

[研究論文] 組換え維持型メチル化酵素を用いた
新規メチル化解析法

吉川僚汰¹・前田翔大¹・高村岳樹^{1,2}・飯田泰広^{1,3}

1 応用化学・バイオサイエンス専攻 博士前期課程
2 神奈川工科大学 工学部応用化学科
3 神奈川工科大学 応用バイオ科学部応用バイオ科学科

Novel methylation analysis method with use of recombinant maintenance
methyltransferase

Ryota YOSHIKAWA¹, Shota MAEDA¹, Takeji TAKAMURA^{1,2}, Yasuhiro IIDA^{1,3}

Abstract

DNA methylation is one of epigenetics, and aberrant DNA methylation is related to various diseases such as cancer, neurological diseases, and allergic diseases. It is necessary to understand the methylation status of DNA in order to elucidate the fundamental cause of these diseases and to make an accurate diagnosis. Currently, the bisulfite sequencing method (BS-seq) is generally widely used as a DNA methylation analysis method. However, BS-seq has a problem that it cannot distinguish between hydroxymethylated cytosine (hmC) and methylated cytosine (mC).

Therefore, our laboratory is trying to develop a new methylation analysis method that combines DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 (Dnmt1) and Polymerase.

In this study, recombinant Dnmt1 with low *de novo* activity and low activity against hmC *in vitro* was prepared and applied to the methylation analysis of the tyrosinase promoter of B16 melanoma. As a result, the difference in the methylation site was observed between the analysis result of only BS-seq and the analysis result of the novel methylation analysis method.

From this result, it is considered that by combining BS-seq with recombinant Dnmt1, only methylation could be detected excluding hydroxymethylation.

Keywords: Epigenetics, DNA methylation, Bisulfite sequencing method, DNA (cytosine-5) methyltransferase 1

1. まえがき

DNA のメチル化はエピジェネティクスの 1 つである。エピジェネティクスとは、「DNA の配列変化を伴わずに子孫や娘細胞に伝達される遺伝子機能の変化、およびこの現象を探求する学問」¹⁾であり、例えば DNA メチル化、ヒストンの化学修飾などの機構がある。この機構は、細胞分裂後も継承され、遺伝子発現や細胞の表現型に影響を及ぼすことも知られている²⁾。

また、この修飾の異常は様々な疾患と深く関わっており、

胃癌³⁾や大腸癌⁴⁾などのがん細胞で DNA のメチル化異常が見つかっている。また、DNA のメチル化異常はがんだけではなく神経疾患、代謝疾患、アレルギー疾患⁵⁾とも関連していることが報告されており、これらの疾患の根本的な原因の解明や正確な診断には DNA のメチル化状態を把握することが必要といえる。

そのため、これまでにメチル化感受性酵素を用いた RLGS (restriction landmark genomic scanning) 法⁶⁾や MS-RAD (methylation-sensitive-representational difference

analysis) 法⁷⁾、蛍光プローブを用いた MethyLight 法⁸⁾や QASM (quantitative analysis of singlebase methylation)法⁹⁾、メチル化 DNA に特異的な抗体を用いた MeDIP-Seq¹⁰⁾や MeDIP-chip 法¹¹⁾など多くの DNA メチル化解析法が開発されてきた。しかし、これらの方法は配列全体のメチル化レベルの定量的な解析に適しているが、個々の CpG のメチル化状態の解析には適していない。

個々の CpG のメチル化状態の解析にはバイサルファイトシーケンシング法 (BS-seq) が一般的に広く使用されている。しかし、BS-seq は脱メチル化の中間体であるヒドロキシメチル化シトシン (hmC) とメチル化シトシン (mC) を区別できないといった問題がある。これまでに hmC を検出する方法として oxBS-seq¹²⁾や TAB-seq¹³⁾ が開発されてきた。しかし、TAB-seq を用いた mC と hmC の識別には、TAB 処理した DNA と未処理の DNA の比較が必要であり、oxBS-seq においても oxBS 処理した DNA と未処理の DNA の比較が必要となる。

そのため、同一の DNA から mC と hmC を同時に検出することはできない。また、前処理を必要とせず、直接メチル化 DNA を解析する方法として Nanopore sequencing^{14,15)}があるが、新規データの解析に機械学習を必要とし、解析対象ごとに大量の事前データが必要である点^{16,17,18)}やナノポア電気信号の逐次的な特性を考慮する必要がある点¹⁹⁾が課題として存在する。

そこで本研究では広く用いられている BS-seq の問題を解決するため、維持型メチル化酵素である DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 (Dnmt1) とポリメラーゼを組み合わせた新規メチル化解析法の開発を試みている。Dnmt1 は proliferating cell nuclear antigen (PCNA) と相互作用する PCNA binding domain、UHRF1 (ubiquitin-like, containing plant homeodomain (PHD) and RING finger domains) と相互作用することで DNA のメチル化を促進させる RFTS (replication foci targeting sequence)、非メチル化 CpG サイトに結合する CXXC zinc finger domain、ペ



