

2021 年度

博士 学位 論文

ゲノム DNA 中の修飾シトシン塩基
簡易測定法の開発

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

指導教員 吉田 亘 准教授

高 夏海

目次

目次

略語一覧

第1章 緒論.....	1
第1節 緒言.....	1
第2節 シトシン修飾に関する知見.....	3
第1項 DNA のメチル化.....	3
1-1. DNA メチル化維持機構.....	3
1-2. メチルシトシンによる遺伝子発現制御.....	3
第2項 DNA の脱メチル化.....	6
2-1. DNA の脱メチル化機構.....	6
2-2. ヒドロキシメチルシトシンによる遺伝子発現制御.....	8
第3節 修飾シトシン塩基結合蛋白質に関する知見.....	9
第1項 メチル化 CpG 結合蛋白質.....	9
第2項 ヒドロキシメチル化 CpG 結合蛋白質.....	11
第4節 がんを始めとする疾病におけるシトシン修飾の異常に関する知見.....	13
第1項 遺伝子特異的なシトシン修飾異常.....	13
第2項 ゲノム DNA 全体のシトシン修飾異常.....	14
第5節 修飾シトシン塩基測定法に関する知見.....	16
第1項 DNA メチル化レベル測定法.....	16
1-1. バイサルファイト処理を利用した定法.....	16
1-2. 液体クロマトグラフを利用した方法.....	17
1-3. 電気化学的方法.....	17
1-4. 分子認識能を利用した方法.....	17
1-4-1. 抗 5mC 抗体を用いた方法.....	17
1-4-2. Methyl acceptance assay.....	18
1-4-3. DNA 結合蛋白質を用いた方法.....	18
1-5. 各種メチル化レベル測定法の比較.....	20
第2項 DNA ヘミメチル化レベル測定法.....	23
第3項 DNA ヒドロキシメチル化レベル測定法.....	24
3-1. 液体クロマトグラフを利用した方法.....	24
3-2. 5hmC のグリコシル化を利用した方法.....	24
3-2-1. TAB-seq 法.....	24
3-2-2. ACE-seq 法.....	24

3-2-3. hMe-Seal 法.....	25
3-3. oxBS-seq 法	25
3-4. 電気化学的方法	25
3-5. ELISA	25
3-6. 各種ヒドロキシメチル化レベル測定法の比較.....	26
第 6 節 本研究の目的と意義	28
第 2 章 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いたヘミメチル化レベル測定法の開発.....	31
第 1 節 緒言.....	31
第 2 節 実験試薬・機器.....	33
第 1 項 試薬及び消耗品	33
第 2 項 実験機器.....	34
第 3 節 実験方法.....	35
第 1 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質発現ベクターの構築.....	35
第 2 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質の組換え生産.....	36
第 3 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質のヘミメチル化 DNA に対する結合能解析	38
第 4 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いたヘミメチル化レベル測定法の検討.....	39
4-1. dsDNA 濃度検討.....	39
4-2. DNA インターカレーター濃度検討.....	40
4-3. ヘミメチル化レベル測定法の検討.....	40
第 4 節 実験結果・考察.....	41
第 1 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質発現ベクターの構築.....	41
第 2 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質の組換え生産.....	44
第 3 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質のヘミメチル化 DNA に対する結合能解析	46
第 4 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いたヘミメチル化レベル測定法の検討.....	47
4-1. dsDNA 濃度検討.....	49
4-2. DNA インターカレーター濃度検討.....	52
4-3. ヘミメチル化レベル測定法の検討.....	55
第 5 節 結言	58
第 3 章 UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いたヒドロキシメチル化レベル測定法の開発..	59
第 1 節 緒言.....	59
第 2 節 実験試薬・機器.....	61
第 1 項 試薬及び消耗品	61
第 2 項 実験機器.....	62
第 3 節 実験方法.....	63
第 1 項 蛋白質発現ベクターの構築.....	63
1-1. UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質発現ベクターの構築	63

1-2. MBD 発現ベクターの構築.....	64
第 2 項 蛋白質の組換え生産.....	65
2-1. UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質の組換え生産.....	65
2-2. MBD の組換え生産.....	66
第 3 項 UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質のヒドロキシメチル化 DNA に対する結合能解析.....	67
3-1. ヒドロキシメチル化 DNA に対する結合能解析.....	67
3-2. MBD 存在下におけるヒドロキシメチル化 DNA に対する結合能解析.....	68
第 4 項 UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いたヒドロキシメチル化レベル測定法の検討.....	69
4-1. ヒドロキシメチル化レベルの測定.....	69
4-2. MBD 存在下でのヒドロキシメチル化レベルの測定.....	70
4-3. TET2 処理したゲノム DNA におけるヒドロキシメチル化シトシンの検出.....	71
4-3-1. TET2 を用いたゲノム DNA のヒドロキシメチル化.....	71
4-3-2. TET2 処理ゲノム DNA におけるヒドロキシメチルシトシンの検出.....	71
4-3-3. TET2 処理ゲノム DNA を用いた検出限界の検討.....	72
第 4 節 実験結果・考察.....	73
第 1 項 蛋白質発現ベクターの構築.....	73
1-1. UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質発現ベクターの構築.....	73
1-2. MBD 発現ベクターの構築.....	76
第 2 項 蛋白質の組換え生産.....	78
2-1. UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質の組換え生産.....	78
2-2. MBD の組換え生産.....	80
第 3 項 UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質のヒドロキシメチル化 DNA に対する結合能解析.....	81
3-1. ヒドロキシメチル化 DNA に対する結合能解析.....	81
3-2. MBD 存在下におけるヒドロキシメチル化 DNA に対する結合能解析.....	82
第 4 項 UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いたヒドロキシメチル化レベル測定法の検討.....	84
4-1. ヒドロキシメチル化レベルの測定.....	84
4-2. MBD 存在下でのヒドロキシメチル化レベルの測定.....	87
4-3. TET2 処理したゲノム DNA におけるヒドロキシメチル化シトシンの検出.....	91
4-3-1. TET2 を用いたゲノム DNA のヒドロキシメチル化.....	91
4-3-2. TET2 処理ゲノム DNA におけるヒドロキシメチルシトシンの検出.....	91
4-3-3. TET2 処理ゲノム DNA を用いた検出限界の検討.....	95
第 5 節 結言.....	97

第 4 章 メチルシトシン酸化酵素 TET2 を用いたゲノム DNA 全体のメチル化レベル測定法の開発.....	98
第 1 節 緒言.....	98
第 2 節 実験試薬・機器.....	100
第 1 項 試薬及び消耗品.....	100
第 2 項 実験機器.....	101
第 3 節 実験方法.....	102
第 1 項 TET2 発現ベクターの構築.....	102
第 2 項 TET2 の組換え生産.....	103
第 3 項 低メチル化ゲノム DNA の調製.....	104
第 4 項 TET2 を用いたゲノム DNA 全体のメチル化レベル測定法.....	105
第 4 節 実験結果・考察.....	106
第 1 項 TET2 発現ベクターの構築.....	106
第 2 項 TET2 の組換え生産.....	108
第 3 項 低メチル化ゲノム DNA の調製.....	109
第 4 項 TET2 を用いたゲノム DNA 全体のメチル化レベル測定法.....	110
4-1. ゲノム DNA 至適濃度の検討.....	110
4-2. ゲノム DNA 全体のメチル化レベルの測定.....	112
第 6 節 結言.....	113
第 5 章 結論.....	114
著書目録.....	122
謝辞.....	123
引用文献.....	125

略語一覽

5caC	5-carboxylcytosine
5fC	5-formylcytosine
5ghmC	5-glucosylhydroxymethylcytosine
5hmC	5-hydroxymethylcytosine
5mC	5-methylcytosine
8oxoG	8-oxoguanine
AD	Alzheimer's disease
BER	Base-excision repair
BRET	Bioluminescence resonance energy transfer
CTCF	CCCTC binding factor
DNMT	DNA methyltransferase
DTT	Dithiothreitol
Fluc	Firefly luciferase
LOD	Limit of detection
LINE-1	Long interspersed nucleotide element 1
MBD	Methyl-CpG binding domain
MeCP	Methyl-CpG binding protein
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase 1
Oluc	<i>Oplophorus</i> luciferase
PD	Parkinson's disease
ROS	Reactive oxygen species
RSD	Relative standard deviation
SRA	SET and RING associated
TDG	DNA thymine glycosylase
TET	Ten-eleven translocation
UHRF	Ubiquitin like with PHD and Ring finger domains
α -KG	α -Ketoglutarate

第 1 章

緒論

第1章 緒論

第1節 緒言

DNA メチル化は、ゲノム DNA における CpG 配列のシトシンの 5 位炭素がメチル化され、5mC (5-methylcytosine)となる反応である。遺伝子のプロモーター領域における CpG のメチル化が転写活性を抑制することが分かっており^{1,2}、そのため DNA メチル化は遺伝子発現制御において大きな役割を持つ³。さらにヒトゲノム DNA の約 45%を占めるトランスポゾン⁴は 90%以上がメチル化されており⁴⁻⁶、メチル化によるトランスポゾンの不活性化は、トランスポゾンの挿入による異常な遺伝子発現やゲノム改変などの影響を抑えるため、ゲノム DNA 全体のメチル化はゲノム DNA の安定性維持に寄与すると考えられている⁷。DNA メチル化は親細胞から娘細胞へと、メチル化維持酵素 DNMT1 などによって維持されていく。しかし、がん細胞では DNA メチル化異常が生じており、正常細胞と比較してゲノム DNA 全体のメチル化レベルの低下と、がん抑制遺伝子の高メチル化による発現抑制が報告されている⁸⁻¹⁰。従ってゲノム DNA のメチル化レベルは、がんのバイオマーカーとして利用されている(Fig.1-1)。

生体内では DNA 複製の際、新生鎖にはメチル化が受け継がれないため、一時的に片鎖のみメチル化された DNA (ヘミメチル化 DNA)が生じる。このヘミメチル化 DNA は Wilm's 腫瘍や卵巣上皮性腫瘍のタンデム反復配列 *NBL2* や *Sat2* で多く存在している^{11,12}。従って、ヘミメチル化レベルも同様にがんのバイオマーカーとして期待される。

近年、新たな修飾シトシン塩基として注目されているのが 5hmC (5-hydroxymethylcytosine)である。5hmC はメチルシトシン酸化酵素 TET によって 5mC が酸化されることによって生じ^{13,14}、ゲノム DNA 全体の 5hmC 量は大腸がん¹⁵、膵臓がん¹⁶、肺がん及び脳腫瘍¹⁷で低下していることが報告されている。5hmC はがん細胞だけでなく、中枢神経系疾患との関連も報告されており^{18,19}、がんや中枢神経系疾患の診断のためには、5mC だけでなく 5hmC もバイオマーカーになると考えられる。

本章では DNA メチル化、ヘミメチル化、ヒドロキシメチル化についての知見や生体内での DNA メチル化、ヒドロキシメチル化機構についての知見を述べた後、がんを始めとする疾病におけるシトシン修飾状態の異常、さらに修飾シトシン塩基に結合する蛋白質についての知見をまとめ、ゲノム DNA 内の修飾シトシン塩基を測定する意義について述べる。その後、既存の DNA メチル化、ヘミメチル化及びヒドロキシメチル化レベルの測定法についてまとめ、本研究の意義を述べる。

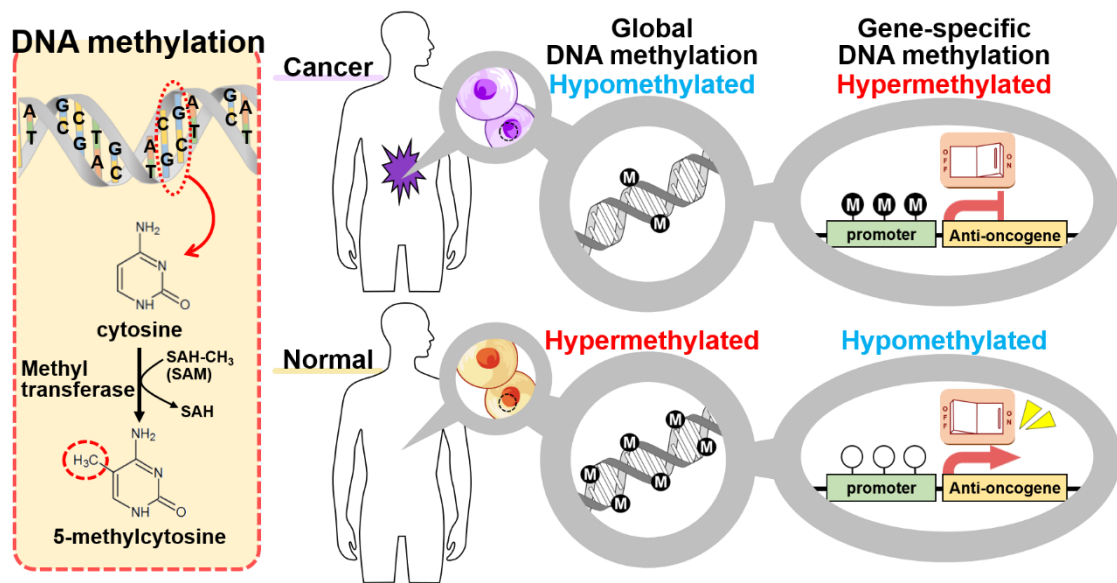


Fig.1-1 DNA methylation pattern in cancer cell and normal cell

Aberrant DNA methylation, the hypermethylation of promoter regions of cancer associated-genes and the global hypomethylation of genomic DNA, has been widely observed in various cancer. Therefore, the measurement of global DNA methylation levels is utilized to assess cancer risk.

第 2 節 シトシン修飾に関する知見

エピジェネティクスとは「DNA 塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現の制御・伝達するシステムと、その現象を探求する学術分野」のことである²⁰。このエピジェネティクスの主要な機構としてヒストン修飾と DNA 修飾が挙げられる。これらのエピジェネティックな修飾は胚発生や細胞の分化に関わっているだけでなく、これらの修飾の変化ががんを始めとする様々な疾病に寄与することがわかっている。

第 1 項 DNA のメチル化

1-1. DNA メチル化維持機構

脊椎動物のゲノム DNA における DNA のメチル化は、ほぼすべてが CpG 配列中のシトシンのメチル化である。CpG 配列中のシトシンは DNA メチルトランスフェラーゼの触媒反応により、SAM (S-adenosylmethionine) からメチル基がシトシンの 5 位炭素(5-methylcytosine; 5mC)に転移されることでメチル化される(Fig.1-2)。DNA メチル化は、体細胞では細胞分裂後の娘細胞にも維持され、この維持機構で中心的に働く蛋白質が維持型 DNA メチル化酵素 DNMT1 (DNA methyltransferase 1) とユビキチンリガーゼ UHRF1 (Ubiquitin like with PHD and Ring finger domains 1) である。DNA 複製が起こると新生鎖にはメチル化修飾が受け継がれず、一時的に片鎖のみがメチル化された DNA (ヘミメチル化 DNA) が生じる。UHRF1 はヘミメチル化 DNA 結合ドメイン SRA (SET and RING-associated) により、ヘミメチル化 DNA を認識する。この時、UHRF1 はヒストン H3 をユビキチン化し、このユビキチン化ヒストン H3 に DNMT1 が結合する。そうすることで、DNMT1 はヘミメチル化 DNA を認識してヘミメチル化 DNA のメチル化されていない CpG をメチル化し、親細胞のメチル化状態は娘細胞に維持される(Fig.1-2)²¹。一方で、配偶子形成や初期発生の段階で、新たにメチル化を確立する反応(*de novo* methylation)を触媒する酵素として DNMT3A と DNMT3B が知られている^{3,22,23}。

1-2. メチルシトシンによる遺伝子発現制御

ゲノム DNA 中の DNA メチル化状態の変化は遺伝子発現を制御する³。遺伝子のプロモーター領域における CpG のメチル化が転写活性を抑制することが分かっている^{1,2}。その理由としてはまず、メチル化によって転写因子の結合サイトへの結合性が下がることが挙げられる²⁴。しかし近年、標的配列がメチル化されることによって結合性が増す転写因子が報告された。メチル化 DNA に対して特異的な転写因子のなかでも転写を活性化するものと抑制に働くものに分類され、HOXB13, HOXC11 や OCT4 は結合サイトのメチル化によって、結合サイト下流の遺伝子の転写を活性化することがわかった²⁵。次に DNA メチル化が遺伝子発現制御する機構として、メチル化 CpG 結合蛋白質がメチル化部位に結合することによってクロマチン構造が変化し、転写が抑制されることが挙げられる。メチル化 CpG 結合蛋白質である MeCP2 (Methyl-CpG-binding protein 2), MBD1 (Methyl-CpG-binding domain 1) 及び MBD2 が

メチル化 DNA に結合することによって、転写を抑制することが分かっている²⁶⁻²⁸。これは、これらの MBD 蛋白質がメチル化 CpG に結合した際にヒストン脱アセチル化酵素 HDAC (Histone Deacetylase) が集積し、クロマチン凝集を引き起こすことで転写が抑制されるからである^{27,29}。

さらに DNA メチル化はレトロトランスポゾンの働きも制御している^{30,31}。ヒトゲノム DNA は遺伝子領域とトランスポゾンで構成されており、トランスポゾンはヒトゲノム DNA の約 45% を占めている³²。そのため、トランスポゾン配列のメチル化レベルはゲノム DNA 全体のメチル化レベル相関すると考えられる^{33,34}。通常、*LINE-1* (Long interspersed nucleotide element 1) や *Alu* などのレトロトランスポゾンの CpG は 90% 以上がメチル化されており^{5,6}、これはトランスポゾンの挿入による異常な遺伝子発現やゲノム改変などの影響を抑える為であると考えられている⁷。メチル化 DNA だけでなく、ヘミメチル化 DNA も遺伝子発現制御に関わると考えられる。近年、ChIP-seq や Bisulfite sequencing により、ヘミメチル化 CpG が転写を制御するインシュレーター構造に関わる CTCF/cohesin の結合部位近隣に多く存在することが明らかにされた³⁵。さらに、DNA 修復や CTCF の制御に関連する PARP1 (Poly (ADP-ribose) polymerase-1) がメチル化と比較してヘミメチル化 CpG に優先的に結合するため³⁶、ヘミメチル化 DNA は遺伝子の発現制御に関わると考えられる。

DNA メチル化状態は酸化ストレスによっても変化することが分かっている。酸化ストレスは、スーパーオキシド(O_2^-)やヒドロキシラジカル($\cdot OH$)、過酸化水素などの活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) の過剰な産生によって引き起こされ、DNA 鎖の切断や断片化などの DNA 損傷や 8oxoG (8-oxoguanine)、Thymine glycol、2-OHA (5-hydroxyadenine) などの酸化塩基を生じさせる。DNA 塩基のなかでもグアニンは酸化されやすいため、酸化塩基の中でも 8oxoG の存在量が多いことが報告されている^{37,38}。この 8oxoG の形成により近傍の 5mC の脱メチル化が誘導されることがわかっている。MeCP2 の MBD が CpG 中のグアニンの酸化によってメチル化 CpG への結合性が阻害されることや³⁹、OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase 1) が 8oxoG に結合した際に TET1 がその部位に集積して近隣の 5mC の脱メチル化反応を触媒する機構が報告されている⁴⁰。つまり、遺伝子プロモーター領域における 8oxoG は DNA 脱メチル化の誘導を通じて、遺伝子発現を制御すると考えられる。

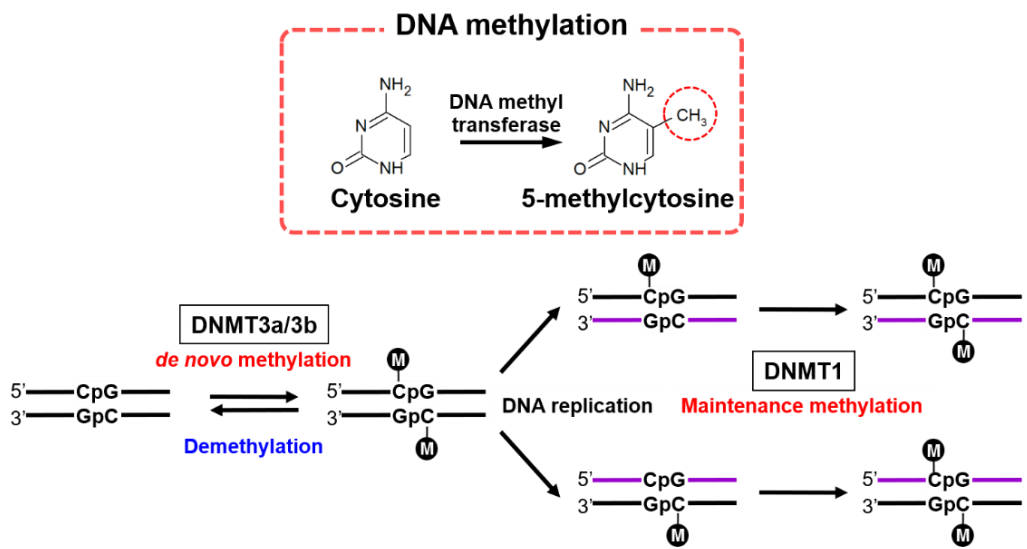


Fig.1-2 Maintenance of DNA methylation status by DNA methyltransferase

In vertebrate, DNA methylation occurs at a cytosine of CpG dinucleotide (5-methylcytosine). The three major DNA methyltransferase (DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B) are identified in mammalian. DNMT1 plays a crucial role in the maintenance of DNA methylation pattern, while DNMT 3A and 3B is responsible for the establish of *de novo* DNA methylation.

第2項 DNAの脱メチル化

2-1. DNAの脱メチル化機構

親細胞のDNAメチル化状態が維持される一方で、様々な生物学的要因でDNAメチル化の損失、つまりDNA脱メチル化が生じていることが報告されている⁴¹。DNA脱メチル化には受動的な反応と能動的な反応が存在し、受動的な反応はDNA複製の際に親鎖のメチル化パターンが新生鎖に維持されず、メチル化が外れてしまうことを指す。一方、能動的なDNA脱メチル化反応は主に始原生殖細胞で生じることが報告されており、植物や真菌類で反応機構や関連分子が同定されていたが、哺乳類においては同定されていなかった⁴²。しかし、能動的な脱メチル化反応に関与する酵素としてTET (Ten-eleven translocation)が同定され、哺乳類ではTETファミリー蛋白質としてTET1, TET2, TET3が存在し、いずれも触媒ドメインであるCysteine-rich domainとDSBH (Double stranded β -helix) domainを保持している(Fig.1-3)⁴³⁻⁴⁶。TET1とTET3は非メチル化CpG結合ドメインCXXCを保持している一方で⁴⁷、TET2のCXXCは進化の過程で触媒ドメインから切り離され、現在はIDAX/CXXC4遺伝子にコードされている^{43,46,48}。それぞれ触媒する反応は同じだが発現場所が異なり、TET1はES細胞特異的に存在し、TET2は様々な組織、TET3は肺、膵臓および脾臓などで発現していることが報告されている⁴⁹。TETはFe(II)/ α -KG (α -ketoglutarate)依存性ジオキシゲナーゼの1つであり、5mCから5hmC (5-hydroxymethylcytosine), 5fC (5-formylcytosine), 5caC (5-carboxylcytosine)へと連続的に酸化する反応を触媒する(Fig.1-4A)^{13,14}。この酸化反応の過程で、 α -KGはコハク酸に変換され、二酸化炭素が放出される(Fig.1-4B)⁵⁰。さらにこの反応過程でFe(II)はFe(III)に酸化されるが、このFe(III)を元のFe(II)に還元することにアスコルビン酸が関与している^{45,50,51}。そのため、アスコルビン酸存在下ではTETの酸化反応が亢進される⁵²⁻⁵⁴。TETの5mC酸化反応によって生じた5fCと5caCは、TDG (DNA thymine glycosylase)により切断された後、BER (Base-excision repair) pathwayによって非修飾のシトシンへ修復される⁴⁴。TDGは2本鎖DNA中のチミン・グリシン mismatchペアのチミンを切断するDNAグリコシラーゼであるが⁵⁵、2011年に2本鎖DNA中のグアニンと塩基対を形成する5fCと5caCへのグリコシラーゼ活性が報告された^{56,57}。さらにTDGのknockdownでES細胞中の5caCレベルが上昇したこと、HEK293細胞中のTETとTDGの過剰発現でTETの酸化反応によって生じた5caCが損失したことより、TDGはDNA脱メチル化反応に関連する酵素であると考えられている^{56,58}。

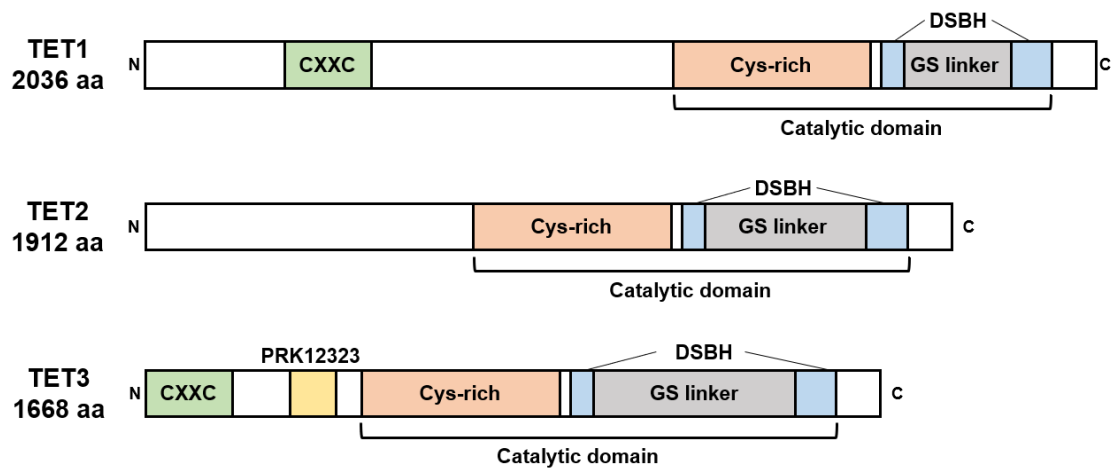
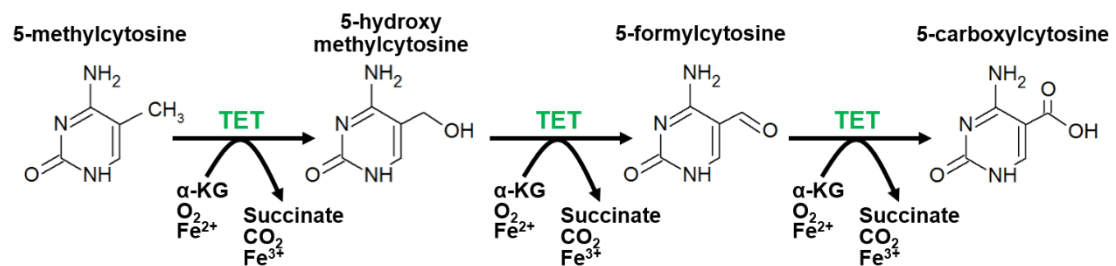


Fig.1-3 Schematic of TET enzymes

TET family (TET1, TET2, and TET3) contains a core catalytic domain: the cysteine (Cys)-rich domain and double-stranded β -helix (DSBH) domain. TET1 and TET3 retain a CXXC domain which recognizes unmethylated CpG. Meanwhile, TET2 has lost of CXXC domain through evolution and encodes IDAX (known as CXXC4).

(A)



(B)

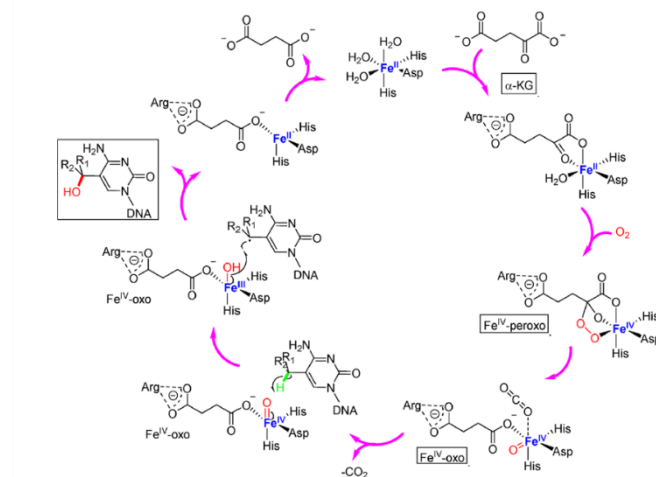


Fig.1-4 TET-catalyzed 5mC oxidation⁴⁵

(A) Catalytic pathway for generation of 5hmC, 5fC, and 5caC by TET. (B) TET-catalyzed 5mC oxidation and the radical rebound mechanism.

2-2. ヒドロキシメチルシトシンによる遺伝子発現制御

TET の 5mC 酸化反応過程で生じる 5hmC は肝臓、腎臓、大腸、脳細胞に存在していることが示されており、なかでも脳細胞で多く存在している^{15,59,60}。ヒト ES 細胞においては、TSS (Transcription start site)近傍やインシュレーター構造形成配列結合蛋白質 CTCF や転写因子 NANOG, OCT4 の結合サイトに 5hmC が多く存在していることが示されている^{61,62}。さらに GO (Gene ontology)解析の結果、胚発生や脳形成、シグナル伝達に関わる遺伝子領域に 5hmC が存在することが示された⁶²。つまり、上記の組織において 5hmC は遺伝子発現制御に関連すると示唆される。遺伝子発現と 5hmC レベルの相関を解析するために、Xu らはマウス胚性幹細胞においてマイクロアレイ解析を実施し、遺伝子発現が低レベルの遺伝子のプロモーター領域では 5hmC が高レベルで存在する一方で、遺伝子発現がハウスキーピング遺伝子などの中程度または高レベルの遺伝子プロモーターの場合では 5hmC が低いレベルで存在することを示している⁶³。つまり、遺伝子プロモーター領域の 5hmC は遺伝子転写活性と負に相関していることが示唆される。

以上のように、正常細胞ではある一定の状態、メチル化修飾を始めとした様々なシトシン修飾が形成されているが、がんを始めとした疾病ではこのシトシン修飾状態が変化する。この変化によって遺伝子発現制御やゲノム DNA の安定性に影響が生じるのである。

第3節 修飾シトシン塩基結合蛋白質に関する知見

第1項 メチル化 CpG 結合蛋白質

現在、MBD 蛋白質ファミリーとして MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MBD5, MBD6 が同定されており、その他にも MBD をドメインとして含む蛋白質として SETDB1, SETDB2, BAZ2A, BAZ2B が報告されている。MBD 蛋白質ファミリー-MBD1-6 は全て、MeCP2 MBD と配列相同性を持つマルチドメイン蛋白質で^{64,65}、それぞれメチル化 CpG に結合するが、多様の役割を持つ(Fig.1-5)。MBD 蛋白質ファミリーの中でも、MBD1 が最もメチル化 CpG への特異性が高いことが報告されており、その解離定数はメチル化 CpG では 5 nM、非メチル化 CpG では 1.4 μ M である⁶⁶。MBD2 は他の MBD 蛋白質ファミリーと同様にメチル化 CpG に対して高い特異性を持つが、4箇所の変異(K161R, F187I, T200S, F208Y)を入れることによって、ヘミメチル化 CpG に対してもメチル化 CpG と同等の親和性を持たせることが出来ることが報告されている⁶⁷。野生型 MBD2 のメチル化 CpG への解離定数は 5.9 nM であることが報告されているが⁶⁸、この MBD2 変異体のヘミメチル化 CpG に対する解離定数は 5.6 nM であった。

UHRF1 (ヒトで ICBP90、マウスで NP95 としても知られる)は DNA 修飾とヒストン修飾に関連するマルチドメインで構成されており、UHRF1 は N-terminal ubiquitin-like domain, Tandem Tudor domain, PHD, SRA domain, C-terminal RING (really interesting new gene) domain の5つの機能ドメインを有する(Fig.1-6)^{69,70}。SRA domain がヘミメチル化 CpG に結合すると、TTD と PHD がヒストン H3 を認識し、RING によってヒストン H3 がユビキチン化される。この部位を標的として DNMT1 が集積し、ヘミメチル化 CpG の相補鎖の未修飾のシトシンはメチル化される(Fig.1-6)。UHRF1 の SRA domain は非メチル化、メチル化 CpG (K_d : 0.28 μ M, 0.25 μ M) よりも高い親和性でヘミメチル化 CpG (K_d : 0.05 μ M)に結合する⁷¹⁻⁷³。SRA はヘミメチル化 CpG の 5-methylcytosine を2重らせん構造の外に引っ張り出すこと(Base flipping)によって認識している⁷⁴⁻⁷⁶。この Base-flipping によって 5mC 近傍塩基の2本鎖形成を不安定化することが報告されている^{72,75}。SRA domain は結晶構造解析により、ヘミメチル化 CpG 結合に寄与するアミノ酸として Arg⁴⁴³, Tyr⁴⁶⁶, Asp⁴⁶⁹ が同定されている。Asp⁴⁶⁹ の変異体は野生型と比較して K_d 値が 250 倍低下することが示された⁷³。よって、SRA domain のヘミメチル化 CpG 結合活性において、Asp⁴⁶⁹ が重要な役割を担っていると考えられる。さらに SRA domain はヘミメチル化 CpG に対して、8つのリン酸基に作用しており、そのうち5つは 5-methylcytosine (5mC)を含む DNA 鎖の 5mC 近傍塩基のものである。SRA は CpG 認識ループ(Asn⁴⁹⁴-Arg⁴⁹⁶)と 5mC 結合ポケット(Tyr⁴⁸³-Ser⁴⁹⁶, Tyr⁴⁷¹-Asp⁴⁷⁴)を持ち、Base flipping 促進ループ(His⁴⁵⁰-Val⁴⁵¹)によって、ヘミメチル化 CpG の 5mC を 5mC 結合ポケットへ Flipping することが分かっている(Fig.1-7)⁷⁵。

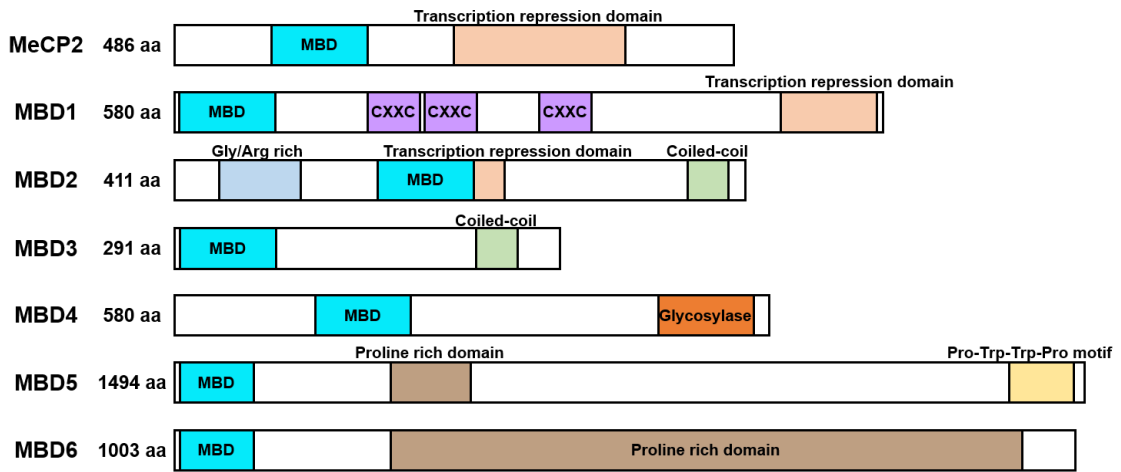


Fig.1-5 Characteristic domains of methyl-binding domain protein family

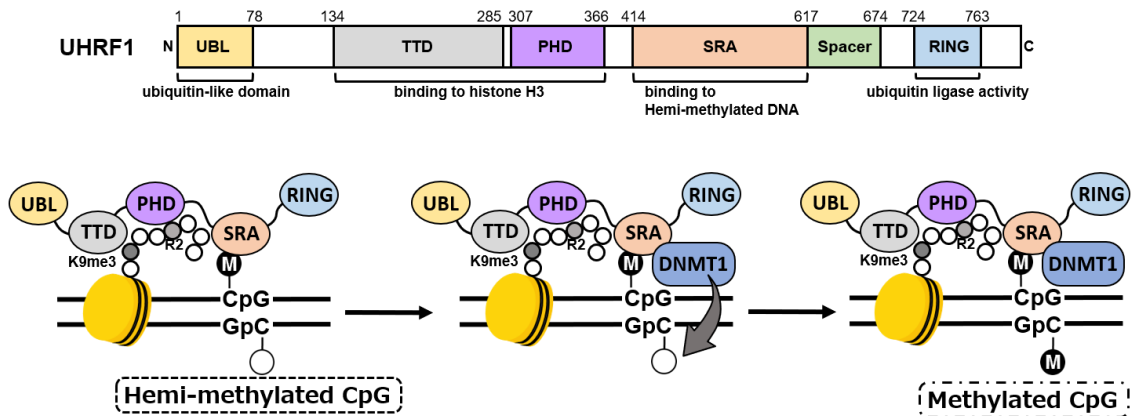


Fig.1-6 Characteristic domains of UHRF1

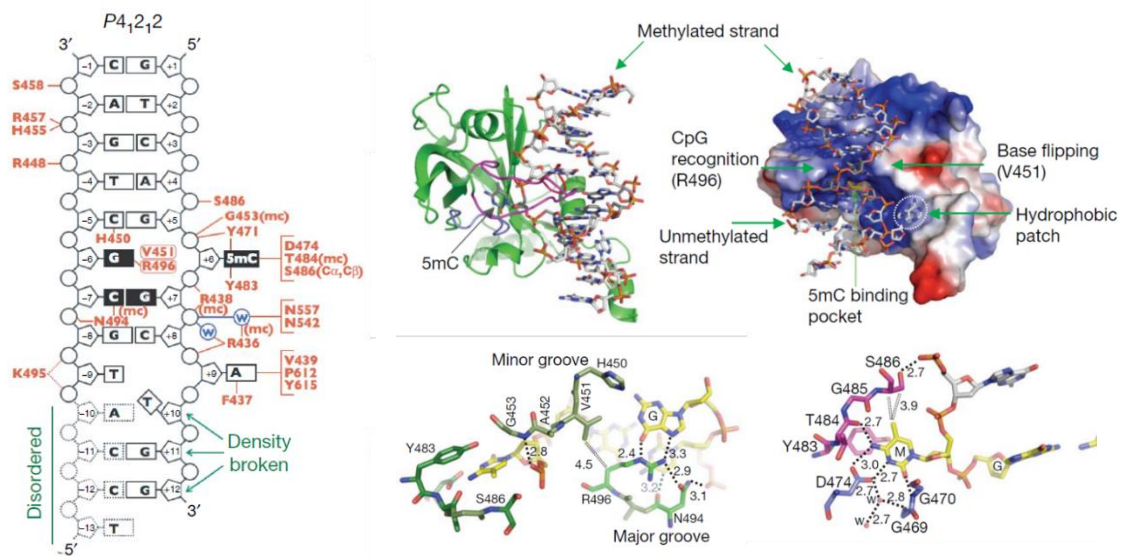


Fig.1-7 Structure and binding of the SRA domain of UHRF1

第 2 項 ヒドロキシメチル化 CpG 結合蛋白質

ヒト生体内において 5hmC に結合特異性を持つ蛋白質は限られる。その中で最も知られている蛋白質として UHRF2 (ヒトで NIRF としても知られる) が挙げられる。UHRF2 は UHRF1 と同様に UHRF 蛋白質ファミリーに含まれ、細胞周期制御やユビキチン化活性を持つ^{77,78}。UHRF1 と UHRF2 では、配列・構造共に高い相同性を持ち (Fig.1-8)⁷⁰、ヒトゲノム DNA 中において SRA domain を保持するのは、この 2 つの蛋白質のみである。UHRF1 と UHRF2 は同じ細胞内局在を示すが、2 つの蛋白質間で相互作用がないことが分かっている一方で、UHRF2 は UHRF1 と同様に DNMT1 と相互作用することが報告されている⁷⁹。UHRF2 と DNMT1 の相互作用が確認されたが、UHRF1 と比べて細胞周期 S 期に DNMT1 をリクルートしないことが分かった。UHRF1 はゲノム DNA 全体の DNA メチル化維持に関わっているが、UHRF2 は特定の遺伝子座でのみ DNA メチル化維持の役割を果たすことが報告されている⁸⁰。さらに、UHRF2 は脳で高度に発現していることから⁸¹、脳内の DNA メチル化維持に重要な役割を果たしていると考えられる。2016 年に Liu らが UHRF2 に相互作用する蛋白質として Zinc finger protein 618 (ZNF618) を同定し⁸²、ZNF618 の存在が、UHRF2 の DNA メチル化維持を特定領域のみに制限している可能性があることを示唆した。

UHRF1 の SRA domain はヘミメチル化 CpG に結合特異性を持つ一方で、UHRF2 SRA domain はヒドロキシメチル化 CpG に結合特異性を持ち (K_d : 1.02 μ M)、非メチル化 CpG の 3.2 倍、メチル化 CpG の 2.8 倍高く結合する (Table 1-1)⁸³。ヒドロキシメチル化 CpG に特異的に結合することがわかっている一方で、UHRF2 が生体内の 5hmC 維持に関わるかどうかなど、UHRF2 の生体内の役割は解明されていない部分が殆どである。

UHRF2 SRA-ヒドロキシメチル化 DNA の結晶構造解析で、UHRF2 SRA は 7 本の β ストランドと 4 本の α ヘリックスからなる鞍型構造で形成されており、 $\beta 3$ - $\beta 4$ (Ala⁴⁹²-Glu⁴⁹⁸) と $\beta 4$ - $\alpha 2$ で形成される 5hmC 結合ポケットで 5hmC を認識し、2 重らせん外に Base flipping していることがわかった⁸³。UHRF1 SRA と比べると、UHRF2 SRA の結合ポケットを形成する $\beta 3$ - $\beta 4$ ループ構造が異なり、UHRF1 よりも広く組むことで、5hmC に結合しやすくなっていると考えられる。5hmC 結合ポケット内の芳香環をもつアミノ酸 Phe⁴⁹⁵ と Tyr⁵⁰⁷ は疎水性相互作用またはファンデルワールス力によって 5hmC のピリミジン環に相互作用している。さらに The⁵⁰⁸ または Gly⁵⁰⁹ のいずれかが 5hmC のヒドロキシ基と、Glu⁴⁹⁸ が 5hmC のアミノ基と、Ala⁴⁹², Gly⁴⁹³, Gly⁴⁹⁴ が 5hmC の O 原子と水素結合を形成する。さらに $\beta 3$ - $\beta 4$ ループ構造先端の Val⁴⁷⁵ が Flipping out した 5hmC があつた 2 本鎖上に入り込むことで、UHRF2 SRA は安定的に 5hmC と結合する (Fig.1-9)。 $\beta 4$ - $\alpha 2$ を繋ぐ NKR ループ構造 (513-524 aa) に変異を入れることによって、フルヒドロキシメチル化への特異性が低下し、ヘミヒドロキシメチル化と同等の解離定数まで低下してしまった。このことより、UHRF2 SRA は NKR ループ構造によって、フルヒドロキシ化とヘミヒドロキシ化を区別して 5hmC に結合していることが示唆された。

Table 1-1. Binding affinity of UHRF SRA domain^{66,83}

	C/C	5mC/C	K_d (μ M)		
			5hmC/C	5mC/5mC	5hmC/5hmC
UHRF1 SRA	3.30 \pm 0.70	0.11 \pm 0.02	1.30 \pm 0.20	1.30 \pm 0.20	1.50 \pm 0.20
UHRF2 SRA	3.20 \pm 0.38	3.30 \pm 0.26	2.21 \pm 0.18	2.80 \pm 0.14	1.02 \pm 0.08

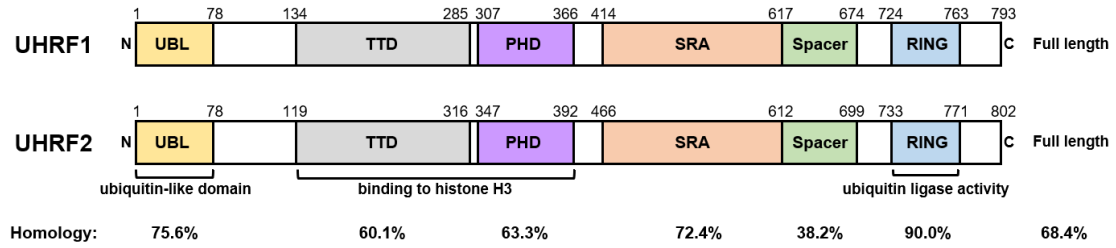


Fig.1-8 Sequence homology between human UHRF1 and UHRF2

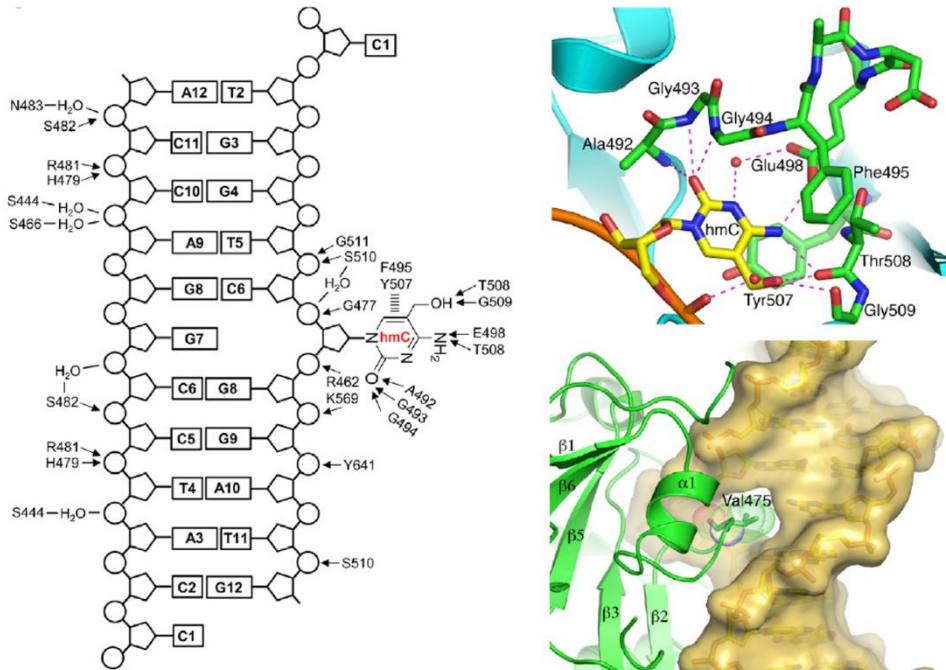


Fig.1-9 Structure and binding of the SRA domain of UHRF2 SRA

第4節 がんを始めとする疾病におけるシトシン修飾の異常に関する知見

がん細胞では正常な細胞と比べ、DNAメチル異常が生じている。具体的には、がん抑制遺伝子のプロモーター領域の高メチル化、ゲノムDNA全体の低メチル化である⁸⁻¹⁰。以上のメチル化異常によってがん細胞では、がん抑制遺伝子のサイレンシングやレトロトランスポゾンの活性化、ゲノムDNAの不安定化が引き起こされる。

第1項 遺伝子特異的なシトシン修飾異常

この正常細胞とがん細胞でのメチル化レベルの違いはがん診断のバイオマーカーとして利用されている。様々なタイプのがんを検出するために、血漿・血清中のcircDNA (cell-free circulating DNA)における遺伝子特異的なDNAメチル化レベルが利用されている⁸⁴。血液中には細胞のアポトーシスや壊死により、その細胞由来のDNAが流れ出る。このcircDNAの存在量は健常者よりもがん患者で増加しており、健常者では血液当たり平均30 ng/mL、がん患者では平均180 ng/mLであることが報告されている⁸⁵。circDNAのメチル化レベルは、大腸がん、肺がん、乳がんではそれぞれ、*SEPT9* (Septin 9)^{86,87}, *RASSF1A* (Ras association domain family member 1)⁸⁸⁻⁹⁰, *CST6* (Cystatin M or E/M)⁹¹の高メチルが報告されている。がん以外においてもアルツハイマー病/軽度認知症では *COASY* (Coenzyme A synthase), *SPINT1* (Serine peptide inhibitor Kunitz type I)の高メチル⁹²、1型糖尿病では *Insulin* (INS)の低メチル化⁹³、心筋梗塞では *FAM101A* (Family with sequence similarity 101 member A)の低メチル化⁹⁴が報告されており、これらの疾患のバイオマーカーとして期待できる(Table 1-2)。

Table 1-2. DNA methylation of cell-free circulating DNA in plasma

Gene	Disease	DNA methylation		Reference
		Disease	Normal	
<i>SEPT9</i>	Colorectal cancer	90–100%	10–20%	86,87
<i>CST6</i>	Breast cancer	Hypermethylated		91
<i>RASSF1A</i>	Lung cancer	47%	10%	88-90
<i>COASY</i>	AD, Mild Cognitive Impairment	40–47%	20–25%	92
<i>SPINT1</i>				
<i>INS</i>	Type 1 diabetes	20%	80%	93
<i>FAM101A</i>	Myocardial infarct	12%	80–90%	94

第2項 ゲノム DNA 全体のシトシン修飾異常

ゲノム DNA 全体の低メチル化についても様々な組織のがんで見られ^{33,95-97}、がんのステージによっても異なり、ステージが上がるとメチル化レベルが低下していく^{98,99}。ゲノム DNA 全体のメチル化レベルと相関のある反復配列である *NBL2* (a tandem repeat in acrocentric chromosomes), *Sat2* (satellite 2 in a juxtacentromeric heterochromatin) はがん細胞での低メチル化が確認されており、且つ、卵巣がんや腎臓がんの一種である Wilm's 腫瘍では、ヘミメチル化レベルが上昇している^{11,12}。さらにゲノム DNA 全体の 5hmC 量も低下している。大腸がん¹⁵、膵臓がん¹⁶、肺がん及び脳腫瘍¹⁷ で低下していることが示されている。故にがん細胞ではゲノム DNA 全体の脱メチル化が活発に生じていると言える¹⁰⁰。

ヘミメチル化 CpG はがん細胞における活発な脱メチル化反応において、両鎖メチル化 CpG の片方のみしか脱メチル化されなかったために生じると考えられている。また、ヘミメチル化は腫瘍形成に関与すると考えられる。ヘミメチル化 CpG を認識する UHRF1 は通常はメチル化維持酵素 DNMT1 と相互作用してともに生体内のメチル化維持に関わるが、腫瘍形成の過程では DNMT3A/3B と相互作用することが報告されており、腫瘍形成において UHRF1 は de novo メチル化に関与すると示唆された¹⁰¹。つまり、腫瘍形成の過程では UHRF1 が de novo メチル化を誘導することによってがん抑制遺伝子の発現を抑制しているのではないかと考えられる。さらに UHRF1 はがん細胞でゲノム全体の低メチル化が生じる際、過剰発現していることが明らかにされている¹⁰²。以上のことを合わせて UHRF1 が認識するヘミメチル化 CpG は腫瘍形成時に多く生じるのではないかと推測される。

がんの進行に合わせて低メチル化が進む一方で、酸化損傷塩基である 8oxoG はゲノム DNA 全体で増加していくことが報告されている⁹⁹。これは前節でも示した通り、MeCP2 が 8oxoG によってメチル化 CpG への結合性が阻害されること³⁹、OGG1 が 8oxoG に結合した際に TET1 をその部位に集積させること⁴⁰が関連していると考えられる。

近年では、シトシン修飾異常はがん細胞だけでなく、中枢神経系疾患との関連も報告されている^{18,19}。アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)患者のゲノム DNA 全体のメチル化レベル、ヒドロキシメチル化レベルは正常細胞と比較して変化している。しかし、それは脳の部位によって異なっているという報告があり、前頭皮質¹⁰³・中前頭回・中側頭回¹⁰⁴ではメチル化、ヒドロキシメチル化レベルの上昇が確認されている一方で、海馬または海馬傍回ではメチル化、ヒドロキシメチル化レベルの低下が確認されている^{105,106}。脳細胞以外では AD 患者の血液サンプル中のリンパ球においてメチル化、ヒドロキシメチル化レベルの低下が報告されている¹⁰⁷。パーキンソン病(Parkinson's disease; PD)患者のゲノム DNA 全体のメチル化レベル、ヒドロキシメチル化レベルは、AD と同様に低下していることが確認されている¹⁰⁷⁻¹⁰⁹。さらに家族性 PD には *SNCA* (alpha-synuclein) 遺伝子の変異が関連しており¹¹⁰、PD 患者で *SNCA* プロモーター領域のメチル化レベルの低下が観察されている^{111,112}。このことより、*SNCA* の CpG site のメチル化状態は PD のバイオマーカーとして期待されている。その他にもハンチントン病や多発性硬化症、脳血管性認知症、うつ病などの中枢神経系疾患と DNA メチル化状態の異常の関連

が報告されており^{18,107,113}、がんと同様に中枢神経系疾患においても DNA メチル化レベルとヒドロキシメチル化レベルはバイオマーカーとして期待できる。上記したように 5hmC は脳細胞に多く存在していることがわかっている。さらにメチルシトシン酸化酵素 TET やヒドロキシメチルシトシンを認識する UHRF2 も他組織と比べて脳細胞で多く存在していることがわかっており、この *Tet1* と *Uhrf2* それぞれノックアウトさせたマウスの脳細胞のヒドロキシメチル化レベルは正常なマウスより低下することが報告されている¹¹⁴⁻¹¹⁶。さらに *Tet1*^{-/-}マウスと *Uhrf2*^{-/-}マウスは生存能力や繁殖能力に影響は出ず、肉眼的正常も確認されたが、空間的な記憶能力や学習能力が正常なマウスよりも劣ることが明らかにされている¹¹⁴⁻¹¹⁶。つまり、脳におけるヒドロキシメチル化レベルの低下は記憶力の低下を誘導すると考えられ、このことは AD や PD 患者の脳細胞ではヒドロキシメチル化レベルが低下することに関与するのではないかと考えられる。

以上のように、ゲノム DNA 全体のメチル化、ヘミメチル化及びヒドロキシメチル化レベルは、がんや中枢神経系疾患の診断におけるバイオマーカーとして期待でき (Table 1-3)、これら修飾シトシン塩基の検出法の開発は上記疾患を早期発見する上で重要である。

Table 1-3. Global DNA methylation and hydroxymethylation alteration in cancer and neurological disease

Disease	DNA modification	DNA methylation		Reference
		Disease	Normal	
Colorectal cancer	Methylation	57%	76%	97,117
	*Hydroxymethylation	0.0028%	0.0059%	15
Lung cancer	Methylation	54%	70%	96
	*Hydroxymethylation	0.05%	0.1%	17
Pancreatic cancer	Methylation	70–85%	75–90%	118
	*Hydroxymethylation	Decrease compared to normal cell		16
Brain tumor	*Hydroxymethylation	0.2%	1%	17
Ovarian cancer	Methylation	40%	84%	119
	Hemi-methylation	3%	1.8%	11,12
Renal cancer	Methylation	82%	81%	120
	Hemi-methylation	6%	1.8%	11,12
Alzheimer's disease	Methylation	2.5%	4%	107
	*Hydroxymethylation	0.15%	0.2%	
Parkinson's disease	Methylation	2.5%	4%	107
	*Hydroxymethylation	0.08%	0.2%	

* This hydroxymethylation level refers to 5hmC/cytosine in genomic DNA but not in 5hmC/CpG.

