

学位論文要旨

西暦 2021年 1月 6日

学位申請者
馬場 勇次 印

学位論文題目

生物発光共鳴エネルギー移動法に基づいたゲノムDNAメチル化レベル定量法の開発

学位論文の要旨

DNAのメチル化とは、シトシンとグアニンの連続した配列(CpG)中のシトシンの5位にメチル基が付加される反応であり、プロモーターがメチル化されるとその遺伝子の発現は抑制される。ヒトゲノムDNAの約45%はレトロトランスポゾン由来の反復配列で構成されているため、この反復配列のメチル化レベルがゲノムDNA全体のメチル化レベルに相関している。正常細胞ではこの反復配列が高度にメチル化されているが、がん細胞ではメチル化レベルが低下しているため、ゲノムDNAのメチル化レベルはがんのバイオマーカーとしての利用が期待されている。

第1章「緒論」では、がん細胞におけるゲノムDNAのメチル化レベルの報告とゲノムDNAのメチル化レベル測定法に関する知見をまとめた。ゲノムDNAのメチル化レベル測定法としては、① Liquid chromatograph – mass spectrometry (LC-MS)を用いる方法、②重亜硫酸ナトリウム(バイサルファイト)処理を用いる方法、③抗5-メチルシトシン(5-methylcytosine: 5mC)抗体を用いる方法および④ methyl-CpG-binding domain (MBD)を用いる方法と4種類に分類することができる。LC-MSを用いる方法は、解析に1時間以上必要であること、大型な機器が必要であるため、測定に時間とコストがかかるという問題点が挙げられる。LC-MSを用いる方法と同等の正確性を持つバイサルファイト処理を用いた方法として、WGBSとCOBRAが挙げられる。WGBSを用いれば一塩基レベルの解像度で5mCを解析できるが、高価な次世代シーケンサーが必要になる。COBRAを用いれば、正確にメチル化レベルを定量できるが、バイサルファイト変換に5-6時間必要になるという欠点が挙げられる。バイサルファイト処理を用いない方法として、抗5mC抗体やMBDを用いる方法が挙げられる。抗5mC抗体を用いたELISA法は、複数回の洗浄操作が必要であるため、これを用いて簡便にゲノムDNAのメチル化レベルを解析できない。分割したluciferaseをMBDに融合した蛋白質を用い、luciferaseの相補性を利用したメチル化レベル測定法が開発されている。これを用いれば迅速・簡便にゲノムDNAのメチル化レベルを定量することができるが、分割されたluciferaseの発光強度は2つのメチル化CpG部位間の距離に依存するため、正確にゲノムDNAのメチル化レベルを測定できない可能性が指摘されている。また、これらの方法はゲノムDNAのメチル化レベルを定量するためには、検量線を必要とする。以上より、迅速・簡便にゲノムDNAのメチル化レベルを定量するためには、検体に試薬を混合するだけで測定できること、定量に検量線を必要としないことが求められる。

第2章「MBD-Flucを用いたヒトゲノムDNAのメチル化CpG量測定法の開発」では、簡便にゲノムDNAのメチル化CpG量を測定する方法を開発した。これまでの研究で、二本鎖DNA結合蛋白質であるZinc finger proteinにFirefly luciferaseを融合させた蛋白質(Zinc-Fluc)とDNA intercalating dye間で生じる生物発光共鳴エネルギー移動(bioluminescence resonance energy transfer: BRET)を利用した二本鎖DNA検出法が開発されている。そこ

で、メチル化 CpG 結合蛋白質(MBD)を firefly luciferase に融合させた蛋白質(MBD-Fluc)を用いれば BRET を利用してゲノム DNA のメチル化 CpG 量を測定できると考えた。以下に本手法の原理を示す。ゲノム DNA に BOBO-3 を加えると、BOBO-3 はゲノム DNA に結合する。そこに、MBD-Fluc を混合すると、MBD-Fluc の MBD はゲノム DNA 中のメチル化 CpG に結合する。最後に、発光基質を加えると、luciferase の発光により BOBO-3 が励起され蛍光を発する。つまり、ゲノム DNA のメチル化 CpG 量に依存して BRET シグナルが得られる。そこで、MBD-Fluc を組換え生産し、これを用いてゲノム DNA のメチル化 CpG 量を測定できるか検討した。MBD-Fluc と BOBO-3 をゲノム DNA に混合し、BRET シグナルを測定した結果、メチル化 CpG 量依存的に BRET シグナルが上昇することが示された。つまり、MBD-Fluc と BOBO-3 を用いて、BRET シグナルを測定することにより簡便にゲノム DNA のメチル化 CpG 量を測定できることを示した。

