

2007年10月25日

独立行政法人 理化学研究所

知りたいメチル化の位置を金属錯体反応ですばやく釣り上げる

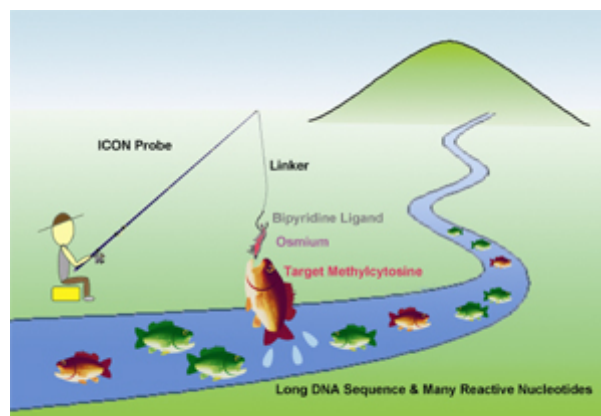
- 金属錯体形成を用いた配列選択的 DNA メチル化迅速定量法を開発 -

私たちの体は、たった1つの受精卵から始まります。1つの細胞が、髪になったり、目になったりするのには、細胞が「分化」するため、この機構のカギとなるのが「DNAのメチル化」です。「DNAのメチル化」とは、DNAを構成している塩基の1つであるシトシンにメチル基が接合することをいい、タンパク質の合成を制御しています。このDNAのメチル化が異常に起こると、がんなどさまざまな病気を引き起こし、また、老化などの原因になることが知られています。

長いDNA鎖の中では、メチル化があらゆる箇所で起こっていますが、その位置・量とがん化との関連性を見出す研究が盛んに行われています。しかし、現在使われているメチル化測定法は、30年以上前に開発されたもので、時間がかかる、場所が特定できない、たくさんのDNA量が必要、などたくさんの問題を抱えていました。

理研フロンティア研究システムの岡本独立主幹研究ユニットは、知りたい位置のシトシンがメチル化しているかを、わずか10分から1時間程度で検出できる新しいメチル化解析システム「ICON法」の開発に成功しました。ICON法は、知りたい配列の相補DNA断片（「場所取り」）と有機分子のビピリジン（「釣針」）を連結した「ICONプローブ」（「釣竿」）を用いて、メチル化に反応する金属試薬オスミウム（「餌」）を、調べたいDNA（「川」）と混ぜるだけで、知りたい位置がメチル化しているかを確実に調べることができます。調べたいDNAの箇所がメチル化している場合（「魚」）には、ICONプローブ（「釣竿」）によって吊り上げられることになるのです。

ICON法を使えば、メチル化の位置とがんとの関連付けの研究を、より簡単かつ正確に行うことができます。この技術を使って、血液一滴からがんなどさまざまな病気の診断、さらに老化の診断などが可能となるかもしれません。この特殊な釣竿ともいえるICONプローブは、株式会社ジーンデザインから発売される予定です。



(図)「ICON法」を魚釣りに例えると・・・

2007年10月25日
独立行政法人 理化学研究所

知りたいメチル化の位置を金属錯体反応ですばやく釣り上げる

- 金属錯体形成を用いた配列選択的 DNA メチル化迅速定量法を開発 -

◇ポイント◇

- ・ 遺伝子を眠らせる「しるし」DNA メチル化をプローブと新しい金属錯体反応で検出
- ・ メチル化の検出反応を最短 10 分と大幅に短縮
- ・ がんや老化など DNA メチル化異常の病気診断の新たなチップとして期待

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、生命根幹のタンパク質合成の出発地点となる「DNAのシトシンメチル化」部位を、わずか10分から1時間程度で検出できる新しいメチル化解析システム「ICON法」の開発に成功しました。同解析システムは、知りたいDNAメチル化部位を、化学反応である「金属錯体^{*1}反応」を利用して迅速に吊り上げて測定するシステムで、従来一晩かかっていたシトシンメチル化検出^{*2}を最短10分と大幅に短縮できます。理研フロンティア研究システム（玉尾皓平システム長）岡本独立主幹研究ユニットの岡本晃充独立主幹研究員による研究成果です。