第 5 節 修飾シトシン塩基測定法に関する知見

第 1 項 DNA メチル化レベル測定法

ゲノム DNA 中のメチル化レベルの差異は様々な疾患のバイオマーカーとなりうる。そのため、ゲノム DNA のメチル化レベル測定法には特異性、迅速性、簡便性が求められる。現在まで開発されている既存法として、化学処理によって核酸塩基を別の塩基に変換して元の配列と比較する方法や、ゲノム DNA をヌクレオシドレベルまで分断して物性の違いにより定量する方法、核酸塩基の酸化還元性の違いを利用した電気化学的手法、抗体や制限酵素、結合タンパク質など分子認識能を利用した方法などが開発されている。それぞれ既存測定法の特徴を以下に述べ、最後に各手法の検出限界や操作性、測定時間をまとめる。

1-1. バイサルファイト処理を利用した定法

バイサルファイト処理を利用した手法は、DNA メチル化レベル測定法として最も多用されている方法である。ゲノム DNA の未修飾シトシンを化学処理によってスルホン化し、ウラシルに変換させる。一方で、5mC は化学処理でウラシルに変換されない。従って、バイサルファイト処理産物を鋳型に PCR を実施すると、未修飾のシトシンはウラシルに変換されるために、PCR の結果、チミンに変換される(Fig.1-10A)。この配列を比較することで 5mC を検出できる。

RRBS 法(Reduced Representation Bisulfite Sequencing)は、ゲノム DNA をメチル化感受性制限酵素 MspI で切断し、バイサルファイト処理後にゲノム DNA 中の CpG アイランド(CGI)領域を標的に次世代シーケンサー(Next Generation Sequencing; NGS)で解析し、5mC を測定する方法である¹²¹。一方で WGBS 法(Whole Genome Bisulfite Sequencing)は、バイサルファイト処理後に NGS で解析する方法である¹²²。上記の 2 つの方法はどちらもゲノム DNA のソニケーション操作を含み、必要なゲノム DNA 量はそれぞれ、RRBS は 0.01–0.3 µg、WGBS は 5 µg 必要とする¹²¹。NGS を使用するため、ゲノム DNA の 5mC を 1 塩基レベルで検出することが可能だが、高いランニングコストがかかってしまう。

シーケンス解析を用いない手法としては、制限酵素を利用した COBRA 法(Combined Bisulfite Restriction Analysis)が挙げられる¹²³。この方法はバイサルファイト処理後に、特定領域を PCR で増幅する、PCR 産物は制限酵素で切断し、その切断効率から特定領域のメチル化レベルを測定する方法である。NGS を必要とせず、上記 2 つのメチル化レベル測定法と比較すると簡便な方法であるが、解析配列が制限酵素認識領域という制約がある。

以上のようにバイサルファイト処理を利用した手法は、未修飾シトシンと 5mC を化学処理によって完全に区別するため正確性は高い。しかし、バイサルファイト処理だけで 5–6 時間要するという欠点がある。

1-2. 液体クロマトグラフを利用した方法

液体クロマトグラフを利用したメチル化レベル定量法は、バイサルファイト法と比べて、バイサルファイト処理を必要としないために、比較的簡便にメチル化レベルを定量できる方法である。しかし、HPLC にサンプルをかける前にゲノム DNA を DNase、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼでヌクレオシドレベルまで加水分解させる必要がある (Fig.1-10B)。あらかじめ各種ヌクレオシドの標準線を作成しておけば、ゲノム DNA の 5mC の存在量が定量できる^{124,125}。

1-3. 電気化学的方法

電気化学的な手法は、電極に固定化された DNA プローブに、検体であるゲノム DNA をハイブリダイゼーションさせ、作用電極表面での酸化反応をボルタンメトリー法で測定することで、未修飾シトシンと 5mC を区別する方法である (Fig.1-10C)¹²⁶⁻¹²⁸。ボルタンメトリー法で分析する手法は検出限界 0.1 μM と感度が高く、バイサルファイト処理や DNA の加水分解処理を必要としない。さらに、電気化学的手法は装置の小型化が容易なため、on-site 型の疾病診断に応用が可能である。

1-4. 分子認識能を利用した方法

1-4-1. 抗 5mC 抗体を用いた方法

5mC に対する抗体を用いる方法は、抗体の高い特異性を利用しているため、バイサルファイト処理を必要としないながらも、感度良く 5mC を検出できる (Fig.1-10D)。

クロマチン免疫沈降 (Chromatin Immunoprecipitation: ChIP) と NGS を組み合わせた MeDIP-seq (Methyl-DNA Immunoprecipitation) は、抗 5mC 抗体で免疫沈降した DNA を WGA (Whole Genome Amplification) 解析することにより、どこの領域に 5mC が存在するかゲノムワイドに解析する方法である¹²⁹。一方で、MBD を用いてメチル化 DNA を免疫沈降する方法が MBDCap-seq (Methyl-CpG binding domain-based capture and sequencing) であり、MeDIP-seq が 4 μg のゲノム DNA を必要とする一方で、MBDCap-seq は 1 μg のゲノム DNA で解析でき、MeDIP-seq よりも高い割合で CpG 領域中の 5mC を検出できた¹³⁰。しかし、これらの ChIP をベースとした手法はメチル化 DNA のみを単離し、シーケンス解析を行なうために RRBS/WGBS よりもリード数が減少し、且つ全ての CpG の 5mC を検出することが出来ない。さらに、免疫沈降して溶出することで DNA ライブラリーを作製するという点で操作の煩雑性が高いことも挙げられる。

タンパク質の結合能を評価する方法として、生体分子間の相互作用をモニタリングできる表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance: SPR) が知られているが、エピジェネティック修飾の解析においても SPR は利用されている¹³¹。SPR はセンサーチップ上の金

属表面中の電子が、照射された光と共鳴して高い出力の光を発する現象のことを指し、この SPR が生じている金属表面上にプローブ DNA を固定化しておき、そこに標的 DNA を流してハイブリダイゼーションさせる。そこに抗 5mC 抗体を流し、メチルシトシンの相互作用が起こると敏感にその共鳴状態が変化する。従って、検出限界が 0.19 ng のゲノム DNA と、感度良く DNA を検出でき、かつ最短 45 分間で測定が可能である¹³²。しかし、センサーチップの作製が非常に高コストであることや、シーケンス解析を用いるメチル化レベル測定法と比較して量的な特質しか解析できないことが挙げられる。

先述した 2 つの抗体を利用した方法と比較して、ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) は簡単・迅速にメチル化レベルを測定できる方法である^{133,134}。抗 5mC 抗体が固定化されたマイクロプレートにゲノム DNA を加えて、洗浄操作を行い、ウェル内に 5mC を含む DNA のみを残す。そこに HRP (Horseradish peroxidase) 標識した抗 DNA 抗体を添加し、洗浄操作を実施した後、HRP 活性を測定することでメチル化レベルを測定する。ELISA 法は、バイサルファイト法や ChIP-seq、LC/MS 法、SPR 法などと比較して簡便な操作性を持ち、低コストで実施できる。さらに、2011 年には 10 ng のゲノム DNA からメチル化レベルを測定できることが報告された¹³⁴。しかし、サンプルを固定化する度に長い反応時間と複数の洗浄操作を要する。

1-4-2. Methyl acceptance assay

Methyl acceptance assay は DNA メチルトランスフェラーゼ (CpG Methyltransferase: M.SssI) を使用し、酵素反応を利用した方法の 1 つである (Fig.1-10E)¹³⁵⁻¹³⁹。トリチウム標識した SAM (S-[³H-methyl] adenosyl-L-methionine: ³H-SAM) を通常の SAM の代わりに使用し、M.SssI が触媒するメチル基転移反応によって供与された放射性同位元素の受容度を LSC (Liquid Scintillation Counter) によって解析する。本手法は DNA に M.SssI と ³H-SAM を混合して反応させた後、イオン交換濾紙に吸着させ、洗浄操作を行なう。フィルターを乾燥させた後、シンチレーション溶液を加え、LSC 法により解析する。この時、放射性メチル基の受容度はゲノム DNA のメチル化レベルと反比例する。本手法は DNA の検出限界 0.2 µg であるが、ELISA と同様に洗浄操作を必要とし、かつ放射性物質を取り扱う。

1-4-3. DNA 結合蛋白質を用いた方法

Zinc finger の標的配列への結合性を利用して、電気化学的に標的領域のメチル化レベルを測定する方法が開発されている¹⁴⁰。この方法はメチル化 CpG を含むゲノム DNA のみを MBD によって単離し、このゲノム DNA に対して PCR を実施する。PCR 産物に対して、Zinc finger 融合 GDH (glucose dehydrogenase) を加え、GDH の酸化還元反応を電気化学的に測定する (Fig.1-10E)。検出限界は 10² コピーだが、PCR 実施前では 10⁶ コピーのゲノム DNA (約 3 µg) が必要である。本手法は電気化学的に測定するため、検出感度は非常に高いが、MBDCap アッセイと PCR の実験ステップが必要である。

Zinc finger-GDH の GDH 部分を Luciferase に置き換えた Zinc finger-luciferase を用いた

メチル化レベル測定法も開発されている¹⁴¹。本手法も Zinc finger-GDH 法と同様にメチル化 CpG を含むゲノム DNA のみを MBD によって単離して PCR を実施する。この PCR 産物に対して、Zinc finger-luciferase を加え、Luciferase の発光量でメチル化レベルを測定する(Fig.1-10E)。本手法においても検出限界は 10^2 コピーだが、PCR 実施前では 10^6 コピーのゲノム DNA が必要であり、さらに実験操作の煩雑性が高い。

Badran らは 2011 年に、MBD に分割型 Luciferase を融合させた融合蛋白質を用いて、溶液除去や分離を必要としないホモジニアスなメチル化測定法を開発した(Fig.1-10E)¹⁴²。① 2 つに分割した Luciferase (N 末側と C 末側: NFluc, CFluc)にそれぞれメチル化 CpG に結合する MBD と標的配列に結合する Zinc finger を組み合わせた融合蛋白質、②NFluc と CFluc のどちらにも MBD を組み合わせた融合蛋白質を作製する。この NFluc と CFluc を融合させた蛋白質の距離が近接することで初めて発光を示し、これらの発光は①標的配列特異的なメチル化レベル、②ゲノム DNA 全体のメチル化レベルに依存する。本手法の検出限界は僅か 20 ng ゲノム DNA でメチル化レベルを測定できる。しかし、本手法における発光は NFluc と CFluc を融合させた蛋白質が DNA に結合した際の距離に依存するため、メチル化 CpG 密度が高い領域でないと発光を示しづらいという点が挙げられる。

本研究室では、メチル化 CpG に結合する融合蛋白質 MBD 融合 Firefly luciferase (MBD-Fluc)と非メチル化 CpG に結合する融合蛋白質 CXXC 融合 Firefly luciferase (CXXC-Fluc)の 2 種の融合蛋白質によって、ゲノム DNA のメチル化レベルを測定する方法を開発している¹⁴³。本手法はゲノム DNA に結合させた DNA インターカレーターと MBD-Fluc 又は CXXC-Fluc 間で生じる生物発光共鳴エネルギー移動(Bioluminescence Resonance Energy Transfer; BRET)がゲノム DNA のメチル化レベル又は非メチル化レベルに相関することを利用して、具体的な原理としては、DNA インターカレーターを結合させたゲノム DNA に融合蛋白質を加えると、MBD-Fluc はメチル化 CpG に、CXXC-Fluc は非メチル化 CpG に結合する。そこに Fluc の発光基質を加えると Fluc が発光し、近隣の DNA インターカレーターが励起されて蛍光が示される(BRET シグナル)。MBD-Fluc の BRET シグナルからはメチル化レベル、CXXC-Fluc の BRET シグナルからは非メチル化レベルが算出され、これらは負に相関していることが示されている。以上より、2 種の融合蛋白質を用いることでゲノム DNA のメチル化レベルが簡便に測定できることが明らかになった。本手法は MBD-Fluc と CXXC-Fluc の反応を同一溶液内で実施することは出来ず、1 度にメチル化レベルと非メチル化レベルの両方を測定することは出来ないため、同一溶液内で同時にメチル化と非メチル化レベルを測定するために Firefly luciferase よりも低波長側に最大発光波長を持つ *Oplophorus luciferase* (Oluc)に CXXC を融合した CXXC-Oluc が構築された。2 種の DNA インターカレーターを結合させたゲノム DNA に MBD-Fluc と CXXC-Oluc を混合し、それぞれの発光基質を添加することで、同一溶液内でメチル化レベルと非メチル化レベルの両方を測定することが可能になった(Fig.1-11)¹⁴⁴。

1-5. 各種メチル化レベル測定法の比較

この項では上述した各種メチル化レベル測定法の特徴をまとめ、検出限界・測定時間を Table.1-4 に示す。ゲノムワイドに 1 塩基レベルで 5mC を検出できる RRBS や WGBS、どの領域に 5mC が濃縮されているか検出できる MeDIP-seq や MBDCap-seq は、正確性が高い一方で、バイサルファイト処理や PCR、免疫沈降など複数の実験ステップが必要となり、所要時間も大幅に要してしまう。液体クロマトグラフを利用した系も、正確に 5mC 量を定量できるが、加水分解などゲノム DNA への前処理が必要となる。電気化学的な手法は電極を用いるため、非常に高感度に 5mC を検出できるが、電極解析までにハイブリダイゼーションや酵素反応などの実験ステップを含む。抗 5mC 抗体を用いた方法である SPR 法と ELISA は、必要とするゲノム DNA 量は非常に少量だが、SPR 法はランニングコストが非常に高い点、ELISA は各種分子の固定化と洗浄を繰り返し実施するため操作の煩雑性が高いことが欠点として挙げられる。Methyl acceptance assay は、M.SssI の酵素反応によって生じるシグナルを 5mC 検出に利用するため、非常に感度良く検出可能だが、ELISA と同様に複数の洗浄操作を要することや放射性物質を使用するという欠点が考えられる。Zinc finger-GDH または Zinc finger-luciferase を使用した手法も、検出限界は 10^2 コピーと感度は非常に高いが、PCR の操作を含む。Split-luciferase を使用した手法は感度良くメチル化 DNA を測定できるが、示される Luciferase の発光はメチル化 CpG の距離間に依存するため、正確性は下がると考えられる。一方で、本研究室で開発されている MBD-Fluc と CXXC-Oluc を用いたメチル化レベル測定法は、試薬を混合するのみの簡便なホモジニアスアッセイであり、所要時間も 35 分と非常に短時間である。さらに R.S.D. (Relative Standard Deviation) も COBRA 法や液体クロマトグラフ法と同等である。

Table.1-4 Comparison of different methods for the detection of DNA methylation

Method	Input of genomic DNA	Time	R.S.D. (%)	Reference	
Bisulfite method	RRBS	0.01–0.3 μ g	>24 h	N.D.	121
	WGBS	5 μ g	>24 h	N.D.	122
	COBRA	1.5 μ g	>16 h	<2.0	145
Liquid chromatography	3 μ g	>3 h	<3.0	124	
Electrochemical analysis	5 μ g	45 min	<4.0	128	
MeDIP-seq	4 μ g	>4 h	N.D.	129	
MBDCap-seq	1 μ g	>4 h	N.D.	130	
SPR	0.0002 μ g	45 min	<7.0	132	
ELISA	0.01 μ g	>2 h	<1.5	134	
Methyl acceptance assay	0.2 μ g	>1 h	<5.9	139	
Zinc finger-GDH	3 μ g	>1.5 h	<1.0	140	
Zinc finger-luciferase	3 μ g	>1.5 h	N.D.	141	
Split-luciferase	0.02 μ g	>12 h	<10	142	
BRET assay	2.2 μ g	35 min	<2.2	144	

N.D.: Not determined

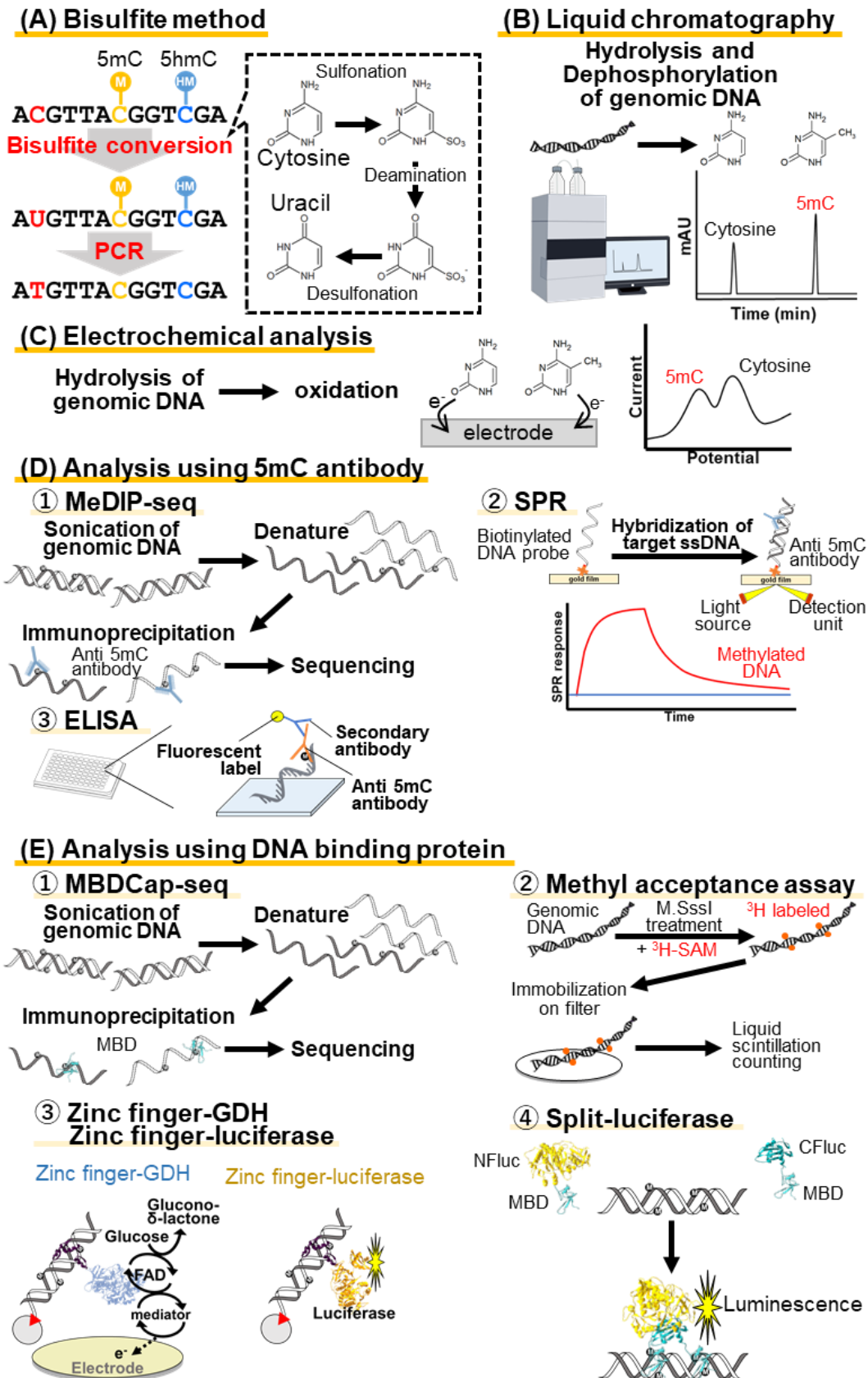


Fig.1-10 Detection of 5-methylcytosine

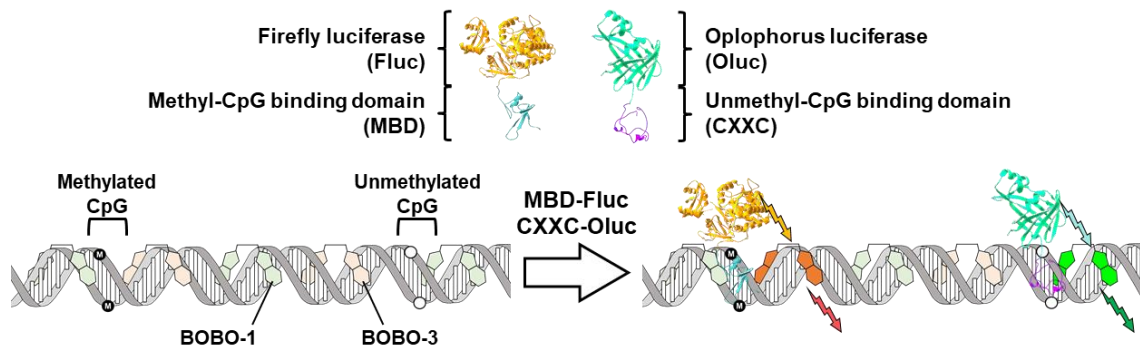


Fig.1-11 Multicolor BRET assay for global DNA methylation level quantification

第 2 項 DNA ヘミメチル化レベル測定法

2本鎖DNAの片鎖のみメチル化されているDNAであるヘミメチル化DNAは、バイサルファイトシーケンス解析を行なうと両鎖のメチル化状態を比較しなければならないため、1塩基レベルで解析可能なWGBSでの解析報告が多い³⁶。近年では、ChIP後に溶出したDNAを1本鎖変性し、バイサルファイト処理を行なった後、PCRにかけ、シーケンス解析するnasChIP-seqがヘミメチル化レベルの測定に利用されている³⁵。ヘミメチル化レベル測定で最も利用されている手法がHairpin-bisulfite PCR法である(Fig.1-12)¹⁴⁶⁻¹⁴⁸。Hairpin-bisulfite PCR法は標的の2本鎖DNAにHairpin linkerをライゲーションさせ、バイサルファイト処理を行うことによってヘミメチル化部位を測定する手法である。上述したヘミメチル化レベル測定法の特徴をまとめ、検出限界・測定時間をTable.1-5に示す。ヘミメチル化レベル測定法は上記した3つのみしか開発されておらず、どの方法もバイサルファイト処理とシーケンス解析を必要とするため、実験操作の煩雑性も高く、所要時間も10時間以上要する。そのため、簡便・迅速なヘミメチル化レベル測定法が求められる。

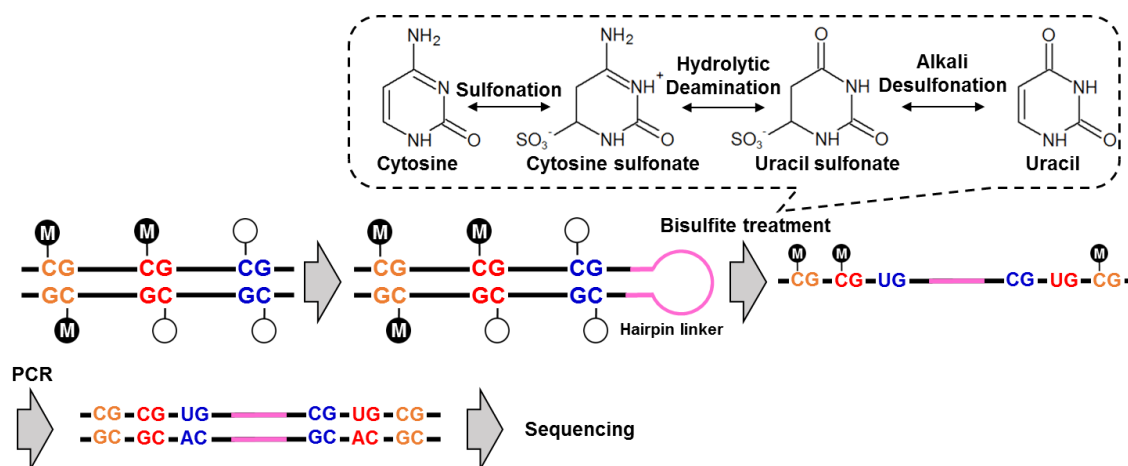


Fig.1-12 Hairpin-bisulfite PCR

Table.1-5 Comparison of different methods for the detection of DNA hemi-methylation

Method	Input of genomic DNA	Time	R.S.D. (%)	Reference
WGBS	5 μ g	>24 h	N.D.	36
nasChIP-seq	N.D.	>13 h	N.D.	35
Hairpin-bisulfite PCR	2 μ g	>3.5 h	<7.2	146

N.D.: Not determined

第3項 DNA ヒドロキシメチル化レベル測定法

DNA メチル化レベルを測定するにはバイサルファイト法が一般的な方法であるが、5hmC も 5mC と同様にバイサルファイト処理で変換されないため、解析結果はメチル化とヒドロキシメチル化を区別できない。従って、ゲノム DNA 中の 5hmC は主に、HPLC や LC-MS/MS で分離して定量する方法、5hmC のグリコシル化を利用した方法、抗 5hmC 抗体を用いた ELISA 法、電気化学的方法に分けられる。それぞれ既存測定法の特徴を以下に述べ、最後に各手法の検出限界や正確性、測定時間をまとめる。

3-1. 液体クロマトグラフを利用した方法

ゲノム DNA 中の 5hmC は、5mC と同様に液体クロマトグラフで定量できる(Fig.1-13A)^{14,149}。しかし、5mC 検出と同様に組成が単一の移動相によって分離するアイソクラティック溶離を行なうと、5hmC とシトシンのピークは同じ箇所に検出されるため、5hmC を区別できない。従って、5hmC を液体クロマトグラフで検出する際は、移動相組成を変化させながら溶出するグラジエント溶離をしなければならないため、5mC 検出よりも煩雑な実験操作が必要となってしまうという欠点がある。

3-2. 5hmC のグリコシル化を利用した方法

5hmC のグリコシル化を利用した方法は、T4-BGT (T4 Phage β -glucosyltransferase)で 5hmC をグリコシル化することで生じる 5ghmC (5-glucosylhydroxymethylcytosine)を利用する。T4-BGT は 5hmC を特異的にグリコシル化するファージ由来の糖鎖修飾酵素であり、このグリコシル化反応で生じた 5ghmC に化学処理をすることで、この 5hmC 特異性を利用して 5mC と 5hmC を区別する。詳細な原理・操作は以下に示す(Fig.1-13B)。

3-2-1. TAB-seq 法

TAB-seq (Tet-assisted Bisulfite Sequencing)法は、T4-BGT による 5hmC グリコシル化の後、TET1 で反応させ、バイサルファイトシーケンス解析を行なう方法である¹⁵⁰。5mC は TET1 処理によって 5caC に変換されるが 5ghmC は変換されず、バイサルファイトシーケンス解析後、5mC はチミンに、5hmC はシトシンとして検出される。以上の操作より、5mC と 5hmC を区別することが可能になる。

3-2-2. ACE-seq 法

ACE-seq (APOBEC-coupled epigenetic sequencing)法は、バイサルファイト処理を必要としない手法である¹⁵¹。APOBEC3A (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme subunit 3A)は未修飾シトシンと 5mC をウラシルへ脱アミノ化する反応を触媒する一方で、5hmC はグリコシル化によって保護され、脱アミノ化されない。従って、シーケンス解析により、未修飾シトシンと 5mC はチミン、5hmC はシトシンとして検出される。

3-2-3. hMe-Seal 法

T4-BGT はウリジン二リン酸グルコース(UDP-Glu)のグルコースを 5hmC のヒドロキシ基に転移する反応を触媒する。hMe-Seal 法は、アジド基を含む UDP-Glu を用いることで T4-BGT の触媒反応により、5hmC のヒドロキシ基にアジド基を含むグルコース分子が転移される¹⁵²。アジド基は容易にビオチン修飾できるため、ストレプトアビジンでビオチンをプルダウンすることによって、ゲノム DNA 内の 5hmC を濃縮できる。

3-3. oxBS-seq 法

oxBS-seq (Oxidative bisulfite sequencing) 法は、酸化試薬の過ルテニウム酸カリウム (KRuO₄) による化学処理によって 5hmC のみを選択的に 5fC に変換し、この 5fC はバイサルファイト処理することでウラシルに変換される¹⁵³。従ってシーケンス解析後は、5mC はシトシンとして、5hmC はチミンとして検出される (Fig.1-13C)。しかし、未修飾シトシン、5mC、5hmC の全てを区別するためには、KRuO₄ 未処理 DNA と KRuO₄ 処理済サンプルのバイサルファイトシーケンス解析の結果を比較する必要がある。

3-4. 電気化学的方法

ECL (Electrogenerated chemiluminescence) 法は、電極における電気化学的反応で生じる発光を利用した方法である¹⁵⁴。ECL 法はプローブ DNA を固定化した電極に標的の DNA をハイブリダイゼーションさせ、この DNA に対して oxBS-seq 法と同様に KRuO₄ 処理で 5hmC のみを選択的に 5fC に酸化させる。ここに ABEI (*N*-(4-aminobutyl)-*N*-ethylisoluminol) を加えることで、生じた 5fC のアルデヒド基は ABEI のアミノ置換基と結合し、5fC-ABEI つまり ECL 標識 5fC が形成されるため、電極反応において、5fC のみが発光を示す (Fig.1-13D)。本手法は電気化学的反応を利用しているため、非常に感度が高く、0.14 pM までの 5hmC を検出可能である。しかし、ABEI との反応に 12 時間かかってしまうという欠点がある。

3-5. ELISA

先述した 5hmC 検出法と比較して、ELISA は抗 5hmC 抗体を用いるため非常に感度良く検出することが可能である上に、バイサルファイト処理や化学処理などの操作を必要とせずに、簡単・迅速に 5hmC を検出できる方法である^{155,156}。ELISA ベースの 5mC 検出法と同様に、1 塩基レベルで 5hmC を検出可能な TAB-seq や ACE-seq などと比較して簡便な操作性を持ち、ランニングコストも低い。しかし、やはり、サンプルを固定化する度に長い反応時間と複数の洗浄操作を要してしまう。

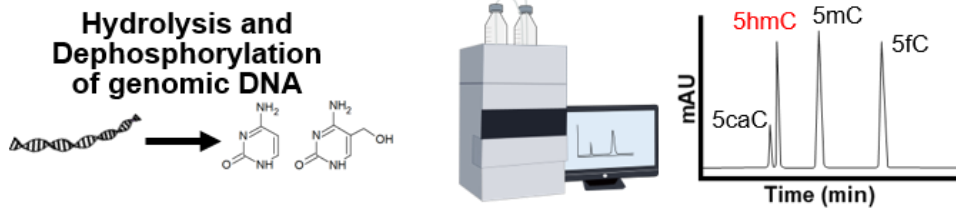
3-6. 各種ヒドロキシメチル化レベル測定法の比較

この項では上述した各種ヒドロキシメチル化レベル測定法の特徴をまとめ、検出限界・測定時間を Table.1-6 に示す。ヒドロキシメチル化レベル測定法はバイサルファイト処理で 5mC と 5hmC を区別できないために、メチル化 DNA レベル測定法と比較して酵素処理や化学処理など複数の実験ステップが増す。実験操作の煩雑性が高い一方で、TAB-seq などシーケンス解析を含む測定法は一塩基レベルで 5hmC を検出できるため、正確性は高い。液体クロマトグラフ法は、5mC 検出と同様にバイサルファイト処理などの化学処理を必要としないが、グラジエント溶離を行わなければならないという欠点がある。ECL 法も電極反応を利用するために、非常に感度良く 5hmC を検出可能であるが、ABEI 処理に 12 時間要してしまい、気軽に 5hmC を検出することは出来ない。抗 5mC 抗体を用いた ELISA は、input するゲノム DNA 量は非常に少量であり、他手法と比較しても非常に簡単な操作感である。しかし、ホモジニアスアッセイのように試薬を混合するのみの操作性であるならば、より簡便・迅速で 5hmC を検出できるはずである。

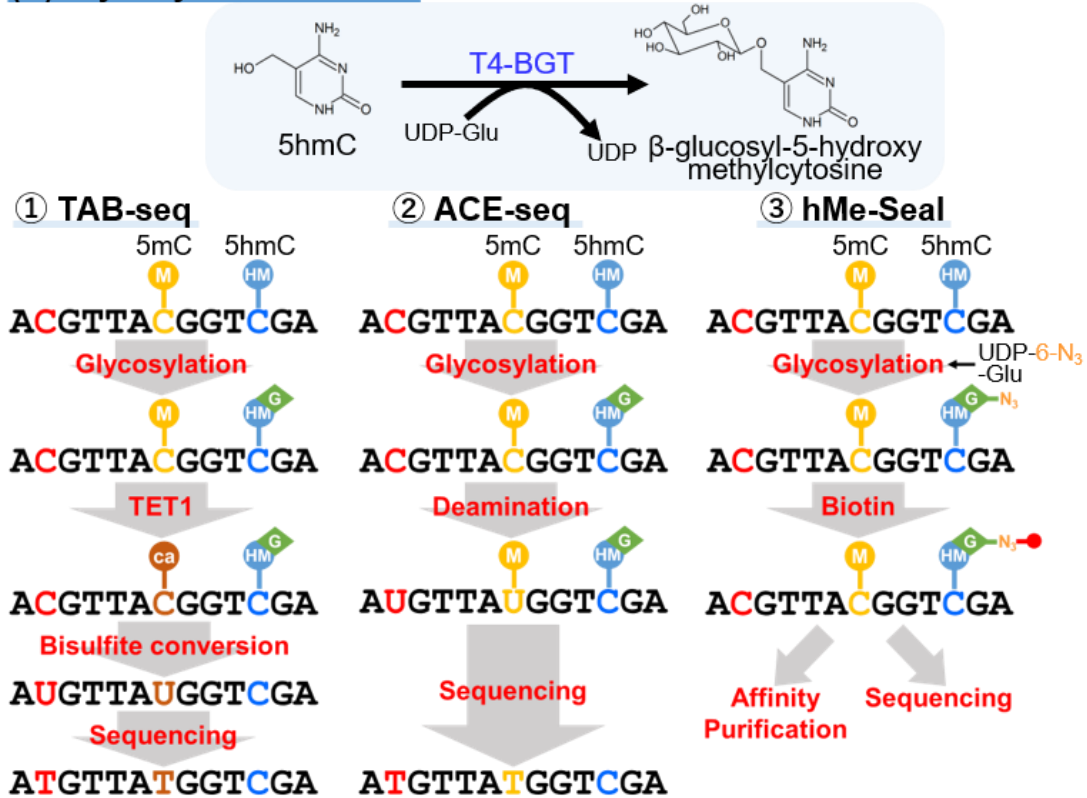
Table.1-6 Comparison of different methods for the detection of DNA hydroxymethylation

Method	Input of genomic DNA	Time	Reference
Liquid chromatography	20 µg	>3 h	14,149
TAB-seq	3 µg	>3 days	150
ACE-seq	1–50 ng	4 h	151
hMe-Seal	30 µg	>5 h	152
oxBS-seq	1 µg	>6 h	153
ECL	0.2 ng	15 h	154
ELISA	20 ng	5 h	155,156

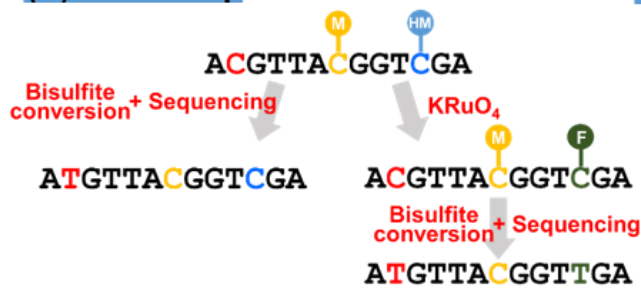
(A) Liquid chromatography



(B) Glycosylation of 5hmC



(C) oxBS-seq



(D) Electrochemical analysis

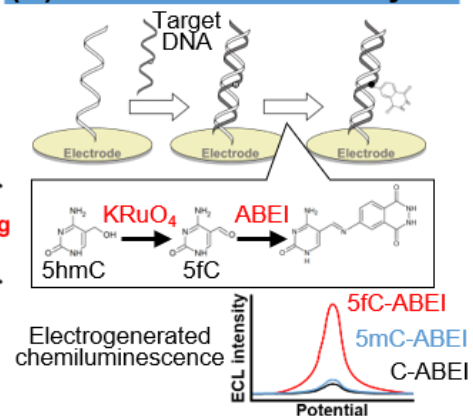


Fig.1-13 Detection of 5-hydroxymethylcytosine

第 6 節 本研究の目的と意義

本研究は、様々な疾患のバイオマーカーとして期待されている DNA のメチル化、ヘミメチル化およびヒドロキシメチル化レベルを従来法よりも、簡便で迅速に測定できる方法を開発することを目的とした。

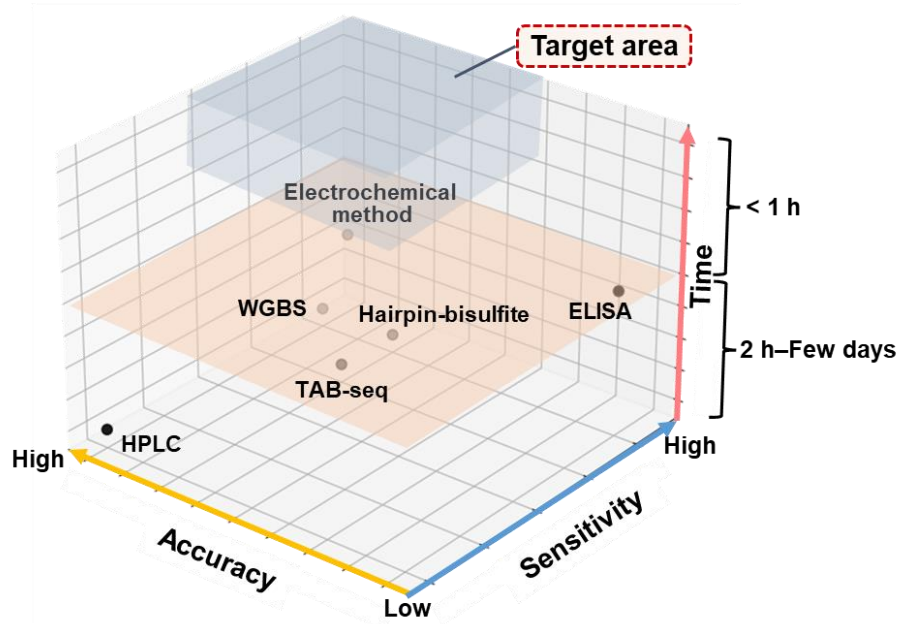
本章で先述したとおり、シトシン修飾であるメチル化、ヘミメチル化およびヒドロキシメチル化修飾は、がんや中枢神経系疾患で、そのレベルが変化していることが報告されている。ゲノム DNA 中において、これらの修飾シトシン塩基レベルを測定するために、複数の既存法が開発され、利用されてきている。しかし、正確度が高い一方で、化学処理や酵素処理、PCR、シーケンス解析、洗浄操作など複数の実験ステップを含む方法が大半であり、簡便・迅速に測定可能な方法はない。従って、本研究では簡便・迅速に修飾シトシン塩基を測定するために、検体に試薬を混合するのみのホモジニアスアッセイを開発することとした(Fig.1-14)。

第 2 章では、BRET を利用したヘミメチル化レベル測定法を開発した。これまでの研究で MBD-Fluc と CXXC-Oluc を用いたゲノム DNA のメチル化レベル測定法が開発されており¹⁴⁴、この方法は DNA インターカレーターと MBD-Fluc 又は CXXC-Oluc 間で生じる BRET がゲノム DNA のメチル化レベル又は非メチル化レベルに相関することを利用している。そこで本研究では、ヘミメチル化 CpG に特異的に結合する UHRF1 の SRA domain に Firefly luciferase を融合させた蛋白質(UHRF1 SRA-Fluc)を作製し、UHRF1 SRA-Fluc を用いて、ヘミメチル化レベルを簡便に測定することを目的とした。予め DNA インターカレーター(1,1'-(4,4,7,7-tetramethyl-4,7-diazaundecamethylene)-bis-4-[3-methyl-2,3-dihydro-(benzo-1,3-thiazole)-2-methylidene]-pyridinium tetraiodide; BOBO-3)を結合させた標的 DNA に UHRF1 SRA-Fluc を反応させる。UHRF1 SRA-Fluc はヘミメチル化 CpG に結合するため、結合部位における BOBO-3 は Luciferase 発光によって励起され、蛍光が示される(BRET シグナル)。つまり、この励起された BOBO-3 の蛍光強度は、標的 DNA 中のヘミメチル化 CpG 量に依存すると想定した(Fig.1-15)。

第 3 章では、BRET を利用したヒドロキシメチル化レベル測定法を開発した。本手法では、先述した BRET を利用した方法をベースとし、融合蛋白質の DNA 結合蛋白質部分を、ヒドロキシメチル化 CpG を特異的に認識するものに置き換えれば、簡便にヒドロキシメチル化レベルも測定できると考えた(Fig.1-15)。ヒドロキシメチル化 DNA 結合蛋白質として、UHRF2 の SRA domain に着目した。UHRF2 SRA に Firefly luciferase を融合させた蛋白質(UHRF2 SRA-Fluc)を作製し、ヒドロキシメチル化 DNA への結合活性を解析した。その後、UHRF2 SRA-Fluc を用いた BRET assay を行ない、ヒドロキシメチル化レベル依存的に BRET シグナルが増加するか検討を行なった。

第 4 章では、メチルシトシン酸化酵素 TET の触媒反応を利用したゲノム DNA のメチル化レベル測定法を開発した。TET は 5mC を 5hmC に酸化する反応を触媒する酵素であり、この反応過程で α -ケトグルタル酸(α -KG)はコハク酸に変換される。つまり、検体であるゲノム DNA に TET を反応させ、この反応過程で生じたコハク酸量はゲノム DNA の 5mC 量に相関すると想定した(Fig.1-16)。

(A) Methods for the detection of DNA hemi-methylation and hydroxymethylation



(B) Methods for the detection of DNA methylation

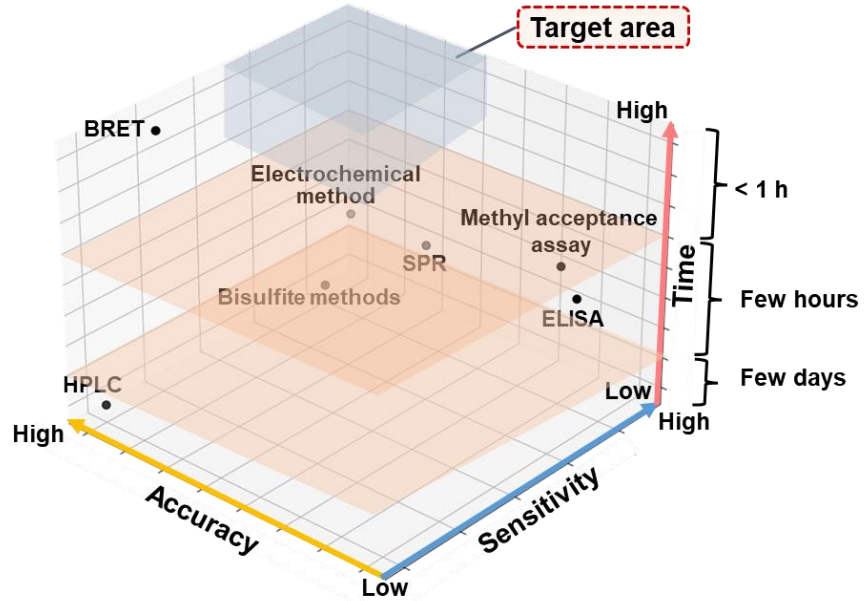


Fig.1-14 Development area in 5mC and 5hmC detection

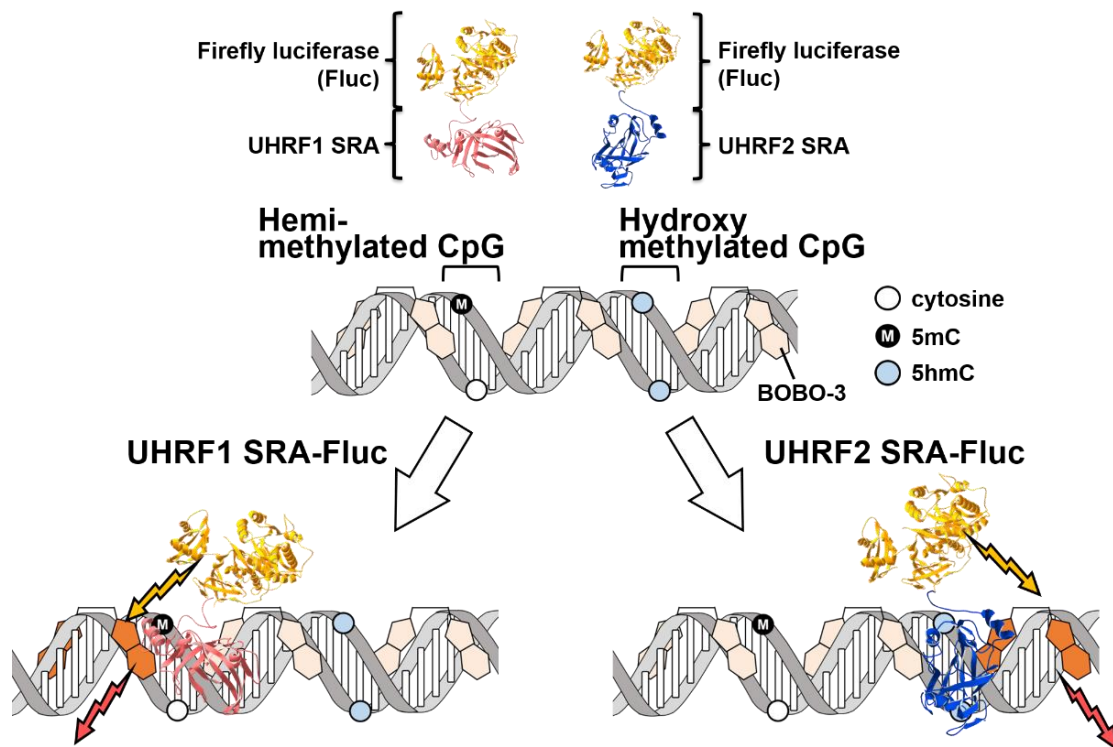


Fig.1-15 BRET assay for the hemi-methylated and hydroxymethylated DNA

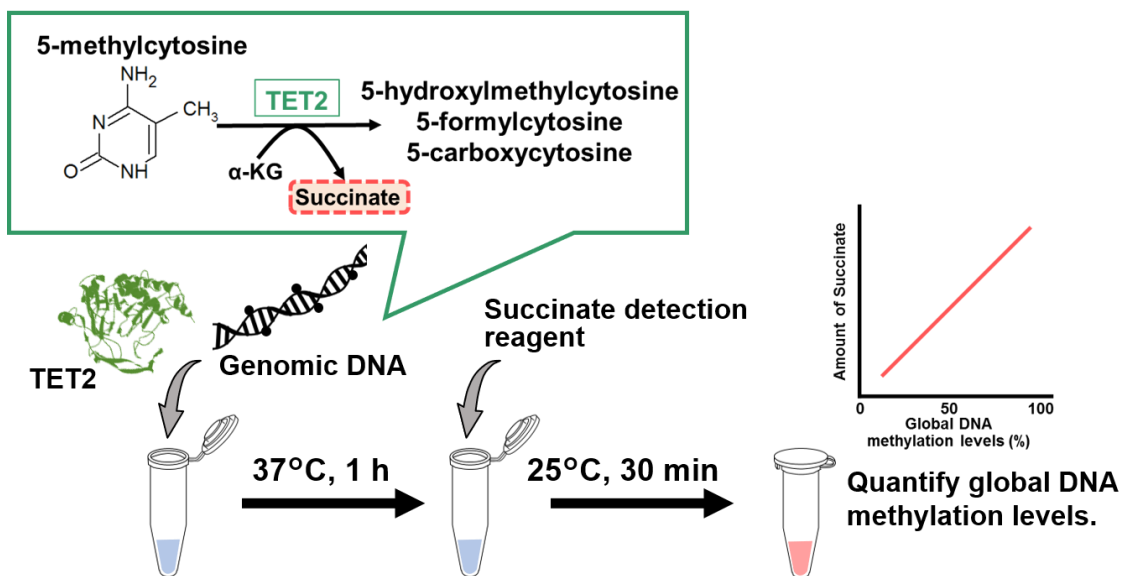


Fig.1-16 Quantification of global DNA methylation level using TET-mediated 5mC oxidation

第 2 章

UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いた ヘミメチル化レベル測定法の開発

第 2 章 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いたヘミメチル化レベル測定法の開発

第 1 節 緒言

本章では、がんのバイオマーカーとして期待されるヘミメチル化レベルを簡便・迅速に測定する方法を開発することを目的とした。DNA メチル化とは、ゲノム DNA における CpG 配列のシトシンの 5 位炭素がメチル化される反応である。通常ゲノム DNA は 2 重らせん構造を形成しており、両鎖ともメチル化された状態であるが、DNA 複製の際、新生鎖には未修飾シトシンが取り込まれるため、一時的に片鎖メチル化 DNA (ヘミメチル化 DNA) が生じる。このヘミメチル化 DNA は Wilm's 腫瘍や卵巣上皮性腫瘍の反復配列 *NBL2* や *Sat2* で多く存在していることが知られており^{11,12}、ヘミメチル化 DNA はがんのバイオマーカーとしての利用が期待される。

これまでにゲノム DNA 中のヘミメチル化レベルはバイサルファイトシーケンス解析や ChIP-seq で解析されてきた⁵⁴。ChIP-seq を用いた解析により、ヒト多能性細胞の複製時において DNMT3A と CCCTC-binding factor (CTCF)/cohesin の結合部位近隣にヘミメチル化 CpG が多く含まれることが報告されている⁵³。この報告より、ヘミメチル化 DNA は、遺伝子転写の対象領域の範囲を制御するインシュレーター構造に関与すると示唆された。一方で、より正確に標的領域のヘミメチル化部位を解析するために、Hairpin-bisulfite PCR 法が開発されている¹⁴⁶⁻¹⁴⁸。しかし、バイサルファイト処理を必要とする従来法は高精度で測定可能だが、複数の実験ステップを必要とすることや検出までに大幅な時間を要する。従って、従来のような煩雑な操作や大幅な測定時間を必要としない簡便なヘミメチル化レベル測定法が望まれる。

そこで本研究は試薬を混合するだけの簡便なヘミメチル化レベル測定法を開発することを目的とした。ヘミメチル化レベルを簡便に測定するために、ヘミメチル化 CpG 結合蛋白質である UHRF1 の SET- and RING-associated (SRA) domain に着目した。UHRF1 SRA は、非メチル化 CpG の 30 倍、メチル化 CpG の 10 倍高い親和性でヘミメチル化 CpG を認識する (K_d : 0.11 μ M)⁷¹⁻⁷³。この UHRF1 SRA にホタル由来の発光蛋白質 Luciferase を融合させた蛋白質(UHRF1 SRA-Fluc)を作製し、DNA インターカレーターを結合させた標的 DNA に UHRF1 SRA-Fluc と Luciferase の発光基質を混合する。すると、Luciferase の発光によって BOBO-3 は励起され、蛍光が示される(Bioluminescence Resonance Energy Transfer; BRET)。つまり、試薬を混合して蛍光強度を測定するだけで、ヘミメチル化レベルを簡便に測定できると想定した(Fig.2-1)。本手法では DNA インターカレーターとして、BOBO-3 を用いた。BOBO-3 はシアニン 2 量体の核酸色素であり、DNA 非存在下ではほぼ蛍光特性を示さないが、DNA に結合することで約 100–1000 倍蛍光強度が上昇する(Fig.2-2)。BOBO-3 の最大励起波長は 570 nm、最大蛍光波長は 602 nm である^{157,158}。

