

SpyTag/SpyCatcher システムを用いた ルシフェラーゼ融合タンパク質の構築とメチル CpG 検出法の開発

Construction of luciferase fusion protein using SpyTag/SpyCatcher system and development of methyl CpG detection method

島村 葉月 ¹⁾

指導教員 吉田 亘 ^{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所属先

キーワード : SpyCatcher, SpyTag, BRET, メチル化DNA

1. 背景・目的

本研究ではタンパク質連結システム SpyTag/SpyCatcher を用いて、種々の疾患の目印となる複数の修飾塩基を同時に測定する方法を開発することを目的とした。DNA は A(アデニン)・T(チミン)・C(シトシン)・G(グアニン)の 4 つの塩基によって構成されている。このうち、シトシンとグアニンが連続する配列(CpG 配列)中のシトシンは、メチル基転移酵素によってメチル基が付加されてメチルシトシンという修飾塩基に変化する(Fig.1)。

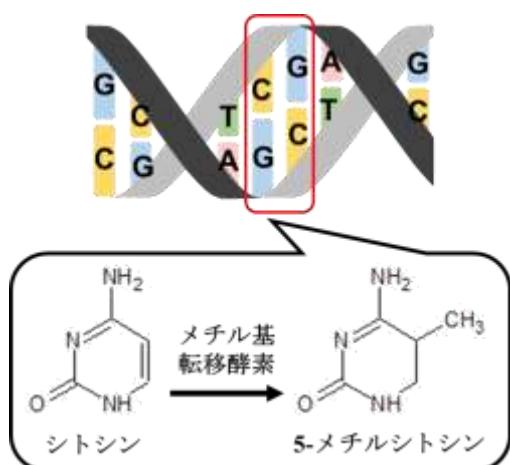


Fig.1 シトシンのメチル化

がん細胞は正常細胞に比べ、DNA のメチル化頻度が低下していることが報告されているため、DNA のメチル化頻度を測定することはがんの診断につながる。

本研究室ではメチル CpG 結合タンパク質 (Methyl-CpG-binding domain: MBD) 融合ホタルルシフェラーゼ (Firefly luciferase: Fluc) と非メチル CpG 結合タンパク質融合エビルシフェラーゼを構築している。そのうえで、発光タンパク質と蛍光物質間でエネルギーが移動する生物発光共鳴エネルギー移動 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer: BRET) を利用してメチル化頻度と非メチル化頻度を同時に測定する方法を開発している。

ヒトゲノム DNA にはメチルシトシン以外にヒドロキシメチルシトシン、メチルアデニン、8-オキソグアニン等の修飾塩基が存在する。これらの修飾塩基は種々の疾患の目印として利用できるが、その簡易的な測定法は開発されていない。つまり、これらの修飾塩基認識タンパク質に発光色の異なるルシフェラーゼを融合させれば、BRET assay を用いて複数の修飾塩基を同時に測定できると想定した。

そこで、本研究では SpyTag/SpyCatcher を用いて、修飾塩基認識タンパク質とルシフェラーゼを任意

の組合せで連結させ、それを用いて標的修飾塩基を測定する方法を開発することを目的とした。本研究では SpyTag/SpyCatcher を用い、モデル系として MBD と Fluc の融合タンパク質を構築し、DNA のメチル化頻度を測定する方法を開発することを試みた(Fig.2)。

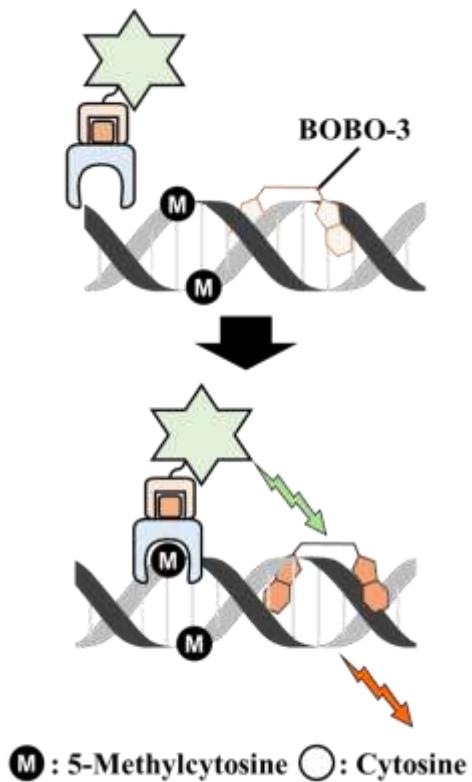


Fig.2 メチル化頻度測定原理

2. 方法

1. MBD-SpyTag と SpyCatcher-Fluc の生産

MBD-SpyTag と SpyCatcher-Fluc の配列を有したプラスミドを構築し、大腸菌 BL21 (DE3)を用いて MBD-SpyTag と SpyCatcher-Fluc を生産させ、これらのタンパク質を精製して SDS-PAGE により解析した。

2. MBD-SpyTag と SpyCatcher-Fluc の連結解析

PBS buffer 中で MBD-SpyTag と SpyCatcher-Fluc を混合し、室温で 1 h 静置することでこれらタンパク質を連結させた。連結効率は SDS-PAGE により解析した。

3. BRET を利用したメチル化 DNA の測定

PBS buffer 中で MBD-SpyTag と SpyCatcher-Fluc を混合し、室温で 1 h 静置後、濾過により未反応の MBD-SpyTag を除去した。次に、PBS buffer 中で DNA と蛍光色素である BOBO-3 を室温で 30 min 反応させた。その後、この反応液に対して MBD-SpyTag-SpyCatcher-Fluc を加えて室温で 1 min 静置後、発光基質となる Picagene を加え、Fluc の発光エネルギーを受け取った BOBO-3 の蛍光波長を測定した。

3. 結果

1. MBD-SpyTag と SpyCatcher-Fluc の生産

SDS-PAGE の結果、目的の位置付近にバンドが確認されたことから、MBD-SpyTag と SpyCatcher-Fluc が精製できたことが示された。

2. MBD-SpyTag と SpyCatcher-Fluc の連結解析

SDS-PAGE の結果、目的の位置付近にバンドが確認されたことから、MBD-SpyTag と SpyCatcher-Fluc が連結したことが示された。

3. BRET を利用したメチル化 DNA の測定

BRET assay の結果、DNA のメチル化頻度依存的に BRET シグナルが上昇することが示された (Fig.3)。以上より、MBD-SpyTag-SpyCatcher-Fluc を用いることで DNA のメチル化頻度を測定できることが示唆された。

4. 結論

大腸菌を用いて MBD-SpyTag と SpyCatcher-Fluc を生産できることが示された。また、MBD-SpyTag と SpyCatcher-Fluc を混合し、室温で 1 時間静置することで、これらが連結することが示された。これら連結産物と BOBO-3 間で生じる BRET 強度を測定することで、DNA のメチル化頻度を測定できることが示された。つまり、本手法を用いることにより、種々の修飾塩基を測定できることが示唆された。