

令和 7 年 6 月 10 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K04798

研究課題名（和文）等温PCRを用いた修飾塩基測定法の開発と在宅がん診断への展開

研究課題名（英文）Development of CpG methylation level detection method using an isothermal PCR for home cancer diagnostics

研究代表者

吉田 亘 (Yoshida, Wataru)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：10599806

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,600,000 円

研究成果の概要（和文）：グアニン四重鎖(G4)構造の相補鎖で形成されるi-motif構造のメチル化による影響を明らかにし、等温PCR法で標的遺伝子のメチル化レベルを簡便に測定する方法を開発した。円二色性スペクトル測定法で解析した結果、メチル化によりVEGF i-motif構造の熱安定性が上昇することが示された。VEGF G4/i-motif構造形成配列を含む領域を等温PCR法であるRecombinase Polymerase Amplification (RPA)で増幅した結果、メチル化レベル依存的にRPA効率が低下した。つまり、RPA効率を測定するだけでVEGFのメチル化レベルを簡便に測定できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、CpGメチル化がi-motif構造形成に与える影響が明らかになり、標的遺伝子のメチル化レベルを、RPAを行うだけで簡便に測定できることが示された。核酸の高次構造形成は転写や翻訳など種々の生命現象の制御に関連している。今後、CpGメチル化i-motif構造を介した新たな制御機構の解明に貢献すると期待される。また、本研究で開発したメチル化レベル測定法を用いれば、簡便にメチル化レベルを測定することが可能になり、今後簡便ながん診断法への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：This research focused on understanding how CpG methylation influences the VEGF i-motif structure, which is formed by the complementary strands of the G-quadruplex (G4) structure. We also developed an isothermal PCR method for conveniently quantifying target gene methylation levels. Circular dichroism spectroscopy analysis demonstrated that CpG methylation enhances the thermal stability of the VEGF i-motif structure. Moreover, we showed that Recombinase Polymerase Amplification (RPA) efficiencies decreased with increasing CpG methylation on the VEGF G4/i-motif forming region. These results indicate that the methylation status of VEGF can be determined by simply measuring RPA efficiency.

研究分野：タンパク質・核酸工学

キーワード：メチル化 グアニン四重鎖構造 i-motif構造 等温PCR

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、がん診断のためのバイオマーカーは主にタンパク質である。その測定には Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) 法が用いられているが、煩雑な操作が必要であり、これを用いて簡単にがん診断を行うことは不可能である。他方、試薬に検体を加えるだけでバイオマーカーを測定できれば、誰でも簡単にがんの診断が可能になる。そこで、本研究ではがんのバイオマーカーとしてメチル化 DNA に着目した。

(2) DNA のメチル化とはシトシンとグアニンの連続配列 (CpG) 中のシトシンの 5 位がメチル化される反応である (図 1)。ヒトゲノム DNA には 2940 万個の CpG 配列が含まれており、プロモーター中の CpG がメチル化されると、通常その遺伝子の発現は抑制される。正常細胞では組織特異的なメチル化パターンが形成されているが、がん細胞などの異常な細胞ではメチル化状態も異常になっている。つまり、異常なメチル化 DNA はがんのバイオマーカーとなる。また、がん患者の血液中にはがん細胞由来の DNA が含まれてあり、これががんのバイオマーカーとして利用できる。実際に、血中遊離 DNA 中のメチル化 SEPT9 を測定する方法は大腸がん診断法として実用化されている。

(3) 標的遺伝子のメチル化レベルを測定する方法としては、5-メチルシトシンには反応しないが、シトシンをウラシルに変換させるバイサルファイトを用いる方法がある。変換されたウラシルは PCR によってチミンに置換されるため、バイサルファイト処理後のゲノム DNA を鑄型に標的遺伝子領域を PCR で増幅し、得られた産物の配列を解析することで、メチル化レベルを測定することができる。しかし、バイサルファイト処理には 5 時間要するため、これを用いて簡単に標的遺伝子のメチル化レベルを測定することはできない。バイサルファイト法を用いないメチル化レベル測定法としては、抗 5-メチルシトシン抗体や Methyl-CpG-binding domain を利用する方法があるが、これらも煩雑な操作が必要となる。

(4) DNA は通常二重らせん構造を形成するが、グアニン四重鎖 (G-quadruplex: G4) や i-モチーフ (intercalated-motif: i-motif) 構造などの特殊な高次構造も形成する (図 2)。我々は血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) プロモーター中に含まれる G4 構造中の CpG 配列

中のシトシンがメチル化されると、その構造の熱安定性が上昇することを示した (Yoshida et al. BBA General Subjects, 2018, 1862, 1933)。さらに、その領域をポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction: PCR) で増幅させると、メチル化レベル依存的に増幅効率が減少することを明らかにし、定量 PCR を行うだけでメチル化レベルを測定できることを示した

