

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32692

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760647

研究課題名(和文)メチル化CpGに結合するRNAの創出及び高感度メチル化CpG検出法の開発

研究課題名(英文) Identification of methylated DNA-binding RNA aptamer and development of high sensitive DNA methylation detection 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) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではメチル化DNAに結合するRNAアプタマーを同定するために、メチル化CpGとメチル化二本鎖DNAを標的分子としてアプタマーのスクリーニングを実施した。5ラウンドのスクリーニングを実施したところ、濃縮されたライブラリーは4種類の配列に収束した。そこで、同定したRNAを合成し、メチル化二本鎖DNAまたは非メチル化二本鎖DNAに結合するか検討したところ、同定したRNAは両DNAに解離定数10nM程度で結合した。今後同定されたアプタマーの特異性を改良することにより、メチル化DNA特異的なアプタマーの同定が期待でき、それをを用いたメチル化DNA検出方法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The research project aimed to identify RNA aptamer that specifically recognizes methylated DNA and develop high sensitive detection system for DNA methylation on target gene. To identify the aptamer, in vitro selection was performed against methylated duplex DNA. After 5th round selection, the RNA library was enriched. By sequencing analysis of the enriched RNA library, four kinds of sequence were identified in the library. The RNAs were synthesized and then binding assay against methylated DNA was performed. As the results, the RNAs bound to both of the methylated duplex DNA and unmethylated duplex DNA with 10 nM Kd. Therefore, it is expected that DNA methylation-binding RNA aptamer might be obtained by improving the binding specificity of the identified RNA aptamer and it might contribute for development of the high sensitive DNA methylation detection system.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：アプタマー in vitro selection メチル化DNA

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類ではゲノム中の CpG 配列のシトシンがメチル化され、このメチル化が近傍の遺伝子発現制御に関連していることが示されている。そのため、ゲノム中の正常なメチル化パターン形成は発生などの生命現象において重要な役割を果たしている。一方、ゲノム DNA の異常なメチル化は癌など様々な疾患に関連していることが報告されており、DNA 配列特異的にメチル化 CpG を検出することは様々な疾病の診断マーカーとして応用可能である。

(2) ゲノム DNA のメチル化を検出する方法として、バイサルファイト法が一般的に用いられているが、バイサルファイト処理によりゲノムが断片化されてしまうため、この手法では高感度にメチル化 DNA を検出することができない。そのため、微量癌細胞などのメチル化状態の解析を行うためには、新たな高感度 DNA メチル化検出システムが求められている。標的ゲノム配列中のメチル化を高感度に検出するためには、ゲノムを傷つけることなくメチル化部分を特異的に認識し、その信号を増幅する必要がある。そのためには、亜硫酸水素ナトリウムを用いない、メチル化 DNA に結合する分子を創出する、PCR より検出シグナルを増幅する、の3つの条件を満たす必要がある。

(3) 一方、抗体と同程度の特異性、親和性を持つリガンドであるアプタマーが注目されている。アプタマーとはランダム配列を持つ核酸ライブラリーから選択される、標的蛋白質や低分子に特異的に結合する核酸のリガンドである。アプタマーは、合成・修飾が容易、特定の構造を形成するように設計できる、PCR のプライマーとしてアプタマーを応用できる、という特長を持つ。そのため、メチル化 CpG に結合するアプタマーを取得できれば、それを用いて標的遺伝子の DNA メチル化を高感度に検出できる方法が開発できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究ではメチル化 CpG に結合する RNA アプタマーをスクリーニングし、標的領域の相補鎖配列をメチル化 CpG アプタマーに連結し、これを PCR のプライマーとして用いることにより、標的 DNA 配列中のメチル化 CpG を高感度に検出するシステムの開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 標的メチル化 DNA としてメチル化した 383bp の二本鎖 DNA を用いた。二本鎖 DNA はビオチン修飾したプライマーを用い PCR によりマウスゲノムから増幅した。この

DNA(20 $\mu$ g)を 60U CpG メチル化酵素(SssI)によってメチル化し、フェノールクロロホルム精製した。調製した DNA のメチル化レベルは、メチル化 CG 感受性制限酵素 HapII による切断割合を定量することによって解析した。本メチル化二本鎖 DNA はアビジンが固定化されている Dynabeads に固定化し、スクリーニングの標的とした。