DNAのメチル化は、DNAを構成する塩基の1つであるシトシンに対して「メチル基」を付加する反応で、このメチル基がDNA情報をもとに行うRNAへの情報転写を調節する「しるし」として働き、いつ・どの遺伝子からタンパク質を作るのかを正しく制御しています。しかし、一方では、このシトシンメチル化が、その発生する位置や量によって発がんや老化の一因になることも知られており、メチル基が付加したDNAの位置や量が正常なのかを即時に知ることが疾病解明や創薬研究に重要です。

研究ユニットは、オスミウム^{*3}という金属試薬がもつユニークな酸化反応力を、シトシンに付加したメチル基の検出に用いました。このオスミウム酸化反応を使うと、メチル基が付加したシトシンと反応し金属酸化生成物（オスミウム錯体）を短時間で生じる一方、メチル化していないシトシンとの反応は極めて遅く、この反応速度の差によってメチル基の有無を明確に区別することができます。さらに、錯体形成に必要な「ビピリジン^{*4}」と呼ぶ有機分子（金属配位子^{*5}）を活用し、核酸配列を読むDNA配列と連結した「ICONプローブ」を開発し、長いDNA鎖の中から、知りたいシトシンだけのメチル化の検出を行うことができました。具体的には、調べたいゲノムサンプルに、オスミウム酸塩およびその反応活性化剤などとともに、知りたいメチル化の位置に対する相補遺伝子断片（DNA）を組み込んだICONプローブを加え、55°Cで10分～1時間程、静置するだけで検出反応が終了します。この反応では、ゲノムサンプルの調べたい位置がメチル化していると反応が進み、ICONプローブと結合し、ゲノムサンプルが吊り上げられます。さらに、錯体形成後に定量PCR^{*6}を行うと、微量なゲノムサンプルのメチル化の定量も可能です。この手法では、従来法に比べて大幅に反応時間が短縮でき、さらにゲノムサンプルを非特異的に切断してしまう問題も避けられます。

研究ユニットは、引き続きこの方法を応用し、知りたい位置がメチル化しているかを即座に検出することができるメチル化検出チップの作成を手がけています。今回開発し

たICONプローブは、12月に株式会社ジーンデザイン(湯山和彦代表取締役)^{*7}から発売される予定です。遺伝子のメチル化は、「エピジェネティクス^{*8}」という遺伝子発現の制御に関わる重要な役割を果たしており、細胞の機能やがん化に強く影響します。今回開発した方法は、生化学の実験法そのものにブレークスルーをもたらすとともに、将来、メチル化が引き金となっているがんの簡便な診断に威力を発揮すると期待できます。

本研究成果は、米国の科学雑誌『*Journal of the American Chemical Society*』に近くオンライン掲載されます。

1. 背景

DNAに対するメチル化・脱メチル化修飾は、ゲノム上の遺伝子発現の活性化・不活性化に著しい影響を及ぼすことが知られています。DNAのメチル化は、DNAの合成を阻害したり、タンパク質合成に欠かせないRNAへの転写を異常にしたりなど遺伝子の働きを不活性化する役割を果たすため、“遺伝子を眠らせる「しるし」である”といえます。「エピジェネティクス機構」と呼ばれるこのDNA修飾は、細胞の分化やがん化など、細胞の機能を決めるさまざまな場面で重要な役割を果たし、生命をつかさどる重要なメカニズムのひとつです。このDNAのメチル化が、DNA配列のどこでどのくらいの確率で起こっているかを知ることは、メチル化が原因で発生する細胞のがん化の機構を解く上で重要であると同時に、がん診断の有効な指標として活かすことができます。しかし、長鎖DNA中での発生した任意のたった1箇所のメチル基の有無を、生化学的に判定すること自体が難しい技術です。1970年代に開発された従来のDNAメチル化の検出法では、サンプルを傷つける長時間の反応、実験誤差を極小化するための技術的な労力、実験に必要なサンプル量の多さなどの問題があり、手法の改善が切望されていました。研究ユニットは、2007年4月にこれまでとはまったく異なる「光や電気でメチル化を直接検出する手法」を開発し、従来の問題点の解決を図ることに成功しています(2007年4月3日プレスリリース：光や電気で遺伝子制御の決め手「メチル化」を診る)。

今回の研究では、長いDNA配列の中から調べたい1箇所のシトシンに的を絞って、メチル化検出反応を引き起こすことができる「ICONプローブ」を開発し、メチル化の位置を知ることが可能にし、さらに短時間での配列特異的メチル化検出ができるようにしました(図1)。同時に、反応生成物に定量PCR法を行うことで、微量のゲノムサンプルからメチル化量を確実に定量する技術を確立し、実用化へと結びつけました。