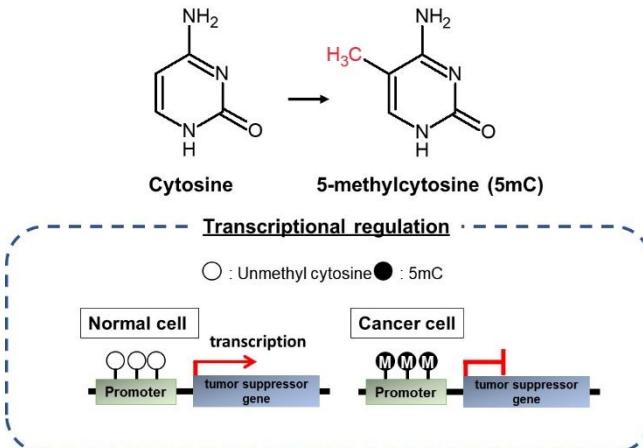


図 1 . CpG メチル化による遺伝子発現制御 CpG 配列中のシトシンの 5 位がメチル化される。プロモーター中の CpG がメチル化されるとその遺伝子の発現が抑制される。がん細胞では、がん抑制遺伝子のプロモーターが高度にメチル化されている。

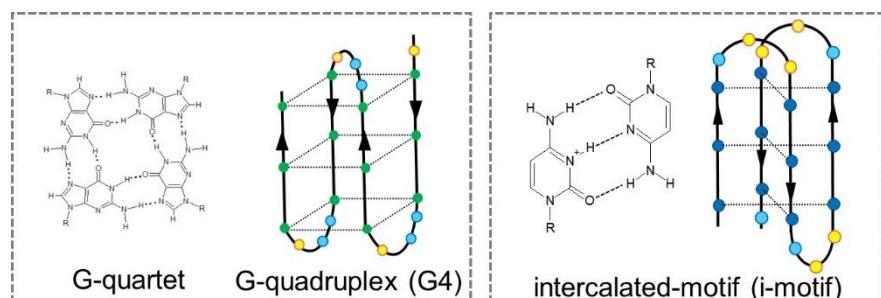


図 2 . グアニン四重鎖 (G-quadruplex: G4) と i-モチーフ (intercalated-motif: i-motif) 構造 G4 構造は 4 つのグアニンで形成される平面構造 (G-quartet) がスタッキング相互作用により、積み重なって形成される構造である。i-motif 構造とはシトシンとプロトン化シトシン (C⁺) 間で形成される塩基対が互い違いに積み重なって形成される構造である。

(Yoshida et al. Anal. Chem., 2016, 88, 7101)。しかし、本手法は定量 PCR 法を用いる方法であるため、精密に反応溶液の温度を制御する機器を用いて、反応溶液を 95 度に加熱し、60 度に冷却し、72 度に加熱する必要があった。また、VEGF G4 構造形成配列の相補鎖で形成される i-motif 構造の CpG メチル化の影響も不明であった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では CpG メチル化が VEGF i-motif 構造の熱安定性に与える影響を解析すること、等温で PCR が行える Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法で標的遺伝子の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(図 3)。RPA 法は、プライマーと複合体を形成するリコンビナーゼと一本鎖 DNA 結合タンパク質を用いて、標的遺伝子を DNA ポリメラーゼにより等温(39)かつ 30 分程度で増幅させる方法である。つまり、RPA による標的遺伝子の増幅効率がメチル化によって減少すれば、精密に反応溶液の温度を制御する機器を用いずに、簡便に標的遺伝子のメチル化レベルを測定できると想定した。

3. 研究の方法

(1) VEGF i-motif 形成オリゴヌクレオチド(5'-CCC CGC CCC CGG CCC GCC CCG-3')には 4箇所の CpG 配列が含まれている。そこで、C4, C10, C15, C20 の 4 節所のシトシンをすべてメチル化した VEGF i-motif 形成オリゴヌクレオチドと非メチル化 VEGF i-motif 形成オリゴヌクレオチドを合成した。終濃度 20 μM のオリゴヌクレオチドに pH を 4.7, 5.0, 5.3, 5.6, 5.9, 6.2, 6.5, or 7.0 に調整した終濃度 25 mM Sodium cacodylate buffer 中で、95°C で 3 分間加熱後、95°C から 25°C まで 30 分間かけて冷却した。全量を 120 μL とし、25°C から 95°C まで 1°C ずつ温度を上昇させながら 220 nm~320 nm の円二色性(circular dichroism: CD)スペクトルを測定し、融解温度(T_m 値)を算出した。

