

改変型DNAメチル化酵素および それを用いたDNAメチル化解析法

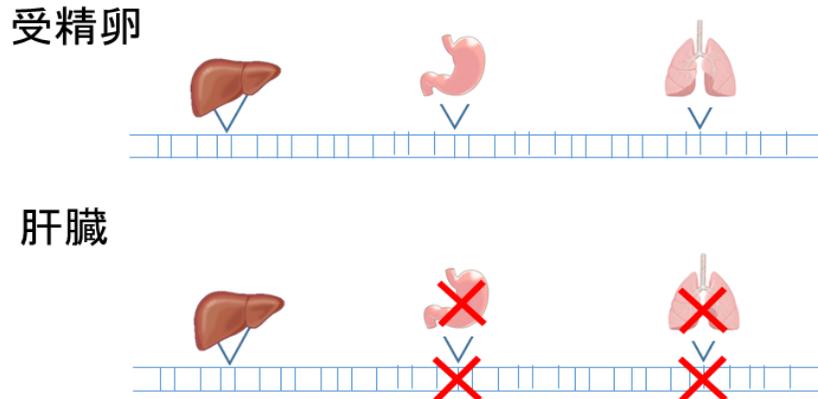
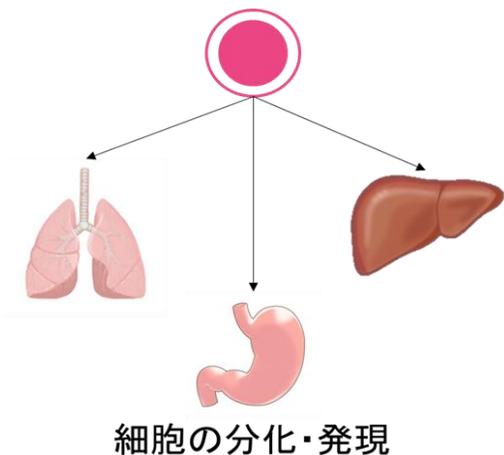
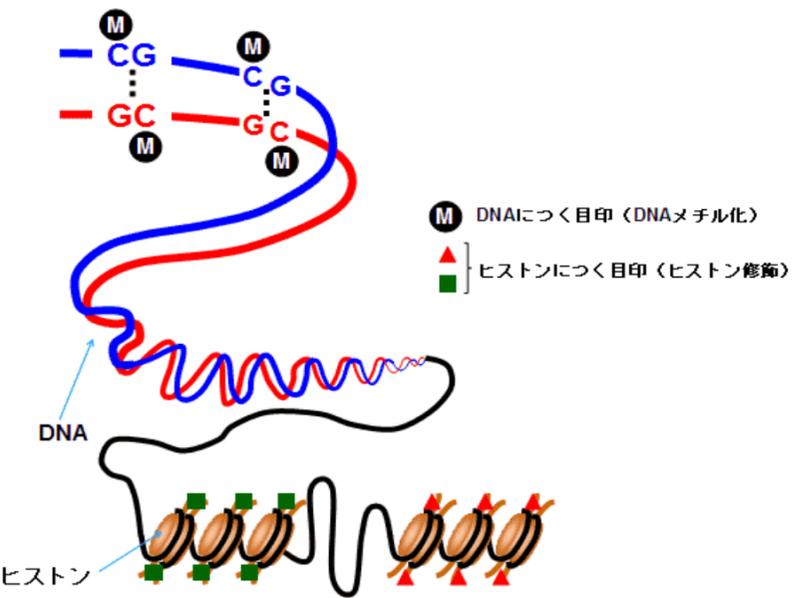
神奈川工科大学応用バイオ科学部
応用バイオ科学科

教授 飯田 泰広

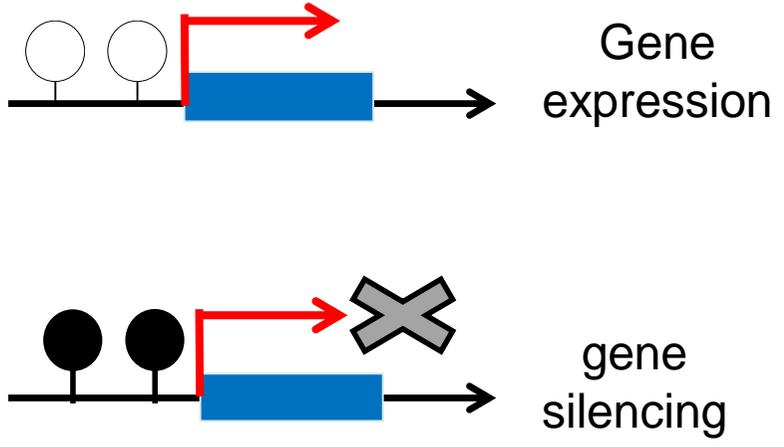
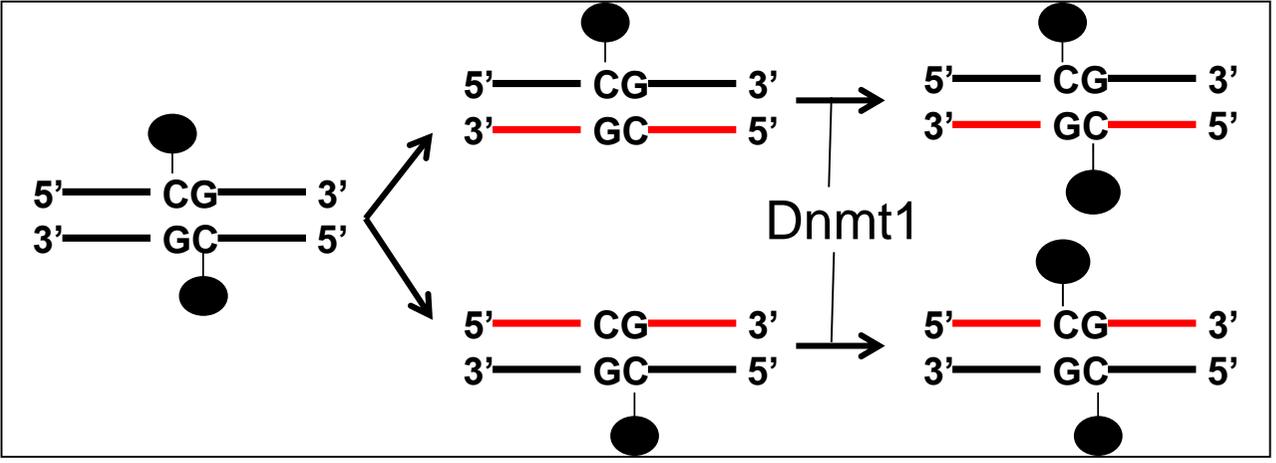
2019年8月27日

