

博士学位論文審査結果要旨

2022年 1月 26日

研究科、専攻名 バイオ・情報メディア研究科 バイオニクス専攻

学位申請者氏名 高 夏海

論文題目 ゲノムDNA中の修飾シトシン塩基簡易測定法の開発

審査結果の要旨

2022年1月17日月曜日に東京工科大学において、学位申請者 高夏海 の博士学位論文公開審査会が開催され、以下の要旨に示す博士学位論文に関する発表と関連する質疑応答が行われた。

DNAメチル化とはゲノムDNAにおけるCpG配列中のシトシンの5位炭素がメチル化される反応である。がん細胞ではDNAメチル化異常が生じており、正常細胞と比較してゲノムDNAのメチル化レベルが低下している。また、片鎖のCpGのみメチル化されているヘミメチル化CpGは、Wilms腫瘍細胞や卵巣上皮性腫瘍細胞のゲノムDNA中のタンデム反復配列中に多く存在している。さらに、メチルシトシン酸化酵素Ten-eleven translocation (TET)によってメチルシトシンが酸化されると生じるヒドロキシメチルシトシンの量は、がん細胞や中枢神経系疾患細胞で低下している。以上より、ゲノムDNAのメチル化、ヘミメチル化およびヒドロキシメチル化レベルは、がんや中枢神経系疾患のバイオマーカーとしての利用が期待されている。そこで本研究では、メチル化、ヘミメチル化およびヒドロキシメチル化レベルを簡便に測定する方法を開発することを目的とした。

はじめに、生物発光共鳴エネルギー移動 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer; BRET)を利用したヘミメチル化レベル測定法を開発した。ヘミメチル化CpG結合蛋白質であるUbiquitin like with PHD and Ring Finger Domains 1 (UHRF1)のSET and RING Associated (SRA) domainにFirefly luciferase (Fluc)を融合させた蛋白質UHRF1 SRA-Flucを作製した。予めDNAインターカレーターであるBOBO-3を結合させた標的DNAにUHRF1 SRA-Flucを結合させ、Flucの発光により励起されたBOBO-3の蛍光強度 (BRETシグナル) を測定した。その結果、BRETシグナルは標的DNAのヘミメチル化レベル依存的に増加することが示された。従って、UHRF1 SRA-Flucを用い、BRETシグナルを測定することによって簡便に標的DNAのヘミメチル化レベルを測定できることが示された。

続いて、ヒドロキシメチル化CpG結合蛋白質であるUHRF2のSRA domainにFlucを融合させた蛋白質UHRF2 SRA-Flucを作製し、ヘミメチル化レベル測定法と同様にBRETを利用したヒドロキシメチル化レベル測定法を開発した。UHRF2 SRAはヒドロキシメチル化CpGだけでなく、メチル化CpGにも結合する。そこで、予めメチル化CpGに特異的に結合する蛋白質であるMethyl-CpG-binding domain (MBD)をメチル化CpGサイトに結合させておけば、UHRF2 SRA-Flucがヒドロキシメチル化CpGに特異的に結合すると想定した。HeLa細胞から抽出したゲノムDNAをTE Tで処理することにより、ヒドロキシメチル化したゲノムDNAを調製した。MBD存在下で、TET

処理ゲノムDNAに対してUHRF2 SRA-Flucを用いたBRETシグナルを測定した。その結果、BRETシグナルはゲノムDNAのヒドロキシメチル化レベル依存的に増加することが示された。以上より、BRETを利用することで簡便にヒドロキシメチル化レベルを測定できることが示された。

次に、TETの触媒反応を利用したゲノムDNAのメチル化レベル測定法を開発した。TETがメチルシトシンを酸化する過程で、 α -ケトグルタル酸はコハク酸に変換される。つまり、ゲノムDNAにTETを反応させることで生じるコハク酸量はゲノムDNAのメチル化レベルに相関すると想定した。ゲノムDNAに対してTETを反応させ、生じたコハク酸量を定量した結果、ゲノムDNAのメチル化レベル依存的にコハク酸量が増加することが示された。従って、TETの触媒反応を利用することによって簡便かつ高感度にゲノムDNAのメチル化レベルを測定できることが示された。

最後に、本研究で開発したメチル化、ヘミメチル化およびヒドロキシメチル化レベル簡易測定法を用いたがんや中枢神経系疾患の診断への展開や修飾シトシン塩基の生体内機能の解明への展望が述べられた。

上記の研究に対する博士学位論文公開審査会での発表および質疑応答は妥当なものであり、筆記試験の結果も合格と判定するに十分な点数であった。以上のことより、審査委員会は、本論文の著者に対して、博士（工学）の学位を授与するに十分な学識と能力を有していることを認めることとした。

審査委員 主査

東京工科大学 教授 横山 憲二