2. 研究手法

研究ユニットは、メチル化検出反応における反応点の絞込みと反応時間短縮を目指し、目的の配列を認識するためのDNA配列(相補DNAの断片)に、金属錯体と付加しやすいビピリジン配位子を連結したDNAプローブ「ICONプローブ」を独自に化学合成しました。続いて、金属錯体の核となるオスミウム酸カリウム、ICONプローブ、オスミウム酸カリウムを活性化するためのヘキサシアノ鉄酸カリウムなどを含む反応水溶液を用意しました。この反応溶液中でゲノムサンプルを55°Cに温度コントロールしながら10分~1時間程度静置することによって、標的のメチル化シトシンに対してのみ選択的に錯体形成を引き起こさせました。メチル化が発生している

場合には、ICONプローブに知りたい遺伝子が結合し、吊り上げられることとなります。さらに、余剰試薬をフィルターで取り除いた後、定量PCR法を行うことにより、微量ゲノムサンプルの特定の位置のメチル化を定量することができます。

3. 研究成果

(1) シトシンのメチル化の有無を区別

調べたいゲノムサンプルを、オスミウム酸カリウム、ICONプローブ、ヘキサシアノ鉄酸カリウムなどを含む反応水溶液中に加え、55°Cという温度の中で10分～1時間静置しました。オスミウム酸カリウムは、ヘキサシアノ鉄酸カリウムによって活性化され、メチルシトシンを酸化します。オスミウムは、その時、生成する酸化物の金属錯体の核となります。研究グループが開発したICONプローブはDNA配列部分（メチル化を調べたいDNAと相補するDNA断片）とビピリジン部分からなります。このDNA配列部分は、標的とする配列を決める役割を果たします。ビピリジン部分は、オスミウム酸化に必須であり、この部分がDNA配列部分によって位置取りされることで、調べたい配列の中の特定的部分でのみ、錯体形成を引き起こすことができます。その結果、任意の位置で起きている「5-メチルシトシン^{*9}」に対して反応が進み、金属錯体が形成しました（図1）。一方、メチル化されていないシトシンに対してはこの金属錯体を形成する反応の進行が400倍以上と極めて遅くなります。このように、錯体形成反応を使って、メチル化を明確に区別することができました。

(2) 特定の位置のシトシンを選択（メチル化の位置の検出）

研究チームが開発したICONプローブは、シトシンと対になる塩基としてアデニンを主骨格とした人工塩基を新たに開発して導入しているので、調べたい位置のシトシンだけで不安定な塩基対を形成します。この人工塩基には、オスミウム錯体形成を誘導するビピリジン配位子を連結しています。したがって、メチル基が付加しているのかを知りたい特定のシトシンだけに起きているオスミウム錯体形成反応を検討することができるようになり、その反応の結果から標的シトシンでのメチル基の有無を知ることができました（図2）。この反応は、長いDNA配列の中での他のメチル化領域の有無・量に左右されず、標的であるシトシンのメチル化の状態だけで起こり、信頼性は100%となります。

(3) 定量的PCR法でメチル化を定量

また、この反応では、メチルシトシン上でのオスミウム錯体形成によって標的DNAとICONプローブの間が固く結び付いています。そのため、DNA配列に結合したICONプローブが、そのDNA配列のポリメラーゼ増幅反応（PCR）を強く阻害することになります。このため、定量的PCR法を用いるとPCR阻害効果を定量でき、微量のゲノムサンプルの任意の位置のシトシンのメチル化量を定量することができました（図3）。実際に、この手法を用いて、マウスゲノムの器官ごとに異なるシトシンメチル化の程度を定量することができました。

今回のオスミウム錯体形成を用いたメチル化判定法は、任意のメチル化シトシン

への金属錯体形成を用いてその量を定量する画期的な方法です。同時に、従来の一晩かかる亜硫酸水素塩法でのメチル化解析と比べて、わずか10分と圧倒的に短時間で終了することができます。また、以前研究グループが開発した方法と比べても、新たにICONプローブを開発することで、反応時間を短縮させると同時に、長いDNA配列の中から調べたいシトシンだけに絞ったメチル化検出反応を達成しました。さらに、反応生成物に対して定量的PCR法を応用することによって、20ng程度の微量のゲノムサンプルからメチル化量を効率的に定量できるようになりました(図4)。

