

東京工科大学 博士学位論文

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

馬場勇次

目次

第 1 章 緒論.....	2
1 節 緒言	2
2 節 ゲノム DNA のメチル化レベルを測定する意義について.....	3
2-1. がん細胞におけるゲノム DNA のメチル化レベルに関する知見.....	3
2-2. メチル化状態に影響を与える分子に関する知見.....	3
2-3. まとめ	4
3 節 ゲノム DNA のメチル化レベル測定法に関する知見.....	5
3-1. Liquid chromatograph–mass spectrometry (LC-MS)を用いる方法.....	5
3-2. 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.....	5
3-3. 抗 5-methylcytosine (5mC)抗体を用いる方法.....	6
3-4. Methyl-CpG-binding domain (MBD)を用いる方法.....	6
3-5. まとめ	8
4 節 MBD 蛋白質に関する知見.....	10
4-1. MBD1 の MBD 蛋白質	10
4-2. MBD1 の MBD の構造	10
5 節 CXXC 蛋白質に関する知見.....	12
5-1. MLL1 の CXXC 蛋白質	12
5-2. MLL1 の CXXC 構造.....	12
6 節 Luciferase 蛋白質に関する知見.....	13
6-1. Firefly luciferase 発光蛋白質	13
6-1. <i>Oplophorus luciferas</i> 発光蛋白質	13
7 節 DNA intercalating dye に関する知見.....	14
8 節 本研究の目的及び意義	15
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.....	19
1 節 緒言	19
2 節 使用した試薬・大腸菌、プレート、実験機器およびオリゴ DNA.....	21
2-1. 試薬・大腸菌	21
2-2. プレート.....	23
2-3. 実験機器.....	23
2-4. オリゴ DNA.....	25
3 節 実験方法	26
3-1. MBD-Fluc 発現ベクターの構築	26
3-2. MBD-Fluc の組換え生産	26
3-3. MBD-Fluc の特性検討.....	28
3-4. MBD-Fluc を用いた BRET assay によるプラスミド DNA のメチル化 CpG 量測定.....	28
3-4-1.メチル化プラスミド DNA の調製.....	28
3-4-2. プラスミド DNA のメチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定	29

3-4-3. プラスミド DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定	29
3-5. MBD-Fluc を用いた BRET assay によるヒトゲノム DNA のメチル化 CpG 量測定	29
3-5-1. 低メチル化ヒトゲノム DNA の調製	29
3-5-2. ヒトゲノム DNA のメチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定	30
3-5-3. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定	30
4 節 実験結果及び考察	31
4-1. MBD-Fluc 発現ベクターの構築	31
4-2. MBD-Fluc の組換え生産	33
4-3. MBD-Fluc の特性検討	35
4-4. MBD-Fluc を用いた BRET assay によるプラスミド DNA のメチル化 CpG 量測定	37
4-4-1. メチル化プラスミド DNA の調製	37
4-4-2. プラスミド DNA のメチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定	38
4-4-3. プラスミド DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定	41
4-5. MBD-Fluc を用いた BRET assay によるヒトゲノム DNA のメチル化 CpG 測定	43
4-5-1. 低メチル化ヒトゲノム DNA の調製	43
4-5-2. ヒトゲノム DNA のメチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定	44
4-5-3. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定	46
5 節 結言	48
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	50
1 節 緒言	50
2 節 使用した試薬、プレート、実験機器およびオリゴ DNA	50
2-1. 試薬・大腸菌	50
2-2. プレート	51
2-3. 実験機器	51
2-4. オリゴ DNA	52
3 節 実験方法	52
3-1. 細胞内で作用する DNA メチル化阻害剤のスクリーニング法の開発	52
3-1-1. 5-Aza-2'-deoxycytidine 処理による低メチル化ヒトゲノム DNA の調製	52
3-1-2. 葉酸欠乏による低メチル化ヒトゲノム DNA の調製	52
3-1-3. MBD-Fluc を用いた BRET assay によるヒトゲノム DNA のメチル化 CpG 量測定	52
4 節 実験結果及び考察	54
4-1. 細胞内で作用する DNA メチル化阻害剤のスクリーニング法の開発	54
4-1-1. MBD-Fluc を用いた BRET assay による 5-Aza-2'-deoxycytidine 処理したゲノム DNA のメチル化状態の測定	54
4-1-2. MBD-Fluc を用いた BRET assay による葉酸欠乏で処理したゲノム DNA のメチル化状態の測定	56
4 節 結言	57
第 4 章 CXXC-Fluc を用いたゲノム DNA の非メチル化 CpG 量測定法の開発	59

1 節 緒言	59
2 節 使用した試薬・大腸菌、プレート、実験機器およびオリゴ DNA.....	59
2-1. 試薬・大腸菌	59
2-2. プレート.....	61
2-3. 実験機器.....	61
2-4. オリゴ DNA.....	63
3 節 実験方法	64
3-1. CXXC-Fluc 発現ベクターの構築.....	64
3-2. CXXC-Fluc の組換え生産.....	64
3-3. CXXC-Fluc の特性検討	66
3-4. CXXC-Fluc を用いた BRET assay によるヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 量測定	66
3-4-1. 低メチル化したヒトゲノム DNA の調製	66
3-4-2. ヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定.....	67
3-4-3. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定.....	67
3-5. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル定量.....	67
4 節 実験結果及び考察	68
4-1.CXXC-Fluc 発現ベクターの構築.....	68
4-2. CXXC-Fluc の組換え生産.....	70
4-3. CXXC-Fluc の特性検討	73
4-4. CXXC-Fluc を用いた BRET assay によるヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 量測定	75
4-4-1. 低メチル化したヒトゲノム DNA の調製	75
4-4-2. ヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定.....	76
4-4-3. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定.....	80
4-5. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル定量.....	82
5 節 結言	86
第 5 章 マルチカラーアッセイを用いたゲノム DNA のメチル化レベル定量法の開発.....	88
1 節 緒言	88
2 節 使用した試薬・大腸菌、プレート、実験機器およびオリゴ DNA.....	88
2-1. 試薬・大腸菌	88
2-2. プレート.....	91
2-3. 実験機器.....	91
2-4. オリゴ DNA.....	92
3 節 実験方法	93
3-1. CXXC-Oluc 発現ベクターの構築.....	93
3-2. CXXC-Oluc の組換え生産.....	93
3-3. CXXC-Oluc の特性検討.....	95
3-4. マルチカラーBRET assay によるヒトゲノム DNA のメチル化レベル定量.....	95
3-4-1. 低メチル化したヒトゲノム DNA の調製	95

3-4-2. ヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定.....	96
3-4-3. BOBO-1 と BOBO-3 の濃度検討.....	96
3-4-4. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定.....	96
3-4-5. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル定量.....	96
4 節 実験結果及び考察.....	98
4-1. CXXC-Oluc 発現ベクターの構築.....	98
4-2. CXXC-Oluc の組換え生産.....	100
4-3. CXXC-Oluc の特性検討.....	102
4-4. マルチカラーBRET assay によるヒトゲノム DNA のメチル化レベル定量.....	105
4-4-1. 低メチル化したヒトゲノム DNA の調製.....	105
4-4-2. ヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定.....	106
4-4-3. BOBO-1 と BOBO-3 の濃度検討.....	110
4-4-4. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定.....	112
4-4-5. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル定量.....	117
5 節 結言.....	127
第 6 章 考察.....	129
1 節 CpG サイトに対する MBD と CXXC の認識機構.....	129
2 節 本 BRET assay における融合蛋白質の発光強度.....	131
3 節 本 BRET assay の精度および疾患診断への展望.....	132
第 7 章 結論.....	135
引用文献および論文目録.....	139
謝辞.....	149

第 1 章 緒論

第1章 緒論

1節 緒言

DNAメチル化とは、ゲノムDNAにおいてシトシン・グアニン塩基(CpG)配列中のシトシンの5位がメチル化される反応であり、プロモーター配列中に含まれる CpG がメチル化されるとその遺伝子の発現が抑制される^[1,2,3]。ヒトでは DNA methyltransferase (Dnmt)として、Dnmt1, Dnmt3a および Dnmt3b が同定されている(Fig. 1-1)^[4, 5, 6]。正常な細胞では正常なメチル化パターンが形成されているため、その細胞に必要な遺伝子が発現し、不要な遺伝子はその発現が抑制される。がん細胞ではがん関連遺伝子の DNAメチル化状態が異常になっており、がん関連遺伝子の発現状態も異常になっている^[7, 8, 9]。つまり、DNAメチル化は近傍の遺伝子発現に重要な役割を果たしている。ヒトゲノムDNAの約45%はトランスポゾン由来の長鎖や短鎖の散在反復配列(long interspersed nucleotide factor-1 : LINE1 などの反復配列)で構成されており、トランスポゾン活性を抑制するために、正常細胞では高度にメチル化されている。また、ヒトゲノムDNA内に存在する CpG サイトの約95%以上はトランスポゾン内に存在している(Fig. 1-2)^[10, 11, 12]。そのため、ゲノムDNA全体のメチル化レベルはLINE1などの反復配列のメチル化レベルに相関することが知られている。このLINE1などのメチル化レベルはがん細胞で低下しているため、ゲノム全体のメチル化レベルはがんのバイオマーカーとして期待されている^[13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20]。

そこで本章においては、がん細胞のゲノムDNAのメチル化レベルに関する知見についてまとめる。また、メチル化状態に影響を与える分子に関する知見をまとめ、ゲノムDNAのメチル化レベルを測定する意義について明らかにする。また、ゲノムDNAのメチル化レベルを測定する方法に関する知見をまとめ、本研究の意義を明らかにする。

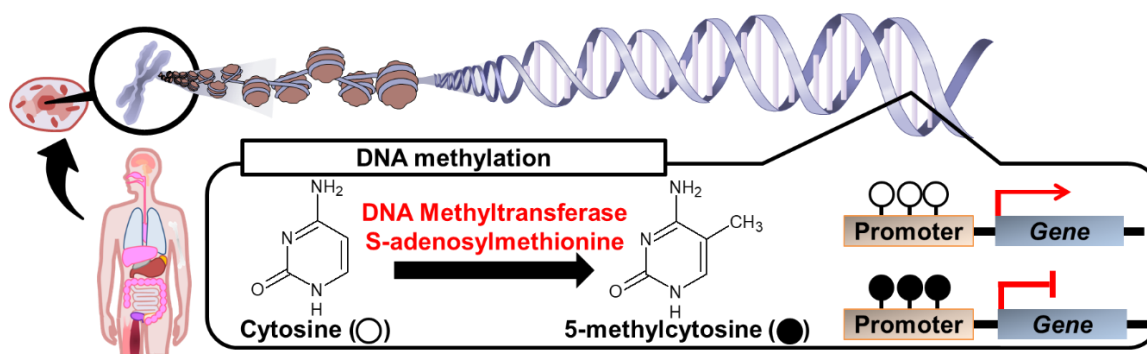


Figure 1-1 DNAメチル化

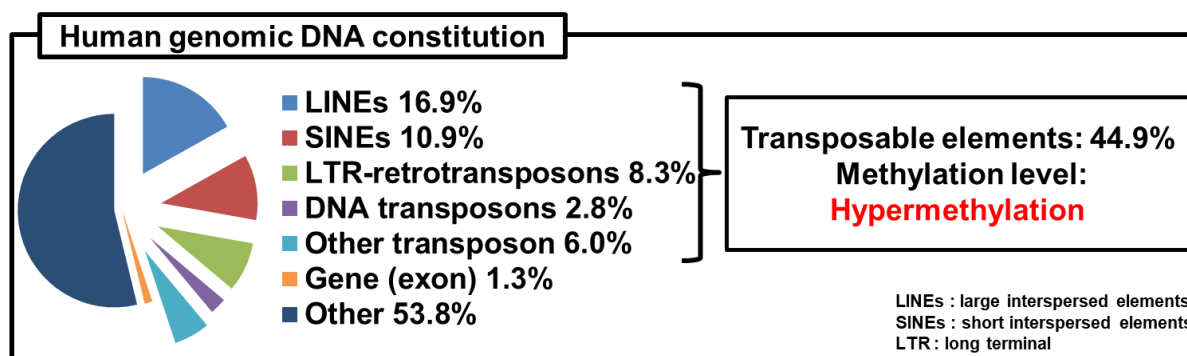


Figure 1-2 ヒトゲノムDNAの構成

2 節 ゲノム DNA のメチル化レベルを測定する意義について

ゲノム DNA の異常なメチル化ががんと関連することが報告されており、ゲノム DNA のメチル化レベルを測定する様々な方法が開発されている。そこで、本項においては、がん細胞におけるゲノム DNA のメチル化レベルに関する報告と、ゲノム DNA のメチル化レベルに影響を与える分子に関する知見をまとめ、ゲノム DNA のメチル化レベルを測定する意義について明らかにする。

2-1. がん細胞におけるゲノム DNA のメチル化レベルに関する知見

ゲノム DNA のメチル化異常はがんの種類によって異なる(Table 1-1)。健常者の肺細胞から採取したゲノム DNA のメチル化レベルは 70%であるのに対して、肺がん患者は 54%に低下していることが報告されている。また、結腸がん、食道がん、胃がん患者の細胞から採取したゲノム DNA のメチル化レベルも低下していることが報告されている^[21, 22, 23, 24]。さらに、がん患者の血液中にはアポトーシスやネクロトーシスによって死滅したがん細胞由来のゲノム DNA が遊離している^[25]。つまり、がん患者の血中遊離 DNA のメチル化レベルは、がんのバイオマーカーとして利用できる。実際に、健常者の血中遊離 DNA のメチル化レベルは 68%であるのに対し、神経膠腫患者の遊離 DNA のメチル化レベルは 56%に低下していることが報告されている^[26, 27]。

Table 1-1 種々のがん細胞のゲノム DNA のメチル化レベル

Cancer type	Sample type	Controls	Cases
Lung	Tissue	70 ± 1.1%	54 ± 11%
Colorectal	Tissue	76 ± 3.1%	66 ± 5.3%
Esophageal	Tissue	79 ± 6.2%	63 ± 13%
Gastric	Tissue	79 ± 5.6%	72 ± 10%
Hepatocellular carcinoma	Blood	54 ± 7.8%	42 ± 10%
Glioma	Blood	68 ± 3.1%	56 ± 6.6%

2-2. メチル化状態に影響を与える分子に関する知見

DNA メチル化とは S-アデノシルメチオニン(SAM)がメチル基のドナーとなり、CpG 配列のシトシン塩基 5 位にメチル基が付加される反応である^[28, 29]。生体内では、食事から摂取する葉酸から SAM が合成される(Fig. 1-3)^[30]。そのため、葉酸欠乏食を与えられたラット^[31]または葉酸拮抗薬である葉酸類似体メトトレキサートで処理されたラットの脳^[32]では、ゲノム DNA が低メチル化状態になることが報告されている。葉酸摂取量の減少とそれに続くゲノム DNA の低メチル化は、ヒトの胃の発がんに関与している可能性があることも報告されている^[33]また中等度の葉酸欠乏症の閉経後の女性は、リンパ球 DNA の低メチル化が観察された^[34]。健康なヒトの女性では、子宮頸部組織と血清中の葉酸濃度が子宮頸部組織のゲノム DNA のメチル化レベルと相関している^[35]。

Joong Won Lee らは、環境たばこ煙(ETS)による出生前の母親への曝露が子の DNA メチル化状態に影響を与えることを示した^[36]。妊娠している C57BL/6 マウスに、1.0 mg/m³ TES を毎日曝露した。その結果、ETS に曝露されたマウスから産まれた子(生後 6 週間)は、対照(ろ過された空気に曝露されたマウスから産まれた子)よりも肺のゲノム DNA のメチル化レベルが約 4%減少したこと、*IL-13* のメチル化レ

レベルが 1.95%減少したことを示した。この DNA メチル化状態の変化は、2 型サイトカインの発現に関連し、それによって気道過敏性の発症と肺の炎症を促進する可能性があることを示唆している。また、環境汚染物質としてベンゼン^[37]、残留性有機汚染物質^[38]、大気汚染(black carbon, PM2.5, SO₂)^[39]、鉛曝露^[40]およびヒ素^[17]にさらされた健康な個人のコホート研究でゲノム DNA のメチル化レベルの減少が確認されている

がん以外でも、統合失調症や双極性障害といった精神疾患等においてゲノム DNA のメチル化レベルの減少がみられることが報告されている^[42]。この研究では、統合失調症や双極性障害患者の末梢血のゲノム DNA のメチル化レベルの減少を明らかにした。また、統合失調症の診断基準を満たさない精神疾患患者が統合失調症になる際、血球中のベタインレベルが有意に減少したことが報告されている^[43]。さらに、血球中のベタインレベルと末梢血中のゲノム DNA のメチル化レベルが正の相関を示した。ベタインは葉酸と同様にメチル基供与体である(Fig. 1-3)。そのため、血球中のベタインレベルの減少に関連するゲノム DNA の低メチル化は統合失調症や双極性障害に共通であり、精神疾患に反映している可能性があることを示唆している。

