

人工発光蛋白質を利用した簡易癌診断法の開発

Development of simple cancer diagnosis system using artificial photoprotein

馬場勇次

指導教員 吉田亘

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 生命機能応用研究室

キーワード：DNA メチル化レベル・メチル化 CpG 結合ドメイン・
非メチル化 CpG 結合ドメイン・Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)

【背景・目的】

本研究では在宅で簡便に癌診断を行える方法を開発する事を目的とした。在宅で癌を簡便に診断できれば癌患者の死亡率を低減させることができると考えた。そこで、本研究では癌のバイオマーカーとして DNA メチル化に着目した。

DNA メチル化とは、ゲノム DNA 中のシトシンとグアニンの連続した塩基配列中のシトシンがメチル化される反応であり、遺伝子発現制御において重要な役割を果たしている。一方、正常細胞のゲノム DNA のメチル化レベルは 70~80% 程度であるのに対し、がん細胞では、40~50% まで低下している。つまり、ゲノム DNA のメチル化レベルは、癌のバイオマーカーとなる。本研究ではメチル化 CpG 結合ドメイン (MBD) 融合ルシフェラーゼ (MBD-luc) を用い、MBD-Luc と DNA インターカレーター間で生じる Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) の signal を利用したゲノム DNA のメチル化 CpG 量測定法を開発している (Yoshida *et al. Anal. Chem.* 2016, 88, 9264)。一方、本手法は非メチル化 CpG 量を測定できないため、メチル化レベルを測定するためにはゲノム DNA 量を測定した検量線を必要とする。そこで、本研究では非メチル化 CpG 結合蛋白質である MLL CXXC domain にルシフェラーゼを融合させた蛋白質 (CXXC-luc) を用い、同様の原理で非メチル化 CpG 量を測定する方法を開発することを目的とした。MBD-Luc と CXXC-Luc を用いゲノム DNA の

メチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量を測定すれば、簡便にゲノム DNA のメチル化レベルを測定できると想定した(図 1)。

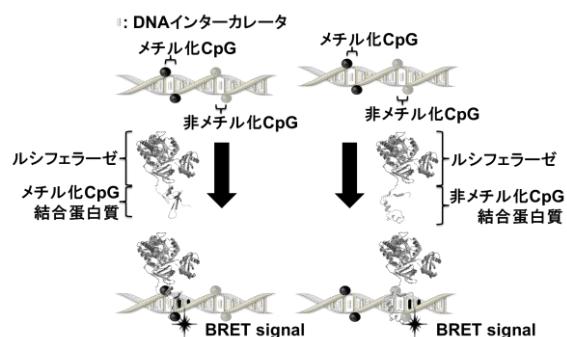


図 1 メチル化と非メチル化 CpG 量の測定法

【方法】

1. CXXC-luc の組換え生産

MLL 由来の CXXC とルシフェラーゼの遺伝子を挿入した発現ベクターを用いて、BL21 (DE3) を形質転換し、IPTG により CXXC-luc の発現誘導を行った。その後、BL21 (DE3) を破碎し水溶性画分を調製し、精製用に付加してある Streptag に結合する Streptavidin 固定化カラムを用いて、CXXC-luc を精製した。その後、SDS-PAGE 解析を行った。

2. BRET アッセイ

2-1. ゲノム DNA のメチル化 CpG 量の測定

DNA インターカレーターとして BOBO-3 を利用した。1.2 μ M BOBO-3 および 22 ng / μ L ヒトゲノム DNA の混合液を調製した。45 nM MBD-luc を加えた後、ルシフェラーゼ基質の添加することで

発光蛍光スペクトルを測定した。

2-2. ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量の測定

DNA インターカレーターとして BOBO-3 を利用した。1.2 μ M BOBO-3 および 22 ng / μ L ヒトゲノム DNA の混合液を調製した。45 nM CXXC-luc を加えた後、ルシフェラーゼ基質の添加することで発光蛍光スペクトルを測定した。

