

博士学位論文審査結果要旨

平成 26 年 2 月 17 日

研究科、専攻名 バイオ・情報メディア研究科 バイオニクス専攻

学位申請者氏名 高梨 健太

論文題目 メチル化DNAのピンポイント検出法の開発

審査結果の要旨

平成26年2月17日に東京工科大学において、学位申請者 高梨 健太 の学位審査公開発表会が開催され、以下の要旨に示す博士論文に関する発表と関連する質疑応答が行われた。

メチル化DNAの1種である5-メチルシトシンは、シトシンの5位にメチル基が導入される酵素反応により生じ、ヒトなど脊椎動物の場合、シトシンとグアニンが隣接したCpG配列中のシトシンで頻繁に生じることが知られている。遺伝子内のシトシンのメチル化パターンは、細胞の分化やがん化など様々な生命現象に深く関与しており、遺伝子診断技術など治療分野への応用やiPS細胞などエピジェネティクスの基礎研究で幅広く研究されている。メチル化DNA検出法の多くは、亜硫酸水素ナトリウムによるシトシン特異的な反応、ウラシルへの変換反応に基づいたバイサルファイト法である。従来のバイサルファイト反応は、配列選択性がなく、CpG配列以外にゲノムDNA中の全てのシトシンを反応させるため、反応時間やDNAの非特異的な損傷、変換後のDNA鎖の偏りがボトルネックとされている。申請者は、DNAプローブを利用した配列選択的な化学修飾法に着目し、DNAプローブを利用した新たな一塩基選択的な化学修飾法の構築、シトシン特異的な化学修飾法およびメチル基識別法の開発を行い、2つの新しい手法を組み合わせたピンポイントなメチル化DNA検出法の開発を目的とした。

はじめに、従来の亜硫酸水素ナトリウムを用いたバイサルファイト反応とは異なる反応および検出系での新規メチル化DNA検出法を開発するため、シトシン特異的な化学修飾法の探索およびメチル基識別法の開発を行った。亜硫酸水素ナトリウムでシトシンを反応させる際に、アミノオキシ化合物 (NH_2OR) などの求核性の高い試薬を併用することで従来法よりも温和な条件下でスムーズに反応が促進されることが報告されている。また、亜硫酸水素ナトリウムとアミノオキシ化合物の一つであるメトキシアミン ($\text{R} = \text{CH}_3$) で化学修飾されたシトシン誘導体、N4-methoxy-5,6-dihydrocytosine-6-sulfonateがDNAポリメラーゼによる相補鎖合成を阻害することが報告されている。申請者は、亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンによる反応がバイサルファイト法同様に、シトシン特異的でありメチル基の識別へ応用できることを調べるために、シトシンまたは5-メチルシトシンを一カ所含む短いDNA鎖を化学修飾し、HPLCとTOF-MSを用いて反応後のDNA鎖における質量数の変化を測定した。その結果、メトキシアミンと亜硫酸水素ナトリウムを併用した反応は、シトシン特異的であり5-メチルシトシンでは反応しないことを明らかにした。また、修飾後のDNA鎖を鋳型にプライマー伸長反応を行い、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成の阻害を指標としたメチル基の識別が可能か調べた。プライマー伸長反応後のDNA鎖を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した結果、シトシンを含むDNA鎖でのみ伸長反応の阻害が確認され、メトキシアミンと亜硫酸水素ナトリウムで化学修飾した標的DNAを鋳型にDNAポリメラーゼによる相補鎖合成の阻害を指標としたメチル基の識別が可能であることが示された。

つぎに、特定のCpG配列を選択的に修飾し、PCRなど簡便な核酸分子検出法への応用を考えた配列選択的な化学修飾法の構築を行った。本研究では、DNAの分岐構造であるThree-way junction (TWJ) 構造に着目した。TWJ構造は、分岐点上にナノスケールの空洞を形成しており、分岐点に位置する塩基が酸化剤や求核剤により容易に修飾できることが報告されている。TWJ構造を形成するDNAプローブを利用することで分岐点上に位置するシトシンのみを選択的に化学修飾し、DNAのメチル化をピンポイントで検出できると考えて、標的とするCpG配列が分岐点上に位置するようにDNAプローブを結合させ、TWJ構造を形成させた標的DNAを亜硫酸水素ナトリウムとメトキシアミンなどのアミノオキシ化合物で反応させた。反応後の標的DNAを鋳型にプライマー伸長反応やリアルタイムPCRなどで相補鎖合成の阻害を測定した結果、分岐点がシトシンの標的DNAでのみプライマー伸長反応やPCR増幅が阻害されることが確認された。DNAプローブを利用することで複数ヵ所存在するシトシンの内、分岐点上に位置するCpG配列のみを選択的に化学修飾し、配列解析を行わずに、リアルタイムPCRで簡便に特定のシトシンのメチル化状態をピンポイントで解析できることが示された。

TWJプローブを利用した新たな一塩基選択的な化学修飾法の構築と修飾後のシトシン誘導体の構造変化を利用したDNAポリメラーゼによる相補鎖合成の阻害を指標とした新規メチル化DNA検出法の開発は、独自性が高く、遺伝子のメチル化状態を簡便に解析するためのツール以外にも、特定の塩基を効率的に修飾または切断することができるため、遺伝子工学などに応用できる有望な方法であると期待できるものであった。

上記の研究に対する学位審査公开发表での発表および質疑応答は妥当なものであり、筆記試験の結果も合格と判定するに十分な点数であった。以上のことより、審査委員会は、本論文の著者に対して博士（工学）の学位を授与するに十分な学識と能力を有していることを認めるものである。

審査委員 主査

東京工科大学 准教授 加藤 輝