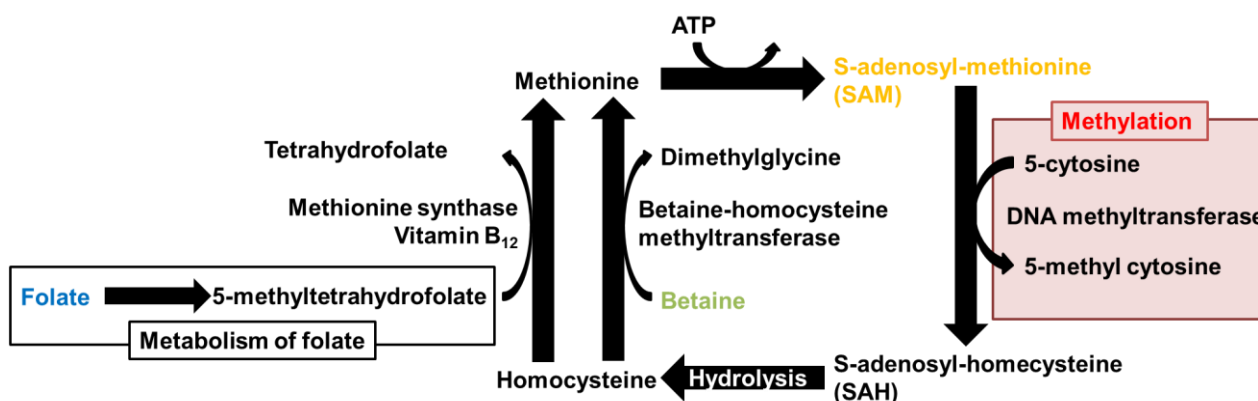


Figure 1-3 葉酸およびベタインのメチル化供与体における SAM 合成経路

2-3. まとめ

ゲノム DNA のメチル化レベルは、食事、喫煙および環境汚染物質等の環境要因の刺激により低下し、がんや精神疾患を引き起こす。がんや精神疾患のマーカーとして蛋白質が利用されているが、マーカー蛋白質は構造の安定性が低いため、その検出結果の再現性が低いことが問題点として挙げられる^[44]。一方、メチル化 DNA は化学的に安定であり、蛋白質マーカーより再現性よく検出することが可能である。したがって、メチル化 DNA はがんや精神疾患のマーカーとして優れていると考えられる。以上のことから、がんや精神疾患の診断においてゲノム DNA のメチル化レベルを測定することは重要であると考えられる。

3 節 ゲノム DNA のメチル化レベル測定法に関する知見

ゲノム DNA のメチル化レベルを測定する方法は、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。本節では各測定法に関して、操作の複雑性(ステップ数と測定時間)と定量性および検出限界についてまとめる。

3-1. Liquid chromatograph–mass spectrometry (LC-MS)を用いる方法

LC-MS を用いる方法は、ゲノム DNA を deoxyribonuclease (DNase)などで分解し、各塩基量を LC-MS により定量する方法である(Fig. 1-4)。本手法の基本的な操作は、①DNase によるゲノム DNA の加水分解、②LC-MS による塩基の定量の 2 つのステップで構成されている。シトシンと 5-メチルシトシン(5-methylcytosine: 5mC)は、逆相カラムを使用して LC 内で分離できる。LC-MS を用いる方法のシトシンと 5mC の検出限界は 2 pg と報告されている^[45]。また、生体内において 5mC は ten-eleven translocation により酸化され脱メチル化される。その過程で、5mC から 5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)、5-ホルミルシトシン(5foC)および 5-カルボキシルシトシン(5caC)が生成される。その後、5foC と 5caC はチミン DNA グリコシラーゼによって切断され、塩基除去修復経路を介してシトシンになる^[46,47,48]。5hmC のレベルはヒトの乳がん、肝臓がん、肺がん、膵臓がん、前立腺がんおよび扁平上皮細胞肺がん減少していることが報告されている^[49,50]。そのため、5hmC はがん診断の新たなバイオマーカーとして有用であると考えられている。これら 5hmC, 5foC および 5caC を LC-MS を用いて同時に解析するために、シトシンを修飾する 2-bromo-1-(4-dimethylamino-phenyl)-ethanone (BDAPE)を用いる方法が開発された。BDAPE はブromoアセトニル基、疎水性フェニル基および正電荷を持つ第三級アミン基を含む化合物である。BDAPE は 5mC, 5hmC, 5foC および 5caC の 3 位と 4 位の N と反応して、安定したペント環状構造を形成する。これら塩基は BDAPE で修飾されると逆相カラムにより容易に分離できるため、MS で検出できる。本手法の 5mC, 5hmC, 5foC および 5caC の検出限界は、それぞれ 2, 1, 2 および 4 ng である^[51]。LC-MS を用いる方法は、正確にゲノム DNA のメチル化レベルを定量できるという利点を持つため、ゲノム DNA のメチル化レベルを測定するためのゴールドスタンダード法として使用されている。しかし、解析に 1 時間以上必要であるという問題点が挙げられる。

3-2. 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

ゲノム DNA を重亜硫酸ナトリウム(バイサルファイト)処理するとシトシンはウラシルに変換されるが、5mC は変換されない^[52]。そのためバイサルファイト処理した HeLa ゲノム DNA を鋳型に PCR 増幅すると、ウラシルはチミンに 5mC はシトシンに置換される(Fig. 1-4)。このバイサルファイト変換法と次世代シーケンサーを組み合わせたメチル化レベル定量法として、whole genome bisulfite sequencing (WGBS)が開発されている。本手法は、①ゲノム DNA の断片化(ソニケーション処理)、②アダプターのライゲーシオン、③バイサルファイトシーケンスの 3 つのステップで構成されている^[53]。WGBS を用いれば一塩基レベルの解像度で 5mC を解析できる。しかし、WGBS のライブラリーを調製するためには、200~500 ng のゲノム DNA が必要であり、高価な次世代シーケンサーが必要になる。

次世代シーケンサーを必要としない方法としては、combined bisulfite restriction analysis (COBRA)法

が開発されている^[54]。本手法は、①バイサルファイト PCR、②制限酵素処理、③電気泳動解析の3つのステップで構成されている。COBRA でゲノム DNA のメチル化レベルに相関のある LINE1 のメチル化レベルを解析することで、ゲノム DNA のメチル化レベルを解析することが可能である。解析できる領域が制限酵素の認識配列が存在するカ所に限定されるが、バイサルファイト処理と制限酵素サイトの認識によってメチル化状態を2重に確認する原理上、定量性は高い。一方で、バイサルファイト処理を用いた WGBS や COBRA はバイサルファイト変換に5-6時間の処理が必要である。

3-3. 抗 5-methylcytosine (5mC)抗体を用いる方法

抗 5mC 抗体は、一本鎖 DNA 中の 5mC を特異的に認識する抗体である。抗体 5mC 抗体を用いてゲノム DNA 中からメチル化されている領域のみ回収し、それを次世代シーケンサーで解析する方法 (methylated DNA immunoprecipitation-seq : MeDIP-seq)^[55]が開発されている(Fig. 1-4)^[55]。本手法は、①ゲノム断片化(ソニケーション処理)、②5mC に対する特異的抗体を用いたメチル化 DNA 断片の回収、③アダプターのライゲーション、④次世代シーケンス解析の4つのステップで構成されている。作製したライブラリーの末端より数十塩基のシーケンスを行い、5mC を含んだゲノム断片の配列を決定し、メチル化されているゲノム DNA 領域を同定する。メチル化されているゲノム DNA 領域のみシーケンス解析するため、WGBS よりも解析に必要なシーケンスリード数は少ない。解析に必要な DNA 量は 160-300 ng ではあるが、すべての CpG サイトのメチル化レベルを解析することはできないという欠点^[55]が挙げられる。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)によりゲノム DNA のメチル化レベルを測定する方法が開発されている(Fig. 1-4)。本手法は、①プレートへのゲノム DNA の固定化、②5mC に対する一次抗体の添加、③標識された二次抗体の添加、④酵素活性の測定、の4つのステップで構成されている。検出限界が 10 ng のゲノム DNA である高感度な方法も開発されている^[56]。本手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という問題点が挙げられる。また、ゲノム DNA のメチル化レベルを定量するためにはスタンダードサンプルを用いて検量線を作製する必要がある。

3-4. Methyl-CpG-binding domain (MBD)を用いる方法

MBD は、二本鎖 DNA のメチル化 CpG を特異的に認識するドメインである^[57]。ELISA より簡便なゲノム DNA のメチル化レベル測定法として、分割した luciferase (split luc)をそれぞれ MBD に融合させた蛋白質(MBD-split luc)を利用した方法が開発されている(Fig. 1-4)^[58]。本手法は、2種類の MBD-split luc と発光基質をゲノム DNA に混合するだけで、ゲノム DNA のメチル化レベルを測定できる方法である。2種類の MBD-split luc が近接するメチル化 CpG 部位に結合すると、分割した luciferase が再構築されるため、発光が観察される。この発光強度はゲノム DNA のメチル化レベルに依存するため、試薬を混合し、luciferase の発光強度を測定するだけでゲノム DNA のメチル化レベルを測定することができ、検出限界は 2.6 ng と優れている。一方で、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考えられる。また、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。

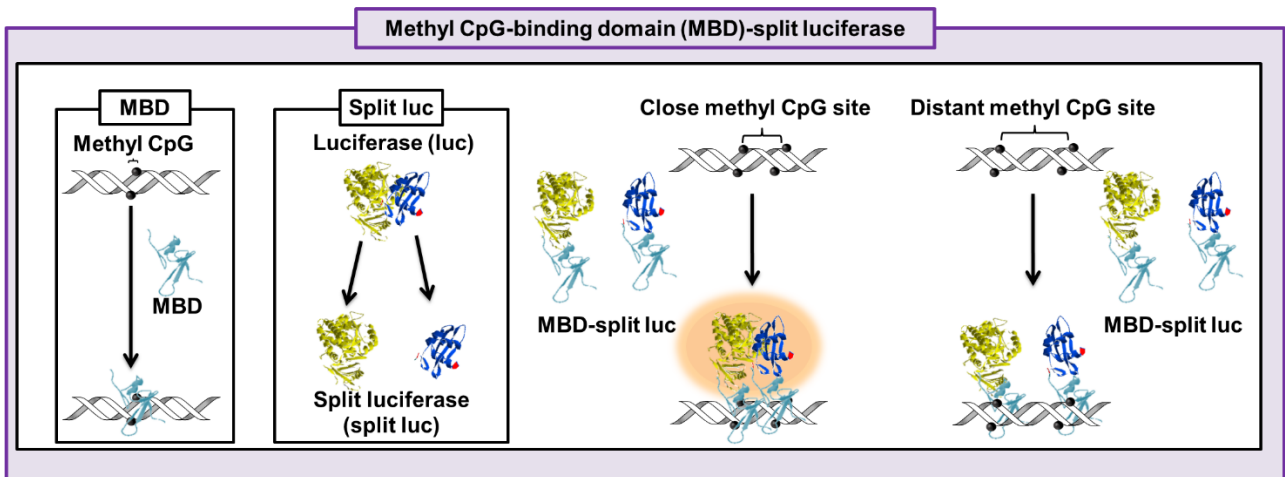
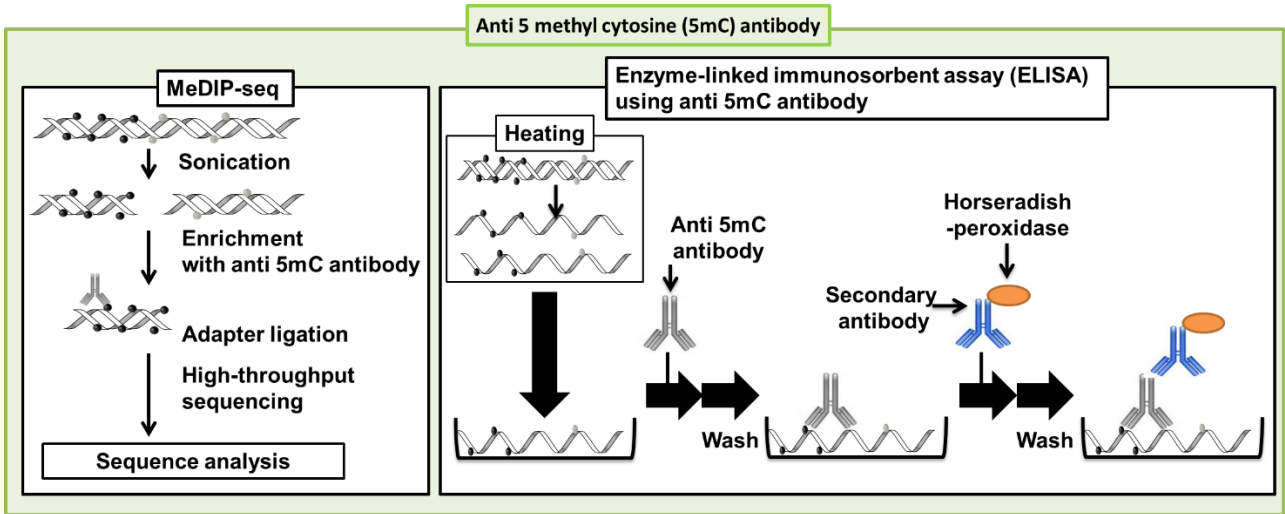
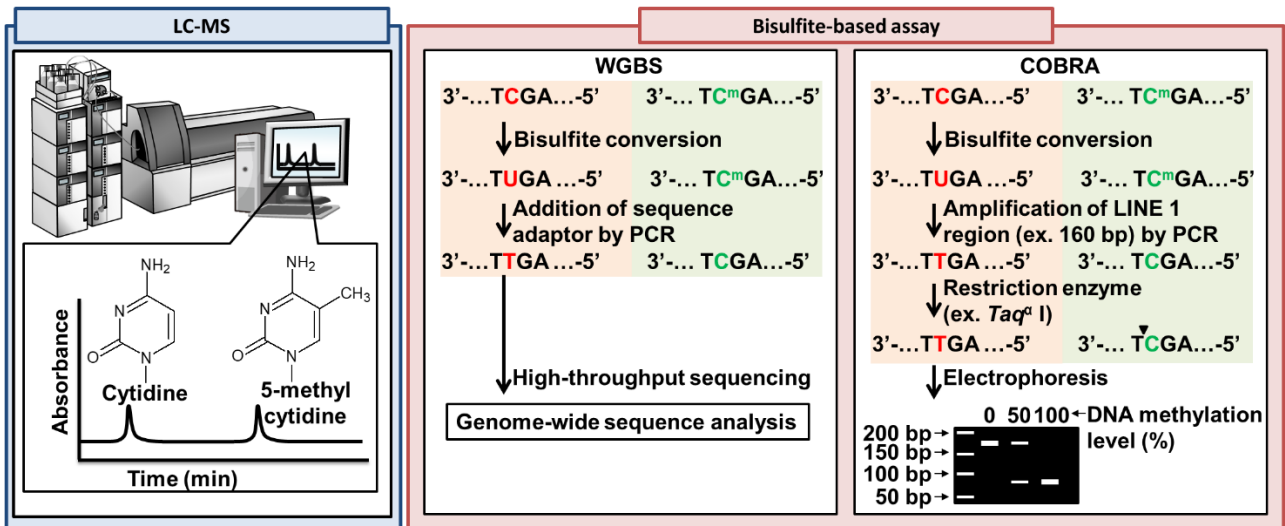


Figure 1-4 各種ゲノム DNA メチル化測定法

3-5. まとめ

各方法の特徴を Table 1-2 にまとめ、ゲノム DNA のメチル化レベル測定法に関する本研究の開発領域を示す。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(MeDIP 法、ELISA 法、MBD-split luc を利用した方法)が挙げられる。MeDIP 法は、メチル化されているゲノム DNA 領域のみシーケンス解析するため、WGBS よりも解析に必要なシーケンスリード数は少ない。そのため、WGBS よりも低コストで解析できるが、すべての CpG サイトのメチル化レベルを解析することはできないという欠点が挙げられる。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。そこで、本研究は、検量線を必要としなく、検体に試薬を混合するだけでゲノム DNA のメチル化レベルを測定できる方法を開発領域する(Fig. 1-5)。

Table 1-2 各ゲノム DNA のメチル化レベル測定法の特徴

Method	Time	Standard curve	Amount of genomic DNA	R. S. D.
LC-MS	1.0 h	Not required	3.0 µg	< 2.0%
WGBS	10 h	Not required	1.0 µg	< 2.0%
COBRA	10 h	Not required	1.0µg	< 2.0%
MeDIP-seq	3.0 h	Required	1.0µg	< 2.6%
ELISA	1.5 h	Required	0.010µg	< 1.5%
MBD-split luc	30 min	Required	0.50 µg	< 10%

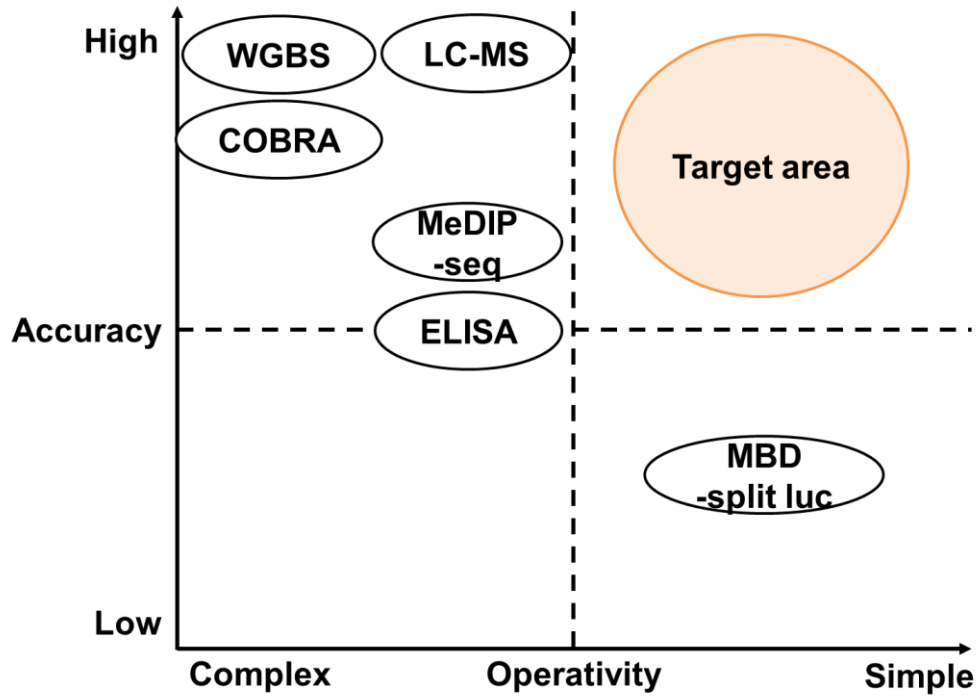


Figure 1-5 ゲノム DNA のメチル化レベル測定法に関する本研究の開発領域

4 節 MBD 蛋白質に関する知見

4-1. MBD1 の MBD 蛋白質

ヒト由来のメチル化 CpG 結合ドメイン(methyl-CpG-binding domain : MBD)蛋白質ファミリーとして、MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MeCP2 蛋白質が同定される^[59, 60, 61]。これらは共通して N 末端側に配列相同性の高いメチル化 CpG 結合ドメイン(MBD)と C 末端側に蛋白質によって異なる機能を担うドメインを保存している^[62]。なお、本研究で用いた MBD はヒト由来 MBD1 蛋白質中の MBD である。