4. 今後の期待

DNAのメチル化の異常は、細胞の分化に対する研究に役立つだけでなく、がん化や老化の一因として働くことが知られています。特に現在、がん抑制遺伝子やがん関連遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化による不活性化に関する研究が急速に発展しています。hMLH1、P16、MGMTなど遺伝子プロモーター領域のCpGアイランド^{*10}は、正常組織では通常、脱メチル化状態にある一方で、がん組織においてはメチル化が観察されています。その結果、これらの遺伝子では、DNAメチル化が、がん特異的なマーカーとして利用できることと期待されており、DNAメチル化を分子標的としてがんの早期診断や治療戦略に生かすことができます。例えば、子宮内膜がんにおいては、発がんの早い時期、すなわち病理学的に診断が可能になる以前に、hMLH1遺伝子のプロモーター領域のメチル化が生じていると考えられており(国立大学法人金沢大学の研究、2003年)、メチル化診断が子宮内膜がんの早期診断法のひとつになる可能性を秘めています。したがって、今回開発した技術は、がん化や老化のメカニズムを調べる研究を効率的に推し進めるための研究ツールとして、時間、質、量のすべての点においてブレークスルーをもたらすこととなります。研究ユニットが生み出したICONプローブは、12月に株式会社ジーンデザインが商品化し、市販を開始する予定です。今後は、この技術を基盤として、医療現場で短時間に結果が出る簡便ながん診断システムの開発を目指して研究が進んでいくことが期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

フロンティア研究システム 岡本独立主幹研究ユニット

独立主幹研究員 岡本 晃充(おかもと あきみつ)

Tel : 048-467-9238 / Fax : 048-467-9205

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 金属錯体

中心の金属イオンとそれを取り囲む有機分子（金属配位子）から成る複合体。

※2 従来のメチル化検出法について

(1)制限酵素法

- ・教科書に記載されている最も古典的な方法。
- ・制限酵素による切断（メチルシトシンを含む配列での切断活性の低減の利用）。
- ・反応時間は、制限酵素の種類による。1～数時間が一般的。
- ・検出可能な配列が極めて限られていることが問題。
- ・生じた DNA 断片の鎖長を、ゲル電気泳動を用いて判別することで、メチル化部位を決定。

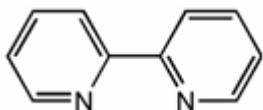
(2)亜硫酸水素塩法

- ・現在最も一般的に用いられている方法。
- ・亜硫酸水素塩のシトシン 6 位への付加に伴うシトシンからウラシルへの加水分解（メチルシトシンでの加水分解活性の低減を利用）。
- ・反応後、PCR を行い、シーケンシングする、または、プローブのハイブリダイゼーションによる検出を行う必要がある。
- ・反応時間は、一般的には 16 時間（一晚）。
- ・非特異的切断反応が起こり、ほとんどのサンプルで断片化が進んでいる。

※3 オスミウム

76 番元素。酸化物である四酸化オスミウムは、炭素-炭素二重結合を酸化し、ジオール（2つのアルコール）を与える。

※4 ビピリジン



（左図は、2,2'-ビピリジン）

オスミウムイオンの配位子として使用。

※5 金属配位子

窒素、酸素、リン、硫黄などの原子の非共有電子対もしくは炭素-炭素多重結合などの π 電子を介して金属イオンに結合して錯体構造を形成する有機分子のこと。

※6 PCR

ポリメラーゼ連鎖反応。遺伝子を増幅する代表的な方法。現在の遺伝子研究に必須の技術で、微量の DNA を短時間で 100 万倍ほどに増やすことができる。

※7 ジーンデザイン(湯山和彦代表取締役)

株式会社ジーンデザインは、核酸医薬品候補化合物の開発・製造、遺伝子診断用核酸化合物の機能性開発および遺伝子研究に関する研究受託業務を展開している。

設立年月日：平成 12 年 12 月

資本金：77,000 千円

所在地：〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7 丁目 7 番 15 号-306 号

TEL : 072-640-5180

※8 エピジェネティクス

DNA の塩基配列の変化を伴わない、遺伝子発現制御に関わる後付けの修飾である。主たる現象として、DNA のメチル化修飾、ヒストンのアセチル化やメチル化、リン酸化が知られる。正常な発生や分化に関わる重要な機構であり、特に個体発生に際してダイナミックな変化をし、次世代の細胞へと伝えられていく。その破綻によりさまざまな発生・分化異常やそれに伴う疾病が生じ、最近では、がん治療や再生医療においてますます重要なテーマになりつつある。分子生物学の世界では、生命現象の解明に向けて、DNA 配列、SNPs (一塩基多型) の次世代の分野として、このエピジェネティクスが注目されている。