Fig.1 Dnmt1 のドメイン

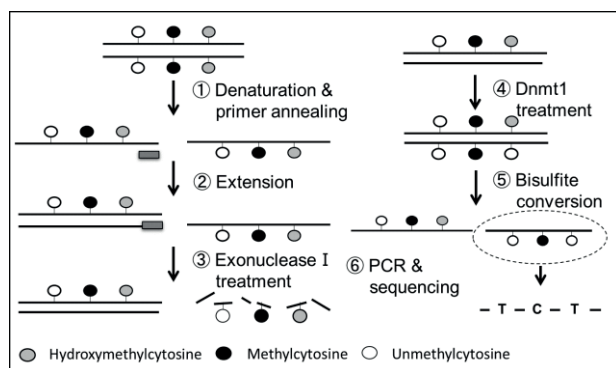


Fig.2 Dnmt I を用いた新規メチル化解析法概念図

アで存在する bromo-associated homology (BAH) domains、触媒ドメインである MTase domain から成るマルチドメインタンパクである (Fig.1)。また、Dnmt1 は *in vivo* で非メチル化シトシン (C), hmC を認識せず mC のみを認識し、その対となるシトシンにメチル基を転移させる維持型活性を持っている。

新規メチル化解析法では Dnmt1 の特性を活かし、解析したい鋳型鎖をポリメラーゼによって 1 サイクルだけ増幅し、新たに増幅された娘鎖を Dnmt1 でメチル化後、BS-seq で解析することで hmC を除く mC のみを検出できると考えている (Fig.2)。

Dnmt1 は Fig.1 に示すドメインを持っており、本研究では Dnmt1 の特性評価を行うため、6 種類の Dnmt1 変異体を作製した。作成した 6 種類の Dnmt1 変異体と組換えを行っていない Dnmt1 (full-length) をそれぞれ非メチル化、ヘミメチル化、ヘミヒドロキシメチル化オリゴ DNA と反応させ活性評価を行った。次に Dnmt1 を新規メチル化解析法に使い、B16 melanoma の tyrosinase promoter のメチル化解析を行った。

2. 実験装置および測定方法

2-1 試薬及び装置

使用した試薬と装置についてまとめる。本実験で用いたプライマーは全て eurofins から購入し、修飾オリゴ ssDNA である methylated DNA と hydroxymethylated DNA は FASMAC で購入した。シーケンス解析は FASMAC に外注した。HeLa 細胞、HepG2 細胞および B16メラノーマ細胞は理化学研究所から購入したものを使用した。本実験に用いた制限酵素 Dpn I, Kpn I は TAKARA BIO、EcoR I は TOYOBO から購入し、PCR に使用した KOD Plus Neo, KOD Multi & Epi は TOYOBO、One Taq DNA Polymerase は New England Biolabs から購入し、サーマルサイクラー FTGENE-Y2 は TECHNE のものを用いた。また、ゲル精製と PCR clean up は Favorgen Biotech Corp. の FavorPrep Gel/PCR Purification Kit、ライゲーションには TOYOBO の DNA Ligation Kit<Mighty Mix>を用いた。細胞培養に使用した CO₂インキュベーター (MODEL370) は、Thermo のものを使用した。

次に、pYES2-tags の構築に用いた pYES2 Yeast Expression Vector は Thermo Fisher Scientific、pCold GST DNA は TAKARA BIO から購入した。Dnmt1 変異体のサブクローニングにおいて使用した、TRIzol™ Reagent, Industries SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Oligo(dT)20 Primer は Thermo Fisher Scientific、PrimerSTAR GXL DNA Polymerase は TAKARA BIO から購入した。Dnmt1 (full-length) の発現確認において使用した、Yeast nitrogen base w/o amino acids は Difco Laboratories、Biomasher IV は TAITEC、100 x Protease inhibitor は NACALAI TESQUE、GST SpinTrap は General Electric、HisLink™ Protein Purification Systems は Promega、HRV 3C

Protease は TAKARA BIO、Nanoseq 3K は Pall、Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate は Bio-Rad Laboratories から購入した。DNA メチル化活性の測定に用いた MTase Glo™ Methyltransferase Assay Kit は Promega、M.SssI は New England Biolabs から購入した。また、DNA メチル化活性測定時に発光量の測定に用いた Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader は BERTHOLD 社製を使用した。ヘミメチル化 pMD20-MLH1 の作製において使用した、TaKaRa Ex Taq HS は TAKARA BIO、T4 DNA Polymerase は New England Biolabs、Exonuclease I (*E. coli*) は New England Biolabs から購入した。ヘミメチル化 pMD20 - MLH1 を用いた Dnmt1 (646-1616 a.a.) のメチル化活性測定に用いた、EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit は QIAGEN から購入した。新規メチル化解析法を用いた B16 melanoma 細胞集団のメチル化解析において使用した、NucleoSpin™TriPrep は TAKARA BIO から購入した。

2-2. pYES2-tags の構築 (精製用タグ付きベクターの構築)

目的のタンパクを簡便かつ高純度に精製するため、pCold GST DNA より TEE-His-tag Factor Xa-GST-HRV 3 C Protease 部分を pYES2 Yeast Expression Vector にサブクローニングした。

