

# 学位論文概要

2022年3月18日

学位申請者

( 高 夏海 ) 印

学位論文題目

ゲノムDNA中の修飾シトシン塩基簡易測定法の開発

## 学位論文の要旨

DNAメチル化は、ゲノムDNAにおけるCpG配列のシトシンの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全体のメチル化レベルが低下している。そのため、ゲノムDNAのメチル化レベルは、がんのバイオマーカーとしての利用が期待されている。他の修飾シトシン塩基についても同様の利用が期待されている。片鎖のみメチル化されたDNAであるヘミメチル化DNAはWilm's腫瘍や卵巣上皮性腫瘍のタンデム反復配列で多く存在している。メチルシトシン酸化酵素TET (Ten-eleven translocation)により、メチルシトシンが酸化されて生じる5-hydroxymethylcytosine (5hmC)は、がん細胞や中枢神経系疾患で5hmCレベルが低下していることが報告されている。以上より、がんなどの疾病の診断のためにはメチル化DNAだけでなく、ヘミメチル化DNAやヒドロキシメチル化DNAもバイオマーカーになると考えられる。そこで本研究は、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できる方法を開発することを目的とした。

ヘミメチル化レベルを測定するために、ヘミメチル化CpG結合蛋白質であるUHRF1 (Ubiquitin like with PHD and Ring finger domains 1)のSRA (SET and RING associated) domainにFirefly luciferase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を結合させた標的DNAにUHRF1 SRA-Flucを反応させた。UHRF1 SRA-Flucはヘミメチル化CpGに結合し、結合部位におけるDNAインターカレーターはLuciferaseの発光によって励起されて蛍光を発するため(Bioluminescence Resonance Energy Transfer; BRET)、その蛍光強度(BRETシグナル)を測定した。各種ヘミメチル化レベルのDNAにUHRF1 SRA-Flucを反応させ、BRETシグナルを測定した結果、その蛍光強度はヘミメチル化レベル依存的に増加した。

次にUHRF1 SRA-Flucを用いたヘミメチル化レベル測定法と同様に、ヒドロキシメチル化CpG結合蛋白質であるUHRF2 SRAにFirefly luciferaseを融合させた蛋白質(UHRF2 SRA-Fluc)を用いれば、BRETを利用してヒドロキシメチル化レベルを測定できると想定した。UHRF2 SRAはヒドロキシメチル化DNAだけでなく、メチル化DNA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MBD (Methyl-CpG-binding domain)をメチル化CpGサイトに結合させておけば、UHRF2 SRA-Flucはヒドロキシメチル化CpGに特異的に結合し、ヒドロキシメチル化レベルを測定できると考えた。HeLa細胞から抽出したゲノムDNAをTET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を用いて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ヘミメチル化レベルと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。

ゲノムDNAのメチル化レベルを簡便かつ高感度に測定するためにTETの触媒反応を利用した。TETがメチルシトシンを酸化する過程で、 $\alpha$ -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、この反応過程で生じた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 100 ng 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した。従って、TET の酸化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。

本研究で開発した測定法はいずれも Bisulfite 処理などの化学処理を必要としない、試薬を混合するのみで測定可能な方法である。BRET を利用したヘミメチル化レベル測定法とヒドロキシメチル化レベル測定法は修飾塩基に結合する蛋白質に Luciferase を融合させた蛋白質を用いる方法であり、結合蛋白質を変えることで種々の修飾塩基を同一のプラットフォームで測定できる。さらに、TET を用いた高感度なメチル化レベル測定法より、他の修飾塩基に反応する酵素を用いれば、高感度にその修飾塩基を測定できると考えられる。以上より、修飾塩基に結合する蛋白質に Luciferase を融合させた蛋白質を用いれば複数の修飾塩基の同時に、修飾塩基に反応する酵素を用いれば標的修飾塩基を高感度に測定でき、これらの方法により正確な疾病の診断が可能になると期待される。

# 学位論文要旨

2022年3月18日

学位申請者  
( 高 夏海 ) 印

学位論文題目

ゲノムDNA中の修飾シトシン塩基簡易測定法の開発

## 学位論文の要旨

DNAメチル化とは、ゲノムDNAにおけるCpG配列のシトシンの5位炭素がメチル化される反応である。通常、ヒトゲノムDNAのCpGは約70–80%がメチル化されているが、がん細胞ではゲノムDNA全体のメチル化レベルは低下している。DNA複製の際に一時的に生じる片鎖メチル化DNAであるヘミメチル化DNAは正常細胞と比べて、がん細胞で多く存在している。5hmC (5-hydroxymethylcytosine) は、メチルシトシン酸化酵素TET (Ten-eleven translocation)によって5mC (5-methylcytosine)が酸化されて生じる修飾塩基である。ゲノムDNA全体の5hmC量は、がん細胞や中枢神経系疾患細胞で正常細胞と比較して減少している。以上より、ゲノムDNA中のメチル化やヘミメチル化、ヒドロキシメチル化レベルはがんなどの疾病のバイオマーカーとしての利用が期待される。そこで本研究では簡便なメチル化、ヘミメチル化、ヒドロキシメチル化レベル測定法を開発することを目的とした。

