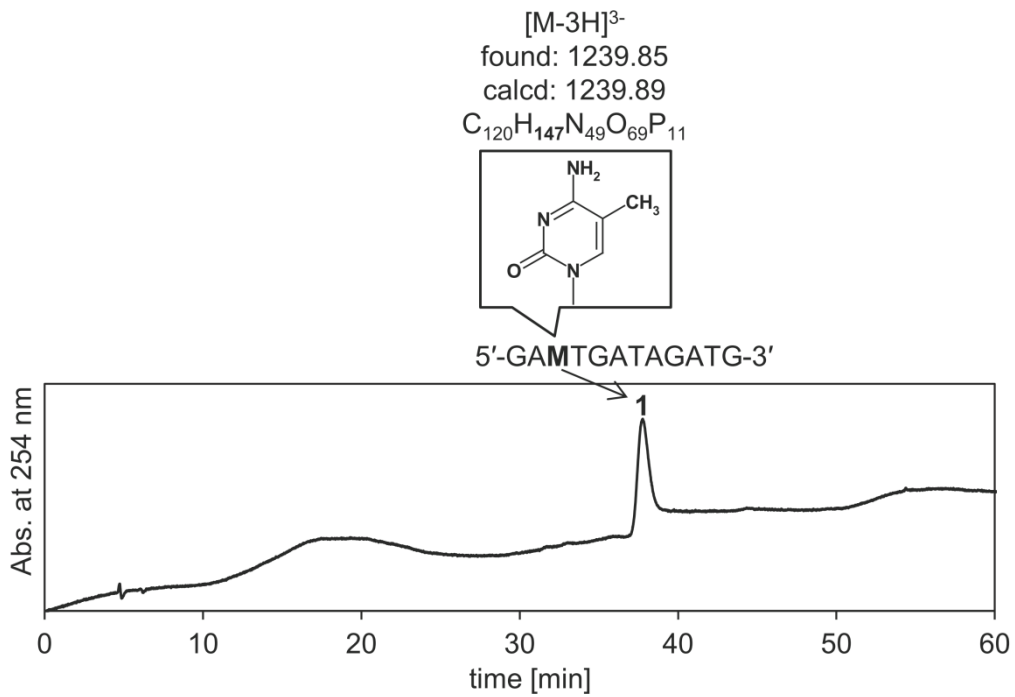


Fig. 2-12 反応後の DNA2 の HPLC 結果

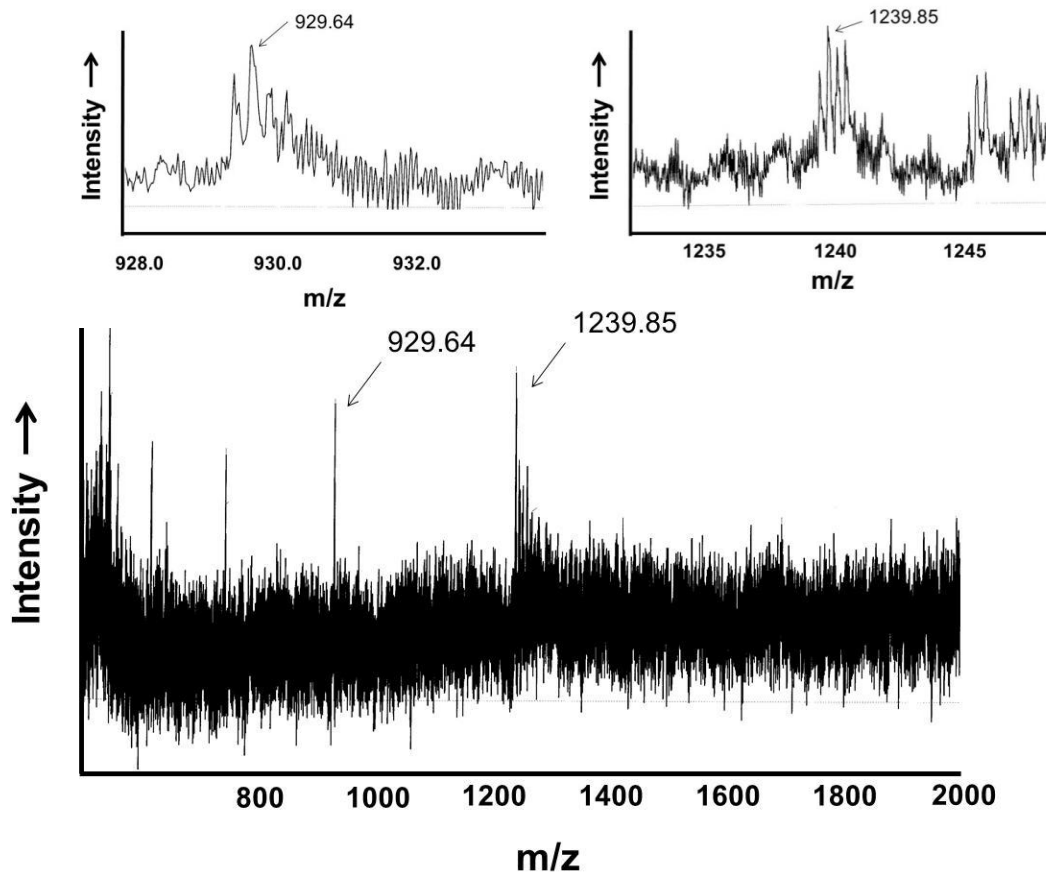


Fig. 2-13 反応後の DNA2 のピーク 1 における MS スペクトル結果

2-3-2 修飾前と修飾後の DNA 鎖を鋳型としたプライマー伸長反応の比較

2-3-1 で、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによる化学修飾は、非メチル化シトシン特異的な付加反応であり、メチルシトシンでは反応しないことが確認された。また、早津らによって、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンで化学修飾されたシトシン誘導体、*N*⁴-methoxy-5,6-dihydrocytosine-6-sulfonate が DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成を阻害することが報告されている⁵⁷。そこで、シトシンとメチルシトシンの化学反応性の違いを利用して、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 鎖におけ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か実験を行った。

まず、C または M を 1 ヶ所含む 20 塩基の標的 DNA、5'-GAXTGGGTTTGGAGTGTGG-3' (X = C または M) を 1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M のメトキシアミン(pH5.0)で 5 時間、25°C で反応を行った後、それぞれの標的 DNA を鋳型にプライマー伸長反応を行い、7 M Urea を含む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有無を調べた。実験方法の概略図を Fig. 2-14 に、電気泳動の結果を Fig. 2-15B と Fig. 2-16 に示す。

Fig. 2-15B より、Lane 1 のプライマーのみと、反応前の標的 DNA を鋳型にプライマー伸長反応を行った Lane 2, 3 を比較すると X が C または M に関わらず、ほぼ完全に相補鎖が合成されていることが確認できる。この結果から、通常の DNA ポリメラーゼを用いた核酸分子増幅法などではメチル基の識別が困難であることが示唆される。

Lane 4 と 5 に、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標的 DNA を鋳型にプライマー伸長反応を行った結果を示す。Lane 4 の X が C の時、プライマーからの伸長反応が途中で阻害され、短い DNA 鎖が新たに生成されていることが確認できる。一方、Lane 5 の X が M の場合では、反応前と同様にほぼ完全に相補鎖が合成されていることが確認できる。Lane 4 の短い DNA 鎖と左端の A+G マーカー、Fig. 2-15A の切断部位と比較すると G18、化学修飾されたシトシン誘導体の一塩基手前で伸長反応が阻害されていることが確認できる。この結果は、早津らの報告とも一致している⁵⁷。通常、核酸塩基、プリン環やピリミジン環は平面的な構造を形成していることが知られている。一方、シトシン誘導体では、スルホ基の付加反応などにより、嵩高い構造へ変化していることが推測される。従って、化学修飾されたシトシン誘導体は、DNA ポリメラーゼにより塩基として認識されなくなり、シトシン誘導体の一塩基手前で伸長反応がストップされたと考えられる。また、早津らは 6 位のスルホ基の向きの違いによる異性体、ジアステレオマーを単離して、両方の異性体で DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成が阻害されることを確認している。

1.0 M のメトキシアミンと 1.0 M の亜硫酸水素ナトリウムを併用して反応した時と同条件下で、DNA3、5'-GACTGGGTTTGGAGTGTGG-3' を 1.0 M のメトキシアミンまたは 1.0 M の亜硫酸水素ナトリウムのみで反応を行った。それぞれの試薬で反応した標的 DNA を鋳型にプライマー伸長反応を行った結果を Fig. 2-16 に示す。Lane 3 と 4 の結果から、メトキシ

アミンまたは亜硫酸水素ナトリウムのみで反応を行った場合には、プライマーからの伸長反応の阻害は確認されなかった。この結果から、メトキシアミンまたは亜硫酸水素ナトリウムのみによるシトシンへの反応は非常に遅い、または化学修飾された場合でも DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成を阻害しないことが示唆される。

これらの結果から、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンで化学修飾されたシトシン誘導体による相補鎖合成の阻害は、非メチル化シトシン特異的でありプライマー伸長反応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、新しい反応によるメチル化 DNA 検出法の開発は、近年発見された 5-ヒドロキシメチルシトシンや 5-ホルミルシトシン、5-カルボキシルシトシンなど従来法では検出が困難な新しい修飾シトシンを識別するのに役立つ可能性がある。

例えば、ナノポアシーケンシングではシトシンと 5-メチルシトシンの差が僅かであるため、シグナルも小さく識別することが困難だが、非メチル化シトシンを亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンで化学修飾することで塩基の物性を大きく変化させることができるため、シグナル増幅に繋がりメチル基を明確に識別できるようになる可能性が考えられる。また、亜硫酸水素ナトリウムで 5-ヒドロキシメチルシトシンを反応した場合、5 位のヒドロキシル基がスルホ基に置換されることが報告されている⁵⁸。従って、スルホ基とメトキシアミンが付加されたシトシン、スルホ基のみが付加された 5-ヒドロキシメチルシトシン、未修飾の 5-メチルシトシンと 3 種類の塩基の差を増幅して明確に識別できる可能性が期待できる。

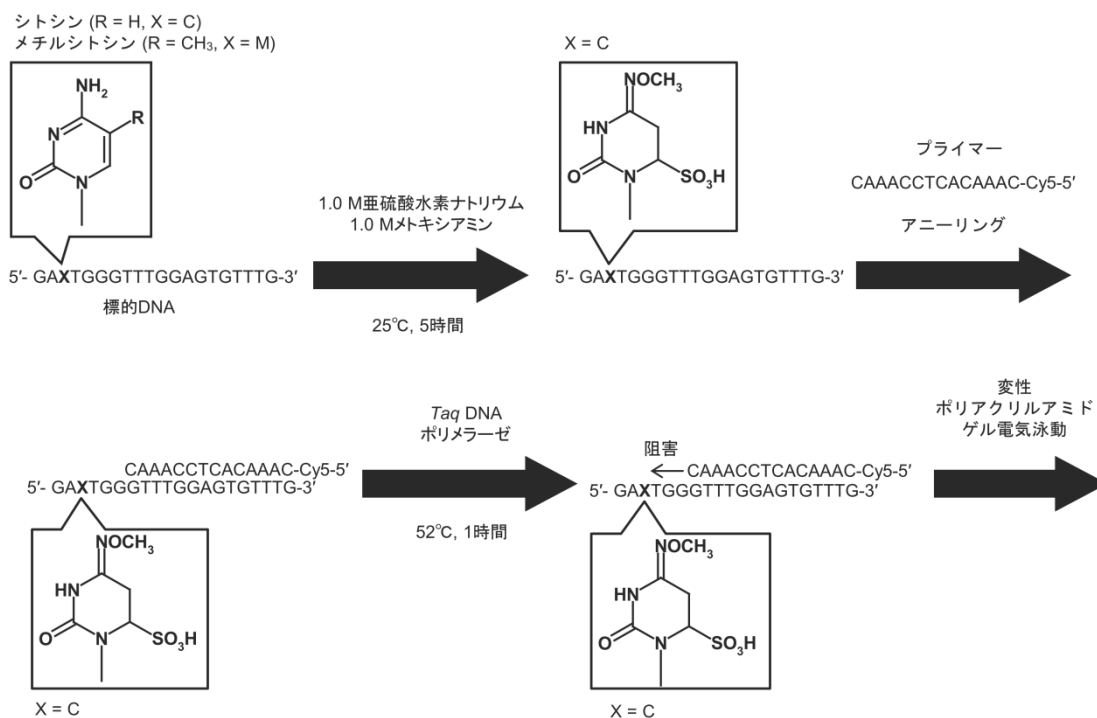
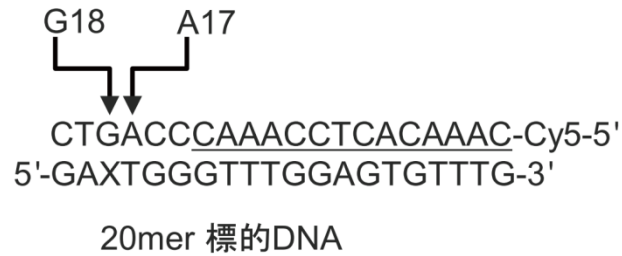


Fig. 2-14 プライマー伸長反応の有無を指標としたメチル基識別法の概略図

(A)



(B)

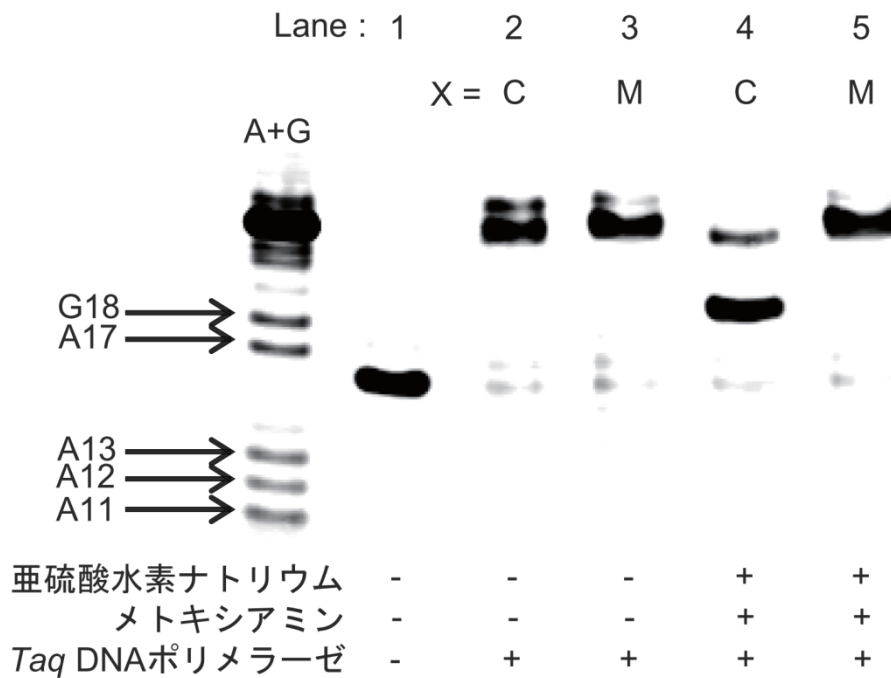


Fig. 2-15 プライマー伸長反応の結果

(A)は、下線の5'末端が蛍光標識されたプライマー配列が標的DNAに結合し、完全に相補鎖合成された場合の模式図とマキシサムギルバート法による切断部位を示す。(B)は、プライマー伸長反応の結果を示す。左端のA+Gは、標的DNAの相補鎖を用いてマキシサムギルバート法により作製したA+Gマーカ、Lane 1はプライマーのみ、Lane 2と3はXがCまたはMの反応前の標的DNAを鋳型にプライマー伸長反応を行った結果を示す。Lane 4と5は、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンで処理した標的DNAを鋳型にプライマー伸長反応を行った結果を示す。

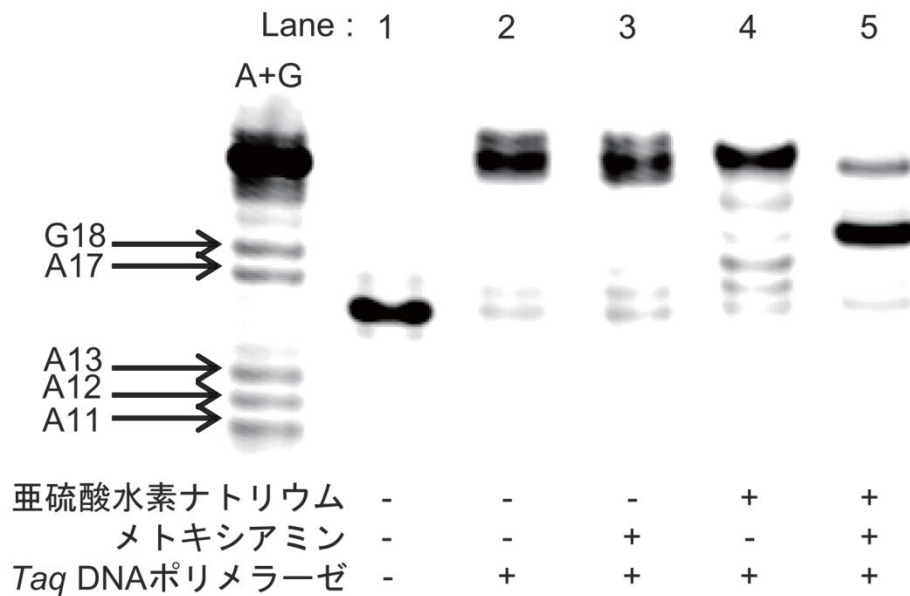


Fig. 2-16 プライマー伸長反応の阻害の有無

左端の A+G は、標的 DNA の相補鎖を用いてマキシムギルバート法により作製した A+G マーカー、Lane 1 はプライマーのみを電気泳動した結果を示す。Lane 2 は反応前の X が C の標的 DNA3 を鋳型にプライマー伸長反応を行った結果を示し、Lane 3 は 1.0 M のメトキシアミン(pH5.0)で反応した標的 DNA を鋳型にプライマー伸長反応を行った結果を示す。Lane 4 は、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)で反応した標的 DNA、Lane 5 は 1.0 M のメトキシアミン(pH5.0)と 1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)で反応した標的 DNA をそれぞれ鋳型にプライマー伸長反応を行った結果を示す。

2-4 結言

本章では、非メチル化シトシン特異的な化学修飾法の確立および新規メチル基識別法の開発を試みた。具体的にはシトシンまたはメチルシトシンを1カ所含む短いDNA鎖を用いて、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによる反応後のDNA鎖の変化をHPLC分析とMSを用いて質量分析を行った。また、化学修飾されたDNA鎖の物性変化、特性を利用したメチル基識別法の開発として、修飾後の標的DNA鎖を鋳型としてプライマー伸長反応を行い、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成の障害の有無を確認した。

シトシンまたはメチルシトシンを1カ所含む12塩基のDNA鎖を用いて反応前と反応後の物性、質量数の変化を調べた結果、シトシンを1カ所含むDNA鎖でのみ反応後のHPLCで新しいピークが確認された。メチルシトシンを含むDNA鎖では、反応前と反応後でHPLCのピークに変化は確認されず、質量数にも変化は確認されなかった。

シトシンを1カ所含むDNA鎖で新たに確認されたピークを質量分析した結果、質量数の変化からメトキシアミンとスルホ基がそれぞれ1つずつ付加されたシトシン誘導体、*N*⁴-methoxy-5,6-dihydrocytosine-6-sulfonateを形成していることが推測された。これらの結果から、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによる反応は非メチル化シトシン特異的な反応であり、メチルシトシンを含め他の3つの塩基(A, T, G)では反応しないことが示された。また、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標的DNAを鋳型としてプライマー伸長反応を行った結果、化学修飾されたシトシン誘導体でのみDNAポリメラーゼによる相補鎖合成の障害が確認された。

以上の結果から、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標的DNAを鋳型にプライマー伸長反応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、本研究で新たに耐熱性、*Taq* DNAポリメラーゼでも修飾後のシトシン誘導体による相補鎖合成の障害が確認され、PCR増幅など一般的な核酸分子増幅法を利用した簡便なメチル化DNA検出法への応用が示唆された。新しいメチル基識別法の開発は、5-ヒドロキシメチルシトシンなどの新しい修飾シトシンを識別できる可能性があり、脱メチル化機構の解明などエピジェネティクス研究において重要なツールとなりえる。また、異なる反応系・検出系でのメチル化DNA検出法の開発は、従来法でメチル化を解析するのが困難な領域をカバーできる可能性があり、詳細な遺伝子発現のプロファイリング、エピゲノムマップの作成に役立つと考えられる。

第3章 DNAプローブを利用した一塩基選択的な化学修飾法の探索

3-1 緒言

本章では、DNAプローブを用いた一塩基選択的な化学修飾法の探索を行う。第2章では、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによる反応が非メチル化シトシン特異的であり、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を確認した。その結果、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鎖を鋳型に、プライマー伸長反応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。しかしながら、この反応を一本鎖DNAで行った場合、DNA鎖中の全てのシトシンが修飾されてしまいプライマーとの結合および伸長反応を阻害してしまい解析できる配列に大きな制限がかかることが予測される。従って、通常のPCRやダイデオキシ法、パイロシーケンシング法などの核酸分子検出法で、簡便にメチル基を識別することが困難であると考えられる。

特定の CpG 配列のみをピンポイントで化学修飾し、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成の阻害を一塩基単位で制御することができれば、PCRなど一般的な分子生物学的手法による検出系への応用が期待でき、簡便な検出法へのアプローチの幅が広がると考えられる。そこで、第3章ではDNAの分岐構造である Three-way junction (TWJ)構造を形成するDNAプローブやミスマッチDNA、バルジDNAなど非二本鎖構造を形成するDNAプローブを用いた一塩基選択的な化学修飾法の探索を行う。

DNAの分岐構造は、相同組み換えの際の four-way junction (Holliday junction)やDNAを複製する際の複製フォーク、RNAの自己構築による高次構造など生体内で頻繁に構成され、生物学的現象の重要な役割を担っている。中でもTWJ分子は、分岐点上に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(Fig. 3-1)^{59,60}。TWJ分子の分子認識機能を利用したSNP検出などバイオセンサーへの応用以外にも、TWJ分子はDNA折り紙やDDS、ナノケミカルデバイスなど様々な用途に利用され、研究されている^{61,62,63,64}。

TWJ分子は、3つのステムから成るY字型の錐体幾何学構造を形成しており、6つの塩基からなる分岐点はナノスケール、直径約1.2nmの空洞を形成していることが報告されている^{65,66}。通常のWatson-Crick塩基対から成る二重らせん構造は、0.34nmの間隔で塩基が密に積み重なり、スタッキングされているため、酸化剤や求核剤による暴露から保護されている。一方、分岐点上は、ナノスケールの大きな空洞を形成しており、分岐点上に位置する塩基は同軸上にスタッキングされていないため、酸化剤や求核剤などの試薬に対して高い反応性を示すことが報告されている⁵⁹。そこで、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プローブを結合させ、TWJ構造を形成させた標的DNAを用いて、第2章で行った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い、分岐点上のシ

トシンを選択的に化学修飾し、メチル化をピンポイントで検出できるか実験を行う。

DNA の高次構造を利用して特定のシトシンを選択的に化学修飾し、プライマー伸長反応の有無でメチル基を識別することが出来れば、PCR やパイロシーケンスによる簡便なメチル化 DNA 検出への応用が期待できる。また、緒論で述べたように、バルジ DNA やミスマッチ塩基対を形成する DNA プロブを用いた配列選択的な化学修飾法が報告されているため³⁵、TWJ 構造以外の非二本鎖構造として、バルジ DNA プロブとミスマッチ DNA プロブを用いて同様の実験を行い、選択性と反応性の比較を行う。

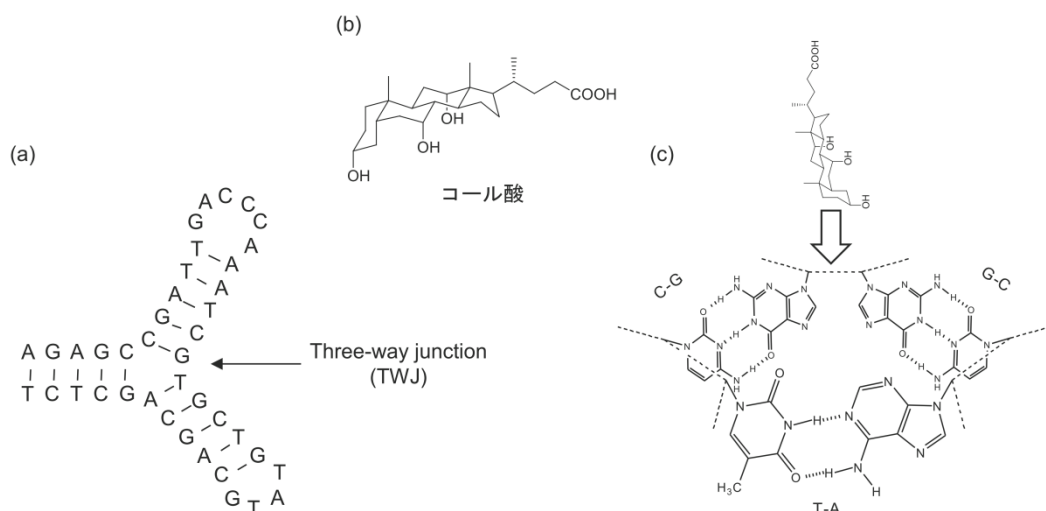


Fig. 3-1 Three-way junction (TWJ)構造の模式図とコール酸

(a) TWJ 構造の推定二次構造 (b)コール酸 (c) TWJ 構造の分岐点を拡大した模式図

3-2 実験方法

3-2-1 試薬の調製

アミノオキシ化合物は、第 2 章で使用したメトキシアミン塩酸塩($\text{NH}_2\text{OCH}_3 \cdot \text{HCl}$, ALDRICH)以外にエチルヒドロキシルアミン塩酸塩($\text{NH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3 \cdot \text{HCl}$, ALDRICH)、イソブチルヒドロキシルアミン塩酸塩($\text{NH}_2\text{OCH}_2\text{CH}[\text{CH}_3]_2 \cdot \text{HCl}$, TCI)、カルボキシメチルヒドロキシルアミンヘミ塩酸塩($\text{NH}_2\text{OCH}_2\text{COOH} \cdot 1/2\text{HCl}$, TCI)を使用した。それぞれの試薬を量りとり、2-2-1 と同様に濃度が 3.0 M、pH が 5.0 になるように調製した。調製したアミノオキシ化合物は冷蔵庫で保存した。また、第 2 章で作製した 8×HEPES 緩衝液 1 (400 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)と 7 M Urea を含む 19%の変性ポリアクリルアミドゲルを使用して実験を行った。

3-2-2 TWJ プローブを用いた化学修飾

実験で使用した DNA 配列(XにCまたはMを含む2種類の標的DNA I と DNA プローブ、プライマー)を Table 3-1 に示す。すべての DNA はつくばオリゴサービスから購入し、100 μ M になるように滅菌水を加え、冷凍庫で保存した。

300 nM の標的 DNA I を 5 μ l (1.5 pmol)と 6 μ M の TWJ プローブ 1, 2 をそれぞれ 1 μ l (6 pmol)ずつ加え、最終体積が 10 μ l になるように、HEPES 緩衝液 1 と滅菌水を加えた。この時、最終濃度がそれぞれ 150 nM 標的 DNA I、600 nM TWJ プローブ、50 mM HEPES/NaOH, 125 mM NaCl, pH6.0 の HEPES 緩衝液 1 になるように調製した。

調製した DNA サンプルをサーマルサイクラーで5分間、95°Cで加熱した後、氷上で冷却させ熱変性を行った。その後、4.0 M の亜硫酸水素ナトリウム水溶液(pH5.0) 7.5 μ l と 3.0 M のアミノオキシ化合物(pH5.0) 10 μ l、HEPES 緩衝液 1 を 2.5 μ l 加え、最終体積が 30 μ l になるように調製した。この時、亜硫酸水素ナトリウム水溶液とアミノオキシ化合物の最終濃度がそれぞれ 1.0 M になるように調製した。また、標的 DNA と TWJ プローブはそれぞれ 50 nM 標的 DNA I、200 nM TWJ プローブになるように調製した。調製したサンプルは 25°Cで 5 時間反応を行った。反応後、エタノール沈殿により試薬などの除去を行った後、15 μ l の滅菌水に再懸濁させた。

反応前の標的 DNA を 1.5 pmol として、再懸濁させた DNA サンプル 5 μ l (0.5 pmol)を鋳型にサイクリングプライマー伸長反応を行った。標的 DNA I は、X が C の標的 DNA と X が M の標的 DNA の 2 種類のサンプルで同様の操作を行った。また、TWJ プローブのかわりに滅菌水を加え、一本鎖標的 DNA のサンプルも同様に作製し、実験を行った。

Table 3-1. TWJ 構造を利用した一塩基選択的な化学修飾法で用いた DNA 配列

Oligo DNAs
Target DNA I (p16-56-2023X, X = C or M, 56mer) 5'-CTGATGAACATACTATCTTGCGCTCGGXGGC TGCGGAGAATTGAATAAGCTGGTAC-3'
TWJ Probe 1 (p16-P38-2023-1, 38mer) 5'-CCACCGCTCTGCCGAGCGCAAGATAGTATGTTTCATCAG-3'
TWJ Probe 2 (p16-P38-2023-2, 38mer) 5'-GTACCAGCTTATTCAATTCTCCGCAGCMAGAGCGGTGG-3'
Primer (P18-Fd-F, 18mer) 5'-FAM-GTACCAGCTTATTCAATT-3'
Forward Primer (P18-Fd, 18mer) 5'-GTACCAGCTTATTCAATT-3'
Reverse Primer (P18-Rv, 18mer) 5'-CTGATGAACATACTATCT-3'

3-2-3 サイクリングプライマー伸長反応

3-2-2 で調製した DNA サンプルを $5\ \mu\text{l}$ ($0.5\ \text{pmol}$) と $2.5\ \mu\text{M}$ の 5'末端が FAM で蛍光標識されたプライマー(P18-Fd-F)を $1\ \mu\text{l}$ ($2.5\ \text{pmol}$)、 $2.5\ \text{mM}$ dNTP mixture (TaKaRa)を $4\ \mu\text{l}$ ($10\ \text{nmol}$)、 $10\times$ Ex Taq Buffer (TaKaRa)を $5\ \mu\text{l}$ 加え、最終体積が $50\ \mu\text{l}$ となるように滅菌水を加えた。調製した DNA サンプルに $5.0\ \text{U}/\mu\text{l}$ の Ex Taq を $0.4\ \mu\text{l}$ ($2.0\ \text{U}$)加え、サーマルサイクラーを用いて以下のプログラムでサイクリングプライマー伸長反応を行った【 94°C :1 分→(94°C :30 秒→ 52°C :30 秒, 40 サイクル)→ 4°C 】。

反応後、DNA サンプルに $0.5\ \text{M}$ EDTA-NaOH (pH8.0)を $5\ \mu\text{l}$ 加え、酵素反応を停止させた後、エタノール沈殿を行った。エタノール沈殿後、粗精製した DNA サンプルにローディング緩衝液 $30\ \mu\text{l}$ を加え、ヒートブロックで 5 分間、 95°C で加熱した。その後、氷上で 5 分間冷却した。第 2 章の 2-2-6 で作製した $7\ \text{M}$ Urea を含む 19%の変性ポリアクリルアミドゲルに DNA サンプルを $6\ \mu\text{l}$ アプライした。また、A+G マーカーも 2-2-5 と同様の手順で 5'末端が FAM で標識された DNA I の相補鎖を用いて作製したマーカーを $6\ \mu\text{l}$ アプライした。電気泳動は以下の条件で行った【 $300\ \text{V}$, $20\ \text{mA}$, $150\ \text{min}$ 】。

電気泳動後のゲルは、蛍光イメージ分析装置、Typhoon9400 (GE Healthcare)により、解析した。蛍光は、プライマーの 5'末端に標識された FAM を検出した。蛍光スキャンは以下の条件で行った【Acquisition mode: Fluorescence, Laser: 488, Emission filter: 520BP40, PMT: $600\ \text{V}$, Focal plane: $+3\ \text{mm}$, Image analysis: ImageQuant】

3-2-4 様々な高次構造を形成する DNA プローブを用いた一塩基修飾法の比較

実験で使用した標的 DNA 配列および DNA プローブ配列を Table 3-2 に示す。プライマーは、Table 3-1 のプライマー配列(P18-Fd-F)を使用した。標的 DNA 配列は、3-2-2 で使用した標的 DNA I の X にシトシンが隣接した CXG 配列を含む標的 DNA II (Target DNA II)を用いて、3-2-2 と 3-2-3 と同様の手順で実験を行った。

まず、 $300\ \text{nM}$ の標的 DNA II $5\ \mu\text{l}$ ($1.5\ \text{pmol}$)に $6\ \mu\text{M}$ の各 DNA プローブ $1\ \mu\text{l}$ ($6\ \text{pmol}$)を結合させ、フルマッチ TWJ、ミスマッチ TWJ、ミスマッチ DNA、バルジ DNA (スペーサーなしとスペーサーあり)の 5 種類の高次構造を形成させた。その後、 $4.0\ \text{M}$ の亜硫酸水素ナトリウム水溶液(pH5.0) $7.5\ \mu\text{l}$ と $3.0\ \text{M}$ のカルボキシメチルヒドロキシルアミン(CMH, pH5.0) $10\ \mu\text{l}$ 、HEPES 緩衝液 1 を $2.5\ \mu\text{l}$ 加え、最終体積が $30\ \mu\text{l}$ になるように調製した。この時、亜硫酸水素ナトリウム水溶液と CMH の最終濃度がそれぞれ $1.0\ \text{M}$ になるように調製した。また、標的 DNA と DNA プローブはそれぞれ $50\ \text{nM}$ 標的 DNA II、 $200\ \text{nM}$ DNA プローブになるように調製した。調製したサンプルは、 25°C で 5 時間反応した。反応後、エタノール沈殿により粗精製した各標的 DNA を鋳型にサイクリングプライマー伸長反応を行った。サ

イクリングプライマー伸長反応後、7 M Urea を含む 19%の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確認を行った。

Table 3-2. 一塩基選択的な化学修飾で使した DNA 配列

Oligo DNAs
Target DNA II (2023-56-X-27C, X = C or M, 56mer) 5'-CTGATGAACATACTATCTTGCCTCGC CX GGC TGCGGAGAATTGAATAAGCTGGTAC-3'
Full-matched TWJ Probe 1 (2023-P38-1-12G, 38mer) 5'-CCACCGCTCTGGCGAGCGCAAGATAGTATGTTTCATCAG-3'
mismatched TWJ Probe 1 (2023-P38-1-11M, 38mer) 5'-CCACCGCTCTMGCGAGCGCAAGATAGTATGTTTCATCAG-3'
TWJ Probe 2 (p16-P38-2023-2, 38mer) 5'-GTACCAGCTTATTCAATTCTCCGCAGCMAGAGCGGTGG-3'
mismatch Probe (2023-P56-MM-29A, 56mer) 5'-GTACCAGCTTATTCAATTCTCCGCAGCMMGCG AGCGCAAGATAGTATGTTTCATCAG-3'
bulge Probe (2023-P55-Bu, 55mer) 5'-GTACCAGCTTATTCAATTCTCCGCAGCMGCG AGCGCAAGATAGTATGTTTCATCAG-3'
bulge Spacer Probe (2023-P55-Bu-18, 55mer) 5'-GTACCAGCTTATTCAATTCTCCGCAGCM-(CH ₂ CH ₂ O) ₆ -GCG AGCGCAAGATAGTATGTTTCATCAG-3'

