

メチル CpG 結合ドメイン融合 luciferase を用いた ヘミメチル化 CpG 検出法の開発

Development of hemimethylated CpG detection method using methyl-CpG-binding domain fused luciferase and fluorescently modified probe DNA

外村 歩夢
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

メチル CpG 結合ドメイン融合ルシフェラーゼ(MBD-Luc)と蛍光色素を修飾したプローブ DNA を用いて、がんのマーカーとなる標的遺伝子のメチル化異常を測定できるか検討した。その結果、MBD-Luc により励起される蛍光修飾プローブの蛍光強度を指標に標的遺伝子のメチル化異常を測定できることが示された。

キーワード：がん診断, 遺伝子, メチル化異常, ルシフェラーゼ

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 種類の塩基で構成され、A と T、G と C がワトソン・クリック塩基対を形成することで二重らせん構造を形成する。近年、第 5 番目の塩基として、シトシンの 5 位がメチル化された 5-メチルシトシンが同定された。ヒトゲノム DNA では、C と G の連続配列 (CpG) 中のシトシンがメチル化される。CpG の相補鎖は CpG であり、通常二重らせん構造の両鎖の CpG がメチル化されている。この CpG のメチル化により遺伝子の発現が制御されることから、これは遺伝子の ON/OFF を制御するスイッチとして機能している。

細胞が分裂する際に、ゲノム DNA も複製されるが、新生鎖には未修飾のシトシンが取り込まれるため、一時的に片鎖のみがメチル化したヘミメチル化 CpG が生じる。ヒト細胞では DNA methyltransferase 1 が、ヘミメチル化 CpG を認識し、非メチル化 CpG をメチル化することで、メチル化パターンが娘細胞にも維持される。一方、正常細胞と比較し、がん細胞ではヘミメチル化 CpG 頻度が上昇していることが報告されていることから、これはがんのバイオマーカーとして利用できる。

本研究室ではこれまでに、両鎖ともメチル化された CpG (フルメチル化 CpG) に特異的に結合する

タンパク質である Methyl-CpG-binding domain (MBD) に発光タンパク質である Luciferase を融合させた MBD-Luc を構築している。さらに、MBD-Luc と蛍光修飾メチル化プローブ DNA 間で生じる生物発光共鳴エネルギー移動 (Bioluminescence resonance energy transfer: BRET) を利用した、標的遺伝子のメチル化 CpG 測定法を開発している。標的遺伝子がメチル化されている場合は、蛍光修飾メチル化プローブ DNA が結合すると、フルメチル化 CpG が形成される。一方、標的遺伝子がメチル化されていない場合は、片鎖のみメチル化されたヘミメチル化 CpG が形成される。MBD-Luc はフルメチル化 CpG に特異的に結合するため、この結合した MBD-Luc が発光すると、プローブ DNA に修飾した蛍光色素が励起され、BRET が生じる。つまり、この BRET シグナルを指標に標的遺伝子のメチル化 CpG を測定することができる。

そこで、本研究では MBD-Luc と標的遺伝子の両鎖に対する 2 種類の蛍光修飾メチル化プローブ DNA を用いれば、標的遺伝子のヘミメチル化 CpG を検出できると想定した (Fig. 1)。標的遺伝子がフルメチル化 CpG の場合は、両鎖に対して BRET シグナルが得られると想定される。一方、標的遺伝子がヘミメチル化 CpG の場合は、片鎖のみに対して BRET シグナルが得られる。また、標的遺伝子が両鎖とも

メチル化されていない場合は、両鎖に対して BRET シグナルが得られない。つまり、BRET シグナルが得られるパターンを解析することで、標的遺伝子のヘミメチル化 CpG を測定できると想定した。