第1章では、ヒト生体内におけるシトシン修飾やがんなどの疾病における異常なシトシン修飾に関する知見について述べた。さらに、既存のメチル化、ヘミメチル化、ヒドロキシメチル化レベル測定法についてまとめ、本研究の意義を明らかにした。正常細胞と比較して、がん細胞ではゲノムDNA全体のメチル化レベルが低下しており、がんの進行度に依存してメチル化レベルは低下する。また、アルツハイマー病やパーキンソン病患者のゲノムDNAにおいてもメチル化レベルは低下している。さらに、ヘミメチル化レベルは卵巣がんやWilm's腫瘍で高く、ヒドロキシメチル化レベルはがん細胞と中枢神経系疾患とともに低下している。そのため、これらのシトシン修飾レベルを測定することは、がんや中枢神経系疾患を診断する上で重要である。これまで開発されたDNAメチル化レベル測定法としては、Bisulfite法やHPLC (High Performance Liquid Chromatography)法、LC-MS/MS (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry)法、ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)法などが挙げられる。しかしBisulfite法やHPLC法、LC-MS/MS法は、煩雑な化学処理や酵素処理が必要で、且つ測定に5時間以上の時間を要する。ヘミメチル化レベル測定法としては、Hairpin-bisulfite PCR法が開発されている。しかし、この方法もBisulfite処理を必要とするため、測定を終えるまでに5時間以上の測定時間を要する。ヒドロキシメチル化レベル測定法として5hmCのグリコシル化反応を利用する方法が開発されている。しかし、この5hmCのグリコシル化の後に、TET処理やBisulfite処理、シーケンス解析を実施するため、実験ステップが複数回に及び、測定時間も4時間以上要する。以上のことから、煩雑な操作や大幅な測定時間を必要としない簡便・迅速な修飾シトシンレベル測定法の開発が望まれている。

第2章ではヘミメチル化レベル簡易測定を開発することを目的とした。ヘミメチル化CpG結合蛋白質であるUHRF1 (Ubiquitin like with PHD and Ring finger domains 1)のSET- and RING-associated (SRA) domainにFirefly luciferaseを融合させた蛋白質(UHRF1 SRA-Fluc)を用いれば、BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)を利用してヘミメチル化レベルを測定できると想定した。想定した原理を以下に示す。UHRF1 SRA-FlucはゲノムDNAのヘミメチル化CpG部位に結合する。そこに発光基質を加えるとLuciferaseが発光し、近傍のDNAインターカレーターを励起する。つまり、このDNAインターカレーターの蛍光強度(BRETシグナル)を測定すれば、ヘミメチル化レベ

ルを測定できると考えた。本章ではまず、大腸菌を用いてUHRF1 SRA-Flucを組換え生産した。このUHRF1 SRA-Flucをヘミメチル化レベル0, 20, 50, 100%のDNAに添加し、BRETシグナルを測定した。その結果、示されたBRETシグナルはヘミメチル化レベル依存的に増加した( $R^2 = 0.99$ )。従って、標的DNAにUHRF1 SRA-FlucとDNAインターカレーターを混合して、BRETシグナルを測定することで、試薬を混合するだけで簡便にヘミメチル化レベルを測定できることが示された。

第3章ではヒドロキシメチル化レベル簡易測定法を開発することを目的とした。第2章で開発したUHRF1 SRA-Flucを用いたヘミメチル化レベル測定法と同様に、ヒドロキシメチル化CpG結合蛋白質であるUHRF2 SRAにFirefly luciferaseを融合させた蛋白質(UHRF2 SRA-Fluc)を用いれば、BRETを利用してヒドロキシメチル化レベルを測定できると想定した。UHRF2 SRAはヒドロキシメチル化DNAだけでなく、メチル化DNA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MBD (Methyl-CpG-binding domain)をメチル化CpGサイトに結合させておけば、UHRF2 SRA-Flucでヒドロキシメチル化レベルを測定できると考えた。UHRF2 SRA-Flucを組換え生産し、その結合能を解析した結果、UHRF2 SRA-Flucはヒドロキシメチル化CpGとメチル化CpGの両方に結合することが示された。そのため、標的DNAとUHRF2 SRA-Flucを反応させる前に、MBDを添加して予めメチル化CpGをブロックし、ゲノムDNA中のヒドロキシメチル化レベルが測定できるか検討した。ゲノムDNAをTETで処理することにより、ヒドロキシメチル化レベルの高いゲノムDNAを調製した。TET処理ゲノムDNAに対し、MBD存在下でUHRF2 SRA-Flucを用いて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。従って、UHRF2 SRA-FlucとMBDを用いることで、試薬を混合するだけで簡便にヒドロキシメチル化レベルを測定法できることが示された。

