

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06933

研究課題名(和文)1細胞メチル化DNA検出法の開発と血中循環腫瘍細胞の簡易検出法への展開

研究課題名(英文)Development of a methylated DNA sensing system for circulating tumor cells detection

研究代表者

吉田 亘(YOSHIDA, Wataru)

東京工科大学・応用生物学部・講師

研究者番号：10599806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、VEGFグアニン四重鎖(G4)構造中のCpGがメチル化されると、それを鋳型とした場合、PCR増幅効率が減少することを報告している。そこで、本研究ではCpGメチル化によりVEGF G4構造が安定化する条件を検討した。その結果、熱安定性が上昇するためには20 mM NaClと2 mM MgCl<sub>2</sub>が必要であることが明らかになった。また、ckit1 G4構造はアデニンがメチル化されると、その熱安定性が低下することを明らかにした。さらに、ヒトゲノムDNAにおいてG4構造形成配列が密に存在する領域を解析した結果、9,651箇所のG4クラスターを同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、CpGのメチル化とアデニンのメチル化がG4構造の熱安定性に影響を与えることが示された。さらに、本メチル化レベル測定法の標的となるG4構造形成配列が含まれるヒトゲノムDNA領域を網羅的に同定することに成功した。つまり、今後これらの知見を基に、定量PCRを行うだけで簡便に標的遺伝子のCpGメチル化レベルやアデニンメチル化レベルを測定できる方法が開発され、種々の疾病の診断法へ利用されることが期待される。また、メチル化レベル測定法の開発だけでなく、メチル化G4構造の生体内での機能解明にも貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that PCR amplification efficiency decreased when the template DNA containing VEGF G-quadruplex (G4) was CpG methylated. In this project, thermal stability of the CpG methylated VEGF G4 structure was analyzed. The results revealed that the G4 structure was stabilized by CpG methylation in the presence of 20 mM NaCl and 2 mM MgCl<sub>2</sub>. Thermal analysis also demonstrated that c-kit1 G4 structure was destabilized by N6-methyladenosine modifications. Moreover, 9,651 G4 clusters were identified in human genomic DNA by high-throughput sequencing of whole genome amplified products with a G4 ligand.

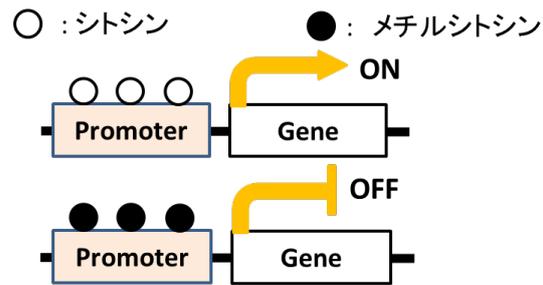
研究分野：核酸工学

キーワード：メチル化CpG メチル化アデニン グアニン四重鎖 定量PCR 熱安定性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) DNA メチル化とはゲノム DNA 中の CpG 配列中のシトシンの 5 位がメチル化される反応であり、プロモーターがメチル化されるとその遺伝子発現は抑制される (図 1)。正常な細胞では正常な DNA メチル化パターンが形成されるが、がん細胞などの異常な細胞では、がん関連遺伝子などのメチル化状態が異常になっていることが知られている。つまり、それら領域のメチル化状態はがんのバイオマーカーとして利用できる。



(2) 標的遺伝子のメチル化レベルを測定する方法として、バイサルファイト法が一般的に用いられている。しかし、ゲノム DNA をバイサルファイトで処理すると、9 割以上のゲノムが分解されるため、微量ゲノム DNA を対象に標的遺伝子のメチル化レベルを解析することは困難であった。メチル化 DNA を認識する分子を用いてメチル化レベルを測定する方法も開発されているが、生体分子間の相互作用の解離定数は nM レベルであるため、高感度にメチル化レベルを測定することは困難である。

