

# CXXC-luciferase と CXXC-mCherry を用いたゲノム DNA メチル化頻度測定法の開発

## Global DNA methylation levels detection system using CXXC-luciferase and CXXC-mCherry

馬渡 琉磨  
指導教員 吉田 亘

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

非メチル化 CpG 結合タンパク質 (CXXC) 融合 luciferase と CXXC 融合蛍光タンパク質間で生じる生物発光共鳴エネルギー移動を利用すれば、ヒトゲノム DNA 全体のメチル化頻度を測定できると想定した。これら融合タンパク質を大腸菌で発現させるために、発現ベクターを構築した。

キーワード：がん診断、ヒトゲノム DNA、DNA メチル化、発光タンパク質、蛍光タンパク質

### 1. 背景・目的

DNA はアデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、シトシン (C) の 4 種類の塩基から構成されているが、ヒトゲノム DNA には 5-メチルシトシンなど様々な修飾塩基が含まれている。シトシンとグアニンが連続している配列は CpG 配列と呼ばれ、CpG 配列中のシトシンは DNA メチルトランスフェラーゼによりメチル化され、5-メチルシトシンとなる。プロモーター中の CpG がメチル化されると、その遺伝子の発現が抑制される。そのため、CpG のメチル化は遺伝子発現のスイッチとして機能している。

ヒトゲノム DNA には約 2900 万個の CpG 配列が含まれている。ゲノム DNA のメチル化頻度とはメチル化されている CpG 量とメチル化されていない CpG 量の割合のことである。ゲノム DNA のメチル化頻度は、正常細胞では 70-80%程度であるのに対し、がん細胞では正常細胞と比較して 10%程度低下している。そのため、ゲノム DNA のメチル化頻度は、がんのバイオマーカーとして利用できる。

本研究室では、メチル化 CpG に特異的に結合するタンパク質である Methyl-CpG-binding domain(MBD)に深海エビ由来のルシフェラーゼである Nanoluc を融合させた MBD-Nluc と、MBD に黄色蛍光タンパク質である mVenus を融合させた MBD-mVenus を構築し、これらの中で起こる生物発光共鳴エネルギー移動 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer :BRET) を指標に、ゲ

ノム DNA のメチル化 CpG 量を測定する方法を開発した。MBD-Nluc と MBD-mVenus が近接したメチル化 CpG に結合すると、Nluc と mVenus 間で BRET が生じる。近接したメチル化 CpG の割合はゲノム DNA のメチル化 CpG 量に依存するため、この BRET 強度を指標にゲノム DNA のメチル化 CpG 量を測定できる。本手法ではゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を測定していないため、ゲノム DNA のメチル化頻度を測定するためには、検量線を必要とする。

そこで、本研究では検量線を必要としないゲノム DNA のメチル化頻度測定法を開発するために、ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を測定する方法を開発することを目的とした。非メチル CpG に特異的に結合するタンパク質として CXXC が同定されている。そこで、CXXC にホタル由来ルシフェラーゼを融合させたタンパク質 (CXXC-Fluc) と CXXC に赤色蛍光タンパク質である mCherry を融合させたタンパク質 (CXXC-mCherry) を構築し、これらの中で生じる BRET を測定すれば、ゲノム DNA 中の非メチル化 CpG 量を測定できると想定した (Fig. 1)。

これまでに、MBD と Nluc、MBD と mVenus 間に GS リンカーを挿入すると、これら融合タンパク質間の BRET 効率が上昇することが示されている。そのため、GS リンカーを挿入した CXXC-GS-Fluc と CXXC-GS-mCherry を発現するベクターを構築することを試みた。

