

# 人工発光タンパク質を用いた複数種がん同時診断法の開発

## Development of simultaneous diagnosis of multiple types of cancer using engineered luminescent protein

後藤 綾乃<sup>1)</sup>

指導教員 吉田 壴<sup>1), 2)</sup>

- 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、ルシフェラーゼ、がん診断

### 【背景・目的】

日本人の死亡要因の一位はがんであり、4人に1人はがんで死んでいます。がんを治療するために早期診断が必須であり、がんの診断にはレントゲンや CT などの画像検査や内視鏡検査、血液検査などが利用されています。

近年、新たながんのバイオマーカーとして血液中に遊離しているがん細胞由来の異常なメチル化 DNA が着目されています。DNA メチル化とは、シトシンとグアニンの連続した配列(CpG)中のシトシンの 5 位がメチル化される反応であり、遺伝子発現制御に関連している(Fig.1)。がん細胞では、このメチル化パターンが異常になっていること、がんの種類によってその異常なパターンが異なることから、これらはがんのバイオマーカーとなる。実際に、大腸がんでは *SEPT9*、*IKZF1*、*BCAT1*、肺がんでは *SHOX2*、*PTGER4* など、がんの種類ごとに異常にメチル化されている遺伝子が同定されています。



Fig. 1 がん細胞における異常なメチル化状態

血液中の異常なメチル化 DNA を検出する方法としては、DNA を化学処理(バイサルファイト変換)する方法が実用化されている。この方法は煩雑な操作を伴い測定までに約半日必要とする。そこ

で、本研究では DNA の化学処理を必要としない、複数の標的遺伝子のメチル化レベルを検出する方法を開発することを目的とした。

本研究室ではホタル等の生物発光に関わる酵素であるシフェラーゼを用いたゲノム DNA 全体のメチル化レベル検出法を開発した。これはホタル由来ルシフェラーゼ Firefly Luciferase(Fluc)と DNA の二本鎖中の CpG がメチル化されたフルメチル化 CpG に結合するタンパク質 Methyl-CpG-binding domain (MBD)の融合タンパク質(MBD-Fluc)を用いた方法である。MBD-Fluc は DNA の 1 本鎖中のメチル化 CpG には結合せず、2 本鎖中の CpG がメチル化されたフルメチル化 CpG にのみ結合する。そのため、DNA のハイブリダイゼーションを用いて様々なプローブ DNA に対応する複数の標的遺伝子のメチル化レベルを検出法できると考えた。今回はモデル系として *SEPT9* と *LINE1* のメチル化レベルを測定する方法を開発することを試みた。

本研究で開発するメチル化レベル測定法の原理を Fig.2 に示す。まず、標的配列の CpG をメチル化した一本鎖プローブ DNA を固相に固定化する。そこに標的 DNA を加え、プローブ DNA と相補的な配列を持つ標的 DNA をハイブリダイゼーションさせる。標的配列がメチル化されている場合は固相上で両鎖の CpG がメチル化されたフルメチル化状態の二本鎖 DNA が形成される。一方、標的配列がメチル化されていない場合は固相で形成され

る二本鎖 DNA はプローブ DNA のみメチル化されたヘミメチル化状態となる。MBD はフルメチル化 CpG に特異的に結合するため、発光基質を加えた後に結合した MBD-Fluc 量をルシフェラーゼの活性を指標に測定すれば標的遺伝子のメチル化レベルを測定できると想定した。

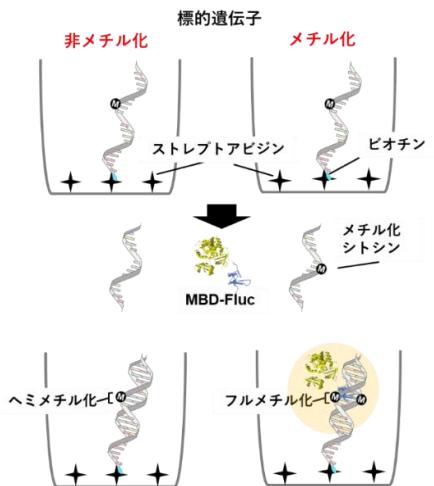


Fig. 2 メチル化標的遺伝子検出法の原理

## 【方法】

### 1. MBD-Fluc の組換え生産

pET30c-Strep-tag II-MBD-Fluc で形質転換した腸菌 BL21 (DE3)を用いて、MBD-Fluc を組換え生産した。得られた湿菌体を破碎し、精製で得られた通過画分、洗浄画分、溶出画分のルシフェラーゼ活性測定し、SDS-PAGE 解析を行なった。

### 2. SEPT9 メチル化レベルの検出

ビオチン修飾した SEPT9 メチル化一本鎖プローブ DNA をストレプトアビシン固定化プレートに加え、固定化した。次に SEPT9 メチル化一本鎖標的 DNA と SEPT9 非メチル化一本鎖標的 DNA を用いて、メチル化レベルの異なる一本鎖標的 DNA 溶液を作製した。この溶液をプレートに加え、プローブ DNA とハイブリダイゼーションさせた。次に MBD-Fluc を加え 30 分室温でインキュベートした後に洗浄し、ルシフェラーゼの発光基質であるルシフェリンを添加し、発光強度を測定した。

### 3. メチル化 LINE1 の検出

ビオチン修飾したフルメチル化 LINE1 二本鎖 DNA とヘミメチル化 LINE1 二本鎖 DNA をストレ

プトアビシン固定化プレートに加え、二本鎖 DNA をプレートに固定化した。MBD-Fluc を加え 30 分室温でインキュベートした後に洗浄し、ルシフェラーゼの発光基質であるルシフェリンを添加し、発光強度を測定した。

## 【結果】

### 1. MBD-Fluc の組換え生産

精製で得られた溶出画分を SDS-PAGE で解析した結果、MBD-Fluc と同じ分子量の位置にシングルバンドが確認できた。また、それぞれの各分の発光強度を測定した結果、洗浄画分と比較して溶出画分で約 10 倍高いルシフェラーゼ活性が得られた。以上より、MBD-Fluc を精製できたことが示された。

### 2. SEPT9 メチル化レベルの検出

メチル化レベルの異なる SEPT9 一本鎖標的 DNA をプローブ DNA にハイブリダイゼーションさせ、MBD-Fluc のルシフェラーゼの活性を測定した結果、メチル化レベル依存的にルシフェラーゼの活性が上昇することが示された。つまり MBD-Fluc を用いて SEPT9 のメチル化レベルを検出できることが示された。

### 3. メチル化 LINE1 の検出

ヘミメチル化 LINE 二本鎖 DNA を固定した場合と比較してフルメチル化 LINE 二本鎖 DNA を固定化すると約 10 倍高いルシフェラーゼ活性が得られた。以上の結果より、MBD-Fluc を用いてメチル化 LINE を検出できることが示された。

## 【結論】

固定化したメチル化一本鎖プローブ DNA にハイブリダイゼーションさせた DNA のメチル化レベルを MBD-Fluc を用いて測定できることが示された。本手法は、固定化するプローブ DNA を変えるだけで、すべての標的遺伝子のメチル化レベルを測定できる汎用性の高い方法である。つまり、本手法を用いれば種々のがん抑制遺伝子のメチル化レベルを同時に測定することが可能である。今後本手法を用いた複数種のがんを同時に診断できる方法が開発されることが期待される。