

DNA メチル化レベル測定法の開発と簡易がん診断法への応用

Development of a DNA methylation sensing system for home cancer test

川上 万理子
指導教員 吉田 亘

東京工科大学 応用生物学部 エピジェネティック工学研究室

本研究は簡便にがん診断を行うことを目的とし、メチル化 CpG 結合蛋白質 MBD と非メチル化 CpG 結合蛋白質 CXXC に蛍光蛋白質を融合させた2種の融合蛋白質を用いて DNA メチル化レベル測定法の開発を試みた。MBD と蛍光蛋白質 GFP との融合蛋白質を作製するために、MBD-GFP 大腸菌発現ベクターを構築した。発現ベクターは制限酵素処理によって MBD と GFP 遺伝子配列がベクターに挿入されたことを確認した。今後同様に CXXC と蛍光蛋白質 RFP の融合蛋白質を作製し、2種の融合蛋白質を用いて蛍光偏光で簡便に DNA メチル化レベルを測定する。

キーワード：がん診断, ヒトゲノム DNA, DNA メチル化, 蛍光蛋白質, 蛍光偏光

【背景と目的】

本研究では、在宅で簡便にがん診断を行う方法を開発することを目的とした。在宅でがん診断を行うことによりがんの早期発見に繋がり、早い段階での治療が可能になると考えられる。そこで本研究では、がんのバイオマーカーであるヒトゲノム DNA の異常なメチル化に着目した。DNA は4種類の塩基(アデニン、チミン、グアニン、シトシン)で構成されるが、ヒトゲノム DNA 中のシトシン・グアニン配列(CpG)中のシトシンはメチル化されることが知られている。プロモーター中のシトシンがメチル化されるとその遺伝子の発現は抑制されることから、メチル化は遺伝子のスイッチとして機能している。正常な細胞では正常なメチル化のパターンが形成されているが、がん細胞などの異常な細胞では、異常なメチル化パターンが形成されている。さらに、がん細胞ではゲノム DNA 全体のメチル化レベルが低下しているため、ヒトゲノム DNA のメチル化レベルはがんのバイオマーカーとなる。

本研究では簡便にヒトゲノム DNA のメチル化レベルを測定するために、蛍光偏光解消法に着目した。蛍光偏光度とは励起されてから蛍光を発するまでに蛍光分子が回転する度合いのことであり、それは蛍光分子の質量に依存する。そのため、蛍光

分子が標的分子に結合すると、見かけの質量が増加するため、蛍光偏光度は上昇する。つまり、ヒトゲノム DNA のメチル化部位に結合する蛍光分子を構築すれば、蛍光偏光度を測定するだけで簡便にメチル化レベルを測定できると想定した。

そこで2種の蛍光蛋白質(GFP(緑色蛍光蛋白質)と RFP(赤色蛍光蛋白質))に着目した。GFP とはオワンクラゲから同定された蛍光蛋白質であり最大励起波長は 475nm、最大蛍光波長は 505nm である。RFP とは造礁サンゴから同定された蛍光蛋白質であり最大励起波長は 580nm、最大蛍光波長は 608nm である。つまり、GFP にメチル化 CpG 結合蛋白質である MBD(メチル化 CpG 結合ドメイン)の融合蛋白質と、RFP に非メチル化 CpG 結合蛋白質である CXXC(非メチル化 CpG 結合ドメイン)の融合蛋白質を作製し、これらの蛍光偏光度を同時に測定すれば簡便にヒトゲノム DNA のメチル化レベルを測定できると考えた(Fig.1)。そこで、本研究では MBD-GFP 融合蛋白質と CXXC-RFP 融合蛋白質発現ベクターの構築を試みた。