3-2-5 PCR 増幅によるメチル化 DNA の検出

3 nM の標的 DNA I 5 μ l (15 fmol) を用いて 3-2-2 と同様に、6 μ M の TWJ プローブを 1 μ l (6 pmol) 加え、熱変性した。その後、4.0 M の亜硫酸水素ナトリウム水溶液 (pH5.0) 7.5 μ l と 3.0 M の CMH (pH5.0) 10 μ l、HEPES 緩衝液 1 を 2.5 μ l 加え、最終体積が 30 μ l になるように調製した。この時、亜硫酸水素ナトリウム水溶液と CMH の最終濃度がそれぞれ 1.0 M になるように調製した。また、標的 DNA と DNA プローブはそれぞれ 0.5 nM 標的 DNA I、200 nM TWJ プローブになるように調製した。調製したサンプルは、25°C で 3 時間反応した。反応後、エタノール沈殿により粗精製した。反応前の標的 DNA I を 15 fmol とした時、0.5 fmol の標的 DNA I を鋳型に PCR 増幅を行った。

PCR 増幅は、TaKaRa の Ex Taq および付属の 10 \times Ex Taq Buffer と 2.5 mM dNTP Mixture

を使用した。また、プライマーは Table 3-1 の P18-Fd と P18-Rv を使用した。PCR 反応溶液の組成は以下に示す【1×Ex Taq Buffer、10 nmol dNTP mixture、12.5 pmol P18-Fd、12.5 pmol P18-Rv】。また、最終体積が 50 μ l になるように滅菌水を加えた。反応溶液に 0.4 μ l の Ex Taq を加え、以下のプログラムで反応を行った【94°C:1 分→(94°C:30 秒→54°C:30 秒→72°C:30 秒, 21 サイクル)→4°C: ∞ 】。

PCR 後、3%のアガロースゲルを用いて電気泳動を行い、PCR 産物の確認を行った。5 μ l の PCR 産物および DNA マーカー(BioMarker Low, BioVentures)に 6×tracking Dye (BioVentures)を加え、3% Agarose 21 gel にアプライし、0.5×TBE 緩衝液中で電気泳動を行った。泳動後、EtBr solution (ニッポンジーン社製)を用いて染色した。染色後のゲルは、蛍光イメージ分析装置、Typhoon9400 (GE Healthcare)により、解析した。

3-3 結果及び考察

3-3-1 TWJ 構造を用いた一塩基修飾法の結果

第 2 章で行った反応を、TWJ 構造を形成させた標的 DNA I で行い、分岐点上のシトシンを選択的に化学修飾し、プライマー伸長反応の有無で DNA のメチル化をピンポイントで識別できるか実験を行った。

X に C または M を含む 56mer の標的 DNA I (1.5 pmol)に 2 つの TWJ プローブ(6 pmol)を結合させ、分岐点上に X が位置するように TWJ 構造を形成させた。TWJ 構造を形成させた標的 DNA を 1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M のメトキシアミン(pH5.0)で 5 時間、25°Cで反応した。反応した標的 DNA を鋳型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、7 M Urea を含む 19%の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結果を確認した。実験方法の概略図を Fig. 3-2、伸長反応後の電気泳動結果を Fig. 3-3B に示す。

Fig. 3-3B より、修飾前の Lane 1 と 2 ではバンドが上部に確認でき、X が C または M に関わらずほぼ完全に相補鎖が合成されていることが確認できる。一方、DNA プローブ非存在下、一本鎖 DNA の状態で化学修飾した標的 DNA では、下部のプライマー部分にしかほとんどバンドを確認することが出来なかった(Lane 3, 4)。これは DNA プローブ非存在下、一本鎖 DNA の状態で反応を行った場合、X を含めプライマー結合領域内にあるシトシンなど標的 DNA 鎖中の全てのシトシンが化学修飾されてしまい、プライマーとの結合およびプライマーからの伸長反応を阻害したことが原因であると考えられる。この結果から、一本鎖 DNA を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場合、目的の CpG 配列以外の全てのシトシンが反応してしまい、PCR などの一般的な分子生物学的手法による検出が極めて困難、または検出配列に大きな制限がかかることが示唆された。

DNA プローブを加え、TWJ 構造を形成させた標的 DNA、X が M の場合では、修飾前の標的 DNA と同様に上部にバンドが確認でき、ほぼ完全に相補鎖が合成されていることが確認できる(Lane 6)。一方、X が C の場合では他の Lane とは異なり、新たに短い DNA 鎖のバンドが確認された(Lane 5)。この短い DNA 鎖と A+G マーカーを比較した結果、Fig. 3-3A の G29、中央の X 周辺で伸長がストップされていることが確認できる。G29 付近にバンドが 2 つ確認されたが、X が M の標的 DNA、Lane 6 では G29 付近にバンドが確認されなかったことから、Lane 5 の G29 付近における 2 つのバンドは X 部位の化学修飾されたシトシン誘導体によって生じたバンドであることがわかる。従って、X 部位の化学修飾されたシトシン誘導体により異なる部位で伸長反応が阻害されていることが推測される。

これらの結果から、TWJ 構造を形成する DNA プローブを用いることで、分岐点以外の二本鎖を形成している 11 ヶ所のシトシンでの反応を抑制し、分岐点上に位置するシトシンを選択的に修飾することができ、シトシンのメチル化をピンポイントで識別できることが示された。従って、TWJ 構造を形成する DNA プローブを利用することで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検出できる可能性が示唆された。

特定の塩基のみを選択的に修飾する方法の確立は、酸化剤など塩基特異性の低い試薬での非特異的な修飾を抑制し、反応部位を制御することができるため、検出系へのアプローチの幅が広がり、ケミカルバイオロジーへの貢献が期待できる。

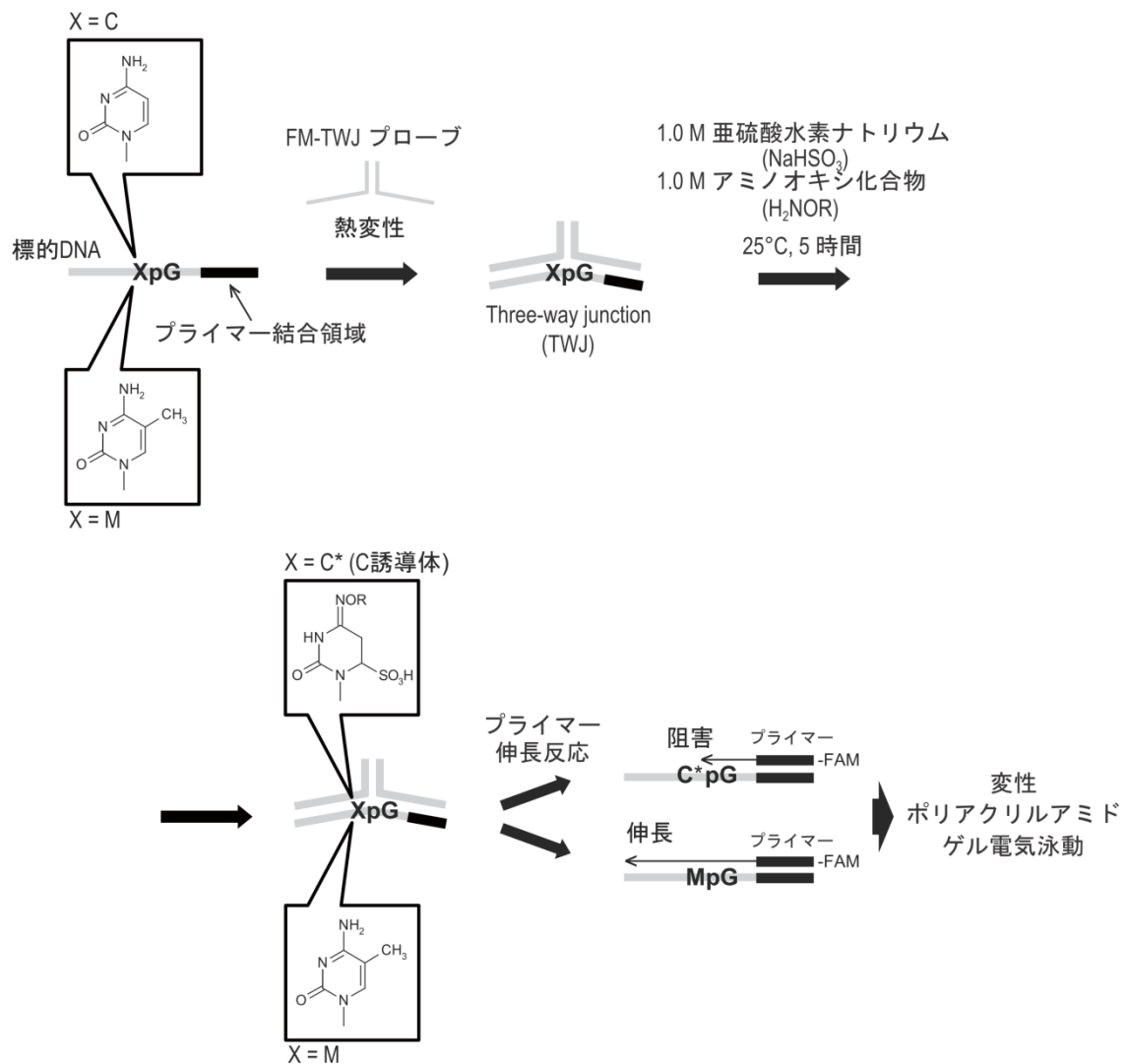
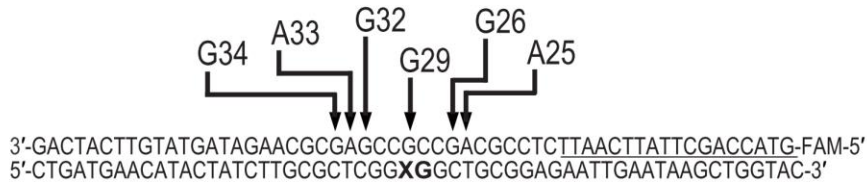


Fig. 3-2 TWJ 構造を用いた一塩基選択的な化学修飾法および検出法の概略図

(A)



(B)

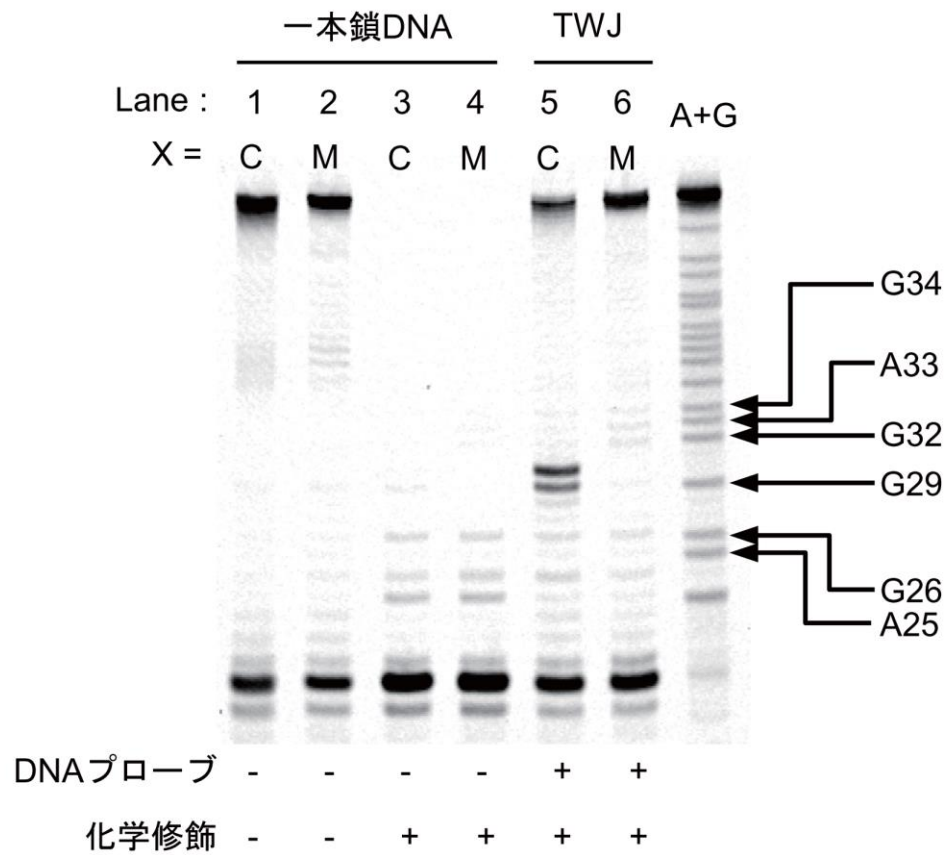


Fig. 3-3 標的 DNA I におけるサイクリングプライマー伸長反応の結果

(A)は、下線の蛍光標識されたプライマーが 56mer の標的 DNA I に結合し、完全に相補鎖が合成された配列と切断部位の模式図を示す。(B)は、サイクリングプライマー伸長反応の泳動結果を示す。Lane 1(X = C)と Lane 2(X = M)は修飾前の標的 DNA を鋳型にサイクリングプライマー伸長反応を行った結果を示す。Lane 3(X = C)と Lane 4(X = M)は、DNA プローブ非存在下、Lane 5(X = C)と Lane 6(X = M)は DNA プローブ存在下で化学修飾を行った後、それぞれの標的 DNA を鋳型にプライマー伸長反応を行った結果を示す。A+G は標的 DNA の相補鎖を用いてマキシムギルバート法により作製した A+G マーカーであり、G29 は X の相補鎖部位である。

3-3-2 各アミノオキシ化合物における伸長反応の阻害結果

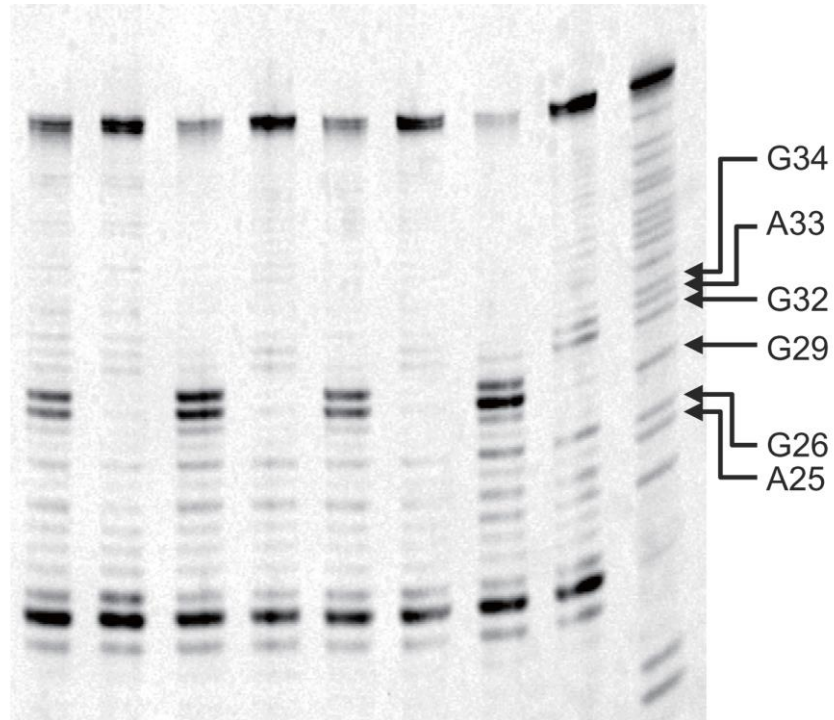
第2章と3-3-1では、アミノオキシ化合物(NH_2OR)の一つであるメトキシアミン(R: -CH_3)を用いて反応を行ってきた。他のアミノオキシ化合物、エチルヒドロキシルアミン($\text{R: -CH}_2\text{CH}_3$)やイソブチルヒドロキシルアミン($\text{R: -CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、カルボキシメチルヒドロキシルアミン($\text{CMH, R: -CH}_2\text{COOH}$)でも同様に、シトシンを特異的に修飾、識別できるか実験を行った。

DNA プローブ(6 pmol)を加え、TWJ 構造を形成させた標的 DNA I (1.5 pmol)を 1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M の各アミノオキシ化合物(pH5.0)で 5 時間反応を行った後、サイクリングプライマー伸長反応を行った。それぞれのアミノオキシ化合物で化学修飾された標的 DNA におけるプライマー伸長反応の阻害結果を Fig. 3-4 に示す。

Fig. 3-4 より、4 種類、全てのアミノオキシ化合物で X が C の標的 DNA でプライマーからの伸長反応が中央付近、G29 で強く阻害されていることが確認された。また、各アミノオキシ化合物で反応した際の伸長反応の阻害を比較した。伸長反応の阻害部位、G29 部位のバンドと相補鎖が完全に合成された上部のバンドの濃さを比較した結果、CMH で反応した標的 DNA を鋳型にした Lane 7 が最も G29 付近のバンドが濃く、相補鎖のバンドが薄いことが確認された。また、修飾後の X が C の標的 DNA の時、G29 付近に 2 つのバンドが確認され、2 ヶ所で伸長反応が阻害されていたが、CMH で反応した Lane 7 では下のバンド、G29 で濃いバンド、強い伸長反応の阻害が確認された。従って、CMH で化学修飾されたシトシン誘導体は、他のアミノオキシ化合物で修飾したシトシン誘導体よりも伸長反応を強く阻害している可能性が示唆される。CMH 以外のアミノオキシ化合物は R、側鎖の部分がエチル基やブチル基などの炭化水素であるに対して、CMH は側鎖にカルボキシル基を持つため、カルボキシル基が DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成を強く阻害したのではないかと推測される。

これらの結果より、4 種類のアミノオキシ化合物の内、分岐点上のシトシンのメチル化を識別するのに最も適したアミノオキシ化合物は、CMH であることが示された。また、すべてのアミノオキシ化合物で同様の反応性を示したことからプライマー伸長反応の阻害を指標とした検出以外に、ビオチンなどで標識されたアミノオキシ化合物を利用することで様々な検出系への応用が期待できる。

R =	<u>-CH₃</u>		<u>-C₂H₅</u>		<u>-CH₂CH(CH₃)₂</u>		<u>-CH₂COOH</u>		
Lane :	1	2	3	4	5	6	7	8	
X =	C	M	C	M	C	M	C	M	A+G



DNAプローブ	+	+	+	+	+	+	+	+
化学修飾	+	+	+	+	+	+	+	+

Fig. 3-4 各アミノオキシ化合物による伸長反応の阻害

標的DNA I を亜硫酸水素ナトリウムと各アミノオキシ化合物(NH₂OR)で反応した際の伸長反応の阻害結果を示す。Lane 1, 2 はメトキシアミン(R: -CH₃)、Lane 3, 4 はエチルヒドロキシルアミン(R: -C₂H₅)、Lane 5, 6 はイソブチルヒドロキシルアミン(R: -CH₂CH(CH₃)₂)、Lane 7, 8 はCMH(R: -CH₂COOH)を使用して反応した結果を示す。右端のA+Gは、マキサムギルバート法によりアデニンとグアニンの部位で切断したA+G マーカーを示す。

3-3-3 各 DNA プローブにおける選択性と反応性の比較

3-3-1 で TWJ 構造を形成する DNA プローブを利用することで分岐点上のシトシンを選択的に修飾できることが示された。そこで、TWJ 構造以外のミスマッチ DNA やバルジ DNA を形成する DNA プローブを用いて同様に、特定のシトシンを選択的に修飾することができるか実験を行った。また、3-3-1 では TWJ 構造の分岐点上に位置する 3 つの塩基対が全て塩基対を形成したフルマッチ TWJ 構造を形成する DNA プローブを使用していたが、TWJ の分岐点が 1 ヲ所塩基対を形成していないミスマッチ TWJ 構造を形成する DNA プローブを用いて比較実験を行った。それぞれの DNA 鎖における推定二次構造の模式図を Fig. 3-5 に示す。

また、特定のシトシンを一塩基選択的に反応制御することができるか確認するため、シトシンが隣接する CCG 配列または CMG 配列を含む 2 種類の標的 DNA II を用いて実験を行った。

56mer標的DNA II (X = CまたはM)

5'-CTGATGAACATACTATCTTGCGCTCGCXGGCTGCGGAGAATTGAATAAGCTGGTAC-3'

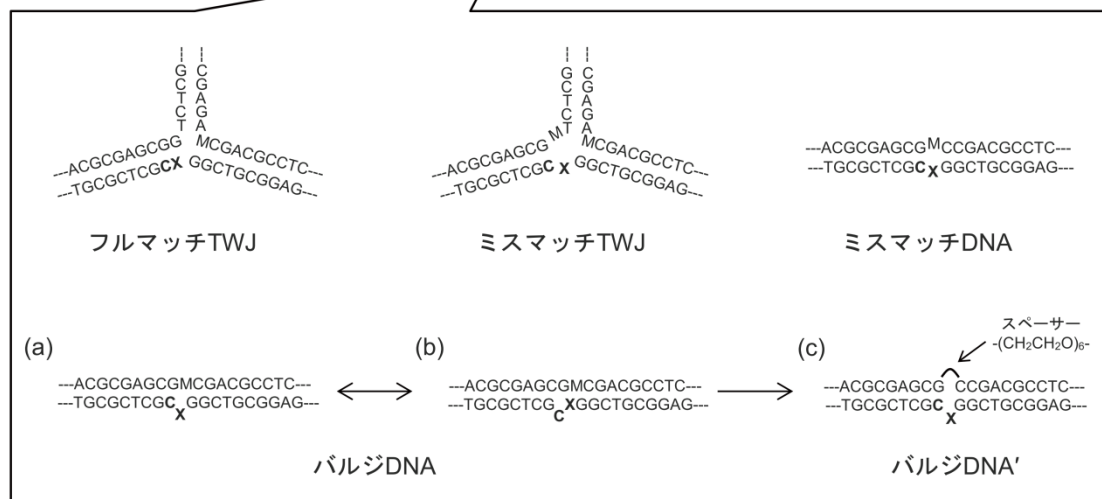


Fig. 3-5 各 DNA プローブによる高次構造形成の模式図

3-3-3-1 TWJ 構造とバルジ DNA、ミスマッチ DNA の比較

標的 DNA II (1.5 pmol)に、TWJ 構造またはバルジ DNA、ミスマッチ DNA を形成する 3 種類の DNA プローブ(6 pmol)をそれぞれ加え、熱変性した後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M の CMH (pH5.0)で 5 時間反応した。反応後、各標的 DNA を鋳型にサイクリングプライマー伸長反応を行った。その結果を Fig. 3-6B に示す。また、A+G マーカーの切断部位を Fig. 3-6A に示す。

3-3-1 と同様に TWJ 構造を形成させた標的 DNA II (X = C)では中央の X、A+G マーカーの G29 または G30 付近で伸長反応が阻害されていることが確認された(Lane 3)。しかし、X が M の標的 DNA II でも G30 付近に薄いバンドが確認されてしまった(Lane 4)。今回の標的 DNA II では、3-3-1 で用いた XG 配列とは異なり、シトシンが隣接した CXG 配列を使用しているため、Lane 4 のバンドは X に隣接するシトシンが化学修飾され、伸長反応が阻害されたと考えられる。通常の Watson-Crick 塩基対を形成している二本鎖 DNA でも、二重らせん構造は約 10 塩基対で一回転、一塩基あたり右におよそ 36° の回転であるため、隣接するシトシンでの反応を完全に抑制することが出来なかったと考えられる。実際には、TWJ 構造の分岐点周辺の配列は、通常の二重らせん構造よりも緩いらせん構造を形成していると推測されているため、分岐点周辺の不安定さも非特異的な修飾の要因の一つであることが考えられる。

一方、バルジ構造では X が C と M とともに中央の X、G30 付近でプライマーからの伸長反応の阻害が確認された(Lane 5, 6)。第 2 章および 3-3-1 より、メチルシトシンでは亜硫酸水素ナトリウムとアミノオキシ化合物による化学修飾ならびに DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成の阻害は確認されなかったことから、Lane 5 と 6 のバンドは隣接するシトシンで伸長反応がストップされていると考えられる。この結果から、Fig. 3-5a のように X がバルジ部分に位置するようにプローブ配列を設計したが、実際には Fig. 3-5b のような構造を形成している可能性が示唆される。また、ミスマッチ DNA では、X が C の標的 DNA と M の標的 DNA とともに僅かな伸長反応の阻害しか確認されなかった(Lane 7, 8)。ミスマッチ DNA を利用したオスミウムなどの酸化剤による配列選択的な酸化・切断反応が既に報告されているが³⁵、Lane 7, 8 の結果から、ミスマッチ DNA は TWJ 構造やバルジ DNA に比べ、反応効率が著しく悪いことが示唆される。ミスマッチ DNA の場合、他の DNA 構造に比べ、DNA 構造の揺らぎが小さく、周囲のスタッキング相互作用により保護されているか、化学修飾する際に用いる化合物の大きさや反応機構の違いによって反応が著しく阻害される可能性が考えられる。

これらの結果から、TWJ 構造とバルジ構造を形成する DNA プローブが高い反応性、DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成の強い阻害を示した。しかし、バルジ構造では隣接するシトシンで伸長反応が強く阻害されてしまったため、3 つの DNA プローブの内、TWJ プローブが最も一塩基選択的な反応制御が可能であることが示された。

(A)



(B)

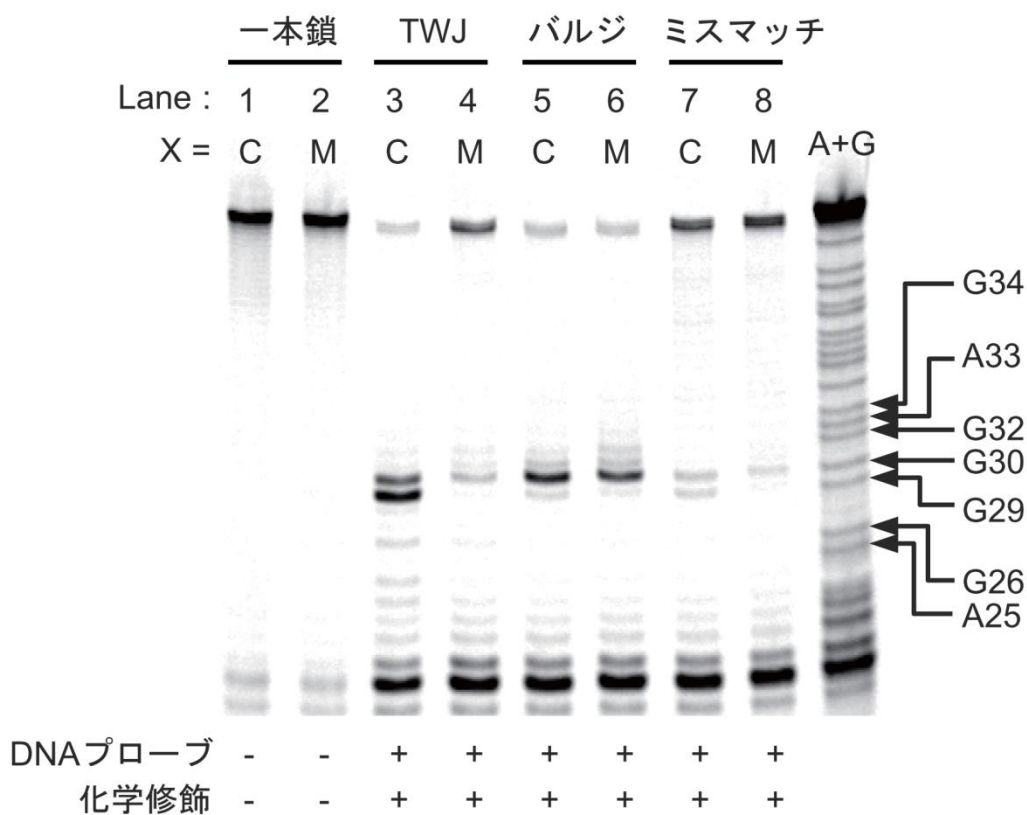


Fig. 3-6 様々な高次構造を形成する DNA プローブを用いた一塩基修飾の比較結果

(A)は、下線の蛍光標識されたプライマーが 56mer の標的 DNA II に結合し、完全に相補鎖が合成された配列と切断部位の模式図を示す。(B)は、サイクリングプライマー伸長反応の結果を示す。Lane 1, 2 は修飾前の標的 DNA を鋳型にサイクリングプライマー伸長反応を行った結果を示す。Lane 3, 4 は TWJ 構造、Lane 5, 6 はバルジ DNA、Lane 7, 8 はミスマッチ DNA を形成する DNA プローブを用いて化学修飾した標的 DNA におけるサイクリングプライマー伸長反応の結果を示す。A+G はマキシムギルバート法により作成したマーカーで G29 は X の相補鎖部位である。

3-3-3-2 バルジ DNA 構造を形成する DNA プローブの検討結果

3-3-3-1 でバルジ DNA 構造を形成する DNA プローブでは、隣接するシトシンでの修飾、伸長反応の阻害が確認されてしまった(Fig. 3-6B, Lane 5 と 6)。これは、バルジ部位の DNA 構造が Fig. 3-5b の状態になっていると推測し、DNA プローブのバルジ部位にスペーサー(アルキル鎖、 $-\text{[CH}_2\text{CH}_2\text{O]}_6-$)を導入することで Fig. 3-5c のようなバルジ構造を形成させ、目的のシトシンを効率的に修飾、隣接するシトシンでの反応を抑制できるのではないかと考え、同様の実験を行った。実験結果を Fig. 3-7 に示す。

バルジ構造を形成する DNA プローブのスペーサーなし(Lane 3, 4)とあり(Lane 5, 6)の比較実験を行った。また、TWJ 構造を形成する DNA プローブとも比較した(Lane 1, 2)。CXG 配列の X が C の標的 DNA、Lane 3 のスペーサーなしと Lane 5 のスペーサーありを比較すると Lane 5 のスペーサーありで、G29 付近で濃いバンドが確認された。しかし、Lane 6 の X が M の場合でも G30 に濃いバンド、隣接するシトシンでの伸長反応の阻害が確認されてしまった。これらの結果から、スペーサーを加えることで Fig. 3-5c のような構造を形成している可能性も示唆されるが、X が M の標的 DNA でも伸長反応の阻害が確認されてしまったことから、バルジ DNA プローブでは一塩基選択的な反応制御が困難であり、汎用性に欠けることが示された。

以上の結果からも TWJ 構造がもっとも隣接するシトシンでの反応を抑制し、分岐点上の C を効率的に反応できることが示された。

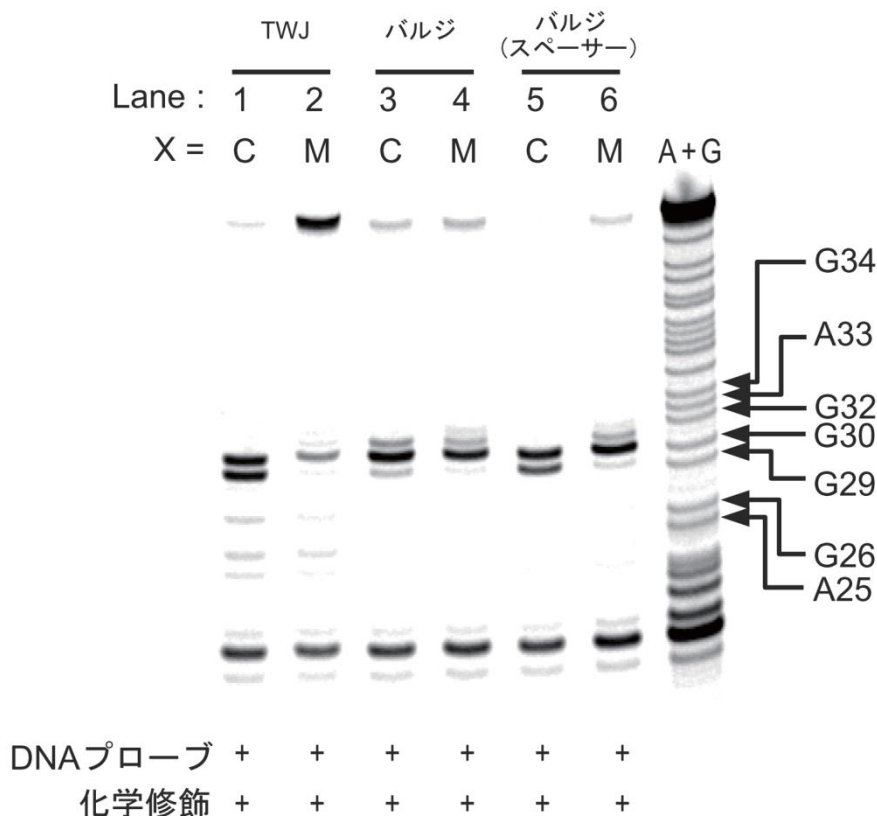


Fig. 3-7 標的 DNA II のバルジ DNA プローブ、スペーサーなしとありの比較結果

3-3-3-3 TWJ 構造を形成する DNA プローブの検討結果

3-3-3-1 と 2 で、TWJ、バルジ DNA (スペーサーなしとあり)、ミスマッチ DNA の 4 種類の非二本鎖構造を形成する DNA プローブを用いて比較実験を行った。その結果、特定のシトシンを一塩基選択的にピンポイントで修飾するのに適した DNA プローブは、TWJ プローブであることが示されたため、更に TWJ プローブについて検討を行った。

3-3-3-1 と 2 では、分岐点上の 3 つの塩基対が全て塩基対を形成したフルマッチ TWJ 構造を形成する DNA プローブを用いて反応を行ってきた。そこで分岐点上に位置する 3 つの塩基対の内、1 ヲ所塩基対を形成していないミスマッチ TWJ とフルマッチ TWJ の 2 種類の TWJ 構造を形成する DNA プローブを用いて比較実験を行った。その結果を Fig. 3-8 に示す。

Fig. 3-8 の Lane 1, 2 は、Fig. 3-7 の Lane 1, 2 と同条件のサンプルである。Lane 3, 4 はミスマッチ TWJ 構造を形成させて反応を行った結果である。フルマッチ TWJ とミスマッチ TWJ の X が M の標的 DNA を比較するとミスマッチ TWJ の方が G30 に濃いバンドが確認され、隣接するシトシンでプライマーからの伸長反応が強く阻害されてしまっていることが確認できる(Lane 2, 4)。これは、分岐点、X が塩基対を形成していないため、隣接する

シトシンがスタッキングされておらず、非選択的に修飾されてしまったのが原因であると考えられる。

Fig. 3-8 の結果から特定のシトシンをピンポイントで化学修飾するのに適した DNA プローブのデザインは、フルマッチ TWJ 構造を形成する DNA プローブであることが示された。

以上の結果から、5 種類の非二本鎖構造を形成する DNA プローブを用いて比較実験した結果、フルマッチ TWJ プローブが最も隣接するシトシンでの反応を抑制し、一塩基選択的な修飾が可能であることが示された。一塩基選択的な化学修飾法は、遺伝子の特定の部位を効率的に切断または変異させることができるため、遺伝子組み換えや点変異解析など遺伝子工学への利用が期待できる。

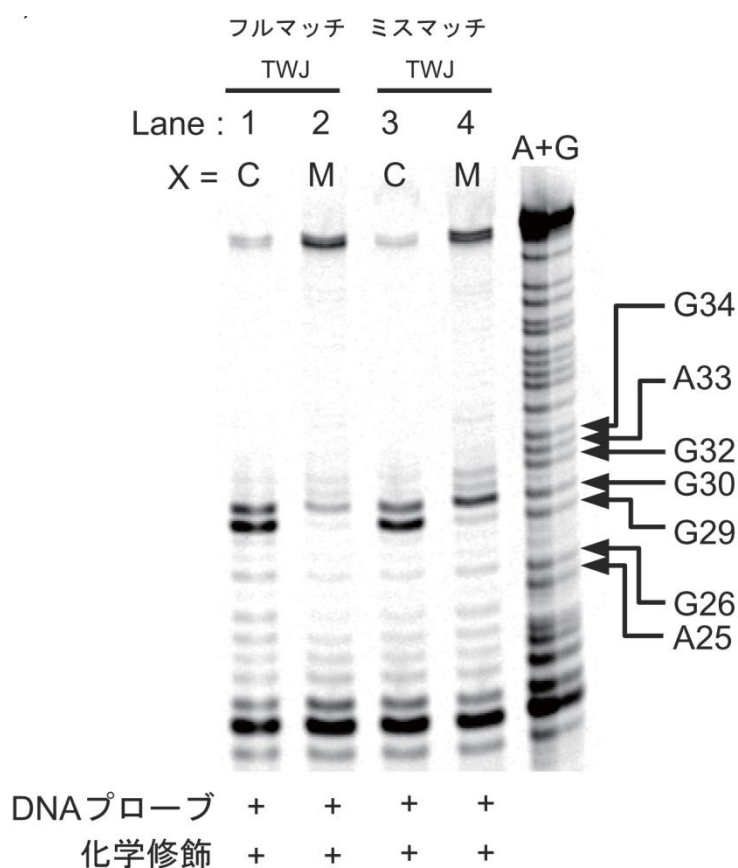


Fig. 3-8 標的 DNA II のフルマッチ TWJ とミスマッチ TWJ プローブの比較結果

3-3-4 PCR 増幅の阻害結果

3-3-1 と 3-3-2 のサイクリングプライマー伸長反応の結果から、TWJ 構造を形成する 2 つの DNA プローブを利用することで分岐点上に位置する特定の CpG 配列を一塩基選択的に修飾することができ、プライマーからの伸長反応を途中でストップできることが示された。しかし、アクリルアミドゲル電気泳動による解析は、煩雑であり迅速性に欠けるため、一般的な PCR およびアガロースゲル電気泳動でも簡便にメチル化を検出できるか実験を行った。その結果を Fig. 3-9 に示す。