この MBD ファミリー蛋白質の内、MBD1 の MBD はメチル化 CpG に対して、特異的に結合する。その解離定数は、メチル化 CpG に対して 10-70 nM、非メチル化 CpG に対して 5 μ M である^[63]。そのため、本研究はメチル化 CpG に特異的に結合する MBD1 の MBD を用いた。

4-2. MBD1 の MBD の構造

MBD1 蛋白質は 605 アミノ酸残基からなりそれぞれの領域は MBD (1-69 残基), CXXC 型のジンクフィンガーモチーフ (169-216 と 330-378 残基)、転写抑制ドメイン(529-592 残基)をコードしている。

MBD1 の MBD とメチル化 DNA の複合体の立体構造を Fig. 1-6 に示す。MBD1 の MBD は 4 本の β シートの層と、 α ヘリックスとループからなる層の α/β サンドイッチ構造をとる。 β シート部分を DNA の主溝に斜めに挿入し、4 本鎖の内側の 2 本の β ストランドは DNA 塩基との接触する部分であり、メチル化 CpG 部位の認識に重要な役割を担う。この β シートは、DNA 糖-リン酸骨格に塩基配列非特異的な相互作用によって支えられている。DNA 骨格への結合の 1 つは Loop L1 によって行われている。このループは塩基接触を行っている 2 つのストランド $\beta 2$ と $\beta 3$ の間に存在し、DNA の片一方の鎖のリン酸骨格とのみ広範囲な接触を行う。もう一方の DNA 鎖へは $\alpha 1$ ヘリックス中の幾つかの残基が結合している。DNA のリン酸骨格と接触している Loop L1 は、DNA の結合に伴い、構造を変化させる。NMR 解析により、Loop L1 を形成する残基は DNA 非結合状態では不安定であるが、メチル化 DNA と複合体を形成すると比較的安定な Loop L1 構造を形成する。

MBD の 5 つの残基のみが DNA 内の塩基と相互作用している。Val20, Arg22, Tyr34, Arg44, Ser45 である。Val20 を除きすべての残基が他の MBD 間で保存されている。MBD が認識する塩基はメチル化 CpG 部位の 2 塩基対に限られている。これら 5 つの残基は蛋白質表面に連続した疎水性表面を形成している。それがメチル化 CpG の 2 つの塩基対と疎水性相互作用している(Fig. 1-6)^[57]。2 つのメチル基の認識は非対称性である Val20, Arg22, Tyr34, で形成される疎水性のポケットにメチル基が広範囲に相互作用する場合に対して、Arg44 と Ser45 の側鎖のアルキル鎖領域にメチル基が狭い範囲で疎水性相互作用する。

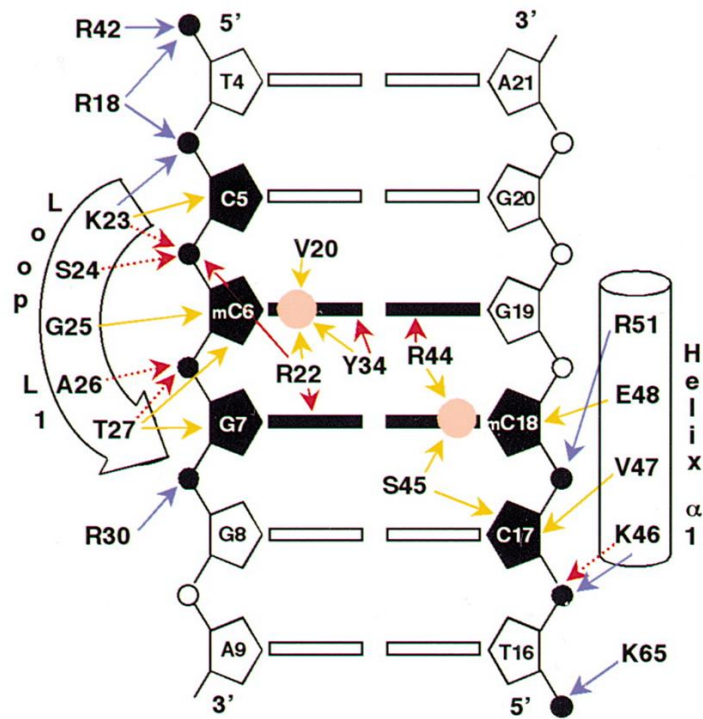
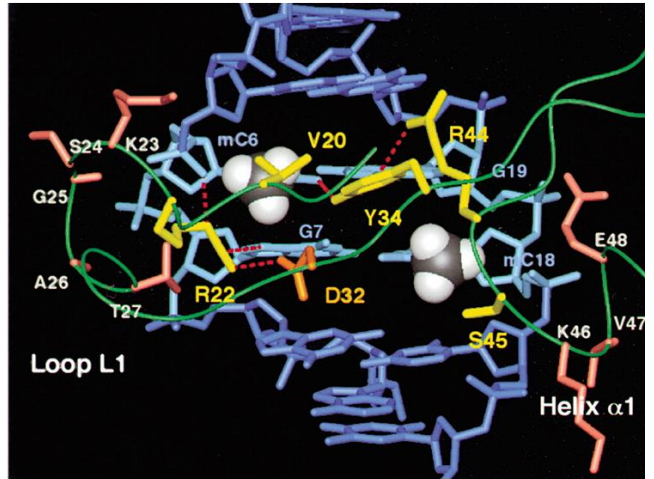
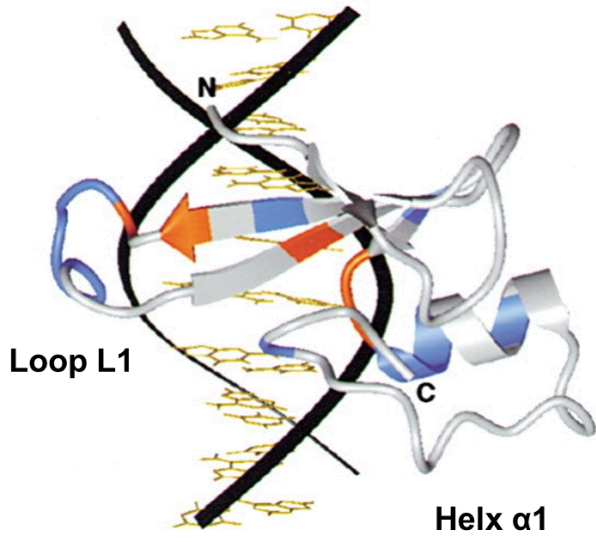


Figure 1-6 MBD1 の MBD 構造^[57]

5 節 CXXC 蛋白質に関する知見

5-1. MLL1 の CXXC 蛋白質

触媒活性部位 suppressor of variegation, Enhancer of zeste, Trithorax (SET)ドメインを持つ The mixed lineage leukemia (MLL) family は、ヒストン H3 蛋白質の N 末端から 4 番目のリジン残基(H3K4)をメチル化し、転写調節に重要な役割を担っている^[64]。ヒト由来の MLL family には、MLL1, MLL2, MLL3, MLL4, SetD1A, SetD1B の 6 種類あり、それぞれメチル化された H3K4、アセチル化されたリジン、RNA 認識モチーフドメインターゲットドメインの違いによって区別されている^[65]。この MLL1 の cys-X-X-cys motif domain (CXXC)は、特異的に非メチル化 CpG と結合する。その解離定数は非メチル化 CpG に対して約 33 nM であるが、メチル化 CpG に対しては 1 mM 以上である^[66]。そのため、本研究では非メチル化 CpG に特異的に結合する MLL の CXXC を用いた。

5-2. MLL1 の CXXC 構造

MLL の CXXC と非メチル化 DNA の複合体の立体構造を Fig.1-7 に示す。CXXC は DNA の主溝に結合する。CXXC が CpG を認識するためには 1182-1188 ループが重要である。Lys1185 と Lys1186 のカルボニル基はシトシン 106 とシトシン 118 の N4-アミン基とそれぞれ水素結合する。また、Gln1187 と Lys1186 がグアニン 107、グアニン 119 と水素結合する。シトシン 106 とシトシン 118 の 5 位の H は、それぞれ Gln1187 と Ile1184 に物理的に近接している。そのため、シトシン 106 とシトシン 118 の 5 位がメチル化されると、Gln 1187 と Ile1184 と立体的に衝突するため、CXXC はメチル化 DNA に結合しにくくなる^[64]。

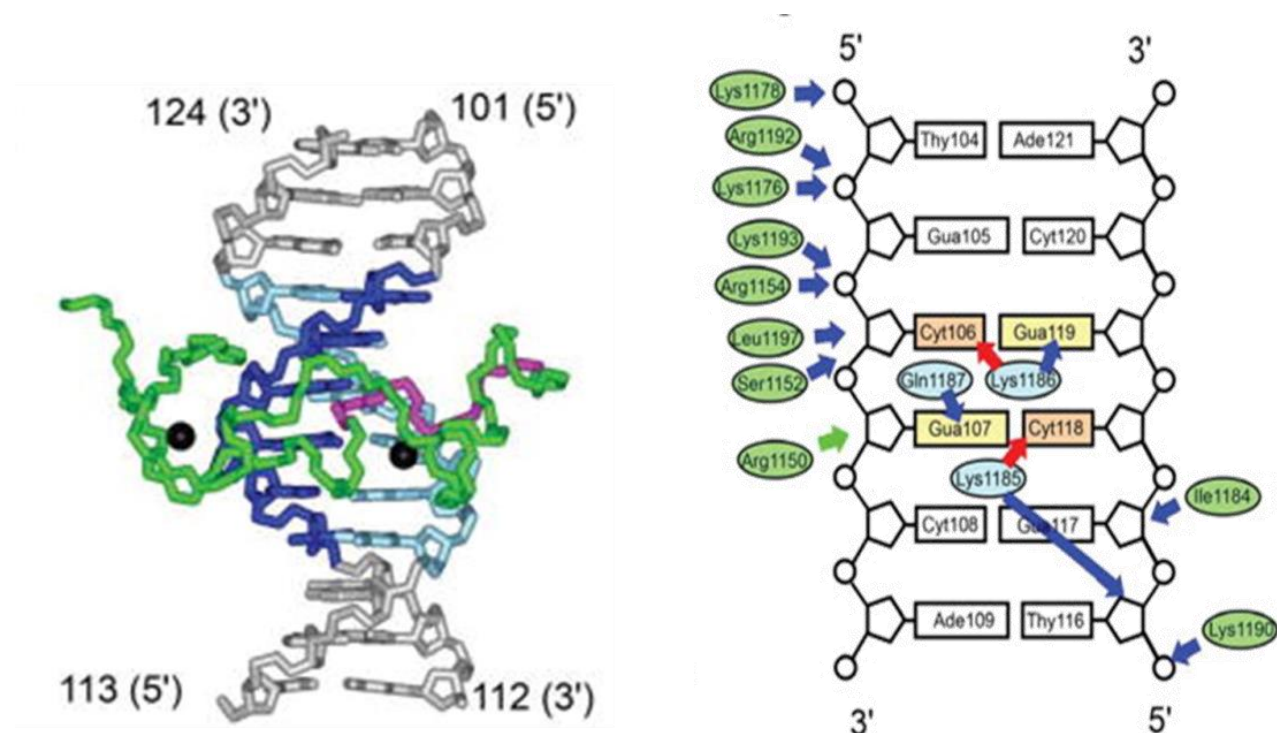


Figure 1-7 MLL の CXXC 構造^[64]

6 節 Luciferase 蛋白質に関する知見

6-1. Firefly luciferase 発光蛋白質

Luciferase は発光基質である luciferin と ATP 存在下で発光反応を触媒する酵素である。反応機構は2段階で進行する。まず luciferin のカルボキシル基が ATP の α 位のリン酸部位を攻撃することで、luciferin AMP 中間体が酵素中で形成される。その後、酸素が中間体と反応した後、励起状態の oxyluciferin が生成し、これが基底状態の oxyluciferin に変わる際、エネルギーを光として放出する(Fig. 1-8) [67]。本研究では、550~580 nm で最大発光波長を示すゲンジボタルの一種である firefly luciferase (Fluc)を用いた。

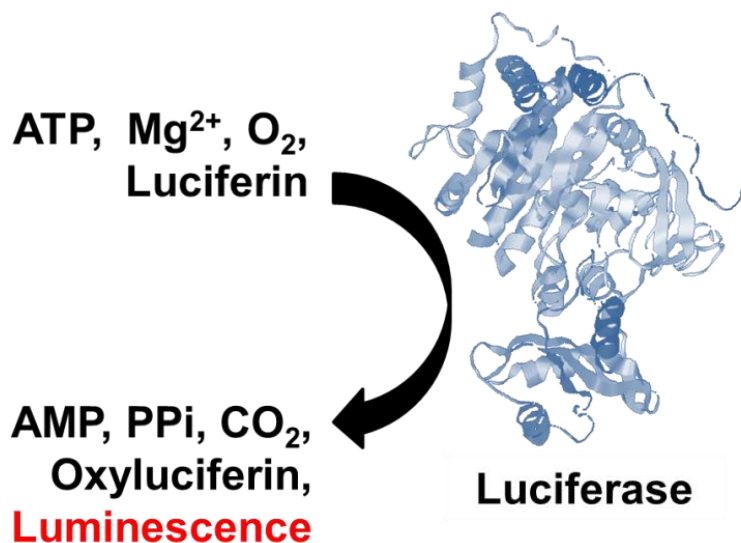


Figure 1-8 Luciferase の発光反応

6-1. Oplophorus luciferas 発光蛋白質

深海エビの一種である *Oplophorus gracilirostris* 由来の発光蛋白質は分子量 3.5×10^4 と 1.9×10^4 のサブユニットからなり、分子量 1.9×10^4 のサブユニットが触媒活性を保持している。分子量 1.9×10^4 のサブユニットは coelenterazine と反応して、最大発光波長 460 nm の発光を発する [68, 69]。本研究では、分子量 1.9×10^4 のサブユニットを oplophorus luciferase (Oluc)として用いた。

7 節 DNA intercalating dye に関する知見

DNA intercalating dye は、二本鎖 DNA に結合する蛍光分子であり、DNA を検出するために用いられる。本研究では、luciferase と DNA intercalating dye 間で起こる bioluminescence resonance energy transfer (BRET) 反応を利用する。そのため、DNA intercalating dye は Oluc の最大発光波長(460 nm)で励起される BOBO-1, Fluc の最大発光波長(550~580 nm)で励起される BOBO-3 を使用した。BOBO-1 と BOBO-3 とは、二量体のシアニン核酸色素である(Fig. 1-9)。核酸に対する親和性が高いことに加えて、シアニン化二量体は、核酸が非存在下では蛍光特性を示さないが、DNA に結合すると、100-1000 倍蛍光強度が増す。BOBO-1 の最大励起波長は 462 nm、最大蛍光波長 481 nm であり、BOBO-3 の最大励起波長が 570 nm であり、最大蛍光波長は 602 nm である^[70, 71]。

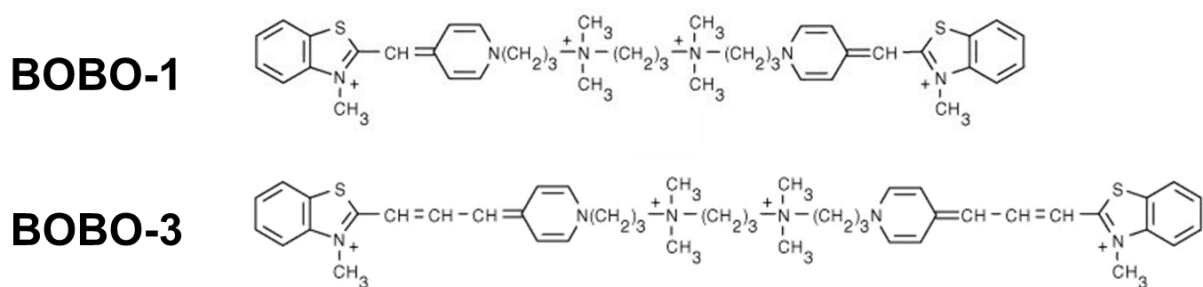


Figure 1-9 BOBO-1 (上)と BOBO-3 (下)の構造

8 節 本研究の目的及び意義

本研究はがんのバイオマーカーであるヒトゲノム DNA のメチル化レベルを迅速・簡便・正確に定量する方法を開発することを目的とした。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^[7]。そこで、MBD (ヒト由来の MBD1 蛋白質の 2-82 番目のアミノ酸に対するメチル化 CpG 結合ドメインを MBD と記す)を Fluc に融合した蛋白質 MBD-Fluc と DNA intercalating dye BOBO-3 を用いれば、BRET assay を基にしたゲノム DNA のメチル化 CpG 量を測定する方法が開発できると考えた。その原理を Fig. 1-10 に示す。①細胞から抽出したゲノム DNA に DNA intercalating dye を加えると、DNA intercalating dye はメチル化の有無にかかわらずゲノム DNA に結合する。そこに、②MBD-Fluc を混合すると、MBD-Fluc の MBD はゲノム DNA 中のメチル化 CpG を認識する。最後に、③Firefly luciferase の発光基質を加えると、luciferase の発光により DNA intercalating dye が励起され蛍光を発する。この発せられた蛍光を BRET シグナルとする。この BRET シグナルは、ゲノム DNA のメチル化レベル依存的に得られると考えられる。

本手法は検体に試薬を混ぜるだけで測定可能な方法であるため、迅速・簡便にメチル化 CpG 量を測定できると考えられる。MBD-Fluc と BOBO-3 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、検量線を必要としないでゲノム DNA のメチル化レベルを定量できると考えられる(Fig. 1-11)。