第3章「ゲノム DNA のメチル化状態に影響を与える分子のスクリーニング法の開発」では、MBD-Fluc を用いた BRET assay を用いて、ゲノム DNA のメチル化状態に影響を与える分子のスクリーニング法が開発できるか検討した。DNA メチル化酵素阻害剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine を含む培地、またはメチル基のドナーである葉酸を欠乏させた培地中で HeLa 細胞を培養し、ゲノム DNA のメチル化レベルを BRET assay で測定した。その結果、5-Aza-2'-deoxycytidine または葉酸の濃度および培養時間依存的な BRET シグナルの低下が確認された。つまり、本 BRET assay によりゲノム DNA のメチル化状態に影響を与える分子をスクリーニングすることができることが示された。

第4章「CXXC-Fluc を用いたヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 量測定法の開発」では、MBD-Fluc を用いた BRET assay と同一のプラットフォームでゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を測定する方法を開発した。MBD-Fluc を用いた BRET assay は、ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を測定できないため、ゲノム DNA のメチル化レベルを定量するためには検量線を必要とする。そこで非メチル化 CpG 結合蛋白質である CXXC を Fluc に融合させた蛋白質 CXXC-Fluc を用いれば、ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を同一のプラットフォームで測定できると考えた。そこで、CXXC-Fluc を組換え生産し、これを用いてゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を測定できるか検討した。CXXC-Fluc と BOBO-3 をゲノム DNA に混合し、BRET シグナルを測定した結果、非メチル化 CpG 量依存的に BRET シグナルが増加した。さらに、MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用いた各 BRET シグナルの比率は、ゲノム DNA のメチル化レベルと相関することを示した。つまり、MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用いた各 BRET assay によりゲノム DNA のメチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量を測定すれば、検量線を必要とせずに、簡単にゲノム DNA のメチル化レベルを定量できることを示した。この時の決定係数 R^2 値は 0.99 であり、相対標準偏差は 2.2%以下であった。既存法である HPLC 法の相対標準偏差は 2.0%以下、バイサルファイト処理を用いる方法は 2.0%である。そのため、本手法が既存法と同じ正確性であることを示した。

第5章「マルチカラーアッセイを用いたゲノム DNA のメチル化レベル絶対定量法の開発」では、簡便にゲノム DNA のメチル化レベルを絶対定量する方法を開発した。第2章と第4章で開発した BRET assay では、同じ発光蛋白質 Fluc を融合した MBD と CXXC を用いているため、これらを用いた BRET assay は別々に行う必要がある。そこで Fluc よりも波長が短い Oplophorus luciferase (Oluc) を CXXC に融合した蛋白質 CXXC-Oluc と MBD-Fluc を用いれば、ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量とメチル化 CpG 量を同時に測定できると考えた。そこで、CXXC-Oluc を組換え生産し、CXXC-Oluc と Oluc の発光で励起される BOBO-1、MBD-Fluc、BOBO-3 をゲノム DNA に混合し、各 BRET シグナルを測定した。その結果、MBD-Fluc と BOBO-3 の BRET シグナルはメチル化 CpG 量に、CXXC-Oluc と BOBO-1 の BRET シグナルは非メチル化 CpG 量に依存することが示された。つまり、これら融合蛋白質を用いれば一度の解析でメチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量を測定でき、ゲノム DNA のメチル化レベルを絶対定量できることが示された。

本研究で開発したゲノムDNAメチル化レベル測定法は、LC-MSや次世代シーケンサーのような大型な機械を必要とせず、検体に試薬を混ぜるだけで測定可能な方法である。また、その正確性は、HPLC法やバイサルファイト処理を用いる方法と同等であり、ゲノムDNAのメチル化レベルを算出するのに検量線を必要としない。つまり、本手法を用いれば迅速・簡便かつ正確にゲノムDNAのメチル化レベルを定量できることが示された。

備 考

1. 要旨は4000字程度にまとめること。
2. 本様式により、ワープロで作成することを原則とする。
3. 用紙はA 4版 上質紙を使用すること。

学位論文概要

西暦 2021年 1月 6日

学位申請者

馬場 勇次 印

学位論文題目

生物発光共鳴エネルギー移動法に基づいたゲノムDNAメチル化レベル定量法の開発

学位論文の要旨

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、これはがんのバイオマーカーとしての利用が期待されている。そこで本研究では生物発光共鳴エネルギー移動 (bioluminescence resonance energy transfer : BRET)法を利用した迅速・簡便なゲノム DNA のメチル化レベル定量法を開発することを目的とした。