サブクローニングは KOD Plus Neo を用いて熱変性 (94 °C, 2min.)、2 step (98 °C, 10 sec., 68 °C, 3.5 min.) 10 cycle の条件で invers PCR し Dpn I で処理した vector と、pCold GST DNA を鋳型とし同酵素で熱変性 (94 °C, 2min.)、2 step (98 °C, 10 sec., 68 °C, 30 sec.) 20 cycle の条件で PCR した insert をライゲーションし、pYES2-tags を作製した。なお vector のプライマーは Fw. 5'-AAG CTT GGT ACC GAG CTC GGA TCC ACT AG-3', Rv. 5'-AAT ATT CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAC AGC TGC TA-3' を用い、insert にはリン酸化したプライマー Fw. 5' ATG AAT CAC AAA GTG CAT CAT CAT CAT CAT AT 3', Rv. 5'-CGG GCC CTG GAA CAG AAC TTC C-3' を使用した。作製したプラスミドを *E.coli* DH5α のコンピテントセルにヒートショック法を用いて形質転換を行った。

2-3. Dnmt1 変異体のサブクローニング

Dnmt1 の特性評価を行うため、ドメインの欠損体を作製した (Fig.3)。Fig.3 より (A), (B), (C), (D) は N 末端部分

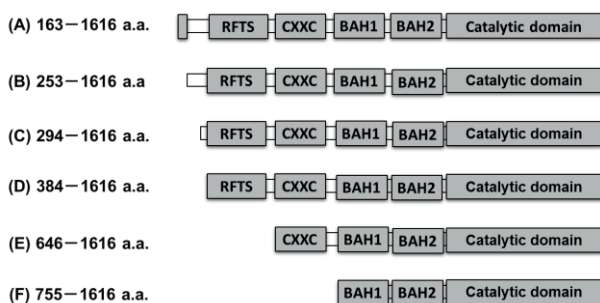


Fig.3 作成した Dnmt1 変異体

の領域を欠損させ、(E) は RFTS (replication foci targeting sequence) まで、(F) は、CXXC zinc finger domain までを欠損させた。

Dnmt1 をクローニングするため、HepG2 細胞から RNA の抽出を行った。凍結した細胞を解冻後、TRIzol™ Reagent を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA を Industries SuperScript™ III Reverse Transcriptase を用いて cDNA を作製した。プライマーは Oligo(dT)20 Primer を使用した。次に、PrimerSTAR GXL DNA Polymerase を用いて熱変性 (94 °C, 2 min.)、2 step (98 °C, 10 sec., 68 °C, 5 min.) 25 cycle の条件で 1stPCR を行い、同条件でアダプターを付加したプライマーを用いて 2ndPCR を行った。プライマーは、1stPCR では Fw. 5'- ATG CCG GCG CGT ACC GCC CCA G -3', Rv. 5'- GTC CTT AGC AGC TTC CTC CTC CTT TAT TTT AGC TG -3' を用い、2ndPCR では Fw. 5'-ATA GGT ACC ATG CCG GCG CGT ACC GC -3', Rv. 5'- AGC GAA TTC TTA TCA GTC CTT AGC AGC TTC CTC -3' を使用した。2ndPCR のアンプリコンおよび plasmid (pYES2) を EcoRI および KpnI で処理後、ライゲーションを行い pYES2-Dnmt1 を作製した。次に、pYES2-Dnmt1 作成時と同様の手順で insert(Dnmt1), vector (pYES2-tags) としてライゲーションを行い pYES2 -tags-Dnmt1 を作製した。作成した pYES2-tags-Dnmt1 は酢酸リチウム法を用いて *S. cerevisiae* INVSc1 株に形質転換し、pYES2-tags-Dnmt1 in *S. cerevisiae* INVSc1 を得た。

2-4. Dnmt1 (full-length) の発現確認

Dnmt1 (full-length) の発現確認を行った。pYES2-tags-Dnmt1 in *S. cerevisiae* INVSc1 を SC-U 培地 (0.67 % Yeast nitrogen base w/o amino acids, 2 % ラフィノース, 0.01 % [adenine, arginine, cysteine, leucine, lysine, threonine, tryptophan], 0.005 % [aspartic acid, histidine, isoleucine, methionine, phenylalanine, proline, serine, tyrosine, valine]) 100 mL で 30 °C で一晩振とう培養した。遠心分離 (2,000 x g, 5 min., 4 °C) 後、上清を廃棄し、誘導培地 (0.67 % Yeast nitrogen base w/o amino acids, 2 % ガラクトース, 1 % ラフィノース, 0.01 % [adenine, arginine, cysteine, leucine, lysine, threonine, tryptophan], 0.005 % [aspartic acid, histidine, isoleucine, methionine, phenylalanine, proline, serine, tyrosine, valine]) を 70 mL 加え 30 °C で 5 hr. 振とう培養した。遠心分離 (2,000 x g, 5 min., 4 °C) 後、上清を廃棄し、滅菌水を加えリンスした後、再び遠心分離 (2,000 x g, 5 min., 4 °C) し、上清を廃棄した。

発現誘導酵母 100 mg を Biomasher IV に秤量し、Lysis buffer Lysis buffer (3 mM MgCl₂, 5 mM β-メルカプトエタノール, 0.25 M NaCl, 10 % sucrose, 20 mM PIPES, 0.1 % Nonidet P-40, pH 7.4) 45 μL、100 x Protease inhibitor 5 μL を加え、攪拌した。1 分間ボルテックスで攪拌し、氷冷を 1 分間、この操作を計 5 回行い、Lysis buffer を 422.5 μL 加え、さらに 1 M DTT を 2.5 μL と 5 M NaCl を 25 μL 加え、1 分間ボルテックスで攪拌し、攪拌後に 10 分間氷冷