さらに、本手法は光学的に測定するため、ゲノム DNA のメチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量を異なる蛍光波長領域で同時に測定できる。そこで、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 と DNA intercalating dye BOBO-1 を用いた BRET assay によるゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を測定できる方法(Fig. 1-12)が開発できれば、CXXC-Oluc, MBD-Fluc, BOBO-1 および BOBO-3 を用いたマルチカラー-BRET assay によりゲノム DNA のメチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量を異なる蛍光波長領域で同時に測定できると考えられる(Fig. 1-13)。そのため、本マルチカラー-BRET assay は、検量線を必要とせず、検体に試薬を混ぜるだけでゲノム DNA のメチル化レベルを定量できる迅速・簡便な測定法である。

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、MBD-Fluc を発現させるベクターの構築、大腸菌から MBD-Fluc の組換え生産および MBD-Fluc を用いた BRET assay によるゲノム DNA のメチル化 CpG 量の測定を試みた。

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を検討した。

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、CXXC-Fluc を発現させるベクターの構築、大腸菌から CXXC-Fluc の組換え生産および CXXC-Fluc を用いた BRET assay によるゲノム DNA の非メチル化 CpG 量の測定を試み、さらに CXXC-Fluc および MBD-Fluc を用いた各 BRET assay で得られた蛍光強度の比率からゲノム DNA のメチル化レベルが定量できるのか

を検討した。

第5章「マルチカラーアッセイを用いたゲノム DNA のメチル化レベル定量法の開発」では、CXXC-Oluc を発現させるベクターの構築、大腸菌から CXXC-Oluc の組換え生産および CXXC-Oluc を用いた BRET assay によるゲノム DNA の非メチル化 CpG 量の測定を試み、さらに CXXC-Oluc と MBD-Fluc を用いたマルチカラー-BRET assay によるゲノム DNA のメチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量の同時測定を試み、異なる蛍光波長領域で得られた蛍光強度の比率からゲノム DNA のメチル化レベルが定量できるのかを検討した。

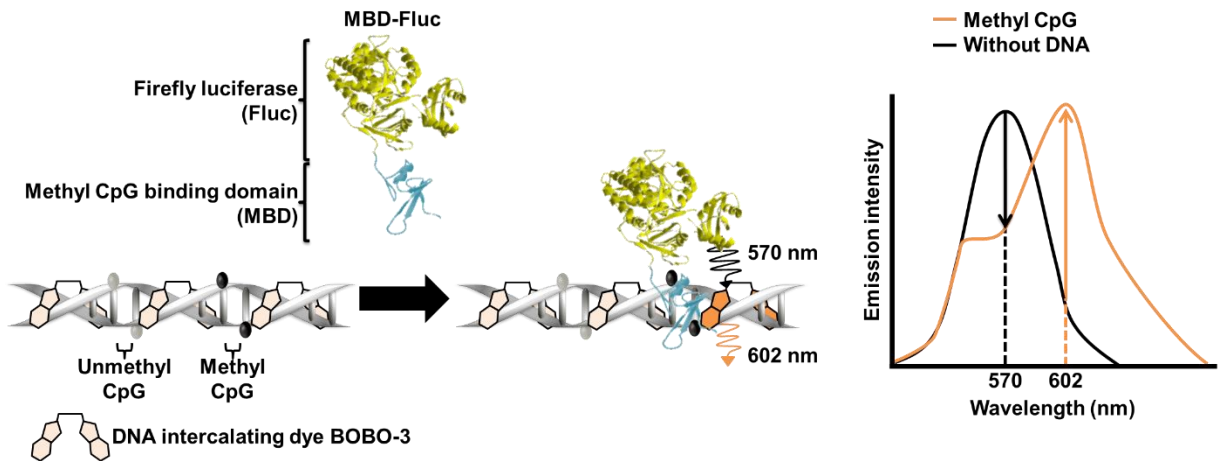


Figure 1-10 MBD-Fluc を用いた BRET assay によるゲノム DNA のメチル化 CpG 量測定法の原理

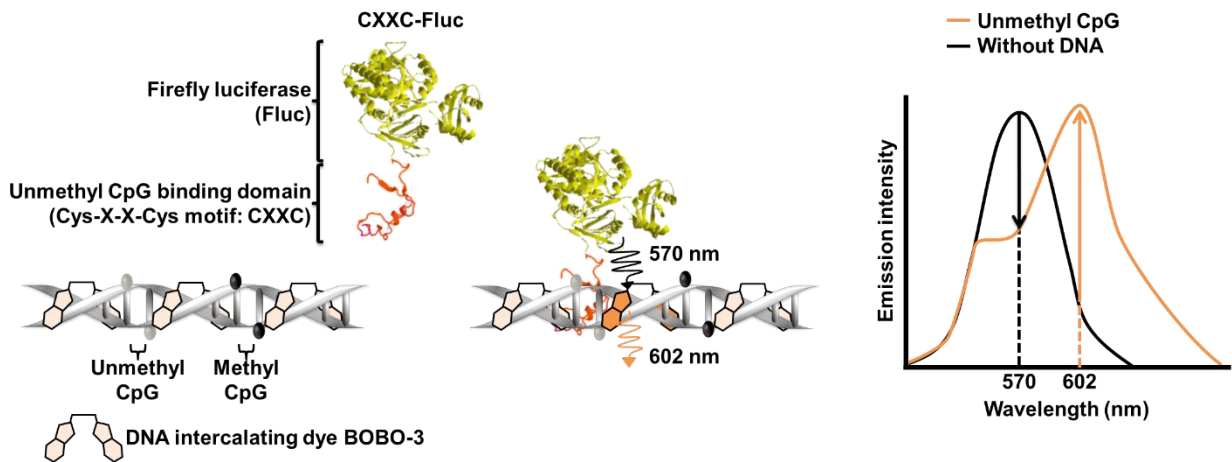


Figure 1-11 CXXC-Fluc を用いた BRET assay によるゲノム DNA の非メチル化 CpG 量測定法の原理

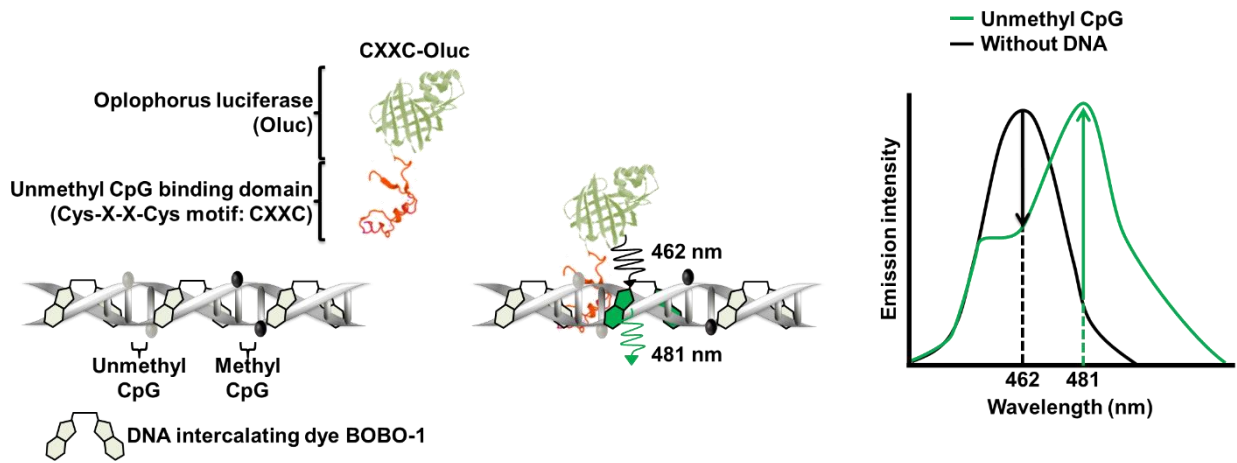


Figure 1-12 CXXC-Oluc を用いた BRET assay によるゲノム DNA の非メチル化 CpG 量測定法の原理

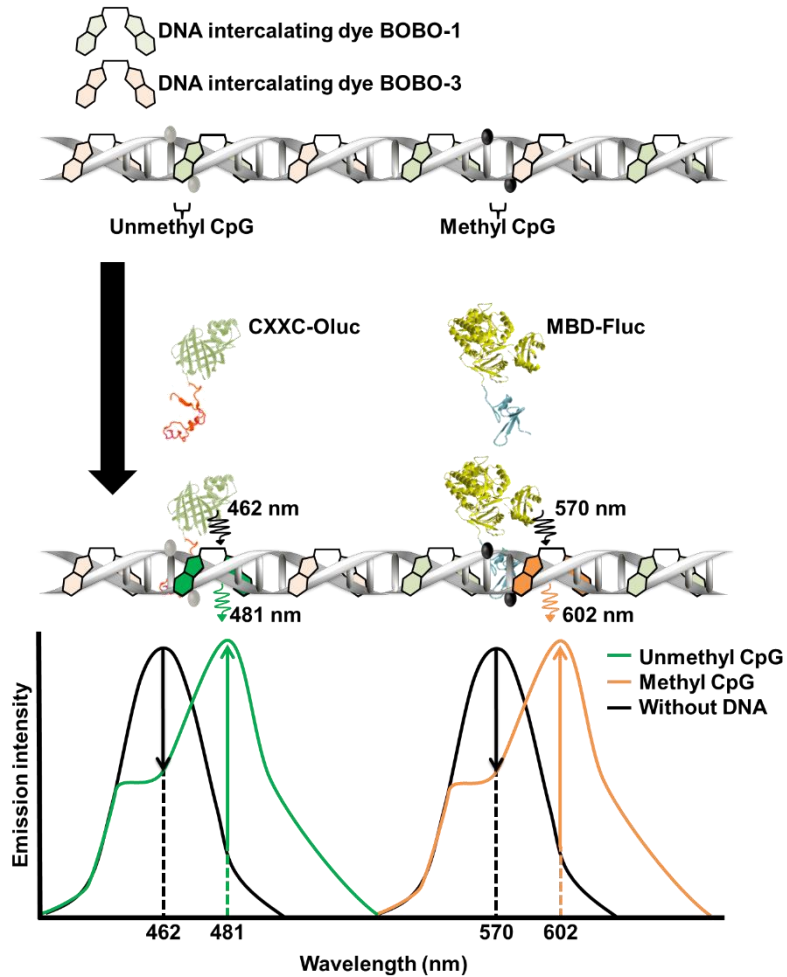


Figure 1-13 CXXC-Oluc と MBD-Fluc を用いたマルチカラーBRET assay によるゲノム DNA のメチル化レベル定量法の原理

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

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

1 節 緒言

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、近傍の遺伝子発現制御に重要な役割を果たしている。正常な細胞では、ヒトゲノム DNA の約 45%は反復配列であるレトロトランスポソンの転写活性を制御するために通常は高度にメチル化されている。また、ヒトゲノム DNA 内に存在する CpG サイトの約 95%以上はトランスポゾン内に存在しているため、ゲノム DNA のメチル化レベルは反復配列のメチル化レベルと相関がある。一方がん細胞では、レトロトランスポソンは低メチル化状態であるため、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期待されている。

ゲノム DNA のメチル化レベル測定法としては、① LC-MS を用いる方法、②バイサルファイト処理を用いる方法、③抗 5mC 抗体を用いる方法及び④ 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。

本研究では、検量線を必要としないで、検体に試薬を混ぜるだけでゲノム DNA のメチル化レベルが測定できる方法を開発領域とした。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^[72]。一方で、メチル化 CpG を認識する蛋白質として MBD1, 2, 3 や MeCP2 が既に単離・精製されている。そこで、MBD (ヒト由来の MBD1 蛋白質の 2-82 番目のアミノ酸に対するメチル化 CpG 結合ドメインを MBD と記す)を zinc-Fluc の zinc と組換えた MBD-Fluc と DNA intercalating dye BOBO-3 を用いれば、BRET assay を基にしたゲノム DNA のメチル化 CpG 量を測定する方法が開発できると考えた。

以下に本手法の原理を示す。①細胞から抽出したゲノム DNA に DNA intercalating dye を加えると、DNA intercalating dye はメチル化の有無にかかわらずゲノム DNA に結合する。そこに、②MBD-Fluc を混合すると、MBD-Fluc の MBD はゲノム DNA 中のメチル化 CpG を認識する。最後に、③Firefly luciferase の発光基質を加えると、luciferase の発光により DNA intercalating dye が励起され蛍光を発する。この発せられた蛍光を BRET シグナルとする。この BRET シグナルは、ゲノム DNA のメチル化レベル依存的に得られると考えられる。

本手法の原理によって、化学処理を必要としなく、検体に試薬を混ぜるだけでゲノム DNA のメチル化 CpG を光学的に測定できると考えられる。したがって本章においては、MBD-Fluc と DNA intercalating dye 間で生じる BRET を利用したヒトゲノム DNA のメチル化 CpG 量測定法を開発することを目的に、MBD-Fluc 発現ベクターを構築した後、大腸菌 BL21 (DE3)を用いて MBD-Fluc を組換え生産し、その特性を検討した。得られた MBD-Fluc と DNA intercalating dye BOBO-3 間で生じる BRET を利用して、プラスミド DNA とゲノム DNA のメチル化 CpG 量を測定できるのかを検討した。

2節 使用した試薬・大腸菌、プレート、実験機器およびオリゴ DNA

2-1. 試薬・大腸菌

Table 2-1 使用した試薬・大腸菌

目的	品名	会社名
	Ultrapure™ distilled water	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	10×PBS (1.4 M Sodium chloride, 0.020 M Potassium, 0.080 M Sodium phosphate dibasic, 0.020 M Potassium phosphate monbasic)	Ambion, Austin, TX
PCR	KOD-plus-neo	Toyobo, Osaka, Japan
	Excelband 1.0 kb DNA ladder	SMBio, Hsinchu, Taiwan
	Excelband 0.20 kb DNA ladder	SMBio, Hsinchu, Taiwan
	10×Ex tag HS buffer	Takara, Tokyo, Japan
	Ex tag HS	Takara, Tokyo, Japan
電気泳動	Agar	Wako, Tokyo, Japan
	Orange G	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	EtBr solution	Nippon gene, Tokyo, Japan
制限酵素処理	<i>Nde</i> I	NEB, Ipswich, MA, USA
	<i>Eco</i> R I	NEB, Ipswich, MA, USA
DNA 精製	Wizard® sv gel and PCR clean-up system	Promega, Madison, WI, USA
	DNeasy blood and tissue kit	Qiagen, Hilden, DE
	Wizard® plus sv minipreps DNA purification system	Promega, Madison, WI, USA
Ligation	Ligation high ver. 2	Toyobo, Osaka, Japan
Transformation	<i>E. coli</i> DH5α competent cells	Takara, Tokyo, Japan
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) competent cells	Biodynamics Laboratory Inc.
	グリセリン	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	SOC medium	Takara, Tokyo, Japan
LB medium	Tryptone	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	Extract yeast dried	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	Kanamycin	Tokyo chemical industry, Tokyo, Japan
	Sodium chloride	Wako, Tokyo, Japan
	Bacto-agar	Wako, Tokyo, Japan

蛋白質精製	10×Bug Buster® protein extraction reagent	Novagen, Madison, WI, USA
	Sodium chloride	Wako, Tokyo, Japan
	Strept-tactin superflow plus (1.0 mL)	Qiagen, Hilden, DE
	Sodium dihydrogenphosphate dihydrate	Wako, Tokyo, Japan
	D-Desthiobiotin	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	HABA	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	(±) DTT	Wako, Tokyo, Japan
活性測定	PicaGene	Toyo b-net, Tokyo, Japan
SDS-PAGE	Acrylamide	Wako, Tokyo, Japan
	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	Sodium dodecyl sulfate	Wako, Tokyo, Japan
	Ammonium Peroxodisulfate	Yoneyama yakuhin kogyo, Osaka, Japan
	N, N, N', N'-tetramethylphenylenediamine (TEMED)	Tokyo chemical industry, Tokyo, Japan
	BES	Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan
	2×Tris-BES sample buffer	Tefco, Tokyo, Japan
	β-mercaptoethanol	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	Sodium thiosulfate pentahydrate	Wako, Tokyo, Japan
	N, N-dimethyl formamide	Wako, Tokyo, Japan
	Quick-CBB plus	Wako, Tokyo, Japan
	Quick start™ braford 1×dye reagent	Bio rad, Hercules, CA, USA
	Alubmin, from bovine serum	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	銀染色 II キット	Wako, Tokyo, Japan
	Methanol	Wako, Tokyo, Japan
Acetic acid	Wako, Tokyo, Japan	
蛋白質濃度測定	DC protein assay kit	Bio rad, Hercules, CA, USA
Plate assay	MgCl ₂	Wako, Tokyo, Japan
	Tween® 20	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	(+) Biotin	Wako, Tokyo, Japan
メチル化処理	4.0 U/μL M. Sssl	NEB, Ipswich, MA, USA
	200×SAM	NEB, Ipswich, MA, USA
	<i>E. coli</i> HST04 dam ⁻ /dcm ⁻	Takara, Tokyo, Japan
COBRA	Epitect bisulfite kits	Qiagen, Hilden, DE
	Max tract	Qiagen, Hilden, DE
	<i>Hpa</i> II	NEB, Ipswich, MA, USA

	Taq ^o I	Takara, Tokyo, Japan
	Chloroform-isoamyl alcohol (24:1)	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	Phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol (25:24:1)	Wako, Tokyo, Japan
	3.0 M sodium acetate	Wako, Tokyo, Japan
	Ethachinmate	Wako, Tokyo, Japan
	Ethanol (99.5)	Wako, Tokyo, Japan
BRET assay	BOBO-3 (570/602)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	PicaGene	Toyo b-net, Tokyo, Japan
細胞培養	HeLa cell	Reken, Ibaraki, Japan
	5-Aza-2'-deoxycytidine	Tokyo chemical industry, Tokyo, Japan
	DMEM	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	FBS	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	Penicillin-streptomycin l-glutamine	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	TrypLE™ select	Thermo fisher scientific, Tokyo, Japan