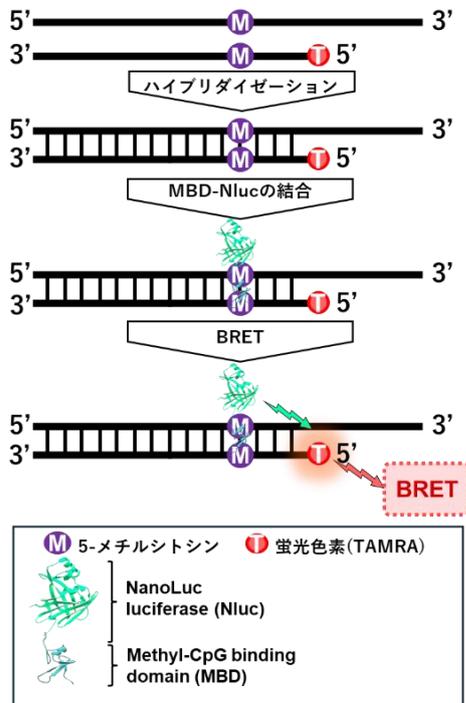


Fig. 1 BRET アッセイの原理

2. 方法

pET30c-*strep-tagII-MBD-Luc* で BL21 (DE3) Champion を形質転換した。形質転換体に IPTG を添加し、MBD-Luc の発現を誘導した。得られた湿菌体を破碎し、精製用に付加した strep-tagII に結合するカラムを用いて、MBD-Luc を精製した。精製過程で得られた溶出画分に MBD-Luc が含まれているか確認するために、luciferase の発光強度測定と SDS-PAGE 解析を行った。

精製した MBD-Luc がメチル化 CpG に特異的に結合するか解析するために、ビオチン修飾したフルメチル化 CpG、ヘミメチル化 CpG、及び非メチル化 CpG を含む二本鎖 DNA 溶液をストレプトアビジン固定化ウェルに固定化した。ウェルを 3 回洗浄後、MBD-Luc を各ウェル添加した。ウェルを 3 回洗浄後、発光基質を加え、発光強度を測定した。

4 種類の標的 DNA (メチル化 CpG また非メチル化 CpG トップストランドとボトムストランド) と対応

する蛍光修飾メチル化プローブ DNA をハイブリダイゼーションさせた。次に、この二本鎖 DNA に MBD-Luc を加えて、インキュベートした。その後、発光基質を添加し、BRET シグナルを測定した。

3. 結果

精製過程で得られた溶出画分を SDS-PAGE で解析した結果、目的の位置 (分子量: 2.9×10^4) 付近にバンドが確認された。溶出画分で高い luciferase 活性が観察されたことから、MBD-Luc が精製できたことが示された。

ストレプトアビジン固定化ウェルにビオチン修飾フルメチル化 CpG、ヘミメチル化 CpG、非メチル化 CpG を含む二本鎖 DNA を固定化し、そこに結合した MBD-Luc のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、フルメチル化 CpG を含む二本鎖 DNA を固定化したウェルで高い発光強度が得られた。つまり、MBD-Luc はフルメチル化 CpG を特異的に認識することが示された。

4 種類の標的 DNA (メチル化 CpG また非メチル化 CpG トップストランドとボトムストランド) と対応する蛍光修飾メチル化プローブ DNA で形成された二本鎖 DNA に MBD-Luc を加え、luciferase の発光により励起される蛍光色素の発光強度を測定した。その結果、メチル化 CpG トップストランドとメチル化 CpG ボトムストランドを標的とした場合のみ、高い BRET シグナルが得られた。つまり、標的遺伝子の両鎖に対して、本 BRET アッセイを行うことで、標的遺伝子のヘミメチル化 CpG を検出することが示された。

4. 結論

MBD-Luc と標的遺伝子の両鎖に対する 2 種類の蛍光修飾メチル化プローブ DNA を用いることで、標的遺伝子のヘミメチル化 CpG を検出できることが示された。本手法は、検体に試薬を混合するだけでヘミメチル化 CpG を検出できる簡便な方法である。ルシフェラーゼの発光はスマートフォン等でも検出可能であるため、今後、在宅でがんを診断できる方法が開発されることが期待される。