図 1. CpG メチル化による遺伝子発現制御

(3) 一方、我々は血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) 遺伝子中に含まれるグアニン四重鎖 (G-quadruplex: G4) 構造形成配列がメチル化されていると、その領域を PCR で増幅すると、PCR 増幅効率が減少することを発見した (図 2)。つまり、定量 PCR 法を用いて PCR 増幅効率を測定するだけで、VEGF 遺伝子中の G4 構造形成配列のメチル化レベルを測定できることを報告している。しかし、メチル化によって VEGF G4 構造が安定化する詳細な条件やその物理化学的なパラメーターは不明であった。また本手法で標的遺伝子のメチル化レベルを測定するためには、その遺伝子中に G4 構造形成配列が含まれる必要があるが、ヒトゲノム DNA 中から G4 構造形成配列を網羅的に解析した報告はなかった。また、哺乳類のゲノム DNA において、CpG のメチル化以外にもアデニンの 6 位がメチル化されていることが報告されている。しかし、アデニンのメチル化が G4 構造形成に与える影響は不明であった。

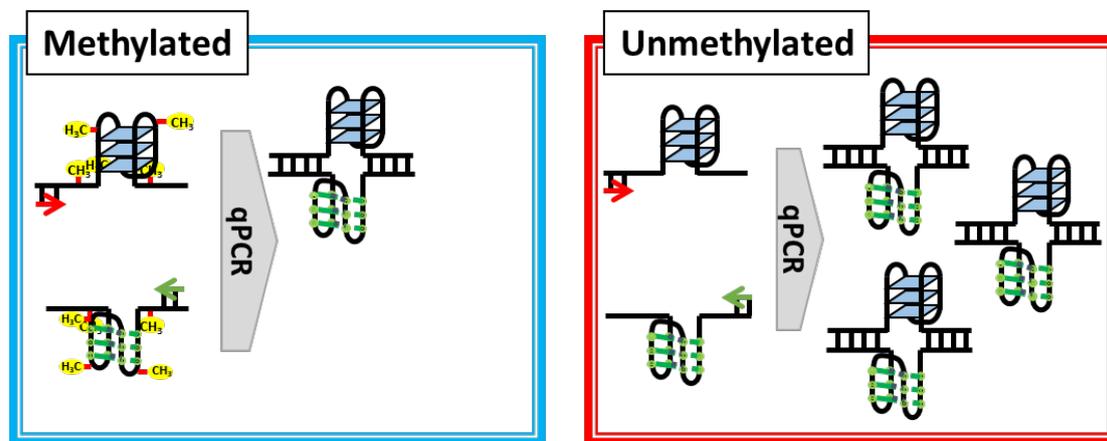


図 2. 定量 PCR 法を用いた G4 構造中のメチル化レベル測定法

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では①CpG メチル化によって VEGF G4 の熱安定性が上昇するメカニズムを解析すること、②ヒトゲノム DNA 中で形成される G4 構造をゲノムワイドに同定すること、③アデニンのメチル化が G4 構造の安定性に与える影響を解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) CpG メチル化 VEGF G4 構造の熱安定性の解析

これまでに VEGF G4 形成配列を含む DNA を鋳型として PCR を行った場合、VEGF G4 形成配列中の CpG がメチル化されると PCR 増幅効率が減少することを報告している。この反応溶液には  $\text{Na}^+$  と  $\text{Mg}^{2+}$  が含まれることから、 $\text{Na}^+$  と  $\text{Mg}^{2+}$  存在下では VEGF G4 構造はメチル化されるとその構造の熱安定性が上昇することが示唆された。そこで  $\text{Na}^+$  と  $\text{Mg}^{2+}$  存在下において、メチル化 VEGF G4 構造の熱安定性を円偏光二色性 (Circular Dichroism: CD) 測定法で解析した。VEGF G4 形成配列中には 4 つの CpG が含まれる。そこで、それぞれの CpG サイトをメチル化したオリゴヌクレオチド及びすべての CpG をメチル化したオリゴヌクレオチドを化学合成し、種々の条件で CD スペ