エピジェネティクスとは

クロマチンへの後天的な修飾により遺伝子発現が制御されることに起因する遺伝学的あるいは分子生物学的現象



DNAメチル化の維持と遺伝子発現



エピジェネティクスと病気

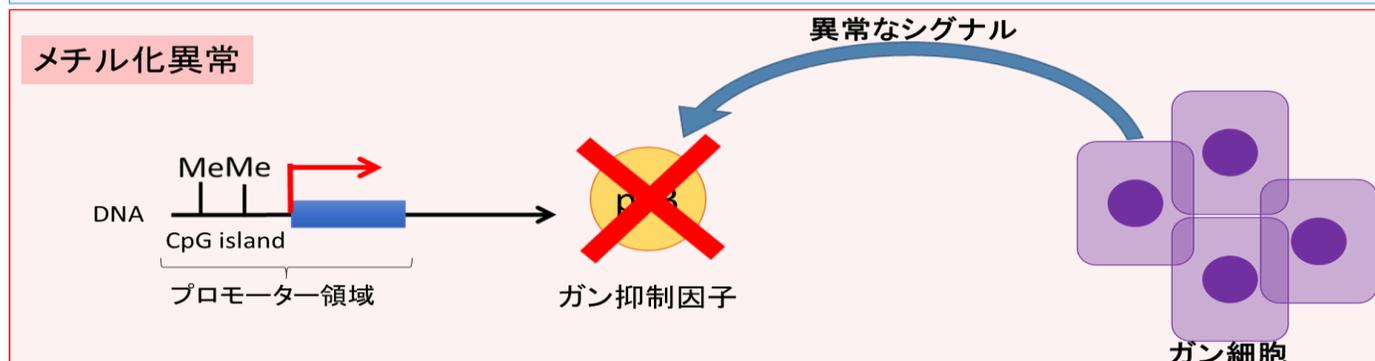
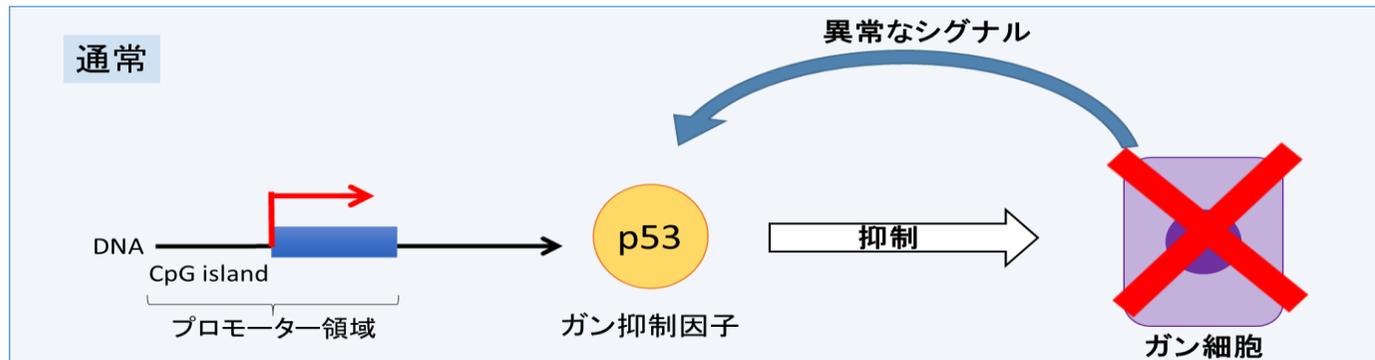
◎がん関連

DNAのメチル化異常： 大腸がん、肝がん、前立腺がん、急性骨髄性白血病、乳がん、肺がん、膀胱がん など

ヒストン修飾異常： 前立腺がん、乳がん、膀胱がん、胃がん、肺がん、肝がん、腎がん、ろ胞性リンパ腫、神経芽細胞腫 など

◎その他：

糖尿病、高血圧、アレルギー性疾患、神経変性疾患、精神疾患、脂肪細胞機能の変化 など



メチル化解析

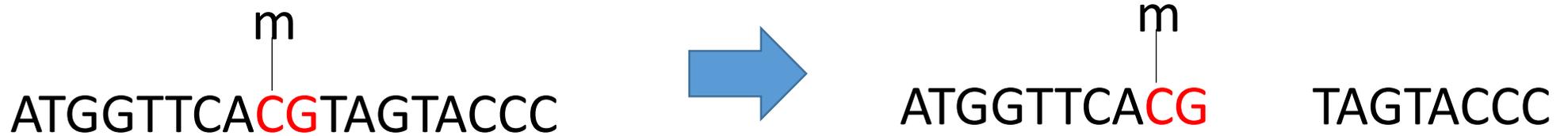


- ・正確な診断ができる
- ・基礎研究
- ・薬剤開発
- ・再生医療

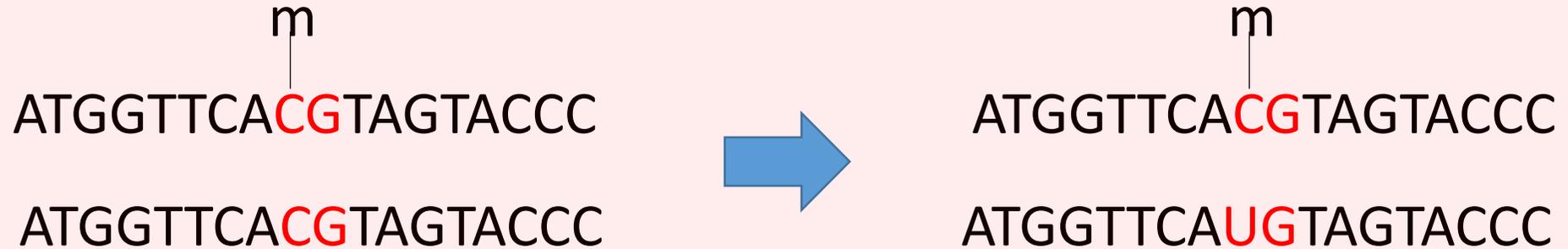
エピジェネティクスの解析法1

ATGGTTCACG TAGTACCC

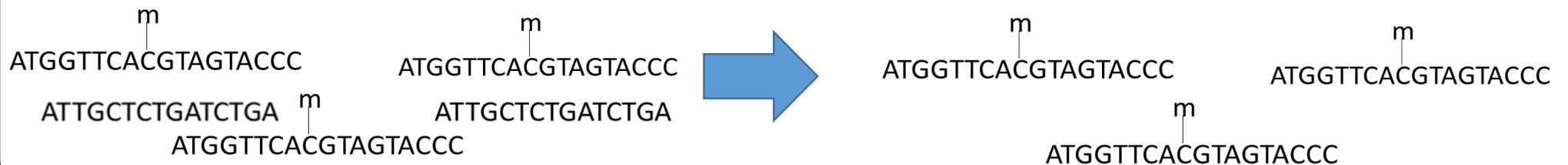
切断 (メチル化感受性制限酵素)



変換 (バイサルファイト処理)

