科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 9 年 6 月 1 3 日現在

機関番号: 32692
研究種目: 若手研究(B)
研究期間: 2015 ~ 2016
課題番号: 15K18278
研究課題名(和文)DNAメチル化反応を触媒するリボザイムの同定と領域特異的メチル化方法の開発
研究課題名(英文)Identification of ribozyme catalyzes DNA methylation to develop gene specific DNA methylation system
研究代表者
吉田 亘(YOSHIDA, Wataru)
東京工科大学・応用生物学部・助教
研究者番号:10599806
交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究ではDNAメチル化反応を触媒するリボザイムをランダムRNAライブラリーから同 定することを目的に、in vitro selection法を実施した。4ラウンドのスクリーニングの結果、ラウンドを重ね るごとにメチル化反応を触媒するRNA溶出量が増加した。つまり、この濃縮されたライブラリー中に目的のDNAメ チル化反応を触媒するRNAが含まれることが示唆された。また、VEGFプロモーター中に含まれるDNA四重鎖構造が メチル化されるとその構造が安定化することを発見した。この特性を利用し、定量PCRを行うだけで標的遺伝子 のメチル化レベルを測定できる方法の開発に成功した。

研究成果の概要(英文): The research project aimed to identify ribozyme that catalyzes DNA methylation and develop gene specific DNA methylation system in vivo. To identify the ribozyme, in vitro selection has been performed using RNA random library that contains S-adenosylmethionine (SAM) binding RNA motif, because SAM is natural substrate of DNA methyltransferase. After 4th round selection, the RNA library was enriched, indicating that the ribozyme would be contained in the enriched RNA library. Moreover, we revealed that quadruplex structures in VEGF promoter were stabilized by DNA methylation. Using the property, q-PCR-based DNA methylation level detection system that requires neither sodium bisulfite treatment nor methylated DNA ligands was developed.

研究分野:核酸工学

キーワード: リボザイム DNAメチル化 In vitro selection DNA四重鎖

1.研究開始当初の背景

日本人の死因の第一はがんである。現在の がん診断方法は画像診断やマーカー蛋白質 を測定する方法であり、治療方法は外科治療、 抗がん剤治療、放射線治療などの癌細胞を死 滅・除去する方法である。しかし、これらの 方法ですべてのがん患者を早期診断し治療 できるのではなく、我が国では年間 30 万人 が癌で亡くなっている。そのため、これまで とは全く異なる新たながん簡易診断方法と がん治療方法の開発が望まれている。そこで、 本研究ではゲノムの DNA メチル化に着目した。

DNAメチル化とはゲノム中のCG配列中のシ トシンがメチル化される反応であり、生体内 では DNA メチル化酵素によって触媒される。 受精卵から特定の細胞に分化していく過程 で、細胞特異的な DNA メチル化パターンが形 成される。皮膚細胞から作製した iPS 細胞の DNA メチル化パターンは皮膚細胞とは異なる が、ES 細胞と類似していることが報告されて いる。つまり、ゲノム DNA のメチル化パター ンはその細胞の特性を反映している。通常分 化した細胞のメチル化パターンは複製する 際に娘細胞にも維持される。一方、がん細胞 などの異常な細胞ではそのメチル化パター ンが異常になっている。つまり、この異常な メチル化を正常に巻き戻すことができれば、 がん細胞を正常細胞に巻き戻すことができ るのではないかと考えた。さらに、この異常 な DNA メチル化はがんのバイオマーカーとな るため、これを簡便に測定できれば簡便なが ん診断が可能になると考えた。

2.研究の目的

本研究は DNA メチル化反応を触媒する機 能性 RNA であるリボザイムを同定し、それを 用いてヒトゲノム中の標的領域を特異的に メチル化する RNA を作製すること、 がん関 連遺伝子の異常メチル化を簡便に測定する 方法を開発することを目的とした。

リボザイムとは特定の化学反応を触媒す る RNA であり、ランダム RNA ライブラリーか ら同定可能である。つまり、DNA メチル化反 応を触媒するリボザイムを同定し、そのリボ ザイムに標的ゲノム領域に結合する RNA を連 結させれば、領域特異的にメチル化できる RNA を作製できると考えた。

がん関連遺伝子の異常メチル化を簡便に 測定する方法を開発するために、DNA の特殊 構造であるグアニン四重鎖(G4)構造と intercalated motif (i-motif)構造に着目し た。G4構造とは4つのグアニンが水素結合を 介して形成される平面構造がスタッキング 相互作用によって重なり合ってできる四重 鎖構造である。i-motif 構造とG4構造形成配 列の相補的塩基配列で形成される構造であ り、シトシンとシトシンで形成される塩基対 が互い違いに重なることでできる四重鎖構 造である。いくつかのG4構造やi-motif構 造はメチル化されるとその構造が安定化す ることが報告されている。つまり、メチル化 によって構造が安定化するDNA 四重鎖構造を 含む領域をPCRで増幅すると、メチル化され ている場合はDNA 四重鎖構造が安定化するた めDNA ポリメラーゼによる伸長反応が阻害さ れると考えた。つまり、PCR 増幅効率を測定 するだけでメチル化レベルを測定すること ができると考えた(図1)。



