

平成23年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号 3 | 2 | 6 | 9 | 2      2. 研究機関名 東京工科大学
3. 研究種目名 基盤研究(C)      4. 研究期間 平成22年度～平成24年度
5. 課題番号 2 | 2 | 5 | 0 | 1 | 0 | 3 | 7
6. 研究課題名 DNAメチル化のピンポイント検出法の開発

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
0   0   3   6   7   1   9   5	カトウ 加藤      テル 輝	応用生物学部	准教授

8. 研究分担者（所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。）

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

1. アミノオキシ基を持つ化合物により修飾されたシトシンの簡便な定量法の確立  
 本検出法では、アミノオキシ基を持つ化合物により修飾されたシトシンを定量することによりメチル化率の算出が可能となる。そこで、今年度は、修飾されたシトシンを含む標的DNAの簡便な定量法の確立を目指し、定量的PCRの1種であるリアルタイムPCRの利用を検討した。具体的には、はじめにp16遺伝子の部分配列（54mer）を標的DNAとし、メチル化を解析したい特定のシトシンがthree-way junction (TWJ) 構造の分岐点上に位置するように設計したプローブDNAを結合させた。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した後、リアルタイムPCRを行い未修飾の標的DNA量を定量した結果、分岐点上の塩基がシトシンの場合と比較して、メチルシトシンの場合の標的DNAでは未修飾の標的DNAが有意に多く残存していることが確認できた。従って、TWJ構造を形成することで、特定のシトシンを選択的に化学修飾し、DNAのメチル化をピンポイントで検出できる可能性が示された。

2. 2本鎖DNA中のシトシンのメチル化検出法の開発  
 実用的なメチル化検出法を確立するためには、2本鎖DNA中のシトシン周辺にプローブDNAを結合させてTWJを形成させる必要がある。上記1の検討に用いた54merの標的DNAとその相補鎖を混合した2本鎖標的DNAにTWJ形成用のプローブDNAを大過剰（100倍以上）に加え、1と同様の実験を行ったところ、2本鎖標的DNA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。

10. キーワード

- |           |        |               |          |
|-----------|--------|---------------|----------|
| (1) 遺伝子   | (2) がん | (3) エピジェネティクス | (4) メチル化 |
| (5) 遺伝子診断 | (6)    | (7)           | (8)      |

11. 現在までの達成度

下欄には、交付申請書に記載した「研究の目的」の達成度について、以下の区分により自己点検による評価を行い、その理由を簡潔に記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。  
 <区分>①当初の計画以上に進展している。 ②おおむね順調に進展している。 ③やや遅れている。 ④遅れている。

(区分) ②おおむね順調に進展している。

(理由) 標的 DNA 中の特定のシトシンがピンポイントで化学修飾されていることをリアルタイム PCR を用いて簡便に検出できることがわかり、さらに 2 本鎖標的 DNA でも同様の実験に成功し、簡便な DNA メチル化検出法確立の可能性が示されたため。

12. 今後の研究の推進方策

本研究課題の今後の推進方策について簡潔に記述すること。研究計画の変更あるいは研究を遂行する上での問題点があれば、その対応策なども記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

検出感度の向上を目指す。具体的には、血液 0.1mL から得られるゲノム分子数に相当する 1 amol (アトモル) 程度でのメチル化検出を目指し、PCR のサーマルサイクルの条件、プライマー配列などのリアルタイム PCR 条件を検討する。さらに、ヒトゲノムサンプルでのメチル化検出を目指す。

13. 研究発表 (平成 23 年度の研究成果)

※ 「13. 研究発表」欄及び「14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況」欄において記入欄が不足する場合には、適宜記入欄を挿入し、それによりページ数が増加した場合は、左端を糊付けすること。

〔雑誌論文〕 計 (0) 件      うち査読付論文 計 (0) 件

著者名		論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
			┆┆┆		
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)					

著者名		論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
			┆┆┆		
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)					

著者名		論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
			┆┆┆		
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)					

〔学会発表〕計（1）件      うち招待講演 計（0）件

発表者名	発表標題		
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		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第5回バイオ関連化学シンポジウム	2011年9月12日	つくば国際会議場（茨城県）	

〔図書〕 計（0）件

著者名	出版社		
	書名	発行年	総ページ数
		！ ！ ！	

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 計（0）件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕 計（0）件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

--