



## HELMET 法—DNA メチル化部位局在のための新しい組織化学

### A New Histochemical Approach to Localize Methylation Sites of DNA: HELMET

小路 武彦

Takehiko Koji

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命医科学講座

組織細胞生物学分野

**要旨** 真核生物では、細胞分化の誘導やその固定化に DNA のメチル化が重要な役割を果たしており、エピジェネティック制御機構として注目されている。これまで、塩基配列特異的な DNA メチル化部位を細胞単位で検出することは不可能であった。我々は、メチル化の有無で同一塩基配列の切断能力が異なるイソシゾマー性制限酵素を用いた新しい組織化学的手法 (HELMET 法) を開発し、マウス精巣に応用したのでご紹介する。

**キーワード**: DNA メチル化, エピジェネティクス, イソシゾマー性制限酵素, 組織化学, ヘルメット

#### 1. 緒言

生命現象を理解するうえで、生命の最小単位である細胞個々についてその活動状態を正確に把握することが必要と思われる。細胞の活動状態、つまり生理的或いは病理的状态をより正確に捉えるためには、遺伝子の発現状態はもとよりその調節機構を理解する必要がある。遺伝子の発現調節には、大別すると転写調節因子による短期的な機構とクロマチン構造の変化による長期的な機構が関与する。後者のクロマチン構造の変化が、特定の遺伝子の発現可能性を規定しており、それが細胞の分化状態の固定化につながる。結果として、肝細胞からは肝細胞が生じることになる。このような調節機構は、細胞の世代を越えて維持されるが、本来の遺伝情報である DNA の塩基配列とは独立した調節系であり、その研究領域を遺伝学に対してエピジェネティクス epigenetics (後成的修飾) と呼ぶ。エピジェネティクスに於ける主要な役者は、DNA のメチル化であり、またヒストン蛋白のメチル化、アセチル化、リン酸化といった修飾であるが、更にヌクレオソームの位置決めと miRNA 発現制御を含め総称してエピゲノム

epigenome という。そもそもエピジェネティクスは発生学的な細胞分化を記載する安定な静的な調節機構と考えられていたが、最近では発がんを含む様々な病態への関与が示されており、これらのエピジェネティックな因子の変異は基本的に可逆的であることから、人為制御による治療可能性も視野に大いに注目されている<sup>1)</sup>。

DNA メチル化は、直接遺伝子を発現抑制させることからエピゲノムの中でも基本的なもので、例えば X 染色体の不活性化やゲノムインプリンティング、更にはゲノム内のレトロトランスポズンの不活性化等に於いて主役である。また、がん細胞では、特定の遺伝子プロモーターは hypermethylation されているが、ゲノムワイドには hypomethylation となっており、遺伝子の不安定化が引き起こされる要因となっている<sup>2)</sup>。

このような背景を基に、細胞単位での DNA のメチル化状態の検索と、更にはメチル化部位の塩基配列との関連の検討が必要と思われるが、これらの必要性を全て満たす有効な方法はこれまで存在していなかった。そこで、今回我々はイソシゾマー性の制限酵素の組み合わせを利用することによる 4-6 塩基と短いながら塩基配列特異性を基本にした組織化学的なメチル化同定法 histo-endonuclease-linked detection of methylation sites of DNA (HELMET) 法<sup>3)</sup> を開発したのでご紹介したい。

#### 2. HELMET 法とは何か?

真核生物の DNA では、CG メチラーゼによる CpG 配列のシトシンのメチル化が起こり、それによってその下流域の遺伝子の不活性化が引き起こされ、細胞分化の誘導や分化の固定化が生じることが知られ、エピジェネティック制御機構として注目されている。そこで我々は、イソシゾマー性の制限酵素が同一の CG を含む塩基配列を認識するが、そのメチル化の有無により切断能力が異なることに着目し、制限酵素が認識する塩基配列に特異的なメチル化レベルを細胞単位で検出し定量する方法を開発し、HELMET と名付けた。

#### 3. HELMET 法の必要性

DNA の特定の部位のメチル化は、細胞分化のエピジェネティック制御機構の根幹をなすものであり、また最近では種々のがんでメチル化の昂進や、また脱メチル化剤の抗癌作用などから DNA の異常メチル化の発がんへの関与が強く示唆されている。しかしながら、これまで組織内で細胞分化段階特異的な DNA のメチル化レベルに関する知見は殆ど皆無であった。5-メチルシトシンに対する免疫組織化学は可能であるが、CpG 配列のメチル化は、全ゲノム  $3 \times 10^9$  塩基中、 $3 \times 10^7$  箇所が生じるため、シグナル強度が飽和レベルに達し細胞間での差異を議論するのは困難であった。一方、メチル化 CpG で CCGG 配列を取る頻度は 5% に過ぎず、その結果、本法によればメチル化レベルの差異を視覚化可能となるものと考えられる。また、ここでは CCGG 配列に関するイソシ