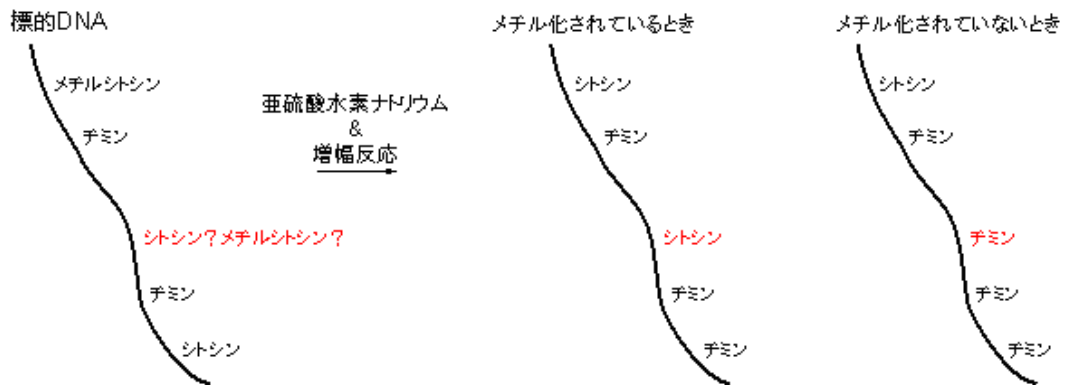
※9 5-メチルシトシン(シトシンメチル化)

エピジェネティクス機構の最も代表的な例。DNA のメチル化修飾は、遺伝子の実体である塩基配列を変えることなく、つまりコードするアミノ酸配列を変えることなく、その発現を制御する。真核生物では、一部の生物の例外を除き、ゲノム DNA のシトシンの 5 位がメチル化修飾を受ける。

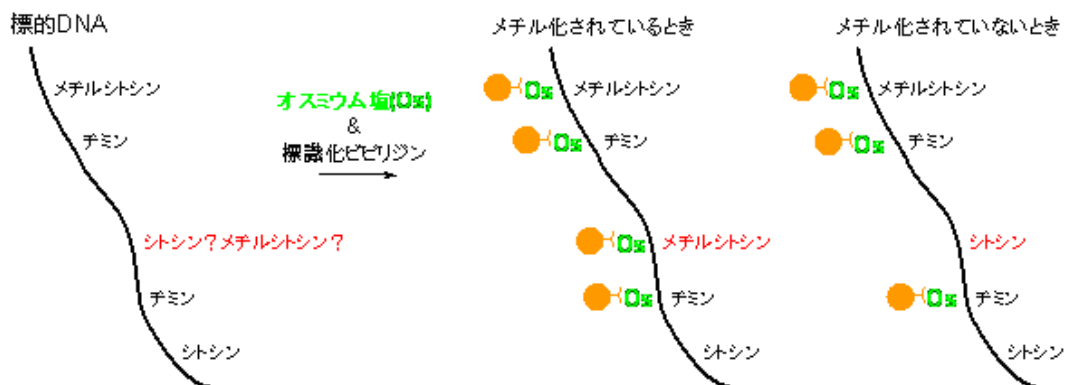
※10 CpG アイランド

シトシンとグアニンが連続する配列を多く含む領域。一般的にメチル化の標的になり、シトシンがメチル化されると脱アミノ化反応によりシトシンからチミンへの突然変異が起りやすくなる。