(2) C4, C10, C15, C20 を 1 節所ずつメチル化した VEGF i-motif 形成オリゴヌクレオチドを合成した。終濃度 20 μM のオリゴヌクレオチドに pH を 5.0 に調整した終濃度 25 mM Sodium cacodylate buffer 中で、95°C で 3 分間加熱後、95°C から 25°C まで 30 分間かけて冷却した。全量を 120 μL とし、25°C から 95°C まで 1°C ずつ温度を上昇させながら 220 nm~320 nm の円二色性(circular dichroism: CD)スペクトルを測定し、 T_m 値を算出した。

(3) ヒトゲノム DNA を鋳型に、VEGF G4 と i-motif 構造形成領域を PCR で増幅した。この PCR 産物を、CpG メチル化酵素でメチル化した。次に、RPA によって VEGF G4 と i-motif 構造形成領域のメチル化レベルを測定する際の最適な Na⁺濃度条件の検討を行った。1.0×10⁷ コピーの VEGF PCR 産物を鋳型に用いて RPA 反応溶液を調製し、そこに Na⁺が終濃度 106, 111, 116, 121 及び 126 mM となるように NaCl を加え、RPA を行った。RPA 増幅効率はリアルタイム PCR 装置を用いて SYBR Green の蛍光強度を指標に測定した。

(4) RPA を用いて VEGF G4 と i-motif 構造形成領域の PCR 産物のメチル化レベルを測定できるか検討した。メチル化した VEGF PCR 産物と非メチル化 VEGF PCR 産物を混合し、メチル化レベル 0, 25, 50, 75 及び 100% の VEGF PCR 産物を調製した。これらの各メチル化レベルの VEGF PCR 産物を鋳型に 121 mM Na⁺存在下で RPA を行った。

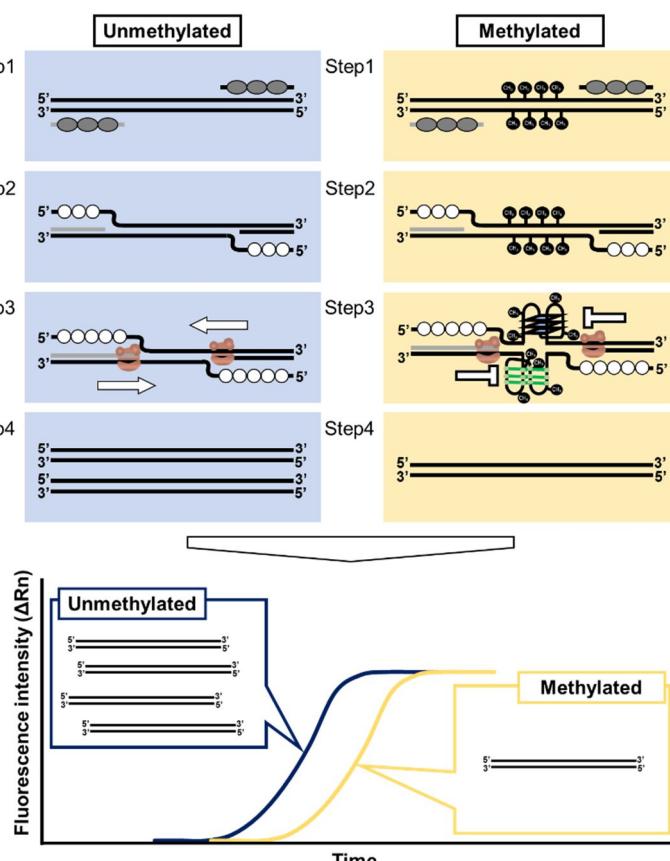


図 3 .RPA 法を用いた標的遺伝子のメチル化レベル測定法
(Goto M. et al., Quantitative detection of CpG methylation level on G-quadruplex and i-motif-forming DNA by recombinase polymerase amplification, Anal. Bioanal. Chem. (2022) 414, 6223, Springer Nature)

(5) ゲノム DNA の VEGF G4 と i-motif 構造形成領域を、RPA で増幅するためのプライマー濃度を最適化するために、終濃度 80, 120 及び 140 nM プライマーを用いて RPA を行った。

(6)(5)で最適化した条件で、ゲノム DNA 中の VEGF G4 と i-motif 構造形成領域のメチル化レベルを RPA によって測定できるか検討した。メチル化したゲノム DNA とメチル化していないゲノム DNA を混合し、高メチル化状態、低メチル化状態及びその中間のメチル化状態のゲノム DNA を調製した。これらのゲノム DNA を鋳型に、RPA を行った。