した。遠心分離 (4 °C, 10,000 x g, 5 min.)し、上清を可溶画分(Soluble)として回収した。

次に目的タンパク質の精製を行った。精製は、GST tag 精製により目的のタンパク質の精製を行い、HRV 3C Protease にて目的タンパク部分と tag 部分も切り分けを行い、His tag 精製によって切断した tag および HRV 3C Protease の除去を行った。最後に Nanoseq 3K を用いた限外濾過を行い、目的タンパク質の濃縮および Strage Buffer (50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 50 % Glycerol, pH 7.5)への置換を行った。この溶液を精製画分(Purification)とした。SDS-PAGE および Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate を用いたブラッドフォード法を使用してタンパク質の濃度を定量した。

2-5. pYES2-tags-Dnmt1 (163-1616, 253-1616, 294-1616, 384-1616, 646-1616, 755-1616 a. a.)の構築

Dnmt1 はリピート配列があり、PCR を避ける必要があるため酵母相同組換えを利用したシームレスクローニングを行った。なお、酵母には不和合性がないため、酵母内でプラスミドを構築後、抽出し、大腸菌へ形質転換した後に抽出、相同配列を確認後、酵母へ形質転換した。ベクターにインサートの相補配列を付加するため pYES2-tags を鋳型として、熱変性(94 °Cで2 min.)後、2 step (98 °C, 10 sec., 68 °C, 3.5 min.) 20 cycle の条件で KOD Plus Neo を用いて PCR を行った。

プライマーは Fw. 5'-AAA ATA AAG GAG GAG GAA GCT GCT AAG GAC TGA TAA GCG ATC GCA AGC TTG GTA CCG AGC-3' と、163-1616 は Rv. 5'-GCC CTT TGC AAA ATG AGA TGT GAT GGT GGT TTG CCT CGG GCC CTG GAA CAG AAC TTC CAG-3'、253-1616 は Rv. 5'- TCT GTC CGG CTC CTC CTT CAG TTT CTG TTT GGG TGT CGG GCC CTG GAA CAG AAC TTC CAG-3'、294-1616 は Rv. 5'- TTC AGG TTC TTT TTC TTC GGG CCT CCG TTT GGC AGC CGG GCC CTG GAA CAG AAC TTC CAG-3'、384-1616 は Rv. 5'- TGT TTT GGC GCG AGC CAT TTT TTT CTC CGT TGG TTC CGG GCC CTG GAA CAG AAC TTC CAG-3'、646-1616 は Rv. 5'- CTC ACA GAC GCC ACA TCG CCG GCG CTT AAA GGC GTT CGG GCC CTG GAA CAG AAC TTC CAG-3'、755-1616 は Rv. 5'- AAT AAC AGA GAC ACA GTC CCC CAC TTC CAG GGT TTC CGG GCC CTG GAA CAG AAC TTC CAG-3' を使用した。

PCR 後のアンプリコン溶液を Dpn I、pYES2-tags-Dnmt1 を Kpn I および Eco R I で処理し、相同配列を付加したベ

クター 30 ng、制限酵素処理後インサート 50 ng を *S. cerevisiae* INVSc1 へ pYES2-tags-Dnmt1 in *S. cerevisiae* INVSc1 作製時と同様の手順で形質転換した。

次に形質転換した酵母からプラスミドを抽出するため次の操作を行った。SC-U 培地で一晚培養した形質転換体酵母培養液を遠心分離 (4 °C, 20,400 x g, 1 min.) し、上清を廃棄した。滅菌水を 1 mL 加えペレットを崩し、新しいマイクロチューブに移し遠心分離 (4°C, 20,400 x g, 1 min.) し、上清を廃棄後、溶液 I (0.1 M Na2EDTA (pH 7.5) を 500 µL と Zymolyase 溶液 (12.5 mg/mL Zymolyase 20T, 10 mM リン酸バッファー, 1.2 M ソルビトール, pH 7.5) 20 µL を加え攪拌した。37 °C で 1 時間インキュベート後、遠心分離 (4 °C, 20,400 x g, 1 min.)し、上清を廃棄し溶液 II (20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) 250 µL と 10 % SDS を 25 µL 加え攪拌した。65°C で 30 分間インキュベート後、5 M 酢酸カリウムを 100 µL 加え転倒混和し、氷上で 30分間 インキュベートした。遠心分離 (4 °C, 20,400 x g, 3 min.) 後、上清を新しいマイクロチューブに移し、上清と等量の PEG 溶液を加え転倒混和し室温で 5 分間インキュベートした。遠心分離(4 °C, 20,400 x g, 3 min.)後、上清を廃棄し 70 % エタノール 400 µL を加えリンスした。遠心分離 (4, 20,400 x g, 3 min.) し、上清を廃棄後 10 分間静置し乾燥させ、1 x TE を 50 µL 加え溶解した。抽出したプラスミドを *E.coli* JM109 にヒートショック法を用いて形質転換を行った。構築した Dnmt1 変異体のプラスミドを *S. cerevisiae* INVSc1 へ pYES2-tags-Dnmt1 in *S. cerevisiae* INVSc1 作成時と同様の手順で形質転換し、pYES2-tags-Dnmt1(163-1616), (253-1616), (294-1616), (384-1616), (646-1616), (755-1616)を作製した。