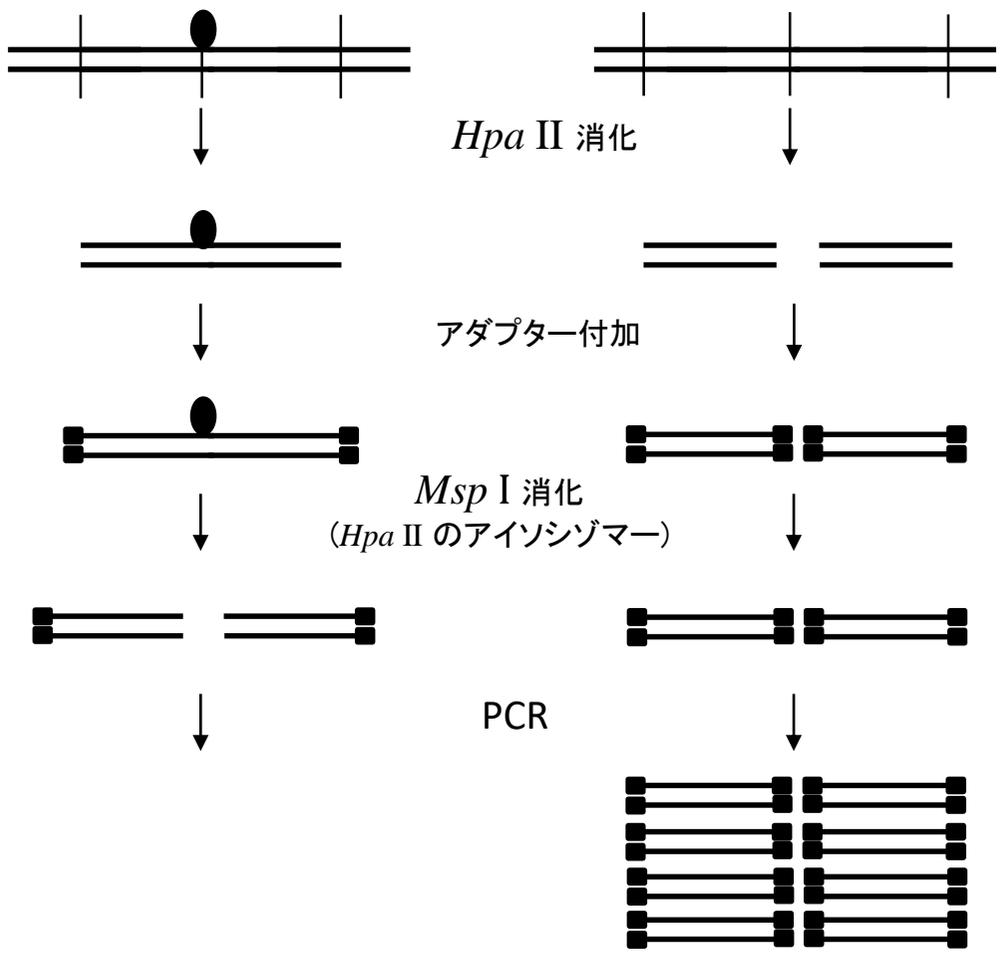


濃縮 (メチル化CpGに特異的に結合するタンパク質)