(a) 亜硫酸水素塩法



(b) われわれが以前の報告した方法



(c) ICON法

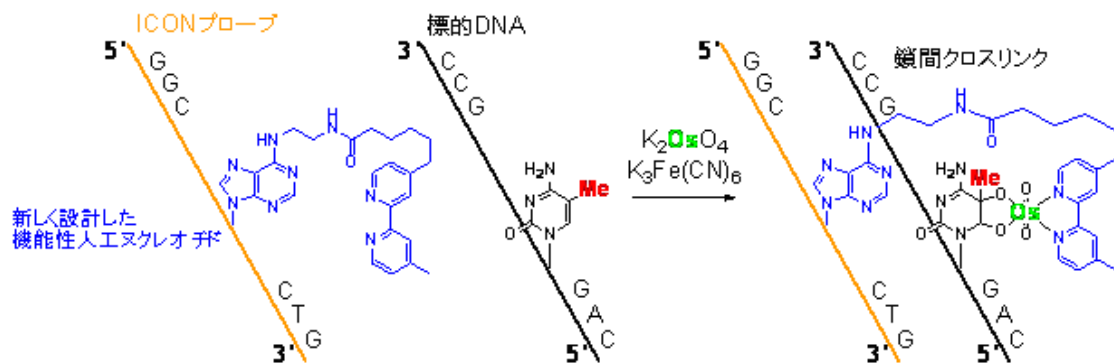
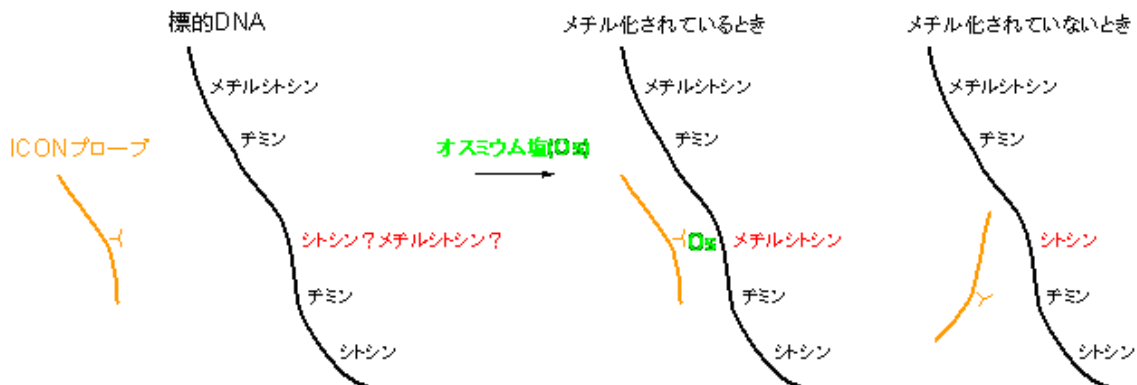


図1 5-メチルシトシン検出法の比較

(a) 旧来の亜硫酸水素塩法

亜硫酸水素塩処理の後、PCR、シーケンシング操作によってメチル化されたシトシンはシトシンとして、非メチル化シトシンは、チミンとして検出される。亜硫酸水素塩処理は、長時間の加熱反応が必要で、大半のゲノムサンプルで非特異的損傷が生じる。

(b) 研究ユニットが前回報告したメチル化標識法

オスミウムによる錯体形成反応を使う。この方法では、非メチル化シトシンには標識反応が起こらないのに対して、メチルシトシンとチミンに標識が付けられる。反応時間は、1時間程度に短縮された。ただし、標的のシトシンに絞ってそのメチル化の有無を解析するためには、酵素処理もしくは蛍光プローブとのハイブリダイゼーションなどひと工夫が必要だった。

(c) 新法 ICON 法

このプローブには、錯体形成に必要なビピリジンが取り付けられており、これを用いることによって標的のシトシンに反応を絞ることができる。メチルシトシンとは反応するが、メチル化を受けていないシトシンとは反応しない。反応時間も短縮でき、微量サンプルからのメチル化の定量も可能になった。下段は、反応点の構造式。ICON プローブのビピリジンと標的のメチルシトシンがオスミウムを介して結合し、DNA 鎖間結合体 (Interstrand crosslink) を形成する。この錯体は安定であり、DNA 増幅反応を強く阻害する。