〒 852-8523 長崎市坂本 1-12-4  
TEL: 095-819-7025  
E-mail: tkoji@nagasaki-u.ac.jp  
2011 年 11 月 4 日受付

ゾマーである *Hpa* II と *Msp* I の組み合わせを用いて解析しているが、*Sau* 3A I と *Mbo* I 等の他の組み合わせを用いることも可能である。

#### 4. HELMET 法の原理と具体的方法論<sup>4)</sup>

ここでは、基本的な CCGG 配列のメチル化部位局在化法について述べる。この配列は左から 2 番目の C がメチル化される。メチル化されていない場合は *Hpa* II でも *Msp* I でも同様に 1 番目の C の 3'-OH が自由端となるように切断され

るが、メチル化により *Hpa* II では切断不可能となる。一方、*Msp* I では切断可能である。切断部位の 3'-OH に、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) を作用させると DNA 鎖の伸長反応が起こるので、そこにハプテン化ヌクレオチドを取り込ませ、そのハプテンに対する抗体を用いた免疫組織化学を行うことにより染色し切断箇所を検出する。従って、両制限酵素を連続的に作用させ、切断部位を異なる核酸アナログで標識し分別的な染色を行うことで、この配列のメチル化された部位とメチル化されていない部位

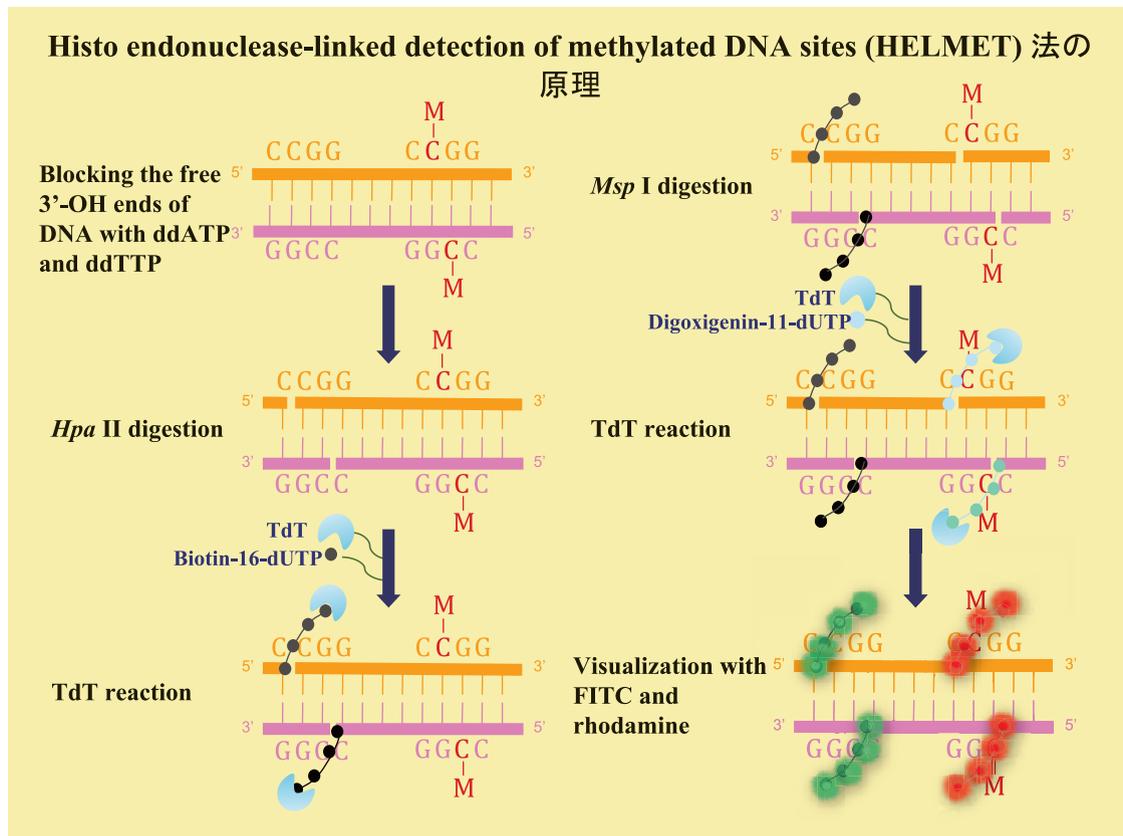


図1 HELMET 法の原理  
内容は本文参照。

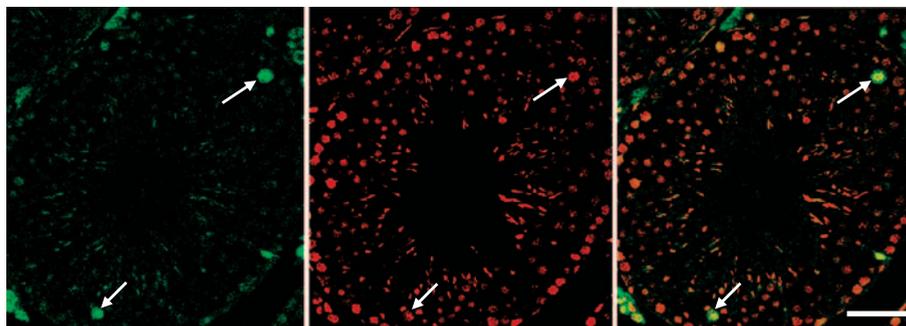


図2 HELMET 法によるマウス精子形成細胞に於けるメチル化 CCGG 配列の局在解析<sup>3)</sup>  
マウス精巣パラフィン包埋切片上で、HELMET 法を施行した。左図が非メチル化 CCGG 部位の蛍光染色。中央がメチル化 CCGG 部位の染色である。右図が二重染色像で、多くの生殖細胞核内で両者は混在しているのが判る。一方で、伸長精子細胞核の一部にメチル化が優勢な箇所があり、更にアポトーシス細胞 (矢印) では CCGG 配列の非メチル化が見いだされた。  
