

DNA 脱メチル化酵素を利用した DNA メチル化レベル簡易測定法の開発

Quantification of global DNA methylation level using Ten-eleven translocation

高 夏海
指導教員 吉田 亘

東京工科大学大学院 バイオ・情報メディア研究科
バイオニクス専攻 エピジェネティック工学研究室

本研究ではDNA 脱メチル化酵素である Ten-eleven translocation (TET)を用いた簡便な DNA メチル化レベル測定法の開発を目的とした。DNA メチル化とは、特定のDNA 配列にメチル基が修飾される反応であり、遺伝子発現制御に深く関連している。正常な細胞と比較してがん細胞ではメチル化異常が生じているため、DNA メチル化レベルは、がんの目印となりうる。そこで本研究は従来よりも簡便・迅速な DNA メチル化レベル測定法の開発を試みた。本手法は試薬を混合するのみの簡単な測定法であるため、在宅で使える簡便ながん診断キットに応用可能だと考えられる。

キーワード：DNA メチル化, DNA 脱メチル化, TET, コハク酸

1. 背景・目的

本研究はがんの目印分子であるメチル化 DNA を従来よりも簡便・迅速に測定することを目的とした。DNA メチル化は、ゲノム DNA における CG 配列中のシトシン塩基がメチル化される反応であり、遺伝子発現制御に深く関連している。ヒトのゲノム DNA 全体の約 45%を構成する繰り返し配列は通常高度にメチル化されている。しかし正常な細胞と比較してがん細胞では、そのゲノム全体のメチル化頻度が低下している。従って、ゲノム全体のメチル化レベルは、がんの目印として注目されている。近年では、この DNA メチル化異常に着目したがん診断や治療、予防を試みる研究が多く実施されているが、大型な解析機械や専門的で煩雑な操作が必要である。

現在、国内で実施されているがん診断は血液検査や MRI 検査、CT スキャン検査など病院や専門機関で医師や専門家の診断に基づいて行われるものであり、誰でも日常的に診断を受けることは出来ない。そのため、検体と試薬を混合し、光の強さで簡単にがんの目印分子を検出できれば、在宅で使用できるがん診断キットに応用できると考えられる。本手法を取り入れたがん診断法が家庭で定期的に用いられることで、がんの超早期発見に限

らず、早期治療にも貢献すると確信している。

本研究では簡便な DNA メチル化レベル測定法の開発を目的とし、着目したのが DNA 脱メチル化酵素 TET (Ten-eleven translocation)である。TET は 2 価鉄イオンと α -ケトグルタル酸(α -KG)を補因子としてメチル化シトシンを連続的に酸化させる (Fig.1)。

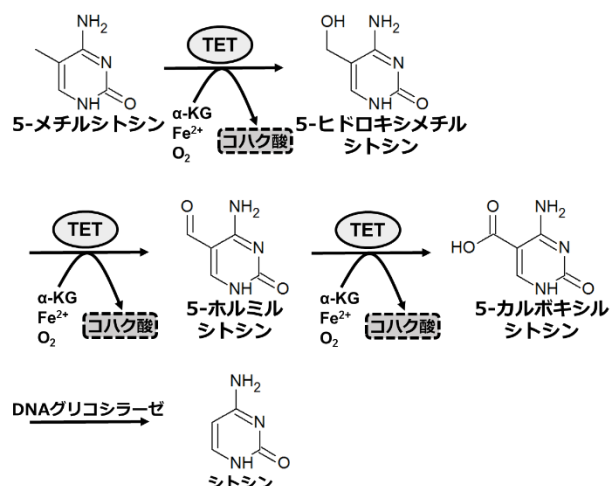


Fig.1 TET による酸化反応

この連続的な酸化反応の過程で α -ケトグルタル酸はコハク酸へと変換される。つまり、ゲノム DNA に対する TET の酸化反応によって生じるコハク酸量を定量すれば、DNA メチル化レベルを簡便に測定できると想定した (Fig.2)。