(2) 24-mer のランダム領域、プライマー領域、T7 RNA プロモーター領域を持つ DNA ライブラリーを合成し、これを鋳型としてランダム RNA ライブラリーを合成した。6.8 nmol の 24-mer ランダム RNA ライブラリーを 200  $\mu$ l PBS buffer(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.4) 中でホールディングし、8.4 pmol の非メチル化 DNA 固定化 Dynabeads に加え、室温で 30 分間インキュベートした。非メチル化 DNA に結合しなかった RNA を回収し、8.4 pmol のメチル化 DNA 固定化 Dynabeads に加え、室温で 30 分間インキュベートした。1 ml PBS buffer で 5 回洗浄後、200 $\mu$ l 7M urea でメチル化 DNA に結合した RNA を回収し、エタノール沈殿を行った。溶出した RNA を鋳型にして、耐熱性逆転写酵素 ThermoScript RT を用いて 55 度 1 時間で逆転写反応を行い、得られた cDNA の copy 数を real time-PCR で定量した。この cDNA を鋳型にして、T7 promoter 配列を含むプライマーを用いて PCR 増幅し、T7 RNA polymerase によって RNA ライブラリーを合成し、次のラウンドに用いた(図 1)。2 ラウンド目では 10 nmol、3 ラウンド目では 11nmol、4 ラウンド目では 1.6 nmol、5 ラウンド目では 1.5 nmol の RNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。

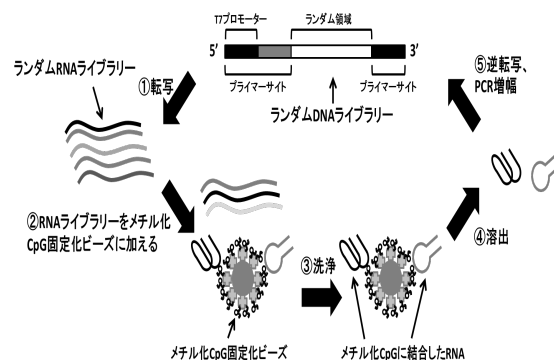


図1 . RNA アプタマーのスクリーニング方法

(3) 5 ラウンド後に得られた RNA ライブラリーを鋳型にして RT-PCR を行い、PCR 産物を pGEM-T Easy vector にライゲーション後 DH5 を形質転換した。得られたシングルクロンのプラスミドを illustra TempliPhi DNA Amplification Kit を用いて増幅し、プラスミドのシーケンスを解析した。

( 4 ) 高い相同性を示す 30 クローンのうち、1 クローンを選択し、5' に TAMRA 修飾した 24-mer #75 を合成した。2nM TAMRA 修飾 24-mer #75 に 0 から 1000nM のメチル化標的 DNA 又は非メチル化標的 DNA を加え、30 分室温でインキュベート後、並進拡散時間を測定することにより、本 RNA と標的 DNA が結合するか解析した。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) CpG メチル化酵素未処理の PCR 産物を HapII で切断した場合はすべての DNA が切断されたのに対し、CpG メチル化酵素処理した PCR 産物は HapII により切断されなかった。つまり、CpG メチル化酵素で PCR 産物进行处理することによって、完全にメチル化された PCR 産物を作製できたことが示された( 図 2 )。

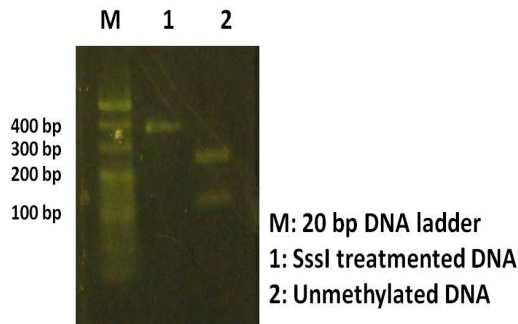


図 2 . SssI 処理した PCR 産物のメチル化割合を解析した結果

( 2 ) ラウンドを重ねるごとに溶出した RNA 量が増加しており( 図 3 )、メチル化 DNA に結合する RNA ライブラリーが濃縮されていることが示唆された。また、5 ラウンド目の RNA ライブラリーの標的メチル化 DNA に対する結合能を蛍光偏光法により解析した結果、5 ラウンド目の RNA ライブラリーはメチル化標的 DNA に結合していることが示唆された( 図 4 )。