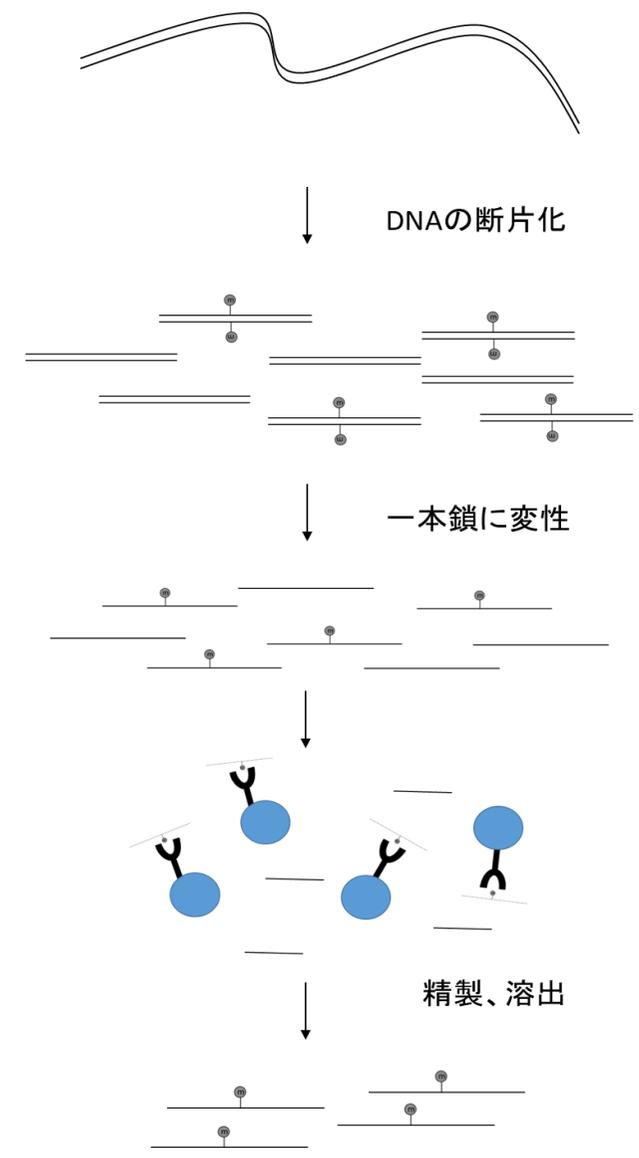


エピジェネティクスの解析法2

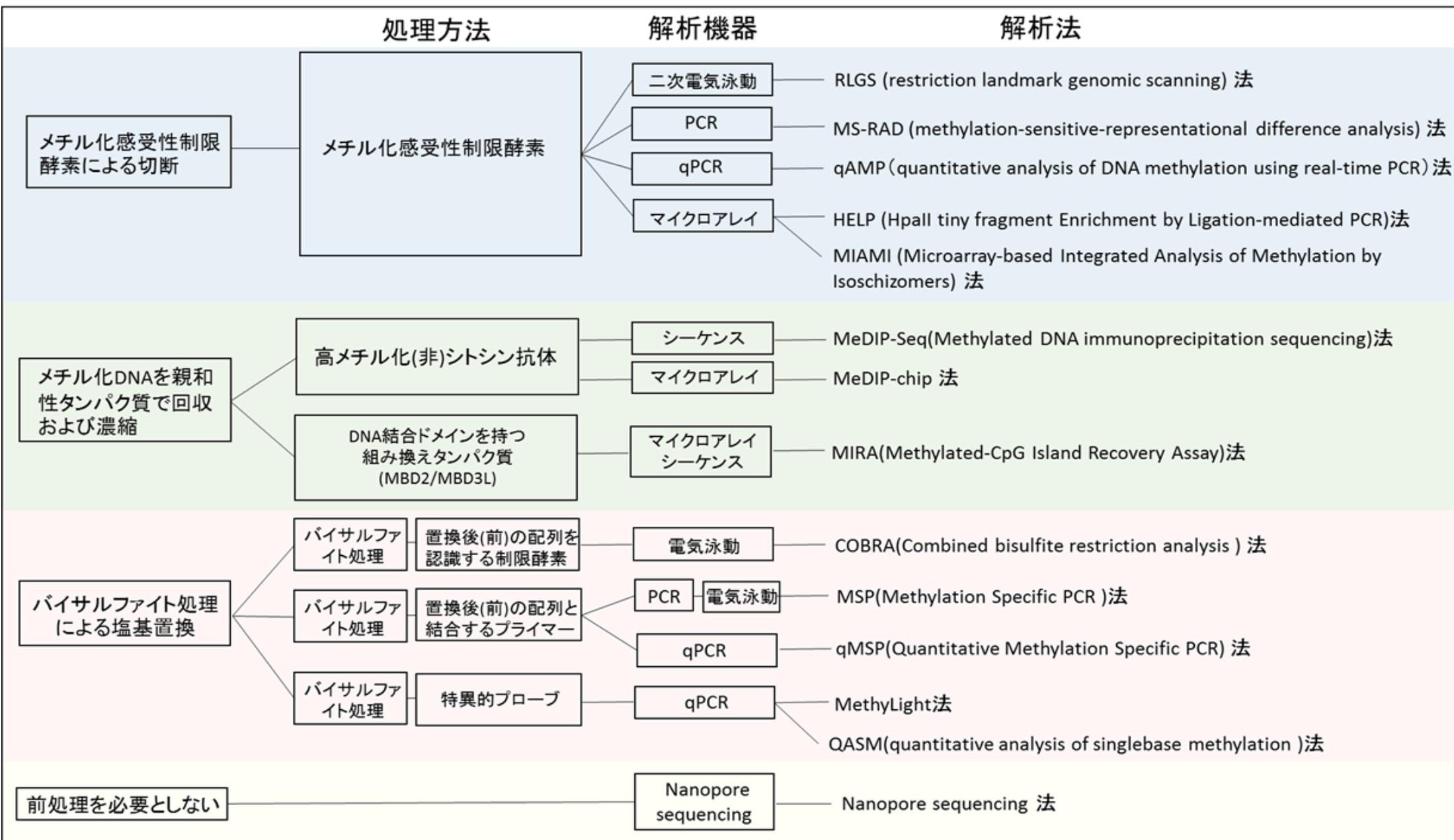
MIAMI法



メチル化DNA免疫沈降法
(MeDIP法)



エピジェネティクスの解析法3



メチル化の位置を特定できるのはバイサルファイトシーケンスのみ

バイサルファイトシーケンスの原理

Bisulfite sequencing (BS-seq)

非メチル化領域

メチル化領域

ACGTTA^mCGGT^mCGA

Sodium
bisulfite

シトシン→ウラシル

シトシンのまま

AUGTTA CGGT CGA

チミンとして検出

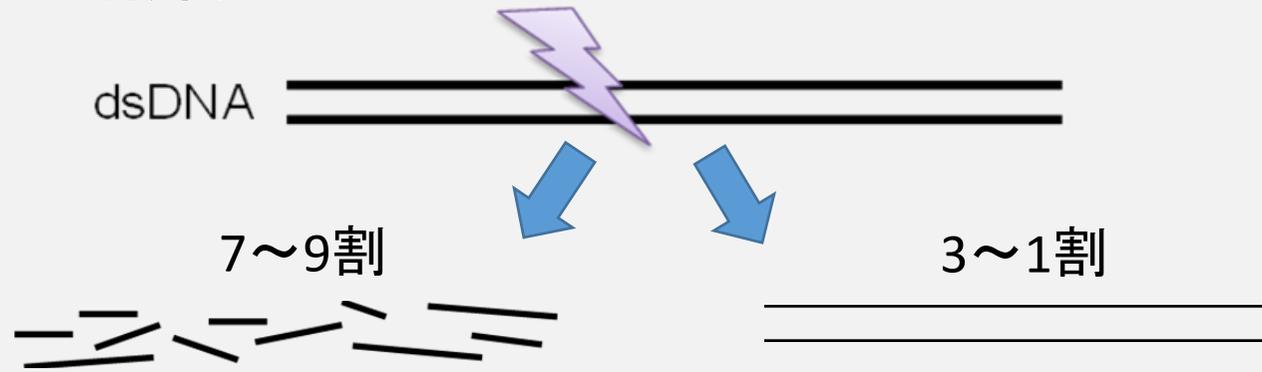
Sequence シトシンとして検出

ATGTTA CGGT CGA

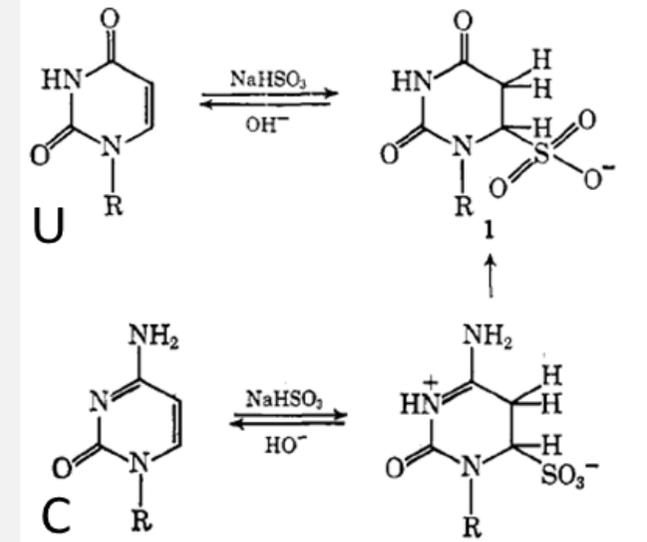


バイサルファイト処理の問題点

① DNAの断片化

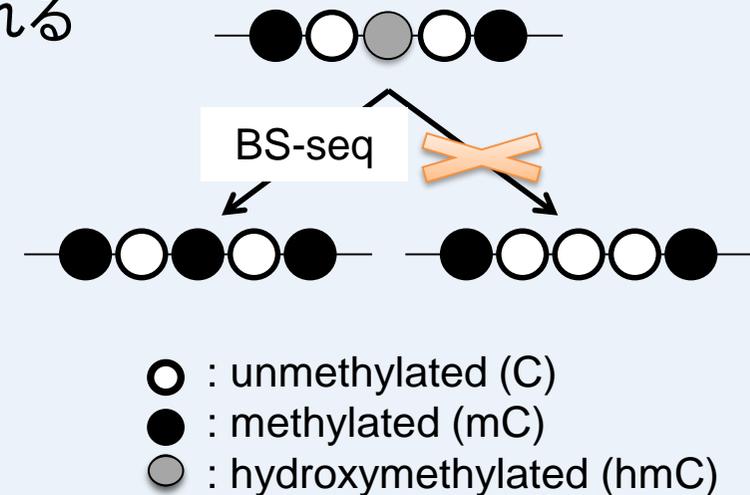
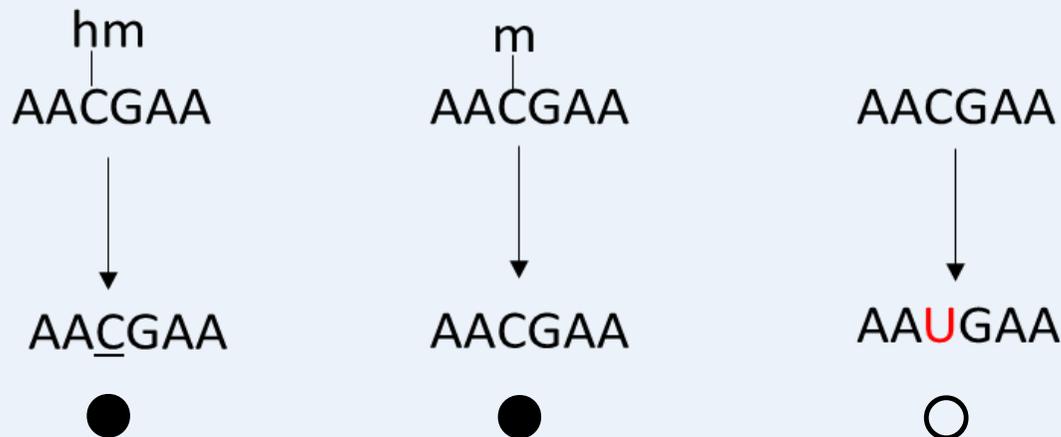


