

発光蛋白質を用いた簡易がん診断法の開発

Development of simple cancer diagnosis system using photoprotein

岩崎 優果
指導教員 吉田 亘

東京工科大学 応用生物学部
応用生物学科 エピジェネティック工学研究室

キーワード：酸化ストレス, 8-オキソグアニン, OGG1, Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)

1. 背景・目的

大腸がんや乳がん、パーキンソン病、アルツハイマー病において 8-オキソグアニン(8-oxoG)の存在量が増加していることが報告されている。そのため、8-oxoG はこれら疾患のバイオマーカーとして期待される。スーパーオキシドやヒドロキシラジカル、過酸化水素などの活性酸素(Reactive oxygen species: ROS)は酸化ストレスにより過剰に発生し、DNA 損傷やミトコンドリア機能異常、アポトーシスを誘導する。これらのうちの DNA 損傷によりグアニンの 8 位が酸化された 8-oxoG が生じる。この 8-oxoG を測定することでがん診断に応用できるのではないかと考えた。

従来の手法としては、抗体を使用する Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)法や 1 塩基ずつ検出することが可能である High Performance Liquid Chromatography (HPLC)法が 8-oxoG を定量する方法として挙げられるが、これらの手法は煩雑な操作や大型の精密機器を必要とする。そこで、本研究では 8-oxoG を簡便に測定する方法の開発を目的とした。

塩基除去修復機構により 8-oxoG はグアニンに修復される。ROS によって DNA 損傷が引き起こされたときに生じる 8-oxoG は 8-oxoG に結合する蛋白質 8-oxoG DNA glycosylase 1 (OGG1)により切除される。それにより、一塩基欠損部位(AP)サイトが生じる。AP サイトはエンドヌクレアーゼとエキソヌクレアーゼによって切断され、完全に除

去される。その後、DNA ポリメラーゼ β により新しく塩基が合成され、DNA リガーゼによって完全に修復される。そこで、本研究において 8-oxoG 結合蛋白質である OGG1 に注目した。

ホタル由来の発光蛋白質であるルシフェラーゼに OGG1 を融合させた蛋白質(OGG1-luciferase)を用いて生物発光共鳴エネルギー移動 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer; BRET) により 8-oxoG 量を測定する(Fig. 1)。また、OGG1 は 8-oxoG 結合能とグリコシラーゼ活性を持つ。そのため、本研究では 8-oxoG 結合能のみを保持した変異型 OGG1 を用いる。

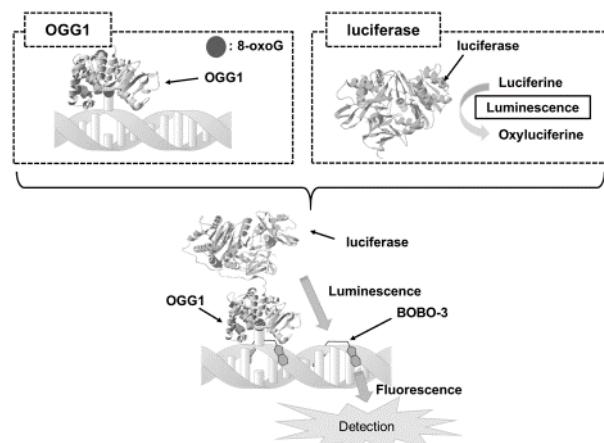


Fig. 1 8-oxoG 量簡易測定法の原理

2. 方法

1. OGG1-luciferase 発現ベクターの構築

グリコシラーゼ活性を不活性化し、8-oxoG 結合能のみを保持するようにヒト由来の OGG1 に変異

を導入した変異型 *OGG1* の設計を行い、大腸菌用に DNA 配列を最適化した。変異型 *OGG1* にホタル由来の *luciferase* 遺伝子を挿入した発現ベクターを構築した。構築した OGG1-luciferase 発現ベクターを用いて DH5 α を形質転換させた。得られたコロニーのうち 10 個のコロニーを用いてコロニー-PCR 後、電気泳動法により解析を行なった。電気泳動法による結果より、OGG1-luciferase 発現ベクターであると考えられるコロニーからプラスミド抽出を行なった。その後、得られたプラスミドの制限酵素処理を行い、OGG1-luciferase 発現ベクターが構築できているかを確認した。また、得られたプラスミドのシーケンス解析を行なった。