15 fmol の標的 DNA I にフルマッチ TWJ プローブ 6 pmol を加え、熱変性した後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム水溶液と 1.0 M の CMH で 3 時間、25°C で反応した。反応前と反応後の 0.5 fmol の標的 DNA I を鋳型に PCR 増幅を行った。Lane 1 と 2 は、反応前の 56mer の標的 DNA I を鋳型に PCR 増幅した結果を示す。反応前の標的 DNA I では、X が C と M の両方で 50 bp 付近に濃いバンド、PCR 産物が確認された。一方、DNA プローブ非存在下、一本鎖 DNA の状態で化学修飾した標的 DNA では PCR 産物はほとんど確認されなかった (Lane 3, 4)。DNA プローブ存在下、TWJ 構造を形成させて化学修飾した標的 DNA では、X が C の時、バンドが薄く PCR 産物が微量であったのに対して、X が M の時、濃いバンドが確認された (Lane 5, 6)。ImageQuant TL (GE Healthcare) を用いて、Lane 5 と Lane 6 のバンドの濃さを比較した結果、約 4.5 倍の差を確認することができた。

以上の結果から、修飾後の DNA 鎖を鋳型に PCR 増幅の阻害を指標とした簡便なメチル基の識別が可能であることが示された。PCR 増幅の阻害を指標とした検出は、リアルタイム PCR への応用が期待でき、迅速かつ定量的な検出法への応用が期待できる。

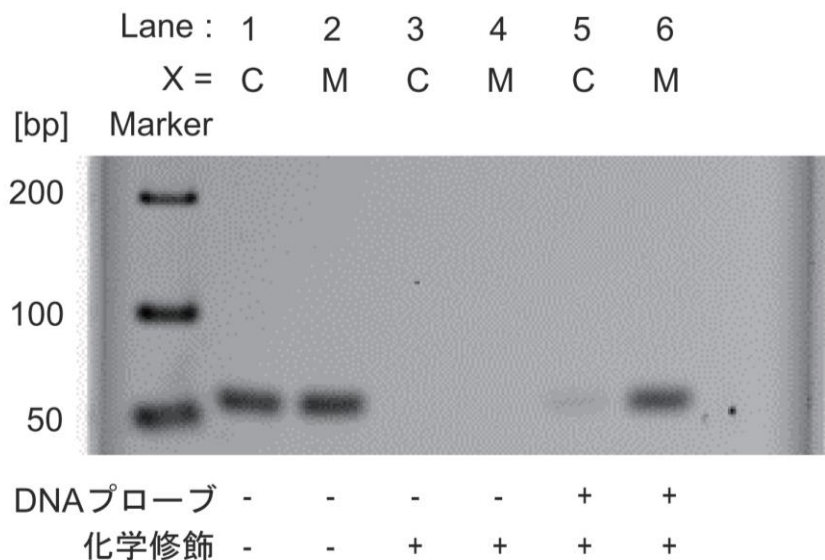


Fig. 3-9 PCR 増幅の有無を指標としたメチル基の識別

3-4 結言

本章では、様々な非二本鎖 DNA 構造を形成する DNA プローブを用いて新たな一塩基選択的な化学修飾法の探索を行った。DNA プローブを利用して特定の塩基を効率的に切断または修飾することができる汎用性に優れた修飾法の開発は、遺伝子工学などケミカルバイオロジーへの応用が期待できる。また、特定の CpG 配列中のシトシンを効率的に修飾することができればメチル化 DNA 検出法への利用が期待できる。本章では、5 種類の DNA プローブを用いて特定の CpG 配列中のシトシンをピンポイントで修飾するのに適した DNA プローブの探索を行った。シトシンへの反応は、第 2 章で利用した亜硫酸水素ナトリウムとアミノオキシ化合物による反応を用いた。

第 2 章で利用した亜硫酸水素ナトリウムとアミノオキシ化合物による反応を DNA プローブ非存在下、一本鎖 DNA の状態で行った場合、DNA 鎖中の全てのシトシンが反応してしまい、プライマーとの結合および伸長反応も阻害してしまい CpG 配列のメチル化を識別することが非常に困難であった。一方、TWJ 構造を形成する DNA プローブを標的 DNA に結合させて反応した場合は、分岐点上に位置するシトシンを効率的に修飾し、特定のシトシンでプライマーからの伸長反応をストップできることが確認された。TWJ プローブを利用することで標的 DNA 鎖中に存在する 12 ヲ所あるシトシンの内、分岐点上に位置するシトシンのみを選択的に修飾し、二本鎖部位に位置する他のシトシンでの反応を抑制できることが示された。また、プライマーからの伸長反応の有無でメチル化をピンポイントで識別できることが示された。

TWJ プローブ以外に、ミスマッチ DNA プローブ、バルジ DNA プローブ(スペーサーなしとあり)の 4 種類の DNA プローブを用いて比較実験を行った結果、TWJ 構造を形成する DNA プローブが最も選択性と反応性に優れていることが示された。また、TWJ の分岐点上に位置する 3 つの塩基対がすべて塩基対を形成したフルマッチ TWJ と 1 ヲ所塩基対を形成していないミスマッチ TWJ 構造を形成する DNA プローブを用いて反応を行った結果、フルマッチ TWJ プローブが最も一塩基選択的な化学修飾に適した DNA プローブであることが示された。

フルマッチ TWJ プローブを利用した一塩基選択的な化学修飾は、特定の CpG 配列中のシトシンをピンポイントで修飾でき、プライマー伸長反応または PCR 増幅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。TWJ プローブを利用した新たな一塩基選択的な化学修飾法は、メチル化 DNA の検出以外に遺伝子内の特定の塩基を効率的に修飾または切断するツールとしても利用できるため、遺伝子工学への応用や SNP 解析など様々な分野への利用が期待できる。

第4章 リアルタイム PCR を用いた新規メチル化 DNA 検出法の構築

4-1 緒言

第2章および第3章では、主に修飾後の DNA 鎖を鋳型にプライマーからの伸長反応の有無を指標として、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるメチル基の識別を行ってきた。しかし、アクリルアミドゲル電気泳動は迅速性や簡便性、定量性に欠けるため、より簡便かつ迅速な検出系への応用が求められる。

第3章で TWJ プローブを利用することで特定の CpG 配列を選択的に修飾できることを既に確認している。また、修飾後の DNA 鎖を鋳型にサイクリングプライマー伸長反応を行うとことで、修飾されたシトシン誘導体でプライマーからの伸長反応がストップされることも確認した。本研究で新たに耐熱性の *Taq* DNA ポリメラーゼでもシトシン誘導体の伸長反応の阻害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、PCR 増幅後の DNA 産物をアガロースゲル電気泳動により解析した結果、PCR 増幅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唆された。そこで本章ではリアルタイム PCR を用いた迅速かつ定量的なメチル化 DNA 検出法の構築を試みる。

リアルタイム PCR は、PCR 後の増幅産物を電気泳動により解析することなく、増幅産物の生成過程をリアルタイムで迅速かつ簡便に検出、解析することができる。本研究では、二本鎖 DNA に対して特異的に結合、蛍光増強する SYBR Green の蛍光シグナルをモニタリングし、PCR 産物の検出を行う。また、PCR 増幅は指数関数的に増幅される領域があり、鋳型 DNA 量と高い相関がみられるため、DNA 量を正確に定量できることが知られている^{67,68}。本研究では、ある一定量の PCR 産物が増幅されるまでのサイクル数、Ct 値(threshold cycle)から検量線を作成し、Ct 値と反応後の未修飾標的 DNA 量の割合から DNA のメチル化を簡便に検出できるか実験を行う。

本章では、第3章で使用した標的 DNA I と標的 DNA II および各 DNA プローブとプライマーを使用して実験を行う(Table 3-1, 2)。具体的には、標的 DNA に DNA プローブを結合させ、亜硫酸水素ナトリウムとアミノオキシ化合物で化学修飾した後、標的 DNA を鋳型にリアルタイム PCR 測定を行い Ct 値または未修飾標的 DNA 量の割合からメチル化を簡便に検出できるか実験を行う。リアルタイム PCR で特定の遺伝子のメチル化状態を簡便かつ迅速に解析することができれば遺伝子診断技術など医療分野への応用が期待できる。また、リアルタイム PCR による解析は、複数の遺伝子または異なる CpG 部位のメチル化状態を同時に検出できる可能性もあり、遺伝子発現のプロファイリングシステムの構築などへの利用が期待できる。

4-2 実験方法

4-2-1 試薬の調製

第 3 章で作製したアミノオキシ化合物、メトキシアミン、エチルヒドロキシルアミン、イソブチルヒドロキシルアミン、カルボキシメチルヒドロキシルアミンと新たにアリルヒドロキシルアミン塩酸塩($\text{NH}_2\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2 \cdot \text{HCl}$, SIGMA)を使用した。

また、第 2 章で作製した HEPES 緩衝液 1 (400 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0) 以外に HEPES 緩衝液 2 (200 mM HEPES/NaOH, 4.0 M NaCl, pH6.0) など塩濃度(NaCl 濃度)が異なる HEPES 緩衝液を作製した。HEPES 緩衝液 2 は、4 倍希釈(50 mM HEPES/NaCl, 1.0 M NaCl, pH6.0)して使用した。

リアルタイム PCR で使用する蛍光物質、SYBR Green は、10,000 × SYBR Green I (CAMBREX) 10 μl と TWEEN[®] 20 (SIGMA) 100 μl 、10 mg/ml の BSA (SIGMA) 1 ml、DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Wako) 5 ml、滅菌水 3.9 ml を混合し、全量が約 10 ml になるように調製した 10 × SYBR Green Mix 溶液を使用した。

4-2-2 リアルタイム PCR 用の DNA サンプルの調製

3-2-2 と同様に、1.5 nM の標的 DNA I 1 μl (1.5 fmol) と 6 μM の TWJ プローブ 1 μl (6 pmol) を HEPES 緩衝液 2 に加え、体積が 6 μl になるように調製した後、熱変性を行った。熱変性は、95°C で 5 分間加熱した後、氷上で急冷させた。この時、DNA の濃度は、250 pM 標的 DNA I、1 μM TWJ プローブになるように調製した。その後、4.0 M の亜硫酸水素ナトリウム水溶液(pH5.0) 7.5 μl と 3.0 M のアミノオキシ化合物(pH5.0) 10 μl 、HEPES 緩衝液 2 を 6.0 μl 加え、最終体積が 30 μl になるように滅菌水を加えた。この時、亜硫酸水素ナトリウム水溶液とアミノオキシ化合物の最終濃度がそれぞれ 1.0 M になるように調製した。また、標的 DNA と TWJ プローブはそれぞれ 50 pM 標的 DNA I、200 nM TWJ プローブになるように調製した。調製したサンプルは 25°C で 3 時間反応を行った。反応後、エタノール沈殿で粗精製を行い、滅菌水 300 μl に再溶解させた。

反応前の標的 DNA を 1.5 fmol として、再溶解させた DNA サンプル 10 μl (50 amol) を鋳型にリアルタイム PCR 測定を行った。リアルタイム PCR の反応溶液の組成は以下に示す【1 × Ex Taq Buffer、0.2 mM dNTP mixture、150 nM フォワードプライマー、150 nM リバースプライマー、2 mM MgSO_4 、1 × SYBR Green Mix】。プライマーは、Table 3-1 の P18-Fd と P18-Rv を使用した。また、最終体積が 25 μl になるように滅菌水を加えた。

反応溶液に 5.0 U/ μl の Ex Taq を 0.1 μl (0.5 U) 加え、以下のプログラムで測定を行った【55°C:5 分→95°C:5 分→(95°C:5 秒→54°C:10 秒→72°C:15 秒, 50 サイクル)→95°C:5 分→

60°C:5分→95°C:5分】。リアルタイム PCR は、ABI PRISM 社製の 7700 Sequence Detection System を用いて SYBR Green (470 nm/510 nm)の蛍光増強をモニタリングして、ある一定量の PCR 産物が増幅されるまでのサイクル数、Ct 値の測定を行った。

また、1.5 fmol の標的 DNA II と 10 pmol の各 DNA プローブを用いて同様の実験を行った。

4-3 結果及び考察

4-3-1 リアルタイム PCR を用いたメチル化 DNA のピンポイント検出

第 3 章の結果から、TWJ 構造を形成する DNA プローブを利用することで分岐点上のシトシンを選択的に修飾、プライマーからの伸長反応を分岐点上に位置する CpG 部位でストップできることが示された。また、PCR 増幅後の DNA 産物をアガロースゲル電気泳動により解析した結果、PCR 産物からでも DNA のメチル化を識別できる可能性が示唆された。従って、リアルタイム PCR を用いて PCR 増幅の有無を指標とした簡便なメチル基の識別が可能であると考えられる。本章ではリアルタイム PCR によるメチル化 DNA 検出法の構築を行った。

1.5 fmol の標的 DNA I と TWJ 構造を形成する 2 つの DNA プローブ(6 pmol)を HEPES 緩衝液 2 (50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)に加え、熱変性を行い、TWJ 構造を形成させた後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M のメトキシアミン(pH5.0)で 3 時間反応を行った。その後、化学修飾した標的 DNA (50 amol)を鋳型にリアルタイム PCR 測定を行った。実験方法の概略図を Fig. 4-1 に示す。

反応前の各標的 DNA I (X = C または M)、50 zmol~5 fmol を用いて検量線を作成した。その結果を Fig. 4-2 に示す。X が C の標的 DNA と M の標的 DNA とともに、Ct 値と DNA 量の相関係数は 0.998 以上であり、増幅効率ほとんど同じであった。この検量線から DNA 量と未修飾標的 DNA 量の割合を算出した。検量線および反応後の Ct 値は、それぞれ 3 回の実験結果の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。各標的 DNA における反応前と反応後の Ct 値および DNA 量、未修飾標的 DNA 量の割合をまとめた表を Table 4-1 に示す。また、リアルタイム PCR を用いて反応前と反応後の標的 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 値を測定した結果を Fig. 4-3 に、検量線から未修飾標的 DNA 量の割合を定量した結果を Fig. 4-4 に示す。

Fig. 4-3 と Table 4-1 の結果から、反応前の標的 DNA では、X が C の時、Ct 値は 13.5 サイクルで X が M の時、Ct 値は 12.7 サイクルであった。また、DNA 量はそれぞれ 39.5 amol と 46.2 amol であった。一方、DNA プローブ非存在下、一本鎖 DNA の状態で化学修飾した標的 DNA では、X が C と M とともに Ct 値が 25.8 サイクルまで増大し、DNA 量は 50 zmol 以下であった。この結果は、Fig. 3-3 の Lane 3, 4 の結果とも一致しており、標的 DNA 中の

全てのシトシンが化学修飾され、プライマーとの結合および伸長反応を阻害した結果、PCR 増幅も同様に阻害され、見かけ上の鋳型 DNA 量が低下したことによって Ct 値が著しく増大したと考えられる。

一方、TWJ 構造を形成する DNA プローブ存在下で反応を行った場合、X が C の時、Ct 値は 18.3 サイクルであり、DNA 量は約 1.7 amol であった。一方、X が M の時は、Ct 値が 14.2 サイクルであり、DNA 量は 19.9 amol であった。反応前の標的 DNA 量を 100%とした時、それぞれの未修飾標的 DNA 量の割合は、4.3%と 36.6%であり、8 倍以上の差を確認することができた。この結果も Fig. 3-3 の Lane 5, 6 の結果と一致している。Fig. 3-3 の結果から、TWJ 構造を形成する DNA プローブ存在下では、分岐点以外の二本鎖を形成しているシトシンでの非特異的な修飾が抑制されることが既に確認されている。従って、X が M の標的 DNA では分岐点上の M とそれ以外の二本鎖を形成しているシトシンがほとんど反応しないため、PCR 増幅があまり阻害されず、未修飾の標的 DNA が多く残存していたと考えられる。一方、X が C の標的 DNA では、分岐点上に位置する C が効率的に化学修飾され、プライマーからの伸長反応が途中でストップされ、PCR 増幅も同様に阻害され、見かけ上の鋳型 DNA 量が低下したことにより Ct 値が上昇したと考えられる。

これらの結果から、TWJ 構造を形成する DNA プローブを用いて、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによる反応を配列選択的に制御することでリアルタイム PCR などの一般的な核酸分子増幅法で、DNA のメチル化を簡便に検出できることが示された。この検出法は TWJ 構造を利用することで配列解析を行わずに、特定のシトシンのメチル化状態をリアルタイム PCR で簡便に検出できるため、がん診断や遺伝診断技術への応用が期待できる。

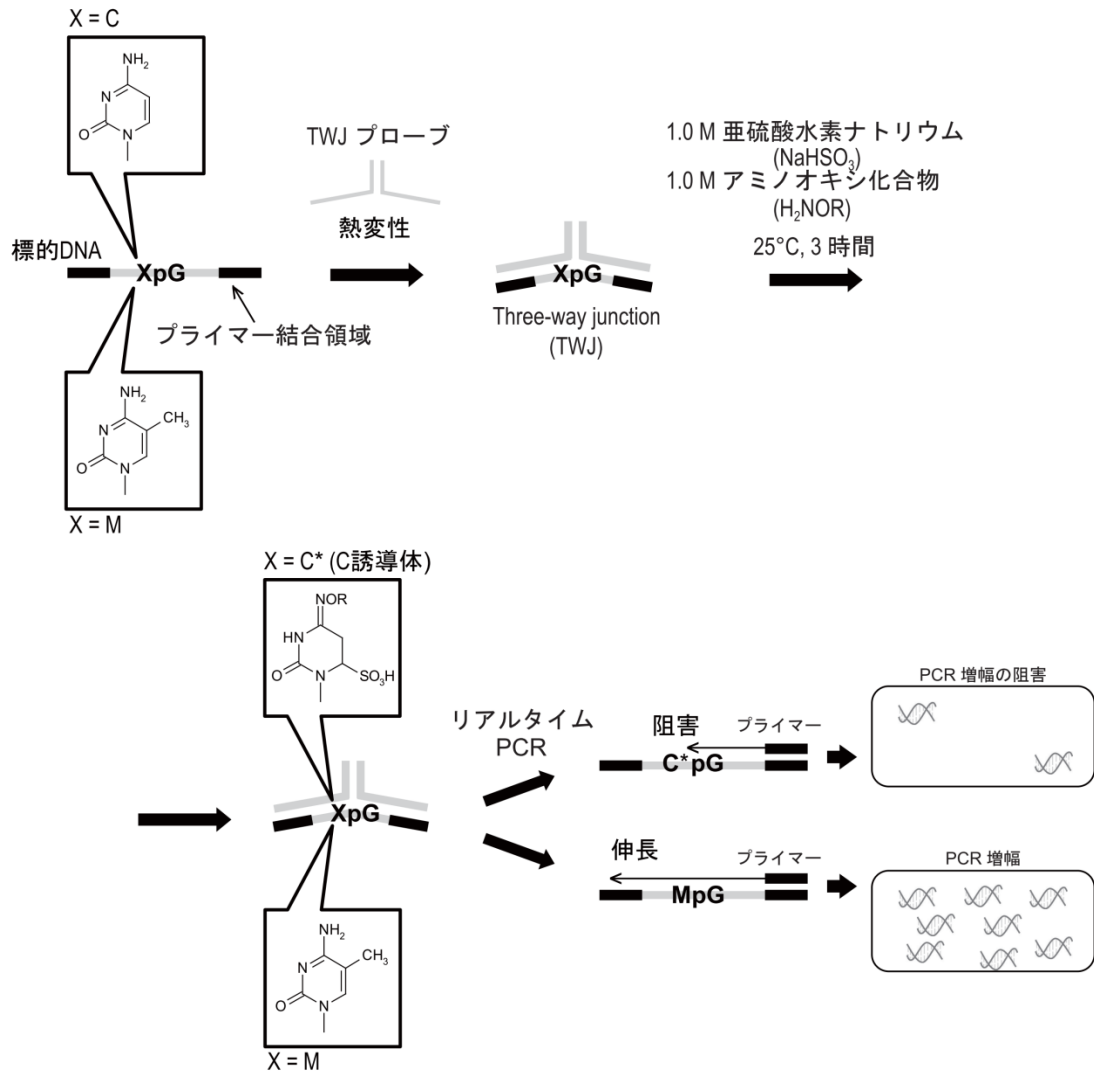


Fig. 4-1 PCR 増幅を指標としたメチル化 DNA ピンポイント検出法の概略図

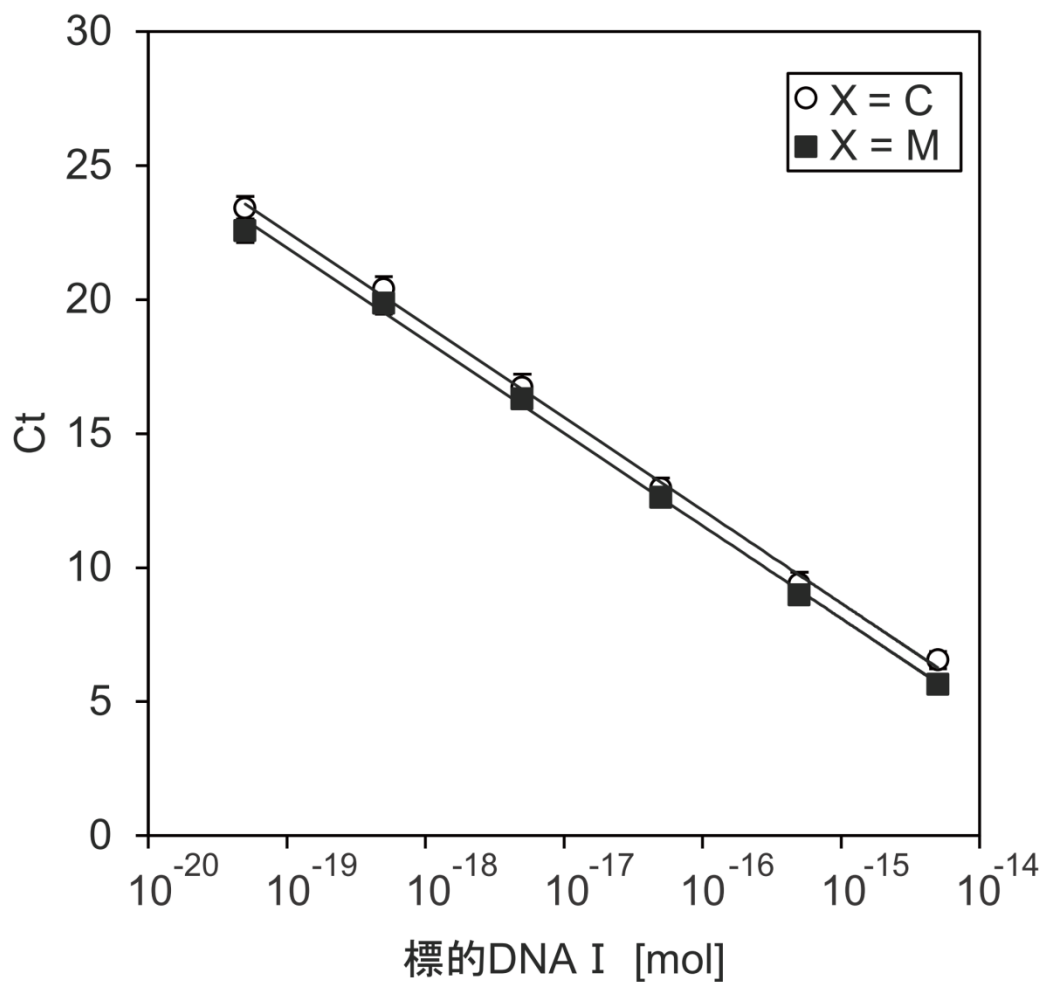


Fig. 4-2 標的 DNA I の検量線

Table 4-1. 各標的 DNA I における Ct 値および DNA 量と未修飾標的 DNA 量の割合

	プローブ	X	Ct		DNA量 [amol]		未修飾標的DNA量の割合 [%]	
			平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
反応前	-	C	13.53	0.10	39.54	2.63	100.00	6.64
	-	M	12.73	0.24	46.25	7.66	100.00	16.56
反応後	-	C	25.80	0.44	-	-	-	-
	-	M	25.81	0.52	-	-	-	-
	+	C	18.28	0.20	1.68	0.22	4.26	0.55
	+	M	14.23	0.15	16.92	1.69	36.59	3.65

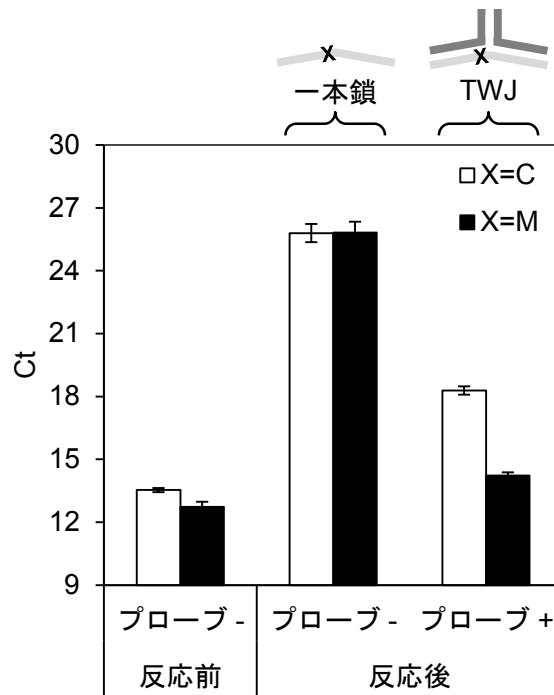


Fig. 4-3 反応前と修飾後の各標的 DNA I おける Ct 値

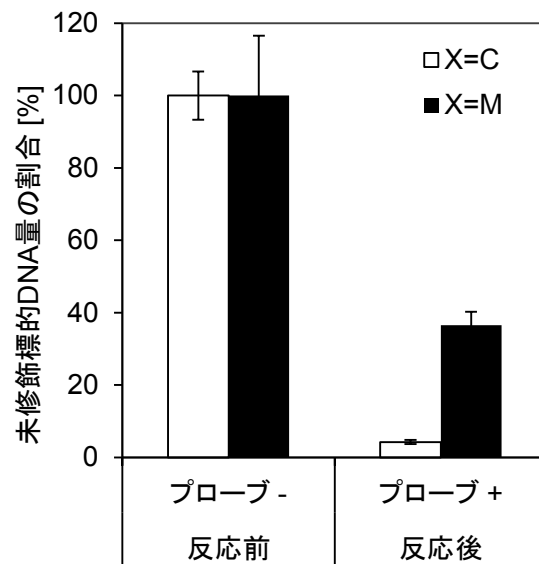


Fig. 4-4 修飾後の DNA プローブ存在下における未修飾標的 DNA 量の割合

4-3-2 アミノオキシ化合物の検討

4-3-1 では、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミン(NH_2OCH_3)を用いて反応を行ったが、メトキシアミン以外のアミノオキシ化合物(NH_2OR)でも同様の結果が得られるか実験を行った。

1.5 fmol の標的 DNA I と TWJ 構造を形成する 2 つの DNA プローブ(6 pmol)を HEPES 緩衝液 2 (50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)に加え、TWJ 構造を形成させた後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M の各アミノオキシ化合物(pH5.0)で 3 時間反応を行った。その後、化学修飾した標的 DNA (50 amol)を鋳型にリアルタイム PCR 測定を行った。各アミノオキシ化合物を用いて反応した結果を Fig. 4-5 に示す。今回の実験では、メトキシアミン(Me, R: $-\text{CH}_3$)、エチルヒドロキシルアミン(Ethyl, R: $-\text{CH}_2\text{CH}_3$)、イソブチルヒドロキシルアミン(Butyl, 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(CMH, R: $-\text{CH}_2\text{COOH}$)、アリルヒドロキシルアミン(Allyl, R: $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)の 5 種類のアミノオキシ化合物を使用して反応を行った。

Fig. 4-5 の結果から今回使用した 5 種類、全てのアミノオキシ化合物で、X が C の標的 DNA I と M の標的 DNA I で Ct 値に 2.6 サイクルから 4.2 サイクルの差を確認することができた。また、各アミノオキシ化合物における C と M の Ct 値の差、 ΔCt 値を比較した結果、CMH (R: $-\text{CH}_2\text{COOH}$)が 4.2 サイクルと最も高く、分岐点上の C と M を明確に識別できることが示された。この結果は、第 3 章の 3-3-2 の Fig. 3-4 と一致している。

リアルタイム PCR でもサイクリングプライマー伸長反応と同様に、すべてのアミノオキシ化合物で同様の結果が得られたが、イソブチルヒドロキシルアミン(Butyl, R: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)の場合では他のアミノオキシ化合物に比べ ΔCt 値が 2.6 サイクルと差が小さかった。また、アリルヒドロキシルアミン(Allyl, R: $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)では、他のアミノオキシ化合物と比較して全体的に Ct 値が低いなどアミノオキシ化合物の種類により僅かではあるが Ct 値の変化に違いが確認された。これは、それぞれのアミノオキシ化合物における求核性や構造、電荷の違いに由来していると考えられる。例えば、単純にシトシンへの求核性が高くてもアミノオキシ化合物の構造が極端に大きすぎる場合、TWJ の分岐点上で反応しにくいことが予測される。求核性以外にアミノオキシ化合物の構造や電荷によって異なる反応性を示す可能性も考えられる。また、反応性以外にも化学修飾されたシトシン誘導体の種類によって DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成の阻害にも影響があると考えられる。

今回の実験では、汎用性や利便性を考慮して市販の化合物を用いて実験を行ったが、他のアミノオキシ化合物を合成、探索することで検出時間の短縮やより明確なメチル基の識別が可能になることも考えられる。また、多くのアミノオキシ化合物で同様の反応性を示したことから、DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成の阻害を指標としたメチル基識別法以外に、蛍光物質やビオチンなどで標識化されたアミノオキシ化合物を用いて化学修飾することでシトシンのメチル化をダイレクトに検出できる可能性も示唆される。本研究では

TWJ プローブを利用したピンポイントなメチル化 DNA 検出法の開発を行っているが、蛍光標識されたアミノオキシ化合物などで一本鎖 DNA を化学修飾することでゲノムワイドなメチル化 DNA の定量が期待できる。

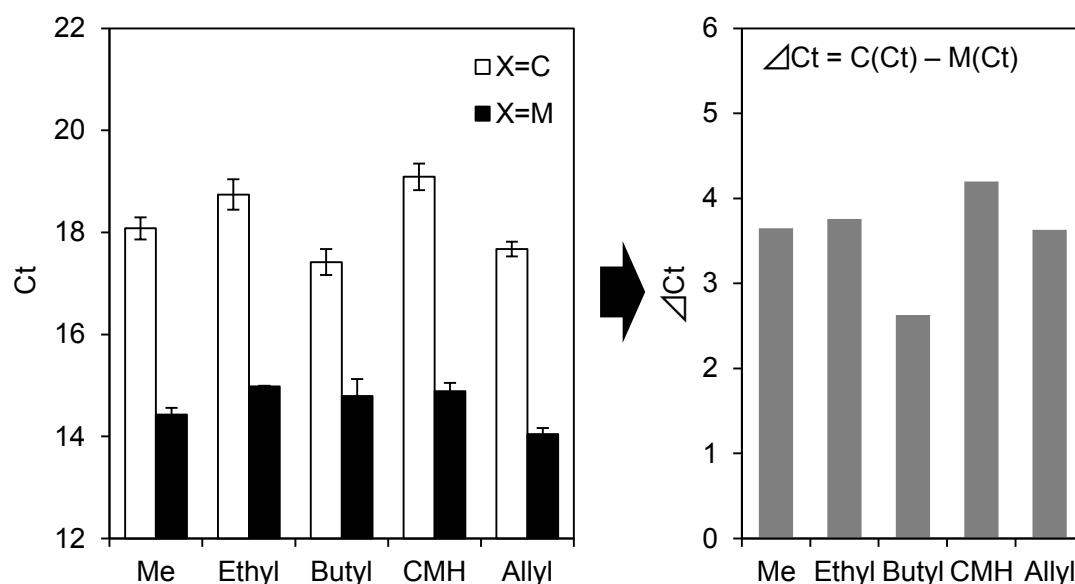
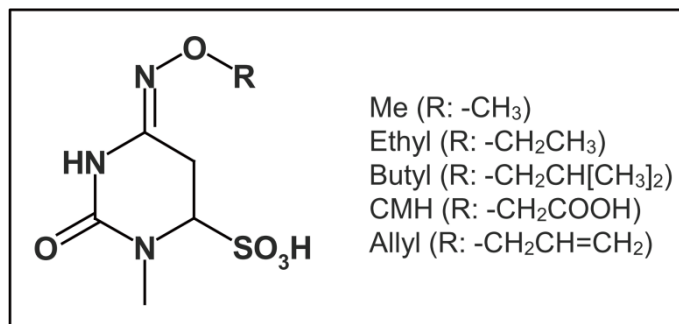


Fig. 4-5 アミノオキシ化合物の検討

左のグラフは、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M のアミノオキシ化合物(pH5.0)で化学修飾した各標的 DNA I を鋳型とした時の Ct 値を示している。右のグラフは、X が C の標的 DNA と M の標的 DNA における Ct 値の差を示す。アミノオキシ化合物は、メトキシアミン(Me, R: -CH₃)とエチルヒドロキシルアミン(Ethyl, R: -CH₂CH₃)、イソブチルヒドロキシルアミン(Butyl, R: -CH₂CH[CH₃]₂)、カルボキシメチルヒドロキシルアミン(CMH, R: -CH₂COOH)、アリルヒドロキシルアミン(Allyl, R: -CH₂CH=CH)を用いて反応を行った。

4-3-3 反応条件の検討

4-3-3-1 pH の検討

亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンの pH がそれぞれ pH4.0~6.0 の試薬を用いて化学修飾した時の各標的 DNA I における未修飾標的 DNA 量の変化を調べた。1.5 fmol の標的 DNA I と TWJ 構造を形成する 2 つの DNA プローブ(6 pmol)を HEPES 緩衝液 2 (50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)に加え、TWJ 構造を形成させた後、pH の異なる 1.0 M の亜硫酸水素ナトリウムと 1.0 M のメトキシアミンで 3 時間反応を行った。その後、化学修飾した標的 DNA (50 amol)を鋳型にリアルタイム PCR 測定を行った。その結果を Fig. 4-7 に示す。メトキシアミン以外のアミノオキシ化合物では pH6.0 に調製した時、析出してしまったため今回の実験ではメトキシアミンを用いて実験を行った。

Fig. 4-7 の結果から、pH4.0 の試薬で反応した場合、X = C の標的 DNA と X = M の標的 DNA で Ct 値が 20.0 サイクル(X = C)と 15.5 サイクル(X = M)に増大し、未修飾標的 DNA 量の割合が 2.6%(X = C)と 24.9%(X = M)に著しく低下してしまっていることが確認できる。一方、pH6.0 の試薬で反応した場合は、X = C の標的 DNA と X = M の標的 DNA とともに Ct 値が 16.0 サイクル(X = C)と 14.2 サイクル(X = M)で低く、未修飾標的 DNA 量が 36.9%(X = C)と 61.6%(X = M)で多く残存していることが確認できる。