2-6. Dnmt1 変異体の発現確認

pYES2-tags にサブクローニングした Dnmt1 変異体の発現確認を行った。pYES2-tags-Dnmt1(163-1616 a.a.), (253-1616 a.a.), (294-1616 a.a.), (384-1616 a.a.), (646-1616 a.a.), (755-1616 a.a.)をそれぞれ 2-4 と同様の手順で誘導培養・タンパク質の抽出・精製・濃度定量・SDS-PAGE を行った。

2-7. DNA メチル化活性の測定

Dnmt1(full-length)および 6 種類の Dnmt1 変異体の活性を測定した。精製後の Dnmt1(full-length), (163-1616 a.a.), (253-1616 a.a.), (294-1616 a.a.), (384-1616 a.a.), (646-1616 a.a.), (755-1616 a.a.)と基質オリゴ DNA である非メチル化、ヘミメチル化、ヘミヒドロキシメチル化オリゴ DNA をそれぞれ反応させ、その活性を評価した。

Table.1 Oligo DNAs list

Name		Sequence	mer
Synthesis DNA (MTase activity) (50 µM)	synthesis DNA (MTase activity)	5'- GGC AAT CAG TTC ACT TCG AGC CCA GGT ATT TAG CC -3'	35
	unmethylated DNA	5'- GGC TAA ATA CCT GGG CTC GAA GTG AAC TGA TTG CC -3'	35
Modified DNA (50 µM)	methylated DNA	5'- GGC TAA ATA CCT GGG CTmC GAA GTG AAC TGA TTG CC -3'	35
	hydroxymethylated DNA	5'- GGC TAA ATA CCT GGG CThmC GAA GTG AAC TGA TTG CC -3'	35

基質オリゴ DNA として用いた dsDNA (double strand DNA) は、以下の手順で作成した。Table.1 に示した synthesis DNA (50 μ M) 4 μ L, Modified DNA²⁰⁾ (50 μ M) 4 μ L, 10 x アニールングバッファー(100 mM Tris HCl, 1 M NaCl, 10 mM EDTA, pH 7.5) 2 μ L, 滅菌水 を加え合計 20 μ L となるように調整し、95 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベート後、25 $^{\circ}$ C まで徐々に冷却した(1 $^{\circ}$ C/1 min.)。なお、Modified DNA は非メチル化オリゴ DNA の場合 unmethylated, ヘミメチル化オリゴ DNA は methylated DNA, ヘミヒドロキシメチル化オリゴ DNA は hydroxymethylated DNA を用いた。

各 Dnmt1 に対するメチル化活性測定の手順を以下に示す。全量 19.5 μ L の反応液(1 x Buffer B²⁰⁾ (2.7 M glycerol, 5 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 25 mM NaCl, 20 mM Tris HCl, pH 7.4), 10 μ M SAM, 10 mg/mL BSA, Dnmt1 30 nM) を調製し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。0.25 μ M dsDNA を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応後、DNA メチル化活性測定を行った。

2-8. ヘミメチル化 pMD20-*MLH1* の作製

新規メチル化解析のコントロールとして用いる為、HeLa 細胞において CpG island のメチル化が報告されている *MLH1*^{21,22)} を pMD20 にサブクローニングしヘミメチル化した。

pMD20-*MLH1* を構築する為、Genomic DNA miniplep のプロトコルに従い HeLa 細胞から gDNA を抽出した。次に、*MLH1* を pMD20 にサブクローニングするため、抽出した gDNA を鋳型として熱変性 (94 $^{\circ}$ C, 4 min.)、3 step (98 $^{\circ}$ C, 10 sec., 55 $^{\circ}$ C, 30 sec., 72 $^{\circ}$ C, 30 sec.) 35 cycle、最終伸長反応(72 $^{\circ}$ C, 2 min.)の条件で TaKaRa Ex Taq HS を用いて PCR を行った。プライマーは、Fw. 5'-GCA AGG GGA GAG GAG GAG CC-3', Rv. 5'-AGT GCC TTC AGC CAA TCA CCT C-3'を用いた。アンプリコンをゲル精製後、自作した pMD20 の TA vector に TA cloning し、pMD20-*MLH1* を作製した。pMD20-*MLH1* を *E.coli* JM109 に形質転換した。

次に pMD20-*MLH1* をヘミメチル化するため、プラスミドを EcoR I で線状化後、全量 10 μ L の反応液 (M.Sss I 4 U, 1 x NEBuffer 2, SAM 640 μ M, 線状化プラスミド 3 μ g) を調製し、37 $^{\circ}$ C で 4 時間インキュベートした。メチル化 pMD20-*MLH1* を精製するため以下の操作を行った。メチル化溶液に滅菌水 を加え、全量 850 μ L に調節し、フェノール:クロロホルムを 200 μ L 加え、よく攪拌し、遠心分離(4 $^{\circ}$ C, 10,000 x g, 5 min.) 後に上清を新しいマイクロチューブに移した。クロロホルムを 300 μ L 加え、よく攪拌し、遠心分離 (4 $^{\circ}$ C, 10,000 x g, 5 min.) 後に上清を新しいマイクロチューブに移した。上清と等量のイソプロパノールおよび上清の 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウムを加え、転倒混和し、氷上で 15 分間静置した。遠心分離 (4 $^{\circ}$ C, 20,400 x g, 15 min.) し、上清を廃棄した。70 % エタノールを 400 μ L 加え軽く転倒混和し、遠心分離 (4 $^{\circ}$ C, 20,400 x g, 10 min.) し、上清を廃棄した。マイクロチューブの蓋を開け、10 分間静置後、TE を 20 μ L 加え回収した。