・鋳型量が必要 → シングルセルでは困難



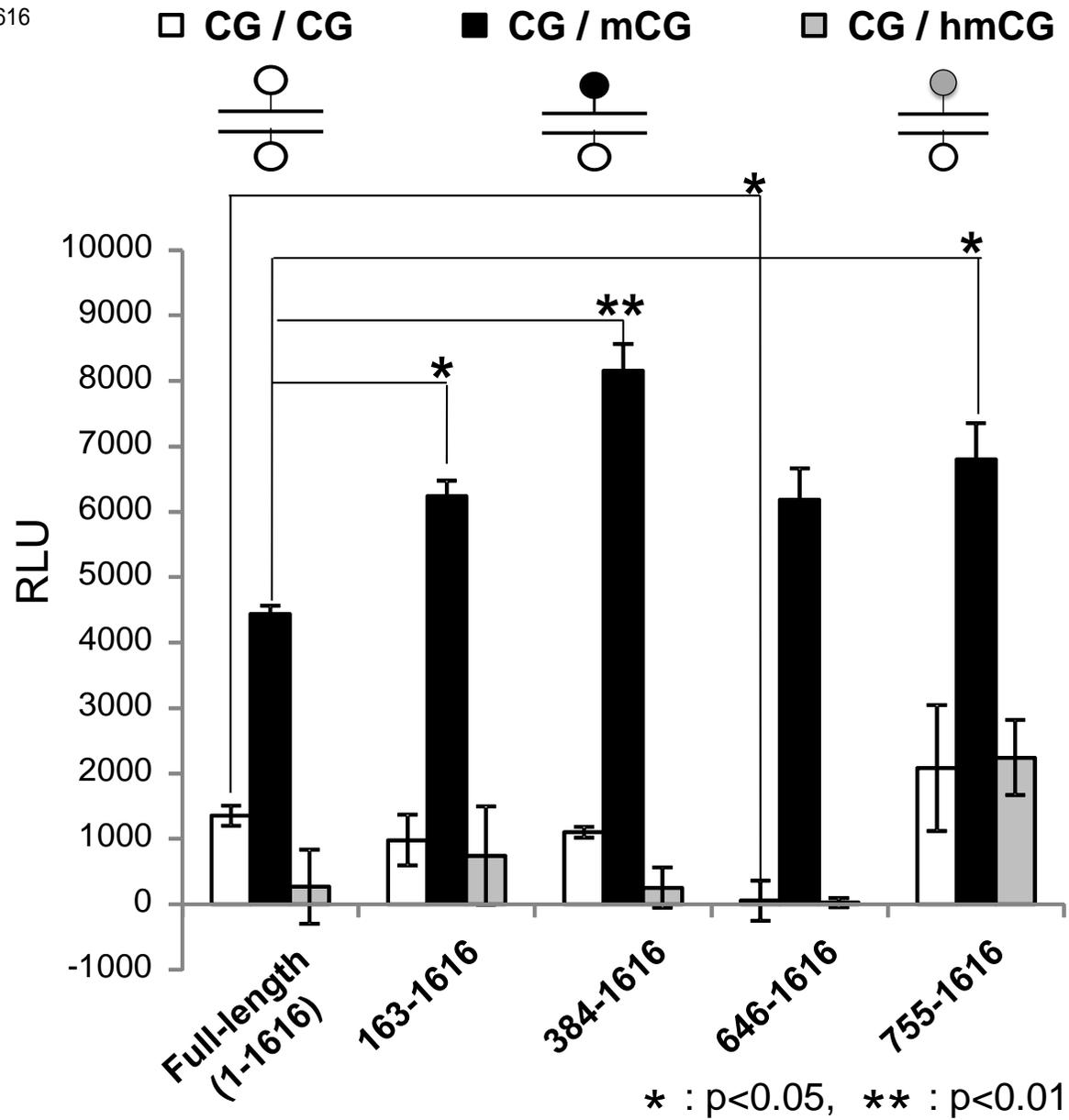
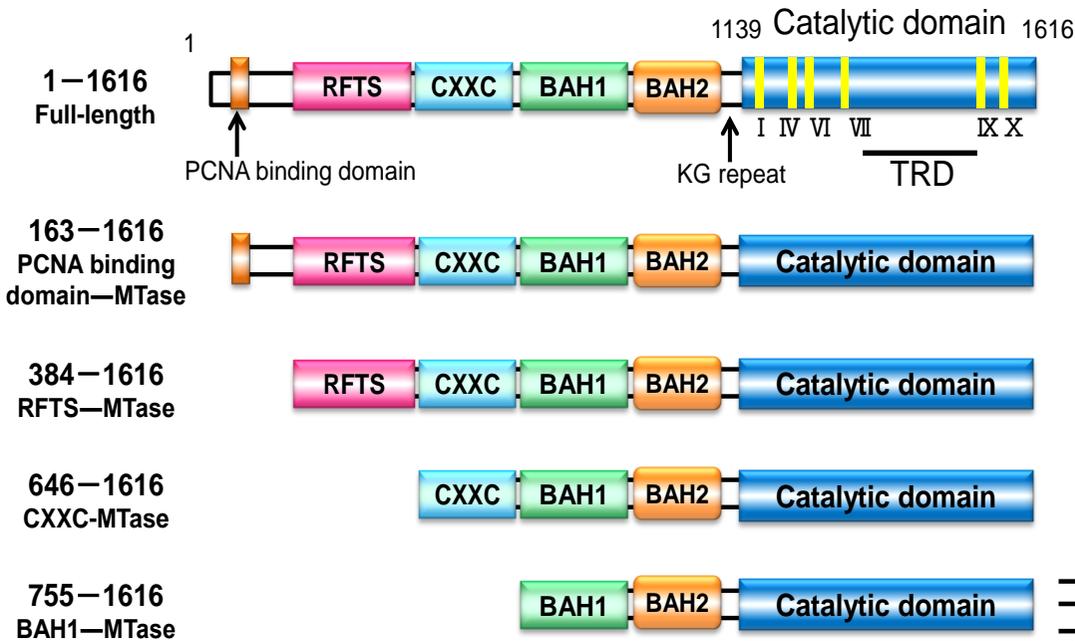
バイサルファイト反応