2-2. プレート

Table 2-2 使用したプレート

目的	品名	会社名
細胞培養	100 mm cell culture dish	Full-steri, Shiga, Japan
	100 mm cell culture dish-treated	Nippon genetics, Tokyo, Japan
蛋白質濃度測定	Clear plate	Thermo fisher scientific, Tokyo, Japan
活性測定	White plate	Greiner bio-one, Kremsmünster, AU
Plate assay	Streptavidin coated white plate	Thermo fisher scientific, Tokyo, Japan

2-3. 実験機器

Table 2-3 使用した実験機器

機器名	品名	会社名
クリーンベンチ	CCV clean bench	Fujisawa, Osaka, Japan
卓上微量高速遠心機	Himac CT15RE	Hitachi, Tokyo, Japan
遠心分離機	Cubee	Recentteci, Tokyo, Japan
サーマルサイクラー	T100™ thermal cycler	Bio rad, Hercules, CA, USA
	PCR thermal cycler dice touch TP350	Takara, Tokyo, Japan

	Veriti thermal cycler	Thermo fisher scientific, Tokyo, Japan
電気泳動槽	Mupid-2 plus	AND, Tokyo, Japan
スラブ電気泳動装置	BE-220	Bio craft, Tokyo, Japan
	電源装置	Bio craft, Tokyo, Japan
分光光度計	Biospectrometer basic	Eppendorf japan, Tokyo, Japan
電子天秤	分析用電子天秤 HR-202	AND, Tokyo, Japan
	電子上皿天秤 PL3002	Metter toledo, Columbus, OH, USA
	電子天秤 AW120	Shimazu, Kyoto, Japan
pH メーター	Seven easy S20	Metter toledo, Columbus, OH, USA
アルミブロック恒温槽	Eyela MG-1200	Tokyo rikakikai, Tokyo, Japan
	Vortex-genie® 2	Scientific industries, Bohemia, NY, USA
トランスイルミネーター	LED illuminator LI-410	Bio craft, Tokyo, Japan
恒温器	Incubator IC601	Yamato scientific, Tokyo, Japan
	低温インキュベーター BNC-110	Espec corp, Osaka, Japan
	マイクロチューブローテーター MTR-103	As one, Osaka, Japan
恒温器小型	クールインキュベーター	Mitsubish electric, Tokyo, Japan
	Rotary shaker NX-20D	Nisshn rika, Tokyo, Japan
スターラー	Pasplina mini stirrer CT-1A	As one, Osaka, Japan
プレートリーダー	Spark 10M multimode microplate reader	Tecan, Männedorf, CH
	Microplate reader model 680	Bio rad, Hercules, CA, USA
チューブポンプ	Variable speed pump-low	Thermo fisher scientific, Tokyo, Japan
シェーカー	Seesaw shaker BC-700	Bio craft, Tokyo, Japan
フリーザー	超低温フリーザー(-80°C)	Panasonic, Osaka, Japan
	低温フリーザー(-20°C)	Sanyo, Osaka, Japan
レンジ	レンジ	Sanyo, Osaka, Japan

2-4. オリゴ DNA

Table 2-4 使用したオリゴ DNA の配列

名前	配列 5'-3'
Forward primer for MBD	TTCATATGTGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAAGGCTGAGGACT GGCTGGACT
Reverse primer for MBD	GTTGAATTCGCTGGCAACCGCCACGG
Methylated DNA_Top	Biotin-AAAAAACAGGATXGACGACGTACCCT (X= methylated cytosine)
Methylated DNA_Bottom	AGGGTACGTCGTXGATCCTG (X= methylated cytosine)
Unmethylated DNA_Top	Biotin-AAAAAACAGGATCGACGACGTACCCT
Unmethylated DNA_Bottom	AGGGTACGTCGTGATCCTG
LINE1 bisulfite forward primer	GYGTAAGGGGTTAGGGAGTTTTT (Y= T or C)
LINE1 bisulfite reverse primer	AACRTAAAACCCTCCRAACCAAATATAAA (R= A or G)

3 節 実験方法

3-1. MBD-Fluc 発現ベクターの構築

ヒト由来の MBD1 の 2-82 番目のアミノ酸に対するメチル化 CpG 結合ドメイン(methyl-CpG binding domain : MBD)をコードする *MBD* は pGEX-2TH-*MBD* [73]から polymerase chain reaction (PCR)により *MBD* を増幅させた。PCR は 50 μ L の反応溶液[1 \times buffer for KOD-plus, 0.20 mM dNTPs, 1.0 mM MgCl₂, 0.30 μ M each primer, 0.20 ng/ μ L の pGEX-2TH-*MBD* および 50 mU/ μ L KOD-Plus (DNA polymerase)]を調製し、サイクルは 94°C で 2 分、[98°C で 10 秒、59°C で 30 秒、68°C で 30 秒] \times 25 サイクルの条件で行った後、電気泳動解析を行った。また、forward primer は N 末端に *Nde* I サイトと *streptag* 配列が付加されている primer を使用し、reverse primer は C 末端に *Eco*R I サイトが付加されている primer を使用した(Table 2-4 の Forward primer for MBD と Reverse primer for MBD)。増幅した 1.0 μ g の PCR 産物を 50 μ L の 1 \times NEBuffer 内で 10 U *Nde* I と 10U *Eco*R I により 37°C で 1 時間処理した後、Pureyield™ miniprep and sv gel & PCR clean-up system により精製した。また、ベクターとなる pET30c-*Firefly luciferase* (pET30c-*Fluc*)を得るために、2.0 μ g の pET30c-*Streptag-Zif268-Fluc* [74]を 50 μ L の 1 \times NEBuffer 内で 20 U *Nde* I と 20 U *Eco*R I により 37°C で 2 時間処理した後、電気泳動解析から観測される目的位置付近のバンド(pET30c-*Fluc*)を切り出し、Pureyield™ miniprep and sv gel & PCR clean-up system により精製した。

pET30c-*Fluc* が 50 μ g に対してモル比が 3 倍の *streptag-MBD* となるように混合液を調製し、調製した混合液に対して半分量の ligation high ver. 2 を添加することで反応液を調製した後、16°C で 30 分間処理した。このライゲーション産物 10 μ L を用いて、20 μ L の *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α (DH5 α) を形質転換した(インキュベートの条件：静置の状態 で 4°C で 30 分間、42°C で 42 秒間、4°C で 2 分間)。

形質転換された DH5 α を LB_Kanamycin プレート培地(pH 7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5.0 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl, 15 g/L Bacto-agar および 20 ug/mL Kanamycin)に播種し、静置の状態 で 37°C で 16 時間培養した。得られたコロニーを 6.0 mL の LB_Kanamycin 液体培地(pH 7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5.0 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl および 20 ug/mL Kanamycin)に添加し、180 r. p. m. で振盪しながら 37°C で 16 時間培養した。培養したサンプルからプラスミド DNA を Pure yield™ plasmid midiprep system を用いて精製した。精製したプラスミド DNA が目的の配列(pET30c-*streptag-MBD-Fluc*)であることを確認するために、精製したプラスミド DNA 配列の解析をマクロジェン社(Tokyo, Japan)に外注した。

3-2. MBD-Fluc の組換え生産

構築した 1.0 ng の pET30c-*streptag-MBD-Fluc* を用いて、*E. coli* BL21 (DE3)を形質転換した(インキュベートの条件：静置の状態 で 4°C で 30 分間、42°C で 42 秒間、4°C で 2 分間)。

形質転換した *E. coli* BL21 (DE3)を 6.0 mL の LB_Kanamycin 液体培地(pH 7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5.0 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl および 20 ug/mL Kanamycin)に添加し、180 r. p. m. で振盪しながら 37°C で 16 時間培養した。この培養したサンプルを 40%グリセロール(40 mL グリセリン、60 mL MilliQ、オートクレーブ済み)と混合し、-80°C で保存した。

保存したサンプルから爪楊枝で適量を取り、1.5 mL の LB_Kanamycin 液体培地(pH 7.2, 10 g/L Bact

tryptone, 5.0 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl および 20 ug/mL Kanamycin)に添加し、180 r. p. m.で振盪しながら 37°C で 16 時間培養した。培養したサンプル全量と 14 mL の LB_Kanamycin 液体培地(pH 7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5.0 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl および 20 ug/mL Kanamycin)を乾熱滅菌したバツフル付きフラスコに添加し、OD₆₀₀ 値が 0.50~1.0 ユニットになるまで 180 r. p. m.で振盪しながら 37°C で培養した。0.50~1.0 ユニットの際に、IPTG を終濃度 1.2 mM になるように添加し、140 r. p. m.で振盪しながら 20°C で 16 時間培養した。この培養した 150 mL のサンプルを 4 つに分け、0.85% NaCl により重さを統一し、2500×g かつ 4°C で 10 分間遠心し、上清を捨てた。この操作を、4 回行った後、集菌したサンプルを-80°C で保存した。

集菌したサンプル 1.0 mg あたり 5.0 mL の細胞溶解液(1×Bug Buster[®] protein extraction reagent, 1×PBS)で懸濁し、ローテーターを用いて 5.0 r. p. m.かつ室温で 5 分間遠心した後、遠心機を用いて 16000×g かつ 4°C で 20 分間遠心した。得られた上清を水溶性画分のサンプルとする。水溶性画分を全量 10 mL の 1×PBS となるように PBS を添加した後、0.45 μm フィルターでろ過した。このろ過したサンプルをフィルターでろ過した水溶性画分とする。ろ過した水溶性画分の全量を Strep-tactin[®] superflow plus (Qiagen, Hilden, DE)のカラムに流速 1.0 mL/min の条件で流し、1.0 mL のフロースルー画分を 10 サンプルずつ回収した。次に、10 mL の洗浄 buffer (pH 8.0, 50 mM NaH₂PO₄ および 0.30 M NaCl)を流速 1.0 mL/min の条件で流し、1.0 mL の洗浄画分を 10 サンプルずつ回収した。最後に、10 mL の溶出 buffer (pH 8.0, 50 mM NaH₂PO₄, 0.30 M NaCl および 10 mM Desthiobiotin) を流速 1.0 mL/min の条件で流し、1.0 mL の溶出画分を 10 サンプルずつ回収し、終濃度 5.0 mM になるように DTT を添加した。精製の間、各サンプルは氷中に保存しながら作業した。得られたサンプルは、水溶性画分、希釈した水溶性画分、フィルターでろ過した水溶性画分、フロースルー画分、洗浄画分および溶出画分を-80°C で保存した。luciferase 活性測定は、得られた各サンプル 5.0 μL に対して、luciferase の基質である 45 μL PicaGene を混合し、Spark 10M を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で luciferase 活性を測定した。また、測定の間、得られた各サンプルは氷中に保存している。

精製された溶出画分のサンプルを SDS-PAGE によって蛋白質の発現を確認するために、7.0 μL の各溶出画分に 7.0 μL の loading buffer (85% Tris BES sample buffer, 60 mM DTT, 5.0% β-mercaptoethanol) を混合することで 14 μL の loading サンプル(50%溶出画分, 43% Tris BES sample buffer, 30 mM DTT, 2.5% β-mercaptoethanol)を調製した後に、loading サンプルを 95°C で 10 分間処理した。電気泳動層は外層に 0.30 L の running buffer (30 mM Tris base, 30 mM BES および 0.10% SDS)、内層に 0.20 L の antioxidant mixture (0.050% Sodium thiosulfata pentahydrate, 0.025% N, N-dimethyl formamide, up to 200 mL with running buffer)を満たし、12% SDS-PAGE mini ゲルをセットした。その後、各 well に 10 μL の loading サンプルと 10 μL の loading marker (50% protein marker, 43% Tris BES sample buffer, 30 mM DTT, 2.5% β-mercaptoethanol)をアプライし、40 mA かつ 165 V の条件で電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルが完全に浸る 20 mL の CBB 染色液にゲルを入れ、シーソーシェーカーを用いて 30 r. p. m.で振盪しながら 60 分間染色した。染色後、CBB 染色液を取り除き、50 mL の MilliQ を入れ、シーソーシェーカーを用いて 30 r. p. m.で振盪しながら 60 分間洗浄した。その後、蛋白質発現の解析を行った。また、各溶出画分を DC protein assay kit を用いたスタンダードアッセイ法により染色し、microplate reader (λ=750 nm)を用いて蛋白質濃度を測定した。

3-3. MBD-Fluc の特性検討

プレートに固定化するためのビオチン修飾された methylated double-stranded DNA (dsDNA) (25 bp, CpG 2 ヶ所、methylated CpG 1 カ所)を調製するために、1×PBS 内で 2 種類の 2.8 μM メチル化 single-stranded DNA (ssDNA) (Table. 2-4 の Methylated DNA_Top と Methylated DNA_Bottom)を混合し、95°C で 5 分間、30 分間かけて温度を 95°C から 25°C に下げる条件でビオチン修飾された methylated dsDNA (25 bp, CpG 1 ヶ所)を調製した。また非メチル化 ssDNA (Table. 2-4 の Unmethylated DNA_Top と Unmethylated DNA_Bottom)を用いてビオチン修飾された unmethylated dsDNA (25 bp, CpG 3 ヶ所)を同様の条件で調製した。

調製した dsDNA に 1×PBS (0.50% Tween 20)を混合し、固定化 dsDNA 溶液(2.5 μM ビオチン修飾された methylated dsDNA, 1×PBS および 0.050% Tween 20)を調製した。この固定化 dsDNA 溶液をストレプトアビジン修飾 96 well クリアプレート(25 pmol streptavidin /well)に 100 μL/well ずつ入れ、シーソーシェーカーを用いて 30 r. p. m.で振盪しながら 30 分間固定化した。続いて 200 μL/well の洗浄 buffer (1×PBS, 0.050% Tween 20 および 0.25 M NaCl)で 5 回洗浄した後、100 μL/well の biotin 水溶液(5.0 μM biotin と 1×PBS)を入れ、シーソーシェーカーを用いて 30 r. p. m.で振盪しながら 30 分間ブロッキングし、200 μL/well の洗浄 buffer (1×PBS, 0.050% Tween[®] 20 および 0.25 M NaCl)で 5 回洗浄した。その後、100 μL/well の蛋白質溶液(34 nM MBD-Fluc と 1×PBS)を入れ、シーソーシェーカーを用いて 30 r. p. m.で振盪しながら 30 分間反応させた。最後に、200 μL/well の洗浄 buffer (1×PBS, 0.050% Tween[®] 20 および 0.25 M NaCl)で 5 回洗浄した後に、100 μL/well の PicaGene を添加し、Spark 10M を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で luciferase 活性を測定した。また、コントロールとしてビオチン修飾された unmethylated dsDNA (25 bp, CpG 3 ヶ所)を同様に調製し、plate assay を行った。

3-4. MBD-Fluc を用いた BRET assay によるプラスミド DNA のメチル化 CpG 量測定

3-4-1.メチル化プラスミド DNA の調製

メチル化酵素である DNA adenine methyltransferase (dam)と DNA cytosine methyltransferase (dcm) の遺伝子が欠損された *E. coli* HST04 *dam*⁻/*dcm*⁻ の 100 μL に 0.10 ng/μL pET30c-*Strepttag*-*MBD-FLuc* (7176 bp, CpG サイト数 456 ヶ所)を 1.0 μL を入れ、大腸菌を形質転換した。(インキュベートの条件：静置の状態での 4°C で 30 分間、42°C で 42 秒間、4°C で 2 分間)。この形質転換処理された *E. coli* HST04 *dam*⁻/*dcm*⁻ の全量を 3.0 mL の LB_Kanamycin 液体培地(pH 7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5.0 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl および 20 ug/mL Kanamycin)に添加し、180 r. p. m.で振盪しながら 37°C で 16 時間培養した。この培養したサンプルからプラスミド DNA を Wizard[®] plus minipreps DNA purification system のキットを用いて抽出した。

得られたプラスミド DNA をメチル化するために、100 μL のメチル化処理溶液[1.0 U/μL M. SssI, 1×SAM, 1×NEBuffer および 0.13 μg/μL プラスミド DNA (pET30c-*Strepttag*-*MBD-FLuc*: 7176 bp, CCGG サイト 37 カ所)]を調製し、37°C で 2 時間反応した。このメチル化処理サンプル内のプラスミド DNA を精製するために、フェノール・クロロホルム処理を行い、エタノール沈殿によりプラスミド DNA を抽出した。

抽出したプラスミド DNA がメチル化されているかどうかをメチル化感受性制限酵素処理[*Hpa*II (CCGG)]によって評価した。*Hpa*II は CCGG サイト内 C と CGG の位置を切断するが、CpG サイトが

メチル化されていれば、*HpaII* による CCGG サイトの切断は起きない。メチル化した 150 ng のプラスミド DNA を 10 μ L の 1 \times CutSmart Buffer 内で 1.0 U *HpaII* により 37°C で 1 時間処理した。また、コントロールとして M. Sss I 処理していないプラスミド DNA を調製し、*HpaII* によって処理した。処理した各サンプルを電気泳動で流した後、バンドの濃淡を画像解析ソフトである imageJ (Wayne Rasband, Bethesda, MD, USA) で解析することによりプラスミド DNA のメチル化レベルを評価した。

3-4-2. プラスミド DNA のメチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定

メチル化プラスミド DNA (終濃度 0, 5.0 および 10 ng/ μ L) と 1.0 μ M BOBO-3 を 1 \times PBS 中で混合し、室温で 30 分間反応させた後に、17 nM MBD-Fluc を添加し、室温で 1 分間反応させた。この反応溶液に 50 μ L の PicaGene を添加し、全量 100 μ L にした後、Spark 10M を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で発光蛍光ペクトル(488~653 nm)を測定し、MBD-Fluc の発光により励起される BOBO-3 の蛍光ペクトル(578~653 nm)を算出した。また、コントロールとして非メチル化プラスミド DNA も同様に BRET assay を行った。

3-4-3. プラスミド DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定

プラスミド DNA のメチル化レベルを 0, 10, 50 および 100% となるようにメチル化プラスミド DNA と非メチル化プラスミド DNA を混合した。調製した各メチル化レベルのプラスミド DNA (終濃度 10 ng/ μ L) と 1.0 μ M BOBO-3 を 1 \times PBS 中で混合し、室温で 30 分間反応させた後に、17 nM MBD-Fluc を添加し、室温で 1 分間反応させた。この反応溶液に 50 μ L の PicaGene を添加し、全量 100 μ L にした後、Spark 10M を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で発光蛍光ペクトル(488~653 nm)を測定し、MBD-Fluc の発光により励起される BOBO-3 の蛍光ペクトル(578~653 nm)を算出した。