クトルを測定した。

#### (2) ヒトゲノム DNA 中で形成される G4 構造形成配列の網羅的解析

これまでに PCR 溶液にグアニン四重鎖 DNA に特異的に結合する化合物 70TD を添加すると、鋳型となる DNA が G4 構造を形成する場合 PCR が阻害されることが報告されている。そこで、ヒトゲノム DNA に 70TD を添加し、Whole Genome Amplification (WGA) 反応を行えば、ヒトゲノム DNA において G4 クラスター領域で WGA 反応が阻害されると想定した (図 3)。つまり、得られた WGA 反応産物を次世代シーケンサーで解析し、WGA 反応が阻害されているゲノム領域を同定すれば、ヒトゲノム DNA 中で形成される G4 クラスターを網羅的に同定できると想定した。そこで、70TD 存在下でヒトゲノム DNA を WGA で増幅し、それを次世代シーケンサーで解析した。

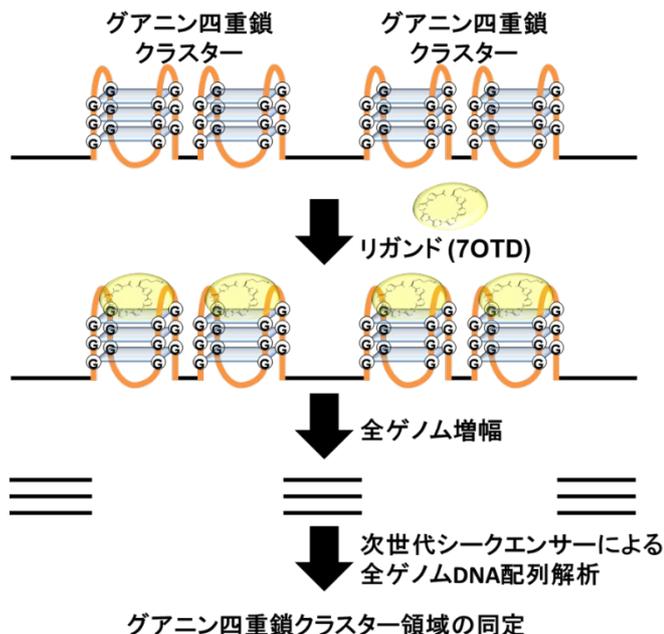


図 3. G4 クラスターの網羅的同定法

#### (3) アデニンメチル化 *c-kit1* G4 構造の熱安定性解析

*c-kit* プロモーター中に含まれる *c-kit1* G4 構造はループ中に 2 つの A-G 塩基対が含まれる。アデニンがメチル化されるとワトソクリック塩基対形成を阻害することから、*c-kit1* G4 構造のループ中のアデニンをメチル化すると、その G4 構造の熱安定性が低下すると考えた。そこで、*c-kit1* G4 構造形成配列中のアデニンをメチル化したオリゴヌクレオチドを化学合成し、種々の条件で CD スペクトルを測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) メチル化 *VEGF* G4 構造の熱安定性の解析

メチル化した *VEGF* G4 構造形成オリゴヌクレオチドと非メチル化 *VEGF* G4 構造形成オリゴヌクレオチドを化学合成し、種々の条件でその熱安定性を CD 測定法で解析した。その結果、メチル化により *VEGF* G4 構造の熱安定性が上昇するためには 20 mM NaCl と 2 mM MgCl<sub>2</sub> が必要であることが明らかになった。この条件下ではメチル化により *VEGF* G4 構造の  $T_m$  値は 5.7 度上昇することが明らかになった。*VEGF* G4 には 4 か所のメチル化サイトが含まれるが、11 番目のシトシンをメチル化すると熱安定性が上昇することも明らかにした。