修飾後の X = C の標的 DNA と X = M の標的 DNA の Ct 値と未修飾標的 DNA 量の差を比較した結果、pH の低下に伴い、X = C と X = M の Ct 値の差、 Δ Ct 値と未修飾標的 DNA 量の差が大きくなっていることがわかる。pH6.0 の場合、 Δ Ct 値が約 1.7 サイクルであったのに対して pH を 4.0 に下げた時、 Δ Ct 値が 4.5 サイクルに増大し、未修飾標的 DNA 量の差も約 1.7 倍から 9.4 倍に上昇した。

これらの結果から pH の低下に依存して未修飾標的 DNA 量が低下しており、低い pH の試薬を用いて反応を行った方が、反応効率が良いことが示唆される。しかし、pH の低下に伴い X = M の標的 DNA での Ct 値の増加、未修飾標的 DNA 量の低下が確認され、非特異的な修飾も増加してしまっていることが確認できる。pH4.0 などの酸性条件下では、Fig. 4-6 のように DNA 鎖中のシトシンの 3 位の窒素がプロトン化されやすくなり、6 位への求核反応がスムーズに進むことでシトシン誘導体の形成が促進されると考えられる一方で、X = M の Ct 値も増大していることから低い pH では各塩基のプロトン化状態などにより二重らせん構造、または TWJ 構造自体が不安定になり分岐点以外での非特異的な修飾により未修飾標的 DNA 量の低下を誘発していると考えられる。従って、反応性と非特異的な損傷を考慮して以降の実験では pH5.0 の試薬を使用することにした。

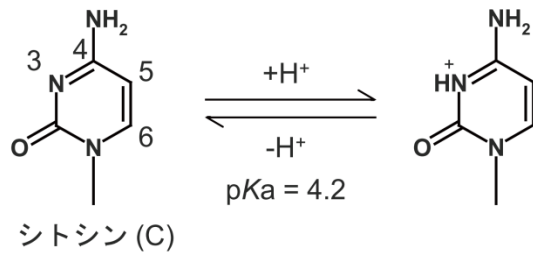


Fig. 4-6 シトシンのプロトン化

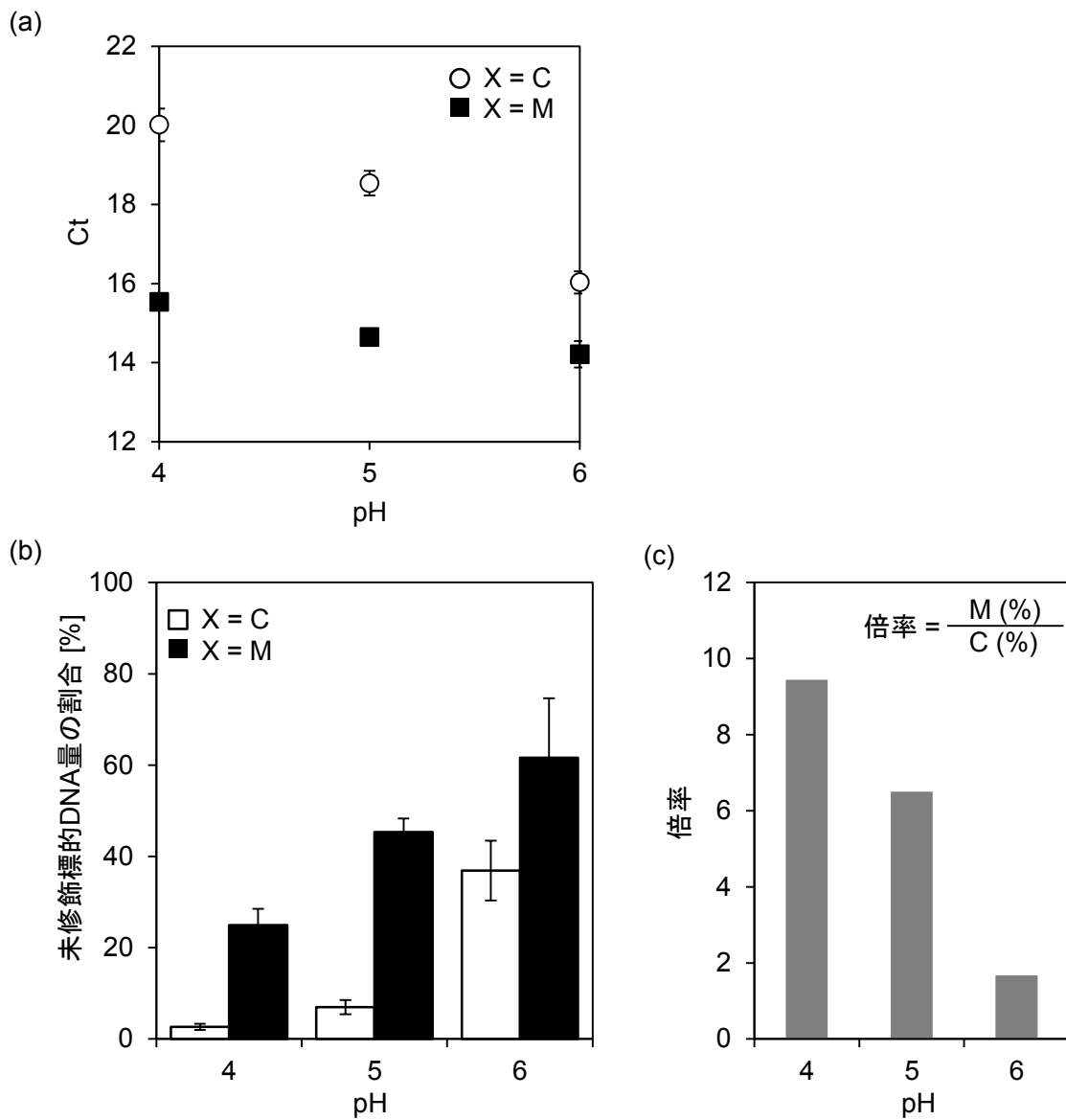


Fig. 4-7 pH と未修飾標的 DNA 量の関係

(a)は、各 pH における修飾後の標的 DNA I を鋳型にした時の Ct 値を示す。(b)は、(a)で測定した Ct 値から未修飾標的 DNA 量の割合を算出した結果を示す。(c)は、(b)で定量した X = C の標的 DNA と X = M の標的 DNA の時の未修飾標的 DNA 量から求めた倍率を示す。

4-3-3-2 亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンの濃度比の関係

今までの実験では、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウムに対して 1.0 M のアミノオキシ化合物を用いて 1:1 の濃度比(Fig. 4-9, 濃度比率 50%)で反応を行ってきた。そこで、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンの濃度を合わせて 2.0 M とした時の各濃度比率における標的 DNA I の Ct 値の変化を調べた。

1.5 fmol の標的 DNA I と TWJ 構造を形成する 2 つの DNA プローブ(6 pmol)を HEPES 緩衝液 2 (50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)に加え、TWJ 構造を形成させた後、濃度の異なる亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)とメトキシアミン(pH5.0)で 3 時間反応を行った。その後、化学修飾した標的 DNA (50 amol)を鋳型にリアルタイム PCR 測定を行った。その結果を Fig. 4-9 に示す。

Fig. 4-9 の結果から、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンの濃度がそれぞれ 1.0 M、比率が 1:1 に近いほど X = C と M の標的 DNA の Ct 値の差が大きく、明確にメチル基を識別できることが確認できる。過去の知見や第 2 章の MS スペクトル結果から、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンで DNA 鎖を反応した場合、シトシンの 6 位と 4 位にそれぞれスルホ基とメトキシアミンが 1 つずつ付加され、シトシン以外の塩基では化学修飾されないことが既に確認されている。1:1 の比率に近いほど反応効率が良いことから、TWJ 構造を形成させ、3 時間反応した場合でも DNA 鎖中のシトシンが特異的に化学修飾され、それ以外の塩基や *N*⁴-methoxy-5,6-dihydrocytosine-6-sulfonate 以外のシトシン誘導体が形成されていないことが推測される。

一方、2.0 M の亜硫酸水素ナトリウムのみで反応した場合、全体的に Ct 値が高く、未修飾標的 DNA 量が少なかった。この結果から、2.0 M の亜硫酸水素ナトリウム存在下では、TWJ 構造が形成されていないため、非特異的な修飾や損傷、脱ピリミジン化が生じている可能性が考えられる。また、亜硫酸水素ナトリウムにより、6 位にスルホ基のみが付加されたシトシン誘導体でも *N*⁴-methoxy-5,6-dihydrocytosine-6-sulfonate と同様にピリミジン環が嵩高い構造に変化するため、ポリメラーゼによる相補鎖合成を阻害することが知られている。これらの理由から、亜硫酸水素ナトリウムで反応した標的 DNA の未修飾標的 DNA 量が少なかったと考えられる。

メトキシアミンのみで反応した場合では、全体的に Ct 値が低く、未修飾の標的 DNA が多く残存しており、メトキシアミンのみでも C と M に僅ではあるが Ct 値に差を確認することができた。メトキシアミンなどのアミノオキシ化合物単体でシトシンを反応した場合、第 1 章の 1-4-1-2 で説明したアリルヒドロキシルアミンの反応や Fig. 4-8 に示すように 6 位への求核付加と 4 位のアミノ基転移反応が生じることが知られている。アミノオキシ化合物のみによる反応は、中間体や異性体がいくつかあり生成物の種類や構造によって、ポリメラーゼによる相補鎖合成を阻害、または修飾部位の塩基を変異させることが知られている。しかし、Fig. 4-9 からわかるように、C と M の差が僅かであり、反応が遅く明確なメチ

ル基の識別が難しいことがわかる。アリルヒドロキシルアミンの反応でも、60°Cで加熱して4時間反応していることから、アミノオキシ化合物単体での反応は遅いことが推測される。

これらの結果から、亜硫酸水素ナトリウムとアミノオキシ化合物の比率は1:1が最適であり、2つの試薬を併用することで亜硫酸水素ナトリウムを用いたバイサルファイト法やアリルヒドロキシルアミンなどアミノオキシ化合物単体の反応よりも、マイルドな条件下でスムーズに反応を行えることが示唆された。

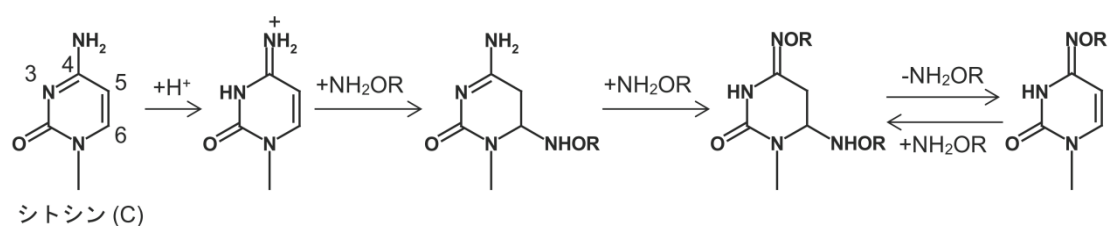


Fig. 4-8 アミノオキシ化合物によるシトシンへの反応

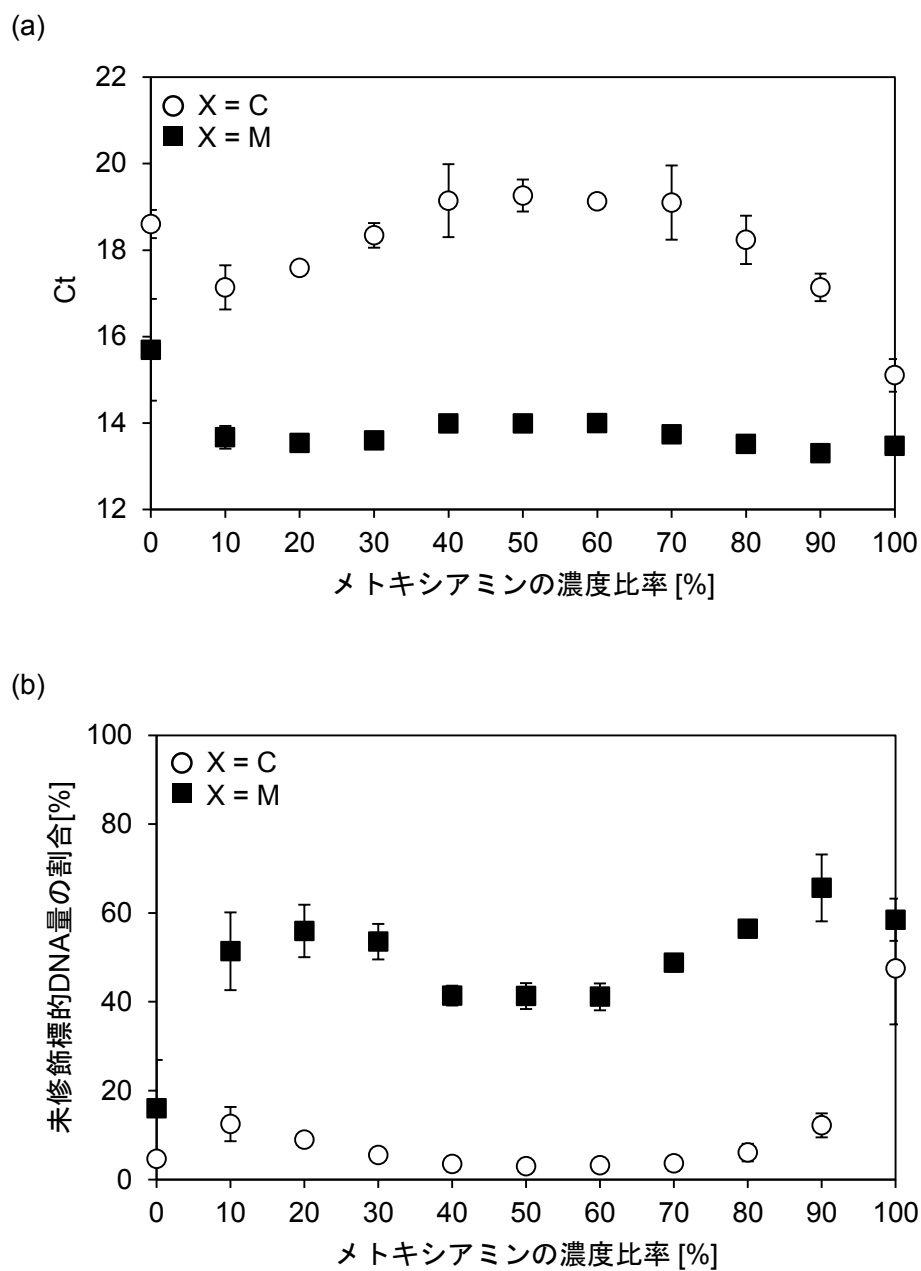


Fig. 4-9 亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンの濃度比の関係

(a)は、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンを合わせて2.0 Mになるようにメトキシアミンの濃度を0 M (0%)から2 M (100%)まで増やした時の各標的 DNA I における Ct 値の変化を示す。(b)は、(a)の Ct 値から未修飾標的 DNA 量の割合を算出したグラフを示している。

4-3-3-3 亜硫酸水素ナトリウムと CMH の濃度と未修飾標的 DNA 量の関係

亜硫酸水素ナトリウムと CMH の濃度をそれぞれ 0.2 M ずつ増やして反応を行い、未修飾標的 DNA 量の変化を調べた。1.5 fmol の標的 DNA I と TWJ 構造を形成する 2 つの DNA プローブ(6 pmol)を HEPES 緩衝液 2 (50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)に加え、TWJ 構造を形成させた後、濃度の異なる亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と CMH (pH5.0)で 3 時間反応を行った。その後、反応した標的 DNA (50 amol)を鋳型にリアルタイム PCR 測定を行った。その結果を Fig. 4-10 に示す。

Fig. 4-10 の結果から試薬の濃度に依存して、分岐点 X が C の標的 DNA と M の標的 DNA における Ct 値の差が大きくなっていくことが確認できる。X = M の標的 DNA I の Ct 値の変化は、僅かであり、修飾前と 1.0 M の亜硫酸水素ナトリウムと CMH で修飾した後で Ct 値が 0.6 サイクルしか変化していなかった。また、未修飾の標的 DNA も多く残存していることからメチルシトシンの亜硫酸水素ナトリウムと CMH による反応が著しく遅いことがわかる。一方、X = C の標的 DNA では、濃度依存的に Ct 値が 13.6 サイクルから 18.8 サイクルまで増大し、未修飾標的 DNA 量の割合が著しく減少した。これらの結果から、試薬の濃度が高いほど C と M の差が大きくなり、分岐点上のシトシンのメチル化を明確に識別できることが示された。しかし、CMH の濃度をこれ以上濃くすることは難しく、安定な品質、再現性を保つことが困難であるため、以降の実験でも 1.0 M で反応を行う。

この結果から、高濃度で溶ける可溶性なアミノオキシ化合物を探索し、高濃度で反応することができれば、反応時間の短縮、迅速性の向上が期待できる。また、TWJ 構造を利用して、亜硫酸水素ナトリウムとラベル標識されたアミノオキシ化合物を用いたメチル基識別法への応用を考えた場合、最低でも数百 mM のアミノオキシ化合物で反応しなくてはならないため、極端に極性の低いアミノオキシ化合物などでは反応が難しいことが示唆される。

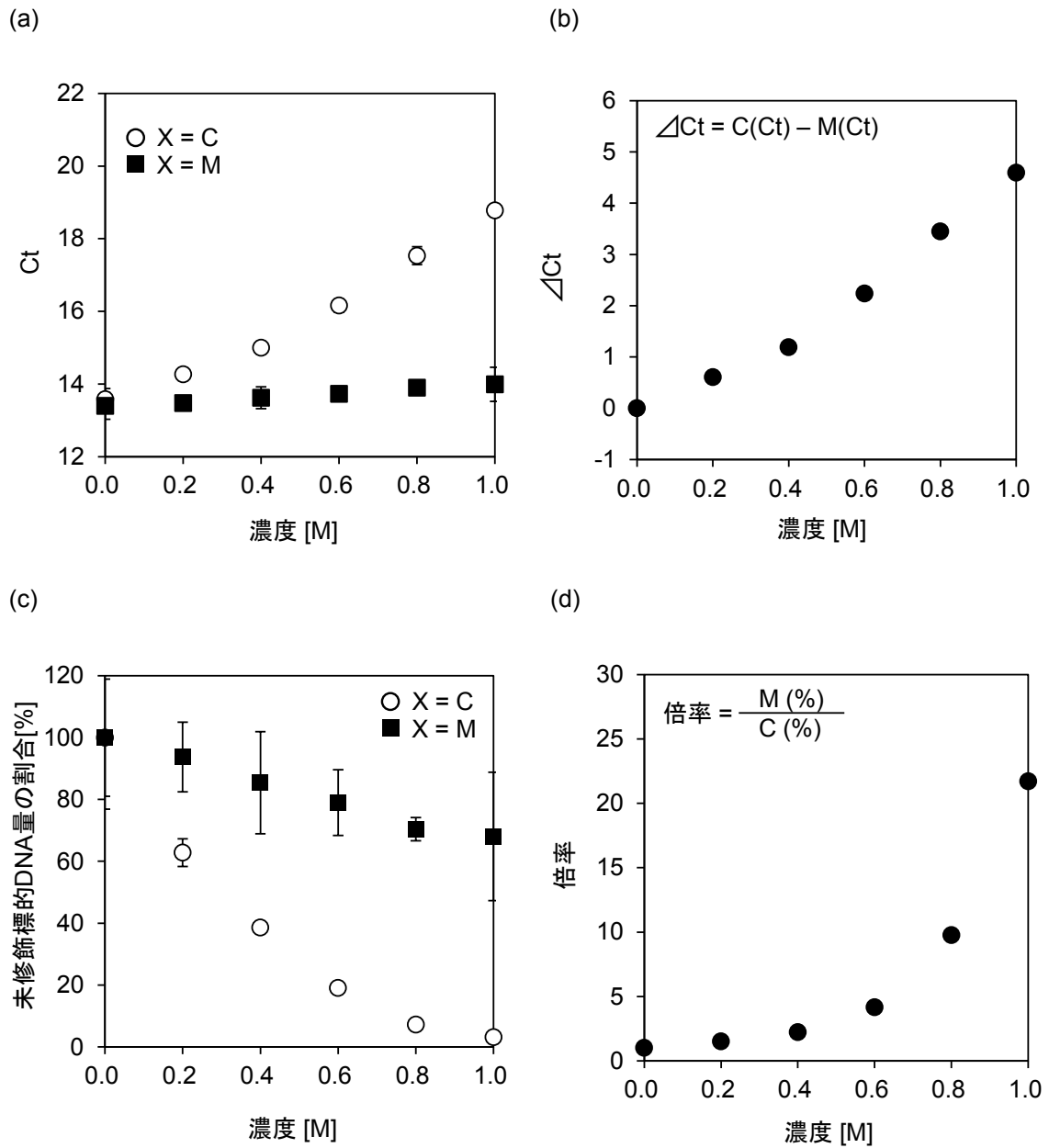


Fig. 4-10 亜硫酸水素ナトリウムとCMHを用いたPCR増幅の阻害と濃度依存性

(a)は亜硫酸水素ナトリウムとCMHを0.2 Mから1.0 Mまで徐々に増やした時の各標的DNA IにおけるCt値の変化を測定したグラフを示す。(b)は、(a)で測定したX = Cの標的DNAとX = Mの標的DNAにおけるCt値の差、 ΔCt 値を表したグラフである。(c)は、(a)の各標的DNAにおけるCt値から未修飾標的DNA量の割合を算出したグラフを示している。(d)は、X = CとX = Mの標的DNAにおける未修飾標的DNA量の割合から差を求めたグラフを表している。

4-3-3-4 反応時間と未修飾標的 DNA 量の関係

今まで、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M の CMH (pH5.0)で 3 時間、25°C で反応を行ってきたが、反応時間を 1 時間半から 2, 3, 4, 5 時間と変更して時間経過ごとの未修飾標的 DNA 量の変化を観測した。1.5 fmol の標的 DNA I と TWJ 構造を形成する 2 つの DNA プローブ(6 pmol)を HEPES 緩衝液 2 (50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)に加え、TWJ 構造を形成させた。その後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M の CMH (pH5.0)で反応を行った。反応後の標的 DNA (50 amol)を鋳型にリアルタイム PCR 測定を行った。その結果を Fig. 4-11 に示す。

Fig. 4-11 の結果から、時間依存的に未修飾標的 DNA 量が減少し、C と M の差が大きくなっていることが確認できる。90 分の反応でも $X = C$ の標的 DNA I と $X = M$ の標的 DNA I で未修飾標的 DNA 量の割合に 4.6 倍の差を確認することができ、従来の 55°C で 16 時間の反応を必要とするバイサルファイト法と比べ、検出時間を大幅に短縮化できる可能性が示された。

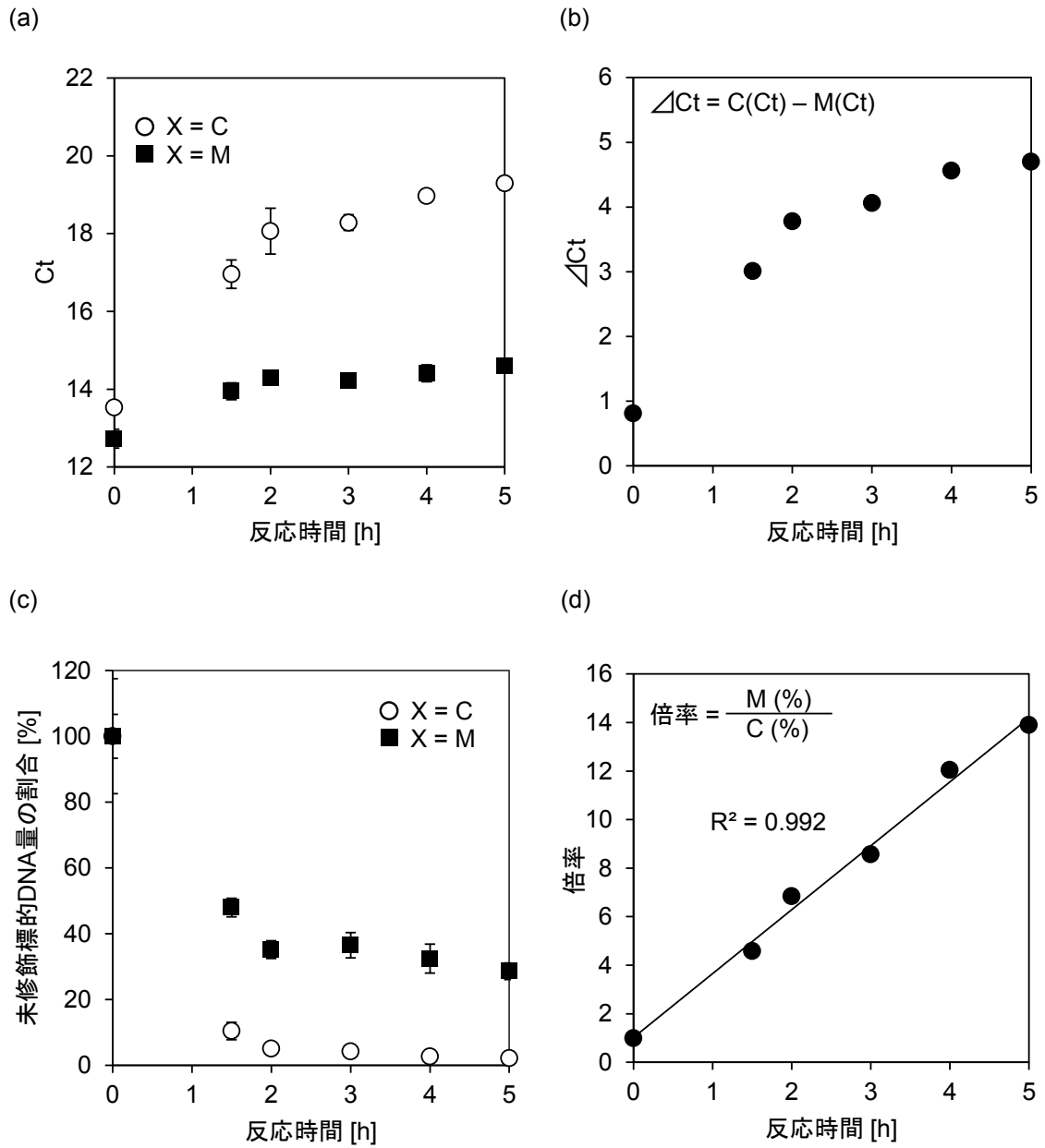


Fig. 4-11 反応時間と修飾 DNA 量の関係

(a)は、反応時間と各標的 DNA I における Ct 値の変化を示す。(b)は、反応時間ごとの X = C の標的 DNA と X = M の標的 DNA における Ct 値の差、 ΔCt 値を表している。(c)は、(a)で測定した Ct 値から算出した未修飾の標的 DNA 量の割合を示す。(d)は、(c)で求めた未修飾標的 DNA 量の X = C の標的 DNA と X = M の標的 DNA の差を表している。

4-3-3-5 塩濃度(NaCl)と未修飾標的 DNA 量の関係

DNA 鎖はリン酸基の負電荷により、相補鎖 DNA や DNA プローブと反発する。塩化ナトリウム(NaCl)などの陽イオンにより、DNA 鎖中の負電荷が中和され、DNA プローブとの結合、および高次構造が安定化されることから、塩濃度が高いほど TWJ 構造が安定になり、非特異的な修飾を抑制できると考え、NaCl 濃度による未修飾標的 DNA 量の変化を調べた。

1.5 fmol の標的 DNA I と TWJ 構造を形成する 2 つの DNA プローブ(6 pmol)を塩濃度の異なる HEPES 緩衝液に加え、TWJ 構造を形成させた。その後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M の CMH (pH5.0)で 3 時間、25°C で反応を行った。反応後の標的 DNA (50 amol)を鋳型にリアルタイム PCR 測定を行った。その結果を Fig. 4-12 に示す。

Fig. 4-12 の結果から NaCl 存在下では、X = M の標的 DNA I における未修飾標的 DNA 量の割合が、約 39.9%から 56.4%であるのに対して、NaCl 非存在下では 14.5%しか未修飾標的 DNA が残存していなかった。この結果から、NaCl 非存在下では、TWJ 構造が不安定、または DNA プローブが結合しにくい状態であることが示唆される。

これらの結果から、分岐点上の C を効率的に化学修飾するためには、緩衝液中に NaCl などの陽イオンの存在が重要であることが示唆された。また、塩濃度(NaCl)は、500 mM NaCl の時、最も分岐点上の C と M を明確に識別できることが示された。

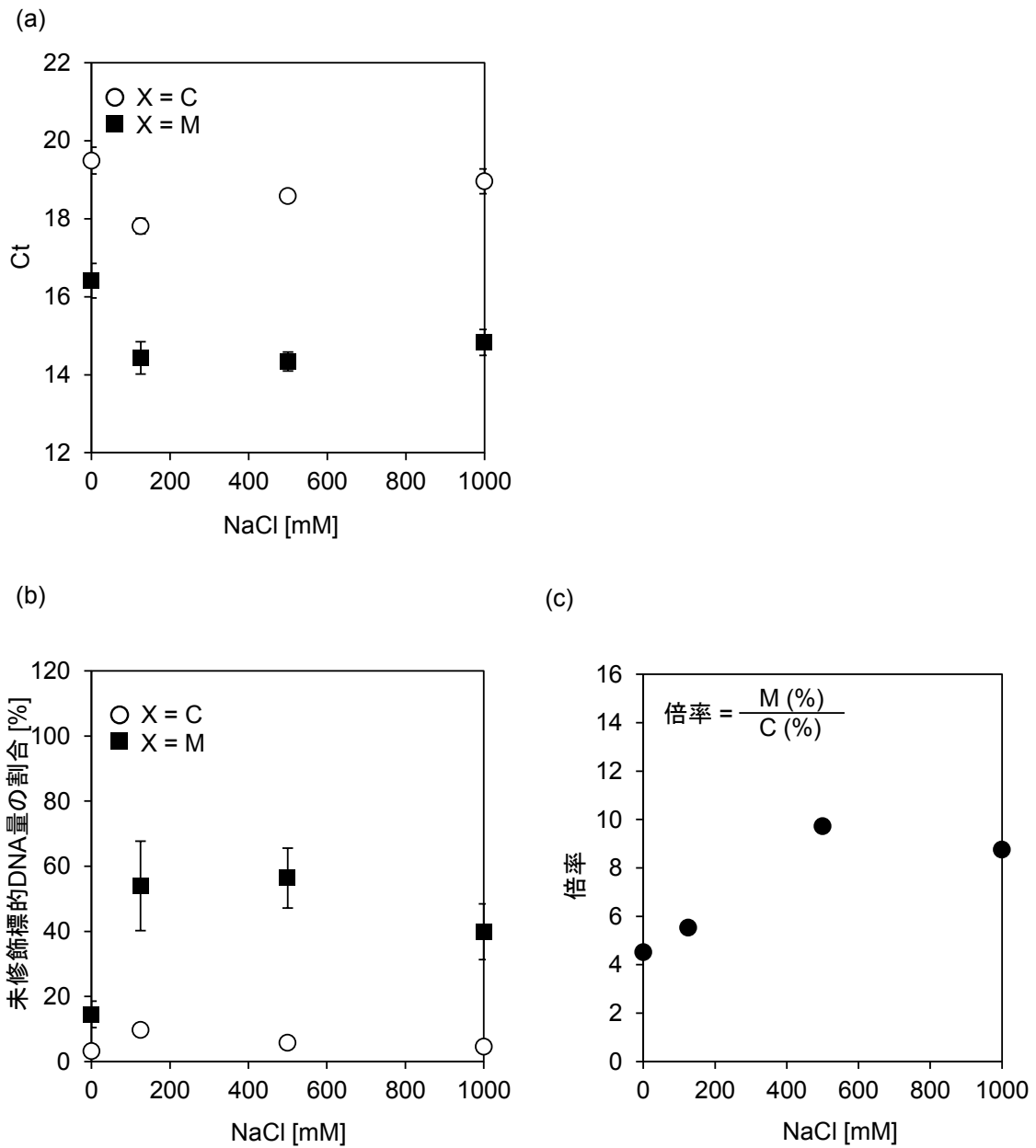


Fig. 4-12 各塩濃度(NaCl)における反応後の未修飾標的 DNA 量の変化

(a)は、各塩濃度(NaCl)における Ct 値を示す。(b)は、各塩濃度における X = C の標的 DNA I と X = M の標的 DNA I の未修飾標的 DNA 量の割合を示す。(c)は、(b)で算出した X = C の標的 DNA と X = M の標的 DNA の未修飾標的 DNA 量の割合から倍率を求めたグラフを表している。

4-3-4 各 DNA プローブにおける未修飾標的 DNA 量の変化

第3章の3-3-3では、5種類のDNAプローブを用いて反応した後、修飾後の各標的DNA IIを鋳型にサイクリングプライマー伸長反応を行い、伸長反応の阻害部位を確認した。各DNAプローブによるサイクリングプライマー伸長反応の阻害結果とリアルタイムPCRの結果が一致するか同様の実験を行った。

1.5 fmolの標的DNA IIと10 pmolのDNAプローブをHEPES緩衝液(50 mM HEPES/NaOH, 500 mM NaCl, pH6.0)に加え、熱変性した。95°Cで5分間加熱した後、氷上で急冷させ、熱変性を行った。その後、1.0 Mの亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と1.0 MのCMH (pH5.0)を加え、25°Cで3時間反応した。反応後の標的DNA II (50 amol)を鋳型にリアルタイムPCRを用いてCt値の測定と未修飾標的DNA量の割合を算出した。その結果をFig. 4-13に示す。

Fig. 4-13の結果より、TWJ構造を形成するDNAプローブを用いて標的DNA IIを化学修飾した時、分岐点XがCの標的DNAとMの標的DNAでCt値に大きな差を確認することができた。また、フルマッチTWJとミスマッチTWJを比較した結果、サイクリングプライマー伸長反応の結果と同様に、フルマッチTWJプローブを用いて反応した方が、X = Mの未修飾標的DNA量が多く残存しており、分岐点上のCとMを明確に識別できることが示された。

バルジDNAプローブにスペーサーを導入した場合でもTWJプローブより小さいが、CとMの標的DNAでCt値に差を確認することができた。未修飾標的DNA量の割合も0.4%(X = C)と1.5%(X = M)で、約3.4倍の差を確認することができたが、未修飾標的DNA量が僅かであった。第3章のFig. 3-7、サイクリングプライマー伸長反応の結果とも一致しており、隣接するシトシンが非特異的に修飾されてしまったことにより未修飾標的DNA量の割合が著しく低下したと考えられる。