図1. 定量 PCR を用いた DNA 四重鎖中のメチ ル化レベル測定法

3.研究の方法

(1)DNA メチル化反応を触媒するリボザイ ムの同定

これまでに DNA メチル化酵素の基質となる S-アデノシルメチオニン (SAM) に結合する RNA が報告されていることから、この RNA の SAM 結合領域を保存し、他の領域をランダム 化したライブラリーを用いれば、メチル化反 応を触媒するリボザイムを同定できるので はないかと考えた。メチル化反応を触媒する リボザイムのスクリーニング方法を図2に 示す。



図2.メチル化反応を触媒するリボザイムの スクリーニング方法

RNA ライブラリーは、ランダム配列を含む 二本鎖 DNA を鋳型にし、in vitro transcription法により調製した。次に、5' にリン酸を、3'端にビオチンを修飾した CG 配列を含むステムループ DNA を合成し、この

ステム DNA と RNA ライブラリーを T4 DNA ligase を用いてライゲーションさせた (25 度 16 時間)。DNA-RNA ライブラリーをストレ プトアビジン固定化ビーズ (Dynabeads My one streptavidin C1)に固定化し、SAM を添 加後、37度で16時間インキュベートした。 メチル化反応を触媒する RNA はライゲーショ ンされたステム DNA 部位をメチル化すると考 えられる。そこで、メチル化された場合のみ ステムループ部位を切断する制限酵素 MspJI を、ビーズに固定化した DNA-RNA ライブラリ ーに加え、メチル化反応を触媒した RNA ライ ブラリーのみ回収した。回収した RNA ライブ ラリーを鋳型に、Thermo ScriptTM RT-PCR Systemsを用いて逆転写反応を55度で1時間 行い、cDNA を合成した。合成した cDNA を PCR により増幅した。この PCR 産物を鋳型にして RNA ライブラリーを合成し、これを次のラウ ンドに用い、合計4ラウンドのスクリーニ グを実施した。また、各ラウンドで溶出した RNA ライブラリー量は RT-qPCR 法により定量 した。

(2)がん関連遺伝子の異常メチル化を簡便 に測定する方法を開発

血管内皮細胞増殖因子である VEGFA とがん 原遺伝子である RET遺伝子プロモーター中に は DNA 四重鎖形成配列が含まれることが報告 されている。そこで、これらの領域を PCR に よって増幅した。PCR 産物を CpG メチル化酵 素 M.Sssl によってメチル化し、メチル化 PCR 産物と非メチル化 PCR 産物を混合することに よって、メチル化レベルが 0, 20, 40, 60, 80, 100%となるように PCR 産物を調製した。これ を鋳型とし、定量 PCR キット(SYBR Premix Ex Taql I, Takara)を用いて定量 PCR を行った。 定量 PCR には 7900HT fast real-time PCR system (ABI)を用いた。尚、コントロール領 域として DNA 四重鎖形成配列中に CpG 配列を 含まない *c-MYC* 領域を用いた。

次に定量 PCR 条件の最適化を行った。定量 PCR 溶液(25 mM TAPS (pH 9.3), 0.1 mM DTT, 2 mM MgCl2, 0.5 U Ex Taq HS (Takara), 0.5 µ M primer, 1 mM dNTPs, 20000-fold diluted SYBR Green I (Lonza))に 1M Betaine, 5% DMSO 又は 0.1% TritonX-100 を添加し、メチル化 した PCR 産物を鋳型に定量 PCR を行った。

最後にヒトゲノム DNA 中の VEGFA 遺伝子の メチル化レベルを測定できるか検討した。 HeLa 細胞からヒトゲノム DNA を抽出し、DNA メチル化酵素 M.SssIを用いてヒトゲノム DNA 全体をメチル化した。HeLa ゲノム DNA とメチ ル化した HeLa ゲノム DNA の VEGFA 遺伝子の メチル化レベルをバイサルファイト法によ り解析し、HeLa ゲノム DNA では VEGFA 遺伝子 は低メチル化状態であり、メチル化した HeLa ゲノム DNA では VEGFA 遺伝子は高メチル化状 態であることを確認した。そこで、これらの ゲノム DNA を鋳型にし、VEGFA, c-MYCの DNA 四重鎖形成領域を対象に定量 PCR を行い、そ の増幅効率とメチル化レベルに相関がある か解析した。