#### (2) ヒトゲノム DNA 中で形成される G4 構造形成配列の網羅的解析

70TD 存在下でヒトゲノム DNA を WGA で増幅し、その WGA 産物の配列を次世代シーケンサーで解析した。その結果、70TD 存在下で WGA が特異的に阻害された領域として 9,651 箇所のゲノム領域を同定した。つまり、これらが G4 クラスターであることが示された。さらに、その内 3,766 G4 クラスターは近傍に転写開始点を含み、95 遺伝子ががん関連遺伝子であることが明らかになった。つまり、これらが定量 PCR でメチル化レベルを測定する方法の標的遺伝子領域となることが明らかになった。

#### (3) アデニンメチル化 *c-kit1* G4 構造の熱安定性解析

アデニンをメチル化した *c-kit1* G4 構造形成オリゴヌクレオチドと非メチル化 *c-kit1* G4 構造形成オリゴヌクレオチドを化学合成し、100 mM K<sup>+</sup> 存在下でそれらの熱安定性を CD 測定法で解析した。その結果、非メチル化 *c-kit1* G4 構造と比較し、 $T_m$  値は 8.2°C 低下した。つまり、アデニンをメチル化すると *c-kit1* G4 構造の熱安定性が低下することが示された。G4 構造の熱安定性がアデニンのメチル化により低下することから、*c-kit* プロモーター中のアデニンのメチル化レベルを PCR の増幅効率を指標に、簡便に測定できることが示唆された。

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 Yoshida Wataru, Terasaka Mizuki, Laddachote Saowalak, Karube Isao	4. 巻 1862
2. 論文標題 Stabilization of G-quadruplex structure on vascular endothelial growth factor gene promoter depends on CpG methylation site and cation type	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 1933 ~ 1937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2018.06.014	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 Yoshida Wataru, Saikyo Hiroki, Nakabayashi Kazuhiko, Yoshioka Hitomi, Bay Daniyah Habiballah, Iida Keisuke, Kawai Tomoko, Hata Kenichiro, Ikebukuro Kazunori, Nagasawa Kazuo, Karube Isao	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification of G-quadruplex clusters by high-throughput sequencing of whole-genome amplified products with a G-quadruplex ligand	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-21514-7	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 -

1. 著者名 Saowalak Laddachote, Mayu Nagata, Wataru Yoshida	4. 巻 524
2. 論文標題 Destabilisation of the c-kit1 G-quadruplex structure by N6-methyladenosine modification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 472-476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.116	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石井 里佳, ラダチョト サワラク, 吉田 亘
2. 発表標題 メチル化c-Kitグアニン四重鎖の熱安定性解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ラダチョト サワラク, 吉田 亘
2. 発表標題 メチル化RETグアニン四重鎖の熱安定性解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saowalak Laddachote, Wataru Yoshida
2. 発表標題 Stabilization of the RET G-quadruplex structure by CpG methylation
3. 学会等名 核酸化学若手フォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saowalak Laddachote, Wataru Yoshida
2. 発表標題 Thermal stability analysis of CpG-methylated RET G-quadruplex structures
3. 学会等名 ISNAC2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ラダチョト サワラク, 吉田 亘
2. 発表標題 N6アデニンメチル化修飾c-kit1グアニン四重鎖の熱安定性解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井 里佳、ラダチョト サワラク、吉田 亘
2. 発表標題 メチル化修飾によるc-kit2グアニン四重鎖構造の不安定化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上 万理子、高 夏海、吉田 亘
2. 発表標題 MBD融合GFPを用いたゲノムDNAメチル化頻度測定法の開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場 勇次、吉田 亘
2. 発表標題 等温PCR法を用いたDNA四重鎖構造中のメチル頻度測定法の開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ヒトゲノム中の「四重鎖構造」複数形成領域を約1万箇所同定 これらを標的とした抗がん剤開発へ  
<http://www.teu.ac.jp/press/2018.html?id=44>

## 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
連携研究者	秦 健一郎  (HATA Kenichiro)  (60360335)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・部長   (82612)	
連携研究者	飯田 圭介  (IIDA Keisuke)  (70719773)	千葉大学・理学研究院・助教   (12501)	