

論文審査の要旨(甲)

申請者領域・分野 氏名	病態制御科学領域 呼吸病態内科学教育研究分野 石戸谷 美奈
指導教授氏名	田坂 定智
論文審査担当者	主 査 黒瀬 顕 副 査 佐藤 温 副 査 畠山 真吾
<p>(論文題目)</p> <p>Real-time MBDi-RPA using methyl-CpG binding protein 2: A real-time detection method for simple and rapid estimation of CpG methylation status (DNA メチル化を迅速かつ簡便に評価するための MeCP2 を用いたリアルタイム MBDi-RPA 法)</p>	
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>癌研究にとって不可欠の DNA メチル化解析にはバイサルファイト法や制限酵素法が用いられるがそれぞれ欠点がある．そこでこれらに代わる methyl-CpG binding domain(MBD)蛋白質を用いた解析法において，methyl-CpG binding protein 2(MeCP2)と，リアルタイム recombinase polymerase amplification(RPA)法の DNA メチル化検出における有効性を調べ，さらにこれらを合わせたリアルタイム MBDi-RPA 法が DNA メチル化解析に有用であるかについて検討した．</p> <p>全実験を通じ MBD 蛋白質がメチル化 CpG に結合することによる標的 DNA の増幅反応抑制により DNA メチル化の有無を調べた．まず鋳型 DNA 内に異なる数の CpG を持つ人工 DNA を合成し，従来の MBD2 蛋白質と MeCP2 による DNA メチル化の検出感度を調べた．次いで HCT116 細胞由来ヒトゲノム DNA を用いて MeCP2 の有効性を調べるとともに，蛍光標識 RNA プローブおよび RNase H を用いた MBD protein interference-RPA(MBDi-RPA)法によってメチル化解析が行えるかを検討した．またリアルタイム RPA 法と MBDi-RPA 法を組み合わせたリアルタイム MBD protein interference-RPA(MBDi-RPA)法の有効性を調べた．</p> <p>その結果，DNA メチル化の検出に従来の MBD2 を用いた際には鋳型 DNA に CpG が最低 10 ヲ所必要であったが，MeCP2 では最低 2 ヲ所あれば検出できた．ヒト HCT116 細胞由来 DNA を用いて p14ARF および p16INK4A 遺伝子のメチル化を MBDi-RPA 法によって調べたところ，既知のアレルのメチル化に相当する結果が得られた．いずれも増幅バンドが標的遺伝子であることをシーケンシングで確認した．さらにモデル DNA を鋳型としてリアルタイム MBDi-RPA 法を行ったところ，モデル DNA がメチル化されていない場合にのみ蛍光の増幅がみられ，かつメチル化されたゲノム DNA の存在量に比例して蛍光が減少した．以上からリアルタイム MBDi-RPA 法は DNA メチル化を定量的に評価出来る有効な方法である事が判明した．</p> <p>本研究は DNA メチル化の簡便かつ高感度な新たな解析法を確立したものであり，基礎研究および臨床応用上も有用と認められ学位授与に値する．</p>	
公表雑誌等名	Analytica Chimica Acta (doi: 10.1016/j.aca.2024.342486)