2. OGG1-luciferase の作製

構築した OGG1-luciferase 発現ベクターを用いて BL21 (DE3)を形質転換させ、OD₆₀₀ の値が 0.6 となったときに終濃度が 1.2 mM となるように IPTG を添加し、蛋白質の発現を行なった。その後、蛋白質を発現させた培地より集菌し、OGG1-luciferase の精製用に付加してある streptag に結合する Streptavidin 固定化カラム(QIAGEN)を用いて精製を行なった。

3. 結果

1. OGG1-luciferase 発現ベクターの構築

構築した OGG1-luciferase 発現ベクターを用いて DH5 α を形質転換させ、得られたコロニーを用いてコロニー-PCR 後、電気泳動を行なった結果、コロニー-1, 3, 4, 6, 7, 10 で目的の位置付近(2853 bp)にバンドが示された(Fig. 2)。この結果より、コロニー-1, 3, 4, 6, 7, 10 は OGG1-luciferase 発現ベクターであると考えられる。

OGG1-luciferase 発現ベクターが構築されていることを確認したコロニーよりプラスミド抽出を行なった。得られたプラスミドの制限酵素処理を行なった結果、目的の 2 つの位置付近(1688 bp, 6301 bp)でバンドがそれぞれ示された。これより、得られたプラスミドは OGG1-luciferase 発現ベクターであると考えられる。また、シーケンス解析を行なった結果、OGG1-luciferase 発現ベクターで

あることが確認できた。

2. OGG1-luciferase の作製

構築した OGG1-luciferase 発現ベクターを用いて BL21 (DE3)を形質転換させ、OGG1-luciferase の発現を行なった。その後、OGG1-luciferase の精製を行なった結果、溶出画分である E3 において最も高い発光強度(9.6×10^7 RLU/mL)が得られた(Fig. 3)。これより、OGG1-luciferase が得られたことが考えられる。

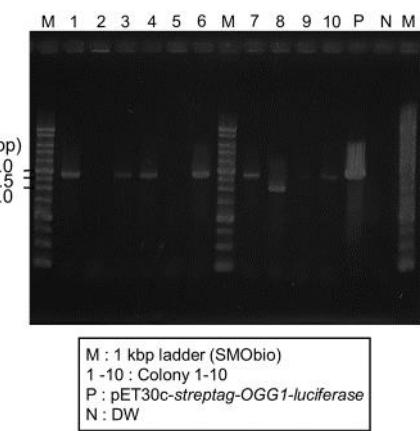


Fig. 2 コロニー-PCR 後の電気泳動結果

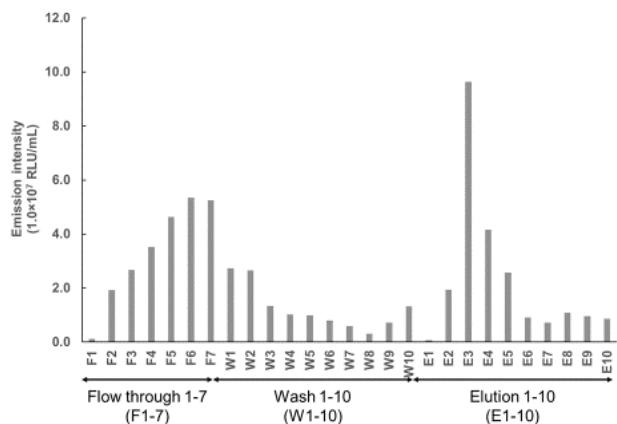


Fig. 3 OGG1-luciferase の精製結果

4. 結論

グリコシラーゼ活性を不活性化し、8-oxoG 結合能のみを保持した変異型 OGG1 を用いた融合蛋白質(OGG1-luciferase)発現ベクターを構築できたことが示された。また、OGG1-luciferase 発現ベクターで形質転換させた大腸菌を用いて OGG1-luciferase を発現できることが示された。