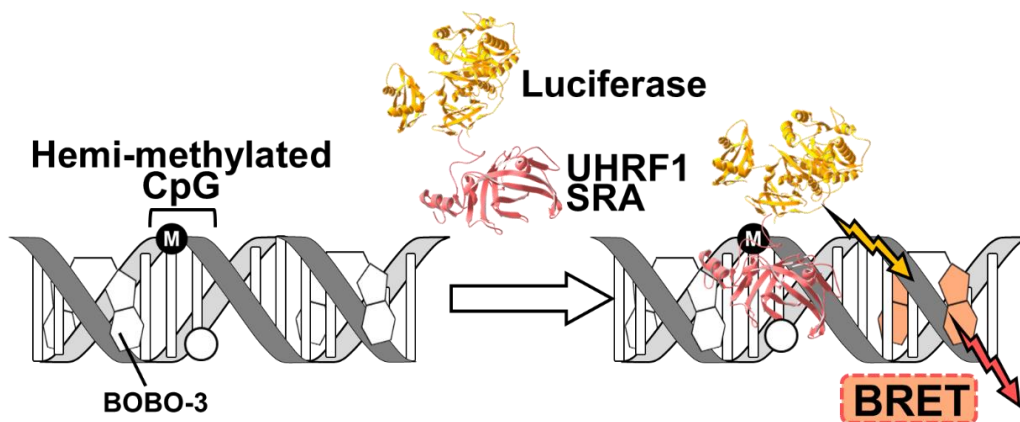


Fig.2-1 BRET assay for the hemi-methylated DNA detection using UHRF1 SRA-Fluc

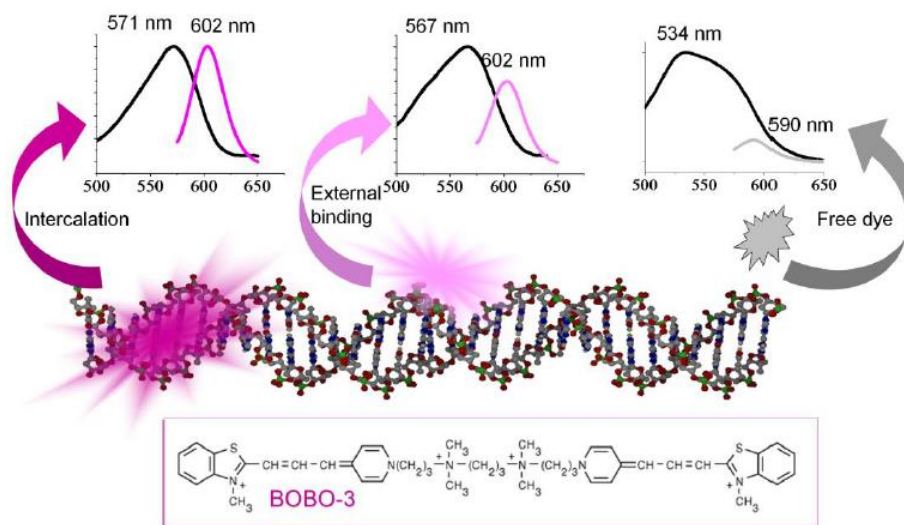


Fig.2-2 Interaction of BOBO-3 with dsDNA¹⁵⁸

第 2 節 実験試薬・機器

第 1 項 試薬及び消耗品

Table 2-1. Reagents and Consumables

Product	Company
UltraPure™ Distilled Water	invitrogen™
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS), Dominican Republic Origin	Biosera
1xpenicillin–streptomycin L-glutamine	Sigma-Aldrich
TrypLE™ Select (1X)	Gibco®
Cell Culture Dish 100mm×20mm Style	NEST®
RNeasy® Mini Kit (50)	Qiagen
ThermoScript™ RT-PCR System	invitrogen™
KOD-Plus-Neo	TOYOBO
1Kb DNA Ladder RTU	Gene DireX
Agar	Wako
Orange G	Nacalai
EtBr Solution	NIPPON Gene
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
Ligation high ver.2	TOYOBO
NdeI	Wako
NotI	Wako
EcoRI	Wako
<i>E. coli</i> DH5α Competent Cells	TAKARA
Competent Cell BL21 (DE3)	BioDynamics Laboratory Inc.
Ex Taq HS	TAKARA
SOC Medium	TAKARA
Tryptone	Nacalai
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Nacalai
Extract Yeast Dried	Nacalai
NaCl	Wako
Kanamycin Monosulfate	Tokyo Chemical Industry
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega
Strep-Tactin Superflow Plus Cartridge (1mL)	Qiagen
25-mm PES syringe filter 0.45-μm pore hydrophilic polyether sulfone membrane	Millipore
BugBuster® 10x Protein Extraction Reagent	Novagen
10x PBS	Ambion
Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate	Wako
d-Desthiobiotin	Sigma-Aldrich
HABA	Sigma-Aldrich
(±) DTT	Wako
Glycerol	Nacalai
BIO-Rad Protein Assay Reagent A	BIO-RAD
BIO-Rad Protein Assay Reagent B	BIO-RAD
BIO-Rad Protein Assay Reagent S	BIO-RAD
Albumin, from bovine serum	Sigma Life Science
96-well clear microplate	Greiner bio-one
Acrylamide	Wako
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Nacalai
Sodium dodecyl sulfate	Wako

Ammonium Peroxodisulfate	Yoneyama Yakuhin Industry
N,N,N',N'-tetramethylphenylenediamine (TEMED)	Tokyo Chemical Industry
BES	Dojindo
Tris-BES Sample buffer (2X)	TEFCO
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Sodium Thiosulfate Pentahydrate	Wako
N,N-Dimethyl formamide	Wako
Quick-CBB PLUS	Wako
Pre-stained marker (SP-1120)	APRO SCIENCE
MgCl ₂	Wako
Tween ®20	Sigma
(+) Biotin	Wako
BioBind Assembly Strip 1x8 Streptavidin Coated	Thermo Scientific
PicaGene	Toyo Ink
BOBO™-3 iodide (570/602)	invitrogen™
96-well white microplate	
F-Bottom (Chimney well), Lumitrac, Med. Binding	Greiner bio-one

第 2 項 実験機器

Table 2-2. Equipment

Product	Company
Airstream® Class II Biological Safety Cabinets, Gen 3 (E-Series)	Esco
Thermo Scientific Forma Series 3 Water Jacketed CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific
himac CT15RE	HITACHI
T100™ Thermal Cycler	BIO-RAD
Veriti Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific
Mupid-2 plus	ADVANCE
BE-220	BIO CRAFT
Power supply for electrophoresis	BIO CRAFT
BioSpectrometer basic	Eppendorf
LED Illuminator LI-410	BIO CRAFT
Incubator IC601	Yamato
Shaker	Iwaki
Microtube rotator MTR-103	AS ONE
Variable Speed Pump I - Low	Fisher Scientific
Microplate Reader Model680	BIO-RAD
Spark 10M multimode microplate reader	TECAN

第3節 実験方法

第1項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質発現ベクターの構築

HeLa 細胞 (RBRC-RCB0007, RIKEN) を 9 mL の DMEM 培地 (10% FBS, 1×penicillin-streptomycin L-glutamine) と混合して遠心した (1,000 × g, 5 min, 室温)。上清を除去し、新しい DMEM 培地を加えて混合し、10 cm dish に播いて培養を始めた (5% CO₂, 37°C)。2 日後、4 日後に dish 内の DMEM 培地を捨て、2 mL TrypLE™ Select を加えて CO₂ インキュベーターで 3 min インキュベートして細胞をはがし、6 mL DMEM 培地を加えて 20 回程度ピペッティングした。新しい dish に 8 mL DMEM 培地を加え、そこに細胞溶液 2 mL を混合し、細胞継代した。細胞を起こしてから 1 週間後に 10 cm dish の 100% コンフルエンス細胞に 2 mL TrypLE™ Select を加え、CO₂ インキュベーターで 3 min インキュベートした。その後、8 mL DMEM を加えて 20 回程度ピペッティングした。回収した HeLa 細胞 1 mL を血球計算盤に加えて、細胞数を測定した。測定後、細胞全てを 15 mL 遠沈管に移して 1,000 × g で 5 min 遠心して上清を捨て、細胞を回収した。

培養した HeLa 細胞より Total RNA を RNeasy Mini Kit を用いて抽出し、ThermoScript™ RT-PCR System より、Total RNA 5 µg に対して 50 pmol の oligo (dT) primer (Table 2-3) を用いて Total cDNA を合成した。Total cDNA を鋳型に 612 bp の *UHRF1 SRA domain* cDNA を PCR で増幅した。具体的には、NdeI 認識配列と *Strep-tag II* 配列を付加した *UHRF1 SRA forward primer* と EcoRI 認識配列を付加した *UHRF1 SRA reverse primer* (Table 2-3) を設計し、これらを用いて 50 µL 溶液 (0.3 µM each primer, 1 × PCR Buffer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgSO₄, 0.02 U/µL KOD) を調製し、94°C, 2 min インキュベート後、98°C 10 sec、58°C 30 sec、68°C 30 sec を 25 サイクルの条件で PCR を行った。PCR 産物を電気泳動で確認後、目的のバンドを切り出し、PCR 産物を Wizard SV Gel PCR Clean-Up System を用いて精製した。

精製した PCR 産物 1 µg と 20 U NdeI, 20 U EcoRI, 10× Cut Smart buffer を混合して溶液全量 50 µL とし、37°C, 1 h 反応後、65°C, 20 min インキュベートした。その後、Wizard SV Gel PCR Clean-Up System を用いて精製し、吸光度を測定することにより濃度を算出した。制限酵素処理済みの pET30c-*Fluc* 50 ng に対して、制限酵素処理した PCR 産物をそれぞれモル比 1 : 1 の割合で混合し、溶液全量 7.5 µL とした。そこに 7.5 µL の Ligation high ver.2 を加え、ライゲーションした (16°C, 16 h)。

E. coli DH5α 50 µL に、ライゲーション産物を 5 µL 加え、氷上で 5 min 静置した。その後、42°C, 30 sec インキュベートし、氷上で 2 min 静置して形質転換させた。形質転換後、450 µL SOC 培地を添加して転倒混和し、37°C, 1 h 振盪培養した。形質転換された DH5α 100 µL を LB+Kanamycin 寒天培地 (終濃度 50 µg/mL Kanamycin) に撒き、37°C で一晚培養した。形成されたコロニーを採取し、LB+Kanamycin 液体培地 (終濃度 50 µg/mL Kanamycin) で 37°C, 16 h 培養した。この大腸菌培養液を 10,000 × g, 30 sec 遠心して上清を除去し、集菌した。その後、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System を用いてプラスミドを抽出した。

抽出した pET30c-*Strep-tag II-UHRF1 SRA-Fluc* plasmid の *Strep-tag II-UHRF1 SRA-Fluc* 遺伝子においてシーケンス解析を実施した。解析には UHRF1 SRA forward primer, reverse primer, Sequence primer 1-6 (Table 2-3)を使用し、シーケンス解析はMacrogenに委託した(3730xl DNA analyzer, Thermo Fisher Scientific)。

Table 2-3. Primer sequence

Name	Sequence (5'–3')
oligo (dT) primer	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
UHRF1 SRA forward primer	TGGGCAATGGCATATGTGGAGCCATCCGCA GTTTGAAAAGCCGTCCAACCACTACGGA
UHRF1 SRA reverse primer	TCTGAATTCGTTGGCCAGGGCTTCC
Sequence primer 1	TAATACGACTCACTAT
Sequence primer 2	TGGTTTGGTTGTTGATGGAA
Sequence primer 3	GGTGTGGCTCCAATAATGAG
Sequence primer 4	CCGACTTTGTTTGCAATTCTT
Sequence primer 5	ATTTACGGGTGTTTCGCAA
Sequence primer 6	CTGAGATCCGGCTGCTAACA

第 2 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質の組換え生産

構築した pET30c-*Strep-tag II-UHRF1 SRA-Fluc* を用いて、*E. coli* BL21 (DE3)を形質転換した後、IPTG によってタンパク質発現誘導を行なった。pET30c-*Strep-tag II-UHRF1 SRA-Fluc* で形質転換した BL21 (DE3)を 1.5 mL LB+Kanamycin 液体培地(終濃度 50 µg/mL Kanamycin)に加えて 37°C, 16 h で前培養した。培養液を 150 mL LB+Kanamycin 液体培地(終濃度 50 µg/mL Kanamycin)に全量加え、37°C で培養した。OD₆₀₀ 値 0.5 付近で IPTG (終濃度 1.2 mM)を添加し、20°C, 140 r.p.m.で 16 h 本培養した。培養後、遠沈管に培養液を 35 mL ずつ分注し、遠心分離した(4°C, 2,500 × g, 10 min)。上清を除去し、35 mL 0.85% NaCl を加えてボルテックスし、遠心分離(4°C, 2,500 × g, 10 min)する一連の操作を 2 回行なった。上清を除去し、25 mL 0.85 % NaCl を加えてボルテックスし、遠心分離(4°C, 2,500 × g, 10 min)遠心した後、上清を除去して湿菌体を回収した。

得られた湿菌体 1 g に対して 5 mL Bug Buster Regent (1 × PBS buffer, 1 × Bug Buster Regent) を加えて懸濁し、インキュベート(室温, 15 min, 5 r.p.m.)した後、遠心分離(4°C, 16,000 × g, 20 min)して水溶性画分を調製した。1×PBS で 10 倍希釈した水溶性画分を Strep-Tactin Superflow Plus Cartridge を用いて、流速 1 mL/min (Variable Speed Pump I–Low)でカラムに流し、フロースルー画分(F1–10)を得た。次に NP buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl)を流して洗浄画分(W1–10)を得て、NPD buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM desthiobiotin)を流して溶出画分(E1–10)を得た。5 µL の精製画分に 45 µL の PicaGene を加えて、Luciferase の発光強度

を Spark 10M multimode microplate reader で測定した(37°C)。またここで用いた全ての精製用 buffer は 4°C に冷却して使用した。

タンパク質の濃度測定には Bradford 色素結合法を利用した。5, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg/mL 各 BSA 溶液を調製し、20 µL BSA 溶液に対して 10 µL の試薬 A' (1 mL BIO-RAD Protein Assay Reagent A, 20 µL BIO-RAD Protein Assay Reagent S)を混合した。そこに 80 µL BIO-RAD Protein Assay Reagent B を加え、15 min 室温で静置した。調製した溶液を 96-well clear microplate に 100 µL ずつ分注し、Microplate Reader Model680 で濃度を測定した($\lambda = 750$ nm)。得られた値より、検量線を作成した。精製して得られた溶出画分(E1-10)にも同様の操作で反応液を調製し、濃度を測定した。

得られた全ての精製画分は SDS-PAGE で解析した。分離ゲル(12%アクリルアミド, 0.37 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.05%過硫酸アンモニウム, 0.05% TEMED)に濃縮ゲル(3.6%アクリルアミド, 0.22 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.001% SDS, 0.05%過硫酸アンモニウム, 0.1% TEMED)を重層し、12% SDS アクリルアミドゲルを作製した。その後、電気泳動槽にセットし、泳動槽の外側に Running Buffer (30 mM Tris, 30mM BES, 0.1% SDS)で完全に満たし、泳動層内側は Antioxidant mixture (0.05% Sodium thiosulfate pentahydrate, 0.025%N,N-Dimethylfoemaide,1xRunning buffer)で満たした。精製した溶質画分と等量の Loading Buffer (200 µL Tris-base Sample buffer, 0.06 M DTT, 10 µL β -Mercaptoethanol)を混合し、Loading sample を調製した。分子量マーカー(Pre-stained marker)にも同様に等量の Loading buffer を添加し、Loading marker とした。10 µL Loading Marker と 20 µL Loading sample をウェルにアプライし、電気泳動(40 mA)を行なった。その後、CBB を用いてゲルを染色し、精製画分を解析した。具体的には、ポリアクリルアミドゲルを 200 mL MQ で 5 min 振盪して MQ を取り換える操作を 3 回行なった。20 mL Quick-CBB PLUS を加え、60 min, 30 r.p.m.振盪した。染色液を取り除き 200 mL MQ を加えて 60 min, 30 r.p.m.振盪し、洗浄した。

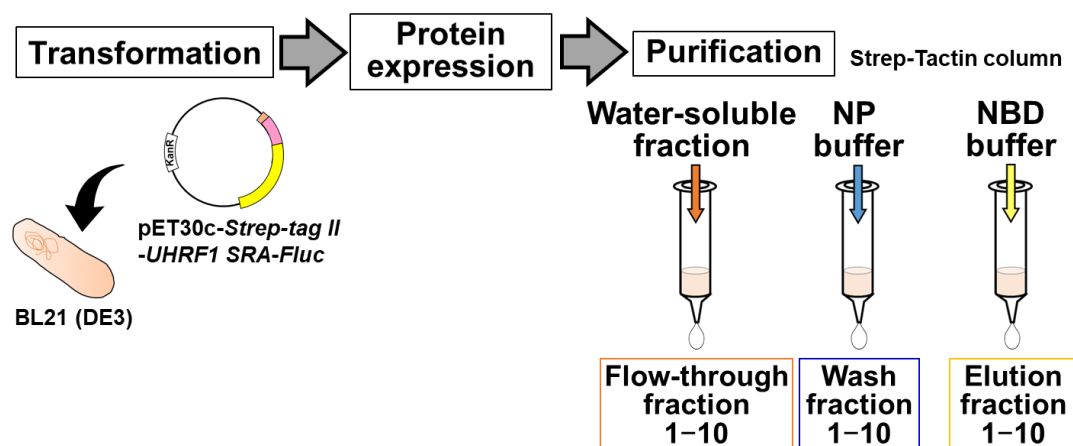


Fig. 2-3 Expression and purification of UHRF1 SRA-Fluc

第 3 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質のヘミメチル化 DNA に対する結合能解析

各種合成 ssDNA (Table 2-4)を反応液中(10 mM Tris-HCl, 0.8 mM MgCl₂, pH 7.4)で混合し、95°C で 5 min インキュベートした後、30 min かけて 25°C まで冷却し、ビオチン修飾の 0.2 μM 非メチル化(Um)、ヘミメチル化(Hm)及びフルメチル化(M) dsDNA を調製した。各種 dsDNA に 0.5% Tween20 を添加し、Streptavidin Coated White plate に加えて室温で 30 min インキュベートした。その後、200 μL Washing buffer (1 × PBS, 0.05% Tween20)で洗浄し、Biotin 溶液(200 pmol Biotin, 1×PBS, 2 mM MgCl₂)を用いてブロッキングした。再び洗浄し、UHRF1 SRA-Fluc を含む溶液(終濃度: 42 nM UHRF1 SRA-Fluc, 0.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)を加えて室温で 30 min インキュベートした(Fig. 2-4)。洗浄後、Firefly luciferase の基質である PicaGene を 100 μL を加えて Luciferase の発光強度を Spark 10M multimode microplate reader で測定した。

Table 2-4. Oligo DNA sequence

Name	Sequence (5'-3')
Biotinylated methylated DNA Top	Biotin-AAAAAACAGGATXGAGCAGCTACCCT (X = methylated cytosine)
Methylated DNA Bottom	AGGGTAGCTGCTXGATCCTG (X = methylated cytosine)
Biotinylated unmethylated DNA Biotin Top	Biotin-AAAAAACAGGATCGAGCAGCTACCCT
Unmethylated DNA Bottom	AGGGTAGCTGCTCGATCCTG

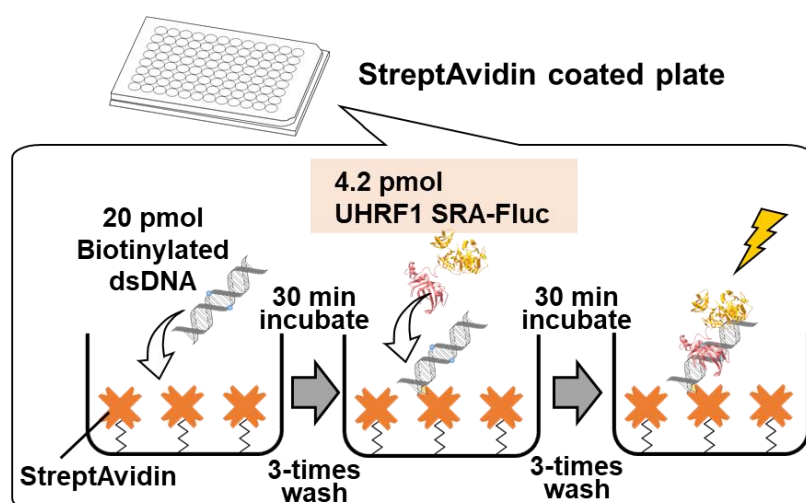


Fig. 2-4 Binding analysis of UHRF1 SRA-Fluc to hemi-methylated DNA

第 4 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いたヘミメチル化レベル測定法の検討

UHRF1 SRA-Fluc を用いたヘミメチル化レベル測定法の条件検討について、反応液中の dsDNA, UHRF1 SRA-Fluc, MgCl₂ の終濃度をそれぞれ 0.2 μM dsDNA, 42 nM UHRF1 SRA-Fluc, 0.5 μM MgCl₂ として、Table 2-5 の条件で本手法の検討を実施した。なお、本項で実施する BRET assay に使用した ssDNA 配列を Table 2-6 に示す。

Table 2-5. Condition of BRET assay

次番号	DNA	dsDNA (μM)	UHRF1 SRA-Fluc (nM)	BOBO-3 (μM)	MgCl ₂ (mM)	PicaGene (μL)
4-1	Um, Hm, M	0.01–0.2	42	0.5	0.5	50
4-2	Um, Hm, M	0.2	42	0.5, 1.5, 2.5	0.5	50
4-3	Hemi-methylation or Methylation level	0.2	42	0.5	0.5	50

Table 2-6. Oligo DNA sequence

Name	Sequence (5'–3')
Unmethylated Top DNA (99 mer)	CAGCCTAACTGGGAGGCACCCCCAGCAGGGCAC ACTGACACCTCACACGGCAGGGTATTCCAACAGAC CTGCAGCTGAGGGTCCTGTCTGTTAGAAGG
Unmethylated Bottom DNA (99 mer)	CCTTCTAACAGACAGGACCCTCAGCTGCAGGTCTG TTGGAATACCCTGCCGTGTGAGGTGTCAGTGTGCC CTGCTGGGGGGTGCCTCCCAGTTAGGCTG
Methylated Top DNA (99 mer)	CAGCCTAACTGGGAGGCACCCCCAGCAGGGCAC ACTGACACCTCACAXGGCAGGGTATTCCAACAGAC CTGCAGCTGAGGGTCCTGTCTGTTAGAAGG (X = methylated cytosine)
Methylated Bottom DNA (99 mer)	CCTTCTAACAGACAGGACCCTCAGCTGCAGGTCTG TTGGAATACCCTGCXGTGTGAGGTGTCAGTGTGCC CTGCTGGGGGGTGCCTCCCAGTTAGGCTG (X = methylated cytosine)

4-1. dsDNA 濃度検討

各種合成 ssDNA を反応液中(10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4)で混合し、95°C, 5 min インキュベートした後に 30 min かけて 25°C まで冷却し、2 μM 非メチル化、ヘミメチル化及びメチル化 dsDNA を調製した。Tris-HCl buffer (pH 7.4), MgCl₂ を混合した反応液に各種 dsDNA を終濃度 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 μM となるように混合した。そこに BOBO-3 を終濃度 0.5 μM となるように添加し、30 min 室温でインキュベートした。4.2 pmol UHRF1 SRA-Fluc を加えた後、Firefly luciferase の基質である PicaGene を 50 μL 加えて溶液全量 100 μL (終濃度: 0.01–0.2 μM DNAs, 0.5 μM BOBO-3, 42 nM UHRF1 SRA-Fluc, 0.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)として 37°C、波長 488–653 nm 範囲で発光強度を測定した(Spark 10M multimode microplate reader)。

4-2. DNA インターカレーター濃度検討

各種合成 ssDNA を反応液中(10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4)で混合し、95°C, 5 min インキュベートした後に 30 min かけて 25°C まで冷却し、2 μM 非メチル化、ヘミメチル化及びメチル化 dsDNA を調製した。各種 dsDNA, Tris-HCl buffer (pH 7.4), MgCl₂を混合した反応液に BOBO-3 を終濃度 0.5, 1.5 又は 2.5 μM となるように添加し、30 min 室温でインキュベートした。4.2 pmol UHRF1 SRA-Fluc を加えた後、PicaGene を 50 μL 加えて溶液全量 100 μL (終濃度: 0.5–2.5 μM BOBO-3, 0.2 μM dsDNA, 42 nM UHRF1 SRA-Fluc, 0.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)として 37°C、波長 488–653 nm 範囲で発光強度を測定した(Spark 10M multimode microplate reader)。

4-3. ヘミメチル化レベル測定法の検討

各種合成 ssDNA を反応液中(10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4)で混合し、95°C, 5 min インキュベートした後に 30 min かけて 25°C まで冷却し、2 μM 非メチル化(Um)、ヘミメチル化(Hm)及びメチル化(M) dsDNA を調製した。調製した Um dsDNA, Hm dsDNA を混合して各々のヘミメチル化レベル、メチル化レベルの dsDNA はヘミメチル化レベル 0, 20, 50, 100%となるようにした。同様に、各種メチル化レベルの dsDNA は、Um dsDNA, M dsDNA を混合することにより作製した(Fig. 2-5)。その後、各種ヘミメチル化、メチル化レベルの dsDNA と Tris-HCl buffer (pH 7.4), MgCl₂を混合した反応液を調製した。この反応液に BOBO-3 を終濃度 0.5 μM となるように添加し、30 min, 室温でインキュベートした。4.2 pmol UHRF1 SRA-Fluc を加えた後、PicaGene 50 μL 加えて溶液全量 100 μL (終濃度: 0.2 μM dsDNA, 42 nM UHRF1 SRA-Fluc, 0.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)として 37°C、波長 488–653 nm 範囲で発光強度を測定した(Spark 10M multimode microplate reader)。

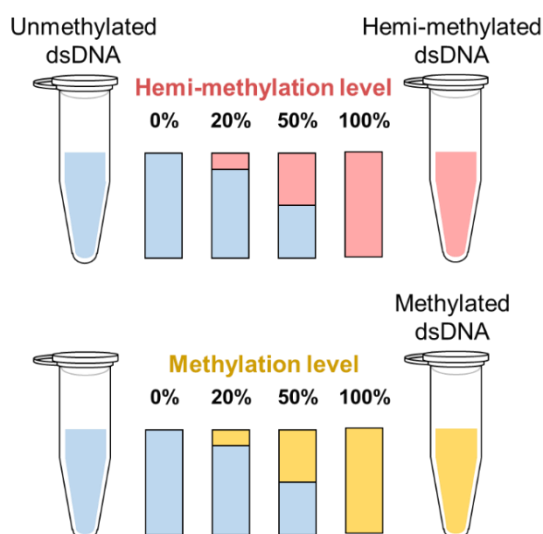


Fig. 2-5 Preparation of dsDNA mixture for characterize the DNA hemi-methylation levels

第 4 節 実験結果・考察

第 1 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質発現ベクターの構築

培養した HeLa 細胞 1.5×10^5 cells から RNeasy Mini Kit を用いて 3.4 μg Total RNA を得た。Total RNA より、RT-PCR System を用いて Total cDNA 合成した。Total cDNA を鋳型に 612 bp の UHRF1 SRA cDNA を PCR で増幅した結果、目的の位置(612 bp)付近にバンドが確認された。PCR 産物を精製し、EcoRI と NdeI で制限酵素処理した。pET30c-*Fluc* に対して精製した UHRF1 SRA 遺伝子をモル比 1 : 1 の割合でライゲーションした。ライゲーション産物を用いて大腸菌 DH5 α の形質転換を行なった。その結果、ライゲーション産物を用いて形質転換した大腸菌でコロニーが形成された。形成されたコロニーを LB+Kanamycin 液体培地(終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin)で培養した。Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System を用いて、培養液からプラスミドを抽出した。得られたプラスミドのシーケンシング結果より pET30c-*Strep-tag II-UHRF1 SRA-Fluc* が構築されたことが示された(Fig.2-6, 2-7)。この構築された pET30c-*Strep-tag II- UHRF1 SRA-Fluc* のベクターマップを Fig.2-8 に示す。

DNA sequence of *Strep-tag II-UHRF1 SRA-Fluc*

ATG **TGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAAG** CCGTCCAACCACTACGGACCCATCCCGGGGATCCCGG
TGGGCACCATGTGGCGGTTCCGAGTCCAGGTCAGCGAGTCGGGTGTCCATCGGCCCCACGTGGC
TGGCATAACAGGCCGGAGCAACGACGGAGCGTACTCCCTAGTCCTGGCGGGGGGCTATGAGGAT
GATGTGGACCATGGGAATTTTTTTCACATACACGGGTAGTGGTGGTTCGAGATCTTTCCGGCAACA
AGAGGACCGCGGAACAGTCTTGTGATCAGAACTCACCAACACCAACAGGGCGCTGGCTCTCAA
CTGCTTTGCTCCCATCAATGACCAAGAAGGGGCCGAGGCCAAGGACTGGCGGTTCGGGAAGCCG
GTCAGGGTGGTGCACAATGTCAAGGGTGGCAAGAATAGCAAGTACGCCCCGCTGAGGGCAACC
GCTACGATGGCATCTACAAGTTGTGAAATACTGGCCCGAGAAGGGGAAGTCCGGGTTTCTCGT
GTGGCGCTACCTTCTGCGGAGGACGATGATGAGCCTGGCCCTTGACGAAGGAGGGGAAGGAC
CGGATCAAGAAGCTGGGGCTGACCATGCAGTATCCAGAAGGCTACCTGGAAGCCCTGGCCAACG
AATTCATGGTTTTTCATGGAGAACGATGAAAATATTGTGTATGGTCCTGAACCATTTTACCCTAT
TGAAGAGGGATCTGCTGGAGCACAATTGCGCAAGTATATGGATCGACATGCAAACTTGGAGCA
ATTGCTTTTACTAACGCACTTACCGGTGTCGATTATACGTACGCCGAATACTTAGAAAAATCAT
GCTGTCTAGGAGAGGCTTTAAAGAATTATGGTTTTGGTTGTTGATGGAAGAATTGCGTTATGCAG
TGAAAACCTGTGAAGAGTTCTTTATTCTGTATTAGCCGGTTTTATTTATAGGTGTCCGGTGTGGCT
CCAATAATGAGATTTACACTCTACGTGAATTGGTTCACAGTTTAGGCATCTCTAAGCCAACAA
TTGTATTTAGTTCTAAAAAAGGATTAGATAAAGTTATAACTGTACAAAAAACGGTAACCTGCTAT
TAAAACCATTTGTTATATTGGACAGCAAAGTGGATTATAGAGGTTATCAATCCATGGACAACCTT
ATTAATAAAAAACACTCCACAAGGTTTCAAAGGATCAAGTTTTAAACTGTAAAAGTTAACCGCA
AAGAACAAGTTGCTCTTATAATGAACTCTTCGGGTTCAACCGGTTTGCCAAAAGGTGTGCAACT
TACTCATGAAAATTTGGTCACGCGTTTTTCTCACGCTAGAGATCCAATTTATGGAACCAAGTT
TCACCAGGCACGGCTATTTTAACTGTAGTACCATTCCATCATGGTTTTGGTATGTTTACTACTT
TAGGCTATCTAACTTGTGGTTTTTCGTATTGTCATGTTAACGAAATTTGACGAAGAGACTTTTTT
AAAAACACTGCAAGATTACAAATGTTCAAGCGTTATTCTTGTACCGACTTTGTTTGCAATTCTT
AATAGAAGTGAATTACTCGATAAATATGATTTATCAAAATTTAGTTGAAATTCATCTGGCGGAG
CACCTTTATCTAAAGAAATTTGGTGAAGCTGTTGCTAGACGTTTTAATTTACCGGGTGTTCGTCA
AGGCTATGGTTTTAACAGAAAACAACCTCTGCAATTATATCACACCGGAAGGCGATGATAAACCA
GGTGCTTCTGGCAAAGTTGTGCCATTATTTAAAGCAAAAAGTTATCGATCTTGATACTAAAAAA
CTTTGGGCCCGAACAGACGTGGAGAAGTTTGTGTAAAGGGTCCATGCTTATGAAAGGTTATGT
AGATAATCCAGAAGCAACAAGAGAAATCATAGATGAAGAAGGTTGGTTGCACACAGGAGATATT
GGGTATTACGATGAAGAAAAACATTTCTTTATCGTGGATCGTTTGAAGTCTTTAATCAAATACA
AAGGATATCAAGTACCACCTGCTGAATTAGAATCTGTTCTTTTGCAACATCCAAATATTTTTGA
TGCCGGCGTTGCTGGCGTTCCAGATCCTATAGCTGGTGAGCTTCCGGGAGCTGTTGTTGTACTT
AAGAAAGGAAAATCTATGACTGAAAAAGAAGTAATGGATTACGTTGCTAGTCAAGTTTCAAATG
CAAACGTTTTCGCTGGTGGTGTCCGTTTTGTGGACGAAGTACCTAAAGGTCTCACTGGTAAAT
TGACGGTAAAGCAATTAGAGAAATACTGAAGAAACCAGTTGCTAAGTGA

Fig. 2-6 The DNA sequence of *Strep-tag II-UHRF1 SRA-Fluc*

DNA sequences coding for *UHRF1 SRA* (RefSeq accession: NM_001290050) and *firefly luciferase* (GeneBank accession: AB778505) are shown as red and blue, respectively. The *Strep-tag II* is highlighted in yellow.

Amino acid sequence of Strep-tag II-UHRF1 SRA-Fluc

MWSHPQFEKPSNHYGPIPGIPVGTMRFRVQVSESGVHRPHVAGIHGRSNDGAYSLVLAGGYED
 DVDHGNFFTYTGSGRDLSGNKRTAEQSCDQKLTNTNRALALNCFAPINDQEGAEAKDWRSGKP
 VRVVRNVKGGKNSKYAPAEGNRYDGIYKVVKYWPEKKGKSGFLVWRYLLRRDDDEPGPWTEKGD
 RIKKLGLTMQYPEGYLEALANEFMVMENDENIVYGPEPFYPIEEGSAGAQLRKYMDRHAKLGA
 IAF TNALTGV DYTAEYLEKSCCLGEALKNYGLVVDGRIALCSENCEEFFIPVLAGLFIGVVA
 PTNEIYTLRELVHSLGISKPTIVFSSKKGDKVITVQKTVTAIKTIVILDSKVDYRGYQSMDF
 IKKNT PQGFKGSSFKTVKVN RKEQVALIMNSSGSTGLPKGVQLTHENLVTRF SHARDPIYGNQV
 SPGTAILT VVPFHGFGMFTTLG YLTCGFRIVMLTKFDEETFLKTLQDYKCSSVILVPTLFAIL
 NRSELLDKYDL SNLVEIASGGAPLSKEIGEAVARRFNLPGVRQGYGLTETTSAI IITPEGDDKP
 GASGVVPLFKAKVIDLDTKKTLPNRRGEVCVKGPMLMKG YVDNPEATREI IDEEGWLHTGDI
 GYDEEKHFFIVDRLKSLIKYKGYQVPPAELESVLLQHPNIFDAGVAGVPDPIAGELPGAVVVL
 KKGKSMTEKEVMDYVASQVSNAKRLRGGVRFVDEVPKGLTGKIDGKAIREILKKPVAK

Fig. 2-7 The amino acid sequence of Strep-tag II-UHRF1 SRA-Fluc

This sequences coding for UHRF1 SRA (PDB ID: 3DWH) and firefly luciferase are shown as red and blue, respectively. The Strep-tag II is highlighted in yellow.

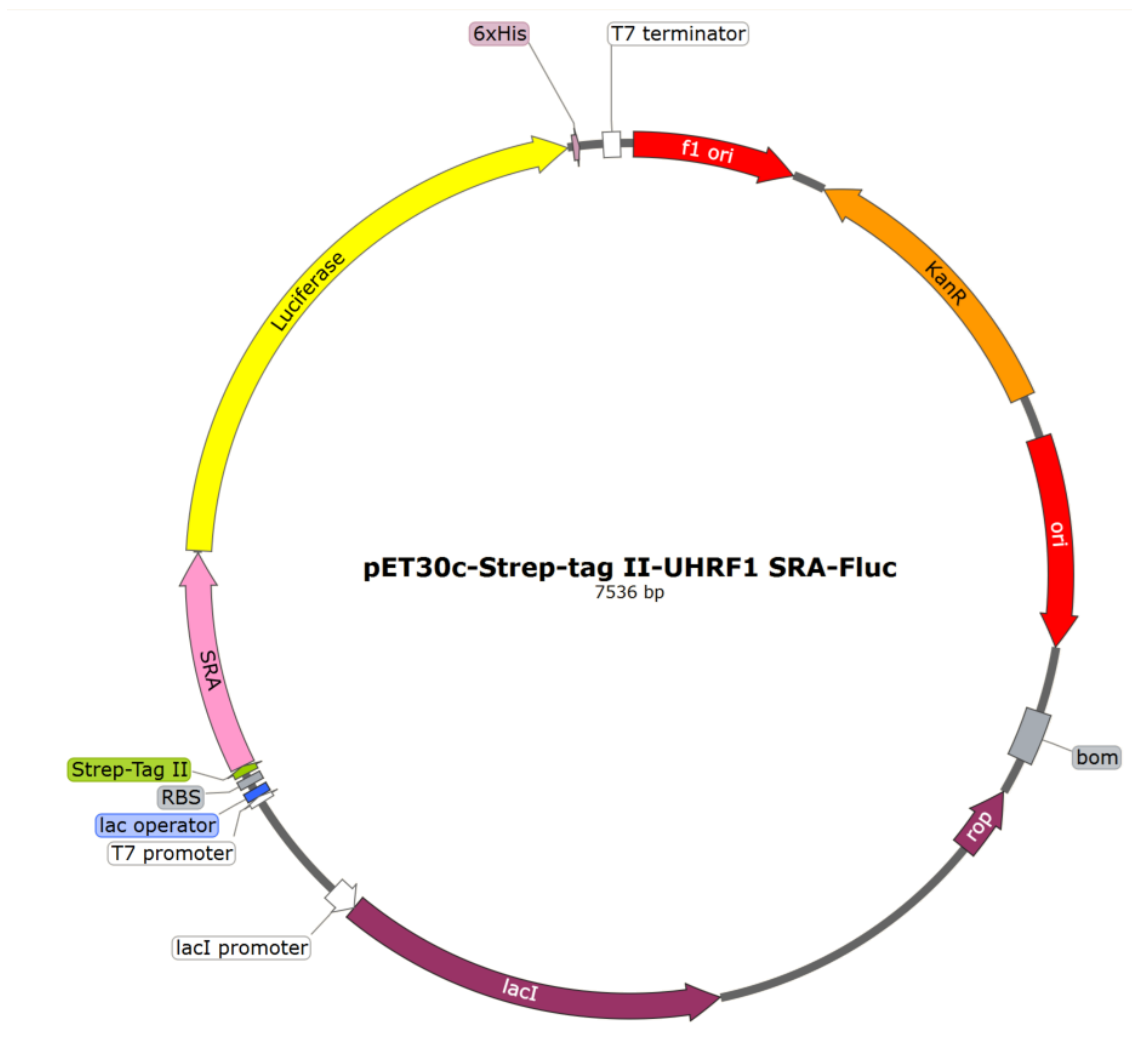


Fig. 2-8 pET30c-Strep-tag II-UHRF1 SRA-Fluc vector map

第 2 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質の組換え生産

pET30c-Strep-tag II-UHRF1 SRA-Fluc を用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換させ、UHRF1 SRA-Fluc の発現を行なった。OD₆₀₀ 値 0.5 付近終濃度 1.2 mM となるように IPTG を添加して発現を誘導した。培養して得られた湿菌体 200 mg より、Bug Buster Regent を用いて菌体を破碎して得られた溶液を遠心した。遠心後の溶液の上清を取り出して水溶性画分とした。本融合蛋白質には精製タグとして Strep-tag II を融合してあるため、水溶性画分より、Strep-tag II を利用して UHRF1 SRA-Fluc の精製を行なった。精製画分として、通過画分(F1–10)、洗浄画分(W1–10)及び溶出画分(E1–10)を回収し、各精製画分の Luciferase 活性を測定した(Fig.2-9)。加えて、溶出画分の蛋白質濃度を測定した結果、溶出画分 2 (E2) で 201.5 ng/μL の UHRF1 SRA-Fluc が 1 mL 得られた。溶出画分(E1–10)をまとめると UHRF1 SRA-Fluc の濃度は 1.86 mg/mL (18.6 mg/10 mL) であり、発現誘導は 150 mL 培地で実施したため、培地当たりの収量は 0.12 mg/mL と考えられる。

溶出画分を SDS-PAGE で解析し、Quick-CBB PLUS で染色した(Fig.2-10)。その結果、E2 で目的の位置付近(84 kDa)にバンドが示された。したがって、UHRF1 SRA-Fluc が精製できたことが示された。

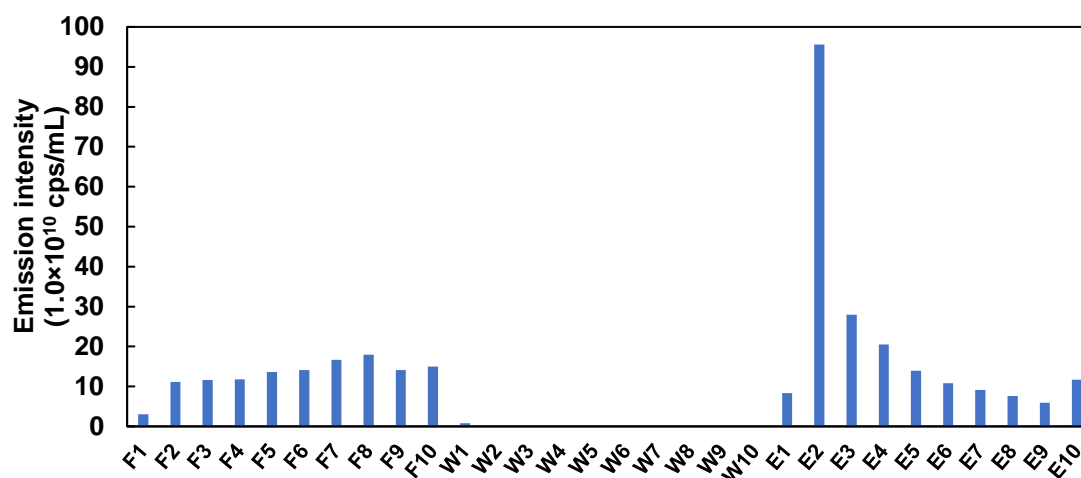


Fig. 2-9 Luciferase activities of each fraction during the purification of UHRF1 SRA-Fluc.

Flow-through fractions (F1–10), wash fractions (W1–10), and elution fractions (E1–10)



Fig. 2-10 SDS-PAGE analysis of purified UHRF1 SRA-Fluc (MW: 8.4×10^4)
The elution fractions (E1–10) were analyzed using 12% SDS-PAGE electrophoresis.

第 3 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質のヘミメチル化 DNA に対する結合能解析

精製した UHRF1 SRA-Fluc のヘミメチル化 DNA に対する特異性を検討するために、20 bp 非メチル化、ヘミメチル化、メチル化 DNA を固定化した 96 穴プレートを用いて結合能を評価した。各種 DNA を固定化したウェルに UHRF1 SRA-Fluc を添加し、DNA に結合していない融合蛋白質を洗浄操作によって取り除いた。その後、すぐに発光強度を測定した。NC (Negative control) として、DNA を固定化せずに Biotin でブロッキングしたウェルの発光強度も測定した。NC と比較して非メチル化またはメチル化 DNA を固定化した場合で発光強度の差は示されなかった(Fig.2-11)。一方、ヘミメチル化 DNA を固定化した条件では、他条件の約 1.5 倍の発光強度が得られた。各種 DNA 条件で示された発光強度に対して多重比較検定を実施した結果、非メチル化、メチル化 DNA に対してヘミメチル DNA 条件において有意な差が示された($p < 0.05$)。従って、UHRF1 SRA-Fluc はヘミメチル化 DNA を特異的に認識していることが示された。

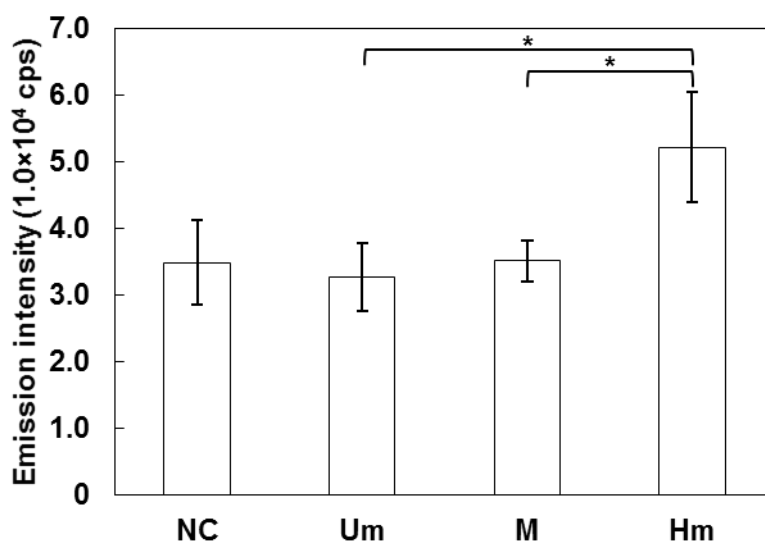


Fig. 2-11 Binding assay of UHRF1 SRA-Fluc to the hemi-methylated DNA.

The biotinylated unmethylated (Um), fully methylated (M), or hemi-methylated (Hm) DNAs (20 pmol) were added to a streptavidin-immobilized plate. After the blocking of the biotin, 42 nM UHRF1 SRA-Fluc was added to the wells. As a negative control, a biotin blocked well without any DNA was employed. All measurements were performed in triplicate and reported as the mean \pm standard deviation. There was a significant difference between the emission intensity in Um and Hm, or M and Hm (ANOVA with Tukey-Kramer post hoc analysis¹⁵⁹, $*p < 0.05$).

第 4 項 UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いたヘミメチル化レベル測定法の検討

UHRF1 SRA-Fluc は 570 nm 付近に最大発光波長を持つ。UHRF1 SRA-Fluc の発光強度を測定した結果、波長 578 nm での発光強度が、99-bp の dsDNA 存在下では減少して示された (Fig.2-12A)。UHRF1 SRA-Fluc が DNA へ結合することで、蛋白質構造が変化したことが発光強度の減少を誘導したと考えられる。しかし、各波長の発光強度を波長 548 nm の強度で割って補正することで、DNA を添加したことによる発光強度への影響はなくなる (Fig.2-12B)。故に、本手法では得られた発光スペクトルを 548 nm の発光強度で正規化することによって、UHRF1 SRA-Fluc の発光によって励起された BOBO-3 の蛍光強度を測定した。

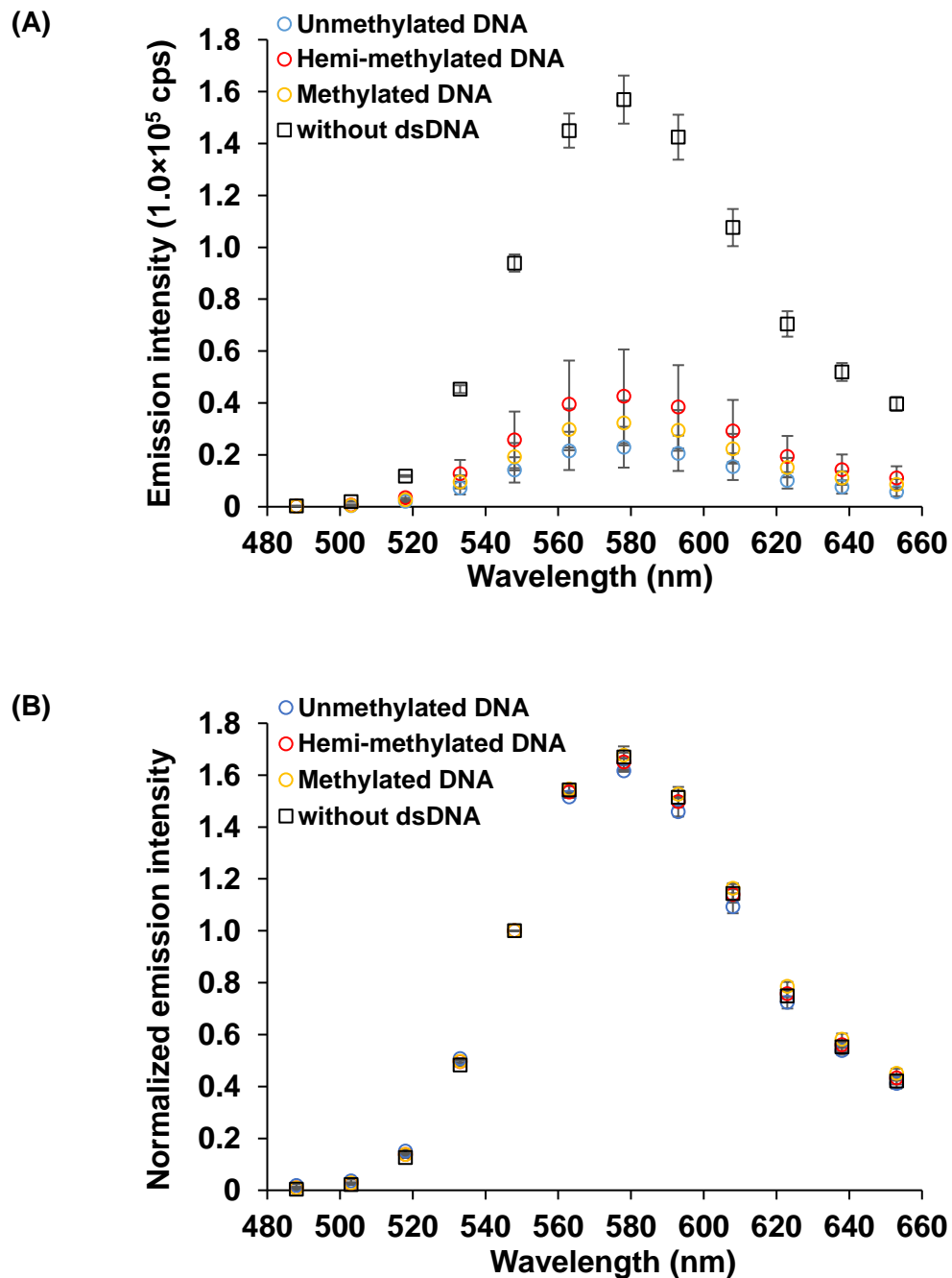


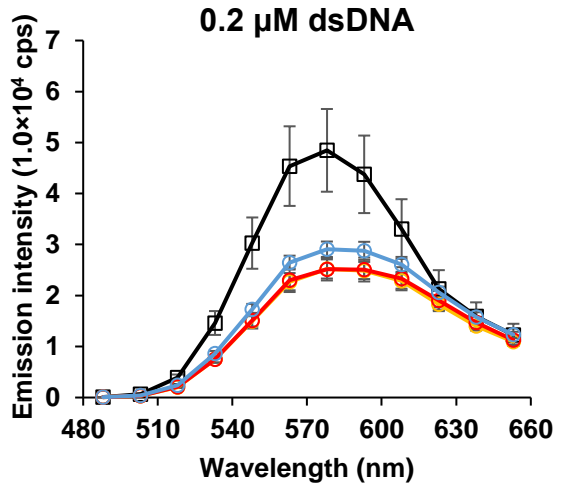
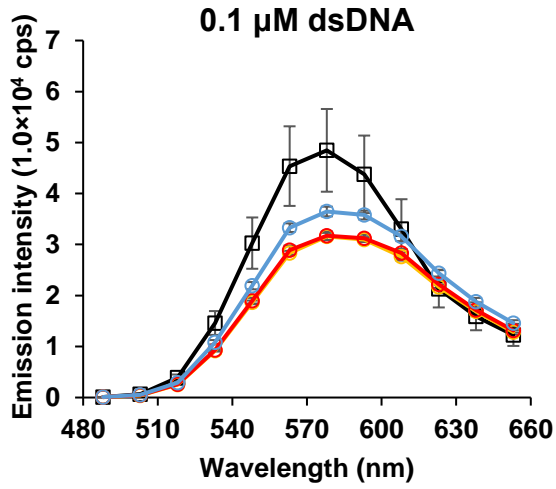
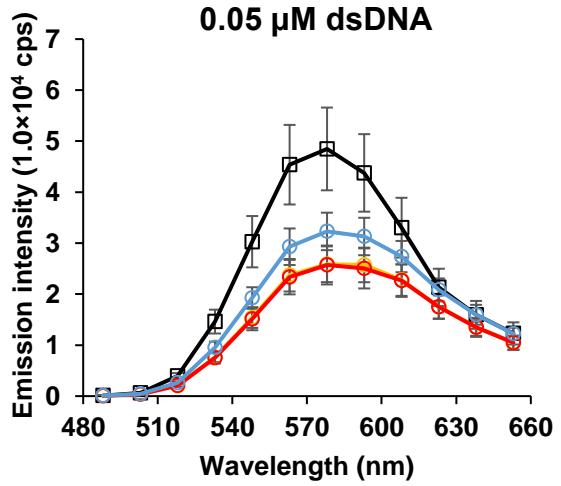
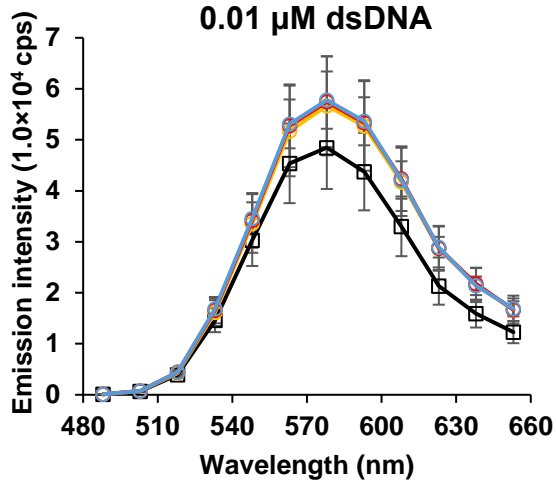
Fig. 2-12 Emission spectra of UHRF1 SRA-Fluc without BOBO-3

(A) The emission intensity of 42 nM UHRF1 SRA-Fluc was measured using 50 μ L of PicaGene luminescent substrate in a 100 μ L reaction volume in the presence or absence of 0.2 μ M dsDNA (mean \pm SD, $n = 3$). (B) Normalized spectra of UHRF1 SRA-Fluc bioluminescence at 548 nm.