② ヒドロキシメチル化についてもメチル化と同様に交換される

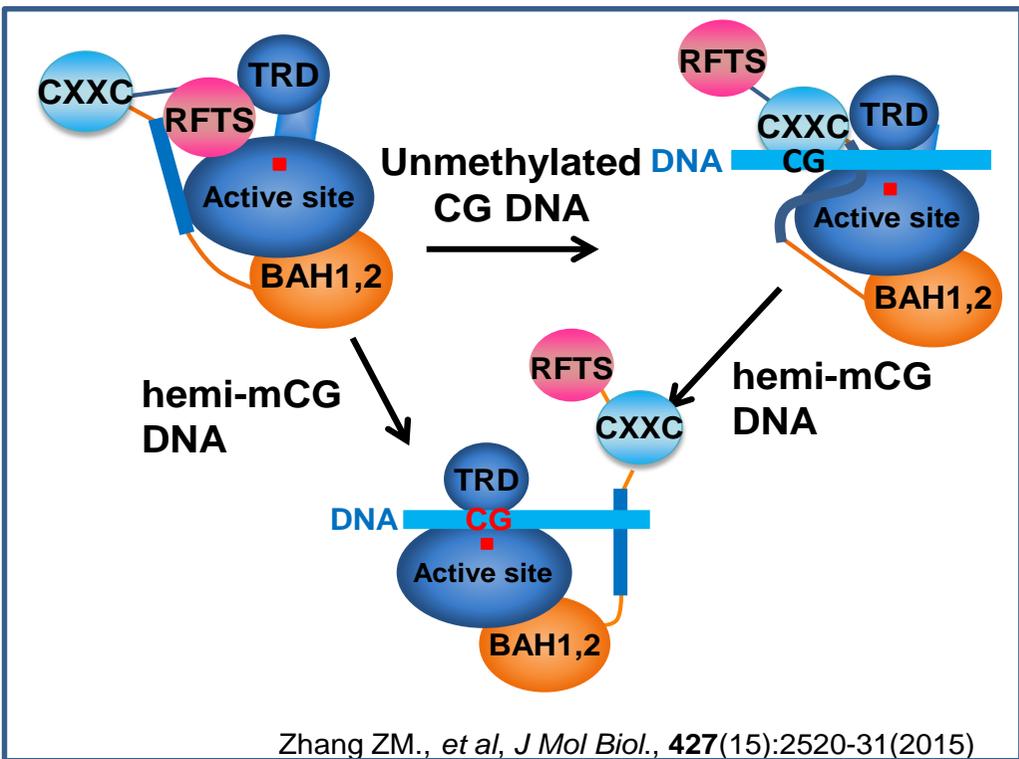


・ヒドロキシメチルは生物的には非メチルと同義 → 誤った解析結果

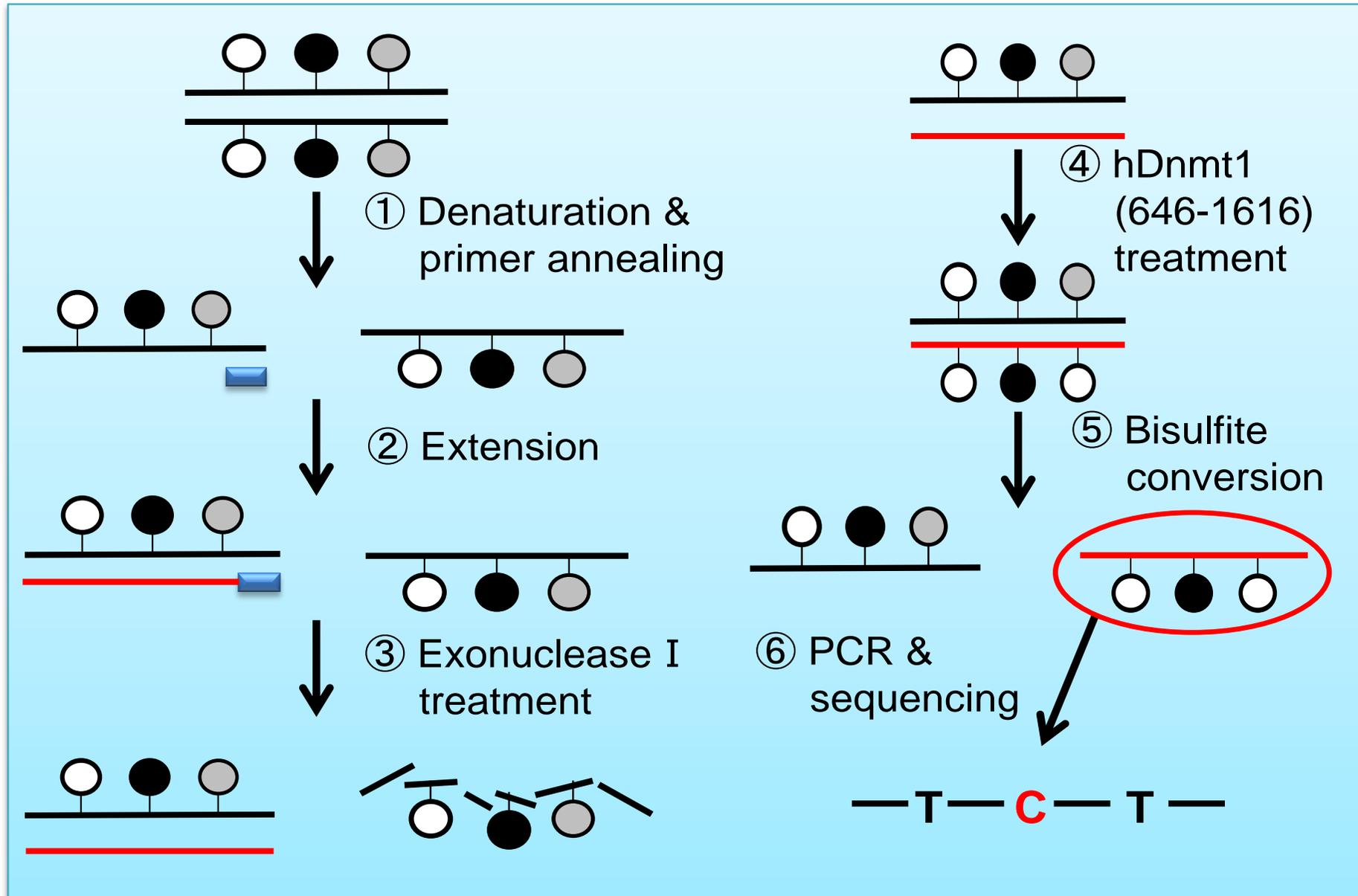
Dnmt1のサブクローニングと活性評価



646-1616 of hDnmt1 was able to reduce *de novo* activity

