

I. DNA メチル化解析

DNA メチル化解析手法は、(A) メチル化 DNA を濃縮する方法、(B) バイサルファイト処理による塩基置換を利用する方法、(C) メチル化感受性の制限酵素を利用する方法の 3 種類に分類されます。新規ターゲットのスクリーニングには(A)の手法が、個別ターゲットの詳細な解析には(B)や(C)の手法がよく用いられています。

C. 制限酵素処理

- ◆メチル化感受性の異なる制限酵素を利用
- ◆特定領域の DNA メチル化解析やメチル化／非メチル化 DNA 濃縮に

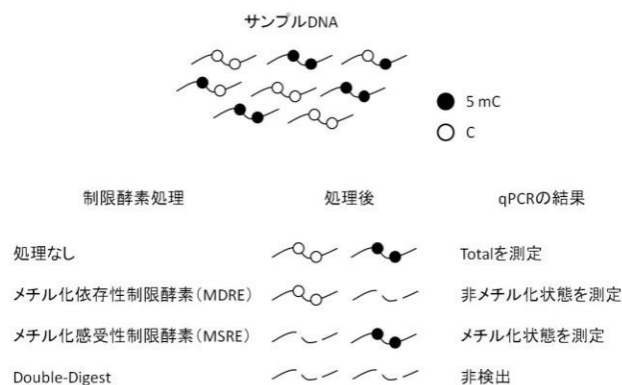
【1】原理

制限酵素の中にはメチル化を受けた配列を切断できるものとできないものがあり、このようなメチル化感受性の違いが DNA メチル化解析に利用されています。

・ qAMP (quantitative analysis of DNA methylation using real-time PCR) 法

qAMP はメチル化感受性の異なる制限酵素を利用する解析方法です。ゲノム DNA を 4 つに分けて、メチル化感受性制限酵素 (MSRE)、メチル化依存性制限酵素 (MDRE) およびそれらの double digestion を行い、残りひとつは制限酵素処理なしのコントロールとします。制限酵素処理後に、その切断箇所を挟むプライマーでリアルタイム PCR 解析*を行い、残存したゲノム DNA の量を定量します。通常、メチル化依存性切断には McrBC (メチル化シトシンを含む一本鎖および二本鎖 DNA を特異的に切断するエンドヌクレアーゼ) を利用します。

* リアルタイム PCR には、GC リッチに強い TB Green™ Premix Ex Taq™ GC (Perfect Real Time)がお勧めです。「I-A-a. リアルタイム PCR」の項をご参照ください。



・メチル化／非メチル化領域の濃縮

MIAMI (Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers)法や MS-RDA (Methylation-Sensitive Representational Difference Analysis)法は、メチル化感受性／非感受性の制限酵素を利用して DNA メチル化／非メチル化領域を濃縮する手法です。

【2】製品リスト

[TB Green™ Premix Ex Taq™ GC \(Perfect Real Time\) \(製品コード RR071A/B\)](#)

[制限酵素各種 \(※\)](#)

※下表に哺乳類のエピジェネティクス解析に利用可能な CpG メチラーゼによるメチル化感受性制限酵素 (Methylation Specific Restriction Enzyme; MSRE) をまとめました。各制限酵素の詳細については、弊社ウェブサイトをご覧ください。