第4章ではメチルシトシン酸化酵素であるTETを用いた簡易かつ高感度なゲノムDNAのメチル化レベル測定法を開発することを目的とした。TETは5mCを5hmCに酸化し、この反応過程で $\alpha$ -ケトグルタル酸はコハク酸に変換される。つまり、TETの5mC酸化反応によって生じるコハク酸量は、ゲノムDNA全体のメチル化レベルに相関すると想定した。大腸菌を用いて組換え生産したTETを、ゲノムDNAに反応させ、生じたコハク酸量を定量した。その結果、ゲノムDNAのメチル化レベル依存的にコハク酸量は増加した。本手法は100 ngのゲノムDNAを対象にメチル化レベルを解析することが可能であり、これは洗浄操作が不要な検出法の中では最も高感度な方法である。以上の結果より、TETの5mC酸化反応で生じたコハク酸量を定量することにより、ゲノムDNAのメチル化レベルを簡易かつ高感度に測定できることが示された。

第5章では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の特徴をまとめ、その展望について述べた。本研究で開発した測定法はいずれもBisulfite処理などの化学処理を必要としない、試薬を混合するのみで測定可能な方法である。BRETを利用したヘミメチル化レベル測定法とヒドロキシメチル化レベル測定法の相対標準偏差0.2–3.3%であり、従来法と同等の正確性で修飾シトシン塩基を測定できることを示した。これら手法は修飾塩基に結合する蛋白質にLuciferaseを融合させた蛋白質を用いる方法であり、結合蛋白質を変えることにより、その修飾塩基を同一のプラットフォームで測定できる。つまり、今後Luciferaseを融合させた修飾塩基結合蛋白質を構築すれば、種々の修飾塩基を同時に測定することができると考えられる。さらに、本研究ではメチルシトシンを酸化する酵素TETを用いた高感度なメチル化レベル測定法を開発した。つまり、他の修飾塩基に反応する酵素を用いれば、高感度にその修飾塩基を測定できると考えられる。以上より、修飾塩基に結合する蛋白質にLuciferaseを融合させた蛋白質を用いれば複数の修飾塩基の同時に、修飾塩基に反応する酵素を用いれば標的修飾塩基を高感度に測定でき、これらの方法により正確な疾病の診断が可能になると期待される。

# S u m m a r y

Applicant for degree: March 18th, 2022

Natsumi Taka

Title of thesis :

## Measurement systems of cytosine modification levels in genomic DNA

In vertebrate, DNA methylation is occurred at C5 position of cytosine (5-methylcytosine; 5mC) on CpG. In cancer cells, global hypomethylation is observed; thus, the methylation level can be utilized as a biomarker for the cancer diagnosis. Moreover, the hemi-methylated CpG, only one strand methylated CpG, exists in larger amounts in *NBL2* (a tandem repeat in acrocentric chromosomes) and *Sat2* (satellite 2 in a juxtacentromeric heterochromatin) of ovarian carcinomas and Wilms' tumors compared with normal cells. The 5hmC (5-hydroxymethylcytosine) is generated by the oxidation of 5mC by TET (Ten eleven translocation) family of dioxygenase. Several studies have reported that global hydroxymethylation levels decreases in cancer and central nervous system disorder. Hence, not only global methylation but also global hemi-methylation and hydroxymethylation may conductive as a biomarker for the detection of the cancers and central nervous system disorder. Accordingly, the aim of this study is to develop the quantification system of cytosine modification levels in genomic DNA.

Hemi-methylation level sensing system was developed based on BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) using SRA (SET and RING associated) domain of UHRF1 (Ubiquitin like with PHD and Ring finger domains 1) fused firefly luciferase (UHRF1 SRA-Fluc). UHRF1 SRA-Fluc binds hemi-methylated CpG, then DNA intercalating dye is excited by the luminescence of luciferase (BRET signal). The BRET signal depends on the hemi-methylated CpG on target DNA. Consequently, the BRET signal increased in accordance with the hemi-methylation levels.

Similarly, sensing system of hydroxymethylation level was developed based on BRET. To measure the hydroxymethylation level, SRA domain of UHRF2 was utilized and fused firefly luciferase (UHRF2 SRA-Fluc). UHRF2 SRA-Fluc recognizes hydroxymethylated as well as methylated CpG. To block the methylated CpG on genomic DNA, the addition of MBD (Methyl-CpG binding domain) was applied to BRET assay using UHRF2 SRA-Fluc. The result showed that hydroxymethylation level on genomic DNA can be measured using UHRF2 SRA-Fluc and MBD.

Finally, TET was utilized to develop global methylation level sensing system. TET produces succinate via the 5mC oxidation, suggesting that global DNA methylation would be determined by measuring the produced succinate. In particular, global DNA methylation level was quantified by measuring the amount of succinate produced by TET-catalyzed 5mC oxidation.

In conclusion, this study demonstrated that global DNA methylation, hemi-methylation, and hydroxymethylation can be more readily measured compared to conventional methods for the detection of cytosine modification levels. These sensing systems would be utilized for the simple diagnosis to assess the risk of cancer and central nervous system disorder.