

平成 29 年度 TIA 連携プログラム探索推進事業「かけはし」 調査研究報告書(公開版)

【研究題目】「高速エピゲノムプロファイリングシステム構築に向けた設計指針の調査研究」

【整理番号】TK17-016

【代表機関】産業技術総合研究所

【調査研究代表者（氏名、連絡先 TEL & Mail）】
栗田僚二、029-861-9496、r.kurita@aist.go.jp

【TIA 内連携機関：連携機関代表者】

筑波大学：鈴木博章
東京大学：南豪

【TIA 外連携機関】

なし

【報告書作成者】
栗田僚二

【報告書作成年月日】
2018/3/22

【連携推進（具体的な連携推進活動内容とその活動の効果等）】

高速なエピゲノムプロファイリングの実現には、新規分析手法の構築だけでなく材料化学、デバイスエンジニアリング、統計解析技術など多くの要素技術を結集する必要がある。新規な生体分析ツールの研究開発を行っている TIA 連携機関が高速エピゲノムプロファイリングというキーワードで結集することで、エピゲノム解析を何処まで高度化できるのか、また高度化によって期待される診断・創薬・エネルギー分野などでの市場調査を行い、それらに合わせた設計指針を模索した。また、現行機関で不足している要素技術の洗い出しも同時に行った。

現在の医療診断では、イオン、ペプチド、タンパクなど様々な生体分子濃度を計測している。疾病は遺伝子発現状態の異常に起因していると考えられ、上記の生体分子濃度異常は、なんらかの遺伝子発現状態が変化した結果である。つまり、セントラルドグマの最上流に位置するエピゲノム情報を疾病診断へ応用することにより、疾病の超早期診断や発症・進行予測などへの応用が期待できる。加えて、定量的診断が困難な精神疾患への応用も示唆され社会的インパクトも大きい。さらに、遺伝子発現異常を正常状態に戻すこと、つまりエピゲノムパターンを正常状態に戻す新規な創薬アプローチが急速に注目を集め、エピゲノムプロファイリング技術は診断だけではなく、創薬分野にも大きなインパクトがある。さらに環境適応力のあるバイオマス探索や食品機能学にエピジェネティクス情報が用いられる等、エネルギー、環境、食品、衛生分野など幅広い展開が見込めることが判った。

上記のようにエピゲノム解析は幅広い分野への展開が見込めるものの、現行法は極めて煩雑かつ時間がかかるため、その応用・産業化は現時点では限定的である。高速なエピゲノムプロファイリングが実現することによって、多くの社会的課題の解決が見込めると考えられる。

【調査研究内容（実験等中心に背景・課題と実行された課題解決の内容と結果）】

DNA のメチル化による後天的遺伝子発現変化（エピジェネティクス）は発生・分化のみで無く、癌や精神疾患など多岐にわたる疾病との関連が報告され、その分析の重要性が増している。我々は過去にビオチン化プローブを用いたエピゲノムセンサを開発し、既知遺伝子のメチル化率の迅

速計測について報告している。しかしながら、配列未知の DNA をマイクロ流路内で固相化することは難しく、ゲノムワイドな計測には至っていない。高速エピゲノムプロファイリングシステム構築の課題の1つとして、ゲノム DNA を機器に導入するだけで固定化出来るようなリンカー材料の開発がキーポイントとなると考えた。そこで、ゲノムの配列に依存せずマイクロ流路内に固相化可能な新規リンカー分子を合成し、ゲノムワイドなメチル化率計測を目指したマイクロ流路センサを開発した。

マイクロ流路内で高効率にゲノム DNA を捕捉するために、ナイトロジェンマスタード構造とチオール構造を有する分子 (L1) を新規に合成した。ナイトロジェンマスタードは第1世代抗がん剤として知られており、そのメカニズムは DNA 二重鎖中のグアニンの N7 位に共有結合するアジリジニウムイオンを形成し、鎖間架橋が生じるためである。本研究では表面プラズモン共鳴 (SPR) による迅速なメチル化分析を目的として、ナイトロジェンマスタードとチオール基を有する L1 を作成し、ゲノム DNA の捕捉とその後の免疫測定をおこなった。

メチル化 DNA を検出するためのアッセイは、(i) L1 によるインタクト DNA の架橋と SPR センサチップへの固定、(ii) DNA 内に存在する修飾核酸の抗体による認識、の2ステップ (図 1A) で分析を行った。化合物 L1 とオリゴ DNA を混合し、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) から、化合物 L1 が DNA 二本鎖に架橋することを明らかにした。さらに化合物 L1 によって架橋された DNA は、金-チオール結合を介して SPR の金センサ表面上に固定化されることを確認できた。さらに SPR に基づくイムノアッセイでは、センサ表面上に固定化された DNA 中の 5-mC や 5-hmC が抗体によって高効率に認識されることを確認できた。シトシンのメチル化率が増加するにつれて SPR 応答は増加 (図 1B)、メチル化率と SPR 応答間で高い相関を観察することができ (図 1C)、化合物 L1 による免疫化学的なオンチップエピゲノム解析の有用性を示すことができた。

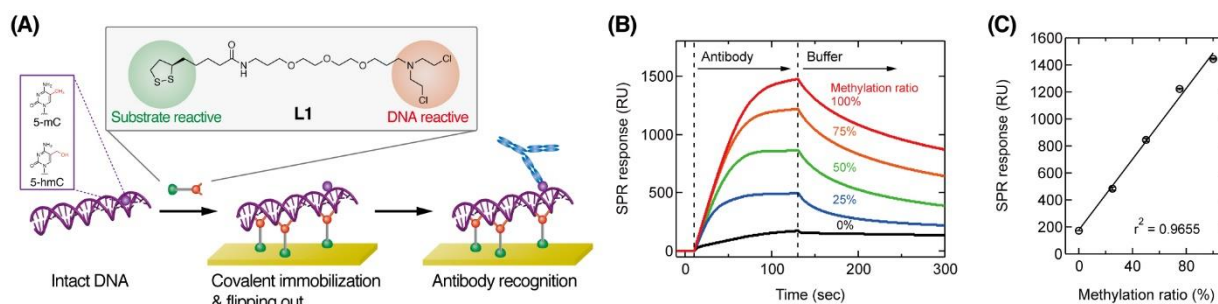


Figure 1 (A) Schematic image of the immobilization of intact DNA crosslinked by L1, followed by SPR-based immunoassay for detecting modified nucleobases. (B) SPR sensorgrams displaying the binding response between anti-mC antibody and 5-mC in immobilized DNA as a function of time. (C) Plot of the SPR response at 120 sec as a function of the methylation ratio of immobilized DNA.

【今後の活動予定】

今後、編成した研究チームを中心として大型予算の獲得を目指したい。まずは JST/AMED 先端計測分析技術・機器開発プログラムでの獲得を目標とする。その後は、各分野での応用に合わせ診断、創薬、エネルギー、食品、衛生分野などへ展開して実用化を行っていきたい。

以上