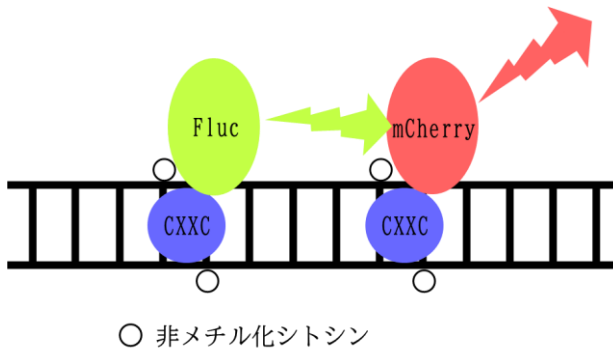


Fig. 1. CXXC-GS-Fluc と CXXC-GS-mCherry を用いたゲノム DNA の非メチル化 CpG 量測定方法 CXXC-GS-Fluc と CXXC-GS-mCherry が近接する非メチル化 CpG に結合すると、これら融合タンパク質間で BRET が生じる。近接する非メチル化 CpG 量はゲノム DNA の非メチル化 CpG 量に依存するため、この BRET シグナルを測定することで、ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を測定できる。

## 2. 方法

大腸菌用発現ベクターとして pET30c を用い、これに精製用タグである strep-tagII と CXXC-GS-mCherry をクローニングすることを試みた。まず、人工合成した GS-mCherry 遺伝子を PCR で増幅した。50  $\mu$ L PCR 溶液 [4 pg/ $\mu$ L GS-mCherry, 1 $\times$ PCR buffer, 0.3  $\mu$ M each primer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.02 U/ $\mu$ L KOD-Plus-Neo] を調製し、94 $^{\circ}$  C で 2 min インキュベート後、98 $^{\circ}$  C 10sec, 62 $^{\circ}$  C 30sec, 68 $^{\circ}$  C 1 min を 26 サイクル行った。次に、増幅した GS-mCherry と pET30c を制限酵素 EcoRI と NotI で切断し、DNA ligase を用いてライゲーションさせ、このライゲーション産物を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換した。得られたコロニーを培養し、得られたプラスミドのシーケンズ解析を行った。

次に、pET30c に strep-tagII と CXXC-GS-Fluc をクローニングすることを試みた。Fluc 遺伝子を PCR で増幅するため 50  $\mu$ L PCR 溶液 [40 pg/ $\mu$ L pET30c-Strep-tagII-CXXC-Fluc, 1 $\times$ PCR buffer, 0.3  $\mu$ M each primer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.02 U/ $\mu$ L KOD-Plus-Neo] を調製し、94 $^{\circ}$  C で 2 min インキュベート後、98 $^{\circ}$  C 10 sec, 68 $^{\circ}$  C 100

sec を 26 サイクル行った。増幅した Fluc と構築した pET30c-Strep-tagII-CXXC-GS-mCherry を制限酵素 KpnI と NotI で切断し、DNA ligase を用いてライゲーションさせ、このライゲーション産物を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換した。

最後に、pET30c-Strep-tagII-CXXC-GS-mCherry を用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換し、目的のタンパク質が発現するか検討した。

## 3. 結果

GS-mCherry を PCR で増幅した結果、目的の位置付近 (781 bp) にバンドが確認された。これと pET30c を制限酵素 EcoRI と NotI で切断し、これらをライゲーションした。このライゲーション産物で大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換し、得られたプラスミドの配列を解析した結果、目的の発現ベクターである pET30c-Strep-tagII-CXXC-GS-mCherry が構築されたことが示された。

Fluc を PCR で増幅した結果、目的の位置付近 (1664 bp) にバンドが確認された。これと pET30c-Strep-tagII-CXXC-GS-mCherry を制限酵素 EcoRI と NotI で切断し、これらをライゲーションした。このライゲーション産物で大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換した結果、形質転換体を得ることができた。

pET30c-Strep-tagII-CXXC-GS-mCherry で大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した結果、mCherry の蛍光が観察された。つまり、CXXC-GS-mCherry が大腸菌内で発現していることが示唆された。

## 4. 結論

発現ベクター pET30c-Strep-tagII-CXXC-GS-mCherry を構築した。これを用いて大腸菌 BL21(DE3) を形質転換することで、CXXC-GS-mCherry を組換え生産できることが示唆された。また、発現ベクター pET30c-Strep-tagII-CXXC-GS-Fluc が構築できたことが示唆された。今後はこれら融合タンパク質を組換え生産し、ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を測定できるか検討する。