メチル化 CpG に結合する蛋白質(methyl-CpG-binding domain: MBD)と Firefly luciferase の融合蛋白質(MBD-Fluc)を用いれば、ゲノム DNA のメチル化 CpG 量を迅速・簡便に測定できると考えた。本手法はゲノム DNA に結合させた DNA インターカレーターとメチル化 CpG サイトに結合した MBD-FLuc 間で起こる BRET を利用した測定法である。実際に、MBD-Fluc を組換え生産し、MBD-Fluc とその発光で励起される BOBO-3 をゲノム DNA に混合し、その BRET シグナルを測定した結果、ゲノム DNA のメチル化 CpG 量に依存して BRET シグナルが増加することが示された。また、本手法を用いたゲノム DNA のメチル化状態に影響を与える分子のスクリーニング法を開発した。

MBD-Fluc を用いた BRET assay は、ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を測定できないため、ゲノム DNA のメチル化レベルを定量するためには検量線を必要とする。そこで非メチル化 CpG 結合蛋白質である CXXC に着目し、CXXC 融合 Fluc (CXXC-Fluc)と BOBO-3 を用いた非メチル化 CpG 量測定法を開発した。MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用いて得られる BRET シグナルはメチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量に相関するため、これら BRET シグナルの比率からゲノム DNA のメチル化レベルを定量できることを示した。

さらに、Fluc とは最大発光波長が異なる luciferase を用いメチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量を同時測定する方法を開発した。Fluc よりも最大発光波長が短い Oplophorus luciferase (Oluc)を CXXC に融合した蛋白質 CXXC-Oluc を組換え生産した。MBD-Fluc と CXXC-Oluc を用いて BRET シグナルを測定した結果、MBD-Fluc と BOBO-3 の BRET シグナルはメチル化 CpG 量に、CXXC-Oluc と BOBO-1 の BRET シグナルは非メチル化 CpG 量に依存することが示された。つまり、これら融合蛋白質を用いれば一度の解析でメチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量を測定でき、ゲノム DNA のメチル化レベルを定量できることが示された。

備考

1. 要旨は1200字程度にまとめること。
2. 本様式により、ワープロで作成することを原則とする。
3. 用紙はA4版 上質紙を使用すること。

S u m m a r y

Applicant for degree: January 6th, 2021

Baba Yuji

Title of thesis :

Development of global DNA methylation level measurement system based on bioluminescence resonance energy transfer assay

DNA methylation is associated with the silencing of gene expression. In cancer cells, global DNA methylation levels decreased compared with normal cells. Therefore, global DNA methylation levels have been considered as biomarkers for cancer diagnostics. This study aimed to develop a simple global DNA methylation level measurement system based on bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assay.

A BRET assay for the measurement of methyl CpG content on genomic DNA was developed using methyl-CpG-binding domain (MBD) fused firefly luciferase (Fluc) (MBD-Fluc) and BOBO-3 of DNA intercalating dye. In the BRET assay, the MBD-Fluc binds to the methyl CpG on genomic DNA, whereby BRET between the MBD-Fluc and BOBO-3 is detected. The results showed that the BRET signal depended on the DNA methylation level of human genomic DNA. Moreover, screening system for DNA methyltransferase inhibitor was developed using the BRET assay.

To quantify global DNA methylation level by the BRET assay using MBD-Fluc, a calibration curve is required, because the MBD-Fluc-based BRET assay does not detect unmethyl-CpG content. Therefore, a BRET assay for the measurement of unmethyl CpG content on genomic DNA was developed using unmethylated CpG-binding protein (CXXC) fused Fluc (CXXC-Fluc) and BOBO-3. The results showed the BRET signal depended on the unmethyl CpG content on genomic DNA. Moreover, the ratio of the BRET signal in the MBD-Fluc-based assay to the total BRET signal in the MBD-Fluc- and CXXC-Fluc-based BRET assays depended on the global DNA methylation level determined by bisulfite method. These results demonstrated that global DNA methylation levels can be quantified by calculating the BRET signal ratio without any calibration curve.

The MBD-Fluc- and CXXC-Fluc-based BRET assays must be performed separately to quantify global DNA methylation level, because the same luciferase fuses to both MBD and CXXC. Therefore, a multicolor BRET assay for the quantification of global DNA methylation level was developed using CXXC-fused Oplophorus luciferase (CXXC-Oluc), MBD-Fluc, BOBO-1 and BOBO-3. The results showed the CXXC-Oluc recognized unmethyl CpG on genomic DNA to excite BOBO-1; whereas, MBD-Fluc recognized methyl CpG on genomic DNA to excite BOBO-3. The emission intensities of BOBO-1 and BOBO-3 were simultaneously detected and depended on the unmethyl and methyl CpG contents on genomic DNA, respectively. There was a significant negative correlation between the emission intensities of BOBO-1 and BOBO-3; therefore, the global DNA methylation level can be quantified with this multicolor BRET assay.

備 考

1. 要旨は300語程度にまとめること。
2. 本様式により、ワープロで作成することを原則とする。
3. 用紙はA4版 上質紙を使用すること。