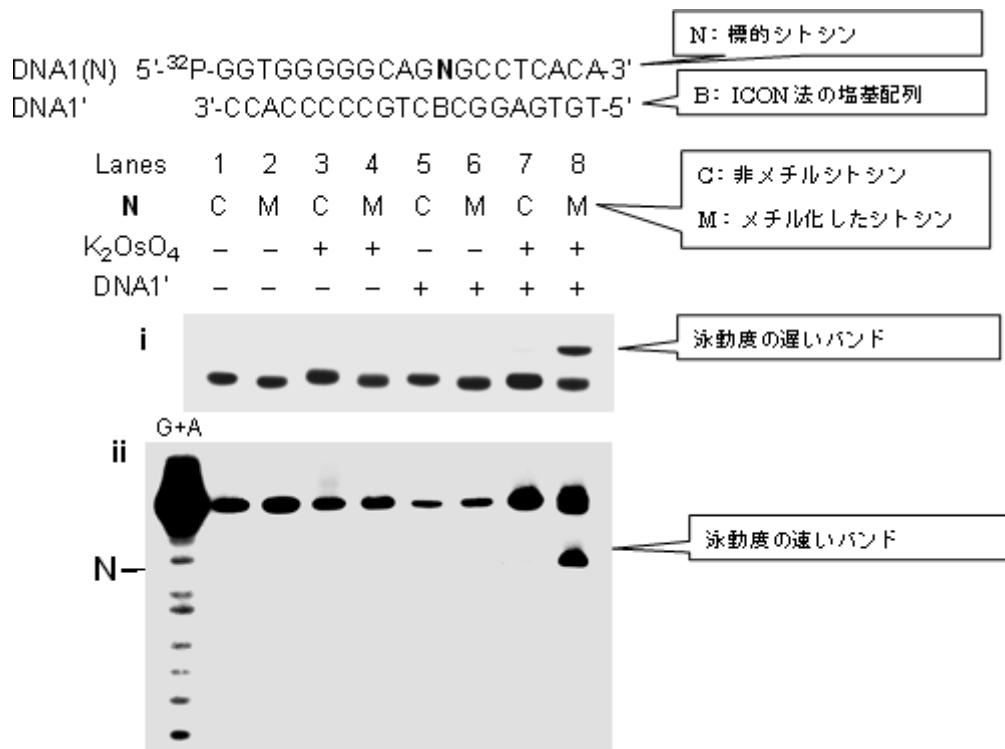


図2 オスミウムによるDNA鎖間結合体を形成したことを示すゲル電気泳動写真

- (i) 錯体形成により分子量が大きいクロスリンク体が生成（一番右の8番レーン上部の泳動度の遅いバンド）。プローブ (DNA1')、オスミウム (K₂OsO₄)、メチル化されていないサンプルでは、このようなバンドは現れない。
- (ii) 加熱アルカリ処理を使ってメチルシトシンの箇所に錯体が形成されていたことを確認。一番右の8番レーンにおいて泳動度の速いバンドが現れた。一番左のグアニン・アデニン塩基切断 G+A レーンと比較することによりメチルシトシンの箇所で切断されたことがわかる。