3-5. MBD-Fluc を用いた BRET assay によるヒトゲノム DNA のメチル化 CpG 量測定

3-5-1. 低メチル化ヒトゲノム DNA の調製

低メチル化した HeLa ゲノム DNA を調製するために、メチル化阻害剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine が終濃度 0, 0.10, 1.0 および 10 μ M を含む培養液(DMEM, 10%FBS および 1 \times PSG)を使用して HeLa 細胞(4.0 \times 10⁵ cell/dish)を 100 mm dish 内で 5% CO₂ かつ 37°C の条件下で培養した。培養 24 時間後に培地を取り除き、新しい 10 mL DMEM 培地に交換してから 3 日間培養した。培養後、TrypLE™ select を用いて細胞を剥がし、1000 \times g の条件で 5 分間遠心分離することで HeLa 細胞を回収した。回収した HeLa 細胞からゲノム DNA を DNeasy blood and tissue kit を用いて精製した。

5-Aza-2'-deoxycytidine で処理した HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルを評価するために、EpiTect bisulfite kit を用いて HeLa ゲノム DNA をバイサルファイト処理し、精製した。バイサルファイト処理した HeLa ゲノム DNA を標的にして、ヒトゲノム DNA のメチル化レベルと相関する LINE1 領域を PCR で増幅した。LINE1 領域に対応する forward primer は LINE1 bisulfite forward primer (Table 2-4), reverse primer は LINE1 bisulfite reverse primer (Table 2-4)を使用した。PCR は 50 μ L の PCR 溶液(1 \times Ex Tag buffer, 25 mU/ μ L Ex Tag HS, 5.0 ng/ μ L バイサルファイト処理した HeLa ゲノム DNA, 0.20 mM dNTP Mixture, 0.30 μ M each primer)を調製し、サイクルは 95°C で 5 分、[98°C で 10 秒、50°C で 30 秒、72°C で 1 分] \times 30 サイクルの条件で行った後、電気泳動解析を行った。その後、Wizard® sv gel and PCR clean-

up system を用いて PCR 産物を精製した。精製した 800 ng の PCR 産物を 50 μ L の 1 \times Cut smart buffer 内で 2.0 U Taq[®] I により 65°C で 1 時間処理した後、15%ポリアクリルアミドゲルを用いて各処理サンプルの電気泳動解析を行い、バンドの濃淡を画像解析ソフトである imageJ (Wayne Rasband, Bethesda, MD, USA)で解析することにより 5-Aza-2'-deoxycytidined で処理した HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルを評価した。

3-5-2. ヒトゲノム DNA のメチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定

ヒトゲノム DNA の約 32 億塩基中には約 2800 万カ所の CpG が存在する^[75]。そのため、CpG 密度はプラスミド DNA より 7 倍低い。したがって、HeLa ゲノム DNA の BRET assay において BOBO-3 は約 7 倍の濃度(7.0 μ M)を使用して行った。HeLa ゲノム DNA (終濃度 0, 7.0, 35 および 70 ng/ μ L)と 7.0 μ M BOBO-3 を 1 \times PBS 中で混合し、室温で 30 分間反応させた後に、8.5 nM MBD-Fluc を添加し、室温で 1 分間反応させた。この反応溶液に 50 μ L の PicaGene を添加し、全量 200 μ L にした後、Spark 10M を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で発光蛍光ペクトル(488~653 nm)を測定し、MBD-Fluc の発光により励起される BOBO-3 の蛍光ペクトル(578~653 nm)を算出した。

3-5-3. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定

5-Aza-2'-deoxycytidine で処理した低メチル化 HeLa ゲノム DNA (終濃度 70 ng/ μ L)と 7.0 μ M BOBO-3 を 1 \times PBS 中で混合し、室温で 30 分間反応させた後に、8.5 nM MBD-Fluc を添加し、室温で 1 分間反応させた。この反応溶液に 50 μ L の PicaGene を添加し、全量 200 μ L にした後、Spark 10M を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で発光蛍光ペクトル(488~653 nm)を測定し、MBD-Fluc の発光により励起される BOBO-3 の蛍光ペクトル(578~653 nm)を算出した。

4 節 実験結果及び考察

4-1. MBD-Fluc 発現ベクターの構築

MBD1 由来の 2-82 のアミノ酸をコードする *MBD* 遺伝子を pGEX-2TH-*MBD* から *Streptag* と制限酵素サイトを含む primer を使用した PCR により増幅した。pET30c-*streptag-Zif268-Fluc* の *Streptag-Zif268* 領域に *Streptag-MBD* をクローニングするために、増殖した PCR 産物(*Streptag-MBD*)と pET30c-*Streptag-Zif268-Fluc* を制限酵素処理した後、制限酵素処理した PCR 産物(*Streptag-MBD*)と pET30c-*Fluc* をライゲーションした。

シーケンス解析により、MBD1 由来の 2-82 のアミノ酸をコードする *MBD* と *streptag* が pET30c-*streptag-Zif268-Fluc* の *Streptag-Zif268* 領域にクローニングされていることが確認された。つまり、pET30c-*streptag-MBD-Fluc* を構築できたことが示された。構築したベクターマップとクローニングした塩基配列およびアミノ酸配列を Fig. 2-1, 2-2 および 2-3 に示す。

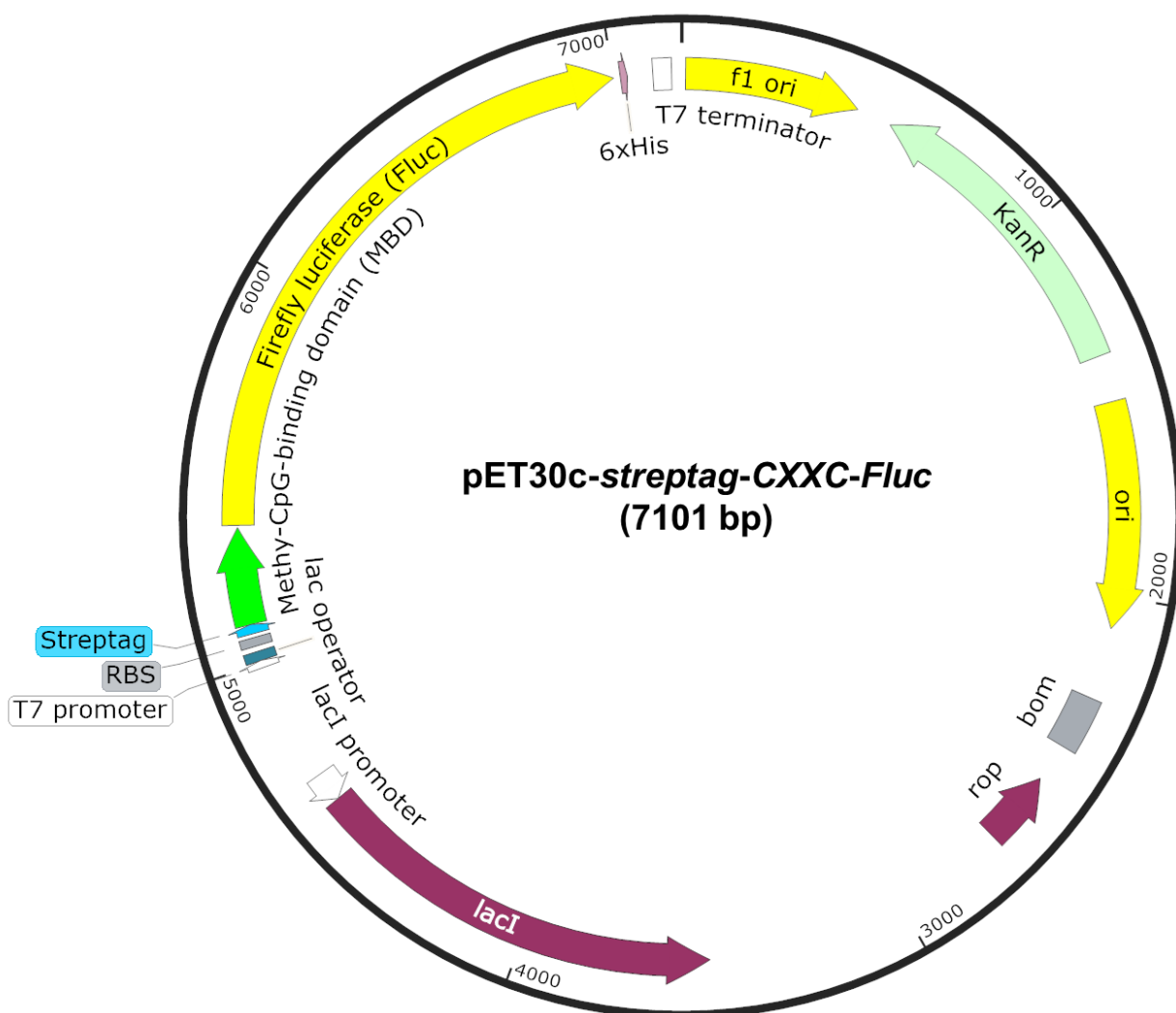


Figure 2-1 pET30c-*streptag-MBD-Fluc* のベクターマップ

atgtggagccatccgagttgaaaaggctgaggactggctggactgcccgccctgggcccctggctggaagcgccgcaagcttctgc
 aagtcaggggcccactgtggacgctcagacacctattaccagagccccacaggagacaggatccgaagcaaagttgagctgactcgat
 acctgggcccctgctgtgactcaccctcttgactcaacaaggcactctgtgctatccagcccccaaggccatcccggtggcgggtgcca
 ggaattcagaccaatggtttcatggagaacgatgaaaatattgtatggtcctgaaccattttaccctattgaagagggatctgctggagc
 acaattgcgaagtatatggatcgacatgcaaaactggagcaattgctttactaacgcactaccgggtgctgattatcgtacgccgaata
 ctagaaaaatcatgctgtctaggagaggcttaaagaattatggttgggtgtgtaggaagaattgcggtatgcagtgaaaactgtgaagagt
 tctttattcctgtattagccggtttattataggtgctgggtggtccaactaatgagattacactctacgtgaattggttcacagtttaggcatctc
 aagccaacaattgtatttagttctaaaaaggattagataaagttataactgtacaaaaaacgtaactgctattaaaaccattgtatattgg
 acagcaaagtggattatagaggtatcaatccatggacaactttataaaaaaacactccacaagggttcaaggatcaagtttaaaact
 gtaaagtaaccgcaagaacaagttgctctataatgaactctcgggttcaaccgggttgccaaaagggtgcaacttactcatgaaaatt
 tggcacgcttttctcagctagagatccaattatggaaccaagttaccaggcaccgctattttaactgtagtaccattccatcatggttt
 ggtatgttactactttaggctatctaactgtggtttcgtattgcatgtaacgaaattgacgaagagactttttaaaacactgcaagattac
 aaatgtcaagcgttattctgtaccgacttggttgcaattcttaatagaagtgaattactcgataaatatgattatcaaatttagtgaaattgcat
 ctggcggagcacctttatctaaagaaattggtgaagctgttctagacgttttaattaccgggtgttctgcaaggctatggttaacagaaca
 acctctgcaattattatcacaccggaaggcgtatgataaaccagggtgcttctgcaaaagttgtccattatataagcaaaagttatcgacttg
 atactaaaaaaccttgggcccgaacagacgtggagaagttgtgtaaagggtcctatgcttatgaaagggtatgtagataatccagaagca
 acaagagaaatcatagatgaagaaggtggtgacacaggagatattgggtattacgatgaagaaaaacattcttatcgtggatcgttg
 aagctttaatacaatacaaggatcaagtagaccacctgctgaattagaatctgttctttgcaacatccaaatattttgatccggcgtgctg
 gcgtccagatcctatagctggtgagctccgggagctgtgtgtacttaagaaaggaaaatctatgactgaaaaagaagtaatggattacg
 ttgtagtcaagttcaaatgcaaaacggttgcgtggtggtccgtttgtggacgaagtacctaaggtctcactggtaaaattgacggtaaa
 gcaattagagaaatactgaagaaccagttgctaagtga

atg : 開始コドン

tga : 終止コドン

: Streptag (24 bp)

: MBD (252 bp)

: Fluc (1641 bp)

Figure 2-2 pET30c-streptag-MBD-Fluc 内の streptag-MBD-Fluc 塩基配列

MW S H P Q F E K A E D W L D C P A L G P G W K R R E V F R K S G A T C G R S D T Y Y Q S P T G D R I R S K V E L T R Y L G P A
 C D L T L F D F K Q G I L C Y P A P K A H P V A V A S E F R P M V F M E N D E N I V Y G P E P F Y P I E E G S A G A Q L R K Y M D R H
 A K L G A I A F T N A L T G V D Y T Y A E Y L E K S C C L G E A L K N Y G L V D G R I A L C S E N C E E F F I P V L A G L F I G V G V A
 P T N E I Y T L R E L V H S L G I S K P T I V F S S K K G L D K V I T V Q K T V T A I K T I V I L D S K V D Y R G Y Q S M D N F I K K N T P
 Q G F K G S S F K T V K V N R K E Q V A L I M N S S G S T G L P K G V Q L T H E N L V T R F S H A R D P I Y G N Q V S P G T A I L T V
 V P F H H G F G M F T T L G Y L T C G F R I V M L T K F D E E T F L K T L Q D Y K C S S V I L V P T L F A I L N R S E L L D K Y D L S N L
 V E I A S G G A P L S K E I G E A V A R R F N L P G V R Q G Y G L T E T T S A I I I T P E G D D K P G A S G K V V P L F K A K V I D L D T
 K K T L G P N R R G E V C V K G P M L M K G Y V D N P E A T R E I I D E E G W L H T G D I G Y Y D E E K H F F I V D R L K S L I K Y K
 G Y Q V P P A E L E S V L L Q H P N I F D A G V A G V P D P I A G E L P G A V V L K K G K S M T E K E V M D Y V A S Q V S N A K R
 L R G G V R F V D E V P K G L T G K I D G K A I R E I L K K P V A K

: Streptag (8 a.a.)

: MBD (84 a.a.)

: Fluc (547 a.a.)

Figure 2-3 streptag-MBD-Fluc のアミノ酸配列

4-2. MBD-Fluc の組換え生産

Streptag-MBD-Fluc 発現ベクターを用いて BL21 (DE3) を形質転換し、IPTG により streptag-MBD-Fluc の発現誘導を行った。発現誘導 16 時間後に、精製用に付加した streptag を利用して streptag-MBD-Fluc を水溶性画分から精製用カラムの strep-tactin® superflow plus (QIAGEN) を用いて精製した。

水溶性画分の調製に使用した菌体量は 0.33 g である。各精製画分における streptag-MBD-Fluc の luciferase 活性を測定した結果、溶出画分全体の luciferase 活性は 1.1×10^{12} cps/mL を示し、2 番目の溶出画分の luciferase 活性は最も高い 4.5×10^{11} cps/mL を示した (Fig. 2-4)。この時、精製する前の水溶性画分の luciferase 活性は、 3.6×10^{13} cps/mL である。luciferase 活性の比率から、溶出画分全体で 31% の streptag-MBD-Fluc を回収できたと考えられる。また SDS-PAGE の結果 (Fig. 2-5)、溶出画分で目的的位置 (分子量: 7.1×10^4) にシングルバンドが観察された。この時の蛋白質濃度は、溶出画分全体 (10 mL) では 0.20 mg/mL、2 番目の溶出画分 (1.0 mL) では 0.20 mg/mL であった。以上より、水溶性画分から溶出画分に 31% の streptag-MBD-Fluc (2.0 mg) が精製できたことが示された。

溶出画分全体で 31% の streptag-MBD-Fluc (2.0 mg) であることから、水溶性画分 (1.7 mL) および菌体 (0.33 g) には 6.5 mg の streptag-MBD-Fluc が存在していると考えられる。一方で、strep-tactin® superflow plus (QIAGEN) の結合容量は 9.0 mg である。つまり、精製用カラムの結合容量に対して 28% 少ない量の streptag-MBD-Fluc を流している。そのため、水溶性画分の調製に使用する菌体量を 0.42 g にすれば、水溶性画分に 9.0 mg の streptag-MBD-Fluc が含まれることになり、溶出画分で streptag-MBD-Fluc の収量を上げることができると考えられる。また、精製用に付加した streptag は N 末端と C 末端側の両方に付加することが可能である。そのため、MBD-Fluc の両末端に streptag を付加すれば、溶出画分での精製効率を改善できると考えられる。

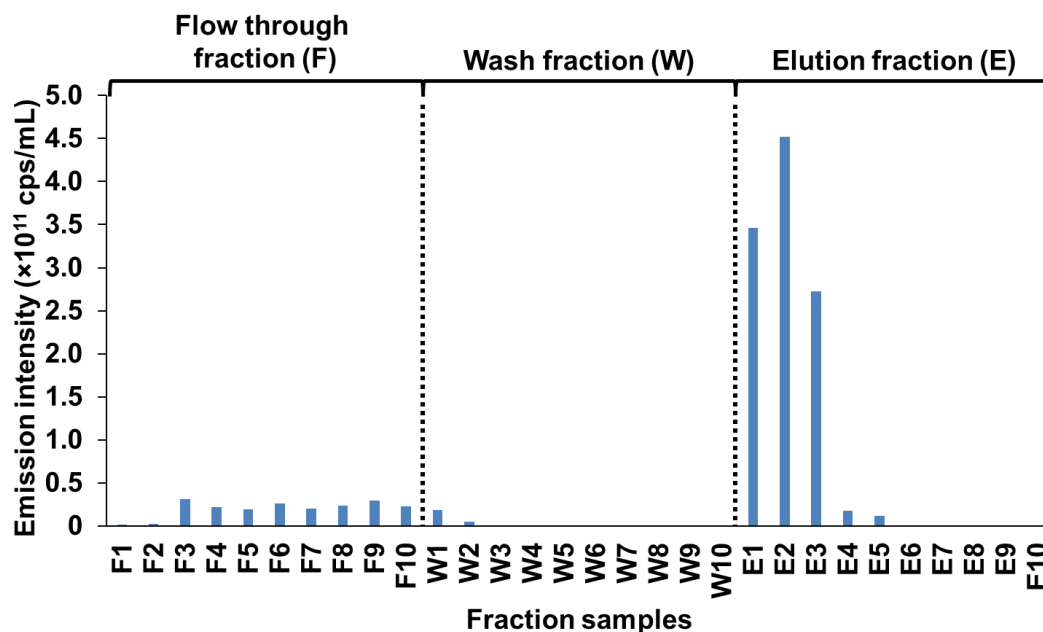


Figure 2-4 各精製画分の luciferase 活性

フロースルー画分(F1-10)、洗浄画分(W1-10)および溶出画分(E1-10)の luciferase 活性は、10 μ L の各サンプルと 90 μ L の PicaGene を用いて測定した。全ての段階で、各サンプル 1 mL を回収した。