バー ; 50  $\mu$ m

を定性的或いは定量的に解析可能となる。これらの原理を図1にまとめて示した(図1)。

具体的には、切片上でまず標本作製時などに生じた既存のDNA切断部位の3'-OHをdideoxyATP(ddATP)とdideoxyTTP(ddTTP)を基質としてTdTで取り込ませ、その更なる伸長反応をブロックした後、非メチル化CCGGのみ切断できるHpa IIで切断し、その後切断により出来た3'-OH部位をTdTによりビオチン-16-dUTPで標識する。ジデオキシヌクレオチドでブロック後、今度はメチル化CCGGも切断できるMsp Iで切断し、ジゴキシゲニン-11-dUTPで標識する。本稿では最終的に、FITC標識抗ビオチン及びrhodamine標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いてシグナルを分別的に検出した。操作の実際に関しては表1に示した(表1)。

特に重要なことは、アポトーシス細胞ではDNA二本鎖切断が生じており、既に多くのDNA部位で3'-OHが自由端と

なっていると思われるので、その箇所を予めTdTが反応できないようブロックする必要がある。また、TdT作用後にも同様に反応を停止させるために同様のブロックが必要で、この目的の為に20 μM ddATPと20 μM ddTTPをTdTで取り込ませている。また、DNAの組織中に隠れている切断部位がTdT反応中に出現すると制限酵素活性に関係ない非特異的な染色を呈するので、4% PFA/PBSで操作毎に再固定を行う。

## 5. 特異性の検定法等

本方法論での特異性の検討では、制限酵素を作用させない(或いは失活させた)場合にはシグナルが出ないこと、ジデオキシヌクレオチドを取り込ませた後にはTdTで標識が出来ないこと、またTdT反応の際にハプテン化ヌクレオチドをTTPに置き換えたりTdTを添加しない場合にはシグナル

表1 パラフィン切片を用いてのHELMET法(蛍光二重染色法)