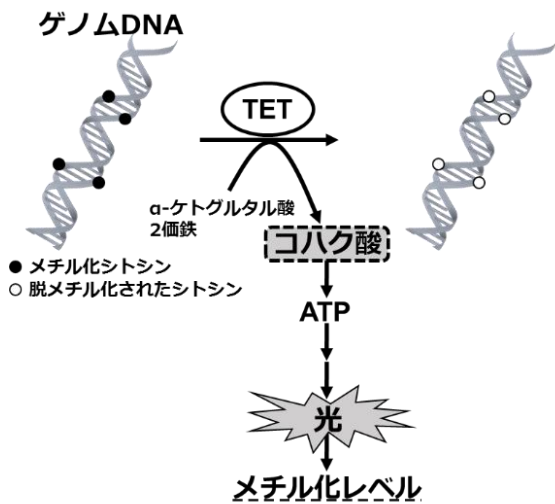


Fig.2 TET を用いた DNA メチル化測定原理

2. 方法

1. HeLa 細胞の培養と脱メチル化処理

ヒトの子宮頸がん細胞である HeLa 細胞 5.0×10^5 cells を DNA メチル化阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine を終濃度 0, 0.1, 1, 10 μM となるように添加した DMEM 培地(10% FBS, 1 \times penicillin-streptomycin l-glutamine)で 1 日間培養した(37°C, 5% CO₂)。その後、新しい DMEM 培地(10% FBS, 1 \times penicillin-streptomycin l-glutamine)に交換し、3 日間培養した(37°C, 5% CO₂)。培養した細胞を回収し、ゲノム DNA を精製して、種々のメチル化レベルとなったゲノム DNA を調製した。ゲノム全体のメチル化レベルは反復配列 LINE1 を標的としたバイサルファイト法により決定した。

2. TET を用いた DNA メチル化レベル測定

調製した、種々のメチル化レベルの HeLa ゲノム DNA と硫酸アンモニウム鉄(II)六水和物、 α -ケトグルタル酸、アスコルビン酸を混合し、そこに TET1 を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。TET1 による反応で生じたコハク酸はスクシニル CoA シンテターゼなどの酵素によって、ATP に変換した。生じた ATP は生じたコハク酸量と等量であるため、ATP を利用して、反応産物中のコハク酸量を定量した。

3. 結果

1. HeLa 細胞の培養と脱メチル化処理

HeLa 細胞より抽出したゲノム DNA のメチル化レベルをバイサルファイト法で評価した結果 (Table)、メチル化阻害剤濃度依存的にメチル化レベルが低下するゲノム DNA を調製することができた。

Table HeLa ゲノム DNA のメチル化レベル

DNA メチル化阻害剤(μM)	0	0.1	1	10
DNA メチル化レベル(%)	67.6	55.2	46.2	31.7

2. TET を用いた DNA メチル化レベル測定

各種濃度のコハク酸溶液の結果より作成した検量線を用いて、TET1 の酸化反応で生産されたコハク酸量を算出した。その結果、ゲノム DNA のメチル化レベル依存的に生じたコハク酸量が増加することが示された(Fig.3)。

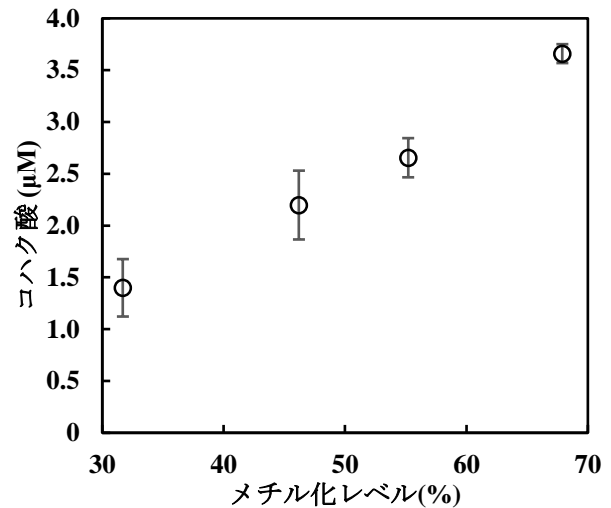


Fig.3 TET1 の反応で生じたコハク酸測定結果(N=3, \pm SD)

4. 結論

TET による酸化反応によって生じたコハク酸量を測定することにより、ゲノム DNA のメチル化レベルが定量できることが示された。