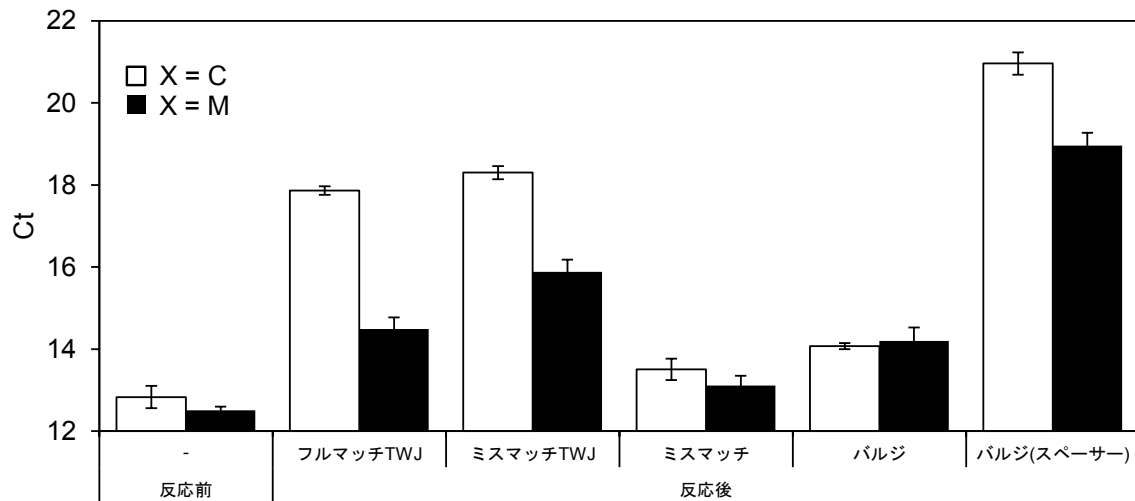
一方、ミスマッチと通常のバルジ構造(スペーサーなし)を形成するDNAプローブを用いて反応した場合は、標的DNAのXがCの時とMの時でCt値に大きな差を確認することができなかった。また、Ct値が低く未修飾標的DNA量が多く残存していた。サイクリングプライマー伸長反応では、バルジDNAプローブを用いて反応した場合、Xに隣接するシトシンでの強い伸長反応の阻害が確認された(Fig. 3-6, Lane 5と6)。しかし、リアルタイムPCRの結果では、Ct値が低く、未修飾の標的DNA量が多く残存しており、サイクリングプライマー伸長反応の結果と一致しなかった。

本検出法では、プライマー結合領域内にあるシトシンでの反応を防ぐため、プライマー結合領域を覆うようなDNAプローブを使用している。従って、ミスマッチDNAプローブやバルジDNAプローブの場合、PCR増幅する際にプライマーがDNAプローブに結合し、プローブ由来の非特異的なPCR増幅が生じてしまったため、Ct値が低くなったと考えられる(Fig. 4-14a, b)。一方、スペーサーを導入したバルジDNAプローブでは、プローブ内のス

ペーサーによりプライマーからの伸長反応が途中で阻害されるため、非特異的な増幅が少なく、リアルタイム PCR とサイクリングプライマー伸長反応の結果が一致したと考えられる(Fig. 4-14c)。この結果から、通常の DNA プローブを用いた場合、スペーサーのような PCR 阻害物質を DNA プローブ内に組み込むか、反応後に DNA プローブの除去操作が必要であることが示唆される。一方、TWJ プローブの場合は、2 つのプローブに分かれているため、プライマーが結合しても非特異的な増幅が少なくプローブの除去操作なしでダイレクトに測定できることが示された(Fig. 4-7d)。

リアルタイム PCR の結果からも、特定の塩基をピンポイントで修飾、メチル基を識別するのに、適した DNA プローブはフルマッチ TWJ プローブであることが示された。また、特殊な合成 DNA プローブを使わずにプローブの除去操作なしで、リアルタイム PCR でメチル化を識別できたことから、TWJ プローブは利便性にも優れていることが示された。

(a)



(b)

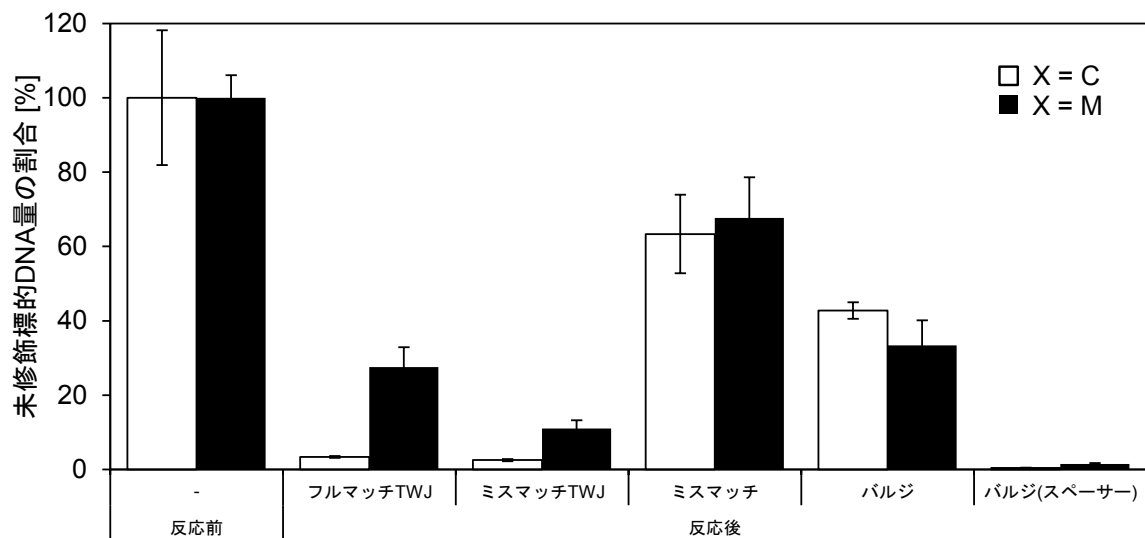


Fig. 4-13 各 DNA プローブにおける反応後のリアルタイム PCR 測定結果

(a)は、反応前と各 DNA プローブにおける反応後の Ct 値の変化を示す。(b)は、未修飾標的 DNA 量の割合を示す。

標的DNA II

5'-CTGATGAACATACTATCTTGCGCTCGC**XX**GGCTGCGGAGAATTGAATAAGCTGGTAC-5'
 プライマー結合領域 プライマー結合領域



(a). ミスマッチDNAプローブ

3'-GACTACTTGTATGATAGAACGCGAGCG^MMCGACGCCTCTTAECTTATTCGACCATG-5'
 5'-CTGATGAACATACTATCTTGCGCTCGC_XGGCTGCGGAGAATTGAATAAGCTGGTAC-3'

(b). バルジDNAプローブ

3'-GACTACTTGTATGATAGAACGCGAGCGMCGACGCCTCTTAECTTATTCGACCATG-5'
 5'-CTGATGAACATACTATCTTGCGCTCGC_XGGCTGCGGAGAATTGAATAAGCTGGTAC-3'

(c). バルジDNAプローブ(スペーサー)

3'-GACTACTTGTATGATAGAACGCGAGCG---MCGACGCCTCTTAECTTATTCGACCATG-5'
 5'-CTGATGAACATACTATCTTGCGCTCGC_XGGCTGCGGAGAATTGAATAAGCTGGTAC-3'

(d). TWJプローブ

5' 3'
 | |
 C G
 C G
 A T
 C G
 C G
 G C
 C G
 T A
 T A
 A

3'-GACTACTTGTATGATAGAACGCGAGCG MCGACGCCTCTTAECTTATTCGACCATG-5'
 5'-CTGATGAACATACTATCTTGCGCTCGC**XX**GGCTGCGGAGAATTGAATAAGCTGGTAC-3'

Fig. 4-14 各 DNA プローブにおけるプライマーのアニーリングと伸長反応の様式図

4-4 結言

本章では、DNA プローブを用いて特定の CpG 配列中のシトシンを選択的に化学修飾した後、リアルタイム PCR を用いて PCR 増幅を指標とした簡便な新規メチル化 DNA 検出法の構築を試みた。リアルタイム PCR を用いた検出系の開発は、迅速かつ定量的なメチル化解析が期待でき、診断技術や複数の遺伝子のメチル化状態を網羅的に解析するのに有用であると考えられる。

TWJ プローブを利用して特定の CpG 配列を化学修飾した後、リアルタイム PCR を用いて Ct 値の測定と未修飾標的 DNA 量の算出を行った。その結果、X がシトシンの標的 DNA とメチルシトシンの標的 DNA で Ct 値に約 3~4 サイクルの差を確認することができ、未修飾標的 DNA 量にも 8 倍以上の差を確認することができた。

TWJ プローブ以外に、バルジ DNA プローブ、ミスマッチ DNA プローブを用いて同様の実験を行ったが、リアルタイム PCR ではメチル化を識別することができなかった。バルジ DNA プローブにアルキル鎖のスペーサーを導入した DNA プローブでは、X がシトシンの標的 DNA とメチルシトシンの標的 DNA で Ct 値に差を確認することができたが、未修飾の標的 DNA 量が僅かであった。また、フルマッチ TWJ プローブとミスマッチ TWJ プローブで反応後の標的 DNA における Ct 値を比較した結果、フルマッチ TWJ プローブの方が Ct 値の差が大きく、未修飾の標的 DNA が多く残存していることが示された。第 3 章と同様に、リアルタイム PCR を用いたメチル基識別法も 5 種類の DNA プローブの内、フルマッチ TWJ プローブが最も X のメチル化を明確に識別できることが示された。

以上の結果から、リアルタイム PCR の Ct 値または未修飾の標的 DNA 量から DNA のメチル化を簡便に検出でき、フルマッチ TWJ プローブが分岐点上のシトシンのメチル化を最も明確に識別できることが示された。

本検出法は、TWJ プローブを利用して特定のシトシンを一塩基選択的に化学修飾することができるため、配列解析を行わずに特定のシトシンのメチル化状態を簡便に解析することができる。また、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非選択的に反応してしまうため、バイサルファイト変換後の標的 DNA 配列の塩基に偏りが生じ、PCR 増幅またはメチル化を解析する際に大きな制限がかかってしまっていた。従来の選択性のない反応に比べ、本検出法は特定の CpG 配列のみを効率的に反応できるため、従来法では検出が困難な領域でもメチル化を解析できる可能性が期待でき、詳細な遺伝子発現のプロファイリングシステム構築への利用が期待できる。

第5章 ヒトがん抑制遺伝子から成る合成 DNA を用いたメチル化解析

5-1 緒言

DNA のメチル化は、細胞のがん化や分化など様々な生命現象に深く関与している。細胞が分化する過程でのダイナミックなメチル化模様の変化や iPS 細胞におけるメチル化の初期化、ゲノムインプリンティングなどゲノムワイドなメチル化状態の変化を解析する際には、未だに従来法であるバイサルファイトシーケンシングによるゲノムワイドなメチル化解析が最も有用である。エピジェネティクスや分子生物学の基礎研究において、煩雑な操作や長い反応時間を必要とするバイサルファイトシーケンシング法のデメリットよりもゲノムワイドな詳細な解析が重要視されている。一方で、従来法は数ミリリットルの血液サンプルや大量の細胞が必要であり、遺伝子のメチル化状態を解析するまでに 2, 3 日かかるため、がん診断や遺伝子診断技術など迅速性や簡便性が求められる医療分野での応用に適していない。特定の遺伝子のメチル化状態を簡便かつ迅速に検出できる新規メチル化 DNA 検出法が開発できれば医療分野での応用が期待できる。また、新しい検出法の開発は、従来法では検出が困難であった領域などをカバーできる可能性があるため、詳細なエピゲノムマップを作成するのに役立つと考えられる。

第4章で、TWJ 構造を形成させた標的 DNA を亜硫酸水素ナトリウムとアミノオキシ化合物で化学修飾することで TWJ 構造の分岐点上に位置するシトシンのメチル化をリアルタイム PCR で簡便に識別できることが示された。本章では、がん抑制遺伝子など、細胞のがん化とメチル化状態が密に関連している遺伝子のメチル化状態を検出できるか *p16* 遺伝子と *retinoblastoma (RB1)* 遺伝子の合成配列を用いてモデル実験を行う。

1-3 で述べたように、*p16* 遺伝子は乳がん患者で過剰にメチル化されていることが報告されているため、*p16* 遺伝子のメチル化状態の解析は、がん診断の有用な指標になると考えられる。また、*RB1* 遺伝子もがん抑制遺伝子の一つである。

RB1 遺伝子のエクソン 8 や 14、25、27 には、CpG 配列にアデニンが隣接した CGA 配列がいくつか存在する。エクソン部位の CpG 配列におけるシトシンのメチル化は、遺伝子の不活性化よりも点変異、チミンへの変異に深く関与していることが報告されている^{69,70}。通常、シトシンの 4 位に脱アミノ化が生じてても DNA 修復機構により正常なシトシンへと修復されるが、5-メチルシトシンが脱アミノ化された場合、5 位のメチル基によりチミンとして誤認識されるため、高頻度で変異が生じる。従って、CGA 配列中のシトシンがメチル化された場合、脱アミノ化を経て TGA 配列(UGA, 終止コドン)へ変換される確率が非常に高くなる。TGA 配列に変異した場合、翻訳途中に終止コドンがあるため、正常なタンパク質が生産されず、細胞のがん化を誘発する。*RB1* エクソン 8 には、3 ヶ所の CpG 配列があり、その内、2 ヶ所は A が隣接した CGA 配列である。この *RB1* エクソン 8 にある CGA 配列中のシトシンのメチル化をピンポイントで検出できるか試みる。

RB1 遺伝子のように特定のシトシンのメチル化が遺伝子変異を引き起こし、細胞のがん化を誘発するケースもあり、配列解析を行わずに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検出できる方法は、新しい遺伝子診断のツールにも成りえる。従来法であるバイサルファイト法は、非メチル化シトシンをウラシル、チミンへと変換させることでシトシンのメチル化を識別しているが、メチル化された 5-メチルシトシンが脱アミノ化を経てチミンへ変異した場合、MSP や MethyLight 法ではバイサルファイト反応によってチミンに変換されたのか、メチル化によりチミンに変異していたのかを識別することができず、メチル化による致命的な変異を見過ごす可能性が考えられる。メチル化を経てチミンへと変異していた場合、バイサルファイトシーケンシング法を用いて変換前と変換後の配列解析を行わなければ識別することができないため、簡便に検出することが困難である。一方、本検出法は、非メチル化シトシンを特異的に化学修飾し、PCR 増幅の阻害を利用してメチル化を検出しているため、メチル化とチミンへの変異を識別することはできないが、シトシンと識別することはできる。このように従来法とは異なるアプローチによる新しいメチル化 DNA 検出法の開発は、DNA のメチル化状態をより鮮明にプロファイリングするのに有用である。また、一塩基単位でメチル化による変異や脱メチル化をモニタリングすることができれば、5-ヒドロキシメチルシトシンや 5-ホルミルシトシン、5-カルボキシルシトシンなどの修飾核酸による遺伝子の再活性化や脱メチル化経路など機能解明にも役立つと考えられる。

5-2 実験方法

任意の量の標的 DNA と TWJ プローブを HEPES 緩衝液に加え、熱変性を行った。熱変性後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム水溶液(pH5.0)と 1.0 M CMH (pH5.0)を加え、3 時間 25°C で反応した。反応後、エタノール沈殿を行い、DNA サンプルを粗精製した。粗精製した DNA サンプルを鋳型にリアルタイム PCR である一定量の PCR 増幅産物が得られるまでのサイクル数、Ct 値の測定をした。また、反応前の標的 DNA の Ct 値から未修飾標的 DNA 量の割合を算出した。

リアルタイム PCR の反応は、TaKaRa の *Ex Taq* 及び付属の 10×*Ex Taq* Buffer、2.5 mM dNTP mixture と 10×SYBR Green I を用いた。DNA サンプル 10.0 μl と 10×*Ex Taq* Buffer 2.5 μl、10×SYBR Green I 2.5 μl、2.5 mM dNTP mixture 2.0 μl (5 nmol)、50 mM MgSO₄ 1.0 μl、2.5 μM のフォワードプライマーと 2.5 μM のリバースプライマーをそれぞれ 1.5 μl (3.75 pmol) 加え、最終体積が 25 μl になるように滅菌水を加えた。この時、それぞれの最終濃度が 1×*Ex Taq* Buffer、0.2 mM dNTP mixture、2 mM MgSO₄、150 nM プライマーになるように PCR 反応溶液を調製した。反応溶液に 5.0 U/μl の *Ex Taq* を 0.1 μl 加え、リアルタイム PCR 測定を行った。

基本的な実験操作は、第4章の4-2-2と同じであるため、下記には、リアルタイムPCRのプログラムおよび使用したDNA配列など詳細を記す。プライマー配列は、主に Sequence Assistant ver. 2.1を使用して設計した。

5-2-1 p16 プロモーター配列から成る 49 塩基の合成 DNA を用いたメチル化解析

p16 遺伝子のプロモーター配列(GenBank, AF022809.1)から成る 49 塩基の合成標的 DNA 配列、および DNA プローブ配列、プライマー配列を Table 5-1 に示す。49 塩基の合成 DNA 配列の X 部位が C または M の 2 種類の標的 DNA (p16 promoter 1)を用いて実験を行った。標的 DNA に DNA プローブ(TWJ プローブ 1 と TWJ プローブ 2)を加え、HEPES 緩衝液(50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)に溶解させた後、熱変性を行った。熱変性は、95°C で 5 分間加熱した後、氷上で急冷させた。TWJ 構造を形成させた標的 DNA の二次構造の模式図を Fig. 5-1a に示す。リアルタイム PCR 測定は以下のプログラムで行った【55°C:5 分→95°C:5 分→(95°C:5 秒→52°C:10 秒→72°C:15 秒, 50 サイクル)→95°C:5 分→60°C:5 分→95°C:5 分】。

Table 5-1. 49 塩基の合成 DNA を用いたメチル化解析用 DNA 配列

Oligo DNAs
p16 promoter 1 (p16-49-1863X, X = C or M, 49mer) 5'-AGTGCTCGGAGTTAATAGCACCTCCTCXGAGCA CTCGCTCACAGCGTCC-3'
TWJ Probe 1 (p16-P38-1863-1, 38mer) 5'-CCACCGCTCTGGAGGAGGTGCTATTA ACTCCGAGCACT-3'
TWJ Probe 2 (p16-P31-1863-2, 31mer) 5'-GGACGCTGTGAGCGAGTGCTMAGAGCGGTGG-3'
Forward Primer 1 (P17-1863-Fd, 17mer) 5'-GCTCGGAGTTAATAGCA-3'
Reverse Primer 1 (P14-1863-Rv, 14mer) 5'-ACGCTGTGAGCGAG-3'

5-2-2 p16 プロモーター配列から成る二本鎖 DNA を用いたメチル化解析

p16 遺伝子のプロモーター配列(GenBank, AF022809.1)から成る 54 塩基の合成標的 DNA 配列、および相補鎖 DNA、DNA プローブ配列、プライマー配列を Table 5-2 に示す。54 塩基の合成 DNA 配列の X 部位が C または M の 2 種類の標的 DNA (p16 promoter 2)を用いて実験を行った。標的 DNA に DNA プローブ(TWJ プローブ 3 と TWJ プローブ 4)を加え、HEPES 緩衝液(50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)に溶解させ、熱変性を行った。熱変性は、95°Cで 5 分間加熱した後、氷上で急冷させた。TWJ 構造を形成させた標的 DNA の二次構造の模式図を Fig. 5-1b に示す。二本鎖標的 DNA の実験は、標的 DNA 量の 1.1 倍量の相補鎖 DNA (cDNA)を加えて実験を行った。リアルタイム PCR は以下のプログラムで測定を行った【55°C:5 分→95°C:5 分→(95°C:5 秒→64°C:10 秒→72°C:15 秒, 50 サイクル)→95°C:5 分→60°C:5 分→95°C:5 分】。

Table 5-2. 54 塩基の二本鎖 DNA を用いたメチル化解析用 DNA 配列

Oligo DNAs
p16 promoter 2 (p16-54-1905X, X = C or M, 54mer) 5'-AGCGTCCCCTTGCCTGGAAAGATAACCGXGGTCCC TCCAGAGGATTTGAGGGACA-3'
cDNA (p16-54-1905C-C, 54mer) 5'-TGTCCCTCAAATCCTCTGGAGGGACCGCGGTATCT TTCCAGGCAAGGGGACGCT-3'
TWJ Probe 3 (p16-P38-1905-1, 38mer) 5'-CCACCGCTCTGCGGTATCTTTCCAGGCAAGGGGACGCT-3'
TWJ Probe 4 (p16-p36-1905-2, 36mer) 5'-TGTCCCTCAAATCCTCTGGAGGGACMAGAGCGGTGG-3'
Forward Primer 2 (P20-1905-Fd, 20mer) 5'-CCCTTGCCTGGAAAGATAACC-3'
Reverse Primer 2 (P21-1905-Rv, 21mer) 5'-TGTCCCTCAAATCCTCTGGAG-3'

5-2-3 96塩基の合成DNAを用いた2カ所のメチル化パターン解析

p16 遺伝子のプロモーター配列(GenBank, AF022809.1)から成る96塩基の合成標的DNA配列、DNAプローブ配列をTable 5-3に示す。92塩基の合成DNA配列のX部位とY部位がそれぞれCまたはMの3種類の標的DNA (*p16* promoter 1+2)を用いて実験を行った。DNAプローブ(TWJプローブ1, 2, 4)およびプライマーは、5-2-1 (Table 5-1)と5-2-2 (Table 5-2)のプローブおよびプライマーを使用した。ただし、TWJプローブ3のみTable 5-3のTWJプローブ3'を用いた。標的DNAにそれぞれのDNAプローブを加え、HEPES緩衝液(50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)に溶解させた後、熱変性を行った。熱変性は、95°Cで5分間加熱した後、氷上で急冷させた。TWJ構造を形成させた標的DNAの二次構造の模式図をFig. 5-1cに示す。リアルタイムPCRのプログラムは、それぞれのプライマーに対応した5-2-1と5-2-2の条件で行った。

Table 5-3. 2カ所のメチル化パターン解析用DNA配列

Oligo DNAs
<i>p16</i> promoter 1+2 (p16-1863X-1905Y, X = C or M, Y = C or M, 96mer) 5'-AGTGCTCGGAGTTAATAGCACCTCCTCXGAGCACTCGCT CACAGCGTCCCCTTGCCTGGAAAGATACCGYGGT CCCTCCAGAGGATTTGAGGGACA-3'
TWJ Probe 3' (p16-P31-1905-1, 31mer) 5'-CCACCGCTCTGCGGTATCTTTCCAGGCAAGG-3'

5-2-4 p16 エキソン 1 から成る 92 塩基の合成 DNA を用いたメチル化解析

p16 遺伝子のエキソン 1 配列(GenBank, U12818.1)から成る 92 塩基の合成標的 DNA 配列、および DNA プローブ配列、プライマー配列を Table 5-4 に示す。92 塩基の合成 DNA 配列の X 部位が C または M の 2 種類の標的 DNA (p16 exon 1)を用いて実験を行った。標的 DNA に TWJ プローブを加え、HEPES 緩衝液(50 mM HEPES/NaOH, 500 mM NaCl, pH6.0)に溶解させた後、熱変性を行った。熱変性は、95°C で 5 分間加熱した後、氷上で急冷させた。TWJ 構造を形成させた標的 DNA の二次構造の模式図を Fig. 5-1d に示す。リアルタイム PCR 測定は以下のプログラムで行った【55°C:5 分→95°C:5 分→(95°C:5 秒→66°C:10 秒→72°C:15 秒, 50 サイクル)→95°C:5 分→60°C:5 分→95°C:5 分】。

Table 5-4. 92 塩基の合成 DNA を用いたメチル化解析用 DNA 配列

Oligo DNAs
p16 exon 1 (P16-92-52X-ex1, X = C or M, 92mer)
5'-TCACCAGAGGGTGGGGCGGACCGCGTGXGCTCGGCCG CTGCGGAGAGGGGGAGAGCAGGCAGCGGGCGG CGGGGAGCAGCATGGAGCCGGCG-3'
TWJ Probe (p16-p38-52-1, 38mer)
5'-CCACCGCTCTGCACGCGGTCCGCCCCACCCTCTGGTGA-3'
TWJ Probe (p16-p74-52-2, 74mer)
5'-CGCCGGCTCCATGCTGCTCCCCGCCGCCCGCTGCCTG CTCTCCCCCTCTCCGCAGCCGCCGAGMAGAGCGGTGG-3'
Forward Primer 1 (p16-p21-52-Fd, 21mer)
5'-TCACCAGAGGGTGGGGCGGAC-3'
Forward Primer 2 (p16-p18-52-Fd, 18mer)
5'-GGGCGGACCGCGTGCGCT-3'
Reverse Primer (p16-p20-52-Rv, 20mer)
5'-CGGCTCCATGCTGGTCCCCG-3'

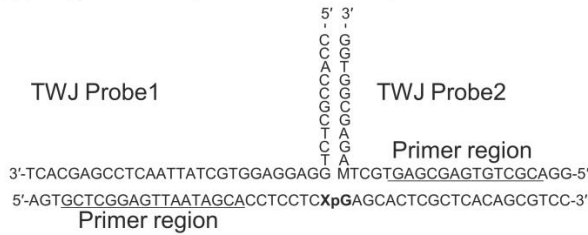
5-2-5 RB1 エキソン 8 から成る 80 塩基の合成 DNA を用いたメチル化解析

RB1 遺伝子のエキソン 8 配列(GenBank, L41896.1)から成る 80 塩基の合成標的 DNA 配列、および DNA プローブ配列、プライマー配列を Table 5-5 に示す。80 塩基の合成 DNA 配列の X 部位が C または M の 2 種類の標的 DNA (RB1 exon 8)を用いて実験を行った。標的 DNA に DNA プローブ(TWJ プローブ 1, 2 または TWJ プローブ 3, 4)を加え、HEPES 緩衝液(50 mM HEPES/NaOH, 50 mM NaCl, pH7.0)に溶解させ、熱変性を行った。熱変性は、95°Cで 15 分間加熱した後、30 分かけてゆっくりと温度を 30°Cに下げてから 25°Cで 5 分間静置させた。TWJ 構造を形成させた標的 DNA の二次構造の模式図を Fig. 5-1e に示す。リアルタイム PCR のプログラムは以下に記す【55°C:5 分→95°C:5 分→(95°C:5 秒→60°C:10 秒→72°C:15 秒, 50 サイクル)→95°C:5 分→60°C:5 分→95°C:5 分】。

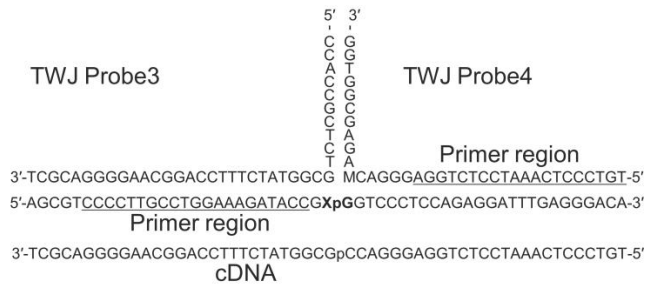
Table 5-5. 80 塩基の合成 DNA を用いたメチル化解析用 DNA 配列

Oligo DNAs
RB1 exon 8 (RB1-59683X, X = C or M, 80mer) 5'-AACAGCTGTTATACCCATTAATGGTTCACCTXGAACACCCAG GCGAGGTCAGAACAGGAGTGACCGGATAGCAAAACAAC-3'
TWJ Probe 1 (RB1-p41-1, 41mer) 5'-CCACCGCTCTGAGGTGAACCATTAATGGGTATAACAGCTGT-3'
TWJ Probe 2 (RB1-p58-2, 58mer) 5'-GTTGTTTTGCTATCCGTGCACTCCTGTTCTGACCTCGCC TGGGTGTTMAGAGCGGTGG-3'
TWJ Probe 3 (RB1-p44-3, 44mer) 5'-CCACCGCTCTTTCGAGGTGAACCATTAATGGGTATAACAGCTGT-3'
TWJ Probe 4 (RB1-p55-4, 55mer) 5'-GTTGTTTTGCTATCCGTGCACTCCTGTTCTGACCTCGCC TGGGTGAGAGCGGTGG-3'
Forward Primer (RB1-P20-Fd, 20mer) 5'-AACAGCTGTTATACCCATTA-3'
Reverse Primer (RB1-p20-Rv20mer) 5'-GTTGTTTTGCTATCCGTGCA-3'

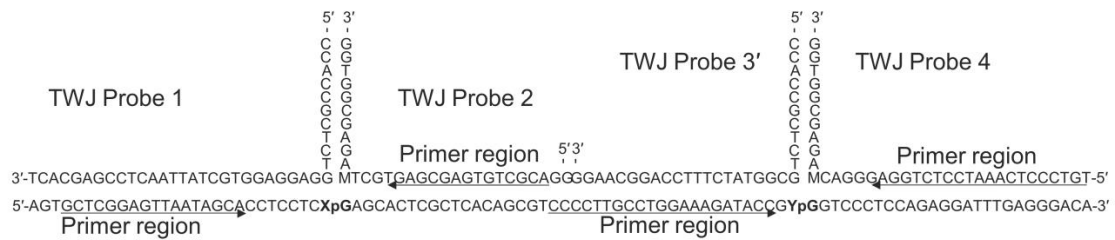
(a) *p16* promoter 1 (49mer, X = C or M)



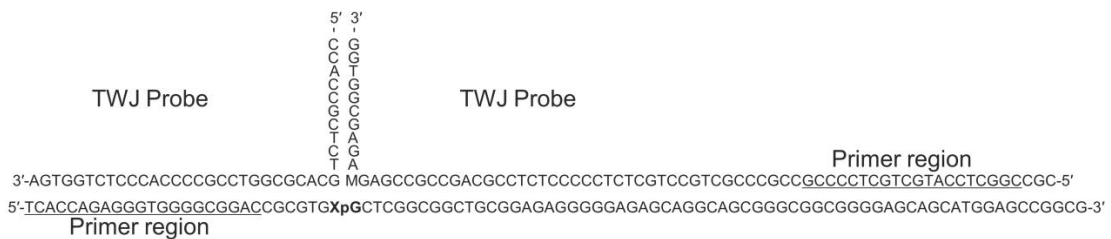
(b) *p16* promoter 2 (54mer, X = C or M)



(c) *p16* promoter 1+2 (96mer, X = C or M, Y = C or M)



(d) *p16* exon 1 (92mer, X = C or M)



(e) *RB1* exon 8 (80mer, X = C or M)

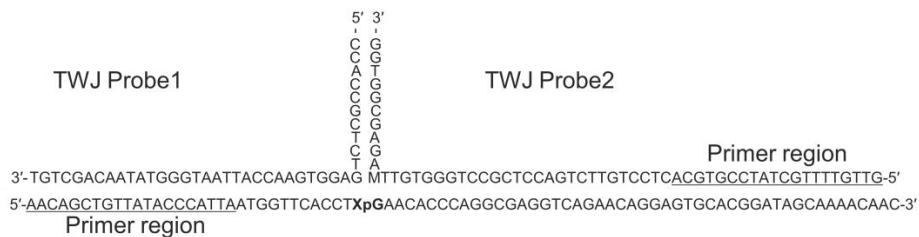


Fig. 5-1 各標的 DNA における TWJ 構造の模式図

5-3 結果及び考察

5-3-1 p16 の部分配列から成る合成 DNA でのメチル化検出結果

がん抑制遺伝子の一つである p16 遺伝子の部分配列から成る合成 DNA を標的として X 部位または Y 部位のメチル化をピンポイントで検出できるか試みた。p16 遺伝子のメチル化異常は、乳がんを含むいくつかの腫瘍形成に関与しているため、p16 の部分配列から成る合成 DNA でメチル化状態を解析することができれば、ゲノム DNA での検出、がん診断への応用が期待できる。

5-3-1-1 p16 プロモーター配列 1 (1863 番目の C) のメチル化検出結果

1.5 pmol の標的 DNA と DNA プローブ 6.0 pmol を HEPES 緩衝液 (50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0) に溶解させ、熱変性により TWJ 構造を形成させ後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム (pH5.0) と 1.0 M CMH (pH5.0) を加え、3 時間 25°C で反応した。反応後の標的 DNA (50 fmol) を鋳型にリアルタイム PCR を行い Ct 値の測定と未修飾標的 DNA 量の割合を算出した。その結果を Fig. 5-2 に示す。

Fig. 5-2a の結果より、反応前では X = C の標的 DNA と X = M の標的 DNA とともに Ct 値が 6.6 サイクルとほぼ同一であり、初期の DNA 量が等しいことが確認できる。一方、DNA プローブを加え TWJ 構造を形成させて化学修飾を行った反応後の標的 DNA では、分岐点 (X) が C の場合、Ct 値が 6.6 サイクルから 12.2 サイクルへ大きく増大したのに対して、M の場合では 6.6 サイクルから 8.5 サイクルへ僅かにしか増大しなかった。X = C の標的 DNA と X = M の標的 DNA で反応前は Ct 値がほぼ同じであったが、反応後では Ct 値に約 3.7 サイクルの差を確認することができた。また、リアルタイム PCR で測定した Ct 値から反応後の未修飾標的 DNA 量の割合を求めた結果 (Fig. 5-2b)、X = C の標的 DNA では未修飾標的 DNA 量の割合が 3.5% であったのに対して、X = M の標的 DNA では 33.0% で、X が C の標的 DNA に比べ、約 9.4 倍も多く残存しており、有意な差を確認することができた。

標的 DNA 量を 1.5 pmol から 150 fmol、15 fmol に減らして同様の実験を行った。その結果を Fig. 5-3 に示す。各標的 DNA 量における反応前と反応後の Ct 値を測定した結果、1.5 pmol の場合では反応後の X = C の標的 DNA と M の標的 DNA で約 3.7 サイクルの差が確認できていたが、150 fmol に減らした時、Ct 値の差が約 2.4 サイクルに減少した。また、未修飾標的 DNA 量の割合は 7.3% (X = C) と 26.8% (X = M) になり、約 3.7 倍の差しか確認することができなかった。15 fmol の標的 DNA では C と M で差を識別することができなかった。

The mfold Web server (<http://mfold.rna.albany.edu/>) を用いて標的 DNA の推定二次構造を予測した結果を Fig. 5-4 に示す。今回使用した 49 塩基の標的 DNA 配列は、分子内に相補

的な部分が多く、Fig. 5-4のような高次構造を形成しやすいため、プライマーやDNAプローブの結合を阻害したと考えられる。従って、低コピー数の標的DNAでのPCR増幅やDNAプローブの結合が阻害され、X部位のメチル化を検出できなくなったと推測される。

通常のPCR法やDNAプローブを利用した配列選択的な化学修飾法の場合、プライマーやDNAプローブ配列の設計が困難な領域や増幅が難しい領域がある。特に、PCRを利用した検出系で高感度化を目指した場合、プライマーダイマーの形成や結合領域、増幅産物のダイマー形成など様々な要因を考慮しなければならない。この問題は、PCR増幅や配列解析など核酸分子を解析するほとんどの手法で共通する問題であり、従来法のバイサルファイトシーケンシング法やMSP、MethyLight法にも共通する問題である。これらの根本的な問題点を改善するには、核酸分子増幅法に頼らない異なる検出系の開発が求められる。3-3-2や4-3-2で様々なアミノオキシ化合物でシトシンを特異的に修飾できることが既に確認できているため、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した新たな検出法を開発できれば、従来の核酸分子増幅法では検出が困難な領域をカバーできる可能性が期待できる。従来法と比較して、アミノオキシ化合物を利用した本検出法は、リアルタイムPCR以外に様々な検出系へのアプローチが期待できるため、従来法よりも利便性や汎用性に優れていることが示唆される。