4-1. dsDNA 濃度検討

DNA インターカレーターである BOBO-3 は 570 nm を最大励起波長とし、602 nm を最大蛍光波長とする。2019 年に報告した MBD-Fluc と CXXC-Oluc を用いた Multicolor BRET assay では、Firefly luciferase の最大発光波長 560 nm 付近で得られた発光強度は BOBO-3 由来の蛍光強度を約 2.1% 含んでしまうため、BOBO-3 の蛍光強度を約 1% しか含まない 550 nm の発光強度でスペクトルを補正している¹⁴⁴。本手法においても発光スペクトルを測定し、波長 548 nm の発光強度で補正すると、UHRF1 SRA-Fluc のみ(BOBO-3 非添加)の条件と比較して、ヘミメチル化 DNA、非メチル化及びメチル化 DNA 存在下の発光強度の差は 608 nm で最も大きく示された。したがって、本論文においても 608 nm の発光強度を BRET シグナルとして扱うこととした。BRET シグナルを測定するために、UHRF1 SRA-Fluc, 各種 DNA, BOBO-3, Luciferase 発光基質を混合し、溶液全量 100 μ L (終濃度: 0.01–0.2 μ M DNAs, 0.5 μ M BOBO-3, 42 nM UHRF1 SRA-Fluc, 0.5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) として発光強度を測定した(Fig.2-13A)。得られた全ての発光スペクトルは 548 nm の発光強度で補正した(Fig.2-13B)。全ての DNA 濃度条件で DNA 添加によって、波長 593 nm 以上で高い発光強度が得られたため、BRET が生じていることが示唆された(Fig.2-13)。DNA 濃度が 0.01 μ M 条件であると、波長 593 nm 以上では各種 DNA において発光強度の差は示されなかった。一方で、0.2 μ M DNA 条件で非メチル化、メチル化 DNA と比較してヘミメチル化 DNA 存在下での発光強度が高く示された。したがって、本手法では 0.2 μ M DNA 条件が至適であると考えられる。

- (A)
- UHRF1 SRA-Fluc only
 - Methylated
 - Hemi-methylated
 - Unmethylated



- (B)
- UHRF1 SRA-Fluc only
 - Methylated
 - Hemi-methylated
 - Unmethylated

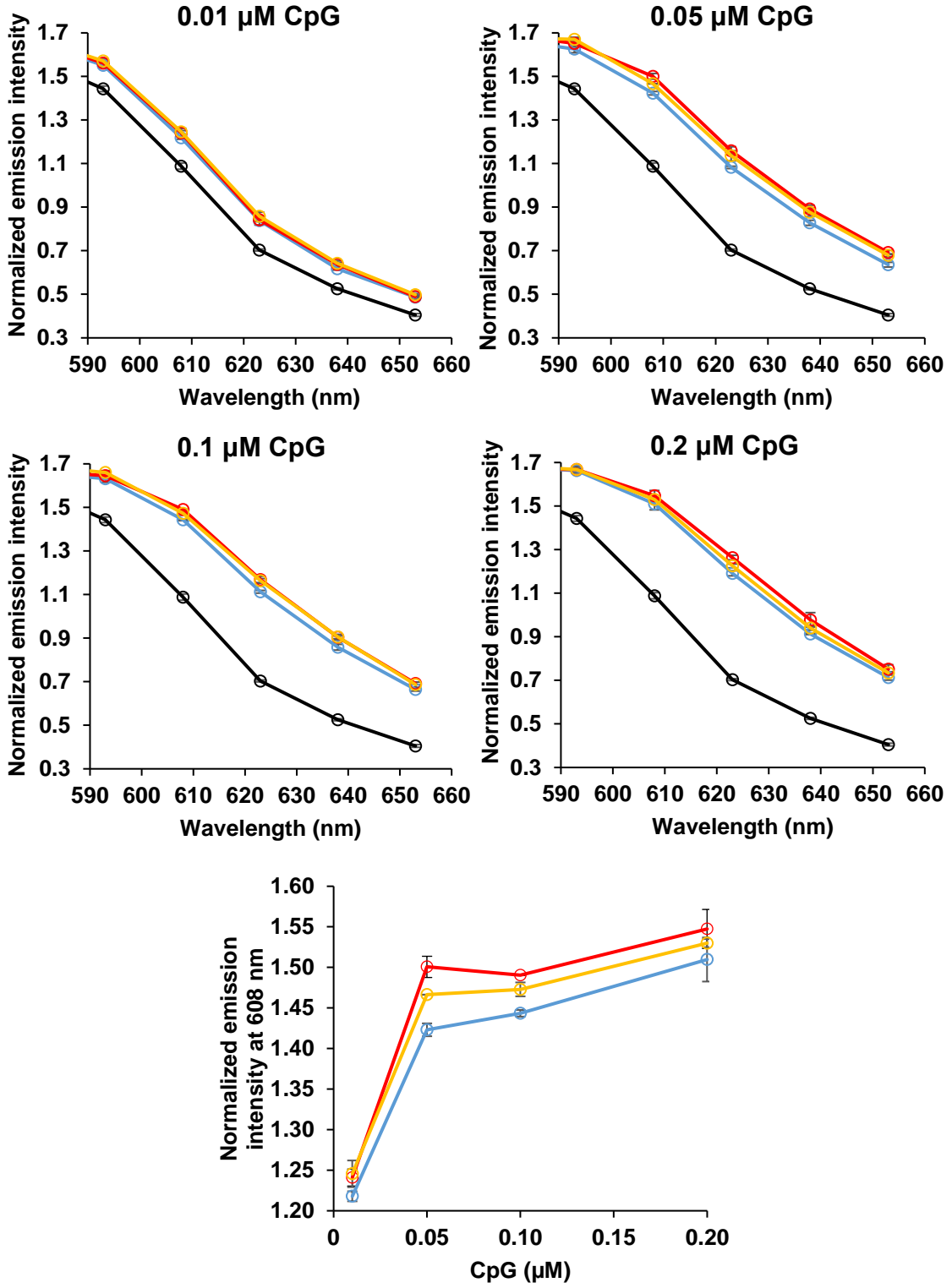


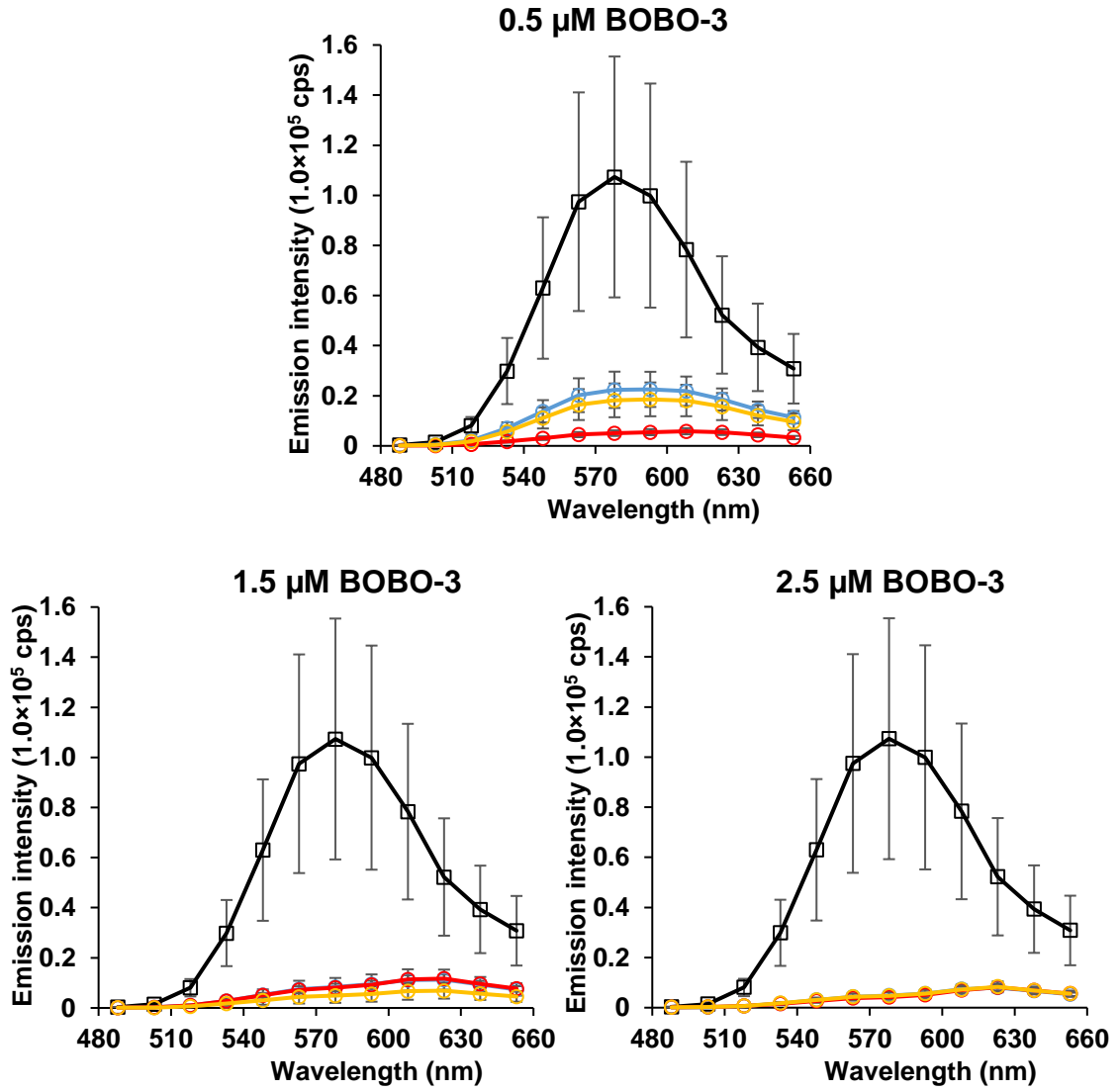
Fig. 2-13 BRET signal dependence on the concentration of dsDNA

To investigate the BRET signal dependence on the concentrations of dsDNA, the 0.01, 0.05, 0.1, and 0.2 μM of dsDNA were used in the BRET assay. All experiments were performed in triplicate (mean \pm SD). (A) Emission spectrum of UHRF1 SRA-Fluc without BOBO-3 is shown as black line. Emission spectra of UHRF1 SRA-Fluc with BOBO-3 in the presence of unmethylated (blue), fully methylated (yellow) or hemi-methylated (red). (B) The emission spectra normalized by the intensity at 548 nm.

4-2. DNA インターカレーター濃度検討

BRET シグナルを測定するために、UHRF1 SRA-Fluc, 各種 DNA, BOBO-3 を混合し、溶液全量 100 μL (終濃度: 0.5–2.5 μM BOBO-3, 0.2 μM dsDNA, 42 nM UHRF1 SRA-Fluc, 0.5 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) として発光強度を測定した(Fig.2-14)。各種 DNA 添加による発光強度の変化を補正するために、得られた全ての発光スペクトルは 548 nm の発光強度で補正した(Fig.2-14B)。この結果より、全ての BOBO-3 濃度条件で BOBO-3 添加によって、波長 593 nm 以上で高い発光強度が得られたため、BRET が生じていることが示された。BOBO-3 濃度が上昇するにつれて 608 nm での発光強度は高く示されたが、非メチル化、メチル化およびヘミメチル化 DNA それぞれの条件での BRET シグナルの差は低下していった。これは UHRF1 SRA のヘミメチル化 CpG への結合様式が起因していると考えられる。UHRF1 SRA はヘミメチル化 CpG の 5mC を 2 重らせん外に flipping out することによってヘミメチル化 CpG を認識している^{74-76,160}。一方、MD simulation により、DNA の全てのリン酸基の電荷を陽イオンでマスクすることによって、非メチル化 DNA のシトシンが他の DNA に比べて、2 重らせん外に flipping out しやすいことが報告されている⁷⁶。故に、陽イオン濃度が高いと、全ての DNA で base flipping が生じ、UHRF1 SRA がヘミメチル化 DNA だけでなく他の DNA も認識するのではないかと推測される。そのため、陽イオン濃度を低くすることで、DNA での base flipping を抑えられ、UHRF1 SRA はヘミメチル化 DNA のみ認識すると考えた。今回用いた BOBO-3 もプラスチャージを帯びているため、過剰量存在すると陽イオン同様に他の DNA での base flipping が生じる可能性がある。以上より、本手法ではヘミメチル化 DNA を特異的に検出するには、反応液における陽イオン濃度及び BOBO-3 濃度が低い条件が適していると考えられる。今回の BRET assay では BOBO-3 濃度 0.5 μM 条件では非メチル化 DNA、メチル化 DNA と比較して約 1.3 倍の発光強度がヘミメチル化 DNA 条件で得られた。したがって、0.2 μM DNA, 0.5 μM BOBO-3 条件でヘミメチル化 DNA を検出可能であることが示された。

- (A)
- UHRF1 SRA-Fluc only
 - Methylated
 - Hemi-methylated
 - Unmethylated



- (B)
- UHRF1 SRA-Fluc only
 - Methylated
 - Hemi-methylated
 - Unmethylated

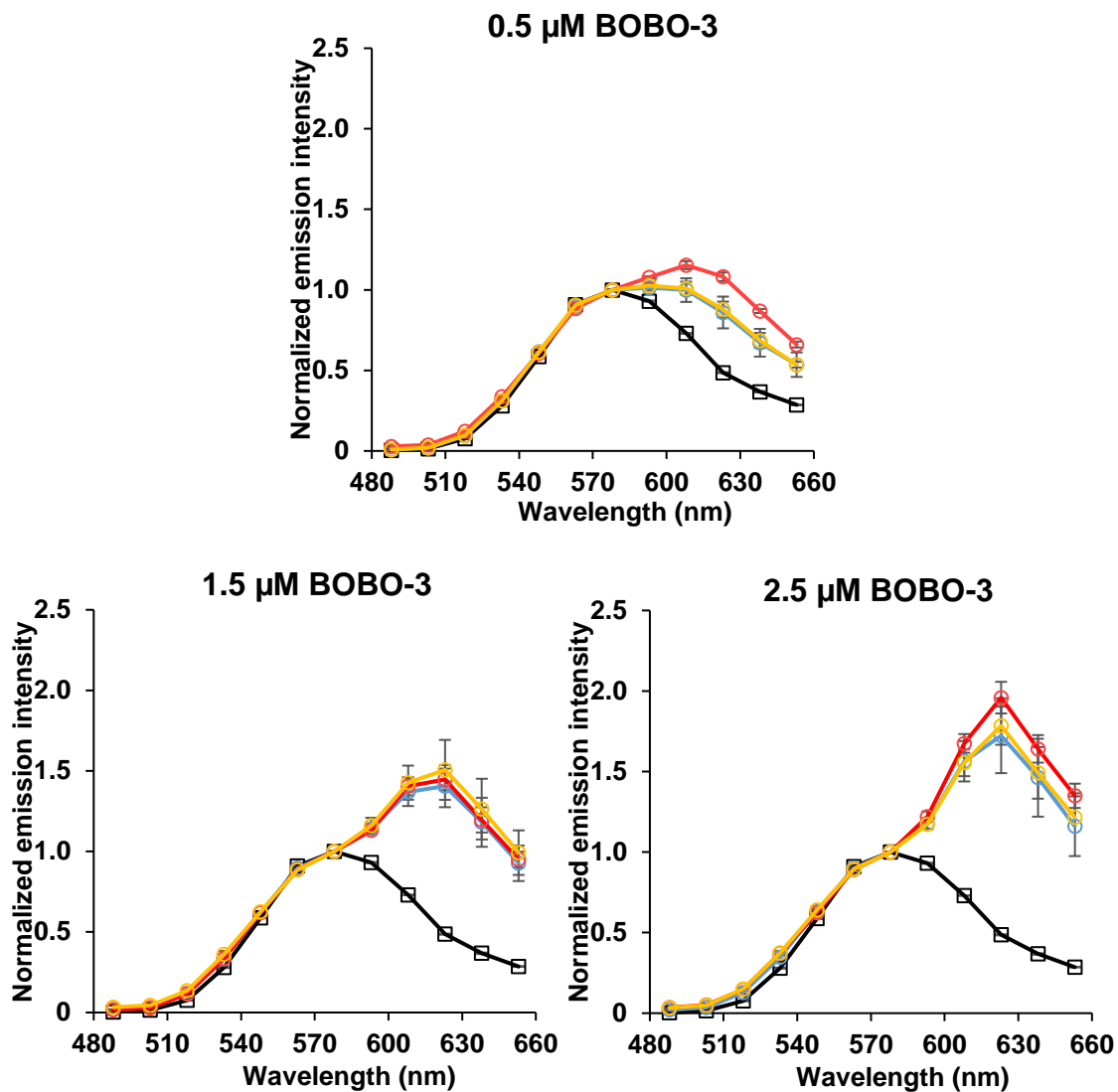


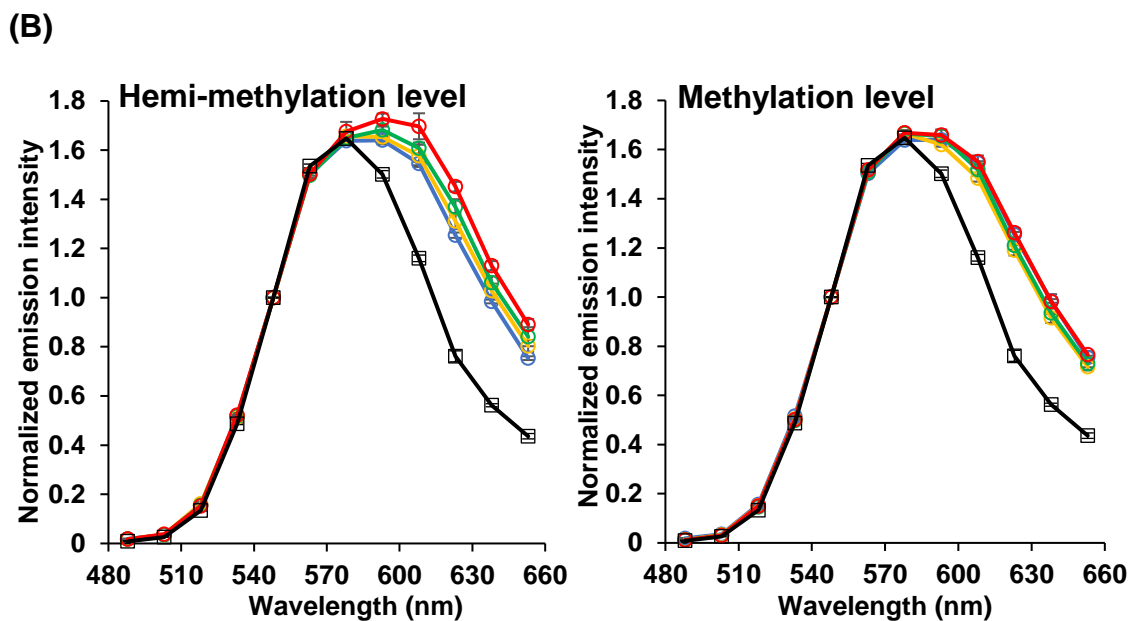
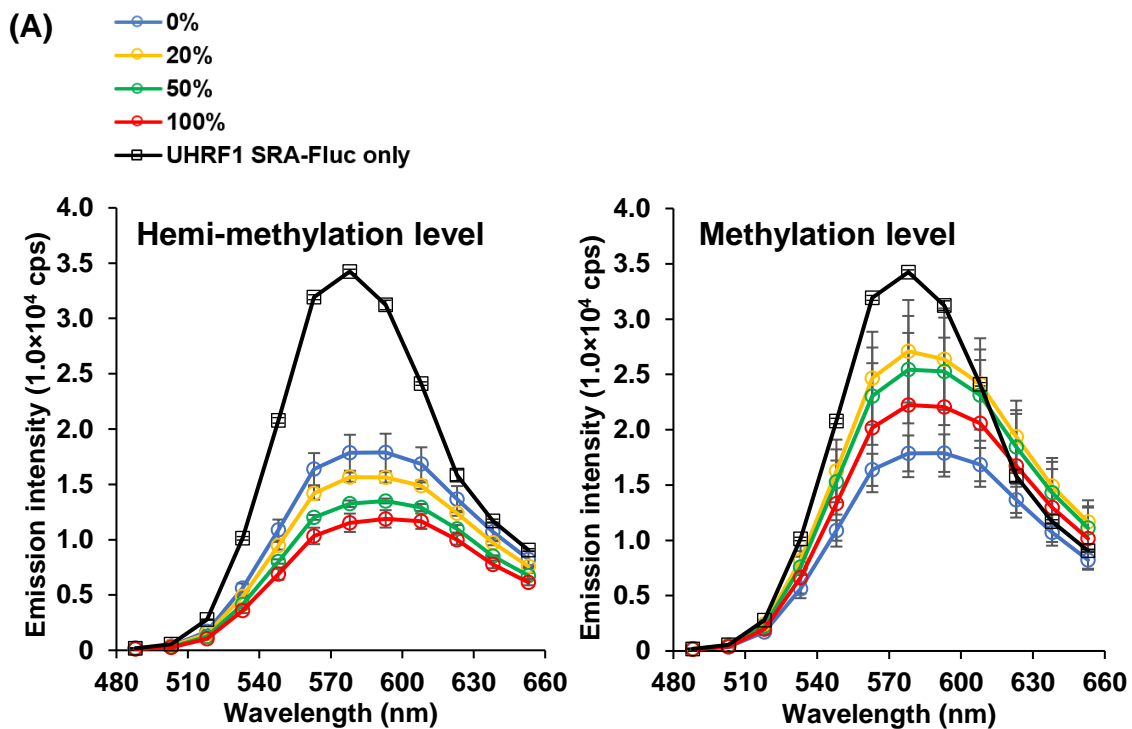
Fig. 2-14 BRET signal dependence on the concentration of BOBO-3

To investigate the BRET signal dependence on the concentrations of BOBO-3, the 0.5, 1.5, and 2.5 μ M of BOBO-3 were used in the BRET assay. All experiments were performed in triplicate (mean \pm SD). (A) Emission spectrum of UHRF1 SRA-Fluc without BOBO-3 is shown as black line. Emission spectra of UHRF1 SRA-Fluc in the presence of unmethylated (blue), fully methylated (yellow) or hemi-methylated (red). (B) The emission spectra normalized by the intensity at 548 nm.

4-3. ヘミメチル化レベル測定法の検討

本手法でヘミメチル化レベルを測定できるか検討するために、非メチル化とヘミメチル化 dsDNA 又はメチル化 dsDNA を混合してヘミメチル化又はメチル化レベル 0, 20, 50, 100% となるように調製した。これらの DNA に対して BOBO-3 を加えて 30 min 室温でインキュベートし、4.2 pmol UHRF1 SRA-Fluc を加えた後、PicaGene 50 μ L 加えて溶液全量 100 μ L (終濃度: 0.2 μ M dsDNA, 42 nM UHRF1 SRA-Fluc, 0.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) として発光スペクトルを測定した(Fig.2-15)。Fig.2-15A より、UHRF1 SRA-Fluc の発光スペクトルと比較して DNA 添加によって 593 nm 以上で発光強度が上昇していることより、BRET が生じていることが示された。メチル化 DNA 条件では、BOBO-3 最大蛍光波長 605 nm 付近の蛍光強度(波長 608 nm または 623 nm の蛍光強度)は各種メチル化レベルで差がなく、メチル化レベル依存的に BRET シグナルは示されなかった(Fig.2-15C)。一方で、本手法において各種ヘミメチル化レベル条件で検討した結果、波長 608 nm または 623 nm における蛍光強度はヘミメチル化レベル依存的に上昇して示された(Fig.2-15C)。メチル化レベルとヘミメチル化レベルで波長 608 nm または 623 nm における発光強度を比較すると、メチル化レベルの上昇による BRET シグナルの変化は微小だが、ヘミメチル化レベルの検討においてはレベル依存的に発光強度の増加が見られた($R^2=0.99$, Fig.2-15D)。波長 623 nm の発光強度は 608 nm と比較して BOBO-3 のシグナルが高く示され、この時の検出限界は 0.02 μ M (2 pmol)のヘミメチル化 CpG であった。さらに、この時のヘミメチル化レベル 0, 20, 50, 100%の時の R.S.D. (Relative Standard Deviation)を算出すると、それぞれ波長 608 nm の BRET シグナルでは 0.46, 2.86, 1.38, 3.11%であり、波長 623 nm の BRET シグナルでは 0.87, 2.51, 2.39, 1.37%であった。

以上より、UHRF1 SRA-Fluc を用いて、BOBO-3 の蛍光強度を測定することにより、ヘミメチル化レベルを定量できることが示された。



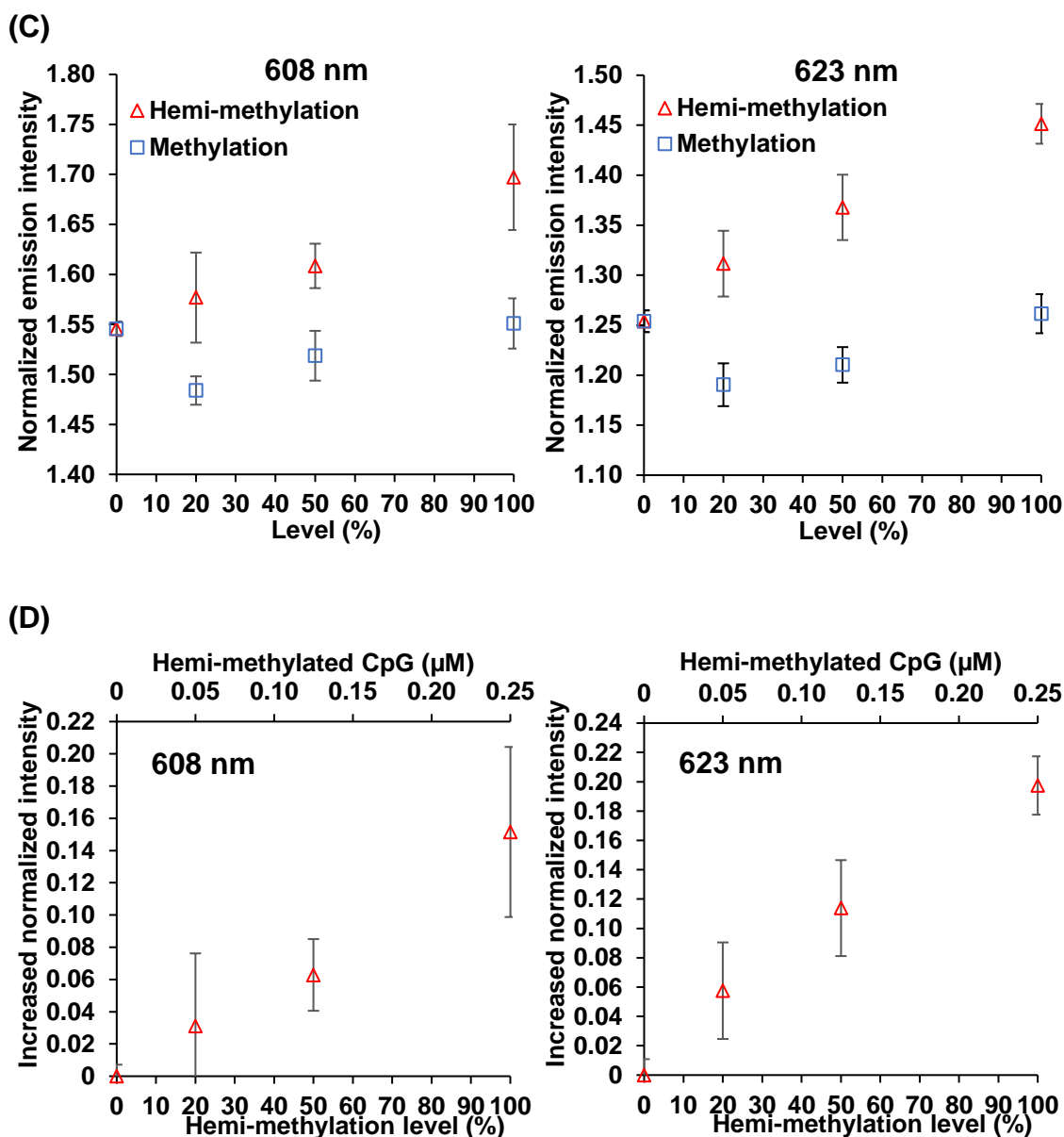


Fig. 2-15 Quantification of the DNA hemi-methylation level using the BRET assay.

All experiments were performed in triplicate (mean \pm SD). (A) Emission spectra of UHRF1 SRA-Fluc in the presence of 0%, 20%, 50%, or 100% of hemi-methylated DNA, or methylated DNA. Furthermore, Emission spectrum of UHRF1 SRA-Fluc without BOBO-3 is shown as black line. (B) The emission spectra normalized by the intensity at 548 nm. (C) Normalized emission intensity at 608 nm or 623 nm in the presence of hemi-methylated (red) and methylated DNA (blue). (D) Normalized emission intensity at 608 nm or 623 nm in the presence of 0%, 20%, 50%, or 100% of hemi-methylated DNA ($R^2 = 0.99$). Hemi-methylated CpG of hemi-methylation level 0, 20, 50, 100% contains 0, 4, 10, 20 pmol in the 100 μ L volume.

第5節 結言

本章では、ヘミメチル化 CpG 結合蛋白質である UHRF1 の SRA domain に Luciferase を融合させた蛋白質(UHRF1 SRA-Fluc)を作製し、ヘミメチル化レベル簡易測定法を開発することを目的とした。大腸菌を用いて UHRF1 SRA-Fluc を組換え生産し、精製した UHRF1 SRA-Fluc が発光活性とヘミメチル化 CpG 結合活性を保持していることが示された。次に、精製した UHRF1 SRA-Fluc を用いて、ヘミメチル化レベルを定量できるか検討した。メチル化レベルまたはヘミメチル化レベル 0, 20, 50, 100%となるように調製した dsDNA に対して BOBO-3 を添加し、室温でインキュベート後に UHRF1 SRA-Fluc, Luciferase 基質を添加して、発光スペクトルを測定した(終濃度: 0.2 μ M dsDNA, 42 nM UHRF1 SRA-Fluc, 0.5 μ M BOBO-3, 0.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)。その結果、メチル化レベルの上昇につれて BRET シグナルに変化は見られなかったが、一方でヘミメチル化レベルが上昇すると共に BRET シグナルも増加して示され、その R.S.D.は 3.30%以下であった。以上の結果より、本章では UHRF1 SRA-Fluc を用いることで簡便にヘミメチル化レベルを定量できることが示された。

UHRF1 SRA-Fluc の結合能解析の結果(Fig.2-11)と BRET assay におけるヘミメチル化レベル測定法の検討実験の結果(Fig.2-15)を比較すると、非メチル化 DNA とヘミメチル化 DNA のシグナル差が結合能解析(Fig.2-11)の方が小さく示された。BRET assay では UHRF1 SRA-Fluc と DNA は同一溶液内で自由に相互作用できたことに対して、結合能解析ではマイクロプレートに固定化された DNA に UHRF1 SRA-Fluc を結合させて発光強度を測定した。従って、固定化操作が加わったために、蛋白質と DNA の相互作用で立体障害が生じ、BRET assay と比べて非メチル化 DNA とヘミメチル化 DNA 間のシグナル差が小さくなったものと考えられる。

UHRF1 SRA の非メチル化、メチル化、ヘミメチル化 DNA への K_d はそれぞれ 3.30 μ M, 1.30 μ M, 0.11 μ M であり⁶⁶、非メチル化の 30 倍、メチル化 DNA の 12 倍、ヘミメチル化 DNA への特異性を持つ。しかし今回の BRET assay では、非メチル化、メチル化 DNA と比較したヘミメチル化 DNA 存在下での BRET シグナルの差は約 1.3 倍であった。他修飾 DNA と比較してヘミメチル化 DNA 存在下で、より高い BRET シグナルを示すためには UHRF1 SRA のヘミメチル化 DNA への特異性を上げる必要があると考えられる。本手法では、UHRF1 の SRA domain (414–617 residue)を用いたが、この UHRF1 SRA の C 末端側に位置する Spacer 領域を付加することにより、ヘミメチル化 DNA への結合性が上昇することが Fang らによって報告されている⁷⁰。そのため、UHRF1 SRA-Spacer-Fluc 融合蛋白質を作製することでより高い BRET 効率を得られると想定される。

第 3 章

UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いた ヒドロキシメチル化レベル 測定法の開発

第 3 章 UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いたヒドロキシメチル化レベル測定法の開発

第 1 節 緒言

本章では、ゲノム DNA 中の 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) レベル測定法を開発することを目的とした。メチルトシチン酸化酵素 TET は、ヒトでは TET1, TET2, TET3 が同定されている^{43-46,161}。TET は 5mC を 5hmC へ酸化する反応を触媒する^{13,14}。5hmC は肝臓、腎臓、大腸、脳細胞に存在していることが示されており、なかでも脳細胞で多く存在している^{15,59,60}。一方で、がん細胞ではゲノム DNA 全体の 5hmC 量が低下していることが報告されている¹⁵⁻¹⁷。さらに、アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)患者のゲノム DNA 全体のヒドロキシメチル化レベルは正常細胞と比較して変化しており、前頭皮質¹⁰³・中前頭回・中側頭回¹⁰⁴ではヒドロキシメチル化レベルの上昇が確認されている。一方で、海馬・海馬傍回ではヒドロキシメチル化レベルの低下が確認されている^{105,106}。AD 患者の血液サンプル中のリンパ球においては、ヒドロキシメチル化レベルの低下が報告されており¹⁰⁷、パーキンソン病(Parkinson's disease; PD)患者でも同様に、ゲノム DNA 全体のヒドロキシメチル化レベルは低下していることが確認されている¹⁰⁷⁻¹⁰⁹。故に、ゲノム DNA 中のヒドロキシメチル化レベルは、がん・中枢神経系疾患におけるバイオマーカーとしての利用が期待できる。

メチル化レベル測定法のスタンダードな手法であるバイサルファイト法では、バイサルファイト処理によって未修飾シトシンはウラシルに変換されるが、5mC と 5hmC は変換されない。そのため、5mC と 5hmC を区別することは出来ない。ヒドロキシメチル化レベル測定法としては、5hmC のグリコシル化反応を利用する方法が開発されている。しかし、この 5hmC のグリコシル化の後に、TET 処理やバイサルファイト処理、シーケンス解析を実施するため、実験ステップが複数回に及び、どの方法も実験ステップが複数回に及び、測定時間も大幅に要する。従って、煩雑な操作や大幅な測定時間を必要としない簡便・迅速な DNA ヒドロキシメチル化レベル測定法が必要とされる。

そこで本研究は試薬を混合するだけの簡便・迅速なヒドロキシメチル化レベル測定法を開発できると想定した。そこで、ヒドロキシメチル化レベルを測定するために UHRF2 の SET- and RING-associated (SRA) domain に着目した。第 2 章で開発した UHRF1 SRA-Fluc を用いたヘミメチル化レベル測定法と同様に、ヒドロキシメチル化 CpG 結合蛋白質である UHRF2 SRA に Firefly luciferase を融合させた蛋白質(UHRF2 SRA-Fluc)を用いれば、BRET を利用してヒドロキシメチル化レベルを測定できると想定した。しかし UHRF2 SRA の非メチル化、メチル化、ヒドロキシメチル化 DNA への K_d 値はそれぞれ 3.20 μ M, 2.80 μ M, 1.02 μ M であり⁸³、メチル化 DNA にも一定量結合してしまう。そこで、予めメチル化 CpG に特異的に結合する蛋白質である MBD (Table 3-1)を添加することによってメチル化 CpG サイトをブロックし、UHRF2

SRA-Fluc を用いてヒドロキシメチル化レベルを測定できると想定した。

本手法の原理を以下に示す。予め DNA インターカレーターを結合させた標的 DNA に MBD を添加し、メチル化 CpG をブロッキングする。その後、UHRF2 SRA-Fluc と Luciferase 基質を加え、Luciferase の発光により標的ゲノム DNA に結合した DNA インターカレーターが励起され蛍光が示される(BRET シグナル)。標的ゲノム DNA 内にヒドロキシメチル化 CpG が存在していない場合は、UHRF2 SRA-Fluc が結合しないため、DNA インターカレーターは励起されない。つまり、試薬を混合して BRET シグナルを測定するだけで、ゲノム DNA のヒドロキシメチル化レベルを簡便に測定できるという想定に至った(Fig.3-1)。

Table 3-1. Binding affinity of MBD and UHRF2 SRA^{66,83}

	K_d (μ M)				
	C/C	5mC/C	5hmC/C	5mC/5mC	5hmC/5hmC
MBD	1.40 \pm 0.30	0.25 \pm 0.09	0.09 \pm 0.01	0.005 \pm 0.001	1.00 \pm 0.10
UHRF2 SRA	3.20 \pm 0.38	3.30 \pm 0.26	2.21 \pm 0.18	2.80 \pm 0.14	1.02 \pm 0.08

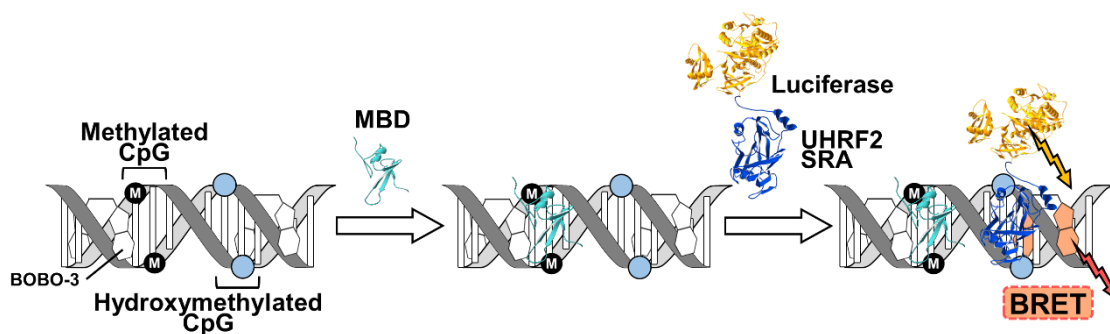


Fig.3-1 BRET assay for the hydroxymethylated DNA detection using UHRF2 SRA-Fluc

第 2 節 実験試薬・機器

第 1 項 試薬及び消耗品

Table 3-2. Reagents and Consumables

Product	Company
UltraPure™ Distilled Water	invitrogen™
DMEM (High Glucose)	Nacalai
Serum, Fetal Bovine, Ireland Origin	Biowest
1×penicillin–streptomycin L-glutamine	Sigma-Aldrich
TrypLE™ Select (1X)	Gibco®
Tissue Culture Dish 100mm*20mm	VIOLAMO
RNeasy® Mini Kit (50)	Qiagen
ThermoScript™ RT-PCR System	invitrogen™
KOD-Plus-Neo	TOYOBO
1Kb DNA Ladder RTU	Gene DireX
Agar	Wako
Orange G	Nacalai
EtBr Solution	NIPPON Gene
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
Ligation high ver. 2	TOYOBO
NdeI	Wako
NotI	Wako
EcoRI	Wako
<i>E. coli</i> DH5α Competent Cells	TAKARA
Competent Cell BL21 (DE3)	BioDynamics Laboratory Inc.
Ex Taq HS	TAKARA
SOC Medium	TAKARA
Tryptone	Nacalai
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Nacalai
Extract Yeast Dried	Nacalai
NaCl	Wako
Kanamycin Monosulfate	Tokyo Chemical Industry
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega
Strep-Tactin Superflow Plus Cartridge (1mL)	Qiagen
25-mm PES syringe filter 0.45-μm pore hydrophilic polyether sulfone membrane	Millipore
BugBuster® 10× Protein Extraction Reagent	Novagen
10x PBS	Ambion
Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate	Wako
d-Desthiobiotin	Sigma-Aldrich
HABA	Sigma-Aldrich
(±) DTT	Wako
Glycerol	Nacalai
Protein Assay BCA Kit	Wako
Albumin, from bovine serum	Sigma Life Science
96-well clear microplate	Greiner bio-one
Acrylamide	Wako
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Nacalai
Sodium dodecyl sulfate	Wako
Ammonium Peroxodisulfate	Yoneyama Yakuin Industry
N,N,N',N'-tetramethylphenylenediamine (TEMED)	Tokyo Chemical Industry
BES	Dojindo
Tris-BES Sample buffer (2X)	TEFCO

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Sodium Thiosulfate Pentahydrate	Wako
N,N-Dimethyl formamide	Wako
Quick-CBB PLUS	Wako
ExcelBand All Blue Broad Range Plus Protein Marker	SMObio
MgCl ₂	Wako
Tween @20	Sigma
(+) Biotin	Wako
Pierce™ Streptavidin Coated High Capacity Plates	Thermo Scientific
PicaGene	Toyo Ink
BOBO™-3 iodide (570/602)	invitrogen™
96-well white microplate	
F-Bottom (Chimney well), Lumitrac, Med. Binding	Greiner bio-one
MaXtract™ High Density	Qiagen
Chloroform-isoamyl alcohol mixture	Fluka Analytical
Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol	Wako
Sodium Acetate, Anhydrous	Yoneyama Yakuhin Industry

第 2 項 実験機器

Table 3-3. Equipment

Product	Company
Airstream® Class II Biological Safety Cabinets, Gen 3 (E-Series)	Esco
Thermo Scientific Forma Series 3 Water Jacketed CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific
himac CT15RE	HITACHI
T100™ Thermal Cycler	BIO-RAD
Veriti Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific
Mupid-2 plus	ADVANCE
BE-220	BIO CRAFT
Power supply for electrophoresis	BIO CRAFT
BioSpectrometer basic	Eppendorf
LED Illuminator LI-410	BIO CRAFT
Incubator IC601	Yamato
Shaker	Iwaki
Microtube rotator MTR-103	AS ONE
Variable Speed Pump I - Low	Fisher Scientific
GelDoc Go Imaging System	BIO-RAD
SpectraMax iD5	Molecular Devices

第3節 実験方法

第1項 蛋白質発現ベクターの構築

1-1. UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質発現ベクターの構築

UHRF2 SRA 遺伝子の合成を Integrated DNA Technologies に委託した。この *UHRF2 SRA* 遺伝子を鋳型に PCR で増幅した。具体的には、NdeI 認識配列と *Strep-tag II* 配列を付加した *UHRF2 SRA forward primer* と EcoRI 認識配列を付加した *UHRF2 SRA reverse primer* (Table 3-4)を設計し、これらを用いて 50 μ L 溶液(0.3 μ M each primer, 1 \times PCR Buffer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgSO₄, 0.02 U/ μ L KOD)を調製し、94°C, 2 min インキュベート後、98°C 10 sec、57°C 30 sec、68°C 30 sec を 28 サイクルの条件で PCR を実施した。PCR 産物を電気泳動で確認後、目的のバンドを切り出して、PCR 産物を Wizard SV Gel PCR Clean-Up System を用いて精製した。

精製した PCR 産物 2 μ g に 20 U NdeI, 20 U EcoRI, 10 \times Cut Smart buffer を混合し、37°C, 1 h 反応後、65°C, 20 min インキュベートした。その後、Wizard SV Gel PCR Clean-Up System を用いて精製し、吸光度を測定することにより濃度を算出した。制限酵素処理済みの pET30c-*Fluc-Strep-tag II* 50 ng に対して制限酵素処理した PCR 産物をそれぞれモル比 1 : 3 の割合で混合し、溶液全量 7.5 μ L とした。そこに 7.5 μ L の Ligation high ver.2 を加え、ライゲーションした(16°C, 16 h)。

E. coli DH5 α 50 μ L に、ライゲーション産物を 5 μ L 加え、氷上で 1 h 静置した。その後、42°C, 30 sec インキュベートし、氷上で 2 min 静置して形質転換させた。形質転換後、250 μ L SOC 培地を添加して転倒混和し、37°C, 1 h 振盪培養した。形質転換された DH5 α の培養液 100 μ L を LB+Kanamycin 寒天培地(終濃度 50 μ g/mL Kanamycin)に撒き、37°C で一晚培養した。形成されたコロニーを採取し、LB+Kanamycin 液体培地(終濃度 50 μ g/mL Kanamycin)で 37°C, 16 h 培養した。この大腸菌培養液を 10,000 \times g, 30 sec 遠心して上清を除去し、集菌した。その後、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System を用いてプラスミドを抽出した。

抽出した pET30c-*Strep-tag II-UHRF2 SRA-Fluc-Strep-tag II* plasmid の *Strep-tag II-UHRF2 SRA-Fluc-Strep-tag II* 遺伝子の配列を確認するためにシーケンス解析を実施した。解析には *UHRF2 SRA forward primer*, *reverse primer*, *Sequence primer 1, 2* (Table 3-4)を使用し、シーケンス解析は MacroGen に委託した(3730xl DNA analyzer, Thermo Fisher Scientific)。

1-2. MBD 発現ベクターの構築

pET30c-*Strep-tag II-MBD-Fluc*¹⁶²を鋳型に PCR で増幅した。具体的には、NdeI 認識配列と *Strep-tag II* 配列を付加した MBD forward primer と NotI 認識配列を付加した MBD reverse primer (Table 3-4)を設計し、これらを用いて 50 μ L 溶液(0.3 μ M each primer, 1 \times PCR Buffer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgSO₄, 0.02 U/ μ L KOD)を調製し、94°C, 2 min インキュベート後、98°C 10 sec、57°C 30 sec、68°C 30 sec を 28 サイクル実施した。PCR 産物を電気泳動で確認後、PCR 産物を Wizard SV Gel PCR Clean-Up System を用いて精製した。

精製した PCR 産物 2 μ g に 20 U NdeI, 20 U NotI, 10 \times Cut Smart buffer を混合し、37°C, 1 h 反応後、65°C, 20 min インキュベートした。その後、Wizard SV Gel PCR Clean-Up System を用いて精製し、吸光度を測定することにより濃度を算出した。制限酵素処理済みの 50 ng の pET30c に対して制限酵素処理した PCR 産物をそれぞれモル比 1 : 3 の割合で混合し、溶液全量 7.5 μ L とした。そこに 7.5 μ L の Ligation high ver.2 を加え、ライゲーションした(16°C, 16 h)。

E. coli DH5 α 50 μ L に、ライゲーション産物を 5 μ L 加え、氷上で 1 h 静置した。その後、42°C, 30 sec インキュベートし、氷上で 2 min 静置して形質転換させた。形質転換後、250 μ L SOC 培地を添加して転倒混和し、37°C, 1 h 振盪培養した。形質転換された DH5 α の培養液 100 μ L を LB+Kanamycin 寒天培地(終濃度 50 μ g/mL Kanamycin)に撒き、37°C で一晚培養した。形成されたコロニーを採取し、LB+Kanamycin 液体培地(終濃度 50 μ g/mL Kanamycin)で 37°C, 16 h 培養した。この大腸菌培養液を 10,000 \times g, 30 sec 遠心して上清を除去し、集菌した。その後、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System を用いてプラスミドを抽出した。

抽出した pET30c-*Strep-tag II-MBD* plasmid の *Strep-tag II-MBD* 遺伝子の配列を確認するためにシーケンス解析を実施した。解析には Sequence primer 1, 2 (Table 3-4)を使用し、シーケンス解析は Macrogen に委託した(3730xl DNA analyzer, Thermo Fisher Scientific)。

Table 3-4. Primer sequence

Name	Sequence (5'–3')
UHRF2 SRA forward primer	TGGAAATTGGCATATGTGGAGCCATCCGCAGTTTG AAAAGAGTACCGAGTCCCGTCTG
UHRF2 SRA reverse primer	TGGGAATTCCTTCCCTTCTTTATCTGACGG
MBD forward primer	TGGAAATTGGCATATGTGGAGC
MBD reverse primer	TCTGCGGCCGCTCAGCTGGCAACCGCCACGGG
Sequence primer 1	GCGGATAACAATTCCCTCT
Sequence primer 2	CTTTCGGGCTTTGTTAGCAG

第 2 項 蛋白質の組換え生産

2-1. UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質の組換え生産

構築した pET30c-*Strep-tag II-UHRF2 SRA-Fluc-Strep-tag II* を用いて、*E. coli* BL21 (DE3) を形質転換した後、IPTG によってタンパク質発現誘導を行なった。pET30c-*Strep-tag II-UHRF2 SRA-Fluc-Strep-tag II* で形質転換した BL21 (DE3) を 1.5 mL LB+Kanamycin 液体培地 (終濃度 50 µg/mL Kanamycin) に加えて 37°C, 16 h で前培養した。培養液を 150 mL LB+Kanamycin 液体培地 (終濃度 50 µg/mL Kanamycin) に全量加え、37°C で培養した。OD₆₀₀ 値 0.8 付近で IPTG (終濃度 0.8 mM) を添加し、18°C, 140 r.p.m. で 18 h 本培養した。培養後、遠沈管に培養液を 35 mL ずつ分注し、遠心分離した (4°C, 2,500 × g, 10 min)。上清を除去し、35 mL 0.85% NaCl を加えてボルテックスし、遠心分離 (4°C, 2,500 × g, 10 min) する一連の操作を 2 回行なった。上清を除去し、25 mL 0.85% NaCl を加えてボルテックスし、遠心分離 (4°C, 2,500 × g, 10 min) 遠心した後、上清を除去して湿菌体を回収した。得られた湿菌体 1 g に対して 5 mL Bug Buster Regent (1 × PBS buffer, 1 × Bug Buster Regent) を加えて懸濁し、インキュベート (室温, 15 min, 5 r.p.m.) した後、遠心分離 (4°C, 16,000 × g, 20 min) して水溶性画分を調製した。1×PBS で 10 倍希釈した水溶性画分を Strep-Tactin Superflow Plus Cartridge を用いて、流速 1 mL/min (Variable Speed Pump I-Low) でカラムに流し、フロースルー画分 (F1-10) を得た。次に NP buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl) を流して洗浄画分 (W1-10) を得て、NPD buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM desthiobiotin) を流して溶出画分 (E1-10) を得た。5 µL の精製画分に 45 µL の PicaGene を加えて、Luciferase の発光強度を SpectraMax iD5 で測定した (37°C)。またここで用いた全ての精製用 buffer は 4°C に冷却して使用した。精製した UHRF2 SRA-Fluc の濃度を測定した (Protein Assay BCA strain)。Reagent A と B を 50:1 の割合で混合して調製した Working reagent 200 µL を Sample 25 µL に混合し、60°C, 30 min 反応させて 30 min かけて 25°C に冷やした。その後、反応液 100 µL を 96-well clear microplate にアプライして吸光度を測定した ($\lambda = 562$ nm)。得られた全ての精製画分は SDS-PAGE で解析した。分離ゲル (12% アクリルアミド, 0.37 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.05% 過硫酸アンモニウム, 0.05% TEMED) に濃縮ゲル (3.6% アクリルアミド, 0.22 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.001% SDS, 0.05% 過硫酸アンモニウム, 0.1% TEMED) を重層し、12% SDS アクリルアミドゲルを作製した。その後、電気泳動槽にセットし、泳動槽の外側に Running Buffer (30 mM Tris, 30 mM BES, 0.1% SDS) で完全に満たし、泳動層内側は Antioxidant mixture (0.05% Sodium thiosulfate pentahydrate, 0.025% N,N-Dimethylfoamide, 1×Running buffer) で満たした。精製した溶質画分と等量の Loading Buffer (200 µL Tris-base Sample buffer, 0.06 M DTT, 10 µL β -Mercaptoethanol) を混合し、Loading sample を調製した。分子量マーカー (ExcelBand All Blue Broad Range Plus Protein Marker) にも同様に等量の Loading buffer を添加し、Loading marker とした。10 µL Loading Marker と 20 µL Loading sample をウェルにアプライし、電気泳動 (40 mA) を行なった。その後、CBB