CpG メチラーゼによるメチル化感受性制限酵素

制限酵素	認識配列	製品コード
<i>Aat</i> II	GACGT↓C	1112A/B
<i>Acc</i> II	CG↓CG	1002A/B
<i>Aor</i> 13H I	T↓CCGGA	1224A/B
<i>Aor</i> 51H I	AGC↓GCT	1118A/B
<i>Bsp</i> T104 I	TT↓CGAA	1225A/B
<i>Bss</i> H II	G↓CGCGC	1119A/B
<i>Cfr</i> 10 I	R↓CCGGY	1120A/B
<i>Cla</i> I	AT↓CGAT	1034A/B/AH/BH
<i>Cpo</i> I	CG↓GWCCG	1035A/B
<i>Eco</i> 52 I	C↓GGCCG	1039A/B
<i>Hae</i> II	RGCGC↓Y	1052A/B
<i>Hap</i> II *	C↓CGG	1053A/B/AH/BH
<i>Hha</i> I	GCG↓C	1056A/B
<i>Mlu</i> I	A↓CGCGT	1071A/B/AH/BH
<i>Nae</i> I	GCC↓GGC	1155A/B
<i>Not</i> I	GC↓GGCCGC	1166A/B/BH
<i>Nru</i> I	TCG↓CGA	1168A/B
<i>Pma</i> C I	CAC↓GTG	1177A/B
<i>Psp</i> 1406 I	AA↓CGTT	1108A/B
<i>Sac</i> II	CCGC↓GG	1079A/B
<i>Sal</i> I	G↓TCGAC	1080A/B/AH/BH
<i>Sma</i> I	CCC↓GGG	1085A/B/AH/BH

* *Hap* II の isoschizomer である *Msp* I (製品コード 1150A/B/AH/BH) は *Hap* II と同じ C↓CGG を認識・切断しますが、CpG メチル化非感受性です。

a. リアルタイム PCR

- ◆メチル化 DNA 濃縮や ChIP 後の特定領域の解析に
- ◆GC 含量の高い配列には専用のリアルタイム PCR 試薬を
- ◆癌関連遺伝子の解析は EpiScope® Promoter qPCR Array (Human)で

【1】原理

[EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit](#) やクロマチン免疫沈降で目的の DNA 画分を濃縮した後、特定の遺伝子領域の定量にはリアルタイム PCR が用いられます。解析結果は、濃縮前 (Input) の量に対する濃縮後のパーセンテージ、または非結合画分と結合画分の割合等で表わされます。

・GC リッチターゲットに適したリアルタイム PCR 試薬

エピジェネティクスの解析では、多くの場合、転写開始点上流域が対象となりますが、この領域には CpG アイランドが存在し、配列の GC 含量が非常に高いことがあります。そのような配列には、GC 含量 60~70%でも精度の高い定量が可能な [TB Green™ Premix Ex Taq™ GC \(Perfect Real Time\)](#)がお勧めです。また、GC 含量が 70%を超える場合には、[MightyAmp™ for Real Time \(TB Green™ Plus\)](#)をお試しください。

・EpiScope® Promoter qPCR Array (Human)

EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit やクロマチン免疫沈降法によりゲノム DNA の目的領域を濃縮した後、DNA メチル化による影響が報告されている遺伝子のゲノム DNA 領域をリアルタイム PCR で定量するためのプライマーセットです。プライマーは、25 種類の遺伝子 (スプライスバリエーションを含む 30 種) をターゲットとし、転写開始点上流付近に設計されています。また、コントロールとして、リピート配列である LINE-1 および DNA メチル化のネガティブコントロールとなる GAPDH 検出用のプライマーも搭載されています。各プライマーセットは、TB Green™ Premix Ex Taq™ GC (Perfect Real Time) で良好に反応することを確認しています。

【2】プロトコール

(操作方法の詳細は、各製品の説明書をご参照ください。)

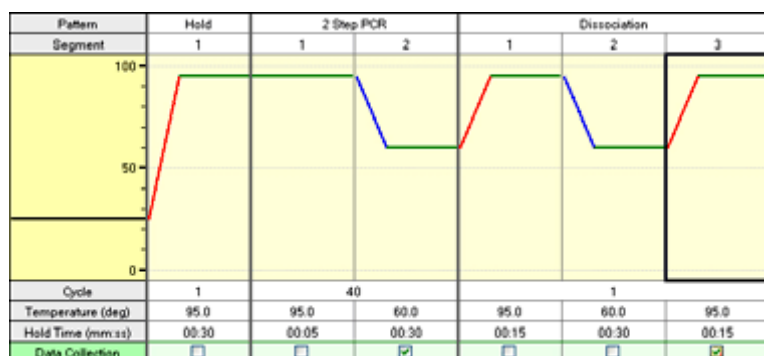
(1) 以下の反応液を調製する

試薬	使用量	最終濃度
TB Green™ Premix Ex Taq™ GC (2×)	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM *1
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM *1
Template DNA	2.0 μl	*2
滅菌精製水	9.5 μl	*2
Total	25.0 μl	