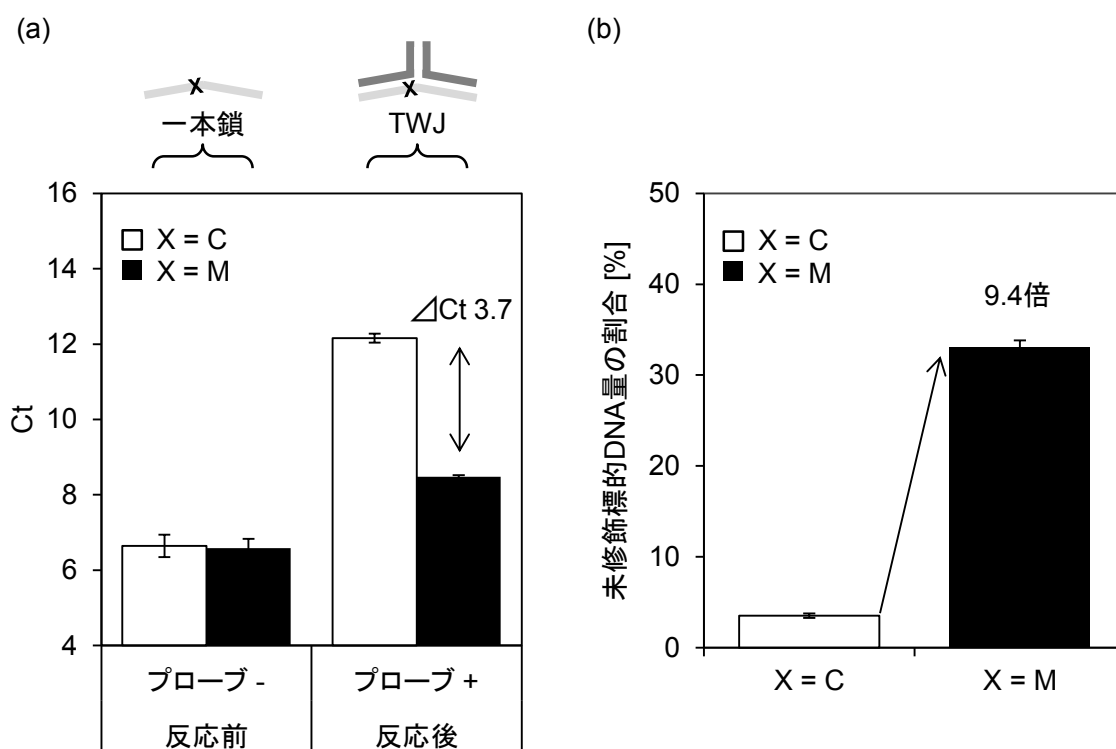


Fig. 5-2 p16 プロモーター領域の 1863 番目のシトシンにおけるメチル化識別結果

(a) 1.5 pmol の標的 DNA における反応前と反応後の Ct 値の変化 (b) Ct 値から算出した反応後の未修飾標的 DNA 量の割合を示す。

5-3-1-2 *p16* プロモーター配列 2 (1905 番目の C)でのメチル化検出結果

5-3-1-1 で *p16* 遺伝子の部分配列を合成した標的 DNA でも TWJ 構造の分岐点上に位置するシトシンのメチル化をピンポイントで検出できることが示された。同様に *p16* 遺伝子の異なる CpG 部位のメチル化も検出できるか、汎用性の確認を行った。

まず、5-3-1-1 と同様に 15 fmol の一本鎖標的 DNA を用いて実験を行った。15 fmol の標的 DNA と DNA プローブ 6.0 pmol を HEPES 緩衝液(50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)に溶解させ、熱変性を行った後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M CMH (pH5.0)を加え、3 時間 25°Cで反応した。反応後の標的 DNA (0.5 fmol)を鋳型にリアルタイム PCR を行い Ct 値の測定と未修飾標的 DNA 量を算出した。その結果を Fig. 5-5 に示す。

1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M の CMH (pH5.0)で反応する前の標的 DNA の Ct 値は、X = C の標的 DNA と X = M の標的 DNA で 11.1 サイクルと 11.0 サイクルでほぼ同じであり、初めの DNA 量が等しいことがわかる。一方、TWJ プローブを加えて反応を行った場合、X = C の標的 DNA では Ct 値が 15.3 サイクルに増大したのに対して X = M の標的 DNA では 11.9 サイクルとほとんど変化しなかった。X が C と M の場合で Ct 値に約 3.5 サイクルの差を確認することができた。また、反応前の標的 DNA 量から反応後の未修飾の標的 DNA 量の割合を算出した結果、X = C の標的 DNA では未修飾の標的 DNA は 6.7% しか残存していなかったのに対して、X = M の標的 DNA では 56.1%も未修飾の標的 DNA が有意に多く残存しており、X が C と M の場合で約 8.4 倍の差を確認することができた。この結果から、*p16* の異なる CpG 部位でもシトシンのメチル化をピンポイントで識別できることが示され、他の CpG 部位や遺伝子のメチル化状態を解析できる可能性が示唆された。

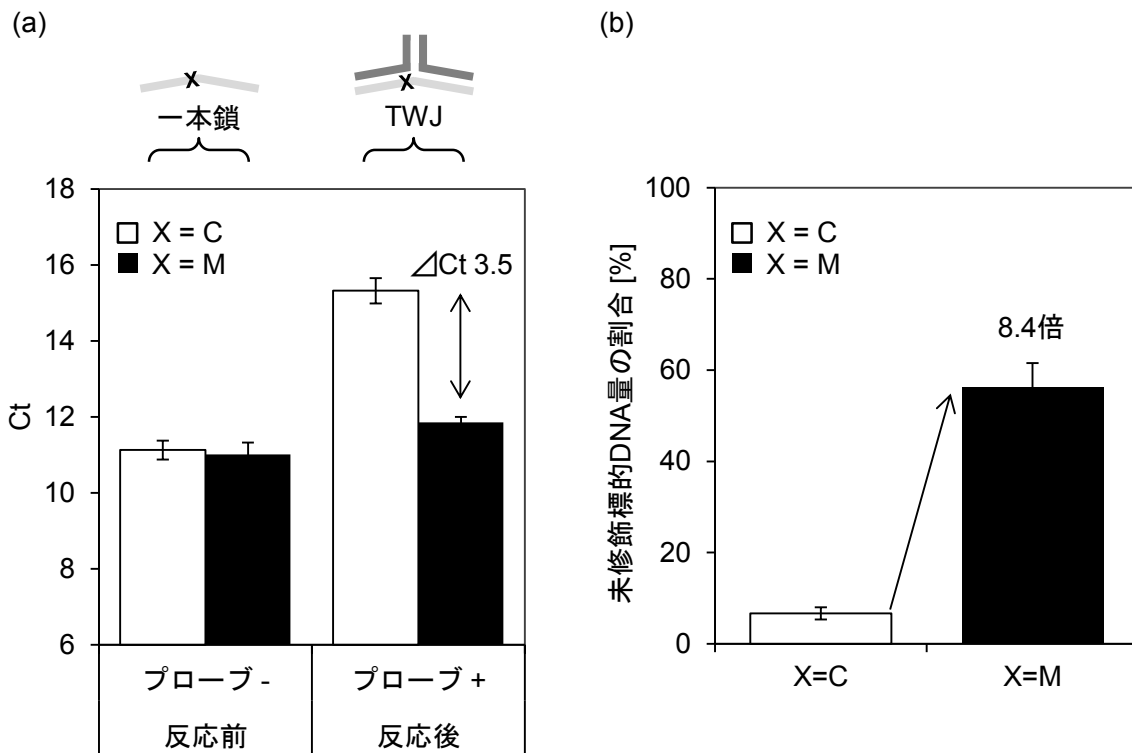


Fig. 5-5 *p16* プロモーター領域の 1905 番目のシトシンにおけるメチル化識別結果

(a) 15 fmol の一本鎖標的 DNA における反応前と反応後の Ct 値の変化 (b) Ct 値から算出した反応後の未修飾標的 DNA 量の割合を示す。

5-3-1-3 p16 合成 DNA(1905)の二本鎖標的 DNA を用いたメチル化検出結果

一本鎖の標的 DNA で検出できることが確認できたため、ゲノム DNA での検出を考え、二本鎖の標的 DNA でも検出できるか同様の実験を行った。1.5 fmol の標的 DNA と 1.65 fmol (標的 DNA の 1.1 倍量)の相補鎖、DNA プローブ 6.0 pmol を HEPES 緩衝液(50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)に溶解させ、熱変性を行った後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M の CMH (pH5.0)を加え、3 時間 25°Cで反応した。反応後の標的 DNA (50 amol)を鋳型にリアルタイム PCR を行い Ct 値の測定と未修飾標的 DNA 量の割合を算出した。その結果を Fig. 5-6 に示す。

反応前の相補鎖 DNA を含む、二本鎖標的 DNA の Ct 値は、X = C と X = M の標的 DNA でそれぞれ、13.9 サイクルと 13.8 サイクルでほぼ同じであり、反応前の DNA 量が等しいことがわかる。また、相補鎖 DNA を 6.0 pmol、過剰に加えて 1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M の CMH (pH5.0)で反応した場合でも、X = C の標的 DNA と X = M の標的 DNA の Ct 値は、ともに 13.8 サイクルであった。一方、二本鎖の標的 DNA に TWJ プローブを 6.0 pmol 加え、反応した場合、X = C の標的 DNA では Ct 値が 18.9 サイクルに著しく増大したのに対して、X = M の標的 DNA では 15.3 サイクルと僅かな増大であった。X が C と M の場合で、Ct 値に約 3.7 サイクルの差を確認することができた。

反応前の標的 DNA の Ct 値から反応後のそれぞれの標的 DNA における未修飾標的 DNA 量の割合を算出した結果、相補鎖 DNA を 6.0 pmol、過剰に加えて反応した場合、未修飾の標的 DNA は 100.3%(X = C)または 99.2%(X = M)と多く残存しており、ほとんど化学修飾されていないことが確認できる。この結果から、相補鎖 DNA を過剰に加え、二本鎖 DNA を形成させた場合、塩基対間のスタッキング相互作用や二重らせん構造により DNA 鎖中のシトシンが保護されていることが推測される。一方、二本鎖の標的 DNA に TWJ プローブ 6.0 pmol を加えて反応した場合、一本鎖の標的 DNA と同様に、X = C の標的 DNA では未修飾の標的 DNA 量が約 4.5%であったのに対して、X = M の標的 DNA では 40.3%であった。X が C と M の標的 DNA で、約 9.5 倍の差を確認することができ、分岐点上の X のメチル化をピンポイントで識別できた。これらの結果から、二本鎖の標的 DNA でも簡便に DNA のメチル化をピンポイントで識別できることが確認され、ゲノム DNA でも DNA のメチル化状態を簡便に解析できる可能性が示唆された。

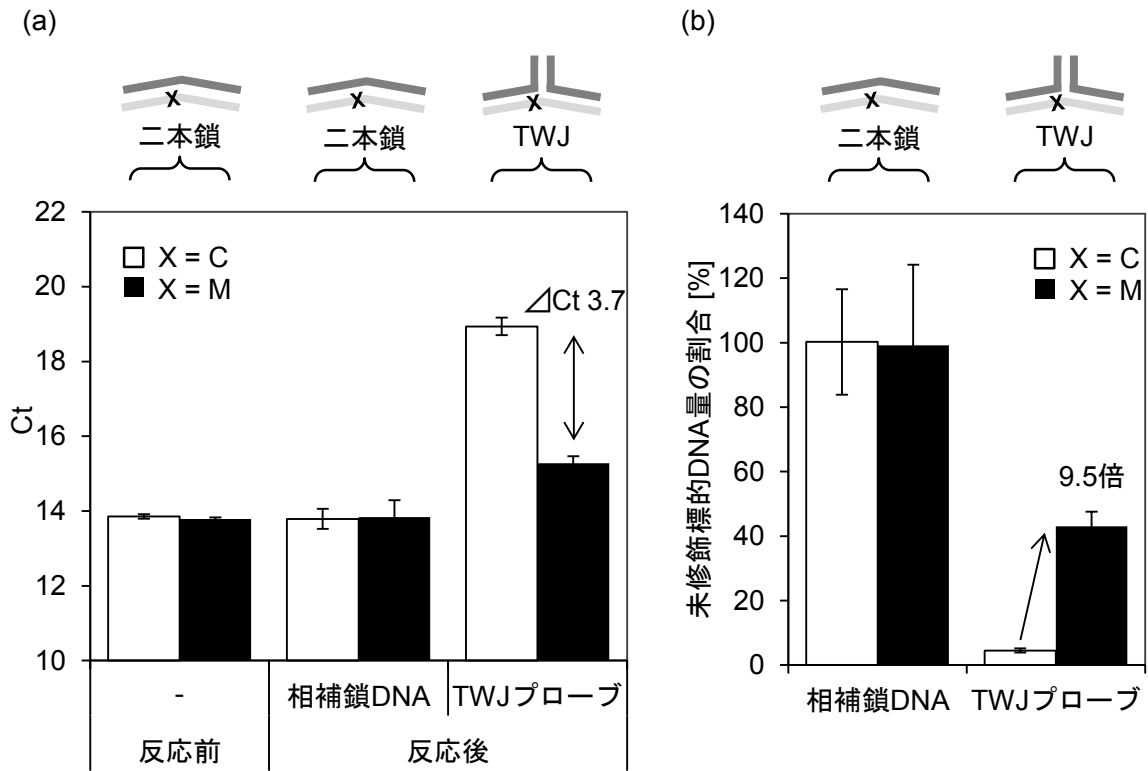


Fig. 5-6 二本鎖標的 DNA 中のシトシンにおけるメチル化識別結果

(a) 1.5 fmol の二本鎖標的 DNA における反応前と反応後の Ct 値の変化 (b) Ct 値から算出した反応後の未修飾標的 DNA 量の割合を示す。

5-3-1-4 p16 合成 DNA(1905)の二本鎖標的 DNA を用いた検出限界の確認

54 塩基の二本鎖標的 DNA における検出限界の確認を行った。150 zmol から 15 fmol の各二本鎖標的 DNA と 6.0 pmol の TWJ プローブを HEPES 緩衝液(50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)に溶解させ、TWJ 構造を形成させ後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0) と 1.0 M の CMH (pH5.0)を加え、3 時間 25°C で反応した。反応後、各標的 DNA における Ct 値の変化を測定した。測定結果を Fig. 5-7 に示す。

各標的 DNA 量(150 zmol から 15 fmol)の反応前の Ct 値は、X = C と X = M とともにほぼ同じであった。一方、反応後の標的 DNA、150 zmol の標的 DNA 以外では、X が C と M で Ct 値に有意な差を確認することができ、分岐点上のシトシンのメチル化を識別することができた。15 amol から 15 fmol までの標的 DNA では、X が C と M の場合で Ct 値に約 3.1 サイクルから 3.3 サイクルの差を確認することができた。1.5 amol の標的 DNA では Ct 値の差が 2.0 サイクルに減少したが、差を確認することができた。この結果から、この標的 DNA における 1905 部位のメチル化を識別するには、1.5 amol、約百万コピーの DNA または数百 μ l の血液サンプルがあればメチル化を検出できる可能性が示唆された。

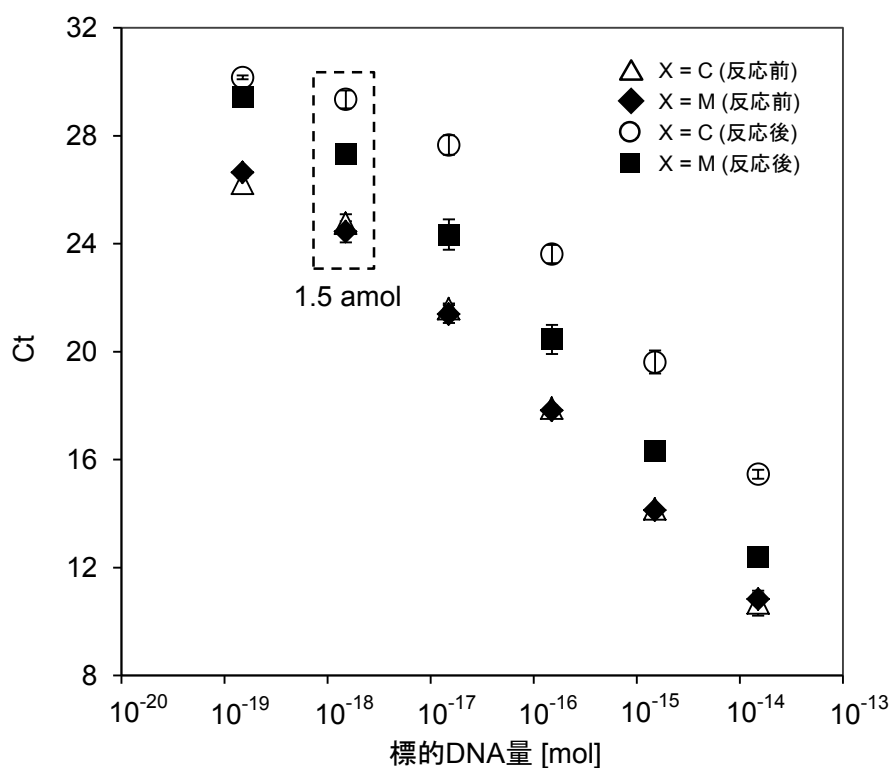


Fig. 5-7 各標的 DNA 量における反応前と反応後の Ct 値の変化

5-3-1-5 p16 合成 DNA(1905)の二本鎖標的 DNA を用いたメチル化率の検出

DNA のメチル化状態を解析する場合、がん細胞を単離して培養した単一な細胞集団など、メチル化パターンが同一な DNA サンプルの場合は、特定のシトシンがメチル化されているか、またはメチル化されていないかの 2 パターンを解析するだけで十分であり、前回までの実験方法で識別することができる。しかし、メチル化 DNA の解析では、メチル化率の定量が必要な場合が多い。血液サンプルや採取してきた不均一な細胞集団の場合、メチル化パターンが異なるゲノム DNA が混在しているため、病的な DNA メチル化異常をもつ細胞がどのくらい存在するのか定量する必要がある。また、用途によって求められる精度や感度が異なる。

まず、モデル実験として 150 amol の二本鎖標的 DNA を用いてメチル化率が検出できるか実験を行った。X = C の標的 DNA と X = M の標的 DNA を任意の値、X = M の標的を 100, 75, 25, 10, 5%の割合で混合し、合計で 150 amol になるように DNA サンプルを調製した。各メチル化率の標的 DNA (150 amol)と TWJ プローブ(6.0 pmol)を HEPES 緩衝液(50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)に溶解させ、TWJ 構造を形成させ後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M の CMH (pH5.0)を加え、3 時間 25°Cで反応した。反応後の各メチル化率による Ct 値の変化を測定した結果を Fig. 5-8 に示す。

Fig. 5-8 の結果から、メチル化率に依存して Ct 値が変化していることが確認できる。X が 100%メチル化された標的 DNA では、Ct 値が 20.7 サイクルと低いのに対して、メチル化率の低下に伴い、Ct 値が上昇した。メチル化率が 5%の標的 DNA では、Ct 値が 23.5 サイクルまで上昇し、メチル化率と修飾後の Ct 値の相関は、 $R^2 = 0.9972$ であった。

この結果から、X = C の標的 DNA 量、修飾されたシトシン誘導体を含む DNA 鎖の量に依存して Ct 値が増加していることが推測される。従って、メチル化 DNA と非メチル化 DNA のコントロールを用いて、検量線を作成することで血液サンプルや採取してきた不均一な細胞集団からでも、Ct 値から簡単にメチル化率を算出できる可能性が示唆された。

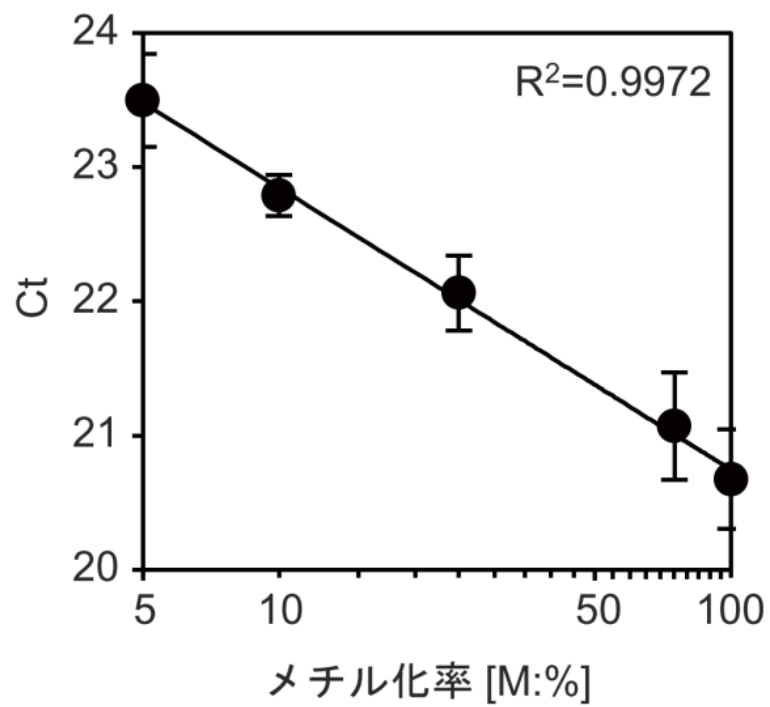


Fig. 5-8 メチル化率と Ct 値の関係

X=M の標的 DNA の割合を 100% から 75%、25%、10%、5% と減らしたメチル化率の異なる二本鎖標的 DNA の修飾後の Ct 値の変化を示す。

5-3-1-6 2カ所のメチル化パターン解析結果

5-3-1-1 と 5-3-1-2 の結果から、1863 番目と 1905 番目のシトシンのメチル化をピンポイントで検出できることが示された。遺伝子診断や遺伝子発現のプロファイリングなどへの応用を考えた場合、1カ所の CpG 配列におけるメチル化状態だけでは、周囲のメチル化状態を判断することが難しく遺伝子の発現状態を予測することが困難である。複数個所の CpG 配列のメチル化を同時に検出することができれば、遺伝子の発現状態をより正確に予測することができ、エピゲノムタイピングや遺伝子発現のプロファイリングへの応用が期待できる。1863 番目(X)と 1905 番目(Y)の 2カ所の CpG 配列を含む 96 塩基の合成 DNA を用いて、2カ所の CpG 配列のメチル化パターンを同時に検出できるか実験を行った。

96 塩基の標的 DNA (1.5 pmol)と 4 種類の DNA プローブ(6.0 pmol)を HEPES 緩衝液(50 mM HEPES/NaOH, 1.0 M NaCl, pH6.0)に溶解させ、TWJ 構造を形成させ後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M の CMH (pH5.0)を加え、3 時間 25°Cで反応した。反応後、各標的 DNA(50 fmol)を鋳型に X と Y のメチル化を検出するため、2 組のプライマーを利用してリアルタイム PCR で Ct 値の測定を行った。その結果を Fig. 5-9b に示す。標的 DNA は、X と Y のメチル化状態が異なる標的 DNA1 (X = C, Y = C)と標的 DNA2 (X = M, Y = C)、標的 DNA3 (X = C, Y = M)の三種類の標的 DNA を使用して実験を行った。

各標的 DNA における反応前と反応後の Ct 値を比較した結果、標的 DNA1 では反応前の Ct 値が 5.9 サイクル(X)と 6.5 サイクル(Y)であったのに対して、反応後は 12.7 サイクル(X)と 10.4 サイクル(Y)に増大していた。それぞれの反応前と反応後の Ct 値の差は 6.8 サイクル(X)と 3.9 サイクル(Y)であった。一方、標的 DNA2 では反応前が 5.9 サイクル(X)と 6.4 サイクル(Y)であったのに対して、反応後は 8.7 サイクル(X)と 10.4 サイクル(Y)であった。それぞれの反応前と反応後の Ct 値の差は 2.8 サイクル(X)と 4.1 サイクル(Y)であった。標的 DNA3 では反応前が 5.6 サイクル(X)と 5.4 サイクル(Y)であったのに対して、反応後は 12.1 サイクル(X)と 5.9 サイクル(Y)であった。それぞれの反応前と反応後の Ct 値の差は 6.5 サイクル(X)と 0.5 サイクル(Y)であった。

1863(X)部位が C の場合、反応前と反応後で Ct 値が約 6 サイクル増大しているのに対して、M の場合では 2.8 サイクルしか増大していなかった。また、1905(Y)部位が C の場合、反応前と反応後で約 4 サイクル増大しているのに対して、M の場合では 0.5 サイクルしか増大していなかった。これらの結果から、反応前と反応後の Ct 値の変化を調べることで、複数個所でもシトシンのメチル化を識別できることが示された。

それぞれの反応前の Ct 値から反応後の未修飾標的 DNA 量の割合を算出した結果を Fig. 5-8c に示す。1863 部位では、標的 DNA1 と標的 DNA3 の未修飾標的 DNA 量の割合が 3.5% と 3.9%であったのに対して、標的 DNA2 の未修飾標的 DNA 量の割合は 25.4%であった。1863 部位が C と M の場合で、未修飾標的 DNA 量の割合に 6.5 倍以上の差を確認することができた。また、1905 部位では標的 DNA1 と標的 DNA2 の未修飾標的 DNA 量の割合が

14.5%と13.3%であったのに対して、標的 DNA3 の未修飾標的 DNA 量の割合は76.3%であった。1905 部位が C と M の場合で未修飾標的 DNA 量に約 5.3 倍の差を確認することができた。この結果は 5-3-1-1 と 5-3-1-2 の結果とも一致している。数値の差異などは、短い合成 DNA と長い合成 DNA における鎖長の違いが原因であると考えられる。例えば、1863 の短い標的 DNA の場合、Fig. 5-4 のような高次構造を形成している可能性が予測されるが、長い標的 DNA では周辺配列により異なる高次構造を形成している可能性がある。また、1863 部位と 1905 部位で未修飾標的 DNA 量の割合に大きな違いが生じたのは、1863 の CpG 配列は左隣にシトシンが隣接しているのに対して、1905 の CpG 配列の左隣はグアニンであるため、PCR 増幅の阻害に差が生じたと考えられる。この結果から、同一遺伝子上の CpG 配列のメチル化を 2 ヶ所同時に解析できることが示され、複数個所の遺伝子のメチル化状態を同時に解析できる可能性が示唆された。したがって、エピゲノムタイピングや遺伝子発現のプロファイリングへの応用が期待できる。

次に、標的 DNA 量を減らして、150 amol、1.5 fmol、15 fmol、1.5 pmol の各標的 DNA 量における反応前と反応後の Ct 値の変化を調べた。その結果を Fig. 5-10 に示す。5-3-1-1 で 49 塩基の短い合成 DNA を用いて 1863 部位のメチル化を解析した結果、分岐点上のシトシンのメチル化を識別できたのは、150 fmol の標的 DNA までであった。一方、96 塩基の長い合成 DNA の場合では、1.5 fmol でもメチル化を識別することができた。短い標的 DNA と長い標的 DNA で検出限界がことなることから、鎖長の違いにより標的 DNA の高次構造が変化していることが予測される。また、同一の DNA 鎖上に存在する 1863(X)部位と 1905(Y)部位のメチル化を同時に検出したが、1863 部位では 150 amol の標的 DNA の時、分岐点上のシトシンのメチル化を識別することができなかったのに対して、1905 部位では 150 amol の標的 DNA でも明確にシトシンのメチル化を識別することができた。これらの結果から検出部位の周辺配列により、検出感度が大きく左右されることが示唆された。

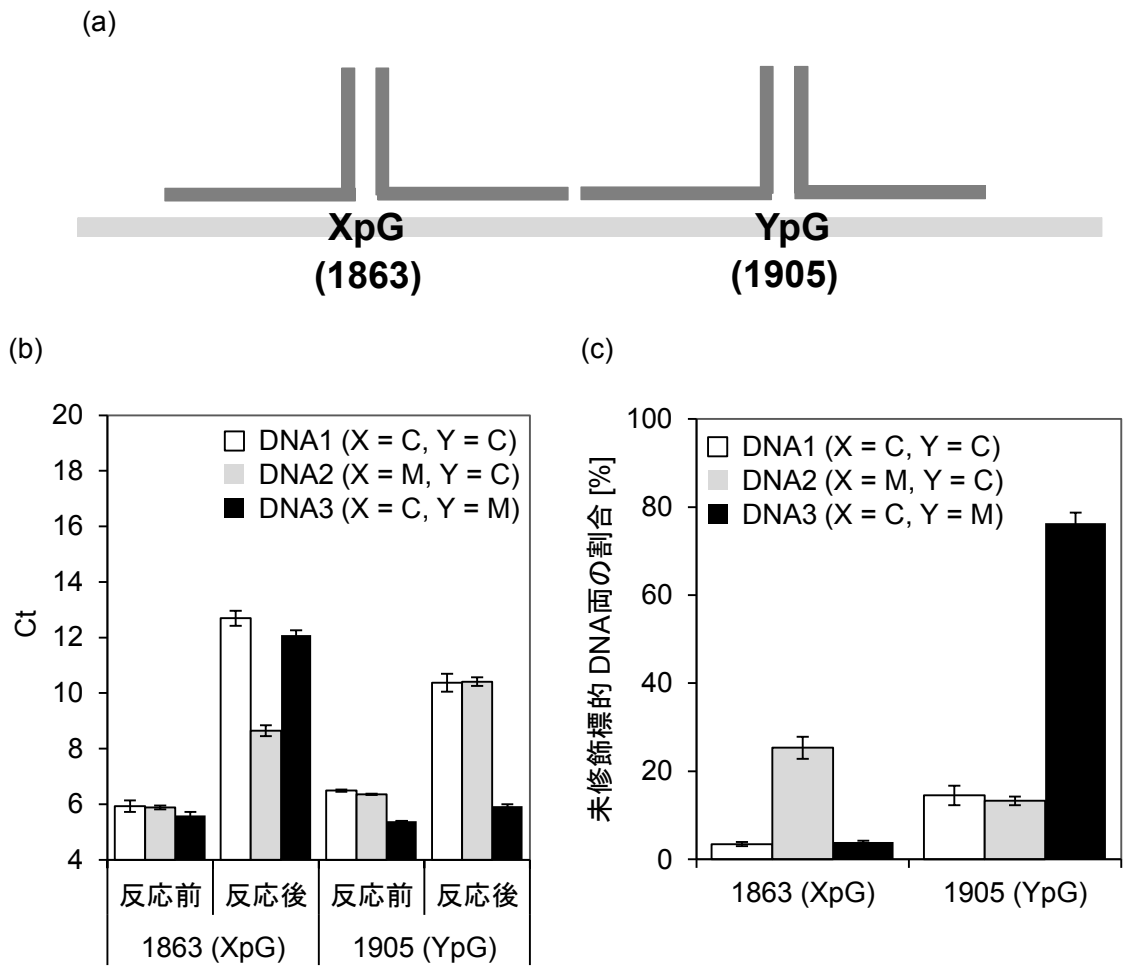
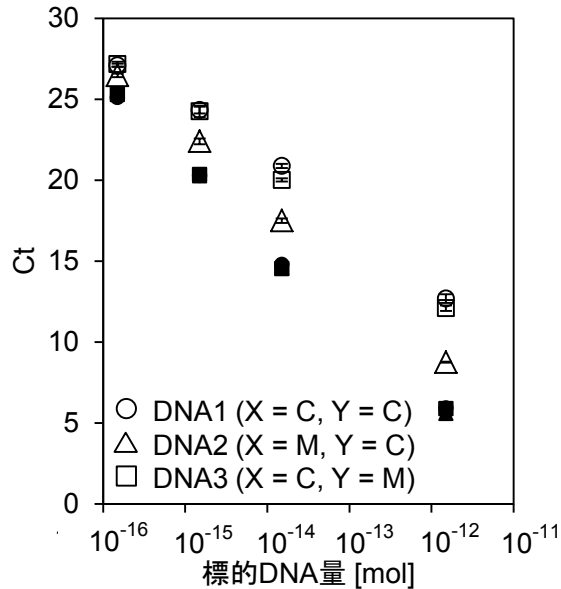


Fig. 5-9 2 カ所のメチル化同時検出結果

(a) TWJ 構造を形成させた標的 DNA の模式図 (b) 反応前と反応後の各標的 DNA における Ct 値 (c) 反応後の標的 DNA における未修飾標的 DNA 量の割合

(a). 1863 (XpG)



(b). 1905 (YpG)

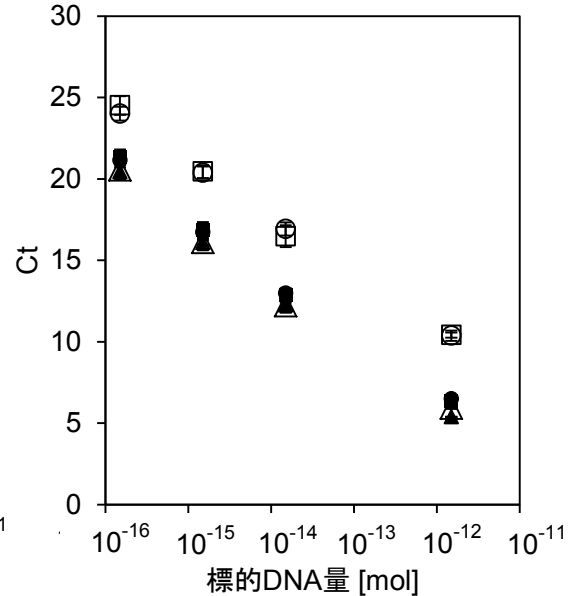


Fig. 5-10 96 塩基の合成 DNA における検出限界の比較

(a)は、1863 (XpG)部位の各標的 DNA 量における反応前と反応後の Ct 値の変化を示す。(b)は、1905 (YpG) 部位の各標的 DNA 量における反応前と反応後の Ct 値の変化を示す。各グラフの“○”は、反応後の標的 DNA1 (X = C, Y = C)、“△”は反応後の標的 DNA2 (X = M, Y = C)、“□”は反応後の DNA3 (X = C, Y = M)における Ct 値を示す。また、塗り潰してある●, ▲, ■は反応前の標的 DNA を示す。

5-3-1-7 p16 エクソン 1 の部分配列を用いたメチル化検出結果

標的 DNA (500 amol)と DNA プローブ(10 pmol)を HEPES 緩衝液(50 mM HEPES/NaOH, 500 mM NaCl, pH6.0)に溶解させ、TWJ 構造を形成させ後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム (pH5.0)と 1.0 M の CMH (pH5.0)を加え、3 時間 25°Cで反応した。反応前と反応後のそれぞれの標的 DNA(250 amol)を鋳型にリアルタイム PCR で Ct 値の測定を行った。その結果を Fig. 5-11a に示す。また、反応前の Ct 値から反応後の未修飾標的 DNA 量の割合を算出した結果を Fig. 5-11b に示す。

Fig. 5-11a の結果より、反応前の Ct 値は、X = C の標的 DNA では 16.4 サイクル、X = M の標的 DNA では 16.1 サイクルとほぼ等しく初期の DNA 量と同じであることが確認できる。一方、反応後の標的 DNA における Ct 値は、X = C の標的では 21.7 サイクル、X = M の標的 DNA では 18.1 サイクルに増加しており、X = C と X = M の標的 DNA で Ct 値に 3.6 サイクルの差を確認することができた。また、Fig. 5-11b より、反応後の未修飾標的 DNA 量の

割合を比較した結果、X = C の標的 DNA では未修飾標的 DNA 量の割合が 6.1%であったのに対して X = M の標的 DNA では 35.5%と約 5.8 倍の差を確認することができた。

これまでの実験では、約 50 塩基ほどの短い標的 DNA 配列と 40 塩基ほどの DNA プローブを用いて実験を行ってきたが、92 塩基の長い標的配列でも TWJ プローブにより 1 ヲ所の CpG 配列のメチル化をピンポイントで識別できることが示された。DNA プローブにより、広い領域を保護し、特定の塩基のみを配列選択的に化学修飾することができたため、SYBR Green 以外に蛍光標的された TaqMan プローブによる検出なども期待でき、複数の遺伝子を同時に解析できる可能性が示唆される。