を用いてゲルを染色し、精製画分を解析した。具体的には、ポリアクリルアミドゲルを 200 mL MQ で 5 min 振盪して MQ を取り換える操作を 3 回行なった。20 mL Quick-CBB PLUS を加え、60 min, 30 r.p.m.振盪した。染色液を取り除き 200 mL MQ を加えて 60 min, 30 r.p.m. 振盪し、洗浄した。

2-2. MBD の組換え生産

構築した pET30c-*Strep-tag II-MBD* を用いて、*E. coli* BL21 (DE3) を形質転換した後、IPTG によってタンパク質発現誘導を行なった。pET30c-*Strep-tag II-MBD* で形質転換した BL21 (DE3) を 1.5 mL LB+Kanamycin 液体培地(終濃度 50 µg/mL Kanamycin)に加えて 37°C, 16 h で前培養した。培養液を 150 mL LB+Kanamycin 液体培地(終濃度 50 µg/mL Kanamycin)に全量加え、37°C で培養した。OD₆₀₀ 値 0.7 付近で IPTG (終濃度 0.5 mM) を添加し、20°C, 140 r.p.m. で 16 h 本培養した。培養後、遠沈管に培養液を 35 mL ずつ分注し、遠心分離した(4°C, 2,500 × g, 10 min)。上清を除去し、35 mL 0.85% NaCl を加えてボルテックスし、遠心分離(4°C, 2,500 × g, 10 min)する一連の操作を 2 回行なった。上清を除去し、25 mL 0.85% NaCl を加えてボルテックスし、遠心分離(4°C, 2,500 × g, 10 min)遠心した後、上清を除去して湿菌体を回収した。得られた湿菌体 1 g に対して 5 mL Bug Buster Regent (1 × PBS buffer, 1 × Bug Buster Regent) を加えて懸濁し、インキュベート(室温, 15 min, 5 r.p.m.) した後、遠心分離(4°C, 16,000 × g, 20 min) して水溶性画分を調製した。1×PBS で 10 倍希釈した水溶性画分を Strep-Tactin Superflow Plus Cartridge を用いて、流速 1 mL/min (Variable Speed Pump I-Low) でカラムに流し、フロースルー画分(F1-10)を得た。次に NP buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl) を流して洗浄画分(W1-10)を得て、NPD buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM desthiobiotin) を流して溶出画分(E1-10)を得た。さらにこの精製 MBD の濃度を測定し(Protein Assay BCA strain)、SDS-PAGE で解析した。濃度測定および SDS-PAGE の操作手順は上記 2-1 と同様である。

第 3 項 UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質のヒドロキシメチル化 DNA に対する結合能解析

3-1. ヒドロキシメチル化 DNA に対する結合能解析

各種合成 ssDNA (Table 3-5)を反応液中(1×PBS, 10 mM MgCl₂)で混合し、95°C で 5 min インキュベートし 30 min かけて 25°C まで冷却し、ビオチン修飾の 0.25 μM 非メチル化、メチル化及びヒドロキシメチル化 dsDNA を調製した。各種 dsDNA に 0.5% Tween20 を添加し、Pierce™ Streptavidin Coated High Capacity Plates に加えて室温で 2 h インキュベートした。その後、200 μL Washing buffer (1×PBS, 10 mM MgCl₂, 0.05% Tween20)で洗浄し、UHRF2 SRA-Fluc を含む溶液(終濃度: 45 nM UHRF2 SRA-Fluc, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)を加えて室温で 30 min インキュベートした(Fig. 3-2)。洗浄後、Firefly luciferase の基質である PicaGene を 100 μL を加えて Luciferase の発光強度を SpectraMax iD5 で測定した。

Table 3-5. Oligo DNA sequence

Name	Sequence (5'-3')
Biotinylated methylated DNA Top	Biotin-AAAAAACAGGATXGAGCAGCTACCCT (X = methylated cytosine)
Methylated DNA Bottom	AGGGTAGCTGCTXGATCCTG (X = methylated cytosine)
Biotinylated unmethylated DNA Top	Biotin-AAAAAACAGGATCGAGCAGCTACCCT
Unmethylated DNA Bottom	AGGGTAGCTGCTCGATCCTG
Biotinylated hydroxymethylated DNA Top	Biotin-AAAAAACAGGATYGAGCAGCTACCCT (Y = hydroxymethylated cytosine)
Hydroxymethylated DNA Bottom	AGGGTAGCTGCTYGATCCTG (Y = hydroxymethylated cytosine)

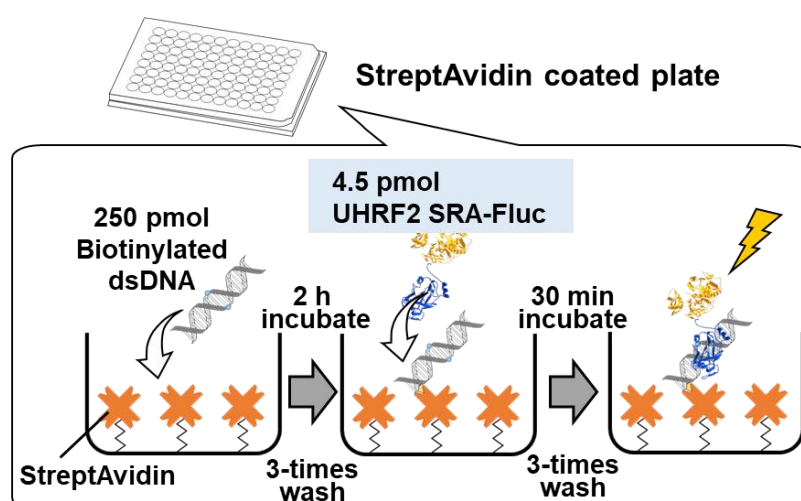


Fig. 3-2 Binding analysis of UHRF2 SRA-Fluc to hydroxymethylated DNA

3-2. MBD 存在下におけるヒドロキシメチル化 DNA に対する結合能解析

各種合成 ssDNA (Table 3-5)を反応液中(1×PBS, 10 mM MgCl₂)で混合し、95°C で 5 min インキュベートし 30 min かけて 25°C まで冷却し、ビオチン修飾の 0.25 μM 非メチル化、メチル化及びヒドロキシメチル化 dsDNA を調製した。各種 dsDNA に 0.5% Tween20 を添加し、Pierce™ Streptavidin Coated High Capacity Plates に加えて室温で 2 h インキュベートした。その後、200 μL Washing buffer (1×PBS, 10 mM MgCl₂, 0.05% Tween20)で 3 度洗浄し、各種濃度の MBD 溶液(終濃度: 45 nM, 100 nM, 200 nM MBD, 1×PBS)を加えて室温で 30 min インキュベートした。洗浄 3 回後、UHRF2 SRA-Fluc を含む溶液(終濃度: 45 nM UHRF2 SRA-Fluc, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)を加えて室温で 30 min インキュベートした(Fig. 3-3)。洗浄を 3 回した後、Firefly luciferase の基質である PicaGene を 100 μL を加えて Luciferase の発光強度を SpectraMax iD5 で測定した。

さらに ssDNA の修飾シトシン塩基も検出可能か検討した。ビオチン修飾の 0.25 μM 非メチル化、メチル化及びヒドロキシメチル化 ssDNA を Pierce™ Streptavidin Coated High Capacity Plates に同様の操作で固定化した。洗浄後、200 nM MBD 溶液(1×PBS)を加えて室温で 30 min インキュベートした。その後は上記と同様の操作で UHRF2 SRA-Fluc を添加し、発光強度を測定した。

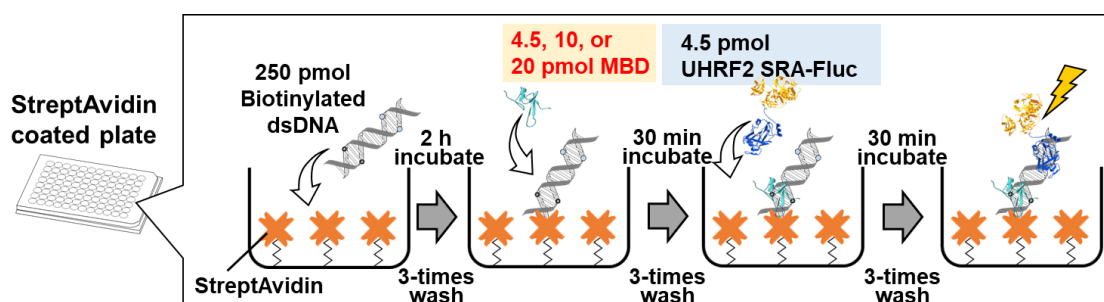


Fig. 3-3 Binding analysis of UHRF2 SRA-Fluc to hydroxymethylated DNA using MBD

第 4 項 UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いたヒドロキシメチル化レベル測定法の検討

UHRF2 SRA-Fluc を用いたヒドロキシメチル化レベル測定法について、本項で実施する BRET assay に使用した ssDNA 配列を Table 3-6 に示す。

Table 3-6. Oligo DNA sequence

Name	Sequence (5'–3')
Unmethylated Top DNA (99 mer)	CAGCCTAACTGGGAGGCACCCCCAGCAGGGCACA CTGACACCTCACACGGCAGGGTATTCCAACAGACC TGCAGCTGAGGGTCCTGTCTGTTAGAAGG
Unmethylated Bottom DNA (99 mer)	CCTTCTAACAGACAGGACCCTCAGCTGCAGGTCTGT TGGAATACCCTGCCGTGTGAGGTGTCAGTGTGCCC TGCTGGGGGGTGCCTCCCAGTTAGGCTG
Methylated Top DNA (99 mer)	CAGCCTAACTGGGAGGCACCCCCAGCAGGGCACA CTGACACCTCACAXGGCAGGGTATTCCAACAGACCT GCAGCTGAGGGTCCTGTCTGTTAGAAGG (X = methylated cytosine)
Methylated Bottom DNA (99 mer)	CCTTCTAACAGACAGGACCCTCAGCTGCAGGTCTGT TGGAATACCCTGCXGTGTGAGGTGTCAGTGTGCCC TGCTGGGGGGTGCCTCCCAGTTAGGCTG (X = methylated cytosine)
Hydroxymethylated Top DNA (99 mer)	CAGCCTAACTGGGAGGCACCCCCAGCAGGGCACA CTGACACCTCACAYGGCAGGGTATTCCAACAGACCT GCAGCTGAGGGTCCTGTCTGTTAGAAGG (Y = hydroxymethylated cytosine)
Hydroxymethylated Bottom DNA (99 mer)	CCTTCTAACAGACAGGACCCTCAGCTGCAGGTCTGT TGGAATACCCTGCYGTGTGAGGTGTCAGTGTGCCC TGCTGGGGGGTGCCTCCCAGTTAGGCTG (Y = hydroxymethylated cytosine)

4-1. ヒドロキシメチル化レベルの測定

各種合成 ssDNA を反応液中(20 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 8.0)で混合し、95°C で 5 min インキュベートした後、30 min かけて 25°C まで冷却し、5 μM 非メチル化(UM 99-mer)、メチル化(FM 99-mer)、ヒドロキシルメチル化(HM 99-mer) dsDNA を調製した。調製した UM dsDNA, HM dsDNA を混合してヒドロキシメチル化レベル 0, 20, 50, 100%となるようにした。同様にして、FM dsDNA, HM dsDNA を混合することによりヒドロキシメチル化レベル 0, 20, 50, 100%の dsDNA 溶液を作製した(Fig. 3-4)。その後、各種ヒドロキシメチル化レベルの dsDNA 溶液 10 μL に 200 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 1 M NaCl, 100 μM BOBO-3 を含む溶 43.7 μL 混合し、30 min 室温でインキュベートした。0.71 μM UHRF2 SRA-Fluc を 6.3 μL 加えた後、PicaGene 50 μL 加えて溶液全量 100 μL (f.c.: 45 nM UHRF2 SRA-Fluc, 0.5 μM dsDNA, 1.2 μM BOBO-3, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)として 37°C、波長 450–700 nm 範囲(5 nm 間隔)で発光強度を測定した(Plate height: 1 mm, Integration time: 100 ms; SpectraMax iD5)。

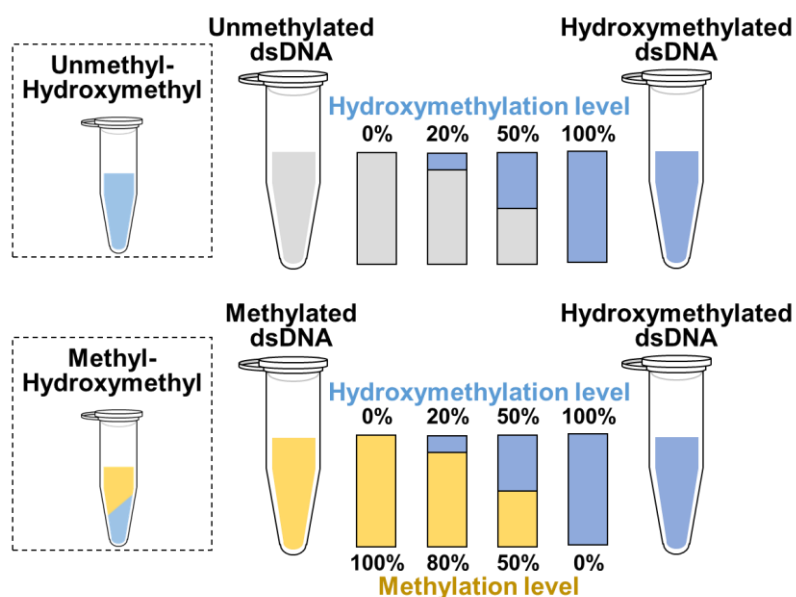


Fig. 3-4 Preparation of dsDNA mixture for characterize the DNA hydroxymethylation levels

4-2. MBD 存在下でのヒドロキシメチル化レベルの測定

各種合成 ssDNA を反応液中(20 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 8.0)で混合し、95°C で 5 min インキュベートした後、30 min かけて 25°C まで冷却し、5 μM 非メチル化、メチル化、ヒドロキシルメチル化 dsDNA を調製した。調製した非メチル化 dsDNA とヒドロキシルメチル化 dsDNA を混合してヒドロキシメチル化レベル 0, 20, 50, 100%となるようにした。同様に、メチル化 dsDNA とヒドロキシルメチル化 dsDNA を混合することによりヒドロキシメチル化レベル 0, 20, 50, 100%の dsDNA 溶液を、非メチル化 dsDNA とメチル化 dsDNA を混合することによりメチル化レベル 0, 50, 80, 100%の dsDNA 溶液を作製した。その後、各種シトシン修飾レベルの dsDNA 溶液 10 μL に 200 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 1 M NaCl, 100 μM BOBO-3 を含む溶液 35.7 μL 混合し、30 min 室温でインキュベートした。ここに、2.5 μM の MBD を 8 μL 加えて室温で 1 min インキュベートした。さらに、0.71 μM UHRF2 SRA-Fluc を 6.3 μL 加えた後、PicaGene 50 μL 加えて溶液全量 100 μL (f.c.: 45 nM UHRF2 SRA-Fluc, 200 nM MBD, 0.5 μM dsDNA, 1.2 μM BOBO-3, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)として 37°C、波長 450–700 nm 範囲(5 nm 間隔)で発光強度を測定した(Plate height: 1 mm, Integration time: 100 ms; SpectraMax iD5)。

4-3. TET2 処理したゲノム DNA におけるヒドロキシメチル化シトシンの検出

4-3-1. TET2 を用いたゲノム DNA のヒドロキシメチル化

ヒドロキシメチルシトシンが多く存在するゲノム DNA を作製するために、HeLa 細胞から抽出したゲノム DNA を TET2 処理した。さらに低メチル化状態のゲノム DNA を作製するために HeLa 細胞をメチル化阻害剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine で処理した。9 mL DMEM (10% FBS, 1×PSG)培地に 1 mM 5-Aza-2'-deoxycytidine を終濃度が 0, 10 μ M となるように添加した。5-Aza-2'-deoxycytidine を添加した各種 9 mL DMEM (10% FBS, 1×PSG)培地に 5.0×10^5 cells の HeLa 細胞(RBRC-RCB0007, RIKEN)を播いて 1 日間培養 (5% CO₂, 37°C)することで低メチル化処理を行なった。培養後、新しい DMEM (10% FBS, 1×PSG)培地 10 mL に培地交換し、3 日間培養した(5% CO₂, 37°C)。培養後、細胞を回収し、DNeasy Blood & Tissue Kit を用いてゲノム DNA を抽出した。

5-Aza-2'-deoxycytidine 処理をしていない HeLa 細胞から抽出したゲノム DNA に対して TET2 処理を行なった。HeLa ゲノム DNA 30 μ g に対して 40 pmol の TET2 を混合し、37°C 2 h 反応させた(f.c.: 0.13 μ M TET2, 100 ng/ μ L genomic DNA, 75 μ M Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, 2 mM Ascorbic acid, 1 mM α -ketoglutaric acid, 50 mM HEPES-NaOH, pH 8.0)。その後、フェノールクロロホルム処理して TET2 を不活化させ、除去した。その後、TET2 処理ゲノム DNA を回収するためにエタノール沈殿を行ない、70%エタノールで洗浄した後、エタノールを除去するためにエバポレーターで 45°C 5 min 風乾した。風乾後、50 μ L の DNase/RNase-free distilled water に懸濁した。

4-3-2. TET2 処理ゲノム DNA におけるヒドロキシメチル化シトシンの検出

HeLa ゲノム DNA、低メチル化ゲノム DNA、TET2 処理ゲノム DNA それぞれ 2.2 μ g に対して 200 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 μ M BOBO-3 を含む溶液 35.7 μ L 混合し、30 min 室温でインキュベートした。ここに、2.5 μ M の MBD を 8 μ L 加えて室温で 1 min インキュベートした。さらに、0.71 μ M UHRF2 SRA-Fluc を 6.3 μ L 加えた後、PicaGene 50 μ L 加えて溶液全量 100 μ L (f.c.: 45 nM UHRF2 SRA-Fluc, 200 nM MBD, 22 ng/ μ L genomic DNA, 1.2 μ M BOBO-3, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)として 37°C、波長 450–700 nm 範囲(5 nm 間隔)で発光強度を測定した(Plate height: 1 mm, Integration time: 100 ms; SpectraMax iD5)。

次に BRET シグナルがゲノム DNA 中のヒドロキシメチルシトシン依存的に増加するか検討するために TET2 処理ゲノム DNA と未処理のゲノム DNA を混合比が 0:1, 3:7, 6:4 または 1:0 となるように混合し、総量 2.2 μ g のゲノム DNA とした。調製したゲノム DNA 溶液に対して上記と同様に BRET assay を実施した。

4-3-3. TET2 処理ゲノム DNA を用いた検出限界の検討

UHRF2 SRA-Fluc を用いた BRET assay において、TET2 処理ゲノム DNA を用いて検出限界を検討した。TET2 処理ゲノム DNA 0, 1, 5, 10, 15, 20 または 25 ng/ μ L に対してそれぞれ 0, 0.06, 0.3, 0.6, 0.8, 1.1 または 1.4 μ M BOBO-3 を混合し、30 min 室温でインキュベートした。ここに、2.5 μ M の MBD を 8 μ L 加えて室温で 1 min インキュベートした。さらに、0.71 μ M UHRF2 SRA-Fluc を 6.3 μ L 加えた後、PicaGene 50 μ L 加えて溶液全量 100 μ L (f.c.: 45 nM UHRF2 SRA-Fluc, 200 nM MBD, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) として 37°C、波長 450–700 nm 範囲(5 nm 間隔)で発光強度を測定した(Plate height: 1 mm, Integration time: 100 ms; SpectraMax iD5)。

第4節 実験結果・考察

第1項 蛋白質発現ベクターの構築

1-1. UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質発現ベクターの構築

合成 *UHRF2 SRA* 遺伝子を PCR で増幅した結果、目的の位置(739 bp)付近にバンドが確認された。この PCR 産物を精製し、EcoRI と NdeI で制限酵素処理した。pET30c-*Fluc-Strep-tag II* に対して精製した *UHRF2 SRA* 遺伝子をモル比 1 : 3 の割合でライゲーションした。ライゲーション産物を用いて大腸菌 DH5 α の形質転換を行なった。その結果、ライゲーション産物を用いて形質転換した大腸菌でコロニーが形成された。形成されたコロニーを LB+Kanamycin 液体培地(終濃度 50 μ g/mL Kanamycin)で培養した。Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System を用いて、培養液からプラスミドを抽出した。得られたプラスミドのシーケンス解析は Macrogen に委託し、シーケンシング結果より pET30c-*Strep-tag II-UHRF2 SRA-Fluc-Strep-tag II* が構築されたことが示された(Fig.3-5, 3-6)。構築された pET30c-*Strep-tag II-UHRF2 SRA-Fluc-Strep-tag II* のベクターマップを Fig.3-7 に示す。

The codon-optimized DNA sequence of *Strep-tag II-UHRF2 SRA-Fluc*

ATG **TGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAAG**AGTACCGAGTCCCGTCGCGACTGGGGACGTGGCATGG
CTTGCGTTGGGGCGCACGCGTGAGTGTACCATTGTGCCTTCAAATCATTATGGACCCATTCGGG
GATTCCTGTAGGATCAACCTGGCGTTTCCGCGTGCAGGTCTCTGAAGCTGGCGTACATCGCCCC
CACGTTGGCGGCATCCACGGACGTTCCAATGACGGCGCGTATTCCTTGTCTTGGCGGCGGGT
TCGCGGACGAGGTAGACCGTGGTGATGAATTTACATACACCGGCTCTGGTGGAAAAAATCTGGC
AGGTAACAAACGTATCGGAGCTCCATCCGCTGACCAGACGCTGACCAACATGAATCGTGCCTTG
GCATTGAACTGCGATGCTCCGCTGGATGATAAAATCGGGGCTGAATCTCGCAACTGGCGCGCTG
GCAAACCGGTCCGTGTAATCCGCAGTTTTAAGGGGCGCAAGATCTCAAATATGCACCAGAAGA
GGGAACCGCTACGATGGGATTTACAAGGTCGTGAAGTATTGGCCGGAGATTAGCTCTTCCAC
GGATTTCTTGATGGCGCTACCTGCTTCGTGTCGTGACGACGTCGAGCCGGCGCCATGGACATCCG
AGGGTATCGAACGCAGTCGTGCGCTTTGTCTTCGTTTGCAGTACCCTGCTGGCTACCCGTCAGA
TAAAGAAGGGAAGGAATTCATGGTTTTTCATGGAGAACGATGAAAATATTGTGTATGGTCCTGAA
CCATTTTACCCATTGAAGAGGGATCTGCTGGAGCACAATTGCGCAAGTATATGGATCGACATG
CAAACCTGGAGCAATTGCTTTTACTAACGCACCTACCGGTGTCGATTATACGTACGCCGAATA
CTTAGAAAAATCATGCTGTCTAGGAGAGGCTTTAAGAATTATGGTTTGGTTGTTGATGGAAGA
ATTGCGTTATGCAGTGAAAACGTGAAGAGTTCTTTATTCCTGTATTAGCCGGTTTTATTTATAG
GTGTCGGTGTGGCTCCAACCTAATGAGATTTACTCTACGTGAATTGGTTCACAGTTTAGGCAT
CTCTAAGCCAACAATTGTATTTAGTTCTAAAAAAGGATTAGATAAAGTTATAACTGTACAAAA
ACGTAACCTGCTATTTAAAACCATTTGTTATATTGGACAGCAAAGTGGATTATAGAGGTTATCAAT
CCATGGACAACCTTTATTAACAAAAACACTCCACAAGGTTTCAAAGGATCAAGTTTTAAACCTGT
AAAAGTTAACCGCAAAGAACAAGTTGCTCTTATAATGAACCTTTCGGGTTCAACCGGTTTGCCA
AAAGGTGTGCAACTTACTCATGAAAATTTGGTCACGCGTTTTTCTCACGCTAGAGATCCAATTT
ATGGAAACCAAGTTTACCAGGCACGGCTATTTTAACTGTAGTACCATTCCATCATGGTTTTGG
TATGTTTACTACTTTAGGCTATCTAACTTGTGGTTTTTCGTATTGTCATGTTAACGAAATTTGAC
GAAGAGACTTTTTTAAAAACACTGCAAGATTACAAATGTTCAAGCGTTATTCTTGTACCGACTT
TGTTTGCAATTCTTAATAGAAGTGAATTACTCGATAAATATGATTTATCAAATTTAGTTGAAAT
TGCATCTGGCGGAGCACCTTTATCTAAAGAAATTTGGTGAAGCTGTTGCTAGACGTTTTAATTTA
CCGGGTGTTTCGTCAAGGCTATGGTTTTAACAGAAACAACCTCTGCAATTATTATCACACCGGAAG
GCGATGATAAACCGGTGCTTCTGGCAAAGTTGTGCCATTATTTAAAGCAAAGTTATCGATCT
TGATACTAAAAAACTTTGGGCCCGAACAGACGTGGAGAAGTTTGTGTAAGGGTCCATGCTT
ATGAAAGGTTATGTAGATAATCCAGAAGCAACAAGAGAAATCATAGATGAAGAAGGTTGGTTGC
ACACAGGAGATATTGGGTATTACGATGAAGAAAAACATTTCTTTATCGTGGATCGTTTGAAGTC
TTAATCAAATACAAAGGATATCAAGTACCACCTGCTGAATTAGAATCTGTTCTTTTGAACAT
CAAATATTTTTGATGCCGCGTTGCTGGCGTCCAGATCCTATAGCTGGTGAGCTTCCGGGAG
CTGTTGTTGTACTTAAGAAAGGAAAATCTATGACTGAAAAAGAAGTAATGGATTACGTTGCTAG
TCAAGTTTCAAATGCAAAACGTTTGCCTGGTGGTGTCCGTTTTGTGGACGAAGTACCTAAAGGT
CTCACTGGTAAAATTGACGGTAAAGCAATTAGAGAAATACTGAAGAAACCAGTTGCTAAG**TGGA**
GCCACCCGCAGTTCGAAAAATGA

Fig. 3-5 The codon-optimized DNA sequence of *Strep-tag II-UHRF2 SRA-Fluc-Strep-tag II*

DNA sequences coding for *UHRF2 SRA* (RefSeq accession: NM_152896) and *firefly luciferase* (GeneBank accession: AB778505) are shown as red and blue, respectively. The *Strep-tag II* is highlighted in yellow.

Amino acid sequence of Strep-tag II-UHRF2 SRA-Fluc-Strep-tag II

MWSHPQFEKSTESRRDWRGMACVGRTRRECTIVPSNHYGPIPGIPVGGSTWRFRVQVSEAGVHRP
 HVGGIHGRSNDGAYSLVLAGGFADEVDRGDEFTYTGSSGKNLAGNKRIGAPSADQTLTNMNRAL
 ALNCDAPLDDKIGAESRNWRAGKPVVRVIRSFKGRKISKYAPEEGNRYDGIYKVVKYWPEISSH
 GFLVWRYLRLRDDVEPAPWTSEGIERSRRLCLRLQYPAGYPSDKEGKEFMVFMENDENIVYGPE
 PFYPIEEGSAGAQLRKYMDRHAKLGAIAFTNALTGVDTYAEYLEKSCCLGEALKNYGLVVDGR
 IALCSENCEEFFIPVLAGLFIGVGVAPTNEIYTLRELVHSLGISKPTIVFSSKKGLDKVITVQK
 TVTAIKTIVILDSKVDYRGYQSMDFIKKNTPQGFKGSSFKTVKVNREQVALIMNSSGSTGLP
 KGVQLTHENLVTRFSHARDPIYGNQVSPGTAILTVPFHHGFGMFTTLGYLTCGFRIVMLTKFD
 EETFLKTLQDYKSSVILVPTLFAILNRSELLDKYDLNLVEIASGGAPLSKEIGEAVARRFNL
 PGVRQGYGLTETTSAAIITPEGDDKPGASGKVPLFKAKVIDLDTKKTLGPNRRGEVCVKGPML
 MKGYVDNPEATREIIDEEGWLHTGDIGYYDEEKHFFIVDRLKSLIKYKGYQVPPAELESVLLQH
 PNIFDAGVAGVPDPIAGELPGAVVVLKKGKSMTEKEVMDYVASQVSNAKRLRGGVRFVDEVKPKG
 LTGKIDGKAIREILKPKVAKWSHPQFEK

Fig. 3-6 The amino acid sequence of Strep-tag II-UHRF2 SRA-Fluc-Strep-tag II

Amino acid sequences coding for UHRF2 SRA (PDB ID: 4PW5) and firefly luciferase are shown as red and blue, respectively. The Strep-tag II is highlighted in yellow.

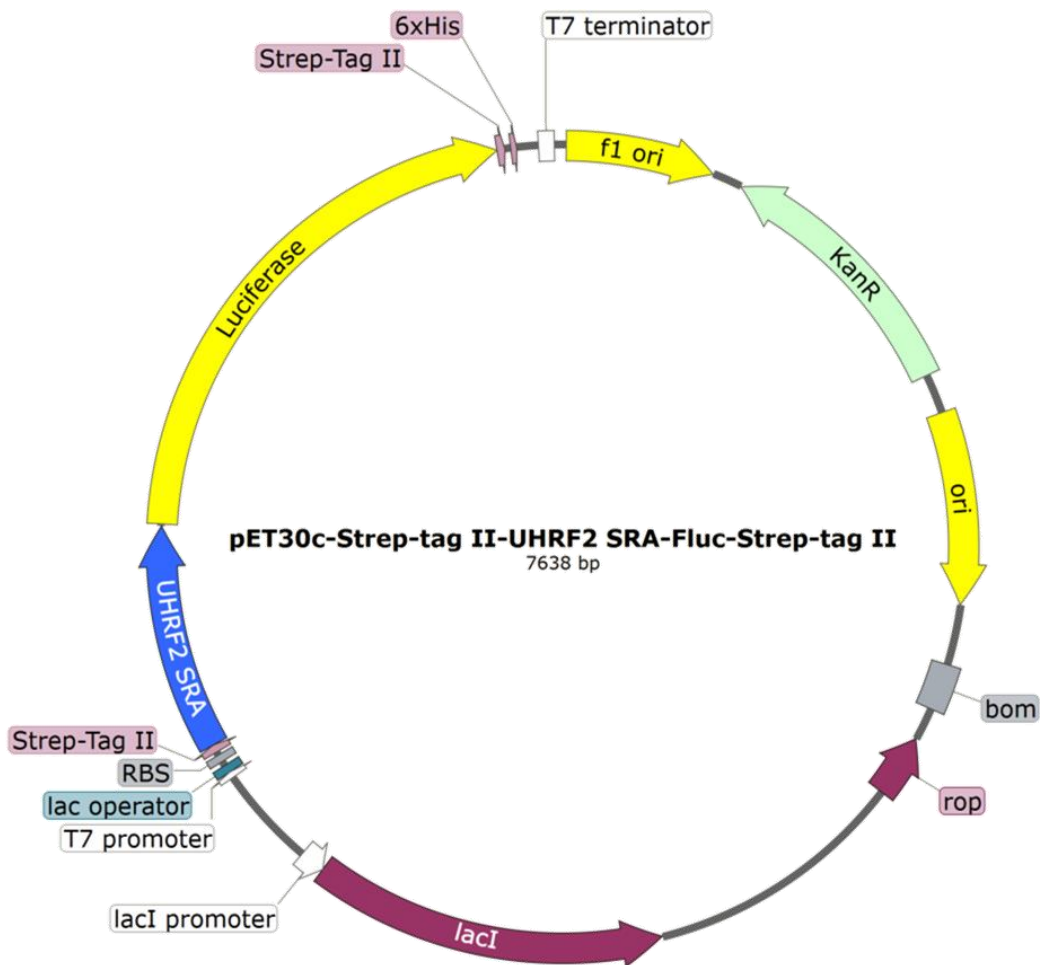


Fig. 3-7 pET30c-Strep-tag II-UHRF2 SRA-Fluc-Strep-tag II vector map

1-2. MBD 発現ベクターの構築

pET30c-*Strep-tag II-MBD-Fluc*¹⁶² を鋳型に MBD を PCR で増幅した結果、目的の位置(290 bp)付近にバンドが確認された。この PCR 産物を精製し、NdeI と NotI で制限酵素処理した。pET30c に対して精製した制限酵素処理産物をモル比 1 : 3 の割合でライゲーションした。ライゲーション産物を用いて大腸菌 DH5 α の形質転換を行なった。その結果、ライゲーション産物を用いて形質転換した大腸菌でコロニーが形成された。形成されたコロニーを LB+Kanamycin 液体培地(終濃度 50 μ g/mL Kanamycin)で培養した。Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System を用いて、培養液からプラスミドを抽出した。得られたプラスミドのシーケンス解析は Macrogen に委託し、シーケンシング結果より pET30c-*Strep-tag II-MBD* が構築されたことが示された(Fig.3-8, 3-9)。構築された pET30c-*Strep-tag II-MBD* のベクターマップを Fig.3-10 に示す。

The DNA sequence of *Strep-tag II-MBD*

```
ATG TGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAAG GCTGAGGACTGGCTGGACTGCCCGGCCCTGGGCCCTG  
GCTGGAAGCGCCGCGAAGTCTTTCGCAAGTCAGGGGCCACCTGTGGACGCTCAGACACCTATTA  
CCAGAGCCCCACAGGAGACAGGATCCGAAGCAAAGTTGAGCTGACTCGATACCTGGGCCCTGCG  
TGTGATCTCACCTCTTCGACTTCAAACAAGGCATCTTGTGCTATCCAGCCCCCAAGGCCCATC  
CCGTGGCGGTTGCCAGCTGA
```

Fig. 3-8 The DNA sequence of *Strep-tag II-MBD*

DNA sequences coding for MBD of MBD1 (RefSeq accession: NM_015846) is shown as light blue. The *Strep-tag II* is highlighted in yellow.

Amino acid sequence of *Strep-tag II-MBD*

```
M W S H P Q F E K A E D W L D C P A L G P G W K R R E V F R K S G A T C G R S D T Y Y Q S P T G D R I R S K V E L T R Y L G P A  
C D L T L F D F K Q G I L C Y P A P K A H P V A V A S
```

Fig. 3-9 The amino acid sequence of *Strep-tag II-MBD*

Amino acid sequences coding for MBD of MBD1 is shown as light blue. The *Strep-tag II* is highlighted in yellow.

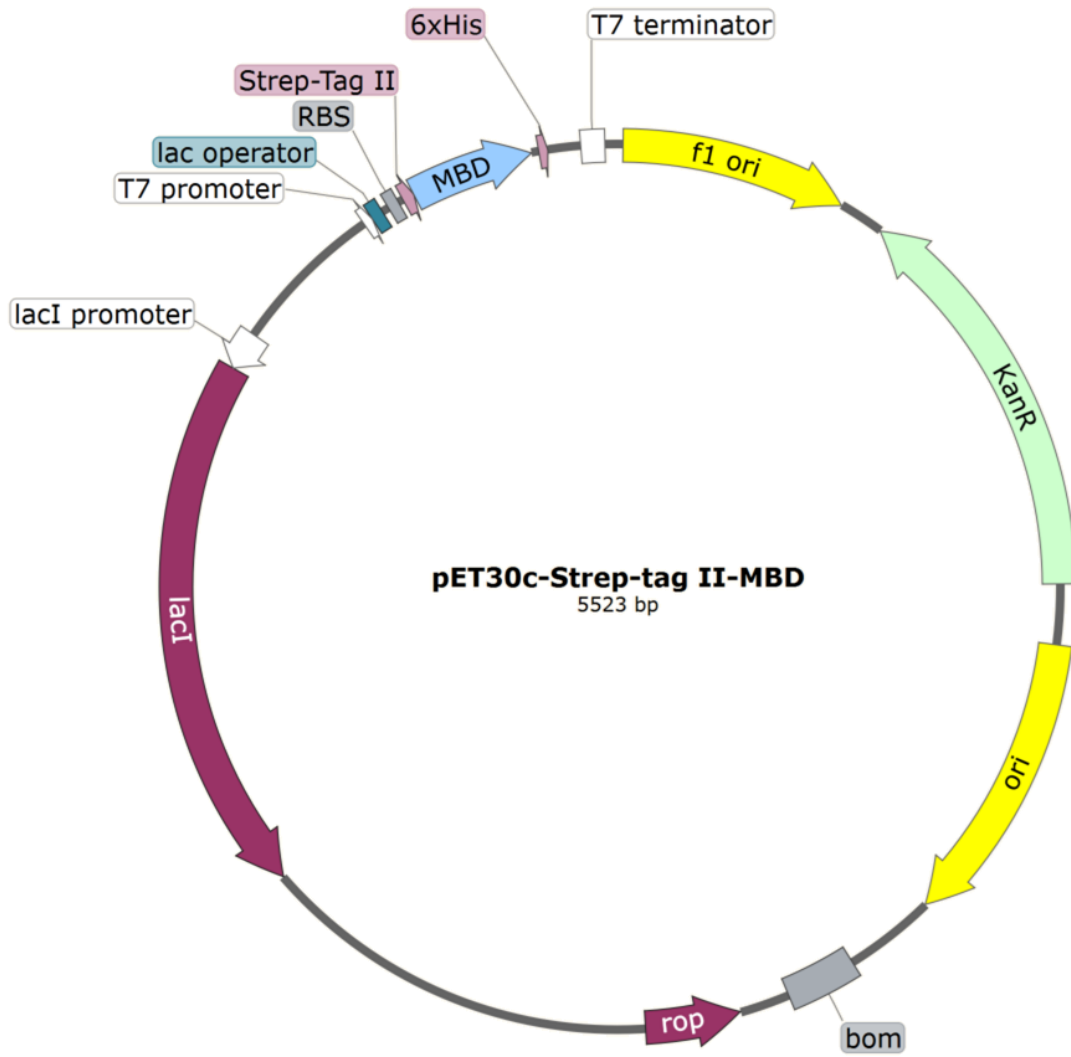


Fig. 3-10 pET30c-Strep-tag II-MBD vector map

第 2 項 蛋白質の組換え生産

2-1. UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質の組換え生産

pET30c-*Strep-tag II-UHRF2 SRA-Fluc-Strep-tag II* を用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換させ、UHRF2 SRA-Fluc の発現を行なった。OD₆₀₀ 値 0.8 付近終濃度 0.8 mM となるように IPTG を添加して発現を誘導した。培養して得られた湿菌体 1080 mg より、Bug Buster Regent を用いて菌体を破碎して得られた溶液を遠心した。遠心後の溶液の上清を取り出して水溶性画分とした。本融合蛋白質には精製タグとして Strep-tag II を融合してあるため、水溶性画分より、Strep-tag II を利用して UHRF2 SRA-Fluc の精製を行なった。精製画分として、通過画分 (F1-10)、洗浄画分 (W1-10) 及び溶出画分 (E1-10) を回収し、各精製画分の Luciferase 活性を測定した (Fig.3-11)。加えて、溶出画分の蛋白質濃度を測定した結果、溶出画分 2 (E2) で 186.5 ng/μL の UHRF2 SRA-Fluc が 1 mL 得られた。溶出画分 (E1-10) をまとめると UHRF2 SRA-Fluc の濃度は 0.31 mg/mL (3.08 mg/10 mL) であり、発現誘導は 150 mL 培地で実施したため、培地当たりの収量は 0.02 mg/mL と考えられる。

溶出画分を SDS-PAGE で解析後、Quick-CBB PLUS で染色した (Fig.3-12)。E2 で目的の位置付近 (89 kDa) にバンドが示されたため、UHRF2 SRA-Fluc が精製できたことが示された。

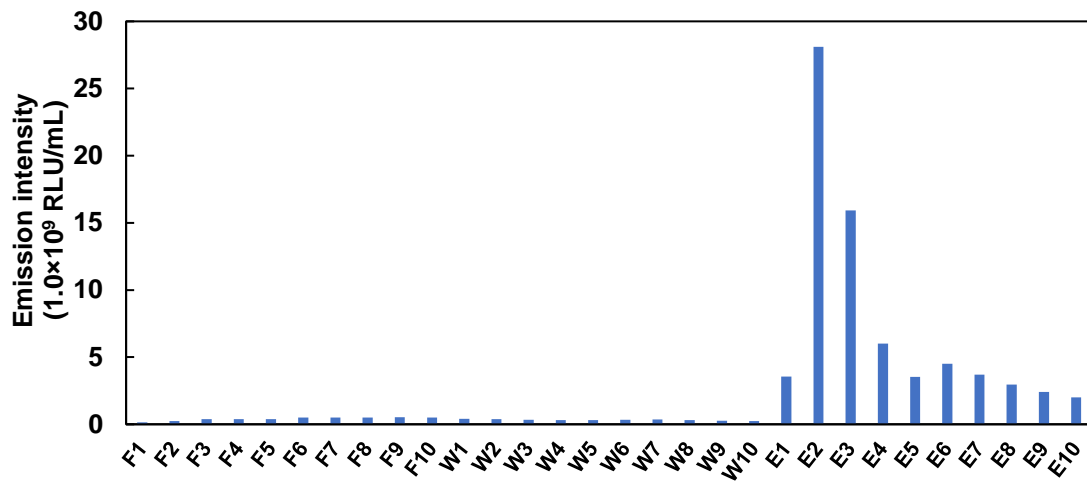


Fig. 3-11 Luciferase activities of each fraction during the purification of UHRF2 SRA-Fluc.

Flow-through fractions (F1–10), wash fractions (W1–10), and elution fractions (E1–10)

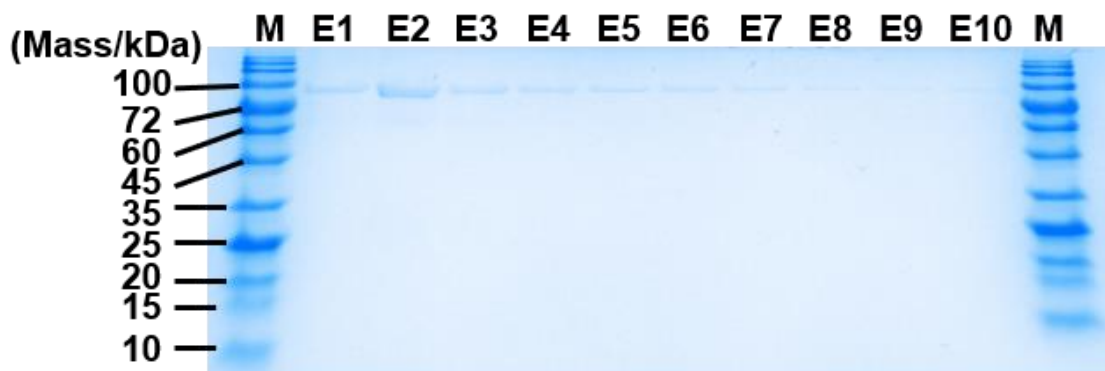


Fig. 3-12 SDS-PAGE analysis of purified UHRF2 SRA-Fluc (MW: 8.9×10^4)

The elution fractions (E1–10) were analyzed using 12% SDS-PAGE electrophoresis.

2-2. MBD の組換え生産

pET30c-*Strep-tag II-MBD* を用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換させ、MBD の発現を行なった。OD₆₀₀ 値 0.7 付近終濃度 0.5 mM となるように IPTG を添加して発現を誘導した。培養して得られた湿菌体 1000 mg より、Bug Buster Regent を用いて菌体を破碎して得られた溶液を遠心した。遠心後の溶液の上清を取り出して水溶性画分とした。本融合蛋白質には精製タグとして *Strep-tag II* を融合してあるため、水溶性画分より、*Strep-tag II* を利用して MBD の精製を行なった。精製画分として、通過画分(F1-10)、洗浄画分(W1-10)及び溶出画分(E1-10)を回収し、溶出画分を SDS-PAGE で解析した(Fig.3-13)。E2-E4 で目的の位置付近(10 kDa)にバンドが示された。従って、MBD が精製できたことが示された。

溶出画分の蛋白質濃度を測定した結果、溶出画分 2 (E2)で 32.9 ng/μL の MBD が 1 mL 得られた。溶出画分(E1-10)をまとめると MBD の濃度は 0.13 mg/mL (1.34 mg/10 mL)であり、発現誘導は 150 mL 培地で実施したため、培地当たりの収量は 0.01 mg/mL と考えられる。

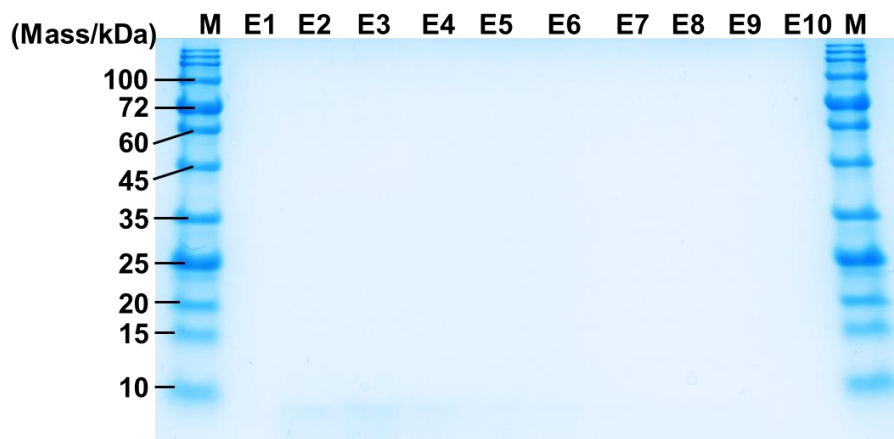


Fig. 3-13 SDS-PAGE analysis of purified MBD (MW: 1.0×10^4)

The elution fractions (E1-10) were analyzed using 12% SDS-PAGE electrophoresis.

第 3 項 UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質のヒドロキシメチル化 DNA に対する結合能解析

3-1. ヒドロキシメチル化 DNA に対する結合能解析

精製した UHRF2 SRA-Fluc のヒドロキシメチル化 DNA に対する特異性を検討するために、20 bp の非メチル化、メチル化、ヒドロキシメチル化 DNA を固定化した 96 穴プレートを用いて結合能を評価した。各種 DNA を固定化したウェルに UHRF2 SRA-Fluc を添加し、DNA に結合していない融合蛋白質を洗浄操作によって取り除いた。その後、すぐに発光強度を測定した。非メチル化、メチル化 DNA を固定した場合と比較して、ヒドロキシメチル化 DNA を固定化した well では、非メチル化 DNA の約 5 倍、メチル化 DNA の約 2 倍の発光強度が得られた(Fig.3-14)。各種 DNA 条件で示された発光強度に対して多重比較検定を実施した結果、非メチル化、メチル化 DNA に対してヒドロキシメチル化 DNA 条件において有意な差が示された($p < 0.01$)。従って、UHRF2 SRA-Fluc はヒドロキシメチル化 DNA を特異的に認識することが示された。

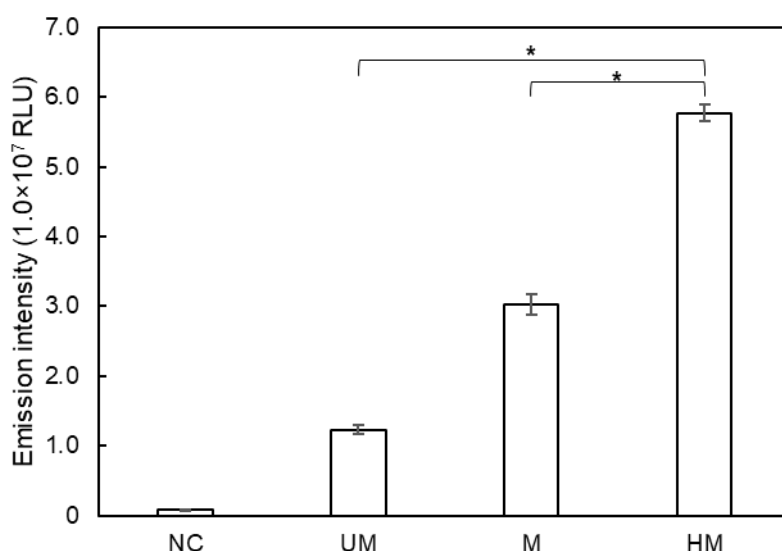


Fig. 3-14 Binding assay of UHRF2 SRA-Fluc to the hydroxymethylated dsDNA

The biotinylated unmethylated (UM), fully methylated (M), or hydroxymethylated (HM) dsDNA were added to a streptavidin-immobilized plate. As a negative control, a biotin blocked well without any DNA was employed. All measurements were performed in triplicate and reported as the mean \pm standard deviation. There was a significant difference between the emission intensity in UM and HM, or M and HM (ANOVA with Tukey-Kramer post hoc analysis¹⁵⁹, * $p < 0.01$).

3-2. MBD 存在下におけるヒドロキシメチル化 DNA に対する結合能解析

UHRF2 SRA-Fluc のメチル化 DNA への結合を抑制するために、DNA を固定化したウェルに、UHRF2 SRA-Fluc の添加前に 4.5 pmol, 10 pmol または 20 pmol の MBD を添加し、予めメチル化 CpG 部位をブロッキングすることにした。非メチル化、メチル化、ヒドロキシメチル化 dsDNA を固定化した 96 穴プレートを用いて結合能を評価した。各種 dsDNA を固定化したウェルに MBD を添加してインキュベート後、洗浄操作を実施した。その後、UHRF2 SRA-Fluc を添加し、DNA に結合していない融合蛋白質を洗浄操作によって取り除いた。その後、すぐに発光強度を測定した。その結果、45 nM, 100 nM MBD 条件では UHRF2 SRA-Fluc の発光強度は非メチル化 DNA 存在下と比較してメチル化 DNA 存在下で高く示されたが、200 nM MBD 条件では非メチル化とメチル化 DNA 存在下の発光強度が同等であった(Fig.3-15)。従って、BRET assay においても、20 pmol の MBD を用いて予めメチル化 CpG をマスクしておけば、UHRF2 SRA-Fluc はメチル化 CpG には全く結合せず、正確にヒドロキシメチル化レベルを測定できると考えた。

さらに 20 pmol MBD の条件で ssDNA のシトシン修飾を検出できるか検討した。健常者の血漿内 cfDNA において ssDNA と dsDNA はそれぞれ約 8 ng/ μ L、約 1 ng/ μ L 存在し、dsDNA よりも ssDNA の方が多く血漿中に遊離している。胃がん患者の血漿中では健常者と比較すると ssDNA と dsDNA は多く存在し、それぞれ約 10 ng/ μ L、約 1.5 ng/ μ L である¹⁶³。健常者とがん患者の両者とも cfDNA 内では dsDNA よりも ssDNA の存在量が高い。そのため、UHRF2 SRA-Fluc の ssDNA への結合活性も解析した。その結果、MBD でメチル化 CpG をブロッキングしたにもかかわらず、メチル化 ssDNA とヒドロキシメチル化 ssDNA の間に発光強度の差は見られなかった(Fig.3-16)。MBD のヘミメチル化 DNA とヘミヒドロキシメチル化 DNA に対する K_d は同程度であり、フルメチル DNA への結合と比較すると 10 倍以上低い(Table 3-1)。UHRF2 SRA の K_d は、フルヒドロキシメチル化 DNA と比べて、ヘミメチル化およびヘミヒドロキシメチル化 DNA への K_d は 3 倍低い。以上より、UHRF2 SRA-Fluc は ssDNA への結合性は低く、UHRF2 SRA-Fluc を用いて ssDNA のシトシン修飾レベルを評価するのは難しいことが示唆された。

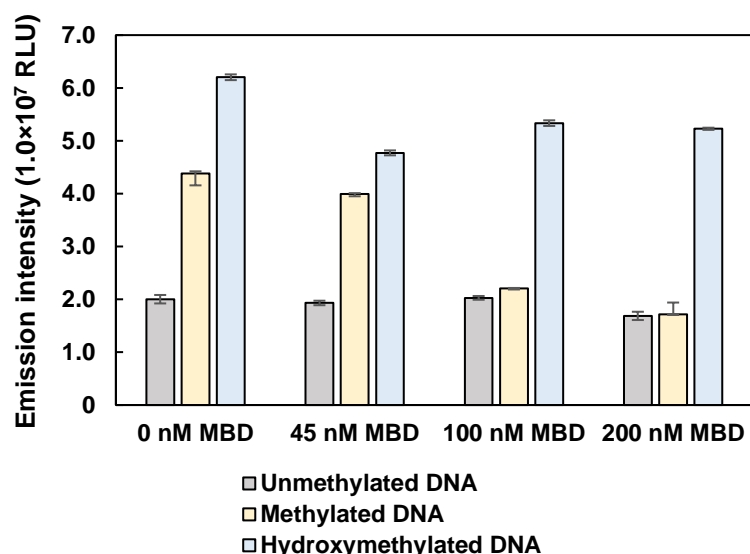


Fig. 3-15 Binding assay of UHRF2 SRA-Fluc to the hydroxymethylated DNA in the presence of MBD

The biotinylated unmethylated, fully methylated, or hydroxymethylated dsDNA were added to a streptavidin-immobilized plate. Before the addition of UHRF2 SRA-Fluc (4.5 pmol), 0 pmol, 4.5 pmol, 10 pmol, or 20 pmol of MBD in PBS was added to each dsDNA-immobilized well. After washing the wells, 100 μ l of UHRF2 SRA-Fluc mixture (45 nM UHRF2 SRA-Fluc, 20 mM Tris-HCl at pH 8.0, 1 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) was added and incubated for 30 min at room temperature. After washing the wells, the luminescence was measured by addition of PicaGene. All emission intensities were calculated by subtracting the intensity on the well without DNAs. All measurements were performed in triplicate and reported as the mean \pm standard deviation.