*1 最終 primer 濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題がある時は 0.1~1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

*2 DNA 濃度によって適宜調整可能。濃縮前のゲノム DNA 相当量で、20~100 ng 程度を用いると良い。

(2) 以下のプログラムでリアルタイム PCR を行う



Hold (初期変性)
 Cycle : 1
 95°C 30 秒
 2 Step PCR
 Cycle : 40
 95°C 5 秒
 60°C 30 秒
 Dissociation

【3】 実験例

HeLa S3 細胞、A549 細胞から抽出したゲノム DNA を断片化し、各 1.5 μg を EpiXplore™による DNA メチル化領域の濃縮に使い、最終的にそれぞれ 45 μl の非結合画分 (FT) および結合画分 (EL) の濃縮物を得た。1 反応あたり 1 μl の濃縮物を鋳型として使用し、EpiScope® Promoter qPCR Array (Human) と TB Green™ Premix Ex Taq™ GC (Perfect Real Time)を用いてリアルタイム PCR を行った。

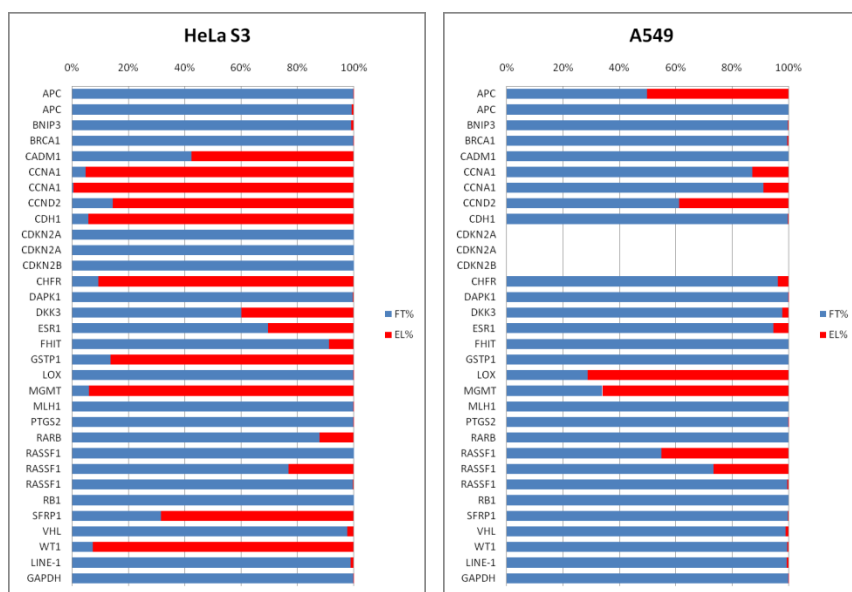


図 1. EpiScope® Promoter qPCR Array (Human)解析結果

EpiXplore™の非結合画分および結合画分の DNA をリアルタイム PCR で解析し、各画分の定量値をパーセンテージで表した (青 : 非結合画分、赤 : 結合画分)。いくつかの遺伝子において、細胞の種類により濃縮度合いが大きく異なることが確認され、これらの遺伝子の転写開始点上流付近の DNA メチル化状態に違いがあることが示唆された。なお、A549 の CDKN2A と CDKN2B は、非結合画分、結合画分ともに検出されなかった。

【4】 製品リスト

[NucleoSpin® Tissue \(製品コード 740952.10/.50/.250\)](#)

[EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit \(製品コード 631963、631962\)](#)

[TB Green™ Premix Ex Taq™ GC \(Perfect Real Time\) \(製品コード RR071A/B\)](#)

[MightyAmp™ for Real Time \(TB Green™ Plus\) \(製品コード R075A/B\)](#)

[EpiScope® Promoter qPCR Array \(Human\) \(製品コード 5301\)](#)