- 1) パラフィン切片をシラン処理スライドガラスに拾い、トルエンに浸漬(5 min, 3回)し脱パラフィン後、100%→70%エタノール処理しミリQ水(DDW)に浸漬
- 2) PBSで洗浄(5 min, 3回)
- 3) プロテインアーゼK/PBS処理(10 μg/ml, 37°C, 15 min)
- 4) PBSで洗浄(5 min, 3回)後、DDWに浸漬
- 5) 1×TdT buffer<sup>※1)</sup>を添加(25-30 μl)し、湿室中に静置(RT, 30 min)
- 6) 3'-OHのブロッキング:ブロッキング溶液<sup>※2)</sup>を添加し、湿室中に静置(37°C, 2 hr)
- 7) DDWでリンス後、4% PFA/PBSで固定(RT, 5 min)し、PBSで洗浄(15 min, 2回)
- 8) DDWでリンス後、Hpa II処理(100 U/ml Hpa II/10 mM Tris/HCl (pH 7.5)/10 mM MgCl<sub>2</sub>/1 mM DTT, 37°C, 2 hr)
- 9) ステップ4)-5)を繰り返す
- 10) TdT反応溶液<sup>※3)</sup>を添加(25-30 μl)し、3'-OHをbiotin標識(37°C, 90 min)
- 11) DDWでリンス後、ステップ4)-7)を繰り返す
- 12) DDWでリンス後、Msp I処理(100 U/ml Msp I/33 mM Tris/HCl (pH 7.9)/66 mM potassium acetate/10 mM MgCl<sub>2</sub>/0.5 mM DTT, 37°C, 2 hr)
- 13) ステップ4)-5)を繰り返す
- 14) TdT反応溶液<sup>※3)</sup>を添加(25-30 μl)し、3'-OHをdigoxigenin標識(37°C, 90 min)
- 15) DDWでリンス後、PBSで洗浄(5 min, 3回)
- 16) 500 μg/ml 正常ヤギIgG/500 μg/ml 正常ヒツジIgG/5% 牛血清アルブミン(BSA)/PBSを切片に添加(25-30 μl)し、湿室内に静置(1 hr)
- 17) FITC-anti-biotin/rhodamine-anti-digoxigenin/5% BSA/PBS溶液を添加(25-30 μl)し、湿室内に静置(1 hr)
- 18) 0.075% Brij35/PBSで洗浄する(10 min, 3回)
- 19) PBSで洗浄(5 min)
- 20) 90% (v/v) glycerol/PBSで封入し、観察

※1) 1×TdT buffer: 25 mM Tris/HCl (pH 6.6), 200 mM potassium cacodylate, 0.25 mg/ml BSA.

※2) ブロッキング溶液: 800 units/ml TdT, 1×TdT buffer, 20 μM ddATP, 20 μM ddTTP, 0.1 mM dithiothreitol (DTT), 1.5 mM CoCl<sub>2</sub>

※3) TdT反応溶液

添加物	添加量	最終濃度
5×TdT buffer	40 μl	1×TdT buffer
10 mM DTT	2 μl	0.1 mM
25 mM CoCl <sub>2</sub>	12 μl	1.5 mM
1 mM dATP	4 μl	20 μM
0.1 mM Biotin-16-dUTP (or digoxigenin-11-dUTP)	1 μl	0.5 μM
40 U/μl TdT	4 μl	800 U/ml
DDW	137 μl	
Total	200 μl	

が出ない事などを示すべきである。具体例は、参考文献を参照頂きたい<sup>3)</sup>。

## 6. 実際例

具体例として、マウス精巣パラフィン切片に於いて、HELMET法によりメチル化 CCGG と非メチル化 CCGG を検出した例を示した (図 2)。

## 7. おわりに

本稿で扱った方法論は、分子組織細胞化学<sup>5)</sup>の一端をなすものとして位置付けられる。これらの学問が目指すものは、個々の細胞レベルでの遺伝子発現状態並びにその制御機構を明らかにすることであり、新たな細胞の理解への挑戦でもある。組織内において、一見同一に見える細胞も決して同調的に活動している訳ではなく個性 (固有分化) をもって生きており、その多様性を知ることによって生命現象の一様性へ近づけるものと考えられる。方法論として、遺伝子のそのものの存在状態からエピジェネティックな調節機構の関与、その遺伝子の転写状態、次いでそれら転写産物の核内での挙動と細胞

質内分布、更には翻訳調節と最終生産物としての蛋白産生までの行程についての解析法が必要である<sup>6)</sup>。本稿ではそのうちの DNA のメチル化状態解析法に焦点をあてて解説した。こういった方法論は日進月歩で開発が試みられており、多くの方々の本領域への参入により我々の理解が飛躍的に深まることを望んで止まない。

## 文 献

- 1) Sharma, S., Kelly, T.K. and Jones, P.A.: *Carcinogenesis*, **31**, 27–36 (2010)
- 2) Wilson, A.S., Power, B.E. and Molloy, P.L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1775**, 138–163 (2007)
- 3) Koji, T., Kondo, S., Hishikawa, Y., An, S. and Sato, Y.: *Histochem. Cell Biol.*, **130**, 917–925 (2008)
- 4) 小路武彦: 組織細胞化学 2010 (日本組織細胞化学会編), 中西印刷, 京都, 61–70 (2010)
- 5) Koji, T. (Ed.): *Molecular Histochemical Techniques (Springer Lab Manuals)*, Springer-Verlag, Heidelberg (2000)
- 6) 小路武彦, 菱川善隆: 日本臨床, **68**, 219–226 (2010)