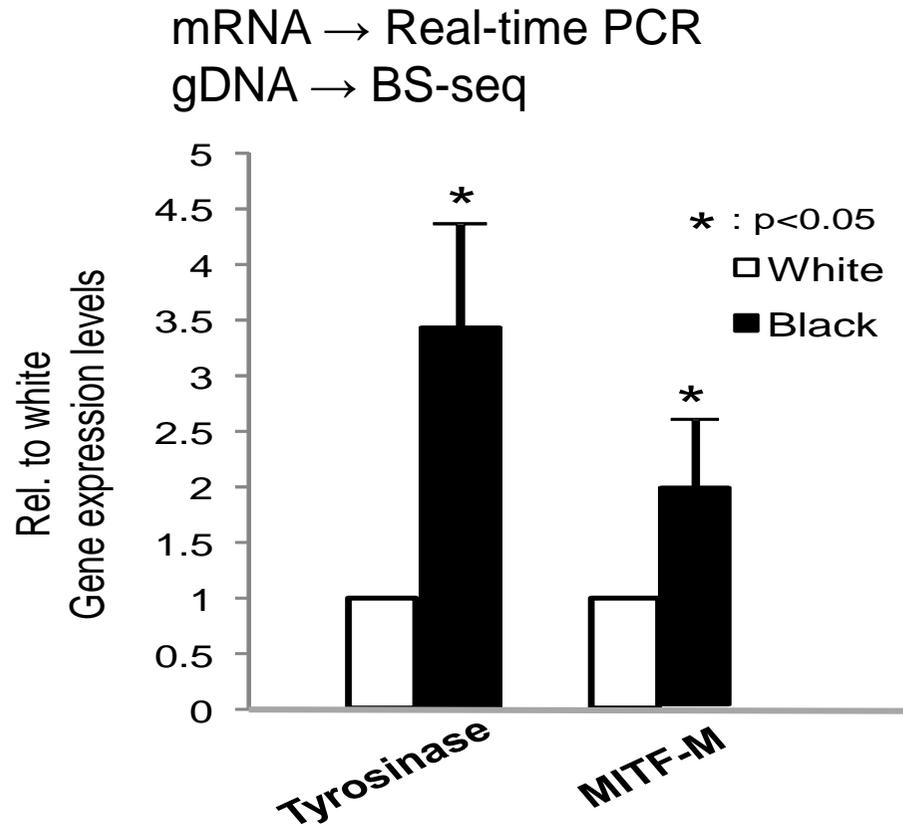
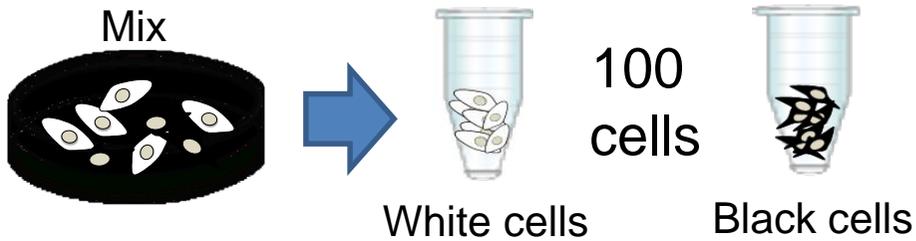


ヒドロキシメチル化部位を特定可能

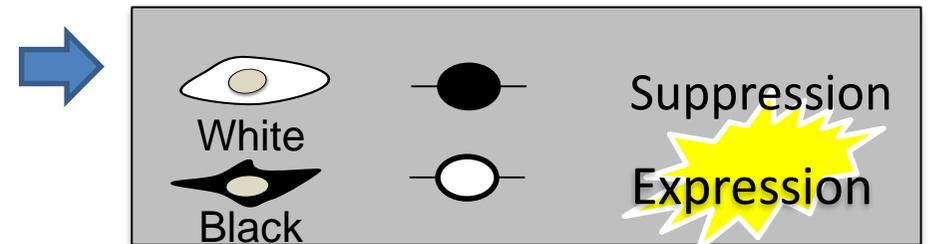
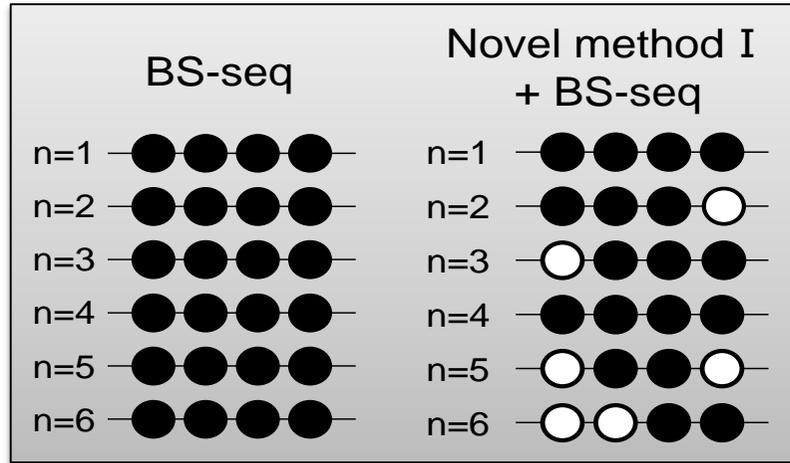
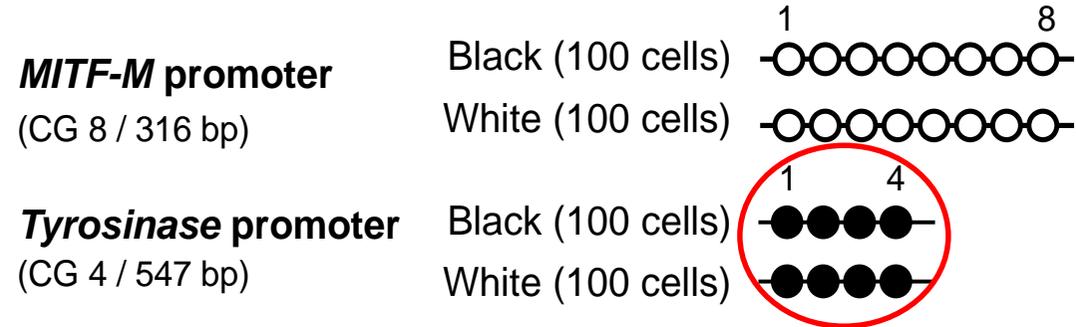