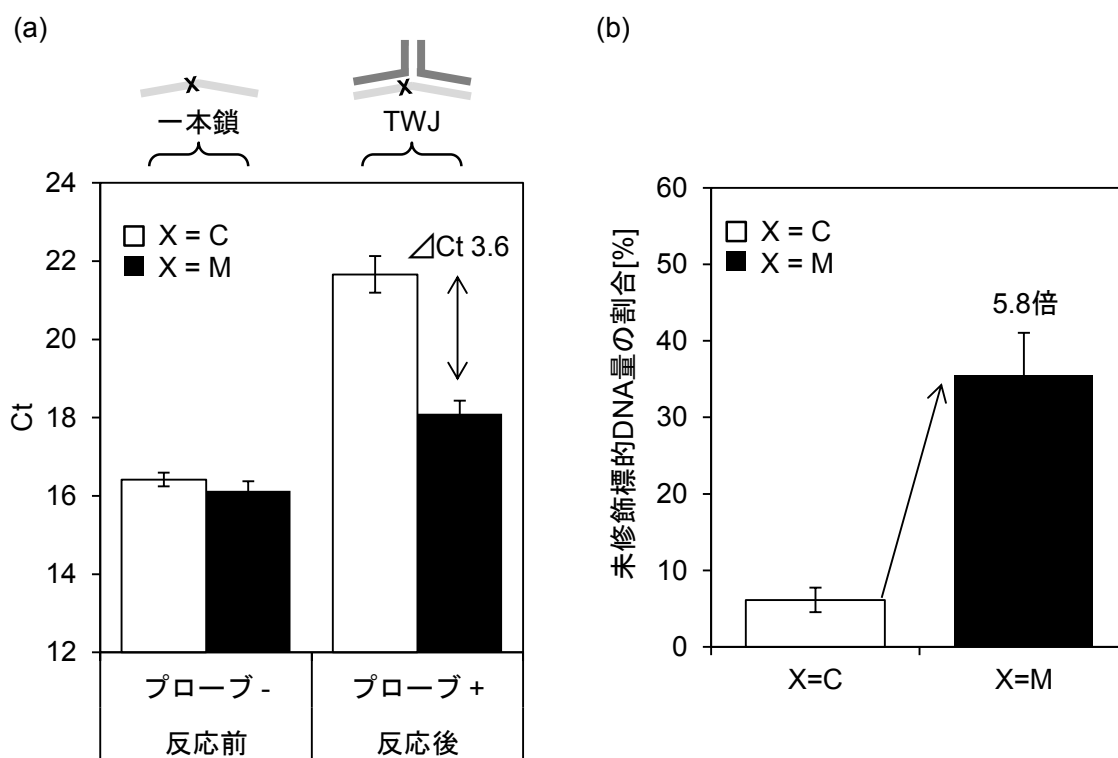


Fig. 5-11 p16 エキソン 1 のメチル化解析用プローブと解析結果

(a) 500 amol の標的 DNA における反応前と反応後の Ct 値の変化 (b) Ct 値から算出した反応後の未修飾標的 DNA 量の割合を示す。

5-3-2 RB1 エキソン 8 の部分配列を用いたメチル化検出結果

これまでの実験では、乳がんや胃がんなど多くの疾患と関連がある *p16* 遺伝子のメチル化状態を解析できるか合成 DNA を用いて実験を行ってきた。その結果、*p16* 遺伝子のプロモーター部位やエキソン部位のメチル化状態を解析できることが示された。他の遺伝子でも同様にメチル化状態を解析できるか、*RB1* 遺伝子のエキソン 8 の部分配列から成る 80 塩基の合成 DNA を用いてメチル化解析を行った。

標的 DNA (500 amol) と DNA プローブ (10 pmol) を HEPES 緩衝液 (50 mM HEPES/NaOH, 50 mM NaCl, pH7.0) に加え、熱変性を行った。その後、TWJ 構造を形成させた後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム (pH5.0) と 1.0 M の CMH (pH5.0) で 3 時間、25°C で反応を行った。反応前と反応後のそれぞれの標的 DNA (250 amol) を鋳型にリアルタイム PCR で Ct 値の測定を行った。その結果を Fig. 5-12b に示す。また、反応前の Ct 値から反応後の未修飾標的 DNA 量の割合を算出した結果を Fig. 5-12c に示す。

Fig. 5-12b の結果より、反応前の Ct 値は、X = C の標的 DNA では 11.9 サイクル、X = M の標的 DNA では 11.6 サイクルとほぼ等しく DNA 量が同じであることが確認できる。DNA プローブ非存在下で反応した標的 DNA では、Ct 値がそれぞれ 24.8 サイクル (X = C) と 24.7 サイクル (X = M) で差は見られなかった。一方、X が分岐点に位置するように設計した DNA プローブ 1, 2 存在下では、X = C の標的 DNA では 18.0 サイクル、X = M の標的 DNA では 14.4 サイクルに変化し、X = C と M の標的 DNA で Ct 値に 3.6 サイクルの差を確認することができた。次に、分岐点に X 以外、ApC が位置するように設計した DNA プローブ 3, 4 を結合させ、TWJ 構造を形成させた (Fig. 5-12a)。プローブ 3, 4 存在下では、Ct 値がそれぞれ 17.1 サイクル (X = C) と 16.5 サイクル (X = M) で Ct 値の差は 0.6 サイクルと僅かであった。

また、Fig. 5-12c より、反応後の各標的 DNA における未修飾標的 DNA 量の割合を比較した。プローブ非存在下では、未修飾標的 DNA 量の割合は 0.03% (X = C) と 0.02% (X = M) で、未修飾の標的 DNA がほぼ残存していなかった。一方、分岐点に X が位置するように設計した DNA プローブ 1, 2 では、未修飾標的 DNA 量の割合が 2.4% (X = C) と 17.4% (X = M) であり、約 7.4 倍の差を確認することができた。DNA プローブ 3, 4 では、4.4% (X = C) と 4.5% (X = M) であり、ほとんど差を確認することができなかった。

これらの結果から、DNA プローブ 1, 2 は、X のメチル化をピンポイントで識別できていることが確認できる。また、DNA プローブ 3, 4 のようにメチル化に関与していないシトシンを反応させ、測定することでコントロールとして使用できる可能性が示唆された。多くのメチル化 DNA 検出法は、メチル化酵素を用いて全ての CpG 配列を高メチルさせたコントロールや PCR 増幅して 5-メチルシトシンをシトシンに変換させたコントロールを作製する必要があるが、本検出法では DNA プローブ 3, 4 のようにコントロールを作製する必要がなく、簡便にメチル化を識別できる可能性が期待できる。

続いて、検出感度の確認を行った。50 zmol から 50 amol の標的 DNA と TWJ プローブ (10

pmol)を HEPES 緩衝液に加え、熱変性を行った。その後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム (pH5.0)と 1.0 M の CMH (pH5.0)を加え、25°Cで 3 時間反応した。反応後、エタノール沈殿を行い粗精製した DNA を鋳型にリアルタイム PCR で Ct 値の測定を行った。測定結果を Fig. 5-13 に示す。Fig. 5-13 の結果から、50 zmol から 50 amol の全ての標的 DNA で、X が C の場合と M の場合で 3.2 サイクルから 4.5 サイクルの差を確認することができた。この結果から、*RB1* 遺伝子のエキソン 8 のメチル化解析用 DNA プローブとプライマー配列を用いた時が最も検出感度が高いことが示された。50 zmol の標的 DNA、約数万コピーのゲノムまたは数 μ l の血液サンプルがあればメチル化を解析できる可能性が示唆された。

また、50 amol の標的 DNA を用いてメチル化率と修飾後の Ct 値の変化を調べた結果を Fig. 5-14 に示す。メチル化率、X = M の標的 DNA 量の割合が 100, 50, 10, 1%の標的 DNA を調製して反応後の Ct 値の変化を調べた結果、メチル化率の低下に伴い Ct 値が上昇しており、高い相関($R^2 = 0.9956$)が確認された。

これらの結果から、*RB1* エキソン 8 の解析用プローブおよびプライマー配列がもっとも高感度かつ高精度にメチル化を識別できることが示された。

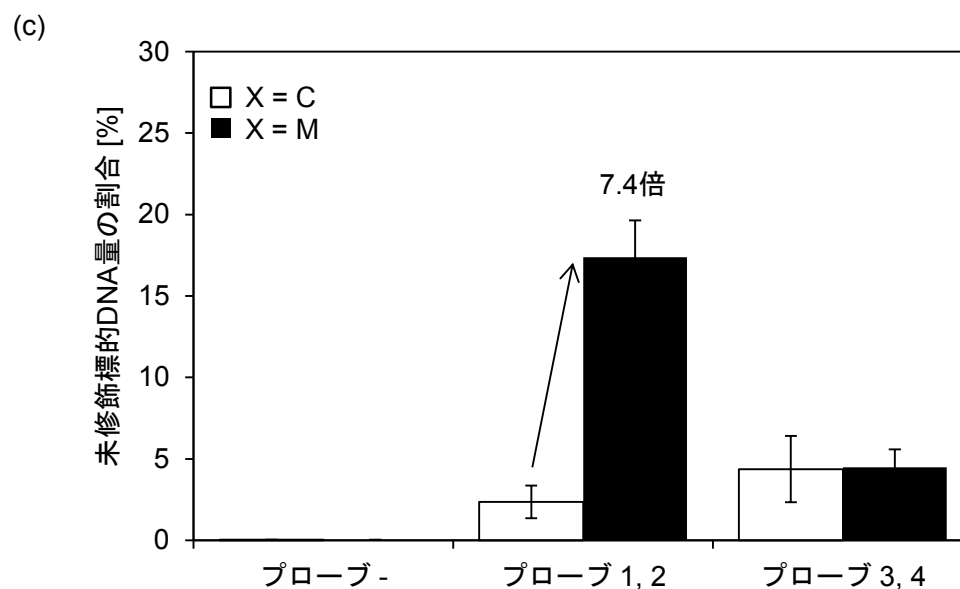
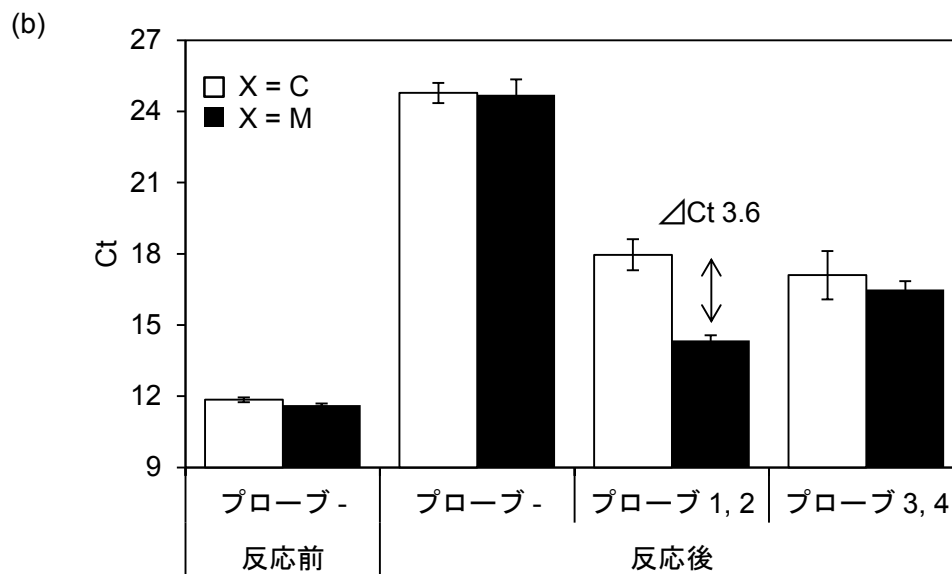


Fig. 5-12 *RB1* エキソン 8 のメチル化解析結果

(a) DNA プローブ 3 と 4 を用いた TWJ 構造の模式図を示す。 (b) 0.5 fmol の標的 DNA における反応前と反応後の Ct 値の変化 (c) Ct 値から算出した反応後の未修飾標的 DNA 量の割合を示す。

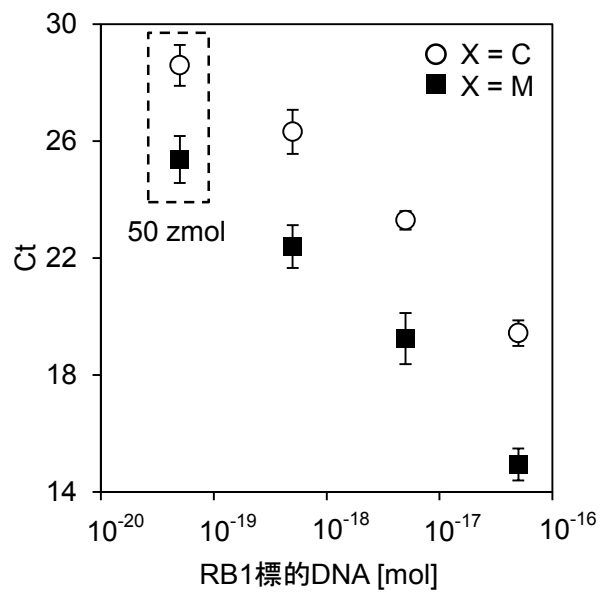


Fig. 5-13 各標的 DNA 量における反応後の Ct 値の変化

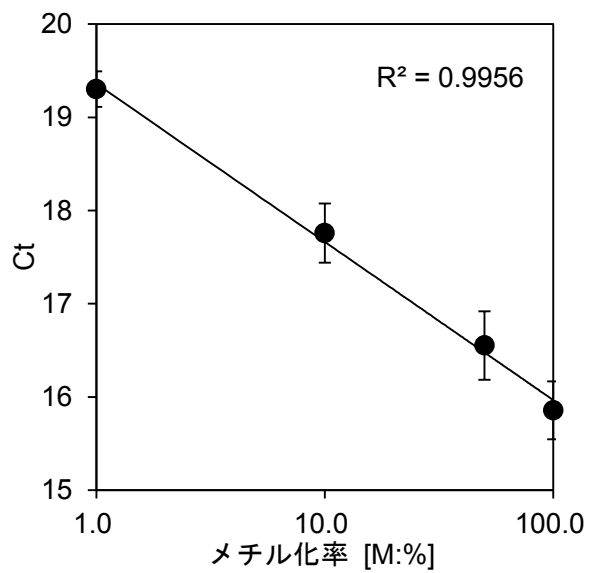


Fig. 5-14 メチル化率と Ct 値の関係

5-4 結言

がん抑制遺伝子の一つである *p16* 遺伝子のプロモーター領域またはエキソン 1 から成る合成 DNA と *RB1* 遺伝子のエキソン 8 から成る合成 DNA を標的として DNA のメチル化をピンポイントで検出できるか実験を行った。

RB1 遺伝子と *p16* 遺伝子の部分配列をいくつか試した結果、2 つの遺伝子、異なる 4 つの CpG 部位のメチル化をピンポイントで識別できることが示された。標的配列ごとに検出限界や反応後の X = C の標的 DNA と X = M の標的 DNA における Ct 値の差に違いが確認されたが、全ての配列で DNA のメチル化を検出することができたことから本検出法、TWJ プローブを利用した一塩基選択的な化学修飾法の高い汎用性が示された。

バイサルファイト法に基づいた従来法の多くは、CpG 配列以外に DNA 鎖中の全てのシトシンを非選択的に反応させるため、検出できる配列に大きな制限がかかる。例えば、MSP や MethyLight 法の場合、プライマーまたはプローブ内に CpG 配列が密集した特殊な領域でしか検出することができない。バイサルファイトシーケンシング法の場合もプライマー配列内に CpG 配列を含まない領域でプライマーを設計する必要があり、検出できる配列に大きな制限がかかる。一方、本検出法は TWJ プローブを利用して特定の CpG 配列だけを選択的に反応させることができるため、通常の PCR に限りなく近いプライマー設計が可能であり、従来法よりも検出配列の制限が大きく緩和されることが推測される。また、既存のメチル化感受性制限酵素を用いた方法は、認識配列に大きな制限があり、CpG 配列内のメチル基しか識別できないのに対して、本検出法は CpG 配列以外のシトシンも選択的に修飾、識別できるため、植物 DNA におけるメチル化解析などへの利用も期待できる。

二本鎖の標的 DNA でもメチル化を簡便に識別できたことからゲノム DNA での検出が期待できる。また、二ヶ所のメチル化を同時に解析することにも成功したため、複数の遺伝子におけるメチル化状態の解析、遺伝子発現のプロファイリングへの応用が期待できる。修飾後の標的 DNA における Ct 値の変化は、分岐点上のシトシンのメチル化率と高い相関を示し、Ct 値からメチル化率を簡単に算出できることが示された。メチル化率を定量することができれば、メチル化状態の異なる細胞や血中の DNA サンプルからでも特定の遺伝子のメチル化状態を解析することができるため、遺伝子診断への応用が期待できる。

第6章 ゲノム DNA を用いたメチル化解析

6-1 緒言

第5章では、短い合成 DNA を用いてメチル化の検出を行った。その結果、*p16* 遺伝子や *RB1* 遺伝子など複数の標的 DNA 配列、二本鎖標的 DNA など全ての標的 DNA で特定のシトシンのメチル化状態をピンポイントで検出できることが実証された。第6章ではゲノム DNA でも同様にメチル化状態をピンポイントで解析できるか実験を行う。

ゲノム DNA は、約 30 億塩基対の長い二本鎖 DNA であり、およそ 2 万個の遺伝子を内包している。遺伝子の種類や部位によっては類似配列や反復配列、または分子内で高次構造を形成している領域があり、短い合成 DNA とは状況が異なる。ゲノム DNA でのメチル化検出に成功すれば、遺伝子診断技術や遺伝子発現のプロファイリングへの応用が大きく期待できる。また、ゲノム DNA 中の特定の遺伝子を切断または修飾、変異させることができれば遺伝子工学などへの利用も期待できる。

第5章の結果とプライマーおよび DNA プローブの特異性、検出感度を考慮して、第6章では *RB1* エキソン 8 部位のメチル化解析用 DNA プローブとプライマーを使用する。また、メチル化を検出するゲノム DNA は、結腸直腸がん細胞株由来の HCT116 細胞から抽出したゲノム DNA を用いて実験を行う。同時に、既知のメチル化 DNA 検出法であるバイサルファイトシーケンシング法を行い、実験結果の比較を行う。

6-2 実験方法

ヒトゲノム、HCT116 細胞株(結腸直腸がん細胞株)由来のゲノム DNA を用いて実験を行った。ポジティブコントロールとして Episcope[®] Methylated HCT116 gDNA (TaKaRa)、ネガティブコントロールとして Episcope[®] Unmethylated HCT116 gDNA (TaKaRa)を使用した。それぞれ、ポジティブコントロールには CpG メチラーゼ(M.Sss I)により高度にメチル化されたゲノム DNA、ネガティブコントロールには、Dnmt1 と Dnmt3b を Double knockout した HCT116 細胞株由来の低メチル化ゲノム DNA を使用した。従来法との比較実験として、QIAGEN 社の EpiTect Bisulfite キットを用いてバイサルファイトシーケンシングを行った。

6-2-1 メチル化 DNA のピンポイント検出

50 ng の非メチル化ゲノム DNA (Episcope[®] Methylated HCT116 gDNA) またはメチル化ゲノム DNA (Episcope[®] Unmethylated HCT116 gDNA) と 100 pmol の TWJ プローブを HEPES 緩衝液 (50 mM HEPES/NaOH, 50 mM NaCl, pH7.0) に加え、熱変性を行った。熱変性は 95°C (15 分間) で加熱した後、30 分かけて 30°C まで温度をゆっくりと下げ、25°C で 5 分間静置した。その後、4°C で 5 分間冷却した。熱変性後の DNA サンプルに、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム (pH5.0) と 1.0 M の CMH (pH5.0) を加え、25°C で 3 時間反応を行った。反応後の DNA サンプルは、エタノール沈殿で粗精製した後、25 ng の DNA を鋳型としてリアルタイム PCR 測定を行った。リアルタイム PCR の反応溶液の組成および測定条件は、5-2-5 と同様の操作を行った。

6-2-2 バイサルファイトシーケンシング

6-2-2-1 バイサルファイト変換

EpiTect Bisulfite (QIAGEN) を使用してバイサルファイト変換を行った。10 ng/ μ l のゲノム DNA 5 μ l と RNase フリー水 15 μ l、Bisulfite Mix を 85 μ l、DNA Protect Buffer 35 μ l を加え、全量を 140 μ l になるように調製した。調製したサンプル溶液をサーマルサイクラーで反応した。サーマルサイクラーのプログラムは以下に記す【95°C : 5 分→60°C : 25 分→95°C : 5 分→60°C : 85 分→95°C : 5 分→60°C : 175 分→20°C で保持】。反応後、サンプルを 1.5 ml のマイクロチューブに全量を移し、10 μ g/ml のキャリア RNA を含む Buffer BL を 560 μ l 加えた。その後、EpiTect スピнкаラムに全量をアプライした後、EpiTect カラムを最高速度で 1 分間遠心した。フロースルーした溶液を除去し、新たに Buffer BW を 500 μ l 加え、再び EpiTect カラムを最高速度で 1 分間遠心した後、フロースルーした溶液を棄てた。その後、Buffer BD を 500 μ l 加え室温で 15 分間インキュベーションすることで脱スルホ化を行った。インキュベーション後、再び最高速度で 1 分間遠心し、フロースルーした溶液を除去した。先ほどと同様に、Buffer BW を 500 μ l 加え、最高速度で 1 分間遠心した後、フロースルーした溶液を除去した。この操作をもう一度繰り返した。スピнкаラムに新しい 2 ml のコレクションチューブをセットし、最高速度で 1 分間遠心し、カラムに残存している液体を除去した。蓋を開けたスピнкаラムを新しい 1.5 ml チューブに移し、56°C で 5 分間インキュベーションした。インキュベーション後、新しい 1.5 ml チューブにスピнкаラムを移し、20 μ l の Buffer EB を加え、12,000 rpm で 1 分間遠心した。溶出した DNA サンプルは冷凍庫 (-20°C) で保存した。

6-2-2-2 PCR 増幅

6-2-2-1 で溶出した DNA サンプルを用いて PCR 増幅を行った。PCR 増幅には Ex *Taq* (*Taq* DNA Polymerase, TaKaRa) 及び付属する 10×Ex *Taq* Buffer、2.5 mM dNTP mixture を用いた。バイサルファイト変換した DNA サンプル 2.0 μ l と 10×Ex *Taq* Buffer 5.0 μ l、2.5 mM dNTP mixture 4.0 μ l、2.5 μ M のプライマーをそれぞれ 6.0 μ l 混合した後、滅菌水を 33.0 μ l 加え、最終体積が 50 μ l になるように調製した。プライマーはバイサルファイト変換後の配列に特異的に結合する 5'-TTATATGATGGATGTATAATTGTTT-3' (Seq-RB1-Fd, 25mer) と 5'-AACTTACATCTAAATCTACTTTAAC-3' (Seq-RB1-Rv, 25mer) を用いた。調製したサンプル溶液に Ex *Taq* 2.0 U を加え、以下のプログラムで PCR 増幅を行った。【95°C : 5 分間→(95°C : 60 秒→56°C : 60 秒→72°C : 60 秒、31 サイクル)→4°C】。PCR 増幅産物をスピнкаラム(Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega)を用いて粗精製を行った。

PCR 溶液 50 μ l を 1.5 ml チューブに入れ、Membrane Binding Solution 50 μ l 加え、SV Column に全量を移し替え Collection Tube に差し込み SV Minicolumn セットの準備をした。SV Minicolumn セットを遠心機で 1 分間、15,000 rpm で遠心した。遠心後、SV Column を SV Minicolumn セットから取り外し、Collection Tube 中のフロースルーした液体を捨てた。SV Column を Collection Tube に戻した後、700 μ l の Membrane Wash Solution を加え、カラムの洗浄を行った。SV Minicolumn セットを遠心機で 1 分間、15,000 rpm で遠心した後、同じように Collection Tube の液体を捨て Collection Tube に SV Column を戻した。再び、500 μ l の Membrane Wash Solution を加え、SV Minicolumn セットを遠心機で 5 分間、15,000 rpm で遠心した。SV Column を新しい 1.5 ml のチューブに差し込んだ後、50 μ l の Nuclease-Free Water を加え、室温で 1 分間インキュベーションした。その後、遠心機で 1 分間、15,000 rpm で遠心し、溶出した DNA 溶液を回収した。DNA 溶液は冷凍庫(-20°C)で保存した。また、スピнкаラムで粗精製した DNA 溶液をアガロース電気泳動により、プライマーが除去されているか確認を行った。

6-2-2-3 T/A クローニング

粗精製した PCR 産物と pGEM T-Vector (Promega)を用いてクローニングした。DNA サンプル 1 μ l、2×Rapid Ligation Buffer 5 μ l、T4 DNA Ligase 1 μ l、pGEM-T Easy Vector 1 μ l、滅菌水 2 μ l を加え、4°Cで一晩、ライゲーション反応を行った。ライゲーション後の反応溶液 4 μ l に Competent cell (DH5 α) 10 μ l を加え、氷上で 30 分間静置した。その後、42°Cで 50 秒間ヒートショックを与えることで Vector を Competent cell へ導入した。ヒートショック後、SOC 培地 100 μ l を加え 60 分間、37°Cでインキュベーションした。また、LB 培地【2%(w/v) LB BROTH BASA, 1.5% Agar】のプレートを作製し、100 mM IPTG 溶液

100 μ l および 50 mg/ml X-Gal 溶液 20 μ l をプレートに塗布した。インキュベーション後のサンプル溶液 50 μ l を LB 培地のプレートに塗布し、37°Cで一晩静置した。LB 培地で培養されたコロニーの中からインサート DNA の挿入された Vector により形質転換された白色の大腸菌の単一コロニーをピックアップし、3 ml の LB 液体培地【2%(w/v) LB BROTH BASE】中で一晩、37°Cでインキュベーションした。

6-2-2-4 プラスミド DNA の精製

液体培養した大腸菌から Wizard SV Minipreps DNA Purification System (Promega)を用いてプラスミド DNA を精製した。液体培養した 3 ml の大腸菌溶液を 10,000 G で 5 分間遠心して上澄みを除去した後、Cell Resuspension Solution 250 μ l を加え激しく攪拌した。その後、Cell Lysis Solution 250 μ l を加えやさしく転倒混和させ、溶液が半透明になるまで静置した後、Alkaline Protease Solution 10 μ l を加え、5 分間静置した。静置後、Neutralization Solution 350 μ l を加え、10 分間 15,000 rpm で遠心を行い、上澄みを Collection Tube にセットした Spin column に加えた。Collection Tube を 1 分間、15,000 rpm で遠心した後、フロースルーした溶液を除去し、Column Wash Solution 750 μ l を加え、1 分間 15,000 rpm で遠心することで洗浄を行った。遠心後、同様にフロースルーした溶液を除去した後、Column Wash Solution 250 μ l を加え、2 分間 15,000 rpm で遠心、洗浄操作を行った。洗浄後、Nuclease-Free Water 100 μ l を加え、1 分間 15,000 rpm で遠心することでプラスミド DNA を溶出させた。溶出したプラスミド DNA は、吸光光度計を用いて 260 nm の波長を測定することで定量した。

6-2-2-5 サイクルシーケンシング

サイクルシーケンシングには Applied Biosystemes の試薬を用いた。上記で精製した DNA 溶液 6 μ l と 5×Sequence Buffer (Applied Biosystemes) 2 μ l、Big Dye Premix (Applied Biosystemes) 1 μ l、3.2 μ M のプライマー(5'-TTATATGATGGATGTATAATTGTTT-3') 1 μ l を加え、最終体積が 10 μ l になるように調製した。調製したサンプル溶液をサーマルサイクラーでセットし、以下のプログラムでサイクルシーケンシングを行った【95°C : 5 分→(95°C : 10 秒→50°C : 5 秒→60°C : 4 分、25 サイクル)→4°Cで保持】。

サイクルシーケンシング後、エタノール沈殿をすることで DNA 溶液を粗精製した。精製した DNA は、Hi-Di Formamide (Applied Biosystemes) 20 μ l に溶解させ、95°Cで 2 分間加熱してから氷上で急冷した。DNA サンプルをシーケンシング用のマイクロプレート(Applied Biosystemes)にアプライした後、Sequencer 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystemes) を用いて配列解析を行った。

6-3-1 HCT116 ゲノム DNA のメチル化解析結果

50 ng の非メチル化ゲノム DNA (TaKaRa, Episcope[®] Unmethylated HCT116 gDNA) とメチル化ゲノム DNA (TaKaRa, Episcope[®] Methylated HCT116 gDNA) に 100 pmol の DNA プローブを加え、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0) と 1.0 M の CMH (pH5.0) で 3 時間、25°C で反応した。反応前と反応後のそれぞれの標的 DNA における Ct 値を測定した結果を Fig. 6-2 に示す。

Fig. 6-2 の結果より、反応前の非メチル化ゲノム DNA とメチル化ゲノム DNA の Ct 値は 24.6 サイクルと 24.8 サイクルでほぼ同じであり、初期の DNA 量が等しいことが確認できる。一方、分岐点に CpG 配列が位置するように設計した DNA プローブ 1, 2 を加えて反応した場合、反応後の非メチル化ゲノム DNA の Ct 値は 28.8 サイクルに、メチル化ゲノム DNA は 27.6 サイクルに増大した。反応後の非メチル化ゲノム DNA とメチル化ゲノム DNA の Ct 値を比較した結果、1.2 サイクルの差を確認することができた。

分岐点に CpG 配列以外のシトシンが位置するように設計した DNA プローブ 3, 4 を加えて反応した場合は、非メチル化ゲノム DNA、メチル化ゲノム DNA とともに Ct 値は、30.3 サイクルであり、ほぼ同じであった。DNA プローブ 3, 4 を用いて反応した場合は、非メチル化ゲノム DNA とメチル化ゲノム DNA の Ct 値に差はほとんど確認されなかったことから、DNA プローブ 1, 2 の 1.2 サイクルの差は、分岐点上の CpG 配列のメチル化状態の違いによる差であると考えられる。

DNA プローブ 3, 4 の結果と比較すると DNA プローブ 1, 2 存在下で反応した非メチル化ゲノム DNA の Ct 値は低く、メチル化ゲノム DNA との差、 Δ Ct 値も小さいことから、非メチル化ゲノム DNA の標的としている *RB1* エキソン 8 部位の CpG 配列がメチル化されている可能性が考えられる。

今回使用した TaKaRa の Episcope[®] Methylated HCT116 gDNA は、HCT116 細胞株から抽出・精製したゲノム DNA をメチル化酵素、CpG methylase (M.Sss I) で処理しているため、全ての CpG 配列が高メチル化されている。一方、Episcope[®] Unmethylated HCT116 gDNA は、Dnmt1 と Dnmt3b を Double knockout した HCT116 細胞株由来のゲノム DNA であり、メチル化レベルが 5% 以下の低メチル化状態とされているが、Dnmt1 と Dnmt3b を Double knockout した細胞由来のゲノム DNA でも遺伝子の部位や細胞株によりメチル化状態が異なることが報告されている^{71,72}。これらのことから、Episcope[®] Unmethylated HCT116 gDNA の *RB1* エキソン 8 部位がメチル化されている可能性が推測される。

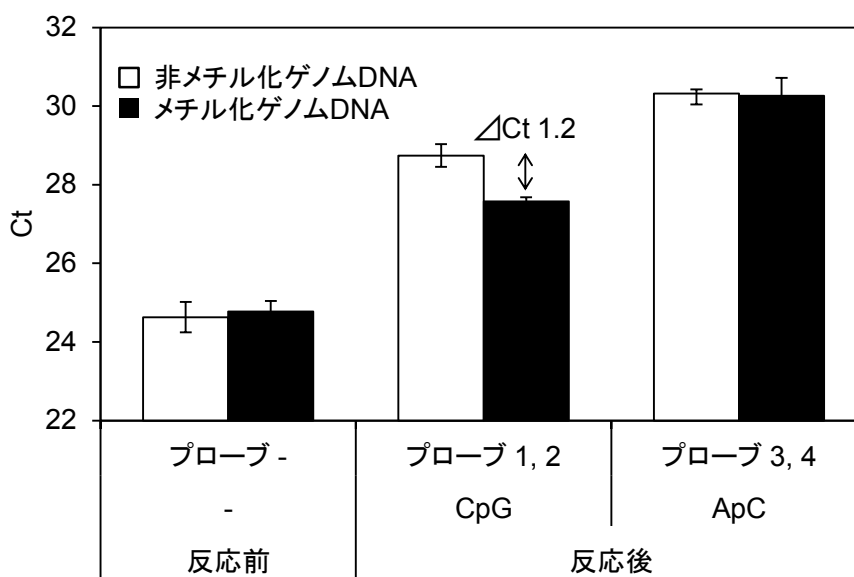


Fig. 6-2 ゲノム DNA における *RB1* エキソン 8 のメチル化検出結果

6-3-2 バイサルファイトシーケンシング結果

50 ng の非メチル化ゲノム DNA (TaKaRa, Episcoper[®] Unmethylated HCT116 gDNA) とメチル化ゲノム DNA (TaKaRa, Episcoper[®] Methylated HCT116 gDNA) を QIAGEN 社の EpiTect Bisulfite キットを用いてメチル化解析を行った。EpiTect Bisulfite キットでバイサルファイト変換した後、ゲノム DNA を PCR 増幅した。PCR 産物は、スピンカラム (Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) を用いて粗精製した。粗精製した PCR 産物を T/A クローニングした後、プラスミド DNA を抽出し、サイクルシーケンシングを行い、変換後の配列解析を行った。

非メチル化ゲノム DNA とメチル化ゲノム DNA、各 28 クローンずつ配列解析した結果を Table 6-1 と Table 6-2 に示す。また、非メチル化ゲノム DNA とメチル化ゲノム DNA の各 CpG 配列におけるメチル化状態を比較した結果を Table 6-3 と Fig. 6-3 に示す。

Table 6-1 と Table 6-2 は、*RB1* エキソン 8 の部分配列、60 塩基を示す。解読した 60 塩基の内、CpG 配列以外の 12 個のシトシンにおけるチミンへの変換効率、unconverted (% convert) を調べた結果、全てのクローンで 91.7% から 100% の高い変換効率が確認された。従って、EpiTect Bisulfite キットにより、ゲノム DNA のシトシンが十分にバイサルファイト変換されていることがわかる。

解読した 60 塩基の内、3 カ所の CpG 配列におけるメチル化状態を調べた。非メチル化ゲノム DNA の 12 番目と 24 番目、45 番目の CpG におけるシトシンのメチル化、チミンへの変換を調べた結果、12 番目の CpG 部位は、28 クローンの内、14 クローンがシトシン、つ

まりメチル化されていた。従って、12番目の CpG 配列におけるメチル化率は 50.0%であると推測される。

同様に、24番目の CpG 部位は、28 クローンの内、20 クローンがメチル化されており、メチル化率は 71.4%であった。45番目の CpG 部位は、28 クローンの内、25 クローンがメチル化されており、メチル化率は 89.3%であった。

表の右端に、3カ所のメチル化パターンを表記する。白い円“○”は非メチル化シトシン、黒い円“●”はメチルシトシンを示す。3つの円はそれぞれ左から12番目、24番目、45番目の CpG におけるメチル化模様を示しており、遺伝子の上流に位置する12番目が最もメチル化率が低く、下流の45番目の CpG が最もメチル化されていることがわかる。

一方、メチル化ゲノム DNA では、3カ所すべての CpG 配列が28 クローン全て 100%メチル化されていた。

Table 6-3 と Fig. 6-3 より、12番目のシトシン、6-3-1 で TWJ 構造を利用して解析した部位は、非メチル化ゲノム DNA では 50.0%、メチル化ゲノム DNA では 100%メチル化されていることが判明した。この結果から、Fig. 6-2 で DNA プローブ 1 と 2 を用いて反応した時、非メチル化ゲノム DNA とメチル化ゲノム DNA で Ct 値に、1.2 サイクルしか差が見られなかったのは、非メチル化ゲノム DNA が 50.0%メチル化されていたのが原因であることが判明した。また、メチル化ゲノム DNA は 100%メチル化されていることから、メチル化ゲノム DNA をコントロールとしてメチル化率を定量できる可能性が考えられる。

バイサルファイトシーケンシング法は、一塩基解像度で各 CpG 部位におけるメチル化状態を詳細に解析できる利点があるが、メチル化率の解像度は配列解析したクローン数に由来し、多数のクローンをシーケンシングする必要があるため、迅速性や簡便性に欠ける。また、バイサルファイト法自体の反応時間も長く、バイサルファイト変換、脱スルホ化の2ステップの反応と洗浄操作など煩雑な操作が必要となる。

Table 6-1. 非メチル化ゲノム DNA のバイサルファイト変換後の配列解析結果

Name	Sequence			unconverted (% converted)	Methylation pattern
	12	24	45		
Genome	ATGGTTCACCTCGAACACCCAGGCGAGGTCAGAACAGGAGTGCACGGATAGCAAAACAAC				
Clone 1	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTATGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	○○○
Clone 2	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTATGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	○○○
Clone 3	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	○○●
Clone 4	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	○○●
Clone 5	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	○○●
Clone 6	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	○○●
Clone 7	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	○○●
Clone 8	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	○○●
Clone 9	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTATGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	○●○
Clone 10	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	○●●
Clone 11	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	○●●
Clone 12	ATGGTTTACTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			1/12 (91.7)	○●●
Clone 13	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	○●●
Clone 14	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	○●●
Clone 15	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 16	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			1/12 (91.7)	●●●
Clone 17	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 18	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 19	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 20	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 21	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATTGTATAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 22	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 23	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 24	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 25	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			1/12 (91.7)	●●●
Clone 26	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 27	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 28	ATGGTTTATTTTGAATATTTAGGTGAGGTTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●

