

DNA メチル化反応を触媒するリボザイムの探索

Screening of ribozyme that catalyzes DNA methylation

初鹿裕美

指導教員 吉田 亘

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

キーワード：DNA メチル化、リボザイム、S-アデノシルメチオニン(SAM)

【背景・目的】

本研究では、DNA メチル化反応を触媒するリボザイムの探索を目的とした。DNA メチル化とはゲノム中の CpG 配列中のシトシン塩基にメチル基が付加する反応であり、遺伝子の発現制御において重要な役割を果たしている。具体的には、プロモーターがメチル化されると遺伝子発現が抑制され、非メチル化の時は遺伝子が発現することが報告されている。一方、癌などの異常細胞では、DNA メチル化パターンが通常細胞と異なっていることが報告されている。多くの真核生物では、この DNA メチル化により遺伝子発現が制御されているため、特定の遺伝子のメチル化状態を制御することが出来れば、人工的に遺伝子発現を制御することが可能になる。そのため、人工的に領域特異的にメチル化する分子を開発できれば、新たな癌治療方法を開発できるのではないかと考えた。これまでに、領域特異的に DNA メチル化反応を触媒する分子として、メチル化酵素をジンクフィンガーや TALEN、CRISPR/Cas9 に融合させた分子が開発されている。しかし、これらの分子は、細胞内で発現させる必要がある。そこで、本研究では新たに領域特異的にメチル化する手法を開発するために、リボザイムに着目した。リボザイムとは、特定の化学反応を触媒する RNA 分子のことであり、細胞に導入可能、任意の RNA 配列と連結が可能、ランダムライブラリーから同定することが可能などの特徴を持つ。領域特異的にメチル化す

るためには、メチル化反応を触媒する機能と標的ゲノム領域を認識する機能の 2 つの機能が必要になる。標的 DNA 配列は核酸を用いれば認識することができるため、メチル化反応を触媒する核酸を同定すれば、簡便に領域特異的にメチル化する分子を開発できると考えた。そこで本研究ではリボザイムに着目し、DNA メチル化反応を触媒するリボザイムのスクリーニングを行うことを目的とした。

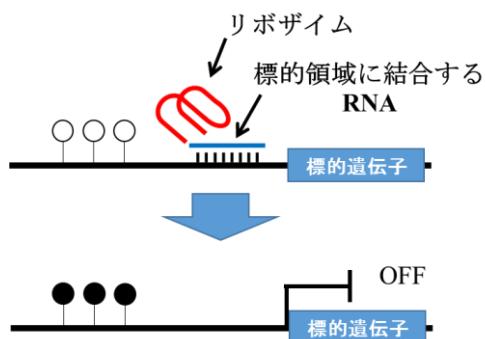


図 1. リボザイムを用いた領域特異的なメチル化方法

【方法】

これまでに DNA メチル化酵素の基質(ドナー)となる S-アデノシルメチオニン(SAM)に結合する RNA が同定されている。そこで、本研究では SAM 結合 RNA において SAM 結合領域以外をランダム化した RNA ライブラリーを用いれば、メチル化反応を触媒するリボザイムが同定できると

想定した。まず、二本鎖 DNA ライブライリーを合成し、それを鋳型に SAM 結合領域以外をランダム化した RNA ライブライリーを調製した。次に、5' にリン酸、3' にビオチンを修飾し、ステム部位にメチル化反応の標的となる CpG 配列を一か所含むステムループ DNA を化学合成した。この化学合成したステムループ DNA とランダム RNA ライブライリーを連結させ、DNA-RNA キメラライブライリーを作製した。作製したライブライリーをストレプトアビジン固定化磁気ビーズに固定化し、SAM を加え、一晩インキュベートした。ステムループ DNA 部位を自己メチル化したライブライリーはメチル化感受性制限酵素 *Msp*JI で切断することにより回収した。この回収したライブライリーを鋳型にし、RT-PCR で増幅後、RNA ライブライリーを合成し、次のラウンドのライブライリーを作製した(図 2)。このサイクルを繰り返し、4 ラウンドまで行い、メチル化反応を触媒するリボザイムを濃縮させた。また各ラウンドにおける溶出した RNA ライブライリー量を RT-qPCR 法により定量した。

その後 3,4 ラウンド後に溶出した RNA ライブライリーを RT-PCR により増幅し、TA クローニング法により配列を決定した。

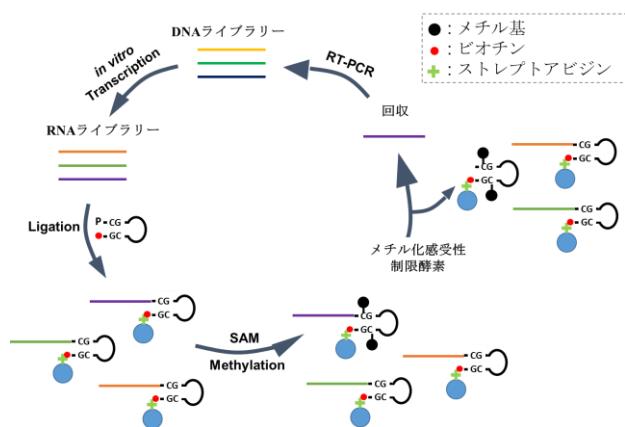


図 2 メチル化反応を触媒するリボザイムのスクリーニング方法

【結果】

各ラウンドで溶出した RNA ライブライリー量を RT-qPCR 法で定量した結果を図 3 に示す。ラウンドを重ねることによってライブライリーの溶出量が増加していることから、メチル化反応を触媒するリボザイムが濃縮されていることが示唆された。

3 ラウンド後と 4 ラウンド後のライブライリーから、TA クローニング法により 8 クローンずつ解析した結果、SAM 結合領域を保持していた配列は 5 クローンであった。今後この RNA がメチル化反応を触媒する活性を保持しているか検討する。

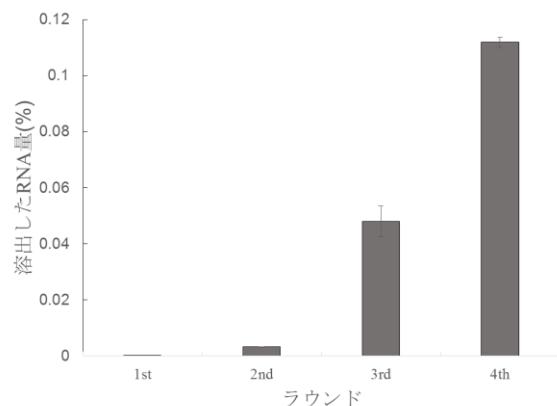


図 3 各ラウンドにおける溶出した RNA ライブライリー量の定量結果

【結論】

このスクリーニングの方法で、DNA メチル化反応を触媒するリボザイムの候補が見つかる事が示された。

今後この配列がリボザイムの活性を持つと示された場合、新たに領域特異的にメチル化する方法が開発されることが期待できる。