このメチル化 pMD20-*MLH1* をヘミメチル化 pMD20-*MLH1* にするため、全量 10 μ L の反応液 (メチル化 pMD20-*MLH1* 1 μ g, M13 primer RV 10 pmol, 1 x NEBuffer 2) を調製し、95 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベート後、氷上で 3 分間静置した。この反応液を 100 μ M BSA, 1 x NEBuffer 2, 3U T4 DNA Polymerase になるよう調製し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。インキュベート後、未反応の一本鎖 DNA の除去するため Exonuclease I (*E. coli*) を 20 U 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートし、PCR clean up を行った。なお、線状化 pMD20-*MLH1* (非メチル化) についても同様の処理を進めた。

2-9. ヘミメチル化 pMD20-*MLH1* を用いた Dnmt1 (646-1616 a. a.) のメチル化活性測定

Dnmt1 変異体 (646-1616 a.a.) とヘミメチル化 pMD20-*MLH1*, 非メチル化 pMD20-*MLH1* を基質として反応させ BS-seq を用いて活性を評価した。

メチル化の反応は全量 30 μ L になるようヘミメチル化 pMD20-*MLH1* 7.5 pmol, 1 x Buffer B, 100 μ M BSA, 160 μ M SAM, 30nM Dnmt1 変異体 (646-1616 a.a.) を調製し 37 $^{\circ}$ C で 1.5 時間インキュベートした。なお、非メチル化 pMD20-*MLH1* も同様に反応させた。メチル化反応後、PCR clean up を行い、滅菌水で 40 μ L で溶出した。メチル化反応液を EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit を用いてバイサルファイト処理し、バイサルファイト後の反応液を KOD Multi & Epi を用い、熱変性(92 $^{\circ}$ C, 2 min.)後、3 step (98 $^{\circ}$ C, 10 sec., 55 $^{\circ}$ C, 30 sec., 68 $^{\circ}$ C, 30 sec.) 40 cycle、最後の伸長(72 $^{\circ}$ C, 2 min.)の条件で PCR した。プライマーは、*MLH1* : Fw. 5'-GTA AGG GGA GAG GAG GAG TT-3', Rv. 5'-AAT ACC TTC AAC CAA TCA CCT C-3'を用いた。DNA シーケンサーを用いてアンプリコンの配列の解析を行った。

2-10. 新規メチル化解析法を用いた B16 melanoma 細胞集団のメチル化解析

B16 melanoma 細胞の tyrosinase promoter のメチル化を Dnmt1 変異体 (646-1616 a.a.) を用いた新規解析法と従来の BS-seq で解析し比較した。

B16 melanoma 細胞を解凍し、DMEM を 5 mL 加え細胞懸濁液とした。この細胞懸濁液 50 μ L に、0.25 % トリパンブルーを 50 μ L 加え、血球計算盤を用いて生細胞数を算出した。60 mm dish (No-treated) に DMEM を 3 mL 加え、3.0 x 10⁵ cells/dish になるように播種し、37 $^{\circ}$ C, CO₂ 濃度 5 % で 1 日間培養した。1 週間に 2 回のペースで培地交換を行い、60-80 % コンフルエントになるまで培養した。100 mm dish (No-treated) に切り替え、dish 内の培地を吸引除去し、DPBS を 3 mL 加え軽く攪拌した後これを吸引除去した。0.25 % Trypsin を 1 mL 加え、DMEM を 3 mL 加え反応を停止させた。遠心分離(20 $^{\circ}$ C, 190 x g 5 min.)し、上清のみを吸引除去後、DMEM を 5 mL 加え、細胞懸濁液とした。細胞懸濁液 50 μ L に、0.25 % トリパンブルーを 50 μ L 加え、7.15 x 10⁵ cells/dish x 3 枚分になるようにファルコンに溶

液を移し、DMEM 培地を全量 30 mL になるように加えた。100 mm dish にこの溶液を 10 mL 加え、37 °C、CO₂ 濃度 5 % に入れ、1 日間培養し、細胞が 80 % コンフルエントになるまで培養した。

dish 内の培地を吸引除去し、DPBS を 3 mL 加え軽く攪拌した後、DPBS を吸引除去した。0.25 % Trypsin を 1 mL 加え、dish を軽く叩きながら細胞を剥がし、DMEM を 3 mL 加え反応を停止させた。DMEM を 5 mL 加え細胞懸濁液とした。NucleoSpinTMTriPrep を用いて gDNA の抽出を行った。