Table 6-2. メチル化ゲノム DNA のバイサルファイト変換後の配列解析結果

Name	Sequence			unconverted (% converted)	Methylation pattern
	12	24	45		
Genome	ATGGTTCACCTCGAACACCCAGGCGAGGTCAGAACAGGAGTGCACGGATAGCAAAACAAC				
Clone 1	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 2	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 3	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGCAAAAATAAA			1/12 (91.7)	●●●
Clone 4	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 5	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 6	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 7	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 8	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 9	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 10	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAACAAT			1/12 (91.7)	●●●
Clone 11	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 12	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 13	GTGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 14	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAACAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			1/12 (91.7)	●●●
Clone 15	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 16	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 17	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 18	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 19	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 20	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 21	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 22	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 23	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 24	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 25	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 26	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 27	ATGGTTTATTT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			0/12 (100.0)	●●●
Clone 28	ATGGTTTATCT CGA ATATTTAGG CGAG TTAGAATAGGAGTGTACGGATAGTAAAAATAAT			1/12 (91.7)	●●●

Table 6-3. *RB1* エキソン 8 部位の各 CpG 部位におけるメチル化状態の比較

	12	24	45	Total
Unmethylated HCT116 gDNA	14/28 (50.0%)	20/28 (71.4%)	25/28 (89.3%)	59/84 (70.2%)
Methylated HCT116 gDNA	28/28 (100%)	28/28 (100%)	28/28 (100%)	84/84 (100%)

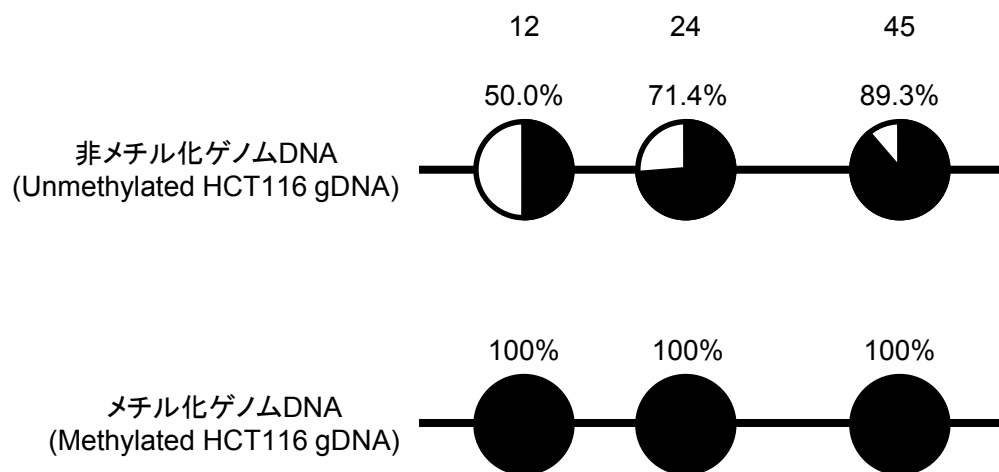


Fig. 6-3 *RB1* エキソン 8 部位の各 CpG 部位におけるメチル化状態の比較

6-3-3 非メチル化ゲノム DNA におけるメチル化率の定量

6-3-1 で DNA プローブ 1 と 2 を用いて非メチル化ゲノム DNA とメチル化ゲノム DNA を反応した結果、Ct 値に 1.2 サイクルの差しか確認することができなかった。また、6-3-2 より、メチル化ゲノム DNA は、全ての CpG 配列で 100%メチル化されていたが、非メチル化ゲノム DNA は完全に脱メチル化されておらず、検出部位の CpG 配列が 50%メチル化されていることが判明した。これらの結果から、非メチル化ゲノム DNA 中の目的の CpG 配列がメチル化されており、Ct 値の差が小さくなったと考えられる。また、バイサルファイトシーケンシング法の結果からメチル化ゲノム DNA が 100%メチル化されていることが判明したため、メチル化ゲノム DNA をコントロールとして非メチル化ゲノム DNA におけるメチル化率の定量が可能であると考え、メチル化率の定量を試みた。

まず、メチル化ゲノム DNA を鋳型に Table 5-5 のプライマー配列を用いて PCR 増幅を行い、非メチル化 DNA の作製を行った。PCR により新たに複製された DNA 鎖は、全てシトシンに変換されるため、非メチル化 DNA となる。50 ng のメチル化ゲノム DNA を 25 ng、5 ng、0.5 ng と減らし、非メチル化 DNA を加え、分子数を統一した。

1, 10, 50, 100%のメチル化率で検量線を作成し、非メチル化ゲノム DNA における RB1 エキソン 8 のメチル化状態の解析を行った。その結果を Fig. 6-4 に示す。メチル化率と Ct 値の相関は、 $R^2 = 0.9969$ であった。また、非メチル化ゲノム DNA の Ct 値は、27.3 サイクルであり、検量線からメチル化率を算出した結果、メチル化率は $31.0 \pm 9.0\%$ であった。6-3-2 の非メチル化ゲノム DNA のバイサルファイトシーケンシング結果では、目的の CpG 配列のメチル化率は 50%で完全に一致はしなかった。

本検出法と従来法で結果が完全に一致しなかった原因として、2つの要素が考えられる。1つ目は、メチル化酵素を Double knockout させた HCT116 細胞株由来の非メチル化ゲノム DNA がメチル化されてしまっていることからメチル化率を定量する際に、PCR 増幅した非メチル化 DNA サンプルを混合して検量線を作成したのが原因ではないかと考えられる。長いゲノム DNA と短い PCR 産物で、亜硫酸水素ナトリウムと CMH による反応または PCR 増幅に差が生じ、従来法との値に差が生じてしまったのではないかと考えられる。2つ目は、バイサルファイト変換後の非メチル化ゲノム DNA とメチル化 DNA における PCR の増幅に差が生じ、PCR 産物に偏りが生じたのが原因ではないかと考えられる。バイサルファイト反応で完全にウラシルへと変換されず、スルホ基が付加されたシトシン誘導体が残っていると PCR 増幅を阻害することが知られている。従って、メチル化ゲノム DNA が優先的に増幅され、見かけ上のメチル化率が上昇してしまったのが原因ではないかと考えられる。

以上の結果から、従来法とは完全に一致しなかったが本検出法でもメチル化率を簡便に解析できる可能性が示唆された。

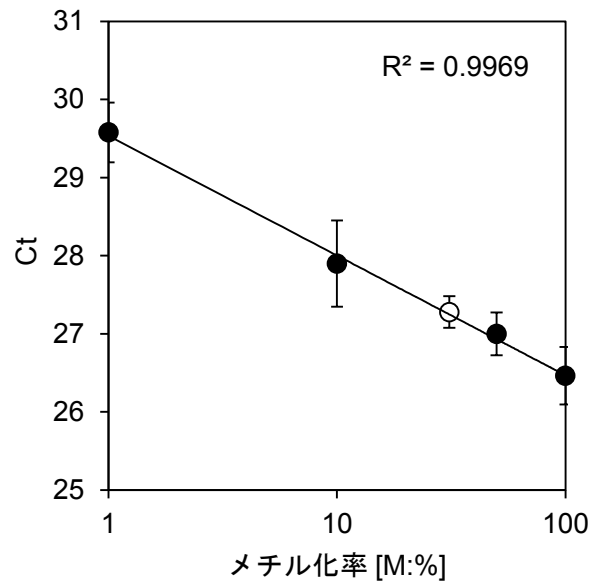


Fig. 6-4 メチル化率の定量

メチル化ゲノム DNA と PCR 増幅した非メチル化 DNA を任意の値で混合し、メチル化率が 100%、50%、10%、1% と異なる DNA サンプルを調製した。"●" が各メチル化率における反応後の Ct 値の変化を示しており、"○" は非メチル化ゲノム DNA の反応後の Ct 値を示す。

6-4 結言

本章では、ヒトゲノム、HCT116 細胞株由来のゲノム DNA を用いて、*RB1* エキソン 8 の 3 ヲ所ある CpG 配列の内、1 ヲ所の CpG のメチル化状態をピンポイントで解析できるか試みた。また、従来法の一つであるバイサルファイトシーケンシングを用いて *RB1* エキソン 8 部位のメチル化解析を行い、本検出法と従来法の検出結果を比較し、正確にメチル基を識別できているか確認を行った。

50 ng のゲノム DNA に 100 pmol の TWJ プローブを加え、熱変性した後、1.0 M の亜硫酸水素ナトリウム(pH5.0)と 1.0 M の CMH (pH5.0)で 3 時間反応した。反応後のゲノム DNA (25 ng)を鋳型にリアルタイム PCR で測定した結果、分岐点が CpG に位置するように設計した DNA プローブ 1, 2 では、非メチル化ゲノム DNA とメチル化ゲノム DNA の Ct 値がそれぞれ、28.8 サイクルと 27.6 サイクルであり、1.2 サイクルの差を確認することができた。また、コントロールとして DNA プローブ 3, 4 を用いて CpG 配列以外のシトシンを反応した結果、非メチル化ゲノム DNA とメチル化ゲノム DNA とともに Ct 値が 30 サイクルであり、ほぼ同じであった。DNA プローブ 1, 2 の Ct 値と比較すると、非メチル化ゲノム DNA の Ct 値の方が高く、メチル化されている可能性が示唆された。メチル化ゲノム DNA をコントロールとし、メチル化率の定量を行った結果、非メチル化ゲノム DNA のメチル化率は、 $31.0 \pm 9.0\%$ であることが判明した。

従来法であるバイサルファイトシーケンシングの結果では、非メチル化ゲノム DNA の *RB1* エキソン 8 におけるメチル化状態は、3 ヲ所ある CpG 配列内、上流からそれぞれ 50.0%、71.4%、89.3%メチル化されていることが判明した。また、メチル化ゲノム DNA では 3 ヲ所全ての CpG 配列が 100%メチル化されていた。

本検出法で定量した非メチル化ゲノム DNA のメチル化率は、 $31.0 \pm 9.0\%$ であり、バイサルファイトシーケンシング法によるメチル化率は、50%であった。バイサルファイトシーケンシングの結果と完全に一致はしなかったが、ゲノム DNA でも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可能性が示唆された。また、QIAGEN 社の EpiTect Bisulfite キットではバイサルファイト変換に 5 時間以上かかり、反応後も脱スルホ化反応やスピンカラムによる洗浄操作など煩雑な操作が必要であるのに対して本検出法は、3 時間の 1 ステップの短い反応で検出が可能であるため、従来法と比較して迅速かつ簡便に DNA のメチル化を検出できることが示された。

第 7 章 結論

本研究では、シトシン特異的な化学修飾法の探索および検出法の開発と DNA プローブを用いた新たな一塩基選択的な化学修飾法の開発を行い、ピンポイントなメチル化 DNA 検出法の開発を試みた。

DNA のメチル化は、シトシンの 5 位にメチル基が導入される酵素反応により生じ、メチル化された遺伝子は、転写因子や RNA ポリメラーゼの結合を阻害するため、遺伝子発現が不活性化される。シトシン特異的な化学修飾法の探索および検出法の開発はメチル化 DNA 検出法への応用が期待でき、簡便なメチル化 DNA 検出法の開発は、がんの早期発見、遺伝子診断技術への応用が期待できる。本研究では、シトシンのメチル基の有無による求核剤、亜硫酸水素ナトリウムとアミノオキシ化合物に対する化学反応性の違いを利用した新規メチル化 DNA 識別法の開発を行った。また、DNA プローブを利用した新たな一塩基選択的な化学修飾法の開発を試みた。特定の塩基を効率的に修飾または切断することができれば、遺伝子工学などへの応用が期待でき、特定の CpG 配列のみを選択的に反応させることができれば、メチル化 DNA 検出法への利用も期待できる。本研究では、亜硫酸水素ナトリウムとアミノオキシ化合物によるシトシン特異的な化学修飾と DNA プローブを利用した一塩基選択的な化学修飾法を組み合わせ、特定の CpG 配列をピンポイントで化学修飾した後、リアルタイム PCR でシトシンのメチル化状態を簡便に解析できる新規メチル化 DNA 検出法の開発を行った。

第 2 章では、メチル基の有無による求核剤、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンに対する化学反応性の違いを利用した非メチル化シトシン特異的な化学修飾法の確立、およびメチル基識別法の開発を行った。

シトシンまたはメチルシトシンを 1 ヶ所含む 12 塩基の DNA 鎖を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後、HPLC と TOF-MS を用いて質量分析を行った。その結果、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによる化学修飾は、非メチル化シトシン特異的でありメチルシトシンを含め、他の 3 つ塩基(T, A, G)では反応しないことを確認した。また、質量数の変化から、6 位と 4 位にスルホ基とメトキシアミンが 1 つずつ付加されたシトシン誘導体、*N*⁴-methoxy-5,6-dihydrocytosine-6-sulfonate を形成していることが推測される。早津らにより、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が報告されていることから、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンで処理した DNA 鎖を鋳型にプライマー伸長反応の有無を指標とした新たなメチル基識別法の開発を試みた。

シトシンまたはメチルシトシンを 1 ヶ所含む 20 塩基の DNA 鎖を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後、標的 DNA を鋳型にプライマー伸長反応を行った。その結果、シトシンを含む標的 DNA でのみ、プライマーからの伸長反応が途中で阻害される

ことが確認された。メチルシトシンを含む DNA 鎖では、反応前も反応後も 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は確認されなかった。

これらの結果から、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標的 DNA を鋳型として、プライマー伸長反応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、本研究で新たに耐熱性、*Taq* DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成の阻害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。*Taq* DNA ポリメラーゼを利用したメチル基の識別は、PCR などの核酸分子増幅法による簡便なメチル基識別法への応用が期待できる。

第 3 章では、様々な DNA プローブを用いて一塩基選択的な化学修飾法の探索を行った。標的 DNA に DNA プローブを結合させ、第 2 章で行った亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンまたは他のアミノオキシ化合物による反応を行い、特定のシトシンをピンポイントで修飾し、メチル基を識別できるか試みた。

DNA の分岐構造である Three-way junction (TWJ) 構造を形成する TWJ プローブとバルジ DNA プローブ、ミスマッチ DNA プローブの 3 種類の DNA プローブを用いて標的 DNA 配列中の特定のシトシンをピンポイントで修飾、検出できるか実験を行った。その結果、TWJ プローブが最も特定のシトシンをピンポイントで修飾、メチル基を識別するのに適した DNA プローブであることが示された。

TWJ プローブを用いて反応することで、標的 DNA 中に 12 ヲ所あるシトシンの内、分岐点上に位置するシトシンのみを選択的に修飾し、プライマーからの伸長反応をピンポイントで阻害できることが確認され、分岐点以外の二本鎖を形成している他の 11 ヲ所のシトシンでは、ほとんど反応しないことが示された。また、TWJ の分岐点上に位置する塩基が全て塩基対を形成したフルマッチ TWJ と 1 ヲ所塩基対を形成していないミスマッチ TWJ を形成する 2 種類の TWJ プローブを用いて同様の実験を行った結果、フルマッチ TWJ 構造を形成する DNA プローブが最も特定のシトシンをピンポイントで修飾するのに適した DNA プローブであることが示された。フルマッチ TWJ プローブを用いて特定のシトシンを化学修飾した後、化学修飾されたシトシン誘導体の *Taq* DNA ポリメラーゼによる PCR 増幅の阻害やサイクリングプライマー伸長反応の阻害を指標としたピンポイントなメチル基の識別が可能であることが示された。TWJ プローブを利用した一塩基選択的な化学修飾法の開発は、特定の塩基を効率的に切断または修飾できるため、遺伝子組み換えや点変異解析など遺伝子工学への利用が期待でき、シトシンのメチル化以外に、5-ヒドロキシメチルシトシンや RNA などの修飾核酸検出ツールとしての利用が期待できる。

第 4 章では、修飾後のシトシン誘導体における *Taq* DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成の阻害を指標として、リアルタイム PCR 測定でシトシンのメチル化状態を簡便に解析できるか試みた。

TWJ プローブを標的 DNA に結合させ、亜硫酸水素ナトリウムとアミノオキシ化合物で反応した後、標的 DNA を鋳型にリアルタイム PCR を用いてある一定量の PCR 産物が増幅されるまでのサイクル数、Ct 値の測定と未修飾標的 DNA 量の割合を算出した。その結果、リアルタイム PCR の Ct 値と未修飾標的 DNA 量の割合から分岐点上のシトシンのメチル化を簡便に識別できることが示された。TWJ プローブを利用して反応することで、プライマー結合領域など目的の CpG 配列以外のシトシンでの反応を抑制し、分岐点上に位置するシトシンをピンポイントに修飾することができるため、リアルタイム PCR で配列解析を行わずに特定のシトシンのメチル化状態を簡便に解析することができる。バイサルファイトシーケンシング法などクローニングやシーケンシングなど煩雑な操作が伴う従来法と比較して、本検出法は特定の CpG 配列のメチル化状態を簡便に解析できるため、遺伝子診断など迅速性が求められる医療分野での利用が期待できる。

第 5 章では、フルマッチ TWJ 構造を形成する DNA プローブを用いてがん抑制遺伝子の一つである *p16* 遺伝子や *RB1* 遺伝子の部分配列から成る合成 DNA 配列を用いて異なる遺伝子、CpG 部位でもメチル化を検出できるか汎用性の確認を行った。その結果、標的配列やプライマー配列によって検出感度や修飾後の標的 DNA おける Ct 値の差に違いはあったが、全ての標的配列で DNA のメチル化をピンポイントで識別することに成功し、高い汎用性が示された。DNA プローブの長さや分岐点周辺の配列が異なる全ての TWJ プローブで分岐点上のシトシンのメチル化をピンポイントで識別できたことから、TWJ プローブを利用した一塩基選択的な化学修飾法の高い汎用性も示された。また、修飾後の標的 DNA における PCR 増幅の阻害は、分岐点上の化学修飾されたシトシン誘導体に由来しており、メチルシトシンの割合により Ct 値が変化することが確認された。この結果から、Ct 値から分岐点上のシトシンのメチル化率を簡便に定量できることが示された。また、二本鎖の標的 DNA や 2 ヶ所のメチル化パターンを同時に解析することにも成功したため、ゲノム DNA での検出やエピゲノムタイピング、遺伝子発現のプロファイリングへの応用が期待できる。

第 6 章では、結腸直腸がん細胞である HCT116 細胞株から抽出したゲノム DNA、Episcope[®] Methylated HCT116 gDNA (TaKaRa) と Episcope[®] Unmethylated HCT116 gDNA (TaKaRa) を用いて *RB1* 遺伝子のメチル化解析を行った。50 ng のゲノム DNA を用いて *RB1* 遺伝子のメチル化状態を解析した結果、反応後の Ct 値の差から配列解析を行わずに特定のシトシンのメチル化を識別することに成功した。TWJ プローブを利用することで、30 億塩基対あるゲノム DNA 中の 1 塩基をピンポイントで修飾、識別できることが示された。従来のバイサルファイトシーケンシング法、QIAGEN 社の EpiTect Bisulfite キットを用いて比較実験を行った。従来法では、バイサルファイト変換に 5 時間以上かかり、脱スルホ化やスピンカラムによる精製など煩雑な操作が必要であるのに対して、本検出法は 3 時間の短い 1 ステップの反応で簡便にメチル化を検出でき、従来法よりも簡便かつ迅速に DNA のメチル

化を検出できることが示された。

本検出法は、従来のメチル化 DNA 検出法とはまったく異なる反応系、および検出法で配列解析を行わずに特定のシトシンのメチル化状態を簡便かつ迅速に解析できる画期的な手法である。バイサルファイト法と比較して 1 ステップの反応で簡便かつ迅速に特定の遺伝子のメチル化パターンを解析することができるため、遺伝子発現プロファイリングシステムの構築など診断医学、分子生物学など様々な分野での貢献が期待できる。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、特定の塩基を効率的に切断または修飾することができるため、遺伝子の組み換えや点変異解析など遺伝子工学への利用が期待できる。

参考文献

- (1). Oki. Y., Aoki. E., Issa. J. P. (2007) Decitabine-Bedside to bench. *Crit Rev Oncol Hematol.*, **61**, 140-152.
- (2). 最新医学. (2008) エピジェネティクス –最近の動向と疾患-. 最新医学社.
- (3). 牛島俊和, 田嶋正二, 塩田邦朗, 吉田稔. (2010) エピジェネティクスと疾患. 羊土社.
- (4). 実験医学. (2011) 世代を超えて伝わる代謝エピジェネティクス. 羊土社.
- (5). Darii.M.V., et al. (2009) Mutational analysis of the CG recognizing DNA methyltransferase Sss I : Insight into enzyme DNA interaction. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1794**, 1654-1662.
- (6). Ito.S., Shen.L., Dai.Q., Wu.S.C., Collins.L.B., Swenberg.J.A., He.C., Zhang.Y. (2011) Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science.*, **333**. 1300-1303.
- (7). Dahl.C., Gronaek.K., Guldborg.P. (2011) Advances in DNA methylation: 5-hydroxylcytosine revisited. *Clin. Chim. Acta.*, **412**, 831-836.
- (8). Nabel.C.S., Kohli.R.M. (2011) Demystifying DNA demethylation. *Science.*, **333**. 1229-1230.
- (9). He.Y., et al. (2011) Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in Mammalian DNA. *Science.*, **333**. 1303-1307.
- (10). Jin. S. G., Kadam. S., Pfeifer. G. P. (2010) Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucleic Acids Res.*, **38**, e125.
- (11). Szwagierczak. A., Bultmann. S., Schmidt. C. S., Spada. F., Leonhardt. H. (2010) Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res.*, **38**, e181.
- (12). Song. C. X., et al. (2011) Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nature biotechnology.*, **29**, 68-75

-
- (13). Jones. P. A., Laird. P. W. (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nature genetics.*, **21**, 163-167.
- (14). Vallian.S., Sedaghat.M., Nassiri.I., Frazmand.A. (2009) Methylation status of p16^{INK4A} tumor suppressor gene in Iranin patients with sporadic breast cancer. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, **135**, 991-996.
- (15). AYADI. W., *et al.* (2008) Aberrant Methylation of p16, DLEC1, BLU and E-Cadherin Gene Promoters in Nasopharyngeal Carcinoma Biopsies from Tunisian Patients. *Anticancer Res.*, **28**, 2161-2168.
- (16). Attaleb. M., *et al.* (2009) Status of p16^{INKa} and E-Cadgerin Gene Promoter Methylation in Moroccan Patients With Cervical Carcinoma. *Oncol Res.*, **18**, 185-192.
- (17). Maekita. T., *et al.* (2006) High levels of aberrant DNA methylation in Helicobacter pylori – infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res.*, **3**, 989-995.
- (18). Lofton-Day.C., *et al.* (2008) DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin. Chem.*, **54**, 414-423.
- (19). Grutzmann.R., *et al.* (2008) Sensitice detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS ONE.*, **3**, e3759.
- (20). deVos.T., *et al.* (2009) Circulationg mrthylated sept9 DNA in plasm is a biomearker for colorectal cncer. *Clin. Chme.*, **55**, 1337-1346.
- (21). BareytS., Carell.T. (2008) Selective detection of 5-methylcytosine sites in DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 181-184.
- (22). 牛島俊和, 眞貝洋一. (2008) エピジェネティクス実験プロトコール. 羊土者.
- (23). Erommer.M., Mcdonald.L.E., Millar.D.S., Collis.C.M. Watt.F., Grigg.G.W., Molloy.P.L., Paul.C.L. (1992) Agenomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 1827-1831.
- (24). Herman,J.G., Graff,J.R., Myohanen,S., Nelkin.B.D., Baylin.S.B. (1996)

Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 9821-9826.

(25). Eads.C.A., Danenberg.K.D., Kawakami.K., Saltz.L.B., Blake.C., Shibata.D., Danenberg.P.V., Laird.P.W. (2000) MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.*, **28**, e32.

(26). Xiong.Z., Laird.P.W. (1997) COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2532-2534.

(27). Gonzalgo.M.L., Jones.P.A. (1997) Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2529-2531.

(28). Cao.A., Zhang.C. (2012) Sensitive and Label-Free DNA methylation detection by ligaton-mediated hyperbranched rolling circle amplification. *Anal. Chem.*, **84**, 6199-6205.

(29). Thomassin.H., Kres.C., Grange.T. (2004) MethylQuant: a sensitive method for quantifying methylation of specific cytosines within the genome. *Nucleic Acids Res.*, **32**, e168.

(30). Shiraishi.M., Hayatsu.H. (2004) High-speed conversion of cytosine to uracil in bisulfite genomic sequencing analysis of DNA methylation. *DNA Res.*, **11**, 409-415.

(31). Munzel,M., Lercher,L., Muller,M., Carell,T. (2010) Chemical discrimination between dC and 5MedC via their hydroxylamine adduct. *Nucleic Acids Res.*, **38**, e192.

(32). Reifeld.A., Rothenberg.J.M., Bayer.E.A., Wilchek.M. (1987) Nonradioactive hybridization probes prepared by the reaction of biotin hydrazide with DNA. *Biochem Biophys Res Commun.*, **142**, 519-526.

(33). Viscid.R.P., Connelly. C.J., Yolken.E.H. (1986) Novel chemical method for the preparation of nucleic acids for Nonisotopic hybridization. *J. CLIN. MICROBIOL.*, **23**, 311-317.

(34). Okamoto.A., Tainaka.K., Kamei.T. (2006) Sequence-selective osmium oxidation of DNA: efficient distinction between 5-methylcytosine and cytosine. *Org. Biomol. Chem.*, **4**,

1638-1640.

(35). Okamoto. A., Nomura. A., Tainaka. K. (2009) Osmium Complexation of Mismatched DNA: Effect of the Bases Adjacent to Mismatched 5-Methylcytosine. *Bioconjugate Chem*, **20**, 603-607.

(36). Yu.Yinni., Blair.S., Gillespie.D., Jensen.R., Myszka.D.G., Badran.A.H., Ghosh.I., Chagovetz.A. (2010) Direct DNA methylation profiling using methyl binding domain proteins. *Anal Chem.*, **82**, 5012-5019.

(37). Nomura.A., Okamoto.A. (2011) Phosphopeptides designed for 5-methylcytosine recognition. *Biochemistry*, **50**, 3376-3385.

(38). Singer-Sam.J., Lebon.J.M., Tanguay.R.L., Riggs.A. (1990) A quantitative HpaII-PCR assay to measure methylation of DNA from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 687.

(39). Flusberg.B., Webster.D., Lee.J., Traver.K., Olivares.E., Clark.T.A., Korlach.J., Turner.S.W. (2010) Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nat Methods.*, **7**, 461-465.

(40). John.E., *et al.* (2009) Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, **323**, 133-138.

(41). Munzel.M., Globisch.D., Bruckl.T., Wagner.M., Welzmler.V., Michalakis.S., Muller.M., Iel.M., Carell.T. (2010) Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 5375-5377.

(42). Stoddart.D., Heron.A.J., Mikhailova.E., Maglia.G., Bayley.H. (2009) Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. *PNAS.*, **106**, 7702-7707.

(43). Wanunu.M., Cohen-Karni.D., Johnson.R.R., Fields.L., Benner.J., Peterman.N., Zheng.Y., Klein.M.L., Drndic.M (2011) Discrimination of methylcytosine from hydroxymethylcytosine in DNA molecules. *J. AM. CHEM. SOC.*, **133**, 486-492.

(44). Wallace.E.V.B., Stoddart.D., Heron.A.J., Mikhailova.E., Maglia.G., Donohoe.T.J.,

Bayley.H. (2010) Identification of epigenetic DNA modification with a preprotein nanopore.

Chem. Commun., **46**, 8195-8197.

(45). Rubin. C. M., Schmid. C. W. (1980) Pyrimidine-specific chemical reactions useful for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4163-4169.

(46). Sugizaki. K., Nakamura. A., Yanagisawa. H., Okamoto. A. (2012) Ligand-Incorporation site in 5-Methylcytosine-Detection probe modulating the site of osmium complexation with the target DNA. *Chem Biodivers.*, **9**, 2000-2007.

(47). Oka.Y., Peng.T., Takei.F., Nakatani.K. (2009) Synthesis and reaction of DNA oligomers containing modified cytosine related to bisulfite sequencing. *Org. Lett.*, **11**, 1377-379.

(48). Cotton. R. G. H., Campbell. R. D. (1989) Chemical reactivity of matched cytosine and thymine bases near mismatched and unmatched bases in a heteroduplex between DNA strands with multiple differences. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 4223-4233.

(49). Cotton.R.G.H., Rodrigues.N.R., Campbell.R.D. (1988) Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 4397-4401.

(50). Gogos. J. A., Karayiorgou. M., Aburatani. H., Kafato. F. C. (1990) Detection of single base mismatches of thymine and cytosine residues by potassium permanganate and hydroxylamine in the presence of tetralkylammonium salts. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6807-6814.

(51). Tainaka.K., Okamoto.A. (2011) ICON probes: synthesis and DNA methylation typing. *Curr Protoc Nucleic Acid Chme.*, **8**, 1-17.

(52). Sugizaki.K., Umemoto.T., Okamoto.A. (2011) On-Chip DNA methylation analysis using osmium complexation. *J Nucleic Acids.*, 480570, 5 page.

(53). Tanaka.K., Tainaka.K., Okamoto.A. (2007) Methylcytosine-selective fluorescence quenching by osmium complexation. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 1615-1621.

(54). Tanaka,K., Tainaka,K., Umemoto,T., Nomura,A., Okamoto,A. (2007) An osmium-DNA Interstrand complex: application to facil DNA methylation analysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**,

14511-14517

(55).Hayatsu. H. (1978) Reactions of bisulfite, an environmental chemical, with nucleic acids and other biological substances. *Pure & Appl. Chem.*, **50**, 1063-1068.

(56). Negishi.K., Harada.C., Ohara.Y., Oohara.K., Nitta.N., Hayatsu.H. (1983) N4-Aminocytosine, a nucleoside analog that has an exceptionally high mutagenic activity. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 5223-5233.

(57).Bessho.T., Nitta.N., Negishi.K., Hayatsu.H. (1992) Blockage of polymerase-catalyzed DNA chain elongation by chemically modified cytosine residues in templates and the release of blockage for readthrough. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4213-4220.

(58). Huang.Y., Pastor.W.A., Shen.Y., Tahiliani.M., Liu.D.R., Rao.A. (2010) The behavior of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS. ONE.*, **5**, e8888.

(59). Kato.T., Yano.K., Ikebukuro.K., Karube.I. (2000) Interaction of three-way DNA junctions with steroids. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1963-1968.

(60). Reinstein. O., *et al.* (2011) Engineering a structure switching mechanism into a steroid-binding aptamer and hydrodynamic analysis of the ligand binding. *Biochemistry.*, **50**, 9368-9376.

(61). Ma. R. I., Kallenbach. N. R., Sheardy. R. D., Petrillo. M. L. Seeman. N. C. (1986) Three-arm nucleic acid junction are flexible. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 9745-9753.

(62). Boer. D. R., Kerckhoffs.J.M.C.A., Parajo.Y., Pascu.M., Uson.I., Linoln.P., Hannon.M.J., Coll.M. (2010) Self-Assembly of functionalizable Two-component 3D DNA arrays through the induced formation of DNA three-way-junction branch point by supramolecular cylinders. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 2336-2339.

(63). Oleksi. A., Blanco. A. G., Boer. R., Uson. I., Aymmi. J., Rodger. A., Hannon. M. J., Coll. M. (2006) Molecular recognition of a Three-way DNA junction by a metallosupramolecular helicate. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 1227-1231.

(64). Murakami. T., Sumaoka. J., Komiyama. M. (2012) Sensitive RNA detection by combining three-way junction formation and primer generation-rolling circle amplification.

Nucleic Acids Res., **40**, e20.

(65). Duckett.D.R., Lilley.D.M.J. (1990) The three-way DNA junction is a Y-shaped molecule in which there is no helix-helix stacking. *EMBO. J.*, **9**, 1659-1664.

(66). Sabir.T., Toulmin.A., Ma.L., Jones.A.C., Mcglynn.P., Schroder.G.F., Magennis.S.W.

(2012) Branchpoint expansion in a fully complementary three-way DNA junction. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 6280-6285.

(67). 野島博. (2006) DNA チップとリアルタイム PCR. 講談社.

(68). 監修, 直木寿治. (1997) PCR Tips -可能性を広げるコツとヒント-. 秀潤社.

(69). Cooper. D. N., Youssoufian. H. (1988) The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet.*, **78**. 151-155.

(70). Mancini. D., Singh. S., Ainsworth. P., Rodenhiser. D. (1997) Constitutively methylated CpG dinucleotides as methylation hot spots in the retinoblastoma gene (RB1). *Am. J. Gene.*, **61**, 80-87.

(71). Egger. G., *et al.* (2006) Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT in cell survival. *PNAS.*, **103**, 14090-14085.

(72). Lee. E.J., *et al.* (2011) Target bisulfite sequencing by solution hybrid selection and massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Res.*, **39**, e127.

業績

学会発表

- ・「DNA の分岐構造を用いたメチル化 DNA 検出法の開発」,
第 90 回日本化学会年会 (2010/03/28), 近畿大学 (大阪), 高梨健太, 加藤輝
- ・「メチル化 DNA のピンポイント検出法の開発」,
第 33 回日本分子生物学会年会 (2010/12/09), 神戸ポートアイランド (神戸),
高梨健太, 加藤輝
- ・「非 2 本鎖構造を形成する DNA プローブを用いたメチル化 DNA 検出法の開発」,
第 91 回日本化学会年会 (2011/03/26), 神奈川大学 (神奈川), 高梨健太, 加藤輝
- ・「メチル化 DNA のピンポイント検出法の開発」,
第 5 回バイオ関連化学シンポジウム (2011/09/21), つくば国際会議場 (茨城),
高梨健太, 加藤輝
- ・「DNA メチル化のピンポイント検出法の開発」,
BIO tech 2012 (2012/04/25,26,27), 東京ビックサイト (東京), 高梨健太, 加藤輝
- ・「Development of a method for the pinpoint detection of methylated DNA」,
The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (2012/11/16),
Nagoya University (Nagoya), Kenta Takanashi, Teru Kato
- ・「メチル化 DNA のピンポイント検出法の開発」,
第 35 回日本分子生物学会年会 (2012/12/13),
福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡), 高梨健太, 加藤輝
- ・「リアルタイム PCR によるメチル化 DNA のピンポイント検出」,
第 93 回日本化学会年会 (2012/03/22), 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (佐賀),
高梨健太, 加藤輝
- ・「A novel real-time PCR assay for the pinpoint detection of methylated DNA」,
The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (2013/11/13-15),
Kanagawa University (Kanagawa), Kenta Takanashi, Teru Kato

論文

- ・ Kenta Takanashi, Teru Kato, "Sequence-selective Modification of DNA Cytosine by Using Junction-forming DNA Probes and its Application to the Detection of Single Cytosine Methylation", Analytical Sciences, In press.
- ・ Kenta Takanashi, Teru Kato, "Detection of single methylated cytosine using junction-forming DNA probes", The Analyst, In press.

謝辞

本研究を行う機会を与えていただいた、主査である東京工科大学大学院バイオ・情報メディア研究科バイオニクス専攻准教授、加藤輝先生に心から感謝いたします。加藤先生には、長年に渡り多大な御指導と御助言を授けていただきました。

また、副査として適切な御助言と協力をいただきました、東京工科大学大学院バイオ・情報メディア研究科バイオニクス専攻、佐藤淳教授、後藤正男教授、村松宏教授、矢野和義教授に心から感謝いたします。

実験、その他について有益な御助言をいただきました、加藤研究室の日向麻須美講師に心から感謝いたします。

最後に、長きに渡る学生生活をご支援くださった両親に深く感謝いたします。