4.研究成果

(1)DNA メチル化反応を触媒するリボザイ ムの同定

合成した RNA ライブラリーとステムループ DNA をライゲーションした結果、約 50%の RNA ライブラリーがステムループ DNA にライゲー ションされた。そこで、この DNA-RNA ライブ ラリーに SAM を加え、自己メチル化反応を触 媒した DNA-RNA ライブラリーのみ、メチル化 感受性制限酵素によって切断し、その RNA ラ イブラリーを回収した。回収した RNA ライブ ラリーから RT-PCR により DNA ライブラリー を合成し、さらに RNA ライブラリーを合成し た。このサイクルを4ラウンド実施し、溶出 した RNA 量を RT-qPCR 法により定量した(図 2)。1 ラウンド目における溶出した RNA ライ ブラリーの割合は 0.95×104 %であったのに 対し、溶出量はラウンドを重ねるごとに増加 し、4 ラウンド目では 0.1%まで増加した(図 3)。つまり、メチル化反応を触媒する RNA が濃縮され、このライブラリーの配列を解析 すれば、メチル化反応を触媒するリボザイム が同定できることが示唆された。



図3. 各ラウンドにおける溶出した RNA ライ ブラリー量

(2)がん関連遺伝子の異常メチル化を簡便 に測定する方法を開発

メチル化した PCR 産物を鋳型に定量 PCR を 行い、その増幅効率を測定した結果、DNA 四 重鎖構造に CpG 配列を含む VEGFAと RET の PCR 産物を鋳型にした場合はメチル化レベル依 存的に PCR 増幅効率が減少することが示され た。一方、DNA 四重鎖構造に CpG 配列を含ま ない c-MYC の PCR 産物を鋳型にした場合はメ チル化レベルと PCR 増幅効率に相関はなかっ た。つまり、VEGFA と RET の DNA 四重鎖構造 はメチル化されるとその構造が安定化し、そ れを鋳型とした場合 PCR による増幅効率が減 少することが示された。 次に定量 PCR 溶液の組成の検討を行った。 定量 PCR 溶液 (25 mM TAPS (pH 9.3), 0.1 mM DTT, 2 mM MgCl2, 0.5 U Ex Taq HS (Takara), 0.5 µ M primer, 1 mM dNTPs, 20000-fold diluted SYBR Green I (Lonza))に 1M Betaine, 5% DMSO 又は 0.1% TritonX-100 を添加して定 量 PCR を行った結果、0.1 % Triton-X を添加 した場合のみ VEGFA と RET の PCR 産物のメチ ル化レベル依存的に PCR 増幅効率が減少する ことが示された。

最後に本手法を用いてヒトゲノム中の VEGFA 遺伝子のメチル化レベルを測定できる か検討した。HeLa ゲノム DNA またはメチル化 した HeLa ゲノム DNA を鋳型に、VEGFA 遺伝子 領域の PCR 増幅効率を最適化した定量 PCR 溶 液を用いて測定した。その結果、VEGFA 遺伝 子領域の PCR 増幅効率はメチル化レベル依存 的に減少することが示された。一方、DNA 四 重鎖構造中に CpG 配列を含まない *c-MYC* 遺伝 子領域は、メチル化レベルと PCR 増幅効率に 相関はなかった。以上の結果から、定量 PCR を用いて PCR 増幅効率を測定するだけで、簡 便にヒトゲノム中の VEGFA 遺伝子のメチル化 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 1件)

Yoshida W., Yoshioka H., Bay D.H., Iida K., Ikebukuro K., Nagasawa K., Karube I. Detection of DNA Methylation of G-Quadruplex and i-Motif-Forming Sequences by Measuring the Initial Elongation Efficiency of Polymerase Chain Reaction. Anal. Chem. (2016) 88, 7101-7107 DOI: 10.1021/acs.analchem.6b00982

査読有

〔学会発表〕(計 3件)
吉岡仁美、飯田圭介、長澤和夫、池袋一
典、軽部征夫、吉田亘
定量 PCR 法を用いた四重鎖中のメチル化 DNA
検出法の開発
第 39 回日本分子生物学会年会
2016 年 12 月 2 日
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

吉岡仁美、飯田圭介、長澤和夫、池袋一 典、軽部征夫、<u>吉田亘</u> 定量 PCR 法を用いた DNA 四重鎖中のメチル化 CpG 検出法の開発 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム 2016 年 9 月 7 日 もてなしドーム地下イベント会場(石川県金 沢市)

吉岡仁美、飯田圭介、長澤和夫、池袋一 典、軽部征夫、吉田亘 DNA 高次構造の安定性に着目した DNA メチル 化検出法の開発 BMB2015 2015 年 12 月 1 日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

【図書〕(計 1件)
<u>吉田亘</u>、馬場勇次、吉岡仁美、軽部征夫
メチル化 DNA の簡易計測法の開発
BIO INDUSTRY (2017) 53 ページ(44-52 ページを執筆)

6.研究組織
(1)研究代表者
吉田 亘 (YOSHIDA, Wataru)
東京工科大学・応用生物学部・助教
研究者番号:10599806