

癌ゲノム DNA 簡易検出法の開発

Direct sensing of cancer genomic DNA for cancer diagnostics

高 夏海

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：ヘミメチル化 DNA・BRET・UHRF1・SRA・ルシフェラーゼ

【背景・目的】

本研究は誰でも簡単に行える癌診断法を開発することを目的とした。日本人における死因の第一位は癌である。現在、癌診断は病院や検査機関で実施されており、在宅で癌診断を行うことはできない。そのため、誰でも簡単に癌診断を行える方法が開発できれば、在宅で癌診断が可能になり、超早期に癌の発見が可能になる。そこで本研究では誰でも簡単に癌診断を行える方法を開発するために、ホタルの発光に着目した。ホタルの発光現象は発光蛋白質ルシフェラーゼが発光基質ルシフェリンと反応することによって生じる。このルシフェラーゼを利用し、癌細胞がある場合のみ発光する方法を開発すれば、誰でも簡単に癌診断が可能になると考えた。

本研究では癌の目印(バイオマーカー)となる分子としてヘミメチル化 DNA に着目した。DNA メチル化とは特定の配列のシトシン塩基にメチル基が修飾される反応である。DNA は通常、二重らせん構造を形成するため、二本の DNA 鎖は両方ともメチル化される(フルメチル化 DNA)が、DNA の複製過程において、DNA のメチル化情報は新生鎖に受け継がれず、片鎖のみがメチル化された DNA (ヘミメチル化 DNA)が生じる。このヘミメチル化 DNA はウィルムス腫瘍や卵巣上皮性腫瘍などの癌細胞で多く存在していることから、癌のバイオマーカーとして期待される。癌患者の末梢血には癌細胞由来の遊離 DNA が含まれているため、癌患者末梢血ではヘミメチル化 DNA 量が通常より

も増加している。これまでに癌のバイオマーカーとして DNA メチル化が注目されているが、フルメチル化 DNA は健常者の末梢血にも多く存在しているため、癌診断に利用するには困難であった。そこでヘミメチル化 DNA を検出すれば癌の診断が可能になると考えた。

本研究ではヘミメチル化 DNA 結合蛋白質 SET and RING finger associated domain (SRA)にルシフェラーゼを融合させた蛋白質(SRA-luciferase)を用いれば、簡単にヘミメチル化 DNA を検出できると考えた。その原理を Fig. 1 に示す。標的 DNA がヘミメチル化されている場合は、SRA-luciferase が標的 DNA に結合する。そこに発光基質を加えるとルシフェラーゼが発光する。その結果、標的 DNA に結合した蛍光物質が蛍光を発する(生物共鳴エネルギー移動(BRET))。つまり蛍光強度を測定すれば試薬を混合するだけで、ヘミメチル化 DNA を検出できると想定した。

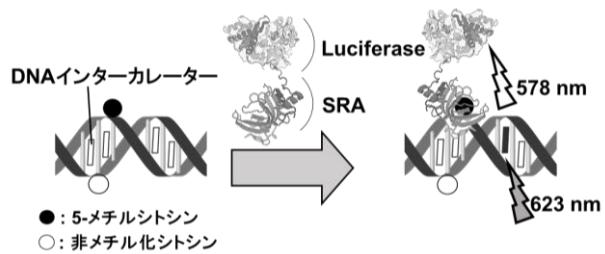


Fig.1 ヘミメチル化 DNA 検出原理

【方法】

1. SRA-luciferase 融合蛋白質の組換え生産

Total RNA を HeLa 細胞より抽出し、逆転写酵素を用いて Total cDNA 合成した。これを鑄型にして Streptag をコードしているプライマーを用いて SRA 遺伝子を PCR で増幅し、SRA 融合 luciferase 発現ベクターを構築した。大腸菌 BL21 (DE3)を用いて SRA-luciferase 融合蛋白質を組み換え生産し、精製した。全ての精製画分(通過画分、洗浄画分、溶出画分)の luciferase 活性測定および SDS-PAGE 解析を行なった。

2. SRA-luciferase のヘミメチル化 DNA に対する結合能解析

biotin 修飾非メチル化、ヘミメチル化、フルメチル化二本鎖 DNA を固定化した Streptavidin プレートを用い、そこに精製した SRA-luciferase 融合蛋白質を加えて Luciferase の発光強度を測定して、ヘミメチル化 DNA に対して特異的に結合するか検討した。

3. BRET を利用したヘミメチル化 DNA 測定

化学合成した非メチル化、ヘミメチル化及びフルメチル化 DNA に DNA インターカレーターである BOBO-3 を加えた後、SRA-luciferase 融合蛋白質を加えた。その後、発光基質を加えて Luciferase の発光によって励起された BOBO-3 の蛍光スペクトルを測定した。

【結果】

1. SRA-luciferase 融合蛋白質の組換え生産

SDS-PAGE 解析結果、溶出画分に目的のバンドが確認でき、また通過及び洗浄画分と比較して溶出画分で約 10 倍の luciferase 活性が示された。以上より、SRA-luciferase を精製できたことが示された。

2. SRA-luciferase のヘミメチル化 DNA に対する結合能解析

Luciferase の発光強度を測定した結果、フルメチ

ル化、非メチル化 DNA と比較して、ヘミメチル化 DNA 存在下で高い発光強度が得られた(Fig.2)ことより、精製した SRA-luciferase は特異的にヘミメチル化 DNA に結合することが示された。

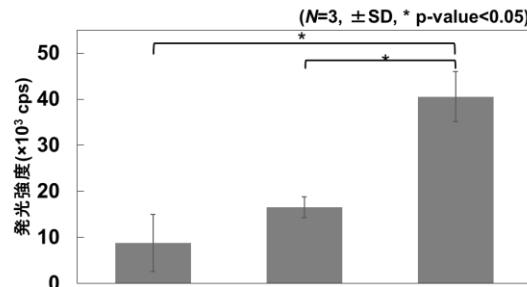


Fig.2 SRA-luciferase の特性解析

3. BRET を利用したヘミメチル化 DNA 測定

各波長の発光・蛍光強度を Luciferase 発光波長 578 nm の発光強度で補正した結果、非メチル化、メチル化 DNA と比較してヘミメチル化 DNA 存在下では BOBO-3 蛍光波長 623 nm で蛍光強度がヘミメチル化 DNA 特異的に上昇することが示された(Fig.3)。以上より、励起された BOBO-3 の蛍光強度を測定することによって洗浄操作なしにヘミメチル化 DNA を測定できることが示された。

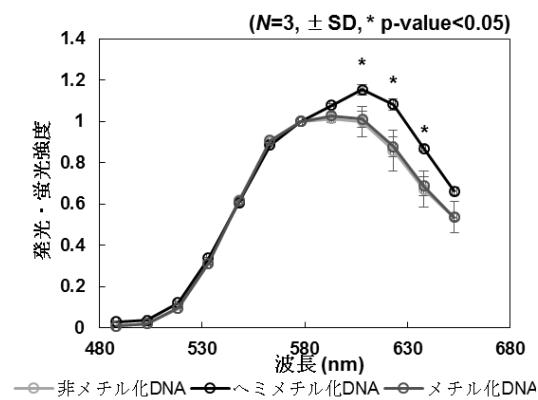


Fig.3 BRET assay 結果

【結論】

BRET assay の結果より、SRA-luciferase の発光によって励起された BOBO-3 の蛍光強度を測定することによってヘミメチル化 DNA を測定できることが示された。また本手法は洗浄操作なしに簡便に行えるため、誰でも簡単に癌診断が可能になることが期待される。