3. ゲノム DNA のメチル化レベルの測定

MBD-luc および CXXC-luc によるゲノム DNA のメチル化レベルを定量化するために、以下の式を使用し、次いでバイサルファイト変換ベースの解析法と比較した。

$$\text{Global methylation level (\%)} =$$

$$\text{IMBD} / (\text{IMBD} + \text{ICXXC}) \times 100$$

(IMBD = BRET signal by MBD-luc,

ICXXC = BRET signal by CXXC-luc)

【結果】

1. CXXC-luc の組換え生産

SDS-PAGE 解析の結果、溶出画分で目的位置にシングルバンドが確認された。この結果より、溶出画分に CXXC-luc を精製できたことが示された。

2. BRET アッセイ

2-1. ゲノム DNA のメチル化 CpG 量の測定

各波長の発光蛍光強度は、578 nm の発光強度によってノーマライズした。このとき、ヒトゲノム DNA のメチル化された CpG 含量依存的に、608 nm での BRET signal が増加した(図 2)。この結果から、BRET signal を測定することにより、メチル化 CpG 含量を検出できることが示された。

2-2. ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量の測定

各波長の発光蛍光強度は、578 nm の発光強度によってノーマライズした。このとき、ヒトゲノム DNA のメチル化された CpG 含量依存的に、608 nm での BRET signal が減少した(図 3)。この結果から、BRET signal を測定することにより、非メチル化 CpG 含量を検出できることが示された。

3. ゲノム DNA のメチル化レベルの測定

バイサルファイト変換ベースの解析法によって定量化されたゲノム DNA のメチル化レベルと、MBD-luc および CXXC-luc を用いた BRET アッセ

イから算出されたゲノム DNA のメチル化レベルとの間には、有意な正の相関が観測された(図 4)。この結果は、MBD-luc と CXXC-luc を用いゲノム DNA のメチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量を測定すれば、簡便にゲノム DNA のメチル化レベルを測定できることを示した。

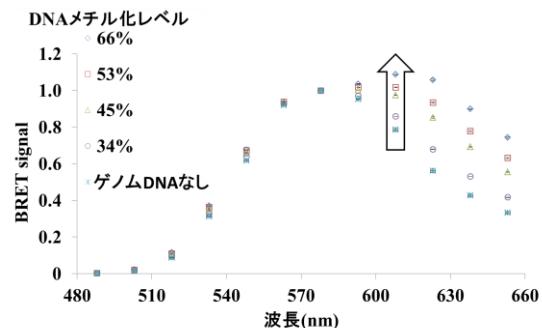


図 2 ゲノム DNA のメチル化 CpG 量測定の結果

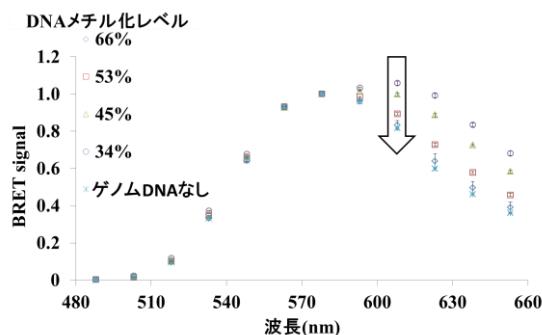


図 3 ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量測定の結果

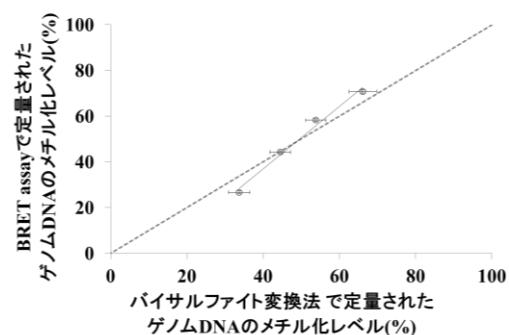


図 4 ゲノム DNA のメチル化レベル測定の結果

【結論】

MBD-luc と CXXC-luc を用いることで、試薬を混合するだけで簡便にゲノム DNA のメチル化レベルを測定できることが示された。

【論文発表】

Yoshida W., Baba Y., Banzawa K., Karube I., *Anal. Chim. Acta.*, 2017, 990, 168-172.