

# 人工発光タンパク質を用いた大腸がん診断法の開発

## Development of colorectal cancer diagnostic system using engineered luminescent protein

後藤 綾乃<sup>1)</sup>

指導教員 吉田 亘<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, *SEPT9*, 大腸がん

### 【背景・目的】

大腸がんは日本で最も罹患数の多いがんであり、死亡数では肺がんに続いて2番目に多い。大腸がんの検診は主に便に含まれる血液を検出する便潜血検査により行われている。これは継続的な出血の有無を調べるため、異なる日に二回便を採取する必要がある。

近年、より簡便な大腸がん診断方法として、血液中に含まれる大腸がん由来のゲノム DNA を検出する方法が開発された。正常細胞と比較し、大腸がん細胞ではがん抑制遺伝子である *SEPT9* が異常にメチル化されている(Fig.1)。そのため、血液中に含まれる異常なメチル化 *SEPT9* は大腸がんのバイオマーカーとして利用されている。開発されたメチル化 *SEPT9* 検出法はサンプル中の DNA を化学処理(バイサルファイト変換)する工程が必要であり、測定までに数時間必要となる。そこで、本研究ではバイサルファイト変換を必要としない簡便なメチル化 *SEPT9* 検出法を開発することを目的とした。

本研究ではホタルの発光現象に関わる発光タンパク質であるル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2本鎖 DNA の両鎖がメチル化されたフルメチル化 DNA 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。

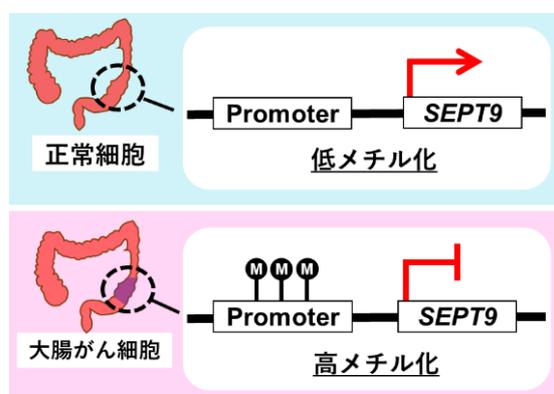


Fig.1 正常細胞と大腸がん細胞の *SEPT9* プロモーター領域のメチル化状態

MBD-Fluc はゲノム DNA 中のすべてのメチル化部位に結合するため、ゲノム DNA 全体のメチル化レベルを測定することが可能である。一方、検体から *SEPT9* のみ抽出し、それを対象に MBD-Fluc を用いてメチル化 DNA の有無を解析すれば、メチル化 *SEPT9* を検出できると考えた。

### 【本研究の原理】

本研究で想定した原理を(Fig.2)に示す。まずメチル化した一本鎖プローブ DNA を固相に固定化し、そこに *SEPT9* をハイブリダイゼーションさせる。*SEPT9* がメチル化されている場合は固相で形成される二本鎖 DNA は両鎖ともメチル化されたフルメチル化状態となる。一方、*SEPT9* 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 DNA 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 *SEPT9* のメチル化レベルを測定できると想定した。

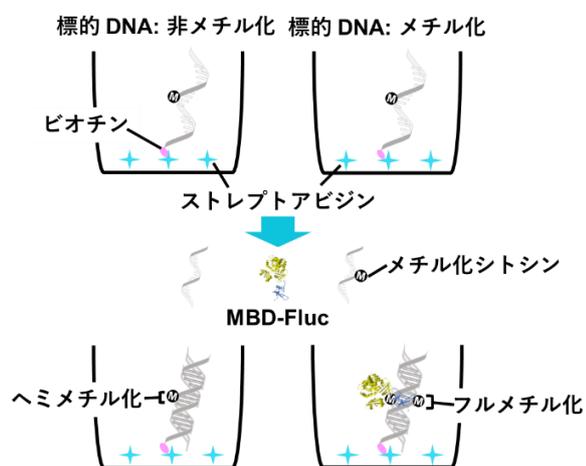


Fig.2 メチル化 *SEPT9* 検出法

## 【方法】

### 1. MBD-Fluc の組換え生産

大腸菌 BL21 (DE3)を用いて MBD-Fluc を組換え生産し、精製した。通過画分、洗浄画分、溶出画分の全てのルシフェラーゼ活性測定および SDS-PAGE 解析を行なった。

### 2. MBD-Fluc とフルメチル化二本鎖 DNA の結合解析

ストレプトアビジンを固定化したプレートにフルメチル化二本鎖 DNA とヘミメチル化二本鎖 DNA を用いて作製したフルメチル化レベルが異なる *SEPT9* 二本鎖 DNA を加え、1 時間インキュベートして固相に固定化した。洗浄後に、MBD-Fluc を加え 30 分室温でインキュベートした後に洗浄し、発光基質であるルシフェリンを添加した。ルシフェラーゼの活性を指標にメチル化レベル依存的に MBD-Fluc が結合するか解析した。

### 3. MBD-Fluc を用いたメチル化 *SEPT9* の検出

ストレプトアビジンを固定化したプレートにメチル化したプローブ DNA を室温で 1 時間イ

ンキュベートすることで固定化させた。そこに、メチル化 *SEPT9* 一本鎖 DNA もしくは非メチル化 *SEPT9* 一本鎖 DNA を添加し、室温で 30 分間インキュベートすることで、プローブ DNA とハイブリタイゼーションさせた。洗浄後に、MBD-Fluc を加え 30 分室温でインキュベートした後に洗浄し、発光基質を添加し、ルシフェラーゼの活性を指標にメチル化レベルを測定できるか検討した。

## 【結果】

### 1. MBD-Fluc の組換え生産

SDS-PAGE で解析した結果、溶出画分に目的の位置にシングルバンドが確認できた。通過画分と洗浄画分と比較して溶出画分で約 10 倍のルシフェラーゼ活性が示された。以上より、MBD-Fluc を精製できたことが示された。

### 2. MBD-Fluc とフルメチル化二本鎖 DNA の結合解析

MBD-Fluc の発光強度が固定化した二本鎖 DNA のフルメチル化レベル依存的に上昇することが示された。以上の結果より、MBD-Fluc がフルメチル化 *SEPT9* 二本鎖 DNA に特異的に結合することが示された。

### 3. MBD-Fluc を用いたメチル化 *SEPT9* の検出

非メチル化 *SEPT9* 一本鎖 DNA を添加した場合と比較し、メチル化 *SEPT9* 一本鎖 DNA を添加した場合において高い発光強度が観察された。つまり、本手法によりメチル化 *SEPT9* を検出できることが示された。

## 【結論】

MBD-Fluc はフルメチル化レベル依存的に *SEPT9* 二本鎖 DNA に結合することが示された。また、固相にメチル化一本鎖プローブ DNA を固定化し、そこに *SEPT9* をハイブリダイゼーションさせ、結合した MBD-Fluc のルシフェラーゼ活性を測定すれば、メチル化 *SEPT9* を検出できることが示された。今後、本手法を用いた簡易大腸がん診断法が開発されることが期待される。