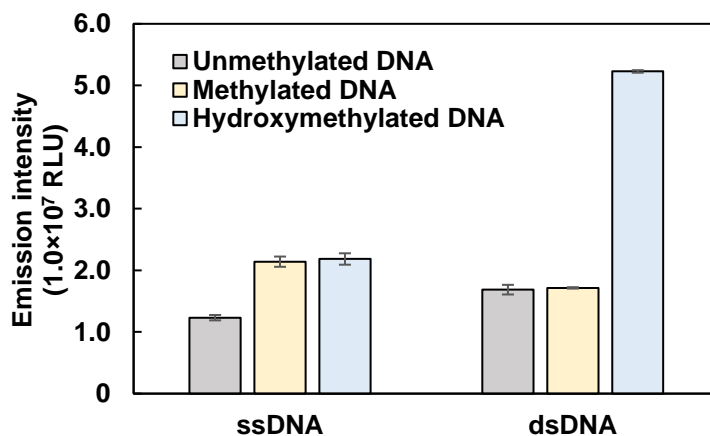


Fig. 3-16 Binding assay of UHRF2 SRA-Fluc to the hydroxymethylated ssDNA

The biotinylated unmethylated (UM), methylated (M), or hydroxymethylated (HM) ssDNA were added to a streptavidin-immobilized plate. As a negative control, a biotin blocked well without any DNA was employed. All measurements were performed in triplicate and reported as the mean \pm standard deviation. There was not a significant difference between the emission intensity in FM and HM ssDNA (ANOVA with Tukey-Kramer post hoc analysis¹⁵⁹).

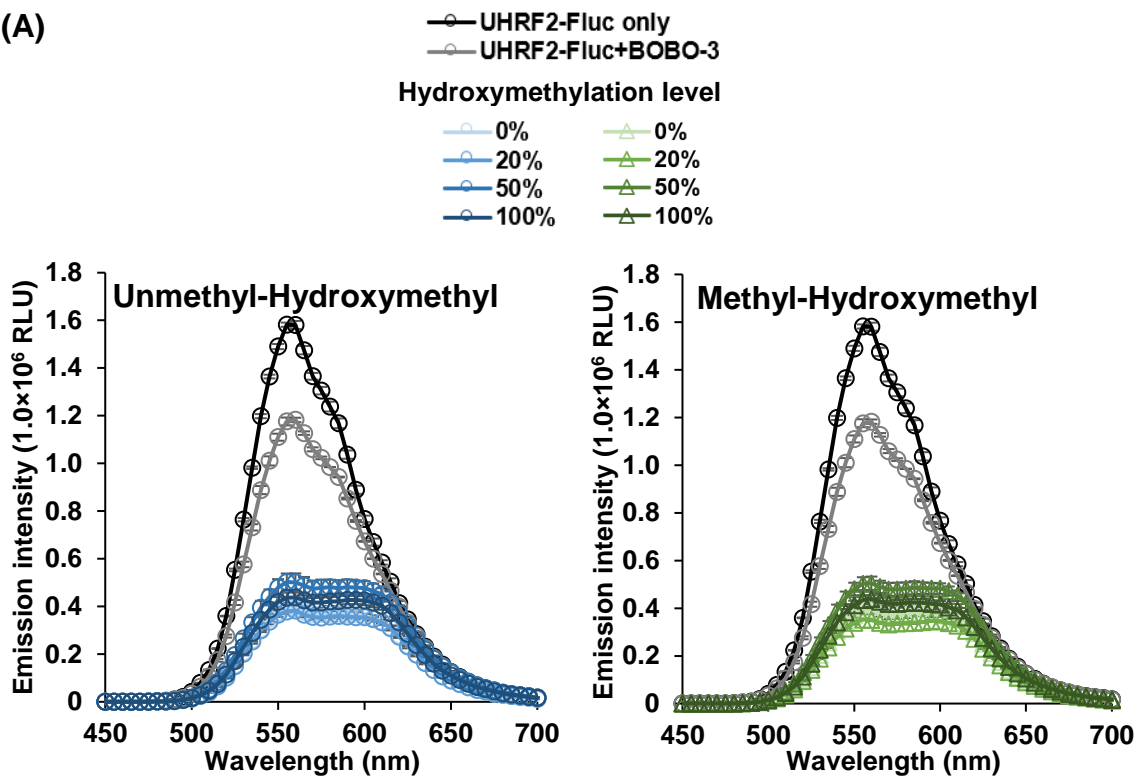
第 4 項 UHRF2 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いたヒドロキシメチル化レベル測定法の検討

4-1. ヒドロキシメチル化レベルの測定

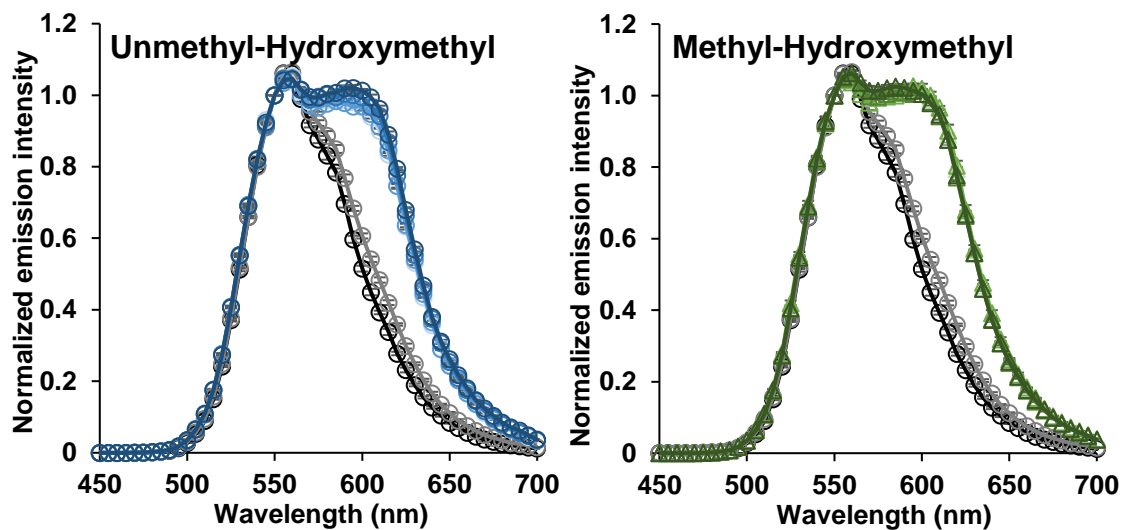
非メチル化とヒドロキシメチル化 dsDNA 又はメチル化とヒドロキシメチル化 dsDNA を混合し、ヒドロキシメチル化レベル 0, 20, 50, 100%となるように調製した。非メチル化 dsDNA とヒドロキシメチル化 dsDNA を混ぜて調製したヒドロキシメチル化レベル DNA 溶液を Unmethyl-Hydroxymethyl とし、メチル化 dsDNA とヒドロキシメチル化 dsDNA を混ぜて調製したヒドロキシメチル化レベル DNA 溶液を Methyl-Hydroxymethyl とする。これらの DNA に対して BOBO-3 を加えて 30 min 室温でインキュベートし、UHRF2 SRA-Fluc を加えた後、PicaGene 50 μ L 加えて溶液全量 100 μ L (f.c.: 45 nM UHRF2 SRA-Fluc, 0.5 μ M dsDNA, 1.2 μ M BOBO-3, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)として発光スペクトルを測定した(Fig.3-17A)。

全ての波長の発光強度を波長 550 nm の発光強度で補正した(Fig.3-17B)。DNA インターカラーである BOBO-3 は 570 nm を最大励起波長とし、602 nm を最大蛍光波長とする。したがって、波長 605 nm で示された発光強度が BRET シグナルと考えられる。発光スペクトルを測定し、550 nm の発光強度で補正した結果、UHRF2 SRA-Fluc のみ(BOBO-3 非添加)の条件と比較して、BOBO-3 存在下の発光強度の差は 605 nm で最も大きく示された。そのため本章において、605 nm の発光強度を BRET シグナルとして扱うこととした。Unmethyl-Hydroxymethyl 溶液ではヒドロキシメチル化レベル依存的に波長 605 nm の発光強度が増加して示された($R^2 = 0.99$)。しかし、Methyl-Hydroxymethyl 溶液では波長 605 nm の発光強度とヒドロキシメチル化レベルに相関性は得られなかった(Fig.3-17C)。つまり、UHRF2 SRA-Fluc はメチル化 DNA にもある一定量で結合してしまっているため、ヒドロキシメチル化レベル依存的な BRET シグナルに、メチル化 DNA の存在により生じた BRET シグナルが足されたことで、Methyl-Hydroxymethyl 溶液ではヒドロキシメチル化レベル依存的な BRET シグナルの変化は見られなかったと考えられる。そのため、本手法においてもメチル化 CpG をブロッキングするために UHRF2 SRA-Fluc 添加前に MBD を添加することとした。

(A)



(B)



(C)

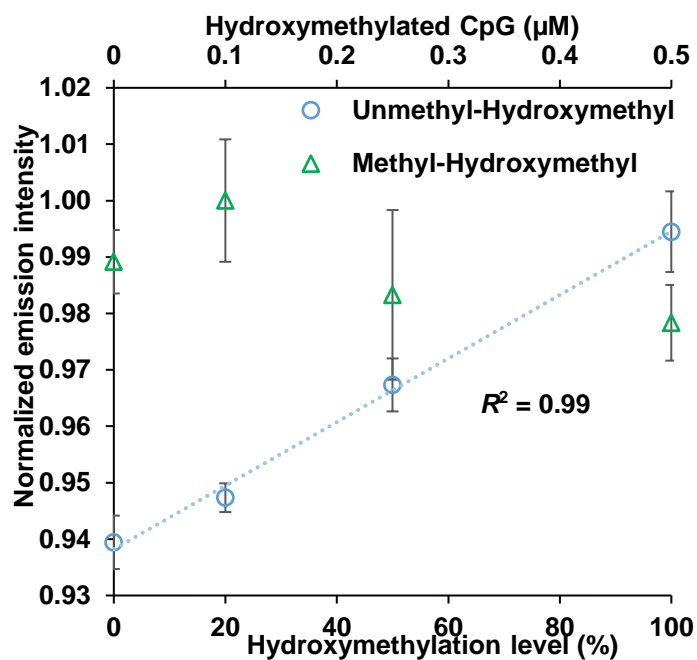


Fig. 3-17 Quantification of the DNA hydroxymethylation level using the BRET assay

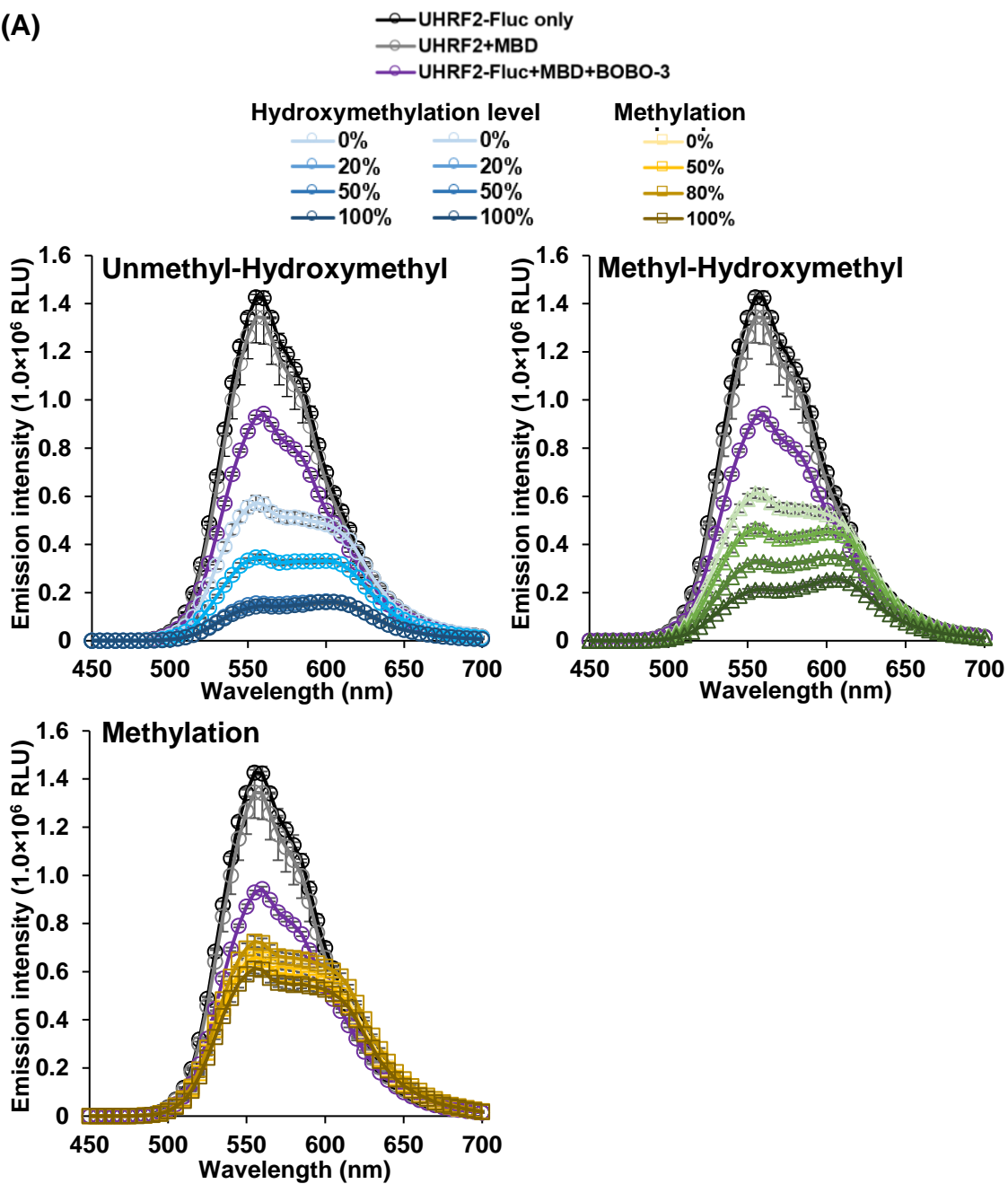
All experiments were performed in triplicate (mean \pm SD). (A) Emission spectra of UHRF2 SRA-Fluc in the presence of 0%, 20%, 50%, or 100% of hydroxymethylated DNA which were prepared by mixing unmethylated and hydroxymethylated DNAs (Unmethyl-Hydroxymethyl), or fully methylated and hydroxymethylated DNAs (Methyl-Hydroxymethyl). (B) The emission spectra normalized by the intensity at 550 nm. (C) Normalized emission intensity at 605 nm in the presence of Unmethyl-Hydroxymethyl (blue, $R^2 = 0.99$), or Methyl-Hydroxymethyl (green). Hydroxymethylated CpG of hydroxymethylation level 0, 20, 50, 100% contains 0, 10, 25, 50 pmol in the 100 μ L volume.

4-2. MBD 存在下でのヒドロキシメチル化レベルの測定

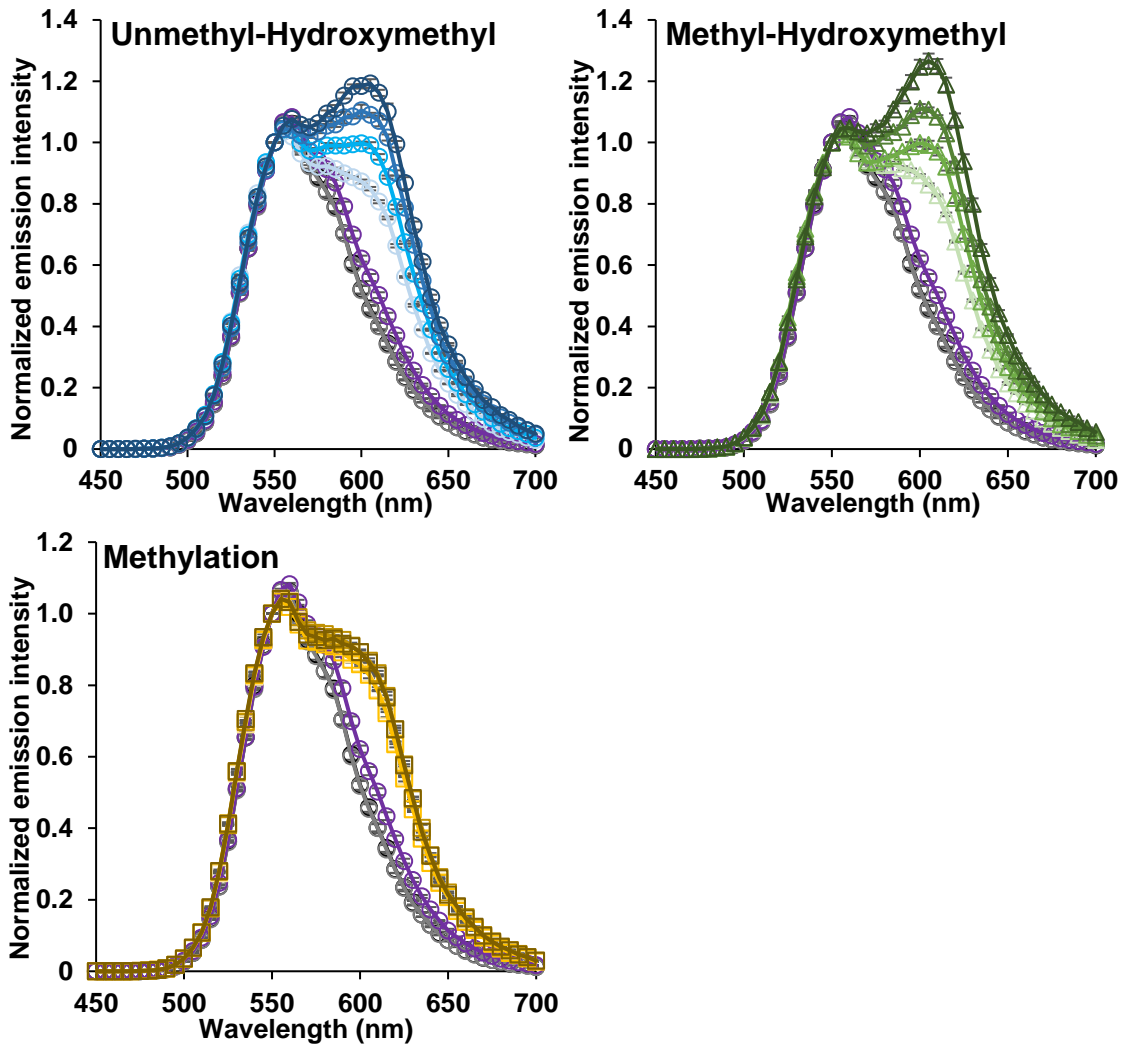
BRET シグナルを測定するために、UHRF2 SRA-Fluc, 各種 99-mer DNA, BOBO-3, Luciferase 発光基質を混合し、溶液全量 100 μ L (f.c.: 45 nM UHRF2 SRA-Fluc, 0.5 μ M dsDNA, 1.2 μ M BOBO-3, 100 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)として発光強度を測定した(Fig.3-18A)。

得られた全ての発光スペクトルは 550 nm の発光強度で補正した(Fig.3-18B)。波長 605 nm の発光強度は、2 種のヒドロキシメチル化レベル溶液どちらにおいてもヒドロキシメチル化レベル依存的に増加した(Fig.3-18C)。一方でメチル化レベル依存的な BRET シグナルの変化は見られなかった。さらにヒドロキシメチル化レベルが 0%のサンプル、つまりそれぞれ非メチル化レベル 100%とメチル化レベル 100%の DNA 溶液では発光強度が同等であったことより、MBD を添加したことでメチル化 CpG をブロックすることができ、Fig.3-11 の結果の再現性を確認することが出来た。そのため、BRET assay においてヒドロキシメチル化レベルを測定できることが示された。

(A)



(B)



(C)

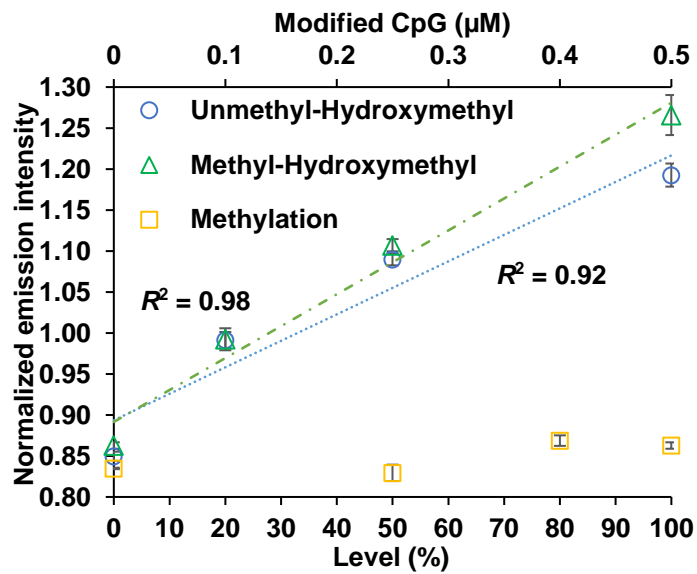


Fig. 3-18 Quantification of the DNA hydroxymethylation levels in the presence of MBD

All experiments were performed in triplicate (mean \pm SD). (A) Emission spectra of UHRF2 SRA-Fluc in the presence of the DNA mixture that hydroxymethylated DNA and unmethylated DNA or methylated DNA were mixed to make the hydroxymethylation values equal to 0%, 20%, 50%, or 100%, or that unmethylated and methylated DNA were mixed to make the methylation values equal to 0%, 50%, 80%, or 100%. (B) The emission spectra normalized by the intensity at 550 nm. (C) Normalized emission intensity at 605 nm. The BRET signals in Unmethyl-Hydroxymethyl ($R^2 = 0.92$) and Methyl-Hydroxymethyl ($R^2 = 0.98$) DNAs increased as hydroxymethylation levels was increased. Additionally, increased methylation level was not accompanied with an alteration of the BRET signal. Hydroxymethylated CpG of hydroxymethylation level 0, 20, 50, 100% contains 0, 10, 25, 50 pmol in the 100 μ L volume, while methylated CpG of methylation level 0, 50, 80, 100% contains 0, 25, 40, 50 pmol in the 100 μ L volume.

4-3. TET2 処理したゲノム DNA におけるヒドロキシメチル化シトシンの検出

4-3-1. TET2 を用いたゲノム DNA のヒドロキシメチル化

TET2 は 5mC 酸化反応を触媒する酵素であり、ゲノム DNA を TET2 処理することで 5hmC 量が増加したゲノム DNA を作製することが出来ると考えた。HeLa 細胞のゲノム DNA 中の 5hmC の存在量は約 0.025%以下であることが報告されている⁵⁹。さらにヒト胎児腎細胞である HEK293 細胞やマウス体細胞における 5fC や 5caC の存在量は、5mC がナノモルレベル、5hmC がピコモルレベルで存在しているのに対し、数十フェムトモル以下しか存在しない^{14,164}。さらに、ゲノム DNA を TET2 で 37°C, 60 min 反応させることで 5mC の約半量を酸化することが出来ることがわかっている⁵³。今回は HeLa 細胞から抽出したゲノム DNA 30 µg に TET2 を添加して 37°C で 2 時間処理したため、ゲノム DNA 中の全ての 5mC が TET2 によって酸化されたと考えられる。さらに Hu らの報告では、合成 DNA 中の 5mC を TET2 によって完全に酸化させると、約 65%が 5hmC に、約 27%が 5fC に酸化されることを示している¹⁶¹。今回用いた HeLa ゲノム DNA 全体の CpG のメチル化レベルは 67.2%であるので(第 4 章 Table.4-5)、TET2 で完全に 5mC を酸化させたとすると、TET2 処理ゲノム DNA のヒドロキシメチル化レベルは約 43.7%、ホルミル化レベルは約 18.1%であると推定される。UHRF2 SRA は 5fC には結合性を示さないため¹⁶⁴、TET2 処理ゲノム DNA を標的とすればゲノム DNA のヒドロキシメチル化レベルを測定できると考えられる。

TET2 によって処理後、フェノールクロロホルム処理とエタノール沈殿で TET2 処理ゲノム DNA を精製した結果、23.6 µg の TET2 処理ゲノム DNA を回収することが出来た(回収率 78.7%)。

4-3-2. TET2 処理ゲノム DNA におけるヒドロキシメチル化シトシンの検出

HeLa ゲノム DNA (Non-treated genomic DNA)、低メチル化ゲノム DNA (Aza-treated genomic DNA)、TET2 処理ゲノム DNA (TET2-treated genomic DNA)それぞれ 2.2 µg に対して BRET assay を実施し、TET2 処理ゲノム DNA 特異的に BRET シグナルが増加するか検討した。それぞれのゲノム DNA に BOBO-3 を加えて 30 min 室温でインキュベート後、MBD を加えて、室温で 1 min インキュベートし、UHRF2 SRA-Fluc を加えた後、PicaGene 50 µL 加えて溶液全量 100 µL (f.c.: 45 nM UHRF2 SRA-Fluc, 200 nM MBD, 22 ng/µL genomic DNA, 1.2 µM BOBO-3, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)として発光スペクトルを測定した(Fig.3-19A)。得られた全ての発光スペクトルは波長 550 nm の発光強度で補正した(Fig.3-19B)。BRET シグナルである波長 605 nm の発光強度は、未処理のゲノム DNA と低メチル化ゲノム DNA と比較して TET2 処理したゲノム DNA で約 1.1 倍高く示された(Fig.3-19C)。従って、ゲノム DNA を TET2 処理することによって生じた 5hmC を検出できたことが示された。

次に BRET シグナルが TET2 処理ゲノム DNA 量依存的に増加するか検討するために TET2 処理ゲノム DNA と未処理のゲノム DNA を混合比が 0:1, 3:7, 6:4 または 1:0 となるように混合し、BRET assay を実施した(Fig.3-20A)。上記の第 4 章 第 4 節実験結果・考察 4-3-1 の考察より、TET2 処理ゲノム DNA のヒドロキシメチル化レベルは 43.7%と推測されることから、TET2 処理ゲノム DNA と未処理のゲノム DNA を混合比が 0:1, 3:7, 6:4 または 1:0 のゲノム DNA 溶液のヒドロキシメチル化レベルはそれぞれ、0%, 13.1%, 26.2%, 43.7% と推測される。得られた全ての発光スペクトルは波長 550 nm の発光強度で補正した結果(Fig.3-20B)、BRET シグナルである波長 605 nm の発光強度は TET2 処理ゲノム DNA の濃度依存的に増加した(Fig.3-20C)。以上より、本手法を用いてゲノム DNA 中のヒドロキシメチルシトシンを検出できることが示された。

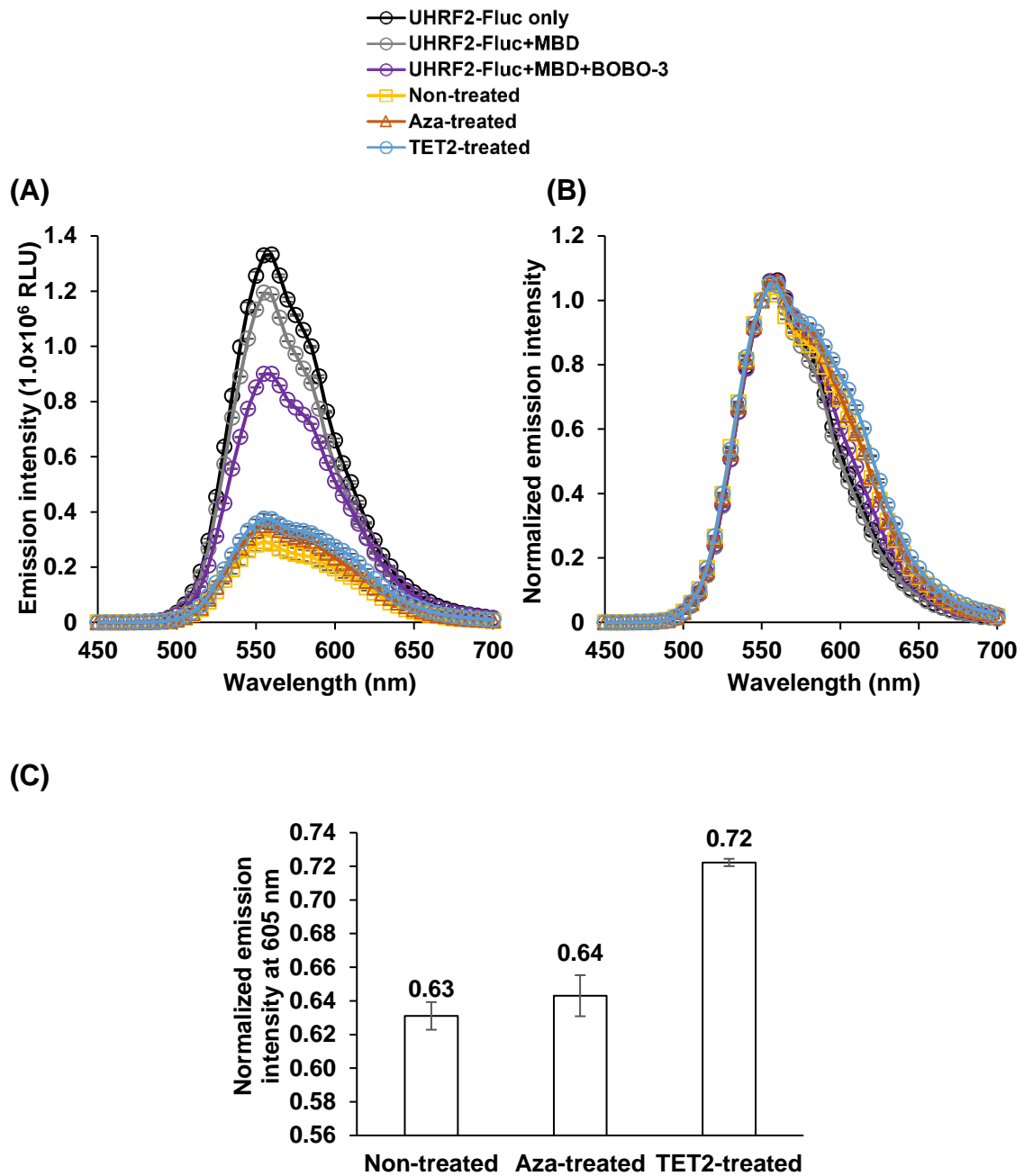


Fig. 3-19 Detection of hydroxymethylated CpG in genomic DNA by the BRET assay

(A) Emission spectra of UHRF2 SRA-Fluc with MBD in the presence of HeLa genomic DNA, hypomethylated genomic DNA, or TET2-treated genomic DNA. As a control, the emission intensities in the presence of MBD without genomic DNA were measured. (B) The emission spectra normalized by the intensity at 550 nm. (C) Normalized emission intensity at 605 nm. All experiments were performed in triplicate (mean \pm SD).

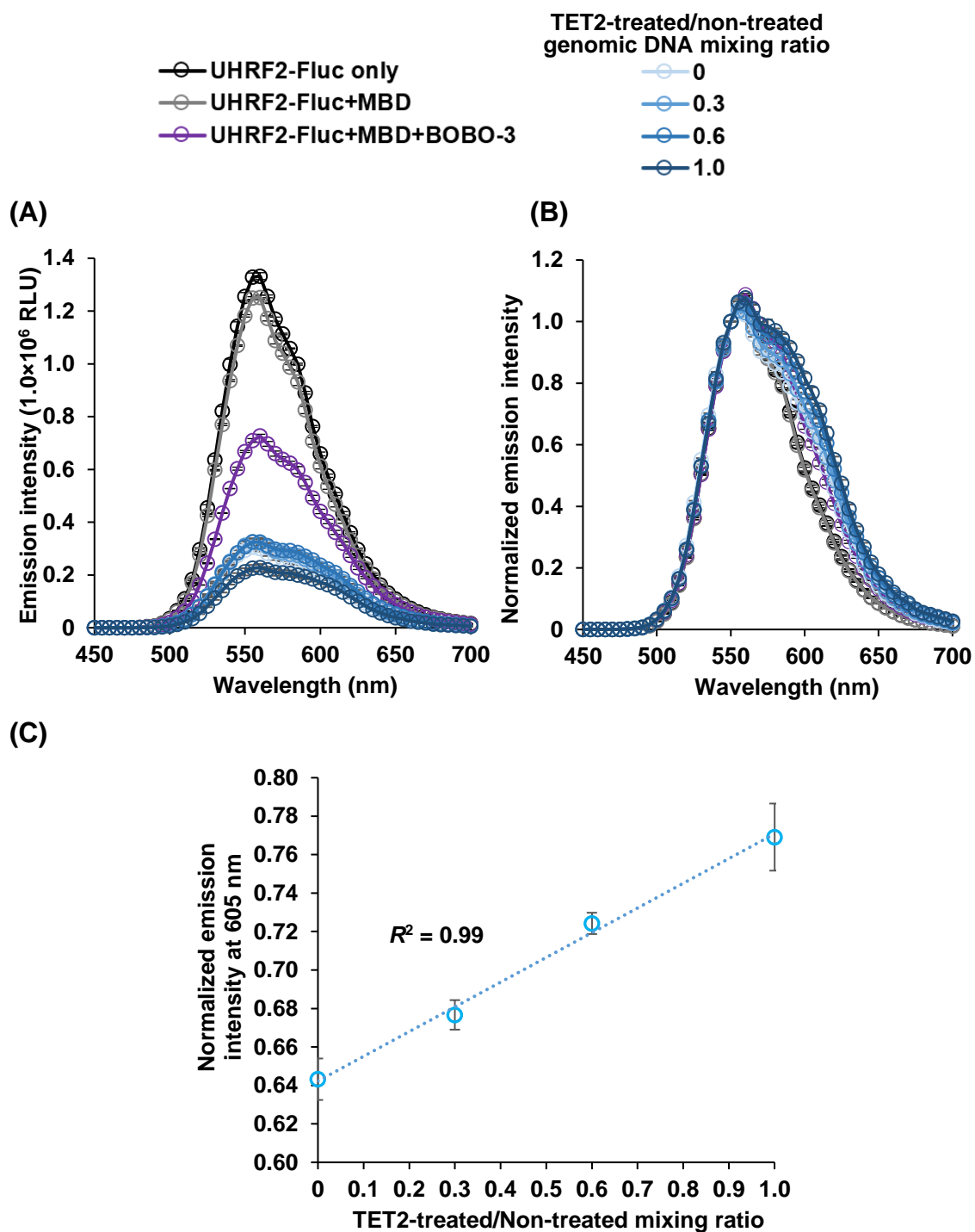


Fig. 3-20 Detection of hydroxymethylated CpG in TET2-treated genomic DNA by the BRET assay
 (A) Emission spectra of UHRF2 SRA-Fluc with MBD in the presence of several mixing ratio (0:1, 3:7, 6:4, or 1:0) which were prepared by mixing TET2-treated and non-treated genomic DNA. (B) The emission spectra normalized by the intensity at 550 nm. (C) Normalized emission intensity at 605 nm. The BRET signal was increased with increasing the amount of TET2-treated genomic DNA ($R^2 = 0.99$). All experiments were performed in triplicate (mean \pm SD).

4-3-3. TET2 処理ゲノム DNA を用いた検出限界の検討

UHRF2 SRA-Fluc を用いた BRET assay において、検出限界を検討するために TET2 処理ゲノム DNA 0, 1, 5, 10, 15, 20 または 25 ng/μL に対してそれぞれ 0, 0.06, 0.3, 0.6, 0.8, 1.1 または 1.4 μM BOBO-3 を混合し、30 min 室温でインキュベートした。ここに、MBD を 8 μL 加えて室温で 1 min インキュベート後、UHRF2 SRA-Fluc と発光基質を加えて溶液全量 100 μL (f.c.: 45 nM UHRF2 SRA-Fluc, 200 nM MBD, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) として発光強度を測定した(Fig.3-21A)。得られた全ての発光スペクトルは波長 550 nm の発光強度で補正した結果(Fig.3-21B)、BRET シグナルである波長 605 nm の発光強度は TET2 処理ゲノム DNA の濃度依存的に増加した(Fig.3-21C)。Fig.3-17C の結果から、検出限界を求めたところ、0.75 ng/μL (74.6 ng)であった。以上より、本手法を用いて最小 75 ng のゲノム DNA 中のヒドロキシメチルシトシンを検出できることが示唆された。

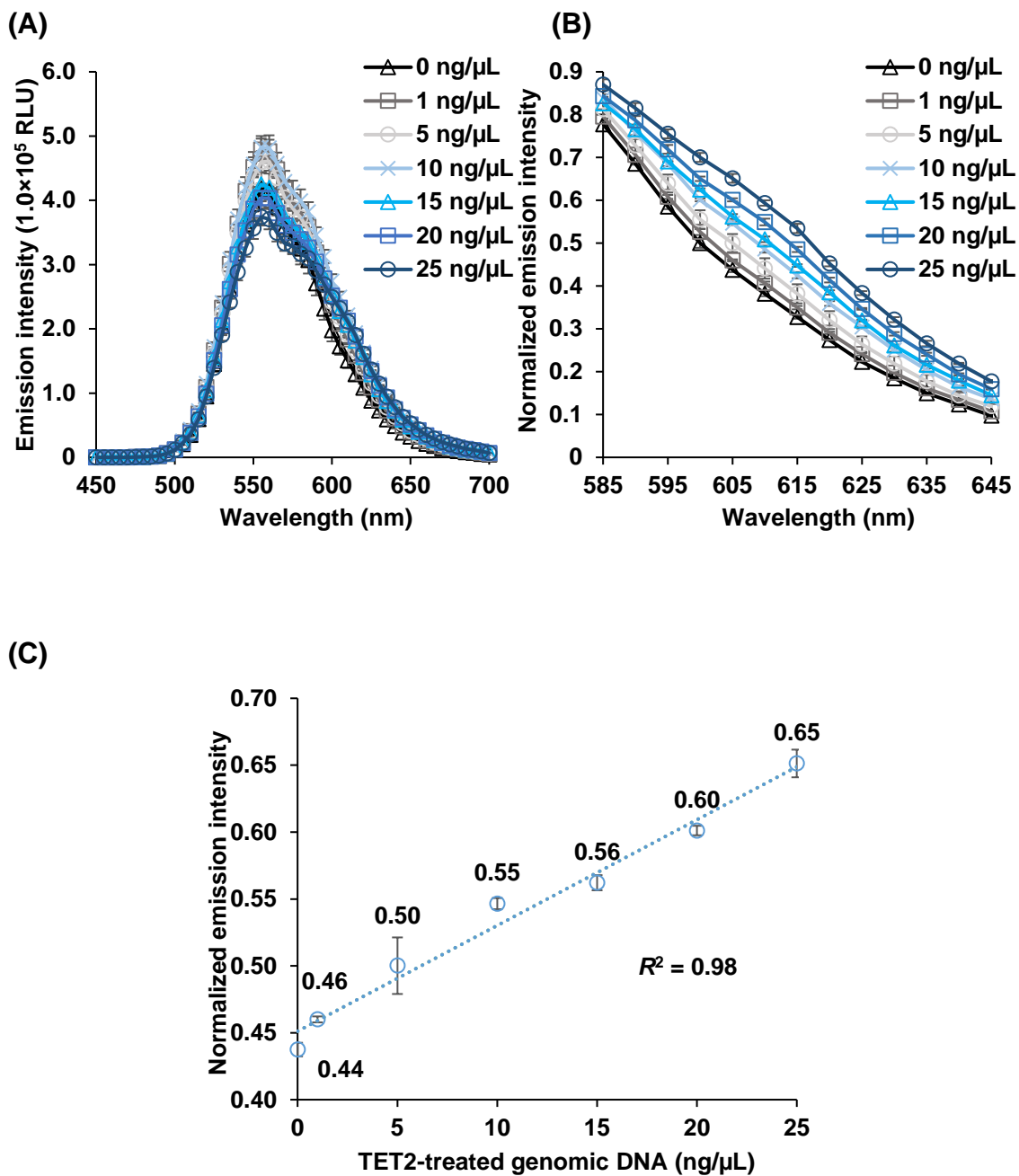


Fig. 3-21 Investigation of detection of limit in the BRET assay

(A) Emission spectra of UHRF2 SRA-Fluc with MBD in the presence of various concentration TET2-treated genomic DNA solution (0, 1, 5, 10, 15, 20, or 25 ng/ μ L). (B) The emission spectra normalized by the intensity at 550 nm. (C) Normalized emission intensity at 605 nm. The BRET signal was increased with increasing the amount of TET2-treated genomic DNA ($R^2 = 0.98$). All experiments were performed in triplicate (mean \pm SD).

第5節 結言

本章では、UHRF2 SRA-Fluc を用いたヒドロキシメチル化レベル測定法を開発した。大腸菌を用いて UHRF2 SRA-Fluc を組換え生産し、ヒドロキシメチル化 DNA に対する結合能解析をした結果、UHRF2 SRA-Fluc が Luciferase の発光活性とヒドロキシメチル化 CpG 結合活性を保持していることが示された。しかし、UHRF2 SRA-Fluc はメチル化 CpG にも結合したため、ヒドロキシメチル化 CpG とメチル化 CpG の両方が DNA に存在した場合、正確なヒドロキシメチル化レベルを測定することは出来ない。そこで、メチル化 CpG 結合蛋白質である MBD を添加することによって、DNA 中のメチル化 CpG を予めブロッキングすることにした。DNA が固定化されたプレートに MBD を添加して洗浄後に、UHRF2 SRA-Fluc を添加して、同様に各種シトシン修飾された DNA に対して結合能解析を行なった。その結果、発光強度は 200 nM MBD 存在下で、メチル化 DNA への結合性が非メチル化 DNA と同程度まで抑えられることが確認された。そこで、BRET assay においても MBD を混合することで、ヒドロキシメチル化レベルを測定できると考えた。

ヒドロキシメチル化レベルを 0, 20, 50, 100%となるようにメチル化 DNA とヒドロキシメチル化 DNA を混合した DNA 溶液に対して BOBO-3 を添加し、室温でインキュベート後に MBD を添加した。室温で 1 min インキュベート後に UHRF2 SRA-Fluc と Luciferase 基質を添加して、発光スペクトルを測定した。その結果、ヒドロキシメチル化レベルが上昇すると共に BRET シグナルも増加して示された。

ヒドロキシメチル化レベルの高いゲノム DNA を作製するために、ゲノム DNA をメチルシトシン酸化酵素 TET2 で処理した。TET2 でゲノム DNA を処理することによってヒドロキシメチル化レベルが約 43.7%のゲノム DNA を調製できたと考えられ、この TET2 処理ゲノム DNA に対して BRET assay を実施した結果、通常の HeLa ゲノム DNA と低メチル化ゲノム DNA と比べて高い BRET シグナルが得られた。さらに、TET2 処理ゲノム DNA と通常の HeLa ゲノム DNA を混合比 0:1, 3:7, 6:4, 1:0 となるように混ぜ合わせ、これらのゲノム DNA 溶液を対象に BRET assay を実施した。その結果、TET2 処理ゲノム DNA 量依存的に BRET シグナルが増加した。この TET2 処理ゲノム DNA を用いて本手法の検出限界を検討したところ、最小 75 ng のゲノム DNA のヒドロキシメチル化レベルを測定できることが示唆された。

以上の結果より、本章では UHRF2 SRA-Fluc を用いることで簡便にヒドロキシメチル化レベルを測定できることが示された。

第4章

メチルシトシン酸化酵素 TET2 を用いた ゲノム DNA 全体のメチル化レベル 測定法の開発

第4章 メチルシトシン酸化酵素 TET2 を用いたゲノム DNA 全体のメチル化レベル測定法の開発

第1節 緒言

ヒトゲノム DNA における CpG サイトは通常約 70–80%がメチル化されている^{165,166}。しかし、がん細胞ではゲノム DNA 全体のメチル化レベルは正常細胞より低下している^{33,95-97}。つまり、ゲノム DNA 全体のメチル化レベルはがんのバイオマーカーとしての利用が期待される。

ゲノム DNA のメチル化レベルを測定する方法として、一般的にバイサルファイト法^{121-123,145}や HPLC 法^{124,125}、LC-MS/MS 法¹⁶⁷、ELISA 法^{133,134}、Methyl acceptance assay¹³⁵⁻¹³⁹などが用いられている。しかし、バイサルファイト法や HPLC 法、LC-MS/MS 法は、解析前にゲノム DNA に煩雑な化学処理や酵素処理が必要で、解析においても大幅な時間を要する。ELISA 法は抗 5mC 抗体を利用する方法で、抗体の 5mC への特異性は非常に高いが、複数回の洗浄操作を必要とし、簡便にゲノム DNA のメチル化レベルを測定することは難しい。Methyl acceptance assay は、CpG Methyltransferase (M.SssI)によるメチル化反応において放射性標識した SAM を触媒反応に用いる。この反応によってメチルシトシンに取り込まれた放射性メチル基はゲノム DNA のメチル化レベルと反比例する。この手法も ELISA と同様に洗浄操作を必要とする。

そこで本章では、煩雑な化学処理等を必要とせず、ゲノム DNA に酵素と測定試薬を混合するのみの簡便なステップで解析できるゲノム DNA のメチル化レベル測定法を開発することを目的とした。本研究室では以前、MBD-Fluc と CXXC-Oluc を用いたゲノム DNA 全体のメチル化レベル測定法を開発している^{143,144,162,168}。本手法は、試薬を混合するだけの簡便な実験ステップでメチル化レベルを測定できるが、ゲノム DNA を少なくとも 2.2 μg 必要とする。そこでゲノム DNA のメチル化レベル測定法の開発において酵素反応に着目した。酵素は標的分子を特異的に認識し、且つその触媒反応の過程で副産物を生成する。故に標的分子の検出に酵素を用いることは非常に有効的であると言える。本研究では、メチルシトシン酸化酵素である TET を用いたゲノム DNA 全体のメチル化レベル測定法を開発することを目的とした。

想定したゲノム DNA 全体のメチル化レベル測定原理を Fig.4-1 に示す。TET は 5mC を 5hmC, 5fC, 5caC に連続的に酸化し、この反応過程で α -KG はコハク酸に変換される。つまり、TET の 5mC 酸化反応によって生じるコハク酸量は、ゲノム DNA 全体のメチル化レベルに相関すると想定した。ヒトでは TET ファミリー蛋白質として TET1, TET2, TET3 が同定されており、そのうち 5mC 酸化反応の触媒活性は TET2 が最も高いことが報告されている^{49,161}。ヒト野生型 TET2 の 1129–1936 残基のうちの 1481–1843 残基までを 15 残基の GS linker (GGGGS)₃ に置換した TET2 CD (Catalytic domain)は、野生型と同様に TET2 の酵素活性を保持することが示されている^{161,169}。本研究ではこの TET2 CD を利用した(Fig.4-2)。

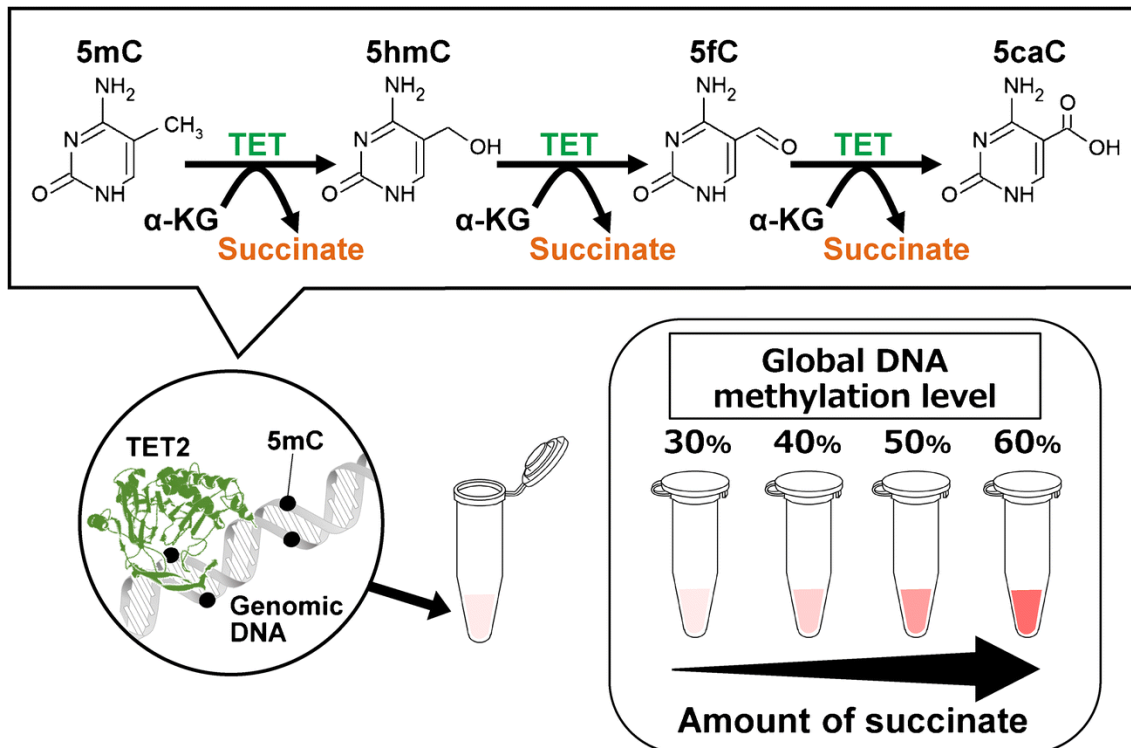


Fig. 4-1 Global DNA methylation quantification assay using TET2

The oxidation of 5mC to 5hmC by TET2 produces succinate quantities which correlate to the global DNA methylation levels.

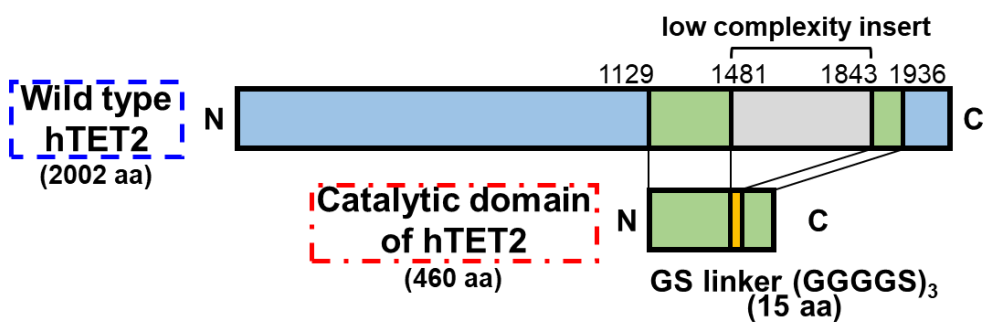


Fig. 4-2 TET2 catalytic domain

TET2 is a large multi-domain enzyme (2002 residue). It has been previously shown that the internal deletion of the truncated mutant (1129–1936 residue with 1481–1843 replaced by a 15-residue GS linker) is responsible for the enzymatic activity.

