

がん診断のためのヒトゲノム DNA 修飾塩基同時検出法の開発

Development of simultaneous epigenetic DNA modifications detection system for cancer diagnosis

宮田 峻通¹⁾

指導教員 吉田 宜^{1),2)}

1) 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 エピジェネティック工学研究室

2) 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: DNA メチル化, BRET, CXXC, ルシフェラーゼ

1. 背景と目的

我々の体は 1 個の受精卵が分化して生じた細胞で構成されている。そのため、すべての細胞は同じゲノム DNA を持つが、組織・細胞ごとにその機能が異なる。それは組織・細胞ごとに機能している遺伝子が異なるためである。遺伝子の機能の ON/OFF は、シトシンのメチル化やヒドロキシメチル化などの DNA 修飾により制御されている (Fig. 1)。正常な細胞では正常な DNA 修飾パターンが形成されているが、異常な細胞では異常な修飾パターンが形成されている。そのため、異常な修飾パターンはがんやアレルギー、アルツハイマー病などのバイオマーカーとして利用できる。

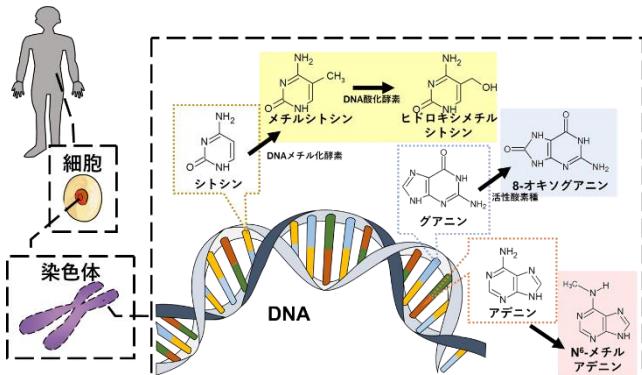


Figure 2 ヒトゲノム DNA 中の修飾塩基

本研究室では、メチル化 CpG 結合タンパク質 Methylated-CpG-binding domain (MBD) とホタル由来のルシフェラーゼ Firefly luciferase (Fluc) を融合させた MBD-Fluc と、非メチル化 CpG 結合タンパク質 unmethylated-CpG-binding domain である Cys-X-X-Cys motif (CXXC) とエビ由来のルシフェラーゼ Oplophorus luciferase (Oluc) を融合させた CXXC-

Oluc を構築し、これらを用いた標的 DNA のメチル化レベル測定法を開発した。これは標的 DNA に結合した蛍光物質がルシフェラーゼも発光により蛍光を発する原理である生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を利用し、異なる波長の BRET シグナルで標的 DNA 中のメチル化 DNA 量と非メチル化 DNA 量を同時に定量する方法である。さらに、ヘミメチル化 DNA を認識する SET and RING-associated (SRA) domain と Fluc を融合した SRA-Fluc を構築し、同様の原理でヘミメチル化レベルを測定する方法も開発している。これらの結果は修飾塩基認識タンパク質融合ルシフェラーゼを構築すれば、その標的修飾塩基を BRET により検出できることを示している。

そこで、本研究ではタンパク質ライゲーションシステム SnoopCatcher/SnoopTag を用いることで、任意の組み合わせの修飾塩基認識タンパク質融合ルシフェラーゼを構築する方法を確立することを目的とした。CXXC に SnoopTag (CXXC-SnoopTag) を、Oluc に SnoopCatcher (SnoopCatcher-Oluc) を附加した 2 種類のタンパク質を組換え生産し、これらのライゲーション産物を用いて BRET により標的 DNA の非メチル化 DNA 量を定量できるか検討した。