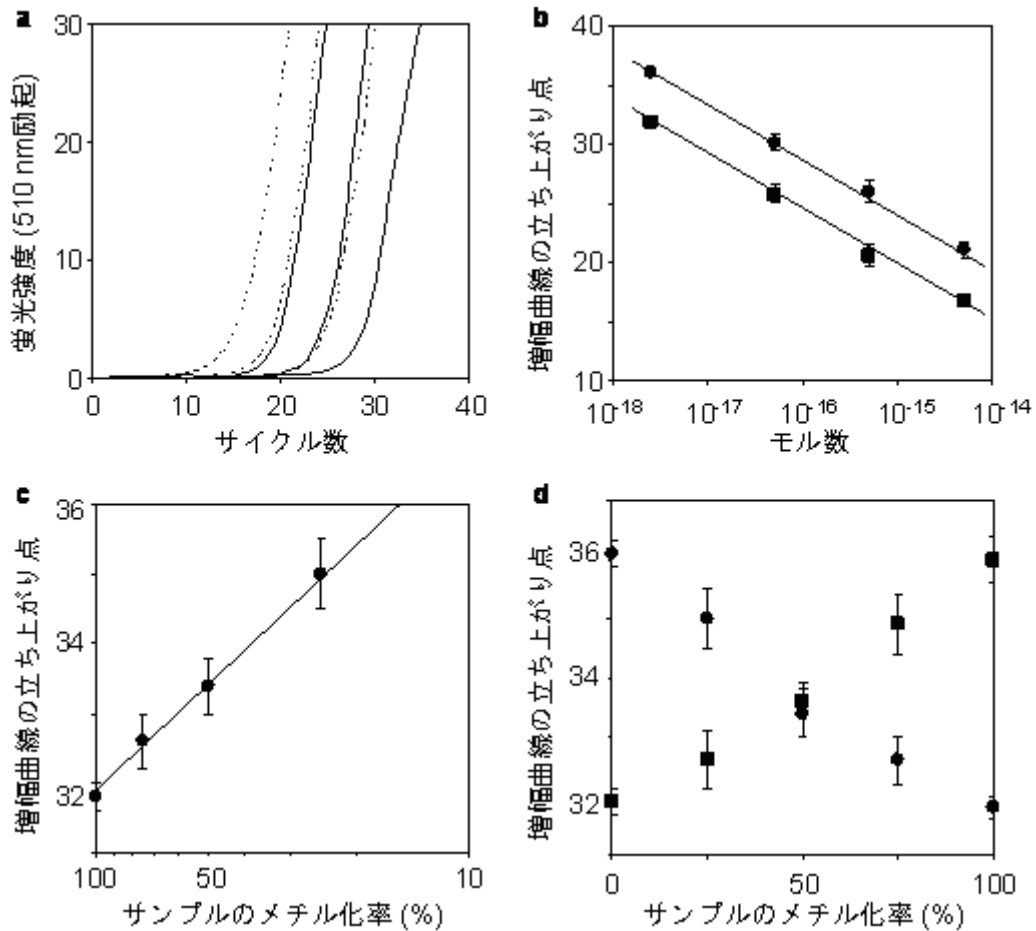


図3 メチル化 DNA の配列選択的定量

- (a) 定量的 PCR 法による DNA 鎖間結合体の増幅阻害
 反応サイクルを繰り返すと（横軸）、DNA の増幅が始まり、同時に加えてある蛍光色素による蛍光の強度（縦軸）が増してくる。非メチル化シトシン（点線）に比べてメチル化を受けたシトシン（実線）は ICON プローブとの DNA 鎖間結合体の形成により増幅が始まるサイクル数が遅れる。
- (b) (a)の曲線から作図されたサンプル量の検量線
 最初のメチル化 DNA の量（横軸）に応じて、増幅開始のサイクル数（縦軸：曲線の 2 次微分の極大値を使用）が直線的に変化する。
- (c) メチル化量決定のための検量線
 標的のシトシンのメチル化の割合（横軸）に応じて、増幅開始のサイクル数（縦軸：曲線の 2 次微分の値を使用）が直線的に変化する。この方法を用いてサンプル中のメチル化量を定量できる。
- (d) メチル化の定量において同時に存在する他のメチル化領域によって影響されない
 本実験では、2 箇所のメチル化部位 (C_1, C_2) をもつ配列を含む仮想的 DNA 2 種類 (C_1 =メチル化、 C_2 =非メチル化の DNA と C_1 =非メチル化、 C_2 =メチル化の

DNA) を一定の割合で混合し、反応を行った。横軸は、混合系でのC₁のメチル化率を示す。■はC₁に対するプローブを用いた測定結果、●はC₂に対するプローブを用いた測定結果を示す。異なる2箇所のシトシンのメチル化の割合を変えたとしても標的のシトシンのメチル化の定量には影響しない。

新規メチル化検出法 -ICON法- の長所

- ・長いDNA配列の中の1個の調べたいシトシンに絞ってメチル化の有無を調べられる
- ・ゲノムサンプルの不規則切断による損傷がない
- ・微量ゲノムサンプルでの解析が容易
- ・各シトシンでのメチル化量を速やかに定量できる
- ・メチル化の有無を区別するための反応時間を大幅短縮

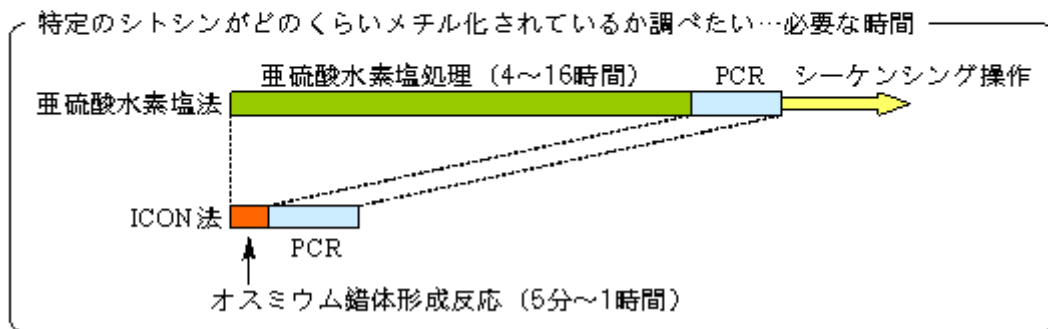


図4 旧来法と比較したICON法の長所