第 2 節 実験試薬・機器

第 1 項 試薬及び消耗品

Table 4-1. Reagents and Consumables

Product	Company
UltraPure™ Distilled Water	invitrogen™
KOD-Plus-Neo	TOYOBO
ExcelBand 1KB (0.25-10 kb) DNA Ladder	SMObio
Agar	Wako
Orange G	Nacalai
EtBr Solution	NIPPON Gene
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
Ligation high ver. 2	TOYOBO
Competent Quick DH5a	TOYOBO
Competent Cell BL21 (DE3)	BioDynamics Laboratory Inc.
Ex Taq HS	TAKARA
NdeI	New England Biolabs
NotI	New England Biolabs
Taq ^{ql}	New England Biolabs
SOC Medium	TAKARA
Tryptone	Nacalai
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Nacalai
Extract Yeast Dried	Nacalai
NaCl	Wako
Kanamycin Monosulfate	Tokyo Chemical Industry
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen
EpiTect Bisulfite Kits	Qiagen
SuperSep™ Ace, 15%, 17 well	Wako
DMEM (High Glucose)	Nacalai
1×penicillin–streptomycin L-glutamine Serum, Fetal Bovine, Ireland Origin	Sigma-Aldrich
TrypLE™ Select (1X)	Biowest
5-Aza-2'-deoxycytidine	Gibco®
Cell Culture Dish 100mm×20mm Style	Tokyo Chemical Industry
Strep-Tactin Superflow Plus Cartridge (1mL)	NEST®
25-mm PES syringe filter 0.45-μm pore hydrophilic polyether sulfone membrane	Qiagen
BugBuster® 10× Protein Extraction Reagent	Millipore
10x PBS	Novagen
Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate	Ambion
d-Desthiobiotin	Wako
HABA	Sigma-Aldrich
(±) DTT	Sigma-Aldrich
Glycerol	Wako
Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit 30K device	Nacalai
Protein Assay BCA Kit	Millipore
Albumin, from bovine serum	Wako
96-well clear microplate	Sigma Life Science
Acrylamide	Greiner bio-one
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Wako
Sodium dodecyl sulfate	Nacalai
	Wako

Ammonium Peroxodisulfate	Yoneyama Yakuhin Industry
N,N,N',N'-tetramethylphenylenediamine (TEMED)	Tokyo Chemical Industry
BES	Dojindo
Tris-BES Sample buffer (2X)	TEFCO
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Sodium Thiosulfate Pentahydrate	Wako
N,N-Dimethyl formamide	Wako
Quick-CBB PLUS	Wako
ExcelBand All Blue Broad Range Plus Protein Marker	SMObio
96-well black microplate	Sanplatec
L(+)-Ascorbic Acid	Kanto Chemical Industry
2-oxoglutaric acid (α -ketoglutaric acid)	Wako
HEPES	Dojindo
Ammonium Iron(II) Sulfate Hexahydrate, 99.5%	Wako
EnzyChrom™ Succinate Assay Kit	BioAssay Systems

第 2 項 実験機器

Table 4-2. Equipment

Product	Company
Airstream® Class II Biological Safety Cabinets, Gen 3 (E-Series)	Esco
Thermo Scientific Forma Series 3 Water Jacketed CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific
himac CT15RE	HITACHI
T100™ Thermal Cycler	BIO-RAD
Veriti Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific
Mupid-2 plus	ADVANCE
BE-220	BIO CRAFT
Power supply for electrophoresis	BIO CRAFT
BioSpectrometer basic	Eppendorf
LED Illuminator LI-410	BIO CRAFT
Incubator IC601	Yamato
Shaker	Iwaki
Microtube rotator MTR-103	AS ONE
Variable Speed Pump I - Low	Fisher Scientific
SpectraMax iD5	Molecular Devices

第 3 節 実験方法

第 1 項 TET2 発現ベクターの構築

TET2 発現ベクターを構築するために N 末端に制限酵素 NdeI 認識配列と Strep-tag II 配列を、C 末端に制限酵素 NotI 認識配列を付加した *TET2* 遺伝子が挿入されたプラスミド pTAC-2-*Strep-tag II-TET2* を Eurofins Genomics に合成委託した。この pTAC-2-*Strep-tag II-TET2* を制限酵素 NdeI と NotI で 37°C 2 h, 65°C 30 min 反応させた(2 µg plasmid, 20 U NdeI, 20 U NotI, 1xCut Smart buffer)。制限酵素処理産物を 1%アガロースゲルにて電気泳動し、*TET2* 部分(1413 bp)のゲルを切り出し、*TET2* を精製した (Wizard SV Gel PCR Clean-Up System)。同様に pET30c を制限酵素 NdeI と NotI で処理して 1%アガロースゲルにて電気泳動し、目的のバンド(5244 bp)を切り出して精製した。この制限酵素処理済みの pET30c 50 ng に対して *TET2* をそれぞれモル比 1 : 1 の割合で混合し、溶液全量 7.5 µL とした。そこに 7.5 µL Ligation high ver.2 加え、ライゲーションした(16°C, 16 h)。

50 µL *E. coli* DH5α に、ライゲーション産物を 5 µL 加え、氷上で 5 min 静置した。その後、42°C, 30 sec インキュベートし、氷上で 2 min 静置して形質転換させた。形質転換後、450 µL SOC 培地を添加して転倒混和し、37°C, 1 h 振盪培養した。形質転換された DH5α 100 µL を LB+Kanamycin 寒天培地(終濃度 50 µg/mL Kanamycin)に撒き、37°C で一晚培養した。形成されたコロニーを採取し、LB+Kanamycin 液体培地(終濃度 50 µg/mL Kanamycin)で 37°C, 16 h 培養した。この大腸菌培養液を 10,000 × g, 30 sec 遠心して上清を除去し、集菌した。その後、プラスミドを抽出し(Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System)、シーケンス解析を実施した。解析には Table 4-3 のプライマーを使用し、シーケンス解析は Macrogen に委託した(3730xl DNA analyzer, Thermo Fisher Scientific)。

Table 4-3. Primer sequence

Name	Sequence (5'-3')
TET2 sequence forward primer 1	GACCGAGACGTTGCGTAAAT
TET2 sequence forward primer 2	GCTCCAAGAGCATCCAAAAC
TET2 sequence reverse primer 1	TCTGACGTGGATGAATTTGG
TET2 sequence reverse primer 2	CGTTGTCTGCACGTTTTTCAC

第 2 項 TET2 の組換え生産

構築した pET30c-*Strep-tag II-TET2* を用いて、*E.coli* BL21 (DE3) を形質転換した後、IPTG によってタンパク質発現誘導を行なった。pET30c-*Strep-tag II-TET2* で形質転換した BL21 (DE3) を 1.5 mL LB+Kanamycin 液体培地(終濃度 50 µg/mL Kanamycin)に加えて 37°C, 16 h 前培養した。培養液を 150 mL LB+Kanamycin 液体培地(終濃度 50 µg/mL Kanamycin)に全量加え、37°C で培養を開始した。OD₆₀₀ 値 0.8 付近で IPTG (終濃度 0.5 mM)を添加し、16°C, 140 r.p.m., 16 h 本培養した。培養後、遠沈管に培養液を 35 mL ずつ分注し、遠心分離した(4°C, 2,500 × g, 10 min)。上清を除去し、35 mL 0.85% NaCl 溶液を加えてボルテックスし、遠心分離(4°C, 2,500 × g, 10 min)する一連の操作を 2 回行なった。上清を除去し、25 mL 0.85% NaCl 溶液を加えてボルテックスし、遠心分離(4°C, 2,500 × g, 10 min)遠心後、上清を除去して湿菌体を回収した。

得られた湿菌体 690 mg に対して 3450 µL Bug Buster Regent (1 × PBS buffer, 1 × Bug Buster Regent)を加えて懸濁し、インキュベート(室温, 15 min, 5 r.p.m.)した後、遠心分離(4°C, 16,000 × g, 20 min)して水溶性画分を調製した。1 × PBS buffer で 10 倍希釈した水溶性画分 10 mL を Strep-Tactin Superflow Plus Cartridge を用いて、流速 1 mL/min (Variable Speed Pump I-Low) でカラムに流し、フロースルー画分を得た。このフロースルー画分は再度カラムに流速 1 mL/min で流した。次に NP buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0)を流して洗浄画分を得て、NPD buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Desthiobiotin, pH 8.0)を流して溶出画分を得た。得られた溶出画分 10 mL を Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 30K に入れて 4°C, 4,000 × g, 20 min 遠心して濃縮した。またここで用いた全ての buffer は 4°C に冷却して使用した。

次に濃縮した TET2 の濃度を測定した(Protein Assay BCA strain)。Reagent A と B を 50:1 の割合で混合して調製した Working reagent 200 µL を Sample 25 µL に混合し、60°C, 30 min 反応させて 30 min かけて 25°C に冷やした。その後、反応液 100 µL を 96-well clear microplate にアプライして吸光度を測定した($\lambda = 562$ nm)。

さらに得られた全ての精製画分は SDS-PAGE で解析した。分離ゲル(12%アクリルアミド, 0.37 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.05%過硫酸アンモニウム, 0.05% TEMED)に濃縮ゲル(3.6%アクリルアミド, 0.22 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.001% SDS, 0.05%過硫酸アンモニウム, 0.1% TEMED)を重ね、12% SDS アクリルアミドゲルを作製した。その後、電気泳動槽にセットし、泳動槽の外側に Running Buffer (30 mM Tris, 30 mM BES, 0.1% SDS)で完全に満たし、泳動層内側は Antioxidant mixture (0.05% Sodium thiosulfate pentahydrate, 0.025% N,N-Dimethylfoeamide, 1×Running buffer)で満たした。精製した溶質画分と等量の Loading Buffer (200 µL Tris-base Sample buffer, 0.06 M DTT, 10 µL β-Mercaptoethanol)を混合し、Loading sample を調製した。分子量マーカー(ExcelBand All Blue Broad Range Plus Protein Marker)にも同様に等量の Loading buffer を添加し、Loading marker とした。10 µL Loading Marker と 20 µL Loading sample をウェルにアプライし、電気泳動(40 mA)を行なった。その後、CBB を用いてゲルを染色し、精製画分を解析した。具体的には、ポリアクリルアミドゲルを 200 mL MQ で 5

分間振盪して MQ を取り換える操作を 3 回行なった。20 mL Quick-CBB PLUS を加え、60 min, 30 r.p.m.振盪した。染色液を取り除き 200 mL MQ を加えて 60 min, 30 r.p.m.振盪し、洗浄した。

第 3 項 低メチル化ゲノム DNA の調製

HeLa 細胞(RBRC-RCB0007, RIKEN)を 9 mL の DMEM (10% FBS, 1xpenicillin–streptomycin L-glutamine (PSG))培地と混合して遠心した(1,000 × g, 5 min, 室温)。上清を除去し、新しい DMEM (10% FBS, 1xPSG)培地を加えて混合し、10 cm dish に播種して培養を始めた(5% CO₂, 37°C)。3 日後に dish 内の DMEM 培地を捨て、2 mL TrypLE™ Select を加えて CO₂ インキュベーターで 3 min インキュベートして細胞をはがし、6 mL DMEM (10% FBS, 1xPSG)培地を加えて 20 回程度ピペッティングした。新しい dish に 8 mL DMEM (10% FBS, 1xPSG)培地を加え、そこに細胞溶液 2 mL を混合し、細胞継代した。5 日後、10 cm dish の 100%コンフルエンス細胞に 2 mL TrypLE™ Select を加え、CO₂ インキュベーターで 3 min インキュベートした。その後、8 mL DMEM (10% FBS, 1xPSG)培地を加えて 20 回程度ピペッティングした。回収した HeLa 細胞 1 mL を血球計算盤に加えて、細胞数を測定した。

新しい 10 cm dish に 9 mL DMEM (10% FBS, 1xPSG)培地を加えて 1 mM 5-Aza-2'-deoxycytidine を終濃度が 0, 0.1, 1, 10 μM となるように添加した。5-Aza-2'-deoxycytidine を添加した各種 9 mL DMEM (10% FBS, 1xPSG)培地に 5.0×10⁵ cells の HeLa 細胞を播いて 1 日間培養(5% CO₂, 37°C)することで低メチル化処理を行なった。培養後、新しい DMEM (10% FBS, 1xPSG)培地 10 mL に培地交換し、3 日間培養した(5% CO₂, 37°C)。培養後、細胞を回収し、DNeasy Blood & Tissue Kit を用いてゲノム DNA を抽出した。

抽出したゲノム DNA のメチル化レベルを COBRA 法によって評価した。ゲノム DNA 1 μg に対して EpiTect Bisulfite Kits を用い、バイサルファイト処理を行なった。その後、バイサルファイト処理産物を精製し、産物 250 ng を鋳型に PCR で LINE-1 領域を増幅した。LINE-1 領域の一部を増幅する primer (Table 4-4)を用いて、95°C 5 min 後、95°C 10 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 min を 35 サイクル行なった(250 ng バイサルファイト変換産物, 0.5 μM each primer, 1xEx Taq Buffer, 1 U Ex Taq HS, 0.3 mM dNTP)。目的の領域が増幅されているかを電気泳動で確認後、PCR 産物を精製した(Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System)。その後、制限酵素 TaqI で PCR 産物を切断し、ゲノム DNA のメチル化レベルを評価した。PCR 産物 200 ng に対して 2 U TaqI を添加し、65°C 1 h, 80°C 20 min インキュベートした。制限酵素処理産物を電気泳動で解析した(SuperSep™ Ace, 15%)。泳動結果を画像解析ソフト Image J で解析し、各サンプルの切断割合より、ゲノム DNA のメチル化レベルを算出した。

Table 4-4. Primer sequence

Name	Sequence (5'–3')
Bisulfite forward primer	G(T/C)GTAAGGGGTTAGGGAGTTTTT
Bisulfite reverse primer	AAC(A/G)TAAAACCCTCC(A/G)AACCAAATAT

第 4 項 TET2 を用いたゲノム DNA 全体のメチル化レベル測定法

TET2 による 5mC 酸化反応によって生じたコハク酸量がゲノム DNA 濃度依存的に増加するか検討した。HeLa 細胞より抽出したゲノム DNA 0, 100, 500, 1000 ng それぞれを含む反応液を調製し、5 μ L の TET2 (終濃度 0.7 μ M) を添加し、全量 20 μ L とした(終濃度: 75 μ M Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, 2 mM Ascorbic acid, 1 mM α -ketoglutaric acid, 50 mM HEPES ,pH 8.0)。TET2 添加後、37°C, 1 h インキュベートし、TET2 による酸化反応で生成されたコハク酸量を EnzyChrom™ Succinate Assay Kit を用いて測定した。具体的には、ATP, Phosphoenolpyruvic acid, NADH, Pyruvate kinase, L-lactate dehydrogenase を含む Working reagent を調製し、TET2 反応液 20 μ L に対して 80 μ L Working reagent を添加した。25°C, 30 min インキュベート後、蛍光強度を測定した(Ex/Em=530/585 nm, 37°C)。

TET2 による 5mC 酸化反応によって生じたコハク酸量がゲノム DNA のメチル化レベルに相関するか検討するために、第 3 節 3 項で調製した低メチル化ゲノム DNA (0, 0.1, 1, 10 μ M 5-Aza-2'-deoxycytidine 処理)を用いた。低メチル化ゲノム DNA 100 ng または 500 ng と HEPES buffer (pH 8.0), Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, Ascorbic acid, α -ketoglutaric acid を混合して反応液を調製した。そこに 5 μ L の TET2 (終濃度 0.7 μ M) を添加し、全量 20 μ L とした。TET2 添加後、37°C, 1 h インキュベートし、TET2 による酸化反応で生成されたコハク酸量を EnzyChrom™ Succinate Assay Kit を用いて上記と同様の操作で蛍光強度を測定した。

第4節 実験結果・考察

第1項 TET2 発現ベクターの構築

制限酵素 NdeI と NotI で処理して得られた pET30c と *TET2* をモル比 1 : 1 の割合でライゲーションした。ライゲーション産物を用いて大腸菌 DH5α の形質転換を行ない、形成されたコロニーを LB+Kanamycin 液体培地で培養した。この培養液から抽出したプラスミドのシーケンス解析は MacroGen に委託し、シーケンシング結果より pET30c-*Strep-tag II-TET2* が構築されたことが示された(Fig.4-3, 4-4)。構築された pET30c-*Strep-tag II-TET2* のベクターマップを Fig.4-5 に示す。pET30c-*Strep-tag II-TET2* は RIKEN BRC に寄託した(RDB18377)。

DNA sequence of the codon-optimized *Strep-tag II-TET2*

```
ATG TGGTCCCATCCGCAGTTCGAAAAA GACTTTCCGAGCTGTGCGCTGTGTTGAACAGATCATCG
AGAAAGATGAAGGCCCGTTTACACCCATCTCGGTGCCGGTCCGAATGTTGCGGCTATTCGCGA
AATCATGGAAGAGCGTTTTCGGCCAAAAGGCCAAGCCATCCGCATTGAGCGTGTGATCTATAACC
GGCAAAGAGGGTAAAAGCAGCCAAGGCTGTCCGATTGCCAAGTGGGTAGTACGCCGCTCTTCAT
CGGAAGAGAAACTGCTCTGCTTAGTGCAGCAAAGGGCAGGTCATACGTGCGAAGCAGCCGTTAT
CGTCATTCTGATTCTTGTGTGGGAGGGGATTCCACTGTCTCTGGCGGATAAGCTATATTCGGAG
TTGACCGAGACGTTGCGTAAATACGGCACACTGACGAACCGACGTTGTGCCTTAAACGAAGAAC
GGACGTGTGCATGCCAAGGTCTTGATCCAGAAACCTGTGGCGCGTCCTTCAGTTTTGGATGCTC
TTGGAGCATGTACTATAACGGGTGTAAGTTTGCAGCGTAGTAAGATAACCGCGCAAGTTTAAAGCTG
CTGGGAGATGATCCGAAGGAAGAGGAAAAA CTGAAAAGCCACCTGCAGAATCTGTGACGCTGA
TGGCGCCTACCTATAAGAAAATTAGCGCCGGATGCATACAACAATCAGATCGAGTATGAACACCG
TGCCCCTGAATGCCGCTTAGGCTTGAAAGAAGGCCGTCCGTTTTAGTGGCGTGACCGCGTGCCTC
GACTTCTGCGCACATGCTCACAGAGACCTGCATAACATGCAGAATGGGAGTACCTTAGTGTGTA
CCCTGACCCGCGAAGATAACCGAGAATTTGGGGGCAAACTGAGGATGAACAGCTGCACGTTCT
TCCGCTGTATAAAGTCTCTGACGTGGATGAATTTGGTTTCGGTTGAAGCGCAGGAAGAGAAGAAA
CGTTCGGGTGCCATCCAGGTGCTGTCATCGTTTTCGTTCGCAAAGTCCGGATGCTGGCAGAGCCAG
TGAAAACGTGCAGACAACGCAAATTTGGAGGCCAAAAAGCGGCAGCGGAAAAA ACTGTCAGGGGG
CGGTGGCTCCGGAGGTGGTGGGTCTGGCGGTGGTGGTAGCGATGAAGTCTGGAGTGACTCCGAA
CAATCGTTCTTGGATCCGGACATTGGAGGCGTAGCTGTGGCTCCAACATCATGGCAGCATCCTGA
TTGAGTGCGCCAAACGTGAACTTCATGCGCAACTCCGCTGAAAAATCCGAATCGGAATCATCC
CACTCGTATTAGCCTCGTGTTCATCAGCACAAATCCATGAATGAACCGAAACACGGGTTAGCC
TTGTGGGAAGCAAAAATGGCTGAGAAAAGCGCGCAAAAAGAGGAAGAGTGCAGAAAATATGGCT
AA
```

Fig. 4-3 The codon-optimized DNA sequence of *Strep-tag II-TET2*

DNA sequence encoding *TET2* (RefSeq accession: NM_001127208), which 1129–1936 residue with 1481–1843 replaced by a 15 residue GS-linker, is shown as blue and *Strep-tag II* is highlighted by yellow.

Amino acid sequence of Strep-tag II-TET2

MWSHPQFEKDFPSCRCVEQIIEKDEGPFYTHLGAGPNVAAIREIMEERFGQKGAIRIERVIYT
GKEGKSSQGCP IAKWVRRSSSEEKLLCLVRERAGHTCEAAVIVILILVWEGIPLSLADKLYSE
LTETLRKYGTLNRRRCALNEERTCACQGLDPETCGASFSGCSWSMYNGCKFARSKI PRKFKL
LGDDPKEEEKLESHLQNLSTLMAPTYKKLAPDAYNNQIEYEHRAPCRLGLKEGRPFSGVTACL
DFCAHAHRDLHNMQNGSTLVCTLTREDNREFGGKPEDEQLHVLPLYKVSVDVDFGVSVEAQEEKK
RSGAIQVLSSFRKVRMLAEPVKTCRQRKLEAKKAAAEKLSGGGGSGGGGSGGGGSDEVWSDSE
QSFLDPDIGGVAVAPTHGSILIECAKRELHATTPLKNPNRNHPTRISLVFYQHKS MNPEKHGLA
LWEAKMAEKAREKEEECEKYG

Fig. 4-4 The amino acid sequence of Strep-tag II-TET2

Amino acid sequence encoding TET2 (1129–1936 residue with 1481–1843 replaced by a 15 residue GS-linker) is shown as blue and Strep-tag II is highlighted by yellow.

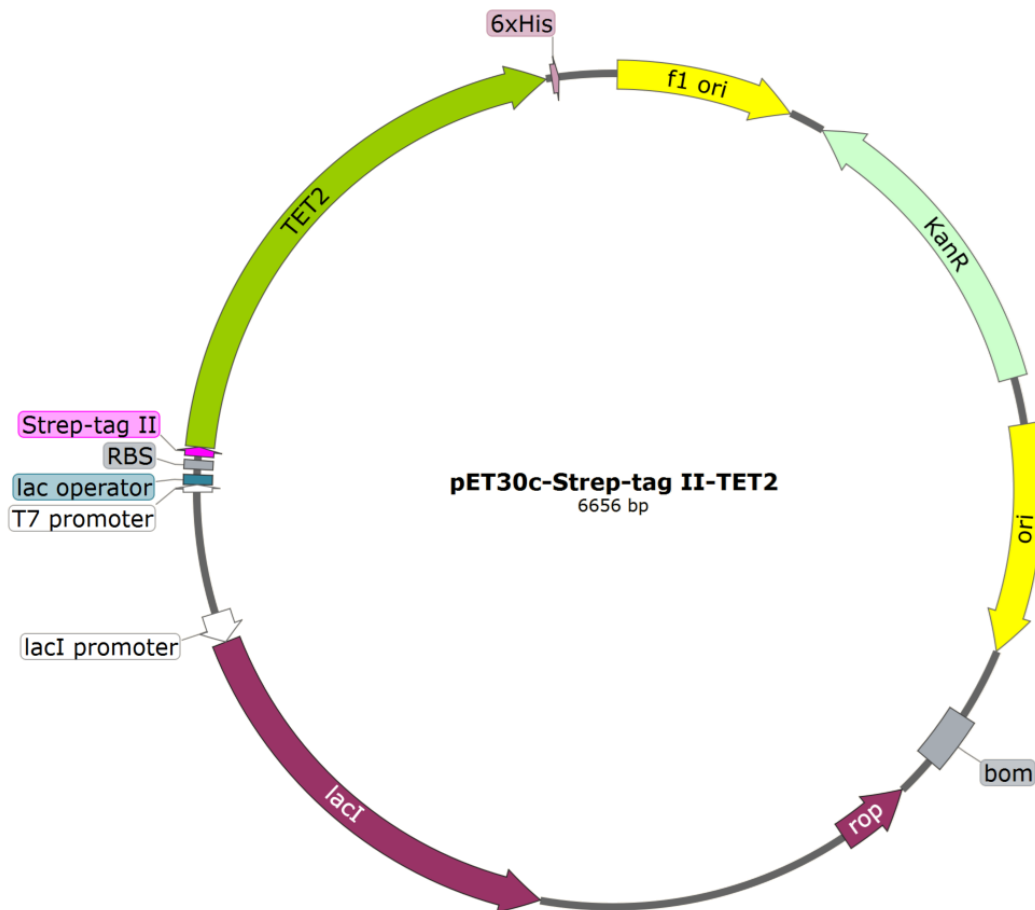


Fig. 4-5 pET30c-Strep-tag II-TET2 vector map

第 2 項 TET2 の組換え生産

pET30c-*Strep-tag II-TET2* を用いて *E. coli* BL21 (DE3) を形質転換させ、TET2 の発現誘導を行った。OD₆₀₀ 値 0.8 付近で終濃度 0.5 mM となるように IPTG を添加してタンパク質発現を誘導した。培養して得られた湿菌体 1 g を Bug Buster Regent を用いて菌体を破碎し、水溶性画分を調製した。TET2 には精製タグとして Strep-tag II を融合してあるため、水溶性画分より、Strep-tag II を利用して TET2 の精製を行なった。精製画分として、通過画分、洗浄画分及び溶出画分を回収し、得られた溶出画分 10 mL を Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 30K で濃縮した。その後、精製画分を SDS-PAGE で解析した。その結果、濃縮した溶出画分で目的の位置付近(52 kDa)にバンドが示された(Fig. 4-6)。SDS-PAGE の結果から画像解析ソフト Image J によってバンド強度を測定し、TET2 の精製度を算出した。その結果、Enriched elution fraction 中の TET2 の精製度は 51%であり、Enriched elution fraction 中の TET2 濃度は 99.1 ng/μL であることが示された。この TET2 に DTT と Glycerol を混合し、-80°C で保存した(終濃度 49.5 ng/μL TET2, 5 mM DTT, 50% Glycerol)。TET2 発現誘導は 150 mL の LB 培地で実施し、この培養液から 1 g の湿菌体を回収できた。この湿菌体 1 g を破碎し、TET2 の精製に用いたところ 19.8 μg の TET2 が得られたため、培地当たりの TET2 の収量は 0.13 mg/L であることが示された。

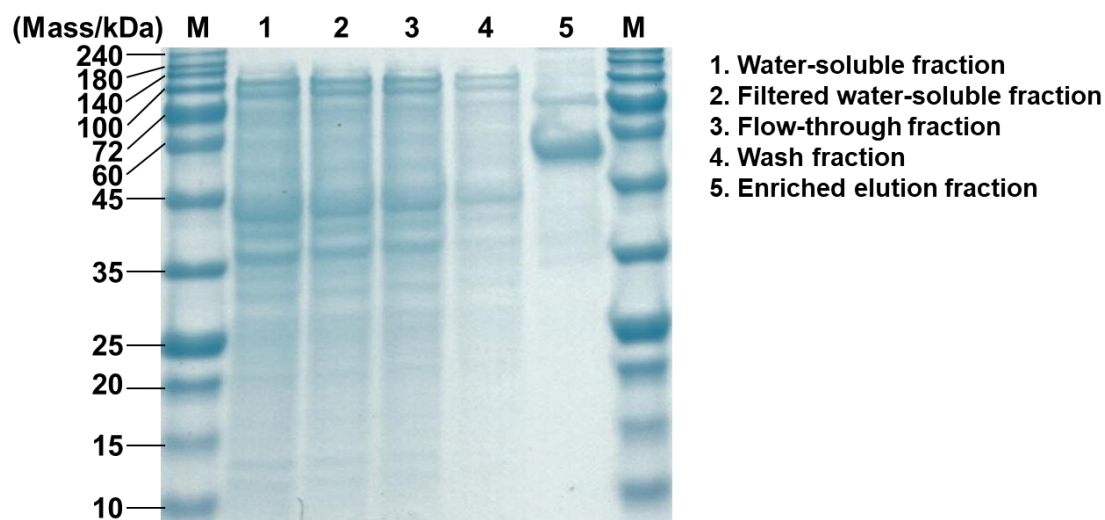


Fig. 4-6 SDS-PAGE analysis of purified TET2 (MW: 5.2×10^4)

第3項 低メチル化ゲノム DNA の調製

5-Aza-2'-deoxycytidine 濃度 0, 0.1, 1, 10 μM で処理した HeLa 細胞より、ゲノム DNA を抽出した。これらのゲノム DNA に対して COBRA 法によってメチル化レベルを評価した。ゲノム DNA をバイサルファイト処理し、LINE-1 領域を増幅するプライマーを用いて PCR をかけた。PCR 産物を Taq^{qI} で切断し、電気泳動で解析した(Fig.4-7)。泳動結果より、Taq^{qI} 処理産物は 80 bp と 160 bp 付近に 2 つのバンドが確認され、Taq^{qI} によってメチル化 CpG が切断されたことが示された。画像解析ソフト Image J で 80 bp と 160 bp 付近の 2 つのバンド強度を測定し、80 bp のバンド強度/(80 bp のバンド強度+160 bp のバンド強度) \times 100 の計算を行い、メチル化レベルを算出した(Table 4-5)。その結果、5-Aza-2'-deoxycytidine 0, 0.1, 1, 10 μM で処理した HeLa 細胞のゲノム DNA のメチル化レベルはそれぞれ、67.2%, 45.4%, 37.9%, 31.8%であった。従って、5-Aza-2'-deoxycytidine 濃度依存的にメチル化レベルが低下したことが明らかとなった。LINE-1 領域のメチル化レベルはゲノム DNA 全体のメチル化レベルと相関するため^{33,34}、5-Aza-2'-deoxycytidine 濃度依存的にゲノム DNA 全体のメチル化レベルが低下したゲノム DNA を調製できたことが示された。

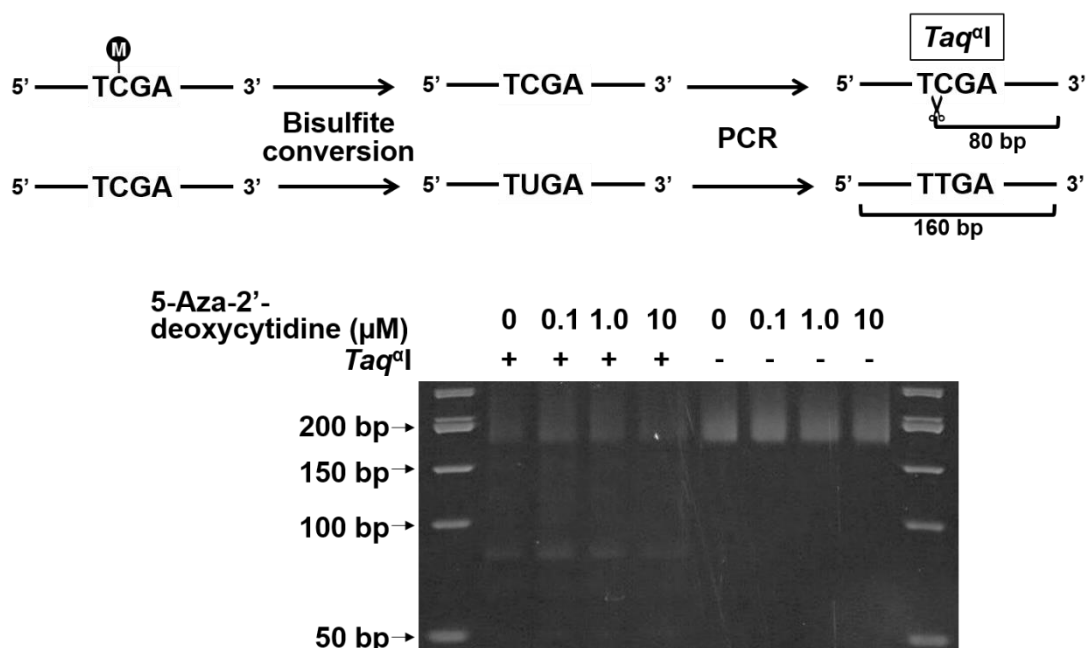


Fig. 4-7 Global DNA methylation analysis by COBRA

Table 4-5. Global DNA methylation levels of the hypomethylated genomic DNA

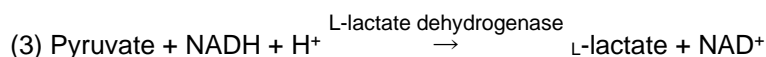
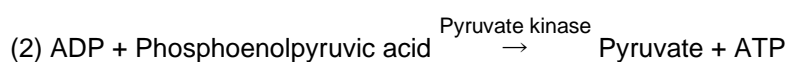
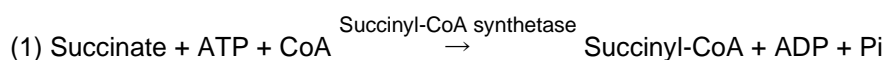
5-Aza-2'-deoxycytidine (μM)	0	0.1	1	10
Average (%)	67.2 \pm 5.7	45.4 \pm 1.9	37.9 \pm 3.1	31.8 \pm 5.5

(n = 3, mean \pm SD)

第 4 項 TET2 を用いたゲノム DNA 全体のメチル化レベル測定法

4-1. ゲノム DNA 至適濃度の検討

TET2 による 5mC 酸化反応によって生じたコハク酸量がゲノム DNA の濃度依存的に増加するか検討するために、TET2 の 5mC 酸化反応によって生じたコハク酸量を EnzyChrom™ Succinate Assay Kit により定量した。このコハク酸定量法は、コハク酸が含まれた溶液に Working reagent を添加し、反応させた後に生じる蛍光強度を指標にコハク酸量を定量する方法である。上記のコハク酸定量キットは内容物の詳細な記載はされていないが、Michal らのコハク酸定量法の報告¹⁷⁰を引用すると、以下の酵素反応が生じていると推測される。



上記の酵素反応によって生じた NAD⁺の量を蛍光(Ex/Em=530/585 nm)で測定することにより評価していると推測される。つまり、生じたコハク酸量は蛍光強度に依存する。バックグラウンド蛍光を差し引くために、測定した全てのサンプルの蛍光強度は、TET2 と Working reagent のみの反応液(ゲノム DNA 非存在下)の蛍光強度を差し引いた。

TET2 の 5mC 酸化反応によって生じたコハク酸量がゲノム DNA の濃度依存的に増加するか検討するため、ゲノム DNA 量を 0, 100, 500, 1000 ng として TET2 で処理した。その後、EnzyChrom™ Succinate Assay Kit を用いてコハク酸量を定量した結果、ゲノム DNA 濃度依存的に蛍光強度が増加した(Fig.4-8)。故に、TET2 による 5mC 酸化反応によって生じたコハク酸量は本手法で定量可能であることが示された。さらにこの結果から、検出限界を求めたところ、2.23 ng/μL (44.6 ng)であった。以上より、本手法を用いて最小 45 ng のゲノム DNA 中のメチルシトシンを検出できることが示唆された。

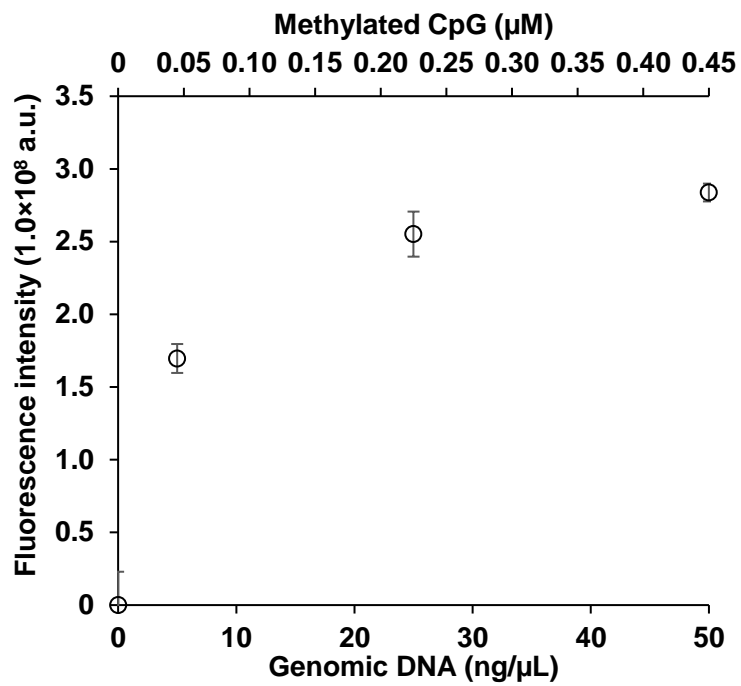


Fig. 4-8 Detection of succinate produced by TET2-mediated oxidation of 5mC on genomic DNA
 Genomic DNA 0, 5, 25, 50 ng/μL seems to contain 0, 0.04, 0.22, 0.45 μM methylated CpG. All experiments were performed in triplicate (mean ± SD).

4-2. ゲノム DNA 全体のメチル化レベルの測定

低メチル化ゲノム DNA は HeLa 細胞を各種濃度のメチル化阻害剤 5-Aza-2'-deoxycytidine で処理することによって調製した。この 5-Aza-2'-deoxycytidine 処理細胞から抽出したゲノム DNA のメチル化レベルは COBRA 法で評価した(第 4 節 3 項, Fig.4-7)。その結果、ゲノム DNA 全体のメチル化レベルがそれぞれ 67.2%, 45.4%, 37.9%, 31.8%のゲノム DNA を調製することが出来た(第 4 節 3 項, Table 4-5)。

COBRA 法で評価したメチル化レベル 67.2%, 45.4%, 37.9%, 31.8%のゲノム DNA を用いて、TET2 による 5mC 酸化反応によって生じたコハク酸量がゲノム DNA 全体のメチル化レベル依存的に増加するか検討した。まずゲノム DNA 量 500 ng に対して TET2 を反応させ、生じたコハク酸量は EnzyChrom™ Succinate Assay Kit を用いて生じた蛍光強度を指標に定量した(Fig.4-9)。その結果、ゲノム DNA 全体のメチル化レベルと蛍光強度に高い相関性があった($R^2 = 0.98$)。この時の R.S.D はメチル化レベル 67.2%, 45.4%, 37.9%, 31.8%で、それぞれ 1.70%, 2.92%, 4.74%, 4.23%であった。さらに、ゲノム DNA 量 100 ng に対しても同様に検討した結果(Fig.4-9)、同様に高い相関性があり($R^2 = 0.98$)、R.S.D はメチル化レベル 67.2%, 45.4%, 37.9%, 31.8%で、それぞれ 6.67%, 3.88%, 20.7%, 37.4%であった。以上の結果より、TET2 による 5mC 酸化反応によって生じたコハク酸量を定量することにより、最小 100 ng のゲノム DNA 量でゲノム DNA 全体のメチル化レベルを測定できることが示された。各種メチル化レベルにおける蛍光強度間で有意差が示されたため($p < 0.05$)、本手法では 20%の最小メチル化レベルを定量できると考えられる。

ヒト正常細胞のゲノム DNA における CpG サイトは通常約 70–80%がメチル化されている^{165,166}。本手法により、ゲノム DNA 全体のメチル化レベルを、TET2 を用いて測定した結果から得られた近似曲線を用いて(Fig. 4-9)、ゲノム DNA のメチル化レベル 80%とした時の蛍光強度を算出すると、ゲノム DNA 100 ng の時が 1.4×10^8 a.u.、500 ng の時が 3.2×10^8 a.u.と推測される。以上のようにヒト正常細胞のゲノム DNA のメチル化レベルも本手法を用いて測定可能であることが示唆された。

本手法は全て HeLa 細胞から抽出したゲノム DNA に対して実施した。HeLa 細胞のゲノム DNA 中のヒドロキシメチル化レベルは約 0.025%以下であることが報告されており⁵⁹、さらにヒト胎児腎細胞である HEK293 細胞やマウス体細胞における 5hmC や 5fC, 5caC の存在量は、5mC がナノモルレベルで存在しているのに対し、5hmC がピコモルレベル、5fC, 5caC に至っては数十フェムトモル以下しか存在していない^{14,164}。全シトシン中の割合で示すと 5hmC や 5fC, 5caC の存在量はそれぞれ、5hmC は約 0.1–1%、5fC, 5caC は約 0.0002%以下である。従って、今回 TET2 の酸化反応で生じたコハク酸は、ほぼ全てが 5mC を酸化して生じたコハク酸であると考えられる。

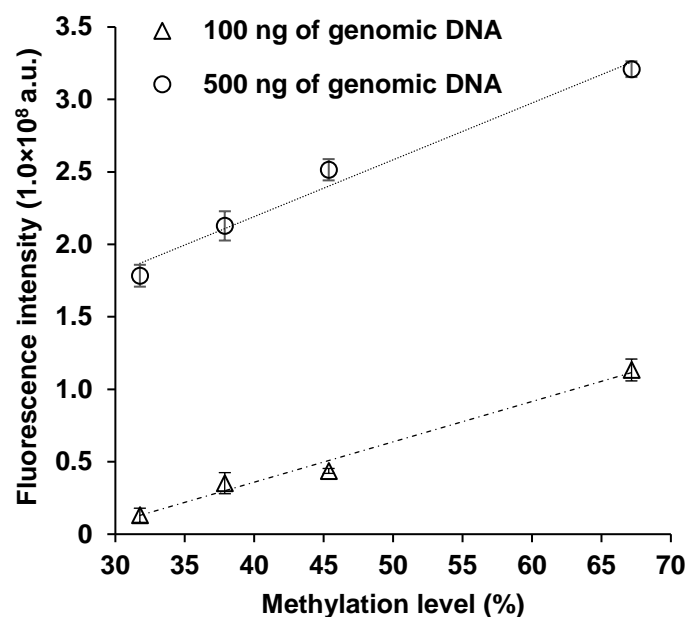


Fig. 4-9 Quantification of global DNA methylation levels using TET2-mediated 5mC oxidation

The amount of succinate produced by TET2-mediated 5mC oxidation in 500 ng (circle) or 100 ng of genomic DNA (triangle). All experiments were performed in triplicate (mean \pm SD). The line shows the best-fit linear regression ($R^2 = 0.98$ for the both results). The genomic DNA extracted from 0, 0.1, 1, 10 μ M 5-Aza-2'-deoxycytidine treated HeLa cells have the methylation levels of 67.2%, 45.4%, 37.9%, 31.8%, respectively (Table 4-5). The genomic DNA 100 ng, which has 67.2%, 45.4%, 37.9%, 31.8% methylation levels, contain 0.90, 0.61, 0.51, 0.42 pmol of methylated CpG in 20 μ L volume. Meanwhile, 500 ng of hypomethylated genomic DNA contains 4.5, 3.0, 2.5, 2.1 pmol of methylated CpG in 20 μ L volume.

第 6 節 結言

第 4 章ではメチルトシチン酸化酵素である TET の触媒反応を利用し、従来法よりも簡便な実験ステップでゲノム DNA 全体のメチル化レベルを測定する方法を開発することを目的とした。

本手法で使用する TET2 は大腸菌を用いて組換え生産し、Strep-tag II/Strep-Tactin system を利用して精製した。形質転換した大腸菌 690 mg を破碎して水溶性画分を調製し、精製に用いた結果、49.5 ng/ μ L の TET2 が 150 μ L 得られた。この TET2 を用いてゲノム DNA を処理し、コハク酸量を定量した結果、ゲノム DNA 濃度依存的にコハク酸量が増加して示された。さらに、ゲノム DNA のメチル化レベル依存的にも、TET2 の 5mC 酸化反応で生じたコハク酸量は増加して示された。

以上の結果より、本章では、TET2 の 5mC 酸化反応で生じたコハク酸量を定量することでゲノム DNA 全体のメチル化レベルを最小 45 ng で測定できることが示された。

第 5 章

結論

第 5 章 結論

本研究によって DNA メチル化、ヘミメチル化、およびヒドロキシメチル化レベルを簡便・迅速に測定する方法を開発した。

第 1 章では、ヒト生体内における修飾シトシン塩基やがんなどの疾病における異常なシトシン修飾について説明し、既存のメチル化、ヘミメチル化、ヒドロキシメチル化レベル測定法についてまとめ、本研究の意義を明らかにした。正常細胞と比較したゲノム DNA 全体の異常な低メチル化は、様々な組織のがんや中枢神経系疾患に見られ、がんの場合はステージが上がるほどゲノム DNA 全体のメチル化レベルは低下していく。中枢神経系疾患であるアルツハイマー病やパーキンソン病についてもゲノム DNA 全体のメチル化レベルは低下している。がん細胞や中枢神経系疾患細胞で異常が生じているのはメチル化レベルのみではなく、ヘミメチル化レベルは卵巣がんや Wilm's 腫瘍で高く、ヒドロキシメチル化レベルはがん細胞と中枢神経系疾患とともに低下している。そのため、これらの修飾シトシン塩基のゲノム DNA 全体のレベルを測定することは、がんや中枢神経系疾患を診断する上で重要である。これまで開発された DNA メチル化レベル測定法としては、バイサルファイト法や HPLC 法、LC-MS/MS 法、ELISA 法などが挙げられる。しかし、バイサルファイト法や HPLC 法、LC-MS/MS 法は、煩雑な化学処理や酵素処理が必要で、5 時間以上の大幅な測定時間を要する。ELISA 法は抗 5mC 抗体を利用する方法で、抗体の 5mC への特異性は非常に高いが、複数回の洗浄操作を必要とし、簡便にゲノム DNA のメチル化レベルを測定することは難しい。DNA ヘミメチル化レベル測定法としては、Hairpin-bisulfite PCR 法が開発されている。しかし、この方法もバイサルファイト処理を必要とするため、高精度で測定可能だが、複数の実験ステップを必要とし、測定を終えるまでに大幅な時間を要する。DNA ヒドロキシメチル化レベルを測定するには、メチル化レベル測定法であるバイサルファイト法を用いることは出来ない。それはバイサルファイト処理によって未修飾シトシンはウラシルに変換されてしまうが、5mC と 5hmC は変換されないため、5mC と区別をつけられないからである。さらに、ヒドロキシメチル化レベル測定法として 5hmC のグリコシル化反応を利用する方法が開発されている。しかし、この 5hmC のグリコシル化の後に、TET 処理や Bisulfite 処理、シーケンス解析を実施するため、実験ステップが複数回に及び、測定時間も 4 時間以上要する。以上のことから、修飾シトシン塩基レベルを測定するには、煩雑な操作や大幅な測定時間を必要としない簡便・迅速な測定法が必要とされる。

第 2 章では、UHRF1 SRA-Fluc を用いた DNA ヘミメチル化レベル簡易測定法を開発した。ヘミメチル化 CpG 結合蛋白質 UHRF1 SRA に Luciferase を融合させた UHRF1 SRA-Fluc 融合蛋白質を用いて、BRET を利用してヘミメチル化レベルを測定した。大腸菌を用いて組換え生産した UHRF1 SRA-Fluc は、Luciferase の発光活性とヘミメチル化 DNA 結合活性の両方を保持し

ていることが確認された。非メチル化、ヘミメチル化及びメチル化 DNA に対して、BRET を用いた本手法を実施した結果、非メチル化、メチル化 DNA と比較して約 1.3 倍の BRET シグナルがヘミメチル化 DNA 存在下で示された。さらに、ヘミメチル化レベル 0, 20, 50, 100% の DNA に対して本手法を検討した結果、ヘミメチル化レベル依存的に BRET シグナルが増加した ($R^2 = 0.99$)。この時の相対標準偏差 R.S.D. は 3.11% 以下であった。Hairpin-bisulfite PCR 法の R.S.D. は 7.2% 以下であることから¹⁴⁶、UHRF1 SRA-Fluc を用いた本手法は既存法と同程度の正確性でヘミメチル化レベルを測定できることが示唆された (Table 5-1)。しかし、正常細胞とがん細胞を比較した際のヘミメチル化レベルの差は最小 1.2% であり^{11,12}、この差を測定できることが、がん診断への応用につながる。ヘミメチル化レベル 1.2% の差を測定するためには、UHRF1 SRA のヘミメチル化 DNA への特異性を上げる必要がある。本手法では、UHRF1 の SRA domain (414–617 residue) を利用したが、SRA の C 末端側に位置する Spacer 領域を付加することによって、ヘミメチル化 DNA への結合性が上昇することが報告されている⁷⁰。そのため、UHRF1 SRA-Spacer-luciferase 融合蛋白質を作製することにより、より高い BRET 効率を得られると考えられる。さらに、第 3 章では UHRF2 SRA-Fluc のメチル化 CpG への結合を阻害するために MBD を添加したが、UHRF1 SRA-Fluc を用いたヘミメチル化レベル測定法においても、MBD を添加することでヘミメチル化レベルをより高感度に測定することが可能になると考えられる。加えて、本手法において BOBO-3 添加後のインキュベーション時間を 30 分と設定しているが、Ruedas-Rama らの研究で、BOBO-3 は 2 本鎖 DNA と 10 分で完全に結合することを示している¹⁵⁷。故に、本手法においてもインキュベーション時間の縮小が見込まれ、より短時間での測定が期待される。

第 3 章では、UHRF2 SRA-Fluc を用いた DNA ヒドロキシメチル化レベル簡易測定法を開発した。UHRF2 SRA-Fluc は大腸菌を用いて組換え生産し、ヒドロキシメチル化 DNA に対する結合能解析をした結果、UHRF2 SRA-Fluc が Luciferase の発光活性とヒドロキシメチル化 CpG 結合活性を保持していることが示された。しかし、UHRF2 SRA-Fluc はメチル化 DNA にも結合しており、ヒドロキシメチル化 CpG とメチル化 CpG の両方が DNA に存在した場合、正確なヒドロキシメチル化レベルを測定することは出来ない。そこで、メチル化 CpG 結合蛋白質である MBD を添加することによって、DNA 中のメチル化 CpG を予めブロックングすることにした。DNA が固定化されたプレートに MBD を添加して洗浄後に、UHRF2 SRA-Fluc を添加して各種 dsDNA に対して結合能解析を行なった。その結果、20 pmol の MBD を添加することによってメチル化 DNA 存在下における UHRF2 SRA-Fluc の発光強度は非メチル化 DNA と同程度まで低下した。そこで、BRET assay においても MBD を混合し、ヒドロキシメチル化レベルを測定した。ヒドロキシメチル化レベルを 0, 20, 50, 100% となるようにメチル化 DNA とヒドロキシメチル化 DNA を混合した DNA 溶液に対して MBD と UHRF2 SRA-Fluc を用いて BRET assay を実施した。その結果、ヒドロキシメチル化レベルが上昇すると共に BRET シグナルも増加して示された。この時の R.S.D. は 0.40–1.9% であった。さらにゲノム DNA におけるヒドロキシメチ

ル化レベルを測定できるのか検討するために、ヒドロキシメチル化レベルの高いゲノム DNA を TET2 の酸化反応を用いて作製した。TET2 で処理することによってヒドロキシメチル化レベル約 43.7% のゲノム DNA を作製できたと考えられ、この TET2 処理ゲノム DNA と通常の HeLa ゲノム DNA を混合比 0:1, 3:7, 6:4, 1:0 となるように混ぜ合わせ、これらのゲノム DNA 溶液を対象に BRET assay を実施した。その結果、TET2 処理ゲノム DNA 量依存的に BRET シグナルが増加した。この時の R.S.D は 0.76–2.27% であった。この TET2 処理ゲノム DNA を用いて本手法の検出限界を検討したところ、最小 75 ng のゲノム DNA のヒドロキシメチル化レベルを測定できることが示唆された。以上より、本章では UHRF2 SRA-Fluc を用いることで簡便にヒドロキシメチル化レベルを測定できることが示された (Table 5-2)。

第 4 章では、TET2 の 5mC 酸化反応を利用したゲノム DNA 全体のメチル化レベル測定法を開発した。本手法開発のために、TET2 は大腸菌を用いて組換え生産した。ゲノム DNA 500 ng と 100 ng に対して TET2 を反応させ、この反応過程で生じたコハク酸量を定量した結果、どちらのゲノム DNA 量においても、ゲノム DNA のメチル化レベル依存的にコハク酸量が増加した ($R^2 = 0.98$)。この時の R.S.D は、ゲノム DNA 量が 500 ng の時は 1.6–4.7%、ゲノム DNA 量が 100 ng の時は 3.9–37% であった。本手法は 100 ng のゲノム DNA を対象にメチル化レベルを解析することが可能であり、これは洗浄操作が不要な検出法の中では最も高感度な方法であることが示された (Table 5-3)。MBD のメチル化 CpG に対する K_d は 5 nM で⁶⁶、TET2 のメチル化 CpG に対する K_m は 480 nM (k_{cat} 2.12 $\times 10^{-3}$ /sec) である¹⁶¹。MBD-Fluc を用いた BRET assay では測定に 2.2 μ g のゲノム DNA (200 nM のメチル化 CpG) を使用し¹⁴³、MBD の K_d の 40 倍量のメチル化 CpG が必要であった。つまり、BRET を検出するには DNA 結合蛋白質の K_d の 40 倍以上の濃度の標的 CpG が必要である。一方で今回、0.7 μ M TET2 を用いて 100 ng のゲノム DNA (45 nM のメチル化 CpG) を検出し、 K_m よりも約 10 倍低い濃度のメチル化 CpG を検出できた。TET2 のメチル化 CpG に対する K_m , k_{cat} から反応初速度 V_0 を算出すると 0.14 nM/sec で、本研究では 1 時間反応させたため、仮に V_0 のまま反応を終了したとすると約 500 nM のメチル化 CpG を反応させることが出来ると推定される。100 ng のゲノム DNA 中のメチル化 CpG は 45 nM であるため、計算上は 1 時間の TET2 反応で全てのメチル化 CpG を酸化できていると考えられる。コハク酸定量キットを用いれば反応で生じたコハク酸を定量できるため、TET2 を用いることで BRET assay よりも高感度にメチル化レベルを測定できたと考えられる。

ヒト正常細胞のゲノム DNA における CpG サイトは通常約 70–80% がメチル化されている^{165,166}。ゲノム DNA のメチル化レベルを、本手法を用いて測定した結果から得られた近似曲線を用いて、メチル化レベル 80% とした時の蛍光強度を算出すると、ゲノム DNA 100 ng の時が 1.4 $\times 10^8$ a.u.、500 ng の時が 3.2 $\times 10^8$ a.u. と推測される。つまり、ヒト正常細胞のゲノム DNA のメチル化レベルにおいても本手法を用いて測定可能であることが示唆された。2018 年に Xu らは、酸素センサーを用いて TET2 の酵素反応速度解析を実施した⁵⁴。この報告によると、TET2 の酵素反応における酸素消費量は 10 min で飽和したことが示された。このことより、本

研究においても TET2 とゲノム DNA との反応時間を 10 min に短縮でき、より短時間での簡便なアッセイが期待できる。以上より、本章では TET の 5mC 酸化反応で生じたコハク酸量を定量することでゲノム DNA 全体のメチル化レベルを簡易かつ高感度に測定できることが示された。

本研究で開発したメチル化、ヘミメチル化およびヒドロキシメチル化レベル簡易測定法はいずれもバイサルファイト処理などの化学処理を必要としない、試薬を混合するのみで測定可能な方法である(Fig.5-1)。BRET を利用したヘミメチル化レベル測定法とヒドロキシメチル化レベル測定法は、修飾塩基に結合する蛋白質に Luciferase を融合させた蛋白質を用いる方法であり、結合蛋白質を変えることにより、その修飾塩基を同一のプラットフォームで測定できる。つまり、本研究室で開発されたメチル化 CpG 結合する MBD-Fluc と非メチル化 CpG に結合する CXXC-Fluc を用いたメチル化レベル測定法に、本研究で開発した UHRF1 SRA-Fluc と UHRF2 SRA-Fluc を組み合わせることで、種々の修飾塩基を同時に測定することができる。

さらに、TET を用いた高感度なメチル化レベル測定法は、TET2 の 5mC 酸化反応を利用することにより、ゲノム DNA 100 ng でメチル化レベルを簡便・高感度に測定できた。DNA ヘミメチル化レベルやヒドロキシメチル化レベルも酵素反応を利用することで、より少量の DNA に対してアッセイ可能であると考えられる。ヒト生体内では、ヘミメチル化 DNA はメチル化維持酵素 DNMT1 によって未修飾シトシンがメチル化される。DNMT1 は SAM (S-adenosylmethionine) からメチル基をシトシンの 5 位炭素に転移する反応を触媒する酵素で、この酵素反応過程で SAM は SAH (S-adenosylhomocysteine) に変換される。そのため、ヘミメチル化 DNA と DNMT1 を反応させて生じる SAH 量はヘミメチル化レベルに依存すると考えられる。ファージのグリコシルトランスフェラーゼである T4-BGT (T4 Phage β -glucosyltransferase) は、5hmC を 5ghmC (5-glucosylhydroxymethylcytosine) にグリコシル化する反応を触媒する。この反応過程で UDP-Glu (uridine diphosphate glucose) は UDP に変換される。従って、ヒドロキシメチル化 DNA と T4-BGT を反応させて生じる UDP 量は、ヒドロキシメチル化レベルに依存すると想定される。以上のように、修飾塩基を基質として反応を触媒する酵素が存在すれば、修飾塩基レベルを高感度に測定することが可能になる。

本研究で開発した手法は将来的に血中 cfDNA を標的に実施可能であると考えられる。健常者とがん患者の血漿中の cfDNA 濃度はそれぞれ約 1 ng/ μ L、約 1.5 ng/ μ L であり¹⁶³、本手法の検出限界はそれぞれ、ヘミメチル化レベル測定法は 15 ng/ μ L、ヒドロキシメチル化レベル測定法は 0.75 ng/ μ L、メチル化レベル測定法は 0.45 ng/ μ L であった。故に、ヒドロキシメチル化レベル測定法とメチル化レベル測定法は cfDNA を対象に測定可能である。UHRF1 SRA-Fluc を用いたヘミメチル化レベル測定法は血漿中 cfDNA 濃度に検出限界が満たないため、このままでは適用できないが、UHRF1 SRA-Fluc のヘミメチル化 CpG への特異性を上げることで検出可能になると想定される。上記した SRA の下流に Spacer 配列を付加した UHRF1 SRA-Spacer-Fluc を作製することで、ヘミメチル化 CpG への特異性を上げ、cfDNA 中のヘミメチル化 CpG も検出可能になるのではないかと考えられる。

従来よりも簡便・迅速にゲノム DNA のヘミメチル化、ヒドロキシメチル化、メチル化レベルが測定することが出来れば生体内のシトシン修飾の機能解明に貢献すると期待される。生体内のヘミメチル化 CpG は活発な DNA 脱メチル化の過程で一部のメチル化 CpG の片鎖のみが脱メチル化されることによって生じると考えられている¹⁰⁰。DNMT1 と UHRF1 はがん細胞でゲノム全体の低メチル化が生じる際、過剰発現していることがわかっており¹⁰²、さらに腫瘍形成の過程では UHRF1 は *de novo* メチル化に関与することも報告されている¹⁰¹。つまり、がん細胞で UHRF1 が過剰発現していること、また腫瘍形成の過程では UHRF1 が *de novo* メチル化を誘導することによってがん抑制遺伝子の発現を抑制しているのではないかと考えられ、UHRF1 が認識するヘミメチル化 CpG は腫瘍形成時に多く生じるのではないかと推測される。しかし、これまでゲノム DNA 中のヘミメチル化 CpG は WGBS や Hairpin-bisulfite PCR によって解析されてきたが、がんなどの疾患とヘミメチル化 DNA の関連性を示す知見は乏しい。このヘミメチル化レベルを簡便・迅速に測定できれば、がん細胞におけるゲノム全体の活発な脱メチル化とヘミメチル化 CpG との関連やメチル化異常の解明に寄与すると考えられる。海馬におけるヒドロキシメチル化レベルの低下はマウスの空間的な記憶能力や記憶保持能力の低下に関与することが明らかにされている¹¹⁴⁻¹¹⁶。つまり、脳におけるヒドロキシメチルシトシンの低下は記憶力の低下を誘導すると考えられ、このことは AD や PD 患者の脳細胞ではヒドロキシメチル化レベルが低下することと関連するのではないかと推測される。さらに活性酸素種による DNA 酸化損傷で生じる 8oxoG が形成されると近傍の 5mC の酸化が誘導されることが報告されている⁴⁰。他の組織と比較すると脳は消費する酸素量が多く¹⁷¹、活性酸素種も多く存在すると考えられる。そのため、この DNA 酸化損傷とヒドロキシメチル化レベルには相関性があるのではないかと推測される。このヒドロキシメチル化レベルを簡便・迅速に測定できれば、生活習慣病やストレス、老化などによる神経細胞への損傷度やそれに伴う記憶障害の制御機構を解明することに貢献するはずである。

以上より、修飾塩基に結合する蛋白質に Luciferase を融合させた蛋白質を用いれば複数の修飾塩基の同時に、修飾塩基に反応する酵素を用いれば標的修飾塩基を高感度に測定でき、これらの方法により正確な疾病の診断が可能になるだけでなく、これら修飾シトシン塩基の生理学的意義をより解明することに貢献すると期待される。

Table.5-1 Comparison of this assay with different methods for the detection of DNA hemi-methylation

Method	Input of genomic DNA (Hemi-methylated CpG)	Time	R.S.D. (%)	Reference
WGBS	5 µg (1.2 pmol*)	>24 h	N.D.	36
nasChIP-seq	N.D.	>13 h	N.D.	35
Hairpin-bisulfite PCR	2 µg (0.48 pmol*)	>3.5 h	<7.2	146
This BRET assay using UHRF1 SRA-Fluc	1.5 µg (20 pmol)	35 min	1.5–3.3%	

N.D.: Not determined

* The amount of hemi-methylated CpG was speculated when hemi-methylation level of genomic DNA is 1.8%^{11,12}.

