

平成22年度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	カケ 加藤 ヒル 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。

今年度は、モデル実験としてシトシンまたはメチルシトシンを1箇所含む20塩基の標的DNAを用い、Taq DNA polymerase (Taq pol) による相補鎖の伸長反応の阻害を指標としたメチル化DNAの識別を試みた。シトシンまたはメチルシトシンを1箇所含む2種類の標的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後に、標的DNAに相補的なDNAプライマーを加え、Taq polによるプライマーの伸長反応を行った。その後、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、プライマーの伸長を確認した。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されたシトシンに対合する位置でTaq polによるプライマーの伸長が阻害されることが確認された。一方、メチルシトシンを含む標的DNAでは、伸長の阻害は全く確認されなかった。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した標的DNAにおける、Taq polによるプライマー伸長反応の有無を指標とすることで、メチル基の有無が識別可能であることが示された。

続いて、TWJ構造を形成するプローブDNAを用い、標的DNA中のシトシンのメチル化のピンポイントな検出を試みた。具体的には、両末端にプライマー配列を持ち、中央にシトシン (X=C) またはメチルシトシン (X=M) を含む56塩基の標的DNAを用い、分岐点上にシトシンまたはメチルシトシンが位置するように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を鋳型としてプライマー伸長反応を行った。その結果、分岐点がシトシンの場合のみ、分岐点付近での伸長反応の阻害を確認することができた。また、メチルシトシンでは分岐点を含め、伸長反応の阻害は確認されなかった。すなわち、TWJ構造を形成するプローブDNAを用い、特定のシトシンを選択的に化学修飾することでDNAのメチル化をピンポイントで検出することに成功した。

10. キーワード

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

11. 研究発表（平成22年度の研究成果）

〔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

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

〔学会発表〕 計（2）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33回日本分子生物学会年会	2010年12月9日	神戸ポートアイランド(兵庫)	

発表者名	発表標題		
高梨健太, 加藤輝	非二本鎖構造を形成する形成するDNAプローブを用いたメチル化DNA検出法の開発		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第91回日本化学会年会	2011年3月26日	神奈川大学(神奈川)	

〔図書〕 計（0）件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

12. 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

13. 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。

--