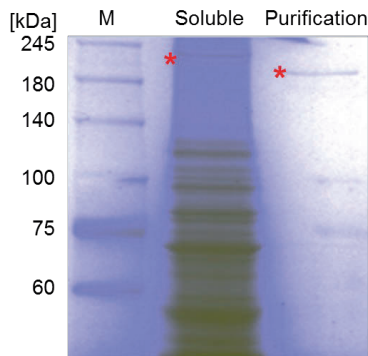
抽出した gDNA 1 µg を超音波で 5 秒間処理し、この超音波処理した gDNA 1 µg、tyrosinase promoter の Fw primer (5'-GGT GGG AAA GAG TTA CAA AAG GCC C-3') 10 pmol, 1 x NEBuffer 2 を調製し、95 °C で 5 分間インキュベート後、氷上で 3 分以上急冷した。この反応液に 100 µM BSA, 1 x NEBuffer 2, 3 U T4 DNA Polymerase を調製し、37 °C で 10 分間インキュベートした。Exonuclease I (*E. coli*) を 20 U 加え、37 °C で 1 時間インキュベートし、PCR-clean up を行い、滅菌水で 40 µL で溶出した。全量 30 µL 中に sample 20 µL, 1 x Buffer B, 100 µM BSA, 160 µM SAM, Dnmt1 変異体(646-1616 a.a.)を加え 37 °C で 1.5 時間反応させた。PCR-clean up を行い、滅菌水 40 µL で溶出した。

バイサルファイト処理を行った。また、抽出後に処理を行っていない gDNA も同様にバイサルファイト処理した。バイサルファイト後の反応液を KOD Multi & Epi を用い、熱変性(94 °C, 4 min.)後、3 step (98 °C, 10 sec., 58 °C, 30 sec., 68 °C, 1 min.) 40 cycle、最後の伸長(68 °C, 5 min.)の条件で PCR した。プライマーは Fw. 5'-GGT GGG AAA GAG TTA TAA AAG GTT T-3', Rv. 5'-AAA TAA CAC TAC TCC ATA AAA AAA A-3'を用いた。DNA シーケンサーを用いて配列を解析した。

3. 結果及び考察

3-1. Dnmt1 (full-length) の発現確認

以下の Fig.4 に、Dnmt1 (full-length) の発現および tag の切断を含む精製を確認するために精製前の可溶画分の



Target molecular weight : Tags-hDnmt1 : 215 kDa, hDnmt1 : 186 kDa,
Calculation molecular weight : Tags-hDnmt1 : 222 kDa, hDnmt1 : 197 kDa

Fig.4 Dnmt1 (full-length)の発現および精製の確認

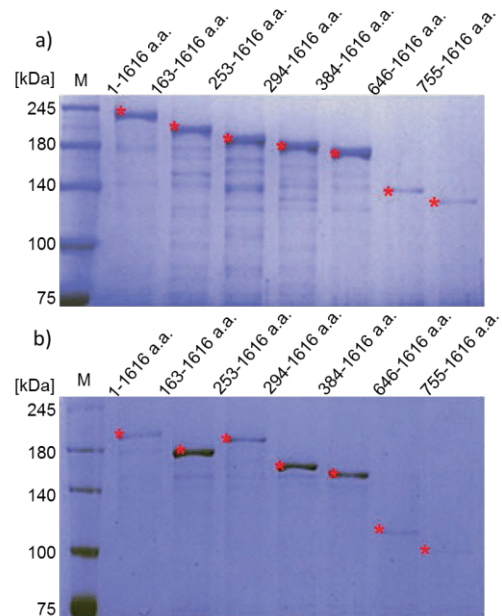
(Soluble) と精製後の精製画分 (Purification) を流した SDS-PAGE の結果を示す。Fig.4 より、可溶画分における目的タンパク質(Tags-Dnmt1)(目的分子量 : 215 kDa)、精製画分の目的タンパク質(Dnmt1)(目的分子量 : 186 kDa)のバンドが目的分子量付近に確認できた。精製画分において、可溶画分と比較し目的分子量付近のバンド以外にバンドが確認されなかったことから、Dnmt1 の精製が行えたと考えた。

3-2. Dnmt1 変異体の発現確認

以下の Fig.5 a) に tag の切断、精製前の Tags-Dnmt1 (1-1616 a.a.), (163-1616 a.a.), (253-1616 a.a.), (294-1616 a.a.), (384-1616 a.a.), (646-1616 a.a.), (755-1616 a.a.), b) に tag の切断および精製後の Dnmt1 (1-1616 a.a.), (163-1616 a.a.), (253-1616 a.a.), (294-1616 a.a.), (384-1616 a.a.), (646-1616 a.a.), (755-1616 a.a.)を SDS-PAGE した結果を示した。

a)より、すべてのレーンにおいて目的分子量付近にバンドを得ることができた。この結果から、目的タンパク質が発現していることが示唆された。次に b) より、精製後の画分において、253-1616 a.a. 以外のレーンにおいて目的分子量付近にバンドを確認することができた。しかし、253-1616 a.a. においては tag を切断する前の Tags-Dnmt1 (253-1616 a.a.)と同じ分子量の位置にバンドが確認された。

Tags-Dnmt1 (253-1616) の tag を切断することが出来なかった理由として、プロテアーゼ認識部位が当該タンパク質の立体構造の内側に入り込んでしまい、プロテアーゼが認識できなくなってしまったことが原因である可能性が考えられる。



Target molecular weight (Tags-Dnmt1/Dnmt1 kDa)
1-1616 a.a.: (214/185 kDa), 163-1616 a.a.: (194/165 kDa), 253-1616 a.a.: (183/54 kDa), 294-1616 a.a.: (179/150 kDa), 384-1616 a.a.: (174/145 kDa), 646-1616 a.a.: (139/110 kDa), 755-1616 a.a.: (126/97 kDa)
Calculated molecular weight
1-1616 a.a.: (220/198 kDa), 163-1616 a.a.: (198/180 kDa), 253-1616 a.a.: (190/191 kDa), 294-1616 a.a.: (185/166 kDa), 384-1616 a.a.: (175/158 kDa), 646-1616 a.a.: (135/114 kDa), 755-1616 a.a.: (124/100 kDa)