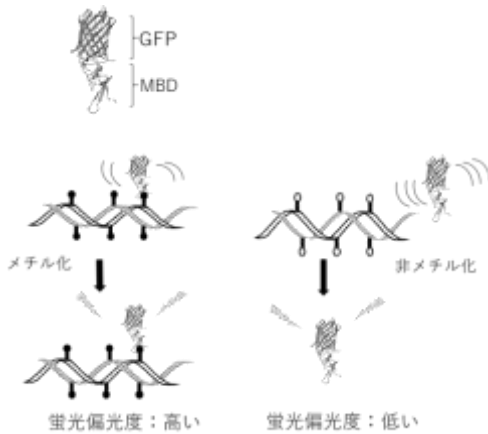


Figure 1 蛍光偏光の原理

【方法】

1.GFP 遺伝子の増幅・精製

EcoRI 認識配列を付加したフォワードプライマーと *NotI* を付加したリバースプライマーを用いて pAcGFP を PCR で増幅した。精製した PCR 産物を *EcoRI* と *NotI* で制限酵素処理した。

2.MBD-GFP 大腸菌発現ベクターの構築

EcoRI と *NotI* で制限酵素処理を行った *pET30c-Streptag-MBD* と *GFP* をライゲーションし、ライゲーション産物を用いて DH5α の形質転換を行った (Fig.2)。形成されたコロニーを用いてコロニーPCRを行い、*pET30c-Streptag-MBD* に *GFP* が挿入されているか確認した。コロニーPCR で目的の位置付近にバンドが確認できたコロニーを培養し、培養液からプラスミドを抽出した。このプラスミドに *EcoRI* と *NotI* で制限酵素処理を行い、電気泳動で *pET30c-MBD* に *GFP* が挿入されているか解析した。

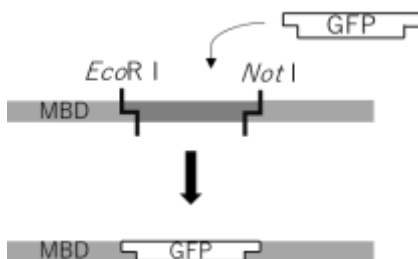


Figure 2 制限酵素処理を行った MBD と GFP のライゲーション

【結果】

1.GFP 遺伝子の増幅・精製

PCR 産物を電気泳動で解析した結果、目的の位置(720 bp)付近にバンドが確認されたことより、*GFP* を増幅できたことが示された。また目的のバンドを切り出し精製した結果、2.2 ng/μL の DNA が得られた。

2.MBD-GFP 大腸菌発現ベクターの構築

pET30c-Streptag-MBD と *GFP* のライゲーション産物を用いて大腸菌 DH5α を形質転換し、形成されたコロニーを用いて、コロニーPCR を行った。その結果、目的とする 1110 bp 付近にバンドが見られた。さらに形成されたコロニーから抽出したプラスミドを *EcoRI* と *NotI* で制限酵素処理し、電気泳動で解析したところ、目的の位置 (*GFP* 720 bp), (*pET30c-Streptag-MBD* 5526 bp) 付近にバンドが見られた (Fig.3)。この結果から *pET30c-Streptag-MBD-GFP* が構築されたことが示された。

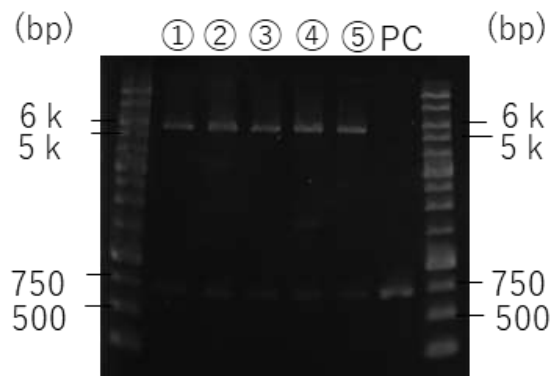


Figure 3 電気泳動結果(①~⑤) : MBD-GFP プラスミド制限酵素処理, PC : GFP

【まとめ】

MBD-GFP 融合蛋白質発現ベクターが構築できたことが示された。CXXC-RFP 融合蛋白質も作製し、2 種類の融合蛋白質を用いて蛍光偏光度を測定し、DNA のメチル化レベルが測定できるか確認する。