

提出日：平成 28 年 6 月 8 日

平成 27 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名		DNA メチル化酵素を用いたヒドロキシメチルシトシン同定法の確立	
研究代表者	氏名	幸田 尚	
	所属機関名・部局名	東京医科歯科大学・難治疾患研究所	
	職名	准教授	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)		<input type="radio"/>	共同研究員
		<input type="radio"/>	国際共同研究課題
		<input type="radio"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題
		<input type="radio"/>	客員フェロー
蛋白研受入担当教員名		田嶋正二	
<p>本研究では mC、hmC を区別して塩基単位で解析を行う新しい手法を考案し、Enzyme Assisted Identification Genome Modification Assay (EnIGMA)法と命名した。本法は維持メチル化酵素である DNMT1 が hemi-mC の逆鎖のシトシンのみをメチル化する特異性を利用し、mC と hmC を区別する方法である。解析の手順は以下のような単純なものである。まず、ゲノムを制限酵素で切断後、ヘアピンを形成する合成 DNA を末端に結合する。これをプライマーとして DNA polymerase を用いて逆鎖の合成を行う。その後、この DNA を DNMT1 酵素で処理することによりメチル化を行う。この際、CpG のシトシンがメチル化されていた場合にのみ DNMT1 によってメチル化される。DNMT1 処理後の DNA を bisulfite 処理してから PCR 増幅し配列を決定することにより、元の配列と連結された逆鎖の対応部分のメチル化状態をあわせて解析することで C、mC、hmC を同定することを可能にすることが可能となる。EnIGMA 法をゲノムワイドのシトシン修飾の解析に適用するため、次世代シーケンサー用のライブラリを作成するためのプロトコールの構築を行った。ゲノムの切断ステップに、認識配列に CpG を含む酵素を用いることで CpG rich な領域を濃縮して解析する Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS)に準じたプロトコールを応用し、実際に Illumina 社の次世代シーケンサーを用いた解析を行った。</p> <p>すでにこれまで、他のグループから、1 塩基解像度で hmC を同定する手法が提案されている。主なものとして挙げられる oxBS と Tab-seq は 1 塩基の解像度で hmC を同定できるが、同一分子上で mC と hmC を同定することができない。通常の bisulfite 法の結果と比較することで mC との比を推定することはできるが、直接 mC、hmC、C を同一分子上で同定することはできない。これに対して EnIGMA 法は mC、hmC、C を同一分子上で同時に同定できるため、これら修飾の存在比を正確に解析できるだけでなく、そのパターンを平均値としてではなく直接示することができる点で、大きなメリットがある。本研究で確立することができた EnIGMA 法は、広くエピゲノム研究における新しいスタンダードとして様々な研究に適用が可能である。</p>			