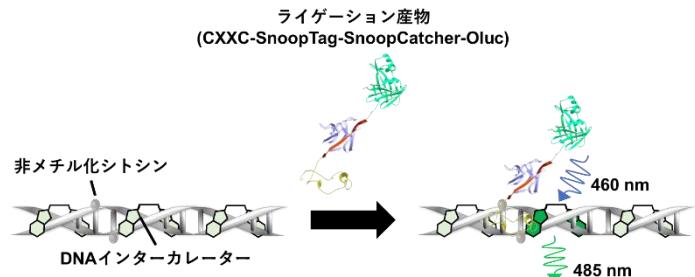


Figure 1 非メチル化 DNA 検出原理

2. 方法

CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc の生産

pET30c-streptagII-CXXC-SnoopTag 発現ベクターと pET30c-streptagII-SnoopCatcher-Oluc 発現ベクターを構築し、大腸菌 BL21 (DE3)を形質転換した。形質転換した BE21 (DE3)を OD₆₀₀ が 0.5-0.6 になるまで培養し、1.2 mM IPTG を添加して CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc の発現誘導を行った。CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc を Strep-Tactin カラムを用いて精製した。全ての溶出画分のルシフェラーゼ活性測定と SDS-PAGE 解析を行った。

CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc のライゲーション反応

CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc をモル比 1 : 1 でライゲーションさせた。この反応液を限外濾過法により、未反応の CXXC-SnoopTag を取り除いた。ライゲーション産物を SDS-PAGE により解析した。

ライゲーション産物の非メチル化 DNA への結合能解析

biotin 修飾非メチル化、メチル化二本鎖 DNA を固定化した Streptavidin プレートを用い、そこに精製したライゲーション産物を加えてルシフェラーゼの発光強度を測定して、非メチル化 DNA に対して特異的に結合するか検討した(Fig. 3)。

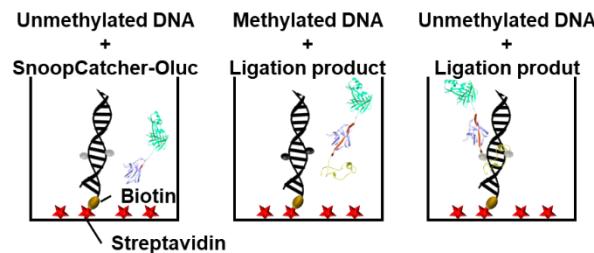


Figure 3 ライゲーション産物の特異性解析

BRET を利用した非メチル化 DNA レベルの定量

メチル化酵素阻害剤である 5 アザシチジンで処理した、ヒトの子宮頸がん細胞由来 HeLa 細胞からゲノム DNA を抽出することにより、メチル化レベルの異なるゲノム DNA を調整した。このゲノム DNA に DNA インターカレーターである BOBO-1 を加えた後、ライゲーション産物を加えた。その後、発光基質を加えてルシフェラーゼの発光によ

って励起された BOBO-1 の蛍光スペクトルを測定した。

3. 結果

CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc の生産

SDS-PAGE 解析の結果、溶出画分で、CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc ともに目的の位置にバンドを確認することができた。また、溶出画分で、通過画分と洗浄画分と比較して約 10 倍高い SnoopCatcher-Oluc のルシフェラーゼ活性が示された。以上より、CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc が精製できたことが示された。

CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc のライゲーション反応

SDS-PAGE 解析の結果、ライゲーション産物の目的の位置にバンドが確認できたことから、CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc がライゲーションされていることが示されました。また、限外濾過法により未反応の CXXC-SnoopTag が取り除かれたことが示された。

ライゲーション産物の非メチル化 DNA への結合能解析

非メチル化 DNA にライゲーション産物を加えた場合のみ高いルシフェラーゼ活性が観察されたことから、ライゲーション産物は、非メチル化DNA に特異的に結合することが示された。

BRET を利用した非メチル化 DNA レベルの定量

各波長の発光・蛍光強度を BOBO-1 の蛍光に影響されない 440 nm の発光強度で補正した結果、BOBO-1 の最大蛍光波長 485 nm でメチル化レベルに依存して、BOBO-1 の蛍光強度が減少することが示された。

4. 結論

BRET assay の結果より、タンパク質ライゲーションシステム SnoopCatcher/SnoopTag を用いることで、標的 DNA 中の修飾塩基を検出できる修飾塩基認識タンパク質融合ルシフェラーゼを構築できることが示された。つまり、本手法を利用することによりゲノム DNA 中の様々な修飾塩基を同一のプラットフォームで測定できることが示唆された。