Fig.5 Dnmt1 変異体の発現および精製の確認

い箇所が観察された。

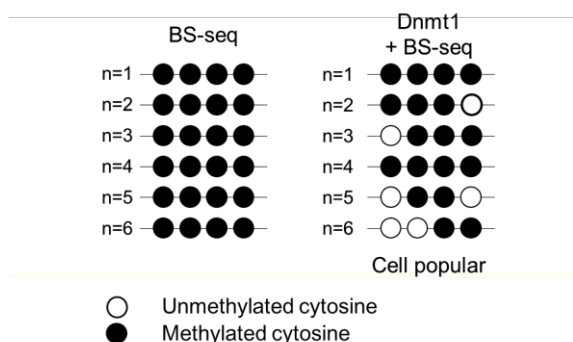


Fig.8 tyrosinase promoter のメチル化解析結果

4. まとめ

6種類の変異体を作製し、*de novo* 活性およびヒドロキシメチル化シトシンに対する活性が低く、高い維持型活性を有した Dnmt1(646-1616 a.a.)を得ることができた。

また、Dnmt1 変異体を用いた新規メチル化解析法を tyrosinase の promoter 領域のメチル化解析に適用した結果、従来の BS-seq 法の解析結果と異なる結果が得られた。この結果から、新規メチル化解析法はヒドロキシメチル化による影響を排除し、従来の解析法と異なる結果が得られることが示唆され、従来法よりもより正確に DNA のメチル化を解析できる手法になり得る可能性がある。

5. 参考文献

- 1) 伊藤 裕子, “生体の遺伝子発現制御機構であるエピジェネティクス研究の最近の動向”, 科学技術動向 99, 9-21 (2009)
- 2) Pim van der Harst, et al., “Translational Perspective on Epigenetics in Cardiovascular Disease”, *J Am Coll Cardiol.*, 70, 590-606 (2017)
- 3) Yukie Yoda, et al., "Integrated analysis of cancer-related pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancer", *Gastric Cancer*, 18, 65-76 (2015)
- 4) Kazuaki Miyamoto, et al., "Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers", *Oncogene*, 22, 274-280 (2003)
- 5) 牛島俊和, “エピジェネティクスと疾患-基礎メカニズムと解析手法の最新知見からがん・神経・代謝・アレルギー疾患などへの応用まで”, 羊土社 (2010)
- 6) Hirotsune S., et al., "New Approach for Detection of Amplification in Cancer DNA Using Restriction Landmark Genomic Scanning", *CANCER RESEARCH*, 52, 3642-3647 (1992)
- 7) Ushijima T., et al., "Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation

of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96, 2284-2289 (1997)

- 8) Cindy A. Eads, et al., "MethylLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation", *Nucleic Acids Research*, *Nucleic Acids Research*, 28, e32-00 (2000)
- 9) Huichuan Yu., et al., "Novel Assay for Quantitative Analysis of DNA Methylation at Single-Base Resolution", *Clinical Chemistry*, 65, 644-673 (2019)
- 10) R Alan Harris., et al., "Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications", *Nature Biotechnology*, 28, 1097-1105 (2010)
- 11) Michael Weber., et al., "Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells ", *Nat. Genet.*, 37, 853-62 (2005)
- 12) Michael J Booth, et al., "Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution", *Science*, 336, 934-7 (2012)
- 13) Miao Yu, et al., " Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome", *Cell*, 149, 1368-80 (2012)
- 14) Laszlo, A. H. et al., "Detection and mapping of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine with nanopore MspA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 18904-18909 (2013)
- 15) Schreiber, J. et al., "Error rates for nanopore discrimination among cytosine, methylcytosine, and hydroxymethylcytosine along individual DNA strands", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 18910-18915 (2013).
- 16) Simpson, J. T. et al., "Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing", *Nat. Methods*, 14, 407-410 (2017).
- 17) McIntyre, A. B. R. et al., "Single-molecule sequencing detection of N6-methyladenine in microbial reference materials", *Nature Communications*, 10, 579 (2019).
- 18) Rand, A. C. et al., "Mapping DNA methylation with high-throughput nanopore sequencing", *Nat. methods*, 14, 411-413 (2017).
- 19) Qian Liu., et al., "Detection of DNA base modifications by deep recurrent neural network on Oxford Nanopore sequencing data", *Nature Communications*, 10 (2019)
- 20) Otani J., et al., "Cell cycle-dependent turnover of 5-hydroxymethyl cytosine in mouse embryonic stem cells", *PLoS One*, 8(12), e82961 (2013)
- 21) Yamada H., et al., "Absence of germline mono allelic promoter hypermethylation of the CDH1 gene in gastric cancer patients", *Mol Cancer.*, 8, 63 (2009)
- 22) Miyakura Y., et al., "Haplotype defined by the MLH1

93G/A polymorphism is associated with MLH1 promoter hypermethylation in sporadic colorectal cancers", *BMC Res Notes.*, 7, 835 (2014)