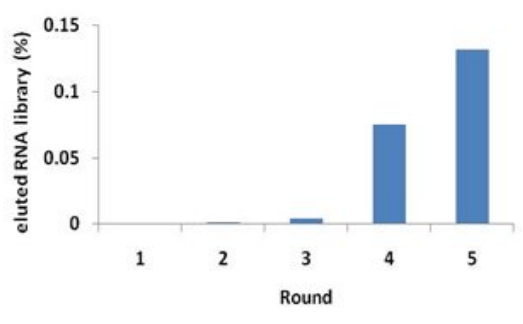


図 3 . 各ラウンドで回収された RNA ライブラリー量

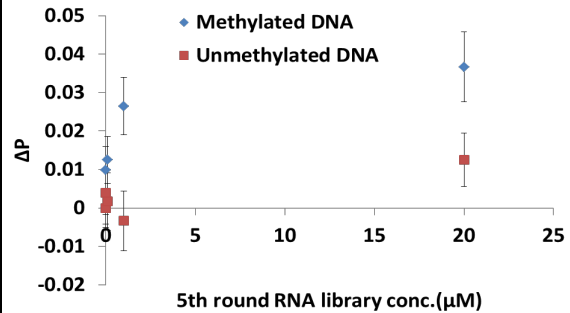


図 4 . 5 ラウンド目の RNA ライブラリーの標的 DNA への結合能を解析した結果

( 3 ) 配列を決定できた 93 クローンと標的 DNA 配列の相同性を解析したところ、得られた配列のすべてが標的 DNA の一部の領域と高い相同性を示した。得られた RNA 配列と高い相同性を示した標的 DNA 領域は 1-12bp 付近 (7 クローン)、272-282 bp 付近 (30 クローン)、335-350bp 付近 (50 クローン)、369-384bp 付近 (3 クローン) であった。これらのうち、標的 DNA 配列の 272-282bp 付近には CpG site が存在することから、この領域と高い相同性を示す RNA が、メチル化 DNA を認識しているのではないかと考えた。

( 4 ) TAMRA 修飾 24-mer #75 はメチル化標的 DNA に解離定数 10 nM 程度で結合することが示された( 図 5 )。つまり、本スクリーニングによって標的に結合する RNA を同定することが出来た。しかし、同定された RNA はメチル化 DNA と同様に非メチル化 DNA にも結合することが示された。今後同定されたアプタマーの特異性を改良することにより、メチル化 DNA 特異的なアプタマーの同定が期待でき、それを用いたメチル化 DNA 検出方法の開発が期待される。

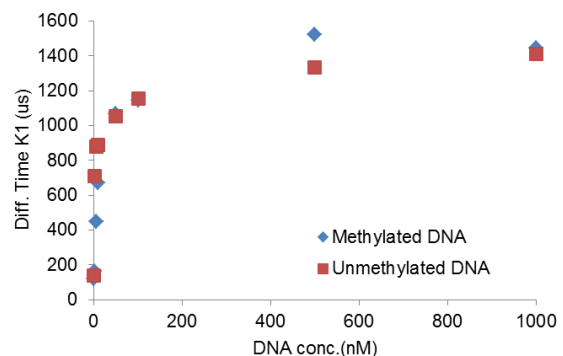


図 5 . TAMRA 修飾 24-mer #75 とメチル化、非メチル化 DNA との結合解析結果

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)(雑誌論文)(計10件)

Yoshida W., Kezuka A., Murakami Y., Lee J., Abe K., Motoki H., Matsuo T., Shimura N., Noda M., Igimi S., Ikebukuro K. Automatic polymerase chain reaction product detection system for food safety monitoring using zinc finger protein fused to luciferase. Anal. Chim. Acta (2013) 801, 78-83. doi: 10.1016/j.aca.2013.08.019, 査読有

Yoshida W., Kezuka A., Abe K., Wakeda H., Nakabayashi K., Hata K., Ikebukuro K. Detection of histone modification by chromatin immunoprecipitation combined zinc finger luciferase-based bioluminescence resonance energy transfer assay. Anal. Chem. (2013) 85, 6485-6490. doi: 10.1021/ac401036k, 査読有

Yoshida W., Saito T., Yokoyama T., Ferri S., Ikebukuro K. Aptamer selection based on G4-forming promoter region. PLOS ONE. (2013) 8, e65497. doi: 10.1371/journal.pone.0065497, 査読有

[学会発表](計21件)

Yoshida W., Sode K., Ikebukuro K., APTAMERIC ENZYME SUBUNIT ~ APTAMERS REGULATING ENZYME ACTIVITY BY BINDING WITH SPECIFIC TARGET~, Enzyme Engineering XXII, 2013年9月22~26日, Toyama International Conference Center

吉田亘、横山智美、齊藤大希、池袋一典、ゲノム中の G-quadruplex 形成配列情報に基づいたバイオマーカー結合アプタマーの探索、日本化学会第93春季年会、2013年3月22日~25日、立命館大学

吉田亘、齊藤大希、池袋一典、In silico アプタマー探索法の開発、第6回バイオ関連化学合同シンポジウム2012、2012年9月6日~8日、北海道大学

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: アプタマーの製造方法

発明者: 池袋一典、吉田亘

権利者: 国立大学法人東京農工大学

種類: 特許権

番号: 特願2012-155095

出願年月日: 平成24年7月10日

国内外の別: 国内

## 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