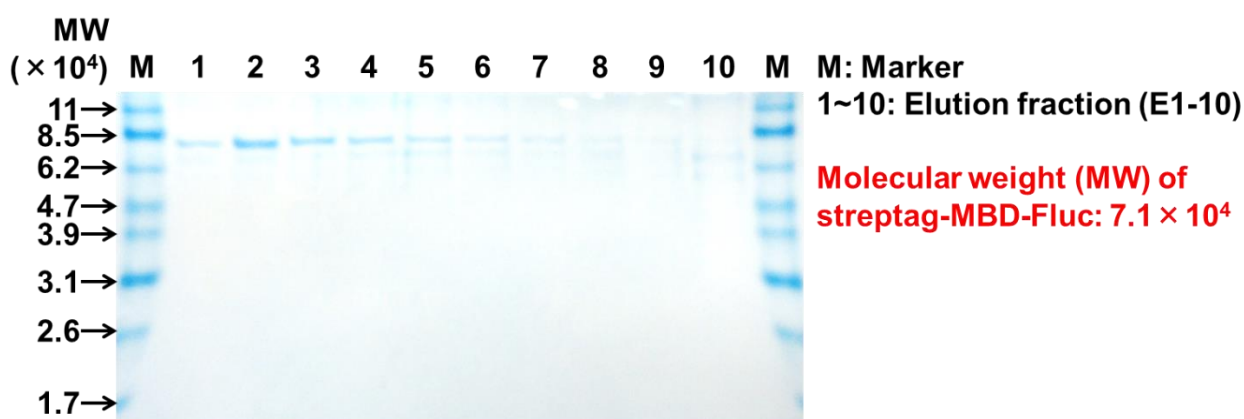


Figure 2-5 精製された streptag-MBD-Fluc (分子量: 7.1×10^4)の SDS-PAGE 解析

蛋白質精製で得られた溶出画分を 12%SDS-PAGE に流し、CBB で染色した。目的の streptag-MBD-Fluc の分子量は 7.1×10^4 である。

4-3. MBD-Fluc の特性検討

メチル化 CpG に対する MBD-Fluc の結合能を plate assay により解析した。Streptag と streptavidin の相互作用を利用してメチル化または非メチル化 CpG を含む dsDNA をプレート上に固定化し、MBD-Fluc を添加した。洗浄した後、luciferase 活性を測定するために、Fluc の基質として PicaGene を加えた。

標的の dsDNA (20 bp)は、3 カ所の CpG サイトを含んでいる。ここでは、3 カ所の内 1 カ所の CpG サイトがメチル化されているサンプルをメチル化 dsDNA (Table 2-4 の Methylated DNA_Top と Methylated DNA_Bottom をハイブリダイゼーションさせたサンプル)とし、メチル化されていないサンプルを非メチル化 dsDNA (Table 2-4 の Unmethylated DNA_Top と Unmethylated DNA_Bottom をハイブリダイゼーションさせたサンプル)とした。また、使用した plate は 1 well あたり最大 1.0 μM の dsDNA を固定化することができる。そのため、メチル化 dsDNA を plate に固定化した場合、1 well あたりメチル化 CpG サイトが 1.0 μM 、非メチル化 CpG サイトが 2.0 μM 存在することになる。このとき、MBD1 由来の MBD はメチル化 CpG に対しての結合解離定数が 10 nM、非メチル化 CpG に対しての結合解離定数が 5.0 μM であるため、結合解離曲線からメチル化 dsDNA 内の CpG サイトに対する MBD の結合親和性を求めることができる(Fig. 2-6)。

推測された MBD の結合親和性の値は、メチル化 CpG サイトに対して 99%、非メチル化 CpG サイトに対して 29%である(Fig. 2-6)。加えた MBD-Fluc の濃度は 34 nM であるため、1 well あたりのメチル化 dsDNA 内に対して 34 nM の MBD-Fluc が結合していることが推測される。一方で、非メチル化 dsDNA を plate に固定化した場合、1 well あたり非メチル化 CpG サイトが 3.0 μM 存在することになる。このとき、結合解離曲線により非メチル化 dsDNA の CpG サイトに対する MBD の結合親和性が推測され、その値は非メチル化 CpG サイトに対して 38%である(Fig. 2-6)。つまり、1 well あたりの非メチル化 dsDNA 内に対して 13 nM の MBD-Fluc が結合していることが推測される。したがって、非メチル化 dsDNA を固定化した場合と比較して、メチル化 dsDNA を固定化した場合では、MBD の結合親和性は 2.6 倍高い値を示すことが推測される。実際に測定された luciferase 活性の値は、非メチル化 dsDNA を固定化した場合と比較して、メチル化 dsDNA を固定した場合は、luciferase 活性は 4.2 倍高い値を観測した(Fig. 2-7)。

以上の結果より、精製した MBD-Fluc はメチル化 CpG サイトを特異的に認識する能力と luciferase 活性の両方を保持している事が示された。

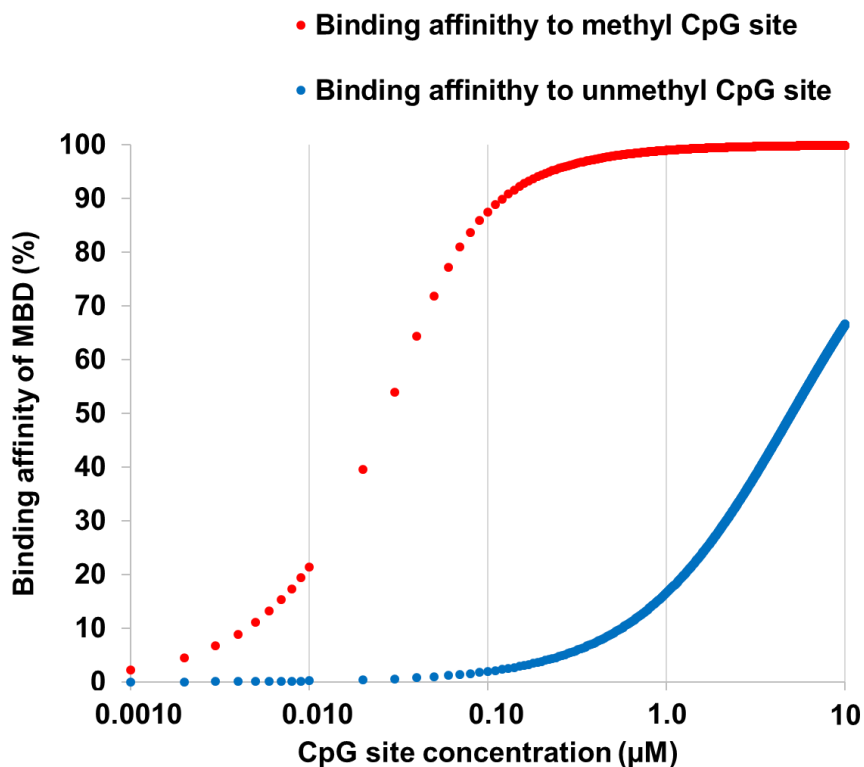


Figure 2-6 CpG サイトに対する MBD1 由来の MBD の結合解離曲線

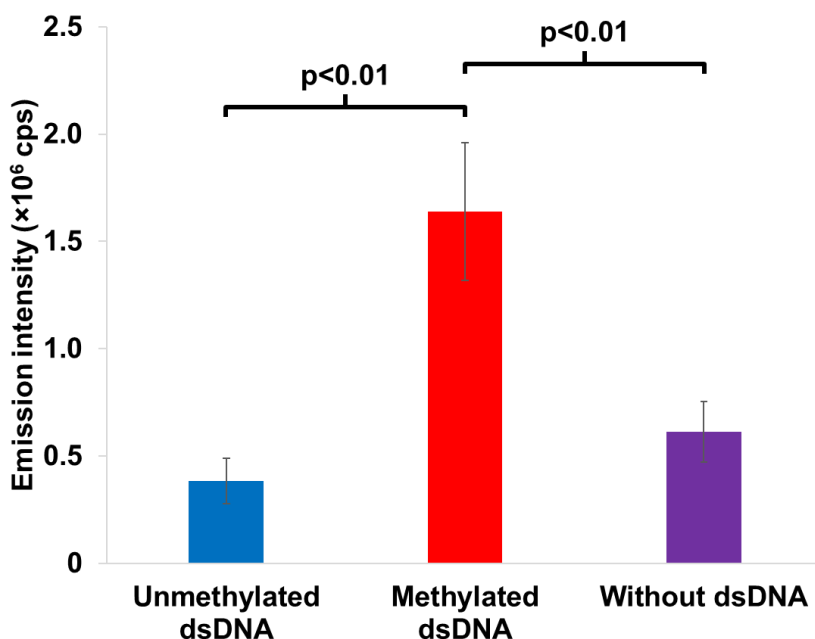


Figure 2-7 plate assay の結果

Streptag と streptavidin の相互作用を利用してメチル化または非メチル化 CpG を含む dsDNA (1.0 μ M)をプレート上に固定化し、34 nM MBD-Fluc を添加した。洗浄した後、luciferase 活性を測定するために、Fluc の基質として PicaGene を 100 μ L を添加した。青色バーが非メチル化 CpG サイトを含む dsDNA を固定化した場合、赤色バーがメチル化 CpG サイトを含む dsDNA を固定化した場合、紫色バーが dsDNA を固定化していない場合の luciferase 活性を測定した(mean \pm SD, N = 3)。

4-4. MBD-Fluc を用いた BRET assay によるプラスミド DNA のメチル化 CpG 量測定

4-4-1. メチル化プラスミド DNA の調製

DNA メチル化酵素(M.Sss I)を用い、プラスミド DNA をメチル化することで、標的となるメチル化 dsDNA を調製した。次に、*HpaII* を用いてメチル化プラスミド DNA を処理し、電気泳動を行い、バンドの濃淡を画像解析ソフトである imageJ (Wayne Rasband, Bethesda, MD, USA)によりプラスミド DNA のメチル化レベルを評価した。

HpaII は CCGG サイト内 C と CGG の位置を切断するが、CpG サイトがメチル化されていれば、*HpaII* による CCGG サイトの切断は起きない。標的のプラスミド DNA は pET30c-*Strepttag-MBD-Fluc* (7176 bp)であり、37 カ所の CCGG サイトを含んでいる。解析した結果、メチル化したプラスミド DNA は *HpaII* で処理していないサンプルとバンドの各位置で同じバンド強度を示した。つまり、プラスミド DNA が 100%メチル化されていることが示された(Fig. 2-7)。

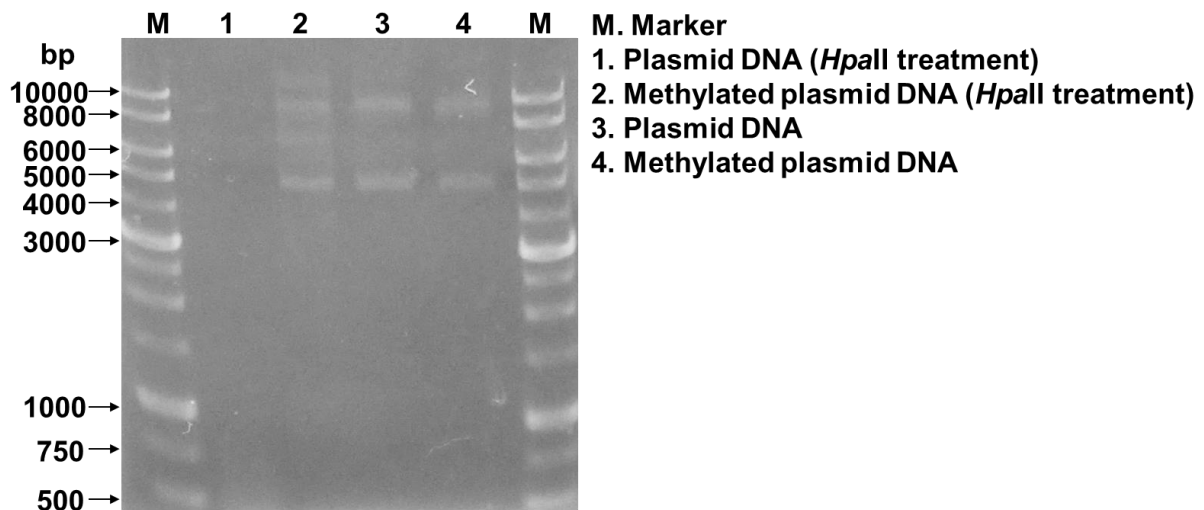


Figure 2-7 *HpaII* によるプラスミド DNA のメチル化レベルの評価

プラスミド DNA がメチル化されているかどうかを *HpaII* によって評価した。*HpaII* は CCGG サイト内 C と CGG の位置を切断するが、CpG サイトがメチル化されていれば、*HpaII* による CCGG サイトの切断は起きない。

4-4-2. プラスミド DNA のメチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定

プラスミド DNA を標的として BRET assay による DNA 濃度量依存的なメチル化 CpG 量を測定した。プラスミド DNA 存在下または非存在下で MBD-Fluc の発光スペクトル(488~653 nm)を測定した結果、MBD-Fluc の発光スペクトルのピークは 578 nm 付近を示した(Fig. 2-8)。一方で、プラスミド DNA 非存在下と比較して存在下では、MBD-Fluc の luciferase 活性は 35%に上昇した(Fig. 2-8 [A])。この結果は、MBD がゲノム DNA のメチル化 CpG に結合することによって Fluc の構造変化が誘導され、その活性が上昇する可能性があることを示した。一方、Fluc の最大発光波長である 578 nm の発光強度で各波長の発光強度を補正したスペクトル形状はゲノム DNA の添加による影響を受けていない(Fig. 2-8 [B])。つまり、MBD-Fluc によって励起された BOBO-3 の 608 nm の発光/蛍光強度が補正されたスペクトルによって算出できることを示している。したがって、MBD-Fluc によって励起された BOBO-3 の 608 nm の発光/蛍光強度を算出するためには、Fluc の最大発光波長である 578 nm の発光強度で各波長の発光/蛍光強度を補正する必要があることを示している。

異なる濃度のメチル化または非メチル化プラスミド DNA (0, 5.0, 10 ng/ μ L)の存在下で、17 nM MBD-Fluc と 1.0 μ M BOBO-3 を加え、luciferase の発光により BOBO-3 が励起されるかを検討した。BRET assay で測定した発光/蛍光スペクトルの raw データを Fig. 2-9 に示す。BOBO-3 の最大励起波長は約 570 nm 付近であり、最大蛍光波長は約 602 nm 付近である。そのため、BRET assay において各スペクトルでは MBD-Fluc の発光と BOBO-3 の蛍光を含んだ発光/蛍光強度が観測された(Fig. 2-9)。そこで、各波長における発光/光強度を 578 nm の発光/蛍光強度で補正し、補正された発光/蛍光スペクトルを算出した(Fig. 2-10)。

標的プラスミド DNA は 7176 bp であり、456 カ所の CpG サイトを含んでいる。そのため、プラスミド DNA が 0, 5.0, 10 ng/ μ L の時、その CpG サイトの濃度は 0, 0.48 および 0.96 μ M である。また、標的プラスミド DNA のメチル化レベルは、4-4-1.で 100%メチル化されていることが確認されている。BRET assay において、5.0 ng/ μ L と 10 ng/ μ L の非メチル化プラスミド DNA 存在下では、BRET シグナルは差を示さなかったが、メチル化プラスミド DNA 存在下では、BRET シグナルはプラスミド DNA 濃度依存的に上昇した。これらの結果は、MBD-Fluc がメチル化 CpG に結合し、BOBO-3 に隣接することにより MBD-Fluc の発光により BOBO-3 が励起され蛍光をメチル化 CpG 量依存的に発していることを示している。