組換えDnmt1の新規メチル化評価法への適用

メラノーマ細胞での発現量



メチル化の評価



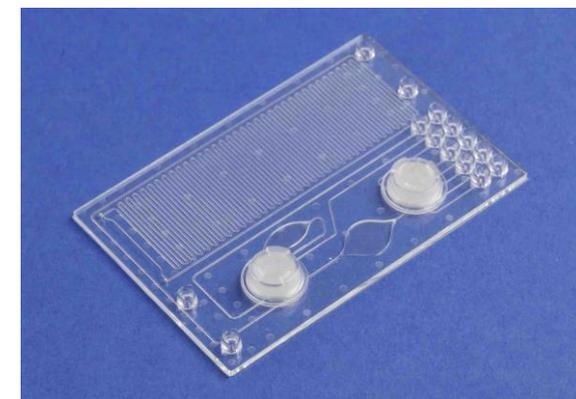
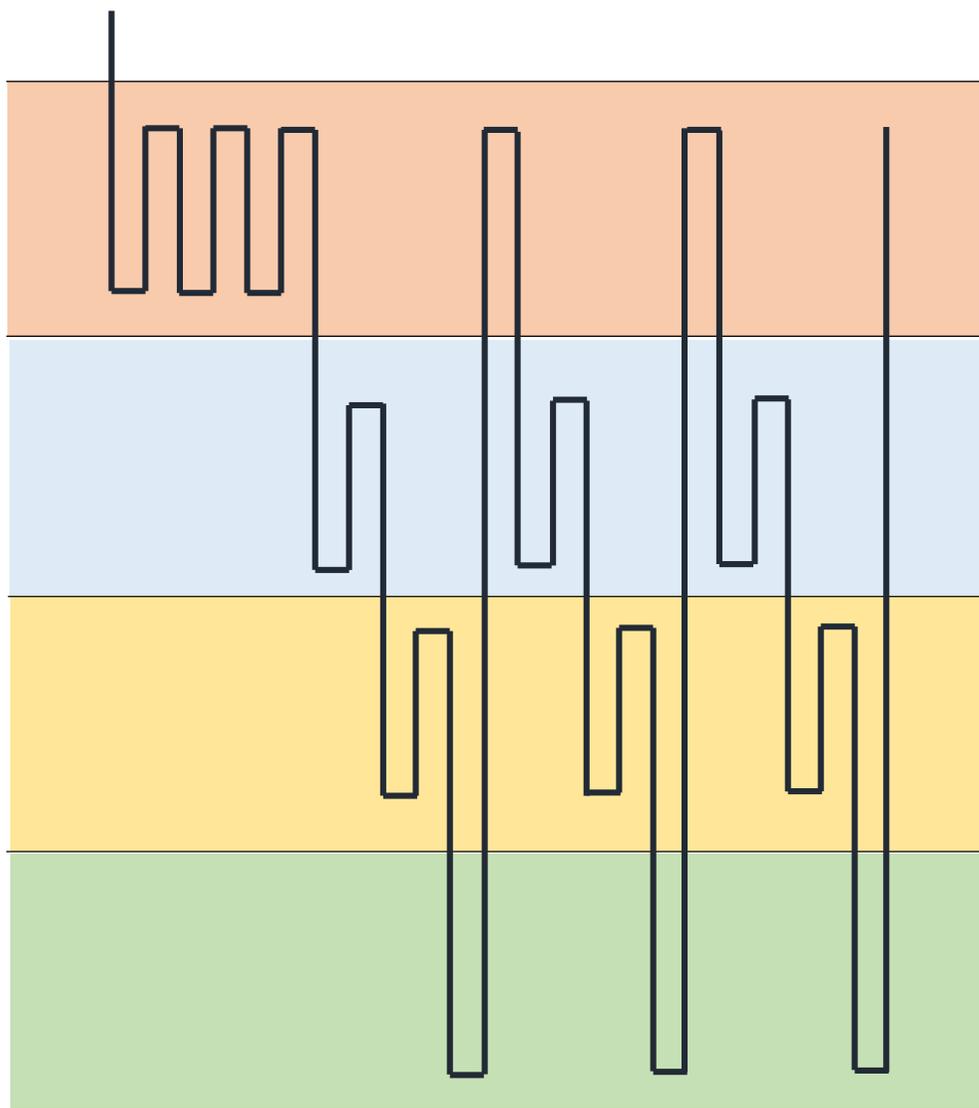
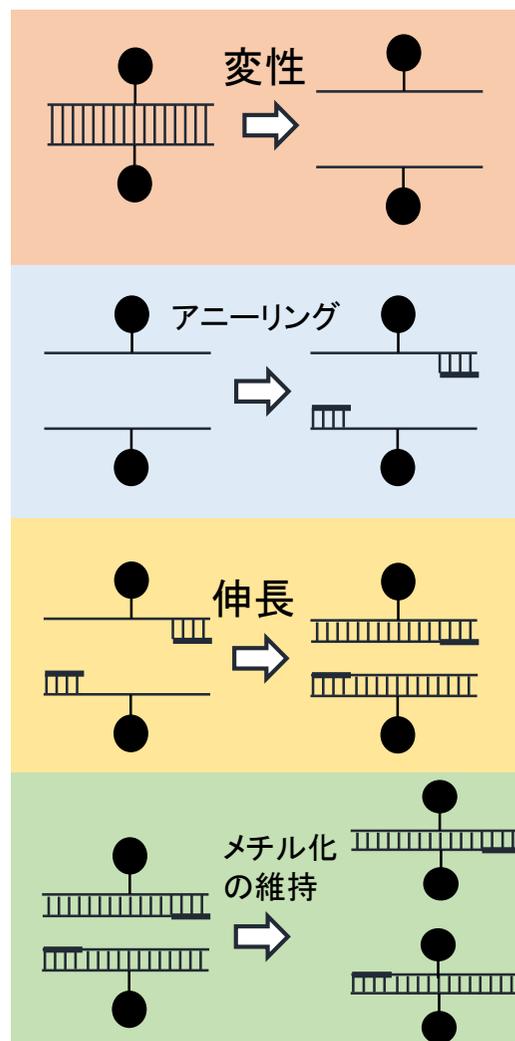
従来法では正しく評価できていない可能性

実用化に向けた課題

- ヒドロキシメチル化を排除してメチル化を解析することは可能となっている。
- しかし、メチル化の維持とPCRは別ステップで行っている。

今後の展開

マイクロ流路と組み合わせた新規メチル化評価法



(株)ASICONのHPより

課題

- ・流路へのDNAポリメラーゼと組換えDnmt1の固定化

想定される用途

- ヒドロキシメチル化の影響を受けないDNAのメチル化解析。
- 鋳型量の少ないサンプルのDNAメチル化解析（神経細胞などの難組織培養細胞含む）
- エピジェネティック創薬

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : メチル化酵素及びそれを用いた
メチル化解析方法
- 出願番号 : 特願2019-027858
- 出願人 : 神奈川工科大学
- 発明者 : 飯田泰広、前田翔大

産学連携の経歴

- 2007年-2008年 産業技術総合研究所の受託研究
- 2009年-2011年 ジュジュ化粧品(株)と共同研究実施
- 2017年-2019年 磐田化学工業(株)と共同研究実施

お問い合わせ先

神奈川工科大学

工学教育研究推進機構

リエゾンオフィス

TEL 046-291-3277

FAX 046-291-3221

e-mail liaison@kait.jp

iida@bio.kanagawa-it.ac.jp