4 . 研究成果

(1) C4, C10, C15, C20 の 4 箇所のシトシンをすべてメチル化した VEGF i-motif 形成オリゴヌクレオチドと非メチル化 VEGF i-motif 形成オリゴヌクレオチドは pH 5.9 以下の条件で、i-motif 構造特有の 290 nm 付近のポジティブピークを示したことから、これらは i-motif 構造を形成していることが示された。また、25°C から 95°C における 290 nm の CD 値から融解曲線を作成し、 T_m 値を算出した結果、4 箇所のシトシンをすべてメチル化すると VEGF i-motif 構造の T_m 値は約 5 上昇することが示された。以上の結果より、VEGF i-motif 構造は CpG メチル化により熱安定性が上昇することが示された。

(2) 次に C4, C10, C15, C20 を 1 箇所ずつメチル化した VEGF i-motif 形成オリゴヌクレオチドの熱安定性を CD スペクトル測定法により解析した。その結果、C10 のメチル化は VEGF i-motif 構造の安定化には寄与せず、C4, C15, C20 がメチル化されることで、VEGF i-motif 構造の熱安定性が上昇することが示された。VEGF -motif 構造では C4, C15, C20 は C-C+塩基対形成に関与しているが、C10 は C-C+塩基対形成に関与していない。シトシンの 5 位のメチル化により C-C+塩基対の安定性が上昇することが報告されていることから、C4, C15, C20 がメチル化されることにより C-C+塩基対の安定性が上昇し、VEGF i-motif 構造の熱安定性が上昇することが示唆された。

(3) Na^+ 濃度を検討した結果、 Na^+ 濃度が 121 mM の場合、メチル化と非メチル化 VEGF PCR 産物の増幅効率の差が最も大きくなかった。つまり、本手法を用いて VEGF のメチル化レベルを測定するための最適な Na^+ 濃度は 121 mM であることが示された。

(4) VEGF PCR 産物を鋳型にした RPA の結果、Threshold time は、メチル化レベル依存的に增加了。このことから、VEGF G4 と i-motif 構造形成領域のメチル化レベルを RPA によって測定できることが示唆された。

(5) ゲノム DNA を鋳型とした場合、PCR 産物上の VEGF G4 と i-motif 構造形成領域を測定する際に用いた 80 nM のプライマー濃度条件では、同領域は増幅されなかった。一方、140 nM のプライマーを用いた場合、VEGF G4 と i-motif 構造形成領域の増幅が確認されたため、140 nM が最適なプライマー濃度条件であることが示された。

(6) 3 つのメチル化状態の異なるゲノム DNA を鋳型として RPA を行った結果、VEGF のメチル化レベルが高くなるに従い、RPA の増幅効率は低下することが示された。以上の結果より、RPA の増幅効率を指標に VEGF G4 と i-motif 構造形成領域のメチル化レベルを測定できることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] 計3件 (うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件)

1. 著者名 Goto Masanori、Baba Yuji、Yoshida Wataru	4. 卷 414
2. 論文標題 Quantitative detection of CpG methylation level on G-quadruplex and i-motif-forming DNA by recombinase polymerase amplification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6223 ~ 6231
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-022-04192-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Kosuke、Oshikawa Daiki、Ikebukuro Kazunori、Yoshida Wataru	4. 卷 594
2. 論文標題 Stabilization of VEGF i-motif structure by CpG methylation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 88 ~ 92
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moriya Momo、Oyama Taiji、Goto Masanori、Ikebukuro Kazunori、Yoshida Wataru	4. 卷 6
2. 論文標題 Protocol for circular dichroism spectral?analysis?of?the?thermal stability of?CpG-methylated?quadruplex structures	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 103646 ~ 103646
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2025.103646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 後藤 雅典、館 旺成、吉田 亘
2. 発表標題 c-MYBとHER2グアニン四重鎖構造形成におけるN6メチルアデニン修飾の影響
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1 . 発表者名 守屋 桃、吉田 亘
2 . 発表標題 N6-メチルアデニン修飾がヒトテロメア <i>i-motif</i> 構造に与える影響
3 . 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 池田 優乃、田中 祐圭、吉田 亘
2 . 発表標題 メチルCpG結合ドメイン融合蛍光タンパク質を用いたゲノムDNAメチル化レベル測定法
3 . 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 黒田 直希、荒川 貴博、須磨岡 淳、吉田 亘
2 . 発表標題 メチルCpG結合ドメイン融合ルシフェラーゼを用いた標的DNAメチル化レベル測定法の開発
3 . 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Wataru Yoshida
2 . 発表標題 Detection of CpG methylation level using fluorescent modified methylated probe DNA with methyl-CpG binding domain fused luciferase
3 . 学会等名 Nanotechnology and Smart Materials Conference 2024 (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-
6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関