Table.5-2 Comparison of this assay with different methods for the detection of DNA hydroxymethylation

Method	Input of genomic DNA	Time	R.S.D. (%)	Reference
Liquid chromatography	20 µg (0.27 pmol*)	>3 h	N.D.	14,149
TAB-seq	3 µg (0.04 pmol*)	>3 days	N.D.	150
ACE-seq	1–50 ng (0.0007 pmol*)	4 h	N.D.	151
hMe-Seal	30 µg (0.40 pmol*)	>5 h	N.D.	152
oxBS-seq	1 µg (0.01 pmol*)	>6 h	N.D.	153
ECL	0.2 ng (0.000003 pmol*)	15 h	N.D.	154
ELISA	20 ng (0.0003 pmol*)	5 h	N.D.	155,156
This BRET assay using UHRF2 SRA-Fluc	2.2 µg (13 pmol**)	35 min	0.76–2.27%	

N.D.: Not determined

* The amount of hydroxymethylated CpG was speculated when hydroxymethylation level of genomic DNA is 0.1%.

** It supposed that TET2-treated genomic DNA contain hydroxymethylation level of 43.7%.

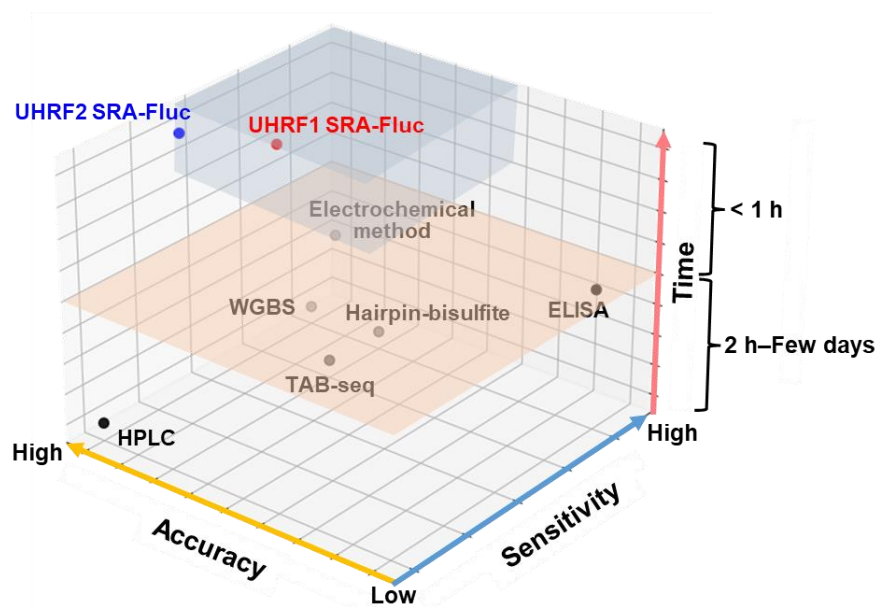
Table.5-3 Comparison of this assay with different methods for the detection of DNA methylation

Method	Input of genomic DNA	Time	R.S.D. (%)	Reference	
Bisulfite method	RRBS	0.01–0.3 µg (2.7 pmol*)	>24 h	N.D.	121
	WGBS	5 µg (45 pmol*)	>24 h	N.D.	122
	COBRA	1.5 µg (13 pmol*)	>16 h	<2.0	145
Liquid chromatography	3 µg (27 pmol*)	>3 h	<3.0	124	
Electrochemical analysis	5 µg (45 pmol*)	45 min	<4.0	128	
MeDIP-seq	4 µg (36 pmol*)	>4 h	N.D.	129	
MBDCap-seq	1 µg (9.0 pmol*)	>4 h	N.D.	130	
SPR	0.0002 µg (0.0018 pmol*)	45 min	<7.0	132	
ELISA	0.01 µg (0.090 pmol*)	>2 h	<1.5	134	
Methyl acceptance assay	0.2 µg (1.8 pmol*)	>1 h	<5.9	139	
Zinc finger-GDH	3 µg (27 pmol*)	>1.5 h	<1.0	140	
Zinc finger-luciferase	3 µg (27 pmol*)	>1.5 h	N.D.	141	
Split-luciferase	0.02 µg (0.18 pmol*)	>12 h	<10	142	
BRET assay	2.2 µg (20 pmol*)	35 min	<2.2	144	
This assay using TET2	0.1 µg (0.90 pmol*)	1.5 h	3.9–37%		
	0.5 µg (4.5 pmol*)		1.7–4.7%		

N.D.: Not determined

* The amount of methylated CpG was speculated when methylation level of genomic DNA is 67.2%.

(A) Methods for the detection of DNA hemi-methylation and hydroxymethylation



(B) Methods for the detection of DNA methylation

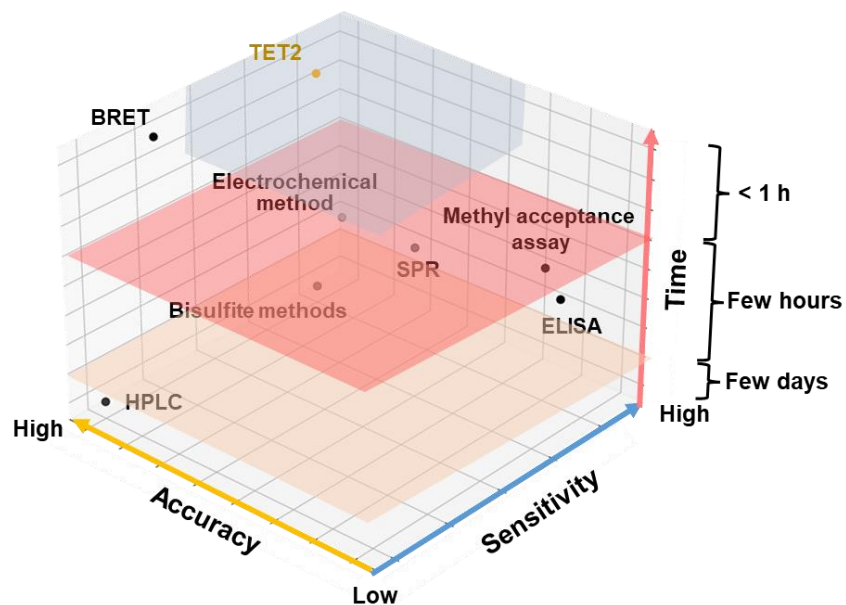


Fig.5-1 Development area in 5mC and 5hmC detection

著書目録

第 2 章を構成する著書

【学術論文】

Natsumi Taka, Isao Karube, Wataru Yoshida; Direct Detection of Hemi-methylated DNA by SRA-fused Luciferase Based on Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Analytical Letters*, 2019, 52(8), 1258–1267.

【書籍】

Natsumi Taka, Yuji Baba, Yuka Iwasaki, Wataru Yoshida; Bioluminescence resonance energy transfer for global DNA methylation quantification. *Methods in Molecular Biology*, 2022, in press.

第 3 章を構成する著書

Natsumi Taka, Shoya Asami, Wataru Yoshida; Quantification of global DNA hydroxymethylation level using UHRF2 SRA-luciferase based on bioluminescence resonance energy transfer. 2021, submitted.

第 4 章を構成する著書

【学術論文】

Natsumi Taka, Wataru Yoshida; Quantification of global DNA methylation level using 5-methylcytosine dioxygenase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412, 5299–5305.

【書籍】

Natsumi Taka, Wataru Yoshida; Global DNA methylation analysis using methylcytosine dioxygenase. *DNA Modification Detection Methods*, 2021, 9, 93–102.

謝辞

本研究の遂行および本論文の執筆にあたって、多くの方々のご指導とご協力をいただきましたことに心より厚く御礼申し上げます。

本学バイオ・情報メディア研究科バイオニクス専攻、吉田亘准教授には、本研究の遂行に当たり、指導教員として沢山のご指導を頂きましたことに深謝申し上げます。吉田准教授には、これまでの約 6 年間の研究生生活全てにおいて非常にお世話になりました。研究活動のみならず、社会人としてのマナーやプレゼンテーションの仕方、図や文章の書き方など多岐に渡りご指導賜りました。学士・修士一貫早期プログラムの利用により、通常よりも研究期間が短い中、自身の研究成果を筆頭著者として論文化できたこと、日本学術振興会 特別研究員 DC2 に採択されたこと、全ては吉田准教授の日々の叱咤激励のお陰です。見放すことなく、数え切れないほどの成長の機会を与えて頂いたことに深く御礼申し上げます。

本研究に多大なご協力とご支援を頂きました軽部征夫教授(当時 東京工科大学学長、2020 年 2 月逝去)にこの場をお借りしまして御礼申し上げます。

ノースカロライナ大学チャペルヒル校 早出広司教授、東京農工大学工学府生命工学専攻 津川若子准教授には研究遂行にあたり、多大なご助言とご支援を頂きました。特に日本学術振興会 特別研究員 DC2 へ採択されたのは、お二人のお力添えがあったからこそであると思っております。この場をお借りしまして深く御礼申し上げます。

そして本論文の主査としてお時間を割いて頂きました本学バイオ・情報メディア研究科バイオニクス専攻の横山憲二教授、副査としてお時間を頂戴致しました本学同専攻の佐藤淳教授、秋元卓央教授、矢野和義教授には、お忙しい中、本論文の審査員として時間を割いて頂き、貴重なご助言賜りましたことを、ここに心から深謝申し上げます。

特に佐藤淳教授には、本研究の遂行にあたって、細胞やベクター、試薬などの譲渡だけでなく、実験操作などについてもご教授・ご助言頂きました。加えて、学部生時のゼミの担当教員を受け持って頂いた際、研究室配属や大学院への進学に迷っていた中、親身に相談にのって頂いたこと、心から感謝申し上げます。

本学バイオ・情報メディア研究科バイオニクス専攻 中西昭仁助教には、研究生生活の様々なことに貴重なご助言を賜りましたことに深く感謝を申し上げます。

そして、本研究室で共に学びました研究室の皆様には研究面のみならず、精神面においても支えられました。研究室の皆様のご尽力なしには約 6 年間の研究生生活を乗り越えることは不可

能でした。この場を借りて深く感謝致します。

特に研究室配属時より、研究面において非常にお世話になりました馬場勇次博士に心から深く感謝すると共に尊敬申し上げます。研究室における馬場博士の存在が私の博士号取得への後押しになりました。また、本学応用生物学部 ラダチョトサワラク実験助手には、研究室生活において多忙で辛い時期も優しく支えて頂いたこと、修士課程では同期として切磋琢磨し合えたことに深く御礼申し上げます。

また、共に博士前期課程・後期課程を走り抜けた同期の岡本瑞穂様、菅原響介様、雨倉咲希子様に深く感謝申し上げます。試行錯誤し、様々な困難を乗り越えられたのも皆さんと共に切磋琢磨し、楽しい学生生活を過ごせたからであると思っています。

これまでの学生生活を送るにあたって日々を支えあい、共に勉学に励んだ沢山の友人たちと、学習面のみならず、研生活や日常生活においても相談にのって頂いた全ての本学教職員の方々に、この場をお借りして深く御礼申し上げます。

なお、本研究の一部は日本学術振興会 特別研究員奨励費 JP21J14414 の助成を受けたものです。ここに感謝の意を表明します。

最後に、温かくときに厳しく叱咤激励してくれた両親に深く尊敬の意を表すとともに、注いでもらった愛情に心から深謝申し上げます。両親からの援助がなければ、現在の自分はありません。博士課程進学に迷っていたなか、進学に 1 歩踏み出し、自身の好きなことを突き詰める勇気くれたのは両親の応援のお陰です。

ご協力して頂いた皆様へ心からの感謝の気持ちと御礼を申し上げたく、謝辞に代えさせていただきます。

東京工科大学
バイオ・情報メディア研究科
バイオニクス専攻
エビジェネティック工学研究室
高 夏海

引用文献

- 1 Klose, R. J. & Bird, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences* **31**, 89-97, doi:10.1016/j.tibs.2005.12.008 (2006).
- 2 Meehan, R. R. & Stancheva, I. DNA methylation and control of gene expression in vertebrate development. *Regulation of Gene Expression* **37**, 59-70, doi:10.1042/bse0370059 (2001).
- 3 Jones, P. A. & Takai, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293**, 1068-1070, doi:10.1126/science.1063852 (2001).
- 4 Beisel, C. & Paro, R. Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nature Reviews Genetics* **12**, 123-135, doi:10.1038/nrg2932 (2011).
- 5 Zheng, Y. A. *et al.* Prediction of genome-wide DNA methylation in repetitive elements. *Nucleic Acids Research* **45**, 8697-8711, doi:10.1093/nar/gkx587 (2017).
- 6 Zhou, W. D., Liang, G. N., Molloy, P. L. & Jones, P. A. DNA methylation enables transposable element-driven genome expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**, 19359-19366, doi:10.1073/pnas.1921719117 (2020).
- 7 Yoder, J. A., Walsh, C. P. & Bestor, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics* **13**, 335-340, doi:10.1016/s0168-9525(97)01181-5 (1997).
- 8 Ehrlich, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21**, 5400-5413, doi:10.1038/sj.onc.1205651 (2002).
- 9 Grunau, C. *et al.* BAGE hypomethylation, a new epigenetic biomarker for colon cancer detection. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **17**, 1374-1379, doi:10.1158/1055-9965.epi-07-2656 (2008).
- 10 Tsumagari, K. *et al.* Epigenetics of a tandem DNA repeat: chromatin DNaseI sensitivity and opposite methylation changes in cancers. *Nucleic Acids Research* **36**, 2196-2207, doi:10.1093/nar/gkn055 (2008).
- 11 Nishiyama, R., Qi, L. X., Lacey, M. & Ehrlich, M. Both hypomethylation and hypermethylation in a 0.2-kb region of a DNA repeat in cancer. *Molecular Cancer Research* **3**, 617-626, doi:10.1158/1541-7786.mcr-05-0146 (2005).
- 12 Shao, C. B., Lacey, M., Dubeau, L. & Ehrlich, M. Hemimethylation footprints of DNA demethylation in cancer. *Epigenetics* **4**, 165-175, doi:10.4161/epi.4.3.8277 (2009).
- 13 Tahiliani, M. *et al.* Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* **324**, 930-935, doi:10.1126/science.1170116 (2009).
- 14 Ito, S. *et al.* Tet Proteins Can Convert

- 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science* **333**, 1300-1303, doi:10.1126/science.1210597 (2011).
- 15 Gilat, N. *et al.* Single-molecule quantification of 5-hydroxymethylcytosine for diagnosis of blood and colon cancers. *Clinical Epigenetics* **9**, doi:10.1186/s13148-017-0368-9 (2017).
- 16 Guler, G. D. *et al.* Detection of early stage pancreatic cancer using 5-hydroxymethylcytosine signatures in circulating cell free DNA. *Nature Communications* **11**, doi:10.1038/s41467-020-18965-w (2020).
- 17 Jin, S. G. *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine Is Strongly Depleted in Human Cancers but Its Levels Do Not Correlate with IDH1 Mutations. *Cancer Research* **71**, 7360-7365, doi:10.1158/0008-5472.can-11-2023 (2011).
- 18 Ai, S. X., Shen, L., Guo, J. F., Feng, X. & Tang, B. S. DNA Methylation as a Biomarker for Neuropsychiatric Diseases. *International Journal of Neuroscience* **122**, 165-176, doi:10.3109/00207454.2011.637654 (2012).
- 19 Sherwani, S. I. & Khan, H. A. Role of 5-hydroxymethylcytosine in neurodegeneration. *Gene* **570**, 17-24, doi:10.1016/j.gene.2015.06.052 (2015).
- 20 Wu, C. T. & Morris, J. R. Genes, genetics, and epigenetics: A correspondence. *Science* **293**, 1103-1105, doi:10.1126/science.293.5532.1103 (2001).
- 21 Ishiyama, S. *et al.* Structure of the Dnmt1 Reader Module Complexed with a Unique Two-Mono-Ubiquitin Mark on Histone H3 Reveals the Basis for DNA Methylation Maintenance. *Molecular Cell* **68**, 350-360, doi:10.1016/j.molcel.2017.09.037 (2017).
- 22 Jaenisch, R. & Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* **33**, 245-254, doi:10.1038/ng1089 (2003).
- 23 Brueckner, B. *et al.* Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Research* **65**, 6305-6311, doi:10.1158/0008-5472.can-04-2957 (2005).
- 24 Bird, A. The essentials of DNA methylation. *Cell* **70**, 5-8 (1992).
- 25 Yin, Y. M. *et al.* Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science* **356**, doi:10.1126/science.aaj2239 (2017).
- 26 Nan, X. S., Campoy, F. J. & Bird, A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* **88**, 471-481, doi:10.1016/s0092-8674(00)81887-5 (1997).
- 27 Nan, X. S. *et al.* Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386-389, doi:10.1038/30764 (1998).
- 28 Ng, H. H. *et al.* MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 h

- istone deacetylase complex. *Nature Genetics* **23**, 58-61 (1999).
- 29 Jones, P. L. *et al.* Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics* **19**, 187-191, doi:10.1038/561 (1998).
- 30 Mighell, A. J., Markham, A. F. & Robinson, P. A. Alu sequences. *Febs Letters* **417**, 1-5, doi:10.1016/s0014-5793(97)01259-3 (1997).
- 31 Kazazian, H. H. & Goodier, J. L. LINE drive: Retrotransposition and genome instability. *Cell* **110**, 277-280, doi:10.1016/s0092-8674(02)00868-1 (2002).
- 32 Pandita, D. & Pandita, A. Jumping Genes-“The Other Half of the Human Genome” and the Missing Heritability Conundrum of Human Genetic Disorders. *Biotechnology Journal International* **11**, 1-18, doi:10.9734/BBJ/2016/13904 (2016).
- 33 Barchitta, M., Quattrocchi, A., Maugeri, A., Vinciguerra, M. & Agodi, A. LINE-1 Hypomethylation in Blood and Tissue Samples as an Epigenetic Marker for Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos One* **9**, doi:10.1371/journal.pone.0109478 (2014).
- 34 Kim, J. S. *et al.* Association between Genetic Instability and Helicobacter pylori Infection in Gastric Epithelial Dysplasia. *Gastroenterology Research and Practice* **2012**, doi:10.1155/2012/360929 (2012).
- 35 Xu, C. H. & Corces, V. G. Nascent DNA A methylome mapping reveals inheritance of hemimethylation at CTCF/cohesin sites. *Science* **359**, 1166-1169, doi:10.1126/science.aan5480 (2018).
- 36 Nalabothula, N. *et al.* Genome-Wide Profiling of PARP1 Reveals an Interplay with Gene Regulatory Regions and DNA Methylation. *Plos One* **10**, doi:10.1371/journal.pone.0135410 (2015).
- 37 Weitzman, S. A., Turk, P. W., Milkowski, D. H. & Kozlowski, K. Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 1261-1264 (1994).
- 38 Turk, P. W., Laayoun, A., Steven, S. S. & Weitzman, S. A. DNA adduct 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase. *Carcinogenesis* **16**, 1253-1255, doi:10.1093/carcin/16.5.1253 (1995).
- 39 Valinluck, V. *et al.* Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Research* **32**, 4100-4108, doi:10.1093/nar/gkh739 (2004).
- 40 Zhou, X. L. *et al.* OGG1 is essential in oxidative stress induced DNA demethylation. *Cellular Signalling* **28**, 1163-1171, doi:10.1016/j.cellsig.2016.05.021 (2016).
- 41 Greenberg, M. V. C. & Bourc'his, D. The diverse roles of DNA methylation in

- mammalian development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **20**, 590-607, doi:10.1038/s41580-019-0159-6 (2019).
- 42 Ooi, S. K. T. & Bestor, T. H. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* **133**, 1145-1148, doi:10.1016/j.cell.2008.06.009 (2008).
- 43 Iyer, L. M., Tahiliani, M., Rao, A. & Aravind, L. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle* **8**, 1698-1710, doi:10.4161/cc.8.11.8580 (2009).
- 44 Kohli, R. M. & Zhang, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* **502**, 472-479, doi:10.1038/nature12750 (2013).
- 45 Lu, X. Y., Zhao, B. S. & He, C. TET Family Proteins: Oxidation Activity, Interacting Molecules, and Functions in Diseases. *Chemical Reviews* **115**, 2225-2239, doi:10.1021/cr500470n (2015).
- 46 An, J., Rao, A. & Ko, M. TET family dioxygenases and DNA demethylation in stem cells and cancers. *Experimental and Molecular Medicine* **49**, doi:10.1038/emm.2017.5 (2017).
- 47 Long, H. K., Blackledge, N. P. & Klose, R. J. ZF-CxxC domain-containing proteins, CpG islands and the chromatin connection. *Biochemical Society Transactions* **41**, 727-740, doi:10.1042/bst20130028 (2013).
- 48 Ko, M. *et al.* Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature* **497**, 122-126, doi:10.1038/nature12052 (2013).
- 49 Ito, S. *et al.* Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466**, 1129-1133, doi:10.1038/nature09303 (2010).
- 50 Kuiper, C. & Vissers, M. C. M. Ascorbate as a co-factor for Fe- and 2-oxoglutarate dependent dioxygenases: physiological activity in tumor growth and progression. *Frontiers in Oncology* **4**, doi:10.3389/fonc.2014.00359 (2014).
- 51 Young, J. I., Zuchner, S. & Wang, G. F. Regulation of the Epigenome by Vitamin C. *Annual Review of Nutrition*, Vol **35** **35**, 545-564, doi:10.1146/annurev-nutr-071714-034228 (2015).
- 52 Blaschke, K. *et al.* Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature* **500**, 222-226, doi:10.1038/nature12362 (2013).
- 53 Yin, R. C. *et al.* Ascorbic Acid Enhances Tet-Mediated 5-Methylcytosine Oxidation and Promotes DNA Demethylation in Mammals. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 10396-10403, doi:10.1021/ja4028346 (2013).
- 54 Xu, Y. Z. *et al.* Real-Time Sensing of TET2-Mediated DNA Demethylation In Vitro by Metal-Organic Framework-Based Oxygen Sensor for Mechanism Analysis and Stem-Cell Behavior Prediction. *Analytical Chemistry* **90**, 9330-9333

- 7, doi:10.1021/acs.analchem.8b01941 (2018).
- 55 Cortazar, D., Kunz, C., Saito, Y., Steinauer, R. & Schar, P. The enigmatic thymine DNA glycosylase. *DNA Repair* **6**, 489-504, doi:10.1016/j.dnarep.2006.10.013 (2007).
- 56 He, Y. F. *et al.* Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA. *Science* **333**, 1303-1307, doi:10.1126/science.1210944 (2011).
- 57 Maiti, A. & Drohat, A. C. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 35334-35338, doi:10.1074/jbc.C111.284620 (2011).
- 58 Nabel, C. S. *et al.* AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation. *Nature Chemical Biology* **8**, 751-758, doi:10.1038/nchembio.1042 (2012).
- 59 Li, W. & Liu, M. Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine in Different Human Tissues *Journal of Nucleic Acids* **2011**, 870726, doi:10.4061/2011/870726 (2011).
- 60 Shahal, T. *et al.* Simple and cost-effective fluorescent labeling of 5-hydroxymethylcytosine. *Methods and Applications in Fluorescence* **4**, doi:10.1088/2050-6120/4/4/044003 (2016).
- 61 Szulwach, K. E. *et al.* Integrating 5-Hydroxymethylcytosine into the Epigenomic Landscape of Human Embryonic Stem Cells. *Plos Genetics* **7**, doi:10.1371/journal.pgen.1002154 (2011).
- 62 Stroud, H., Feng, S. H., Kinney, S. M., Pradhan, S. & Jacobsen, S. E. 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biology* **12**, doi:10.1186/gb-2011-12-6-r54 (2011).
- 63 Xu, Y. F. *et al.* Genome-wide Regulation of 5hmC, 5mC, and Gene Expression by Tet1 Hydroxylase in Mouse Embryonic Stem Cells. *Molecular Cell* **42**, 451-464, doi:10.1016/j.molcel.2011.04.005 (2011).
- 64 Hendrich, B. & Bird, A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 6538-6547, doi:10.1128/mcb.18.11.6538 (1998).
- 65 Baymaz, H. I. *et al.* MBD5 and MBD6 interact with the human PR-DUB complex through their methyl-CpG-binding domain. *Proteomics* **14**, 2179-2189, doi:10.1002/pmic.201400013 (2014).
- 66 Hashimoto, H. *et al.* Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Research* **40**, 4841-4849, doi:10.1093/nar/gks155 (2012).
- 67 Tam, B. E., Sung, K. & Sikes, H. D. Engineering affinity agents for the detection of hemi-methylated CpG sites in DNA. *Molecular Systems Design & Engineering*

- neering **1**, 273-277, doi:10.1039/c6me00073h (2016).
- 68 Heimer, B. W., Tam, B. E. & Sikes, H. D. Characterization and directed evolution of a methyl-binding domain protein for high-sensitivity DNA methylation analysis. *Protein Engineering Design & Selection* **28**, 543-551, doi:10.1093/protein/gzv046 (2015).
- 69 Qin, W. H. *et al.* DNA methylation requires a DNMT1 ubiquitin interacting motif (UIM) and histone ubiquitination. *Cell Research* **25**, 911-929, doi:10.1038/cr.2015.72 (2015).
- 70 Fang, J. *et al.* Hemi-methylated DNA opens a closed conformation of UHRF1 to facilitate its histone recognition. *Nature Communications* **7**, doi:10.1038/ncomms11197 (2016).
- 71 Delagoutte, B., Lallous, N., Birck, C., Oudet, P. & Samama, J. P. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic study of the SRA domain of the human UHRF1 protein. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications* **64**, 922-925, doi:10.1107/s1744309108027462 (2008).
- 72 Greiner, V. J. *et al.* Site-Selective Monitoring of the Interaction of the SRA Domain of UHRF1 with Target DNA Sequences Labeled with 2-Aminopurine. *Biochemistry* **54**, 6012-6020, doi:10.1021/acs.biochem.5b00419 (2015).
- 73 Qian, C. M. *et al.* Structure and Hemimethylated CpG Binding of the SRA Domain from Human UHRF1. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 34490-34494, doi:10.1074/jbc.C800169200 (2008).
- 74 Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Nakamura, Y. & Shirakawa, M. Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism. *Nature* **455**, 818-U812, doi:10.1038/nature07249 (2008).
- 75 Hashimoto, H. *et al.* The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature* **455**, 826-U814, doi:10.1038/nature07280 (2008).
- 76 Bianchi, C. & Zangi, R. Dual base-flipping of cytosines in a CpG dinucleotide sequence. *Biophysical Chemistry* **187**, 14-22, doi:10.1016/j.bpc.2013.12.005 (2014).
- 77 Mori, T., Li, Y., Hata, H., Ono, K. & Kochi, H. NIRF, a novel RING finger protein, is involved in cell-cycle regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **296**, 530-536, doi:10.1016/s0006-291x(02)00890-2 (2002).
- 78 Mori, T., Li, Y. Y., Hata, H. & Kochi, H. NIRF is a ubiquitin ligase that is capable of ubiquitinating PCNP, a PEST-containing nuclear protein. *Febs Letters* **557**, 209-214, doi:10.1016/s0014-5793(03)01495-9 (2004).
- 79 Zhang, J. Q. *et al.* S phase-dependent interaction with DNMT1 dictates the role of UHRF1 but not UHRF2 in DNA methylation maintenance. *Cell Research* **21**, 1723-1739, doi:10.1038/cr.2011.176 (2011).

- 80 Liu, Y. D. *et al.* UHRF2 regulates local 5-methylcytosine and suppresses spontaneous seizures. *Epigenetics* **12**, 551-560, doi:10.1080/15592294.2017.1314423 (2017).
- 81 Pichler, G. *et al.* Cooperative DNA and Histone Binding by Uhrf2 Links the Two Major Repressive Epigenetic Pathways. *Journal of Cellular Biochemistry* **112**, 2585-2593, doi:10.1002/jcb.23185 (2011).
- 82 Liu, Y. D. *et al.* Zinc Finger Protein 618 Regulates the Function of UHRF2 (Ubiquitin-like with PHD and Ring Finger Domains 2) as a Specific 5-Hydroxymethylcytosine Reader. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 13679-13688, doi:10.1074/jbc.M116.717314 (2016).
- 83 Zhou, T. *et al.* Structural Basis for Hydroxymethylcytosine Recognition by the SRA Domain of UHRF2. *Molecular Cell* **54**, 879-886, doi:10.1016/j.molcel.2014.04.003 (2014).
- 84 Wang, J. J., Han, X. A. & Sun, Y. L. DNA methylation signatures in circulating cell-free DNA as biomarkers for the early detection of cancer. *Science China Life Sciences* **60**, 356-362, doi:10.1007/s11427-016-0253-7 (2017).
- 85 Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B. & Pantel, K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer* **11**, 426-437, doi:10.1038/nrc3066 (2011).
- 86 Grutzmann, R. *et al.* Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay. *Plos One* **3**, doi:10.1371/journal.pone.0003759 (2008).
- 87 Warren, J. D. *et al.* Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *Bmc Medicine* **9**, doi:10.1186/1741-7015-9-133 (2011).
- 88 Wang, Y. C., Hsu, H. S., Chen, T. P. & Chen, J. T. Molecular diagnostic markers for lung cancer in sputum and plasma. *Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum* **1075**, 179-184, doi:10.1196/annals.1368.024 (2006).
- 89 Zhang, Y. W. *et al.* Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer. *Cancer Letters* **303**, 21-28, doi:10.1016/j.canlet.2010.12.011 (2011).
- 90 Majchrzak-Celinska, A. *et al.* Detection of MGMT, RASSF1A, p15INK4B, and p14ARF promoter methylation in circulating tumor-derived DNA of central nervous system cancer patients. *Journal of Applied Genetics* **54**, 335-344, doi:10.1007/s13353-013-0149-x (2013).
- 91 Chimonidou, M. *et al.* CST6 promoter methylation in circulating cell-free DNA of breast cancer patients. *Clinical Biochemistry* **46**, 235-240, doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.09.015 (2013).
- 92 Kobayashi, N. *et al.* Usefulness of DNA Methylation Levels in COASY and SPINT1 Gene Promoter Regions as Biomarkers in Diagnosis of Alzheimer's Disease and Amnesic Mild Cognitive Im

- pairment. *PLoS One* **11**, doi:10.1371/journal.pone.0168816 (2016).
- 93 Lehmann-Werman, R. *et al.* Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E1826-E1834, doi:10.1073/pnas.1519286113 (2016).
- 94 Zemmour, H. *et al.* Non-invasive detection of human cardiomyocyte death using methylation patterns of circulating DNA. *Nature Communications* **9**, doi:10.1038/s41467-018-03961-y (2018).
- 95 Chalitchagorn, K. *et al.* Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* **23**, 8841-8846, doi:10.1038/sj.onc.1208137 (2004).
- 96 Daskalos, A. *et al.* Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer* **124**, 81-87, doi:10.1002/ijc.23849 (2009).
- 97 Irahara, N. *et al.* Precision of Pyrosequencing Assay to Measure LINE-1 Methylation in Colon Cancer, Normal Colonic Mucosa, and Peripheral Blood Cells. *Journal of Molecular Diagnostics* **12**, 177-183, doi:10.2353/jmoldx.2010.090106 (2010).
- 98 Widschwendter, M. *et al.* DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer Research* **64**, 4472-4480, doi:10.1158/0008-5472.can-04-0238 (2004).
- 99 Barciszewska, A. M., Giel-Pietraszuk, M., Perrigue, P. M. & Naskret-Barciszewska, M. Total DNA Methylation Changes Reflect Random Oxidative DNA Damage in Gliomas. *Cells* **8**, doi:10.3390/cells8091065 (2019).
- 100 Ehrlich, M. & Lacey, M. DNA Hypomethylation and Hemimethylation in Cancer. *Epigenetic Alterations in Oncogenesis* **754**, 31-56, doi:10.1007/978-1-4419-9967-2_2 (2013).
- 101 Jeong, S. *et al.* Selective Anchoring of DNA Methyltransferases 3A and 3B to Nucleosomes Containing Methylated DNA. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 5366-5376, doi:10.1128/mcb.00484-09 (2009).
- 102 Mudbhary, R. *et al.* UHRF1 Overexpression Drives DNA Hypomethylation and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* **25**, 196-209, doi:10.1016/j.ccr.2014.01.003 (2014).
- 103 Rao, J. S., Keleshian, V. L., Klein, S. & Rapoport, S. I. Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Translational Psychiatry* **2**, doi:10.1038/tp.2012.55 (2012).
- 104 Coppieters, N. *et al.* Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. *Neurobiology of Aging* **35**, 1334-1344, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.031 (2014).
- 105 Chouliaras, L. *et al.* Consistent decrease in global DNA methylation and hydr

- oxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiology of Aging* **34**, 2091-2099, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.02.021 (2013).
- 106 Bradley-Whitman, M. A. & Lovell, M. A. Epigenetic changes in the progression of Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development* **134**, 486-495, doi:10.1016/j.mad.2013.08.005 (2013).
- 107 Martinez-Iglesias, O. *et al.* DNA Methylation in Neurodegenerative and Cerebrovascular Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, doi:10.3390/ijms21062220 (2020).
- 108 Masliah, E., Dumaop, W., Galasko, D. & Desplats, P. Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease Identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. *Epigenetics* **8**, 1030-1038, doi:10.4161/epi.25865 (2013).
- 109 Castillo, S., Munoz, P., Behrens, M. I., Diaz-Grez, F. & Segura-Aguilar, J. On the Role of Mining Exposure in Epigenetic Effects in Parkinson's Disease. *Neurotoxicity Research* **32**, 172-174, doi:10.1007/s12640-017-9736-7 (2017).
- 110 Corti, O., Lesage, S. & Brice, A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiological Reviews* **91**, 1161-1218, doi:10.1152/physrev.00022.2010 (2011).
- 111 Matsumoto, L. *et al.* CpG Demethylation Enhances Alpha-Synuclein Expression and Affects the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Plos One* **5**, doi:10.1371/journal.pone.0015522 (2010).
- 112 Tan, Y. *et al.* Methylation of α -synuclein and leucine-rich repeat kinase 2 in leukocyte DNA of Parkinson's disease patients. *Parkinsonism and Related Disorders* **20**, 308-313 (2014).
- 113 Villar-Menendez, I. *et al.* Increased 5-Methylcytosine and Decreased 5-Hydroxymethylcytosine Levels are Associated with Reduced Striatal A(2A)R Levels in Huntington's Disease. *Neuromolecular Medicine* **15**, 295-309, doi:10.1007/s12017-013-8219-0 (2013).
- 114 Zhang, R. R. *et al.* Tet1 Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognition. *Cell Stem Cell* **13**, 237-245, doi:10.1016/j.stem.2013.05.006 (2013).
- 115 Rudenko, A. *et al.* Tet1 Is Critical for Neuronal Activity-Regulated Gene Expression and Memory Extinction. *Neuron* **79**, 1109-1122, doi:10.1016/j.neuron.2013.08.003 (2013).
- 116 Chen, R. Y. *et al.* The 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC) Reader UHRF2 Is Required for Normal Levels of 5hmC in Mouse Adult Brain and Spatial Learning and Memory. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 4533-4543, doi:10.1074/jbc.M116.754580 (2017).
- 117 Antelo, M. *et al.* A High Degree of LINE-1 Hypomethylation Is a Unique Feature of Early-Onset Colorectal Cancer.

- Plos One* **7**, doi:10.1371/journal.pone.0045357 (2012).
- 118 Yamamura, K. *et al.* LINE-1 methylation level and prognosis in pancreas cancer: pyrosequencing technology and literature review. *Surgery Today* **47**, 1450-1459, doi:10.1007/s00595-017-1539-1 (2017).
- 119 Dammann, R. H. *et al.* Frequent aberrant methylation of the imprinted IGF2/H19 locus and LINE1 hypomethylation in ovarian carcinoma. *International Journal of Oncology* **36**, 171-179, doi:10.3892/ijo_00000488 (2010).
- 120 Liao, L. M. *et al.* LINE-1 Methylation Levels in Leukocyte DNA and Risk of Renal Cell Cancer. *Plos One* **6**, doi:10.1371/journal.pone.0027361 (2011).
- 121 Gu, H. C. *et al.* Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nature Protocols* **6**, 468-481, doi:10.1038/nprot.2010.190 (2011).
- 122 Beck, D., Ben Maamar, M. & Skinner, M. K. Genome-wide CpG density and DNA methylation analysis method (MeDIP, RRBS, and WGBS) comparisons. *Epigenetics*, doi:10.1080/15592294.2021.1924970.
- 123 Xiong, Z. G. & Laird, P. W. COBRA: A sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Research* **25**, 2532-2534, doi:10.1093/nar/25.12.2532 (1997).
- 124 Armstrong, K. M. *et al.* Global DNA methylation measurement by HPLC using low amounts of DNA. *Biotechnology Journal* **6**, 113-117, doi:10.1002/biot.201000267 (2011).
- 125 Friso, S., Choi, S. W., Dolnikowski, G. G. & Selhub, J. A method to assess genomic DNA methylation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **74**, 4526-4531, doi:10.1021/ac020050h (2002).
- 126 Sato, S. *et al.* Ferrocenylnaphthalene diimide-based electrochemical detection of methylated gene. *Analytica Chimica Acta* **578**, 82-87, doi:10.1016/j.aca.2006.04.056 (2006).
- 127 Kato, D. *et al.* A nanocarbon film electrode as a platform for exploring DNA methylation. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 3716-+, doi:10.1021/ja710536p (2008).
- 128 Wang, P., Chen, H. B., Tian, J. Y., Dai, Z. & Zou, X. Y. Electrochemical evaluation of DNA methylation level based on the stoichiometric relationship between purine and pyrimidine bases. *Biosensors & Bioelectronics* **45**, 34-39, doi:10.1016/j.bios.2013.01.057 (2013).
- 129 Thu, K. L. *et al.* Methylated DNA immunoprecipitation. *Journal of Visualized Experiments*, 935 (2009).
- 130 Nair, S. S. *et al.* Comparison of methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) and methyl-CpG binding domain (MBD) protein capture for genome-wide DNA methylation analysis reveal CpG sequence coverage bias. *Epigenetics* **6**, 34-4

- 4, doi:10.4161/epi.6.1.13313 (2011).
- 131 Pan, S. Y. *et al.* Double recognition of oligonucleotide and protein in the detection of DNA methylation with surface plasmon resonance biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **26**, 850-853, doi:10.1016/j.bios.2010.08.007 (2010).
- 132 Kurita, R., Yanagisawa, H., Yoshioka, K. & Niwa, O. On-Chip Sequence-Specific Immunochemical Epigenomic Analysis Utilizing Outward-Turned Cytosine in a DNA Bulge with Handheld Surface Plasmon Resonance Equipment. *Analytical Chemistry* **87**, 11581-11586, doi:10.1021/acs.analchem.5b03520 (2015).
- 133 Piyathilake, C. J. *et al.* Immunohistochemical evaluation of global DNA methylation: Comparison with in vitro radiolabeled methyl incorporation assay. *Biochemical & Histochemistry* **75**, 251-258, doi:10.3109/10520290009085128 (2000).
- 134 Kremer, D., Metzger, S. & Kolb-Bachofen, V. Quantitative measurement of genome-wide DNA methylation by a reliable and cost-efficient enzyme-linked immunosorbent assay technique. *Analytical Biochemistry* **422**, 74-78, doi:10.1016/j.ab.2011.11.033 (2012).
- 135 Balaghi, M. & Wagner, C. DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **193**, 1184-1190, doi:10.1006/bbrc.1993.1750 (1993).
- 136 Rampersaud, G. C., Kauwell, G. P. A., Hutson, A. D., Cerda, J. J. & Bailey, L. B. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *American Journal of Clinical Nutrition* **72**, 998-1003 (2000).
- 137 Pilsner, J. R. *et al.* Genomic methylation of peripheral blood leukocyte DNA: influences of arsenic and folate in Bangladeshi adults. *American Journal of Clinical Nutrition* **86**, 1179-1186, doi:10.1093/ajcn/86.4.1179 (2007).
- 138 Nephew, P., K., Balch, C. & Skalnik, D. G. Methyl group acceptance assay for the determination of global DNA methylation levels. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **507**, 35-41 (2009).
- 139 Delgado-Cruzata, L. *et al.* Global DNA methylation levels in white blood cell DNA from sisters discordant for breast cancer from the New York site of the breast cancer family registry. *Epigenetics* **7**, 868-874, doi:10.4161/epi.20830 (2012).
- 140 Lee, J. *et al.* Development of an electrochemical detection system for measuring DNA methylation levels using methyl CpG-binding protein and glucose dehydrogenase-fused zinc finger protein. *Biosensors & Bioelectronics* **93**, 118-123, doi:10.1016/j.bios.2016.09.060 (2017).
- 141 Hiraoka, D. *et al.* Development of a Method To Measure DNA Methylation Levels by Using Methyl CpG-Binding Protein

- ein and Luciferase-Fused Zinc Finger Protein. *Analytical Chemistry* **84**, 8259-8264, doi:10.1021/ac3015774 (2012).
- 142 Badran, A. H. *et al.* Evaluating the Global CpG Methylation Status of Native DNA Utilizing a Bipartite Split-Luciferase Sensor. *Analytical Chemistry* **83**, 71-7157, doi:10.1021/ac2015239 (2011).
- 143 Yoshida, W., Baba, Y., Banzawa, K. & Karube, I. A quantitative homogeneous assay for global DNA methylation levels using CpG-binding domain- and methyl-CpG-binding domain-fused luciferase. *Analytica Chimica Acta* **990**, 168-173, doi:10.1016/j.aca.2017.07.046 (2017).
- 144 Baba, Y., Yamamoto, K. & Yoshida, W. Multicolor bioluminescence resonance energy transfer assay for quantification of global DNA methylation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **411**, 4765-4773, doi:10.1007/s00216-019-01583-x (2019).
- 145 Yang, A. S. *et al.* A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Research* **32**, doi:10.1093/nar/gnh032 (2004).
- 146 Laird, C. D. *et al.* Hairpin-bisulfite PCR: Assessing epigenetic methylation patterns on complementary strands of individual DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 204-209, doi:10.1073/pnas.2536758100 (2004).
- 147 Xie, H. H. *et al.* Genome-wide quantitative assessment of variation in DNA methylation patterns. *Nucleic Acids Research* **39**, 4099-4108, doi:10.1093/nar/gkr017 (2011).
- 148 Zhao, L. *et al.* The dynamics of DNA methylation fidelity during mouse embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Genome Research* **24**, 1296-1307, doi:10.1101/gr.163147.113 (2014).
- 149 Kriaucionis, S. & Heintz, N. The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain. *Science* **324**, 929-930, doi:10.1126/science.1169786 (2009).
- 150 Yu, M. *et al.* Tet-assisted bisulfite sequencing of 5-hydroxymethylcytosine. *Nature Protocols* **7**, 2159-2170 (2012).
- 151 Schutsky, E. K. *et al.* Nondestructive, base-resolution sequencing of 5-hydroxymethylcytosine using a DNA deaminase. *Nature Biotechnology* **36**, 1083+, doi:10.1038/nbt.4204 (2018).
- 152 Song, C. X. *et al.* Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nature Biotechnology* **29**, 68-72, doi:10.1038/nbt.1732 (2011).
- 153 Booth, M. J. *et al.* Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution. *Science* **336**, 934-937, doi:10.1126/science.1220671 (2012).
- 154 Ma, S. X., Sun, H. P., Li, Y., Qi, H. L. &

- Zheng, J. B. Discrimination between 5-Hydroxymethylcytosine and 5-Methylcytosine in DNA via Selective Electrogenerated Chemiluminescence (ECL) Labeling. *Analytical Chemistry* **88**, 9934-9940, doi:10.1021/acs.analchem.6b01265 (2016).
- 155 Murata, A. *et al.* TET family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **6**, 23372-23382, doi:10.18632/oncotarget.4281 (2015).
- 156 Olova & N., N. ELISA-Based Quantitation of Global 5hmC Levels. *Methods in Molecular Biology* **2271**, 45-63 (2021).
- 157 Ruedas-Rama, M. J., Orte, A., Crovetto, L., Talavera, E. M. & Alvarez-Pez, J. M. Photophysics and Binding Constant Determination of the Homodimeric Dye BOBO-3 and DNA Oligonucleotides. *Journal of Physical Chemistry B* **114**, 1094-1103, doi:10.1021/jp909863c (2010).
- 158 Ruedas-Rama, M. J., Alvarez-Pez, J. M. & Orte, A. Formation of Stable BOBO-3 H-Aggregate Complexes Hinders DNA Hybridization. *Journal of Physical Chemistry B* **114**, 9063-9071, doi:10.1021/jp103131r (2010).
- 159 Yanai, H. *Statcel-the Useful Addin Forms on Excel-4th edition.* (2018).
- 160 Kilin, V. *et al.* Dynamics of Methylated Cytosine Flipping by UHRF1. *Journal of the American Chemical Society* **139**, 2520-2528, doi:10.1021/jacs.7b00154 (2017).
- 161 Hu, L. L. *et al.* Structural insight into substrate preference for TET-mediated oxidation. *Nature* **527**, 118-122, doi:10.1038/nature15713 (2015).
- 162 Yoshida, W., Baba, Y. & Karube, I. Global DNA Methylation Detection System Using MBD-Fused Luciferase Based on Bioluminescence Resonance Energy Transfer Assay. *Analytical Chemistry* **88**, 9264-9268, doi:10.1021/acs.analchem.6b02565 (2016).
- 163 Huang, X. W. *et al.* The Ratio of ssDNA to dsDNA in Circulating Cell-Free DNA Extract is a Stable Indicator for Diagnosis of Gastric Cancer. *Pathology & Oncology Research* **26**, 2621-2632, doi:10.1007/s12253-020-00869-1 (2020).
- 164 Spruijt, C. G. *et al.* Dynamic Readers for 5-(Hydroxy)Methylcytosine and Its Oxidized Derivatives. *Cell* **152**, 1146-1159, doi:10.1016/j.cell.2013.02.004 (2013).
- 165 Torano, E. G., Petrus, S., Fernandez, A. F. & Fraga, M. F. Global DNA hypomethylation in cancer: review of validated methods and clinical significance. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **50**, 1733-1742, doi:10.1515/cclm-2011-0902 (2012).
- 166 Dong *et al.* DNA methylation as an early diagnostic marker of cancer (Review). *Biomedical Reports* **2**, 326-330 (2014).
- 167 Zhang, J. J. *et al.* Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra high-pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **985**, 11-18, doi:10.1016/j.jchromb.2016.08.011 (2016).

- graphy tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **413**, 164-170, doi:10.1016/j.ab.2011.01.029 (2011).
- 168 Baba, Y., Karube, I. & Yoshida, W. Global DNA Methylation Level Monitoring by methyl-CpG Binding Domain-Fused Luciferase. *Analytical Letters* **52**, 754-760, doi:10.1080/00032719.2018.1494739 (2019).
- 169 Hu, L. L. *et al.* Crystal Structure of TET2-DNA Complex: Insight into TET-Mediated 5mC Oxidation. *Cell* **155**, 1545-1555, doi:10.1016/j.cell.2013.11.020 (2013).
- 170 Michal, G., Bueutler, H. O., Lang, G. & Guentner, U. Enzymatic determination of succinic acid in foodstuffs. *Zeitschrift fur Analytische Chemie* **279**, 137-138 (1976).
- 171 Nagata, K. Understanding of cognitive function through the brain images. *Japanese Society of Clinical Neurophysiology* **45**, 146-153 (2017).