



Title: Global DNA methylation level sensing using methyl-CpG binding domain-fused luciferase and fluorescent protein (メチル CpG ドメイン融合ルシフェラーゼと蛍光タンパク質を用いたゲノム DNA メチル化レベル検出法)

Authors: Yuto Shoji, Yuno Ikeda, Rie Rin, Koichiro Doi, Masayoshi Tanaka, Wataru Yoshida

(庄司 悠人 (東京工科大 大学院生)、池田 優乃 (東京工科大 大学生)、林 理恵 (東京工科大 大学院生) 土井 晃一郎 (東京工科大 准教授)、田中 祐圭 (東京科学大 准教授)、吉田 亘 (東京工科大 教授))

Journal: Sensors and Actuators B: Chemical 438 (2025) 137797

掲載年月: 2025 年 4 月

研究概要: メチル化 DNA に結合するタンパク質に発光タンパク質と蛍光タンパク質をそれぞれ融合させた 2 種類のタンパク質を用い、がんのバイオマーカーとなるゲノム DNA のメチル化レベルを 3 分以内に迅速測定する方法を開発しました。本手法は検体と試薬を混合するだけで測定可能な簡便な方法であることから、本手法を用いることで在宅でのがん診断が可能になると期待されます。

研究背景: DNA のメチル化とはシトシン (C) とグアニン (G) の連続配列 (CpG) 中のシトシンの 5 位がメチル化される反応であり、遺伝子発現制御に関連しております。ヒトゲノム DNA には約 2940 万か所の CpG 配列が含まれており、正常細胞ではこれらの 60%~80%がメチル化されております。一方、がん細胞ではこのゲノム DNA 全体のメチル化レベルが低下していることから、これはがんのバイオマーカーとして利用できます。これまでに本研究グループでは、メチル CpG に結合するメチル CpG 結合ドメイン (MBD) と発光タンパク質の融合タンパク質を構築し、発光タンパク質と DNA インターカレーター間で生じる生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を用いたゲノム DNA メチル化レベル測定法を開発しております。本手法を用いれば試薬を混合するだけで簡便に測定が可能ですが、DNA インターカレーターをゲノム DNA に結合させるために 30 分の静置が必要でした。そこで、本研究では MBD に発光タンパク質と蛍光タンパク質をそれぞれ融合させた 2 種類のタンパク質を用い、発光タンパク質と蛍光タンパク質間で生じる BRET を用いて、3 分以内に測定する手法を開発することを目的としました (図 1)。

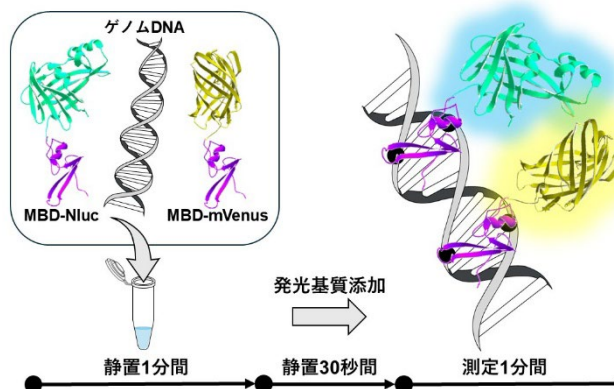


図 1. 本研究で開発したゲノム DNA メチル化レベル迅速測定法
MBD-Nluc と MBD-mVenus をゲノム DNA に混合し、1 分間静置後、発光基質を添加し、Nluc の発光により励起された mVenus の蛍光強度 (BRET シグナル) を測定することで、3 分以内にゲノム DNA メチル化レベルを測定できる。

研究成果: MBD に深海エビ由来発光タンパク質を改良した NanoLuc (Nluc) と、Nluc の発光で励起される蛍光タンパク質 monomeric Venus (mVenus) をそれぞれ融合させた、MBD-Nluc と MBD-mVenus を組換え生産しました。ヒト培養細胞から抽出したゲノム DNA に、この 2 種類の融合タンパク質を混合し、1 分間室温で静置後、Nluc の発光基質を添加し、Nluc の発光により励起される mVenus の蛍光強度 (BRET シグナル) を測定しました。その結果、ゲノム DNA メチル化レベル依存的に BRET シグナルが増加することが示されました。以上の結果より、MBD-Nluc と MBD-mVenus 間で生じる BRET シグナルを測定することで、ゲノム DNA のメチル化レベルを迅速に測定できることが示されました。

社会への影響：本研究により 3 分以内にゲノム DNA のメチル化レベルを測定することが可能となりました。本手法は検体と試薬を混合するだけで測定可能な簡便な方法であることから、本手法を用いることで在宅でのがん診断が可能になると期待されます。

専門用語：

MBD：Methyl-CpG Binding Domain の略で、二本鎖 DNA 中のメチル化された CpG に結合するタンパク質

DNA インターカレーター：DNA に結合して蛍光を発する色素

BRET：Bioluminescence Resonance Energy Transfer の略で、発光タンパク質と蛍光タンパク質が近接することで、発光タンパク質の発光により蛍光タンパク質が励起され蛍光が生じる現象