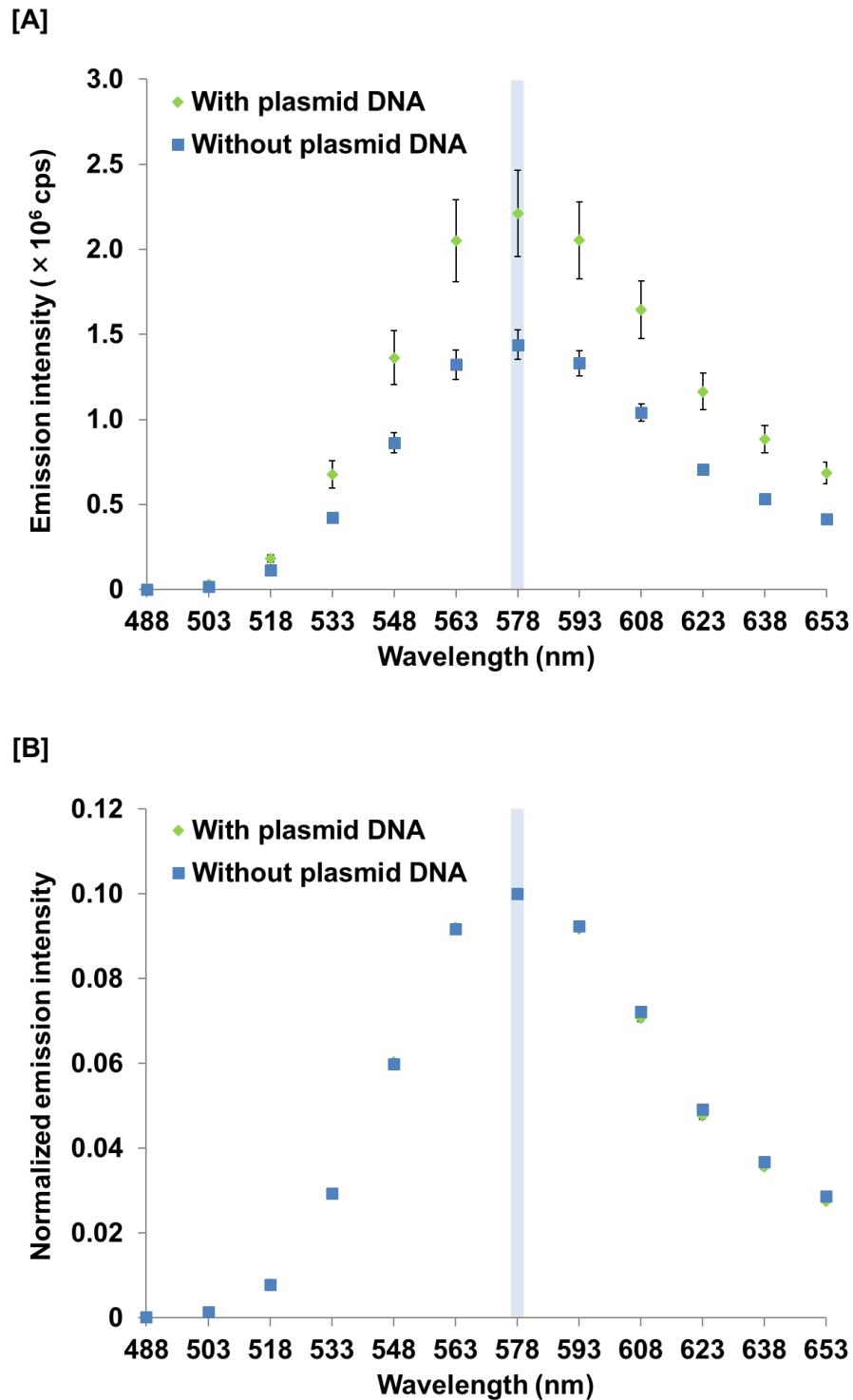


Figure 2-8 MBD-Fluc の発光スペクトル

プラスミド DNA (10 ng/μL) 存在下または非存在下の条件で 17 nM MBD-Fluc の発光スペクトルを全量 100 μL (1×PBS, 50 μL の PicaGene) 内で測定した (mean ± SD, N = 3)。[A] が raw データの発光スペクトルを示す。[B] が 578 nm の発光強度で補正された発光スペクトルを示す。青色のハイライトは 578 nm の波長を示す。

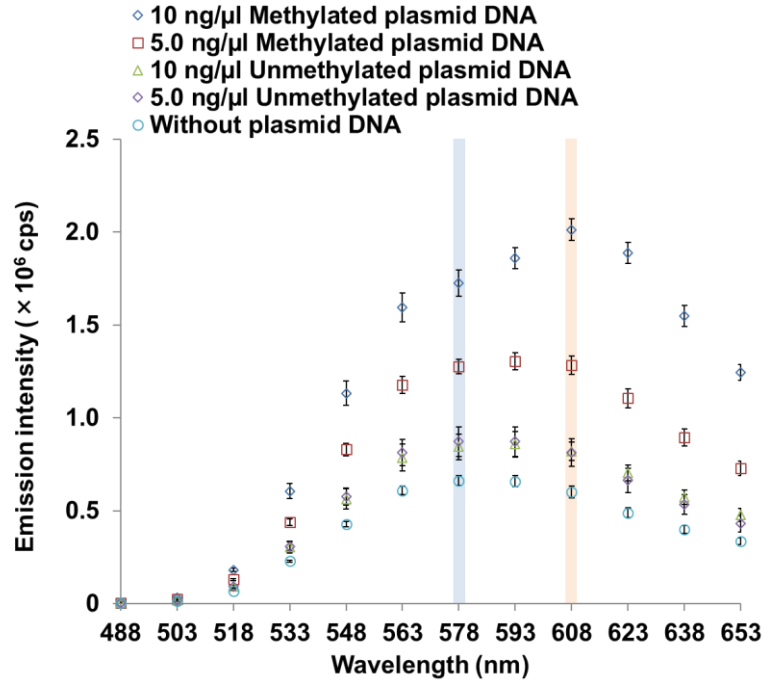


Figure 2-9 蛍光/発光スペクトル(raw データ)

異なる濃度のメチル化または非メチル化プラスミド DNA (0, 5.0, 10 ng/μL) の存在下で、17 nM MBD-Fluc と 1.0 μM BOBO-3 を加え、luciferase の発光により BOBO-3 が励起されるかを検討した (mean ± SD, N = 3)。青色のハイライトは 578 nm の波長を表し、赤色のハイライトは 608 nm の波長を示す。

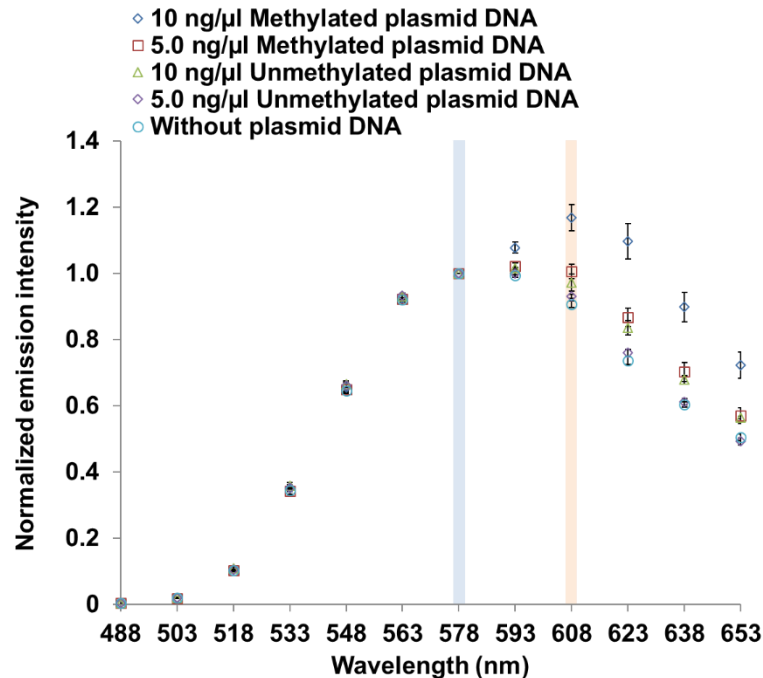


Figure 2-10 578 nm の発光/蛍光強度で補正された発光/蛍光スペクトル

Raw データ (Fig. 2-9) の発光/蛍光スペクトルを 578 nm の発光/蛍光強度で補正した。青色のハイライトは 578 nm の波長を表し、赤色のハイライトは 608 nm の波長を示す。

4-4-3. プラスミド DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定

BRET assay によりプラスミド DNA のメチル化レベル依存的なメチル化 CpG 量を測定した。メチル化レベルが 0, 10, 50 および 100% のプラスミド DNA (10 ng/ μ L) に 17 nM MBD-Fluc と 1.0 μ M BOBO-3 を混合し、Fluc の基質として PcaGene を加えることで、発光/蛍光スペクトルを測定した。標的としたプラスミド DNA は 7176 bp であり、467 カ所の CpG サイトを含んでいる。そのため、メチル化レベルが 0, 10, 50 および 100% であるプラスミド DNA のメチル化 CpG 量は、0, 0.096, 0.48 および 0.96 μ M となる。

測定した発光/蛍光スペクトルの raw データを Fig. 2-11 に示す。次に、各波長における発光/光強度を 578 nm の発光/蛍光強度で補正し、補正された発光/蛍光スペクトルを算出した(Fig. 2-12)。その結果、608 nm における BRET シグナルはプラスミド DNA のメチル化 CpG 量依存的に増加したことが示された(Fig. 2-13)。つまり、BRET assay によりプラスミド DNA のメチル化レベル依存的なメチル化 CpG 量を測定できることが示された。

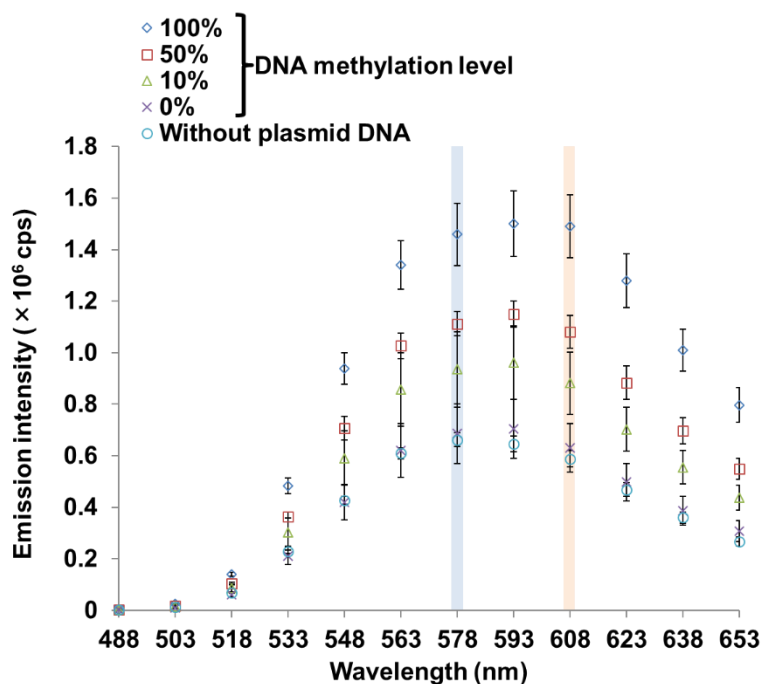


Figure 2-3 蛍光/発光スペクトル(raw データ)

メチル化レベルが 0, 10, 50 および 100% のプラスミド DNA (10 ng/ μ L) の存在下で、17 nM MBD-Fluc と 1.0 μ M BOBO-3 を加え、Fluc の発光により BOBO-3 が励起されるかを検討した(mean \pm SD, $N = 3$)。青色のハイライトは 578 nm の波長を表し、赤色のハイライトは 608 nm の波長を示す。

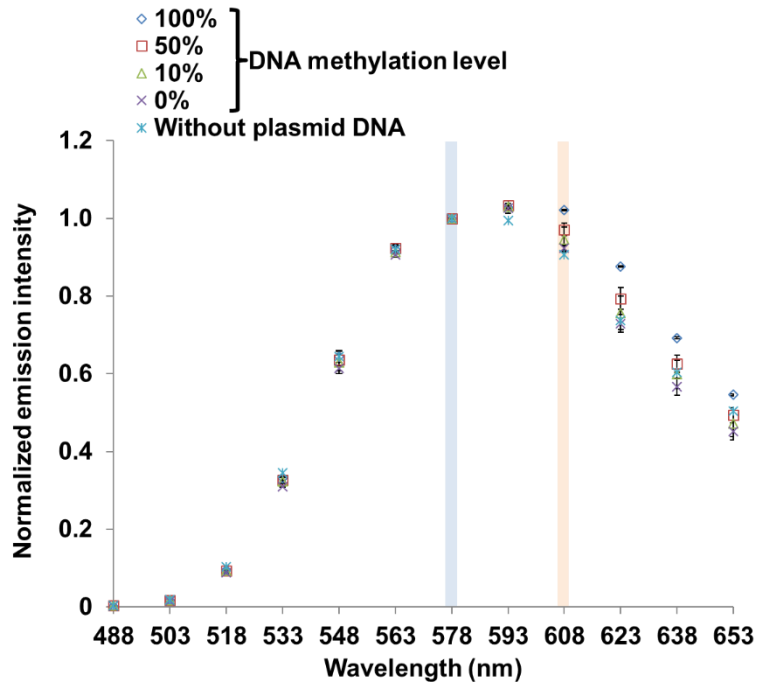


Figure 2-4 578 nm の蛍光強度で補正された発光/蛍光スペクトル

Raw データ(Fig. 2-11)の発光/蛍光スペクトルを 578 nm の発光/蛍光強度で補正した。青色のハイライトは 578 nm の波長を表し、赤色のハイライトは 608 nm の波長を示す。

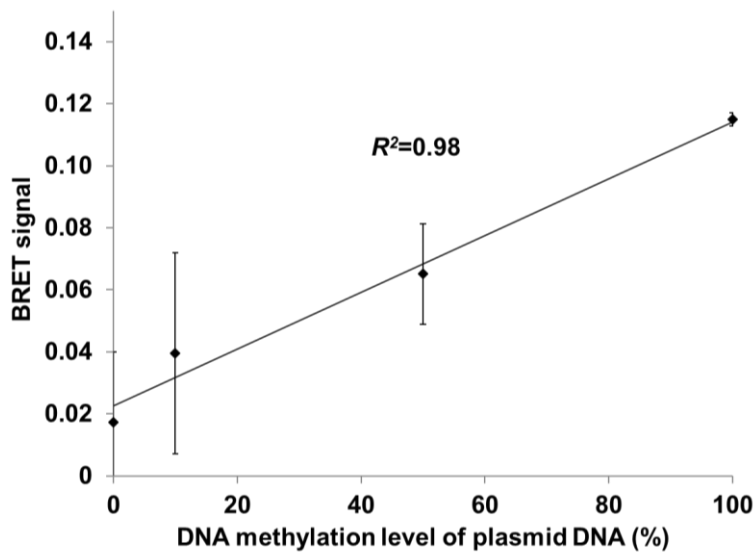


Figure 2-5 608nm における BRET シグナル

COBRA によって評価されたプラスミド DNA のメチル化レベルに対して BRET シグナルをプロットした。

4-5. MBD-Fluc を用いた BRET assay によるヒトゲノム DNA のメチル化 CpG 測定

4-5-1. 低メチル化ヒトゲノム DNA の調製

メチル化阻害剤の 5-Aza-2'-deoxycytidine により HeLa 細胞を処理した後、HeLa ゲノム DNA を精製した。この HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルを COBRA により評価した。

HeLa ゲノム DNA をバイサルファイト変換し、PCR によりゲノム DNA のメチル化レベルと相関する反復配列で LINE1 領域を増幅させた。増幅させた領域は、LINE1 領域内の 160 bp である。その後、*taq*^α I により PCR 産物を処理し、電気泳動法にてメチル化レベルを評価した。バンドの強度を *imagj* で解析した結果(Fig. 2-14)、0, 0.10, 1.0 および 10 μM 5-Aza-2'-deoxycytidine で処理した HeLa 細胞から精製したゲノム DNA のメチル化レベルは 63, 51, 43 および 31%であった。つまり、HeLa ゲノム DNA のメチル化 CpG 量が低下していることが示された。

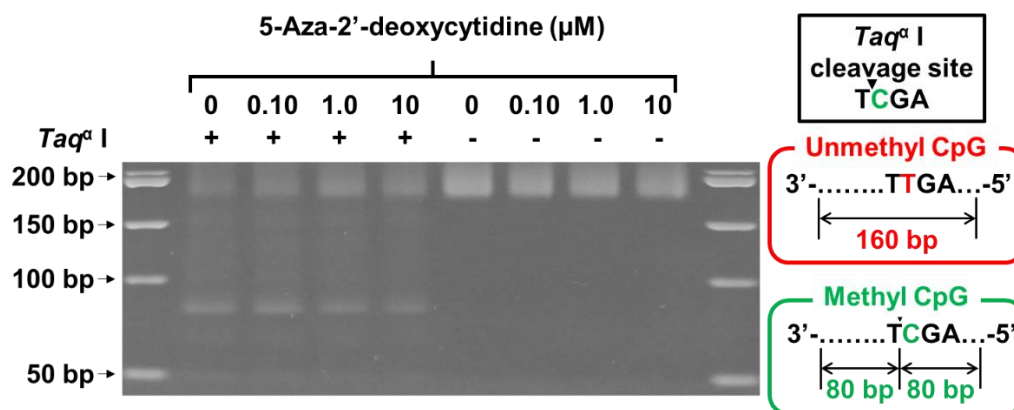


Figure 2-14 COBRA による HeLa ゲノム DNA のメチル化レベル評価

調製した HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルを COBRA によって評価した。メチル化レベルを評価した領域は、ゲノム DNA のメチル化レベルと相関する LINE1 領域内の 160 bp である。LINE1 領域がメチル化されていない場合、*taq*^α I では切断されない。一方でメチル化されている場合、*taq*^α I により切断され、80 bp にバンドが観測される。観測されたバンドの強度から、LINE1 領域のメチル化レベルを算出した。プラス(+)は *taq*^α I 処理したサンプルを示し、マイナス(-)は *taq*^α I 処理していないサンプルを示す。

4-5-2. ヒトゲノム DNA のメチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定

HeLa ゲノム DNA を標的分子として BRET assay によるゲノム DNA 量依存的なメチル化 CpG 量を測定した。ヒトゲノムの約 32 億塩基対の内、約 2800 万カ所は CpG サイトである。このとき、CpG の密度はプラスミド DNA よりも約 7 倍低い。そのため、HeLa ゲノム DNA を標的とした BRET assay では 7 倍濃い BOBO-3 (7.0 μ M) を使用した。

異なる HeLa ゲノム DNA 濃度(0, 7.0, 35 および 70 ng/ μ L)の存在下で、8.5 nM MBD-Fluc と 7.0 μ M BOBO-3 を混合し、Fluc の基質として PicaGene を加えることで、発光/蛍光スペクトルを測定した。BRET assay で測定した発光/蛍光スペクトルの raw データを Fig. 2-15 に示す。次に、各波長における発光/光強度を 578 nm の発光/蛍光強度で補正し、補正された発光/蛍光スペクトルを算出した(Fig. 2-16)。さらに、608 nm における BOBO-3 の蛍光強度(BRET シグナル)を算出した(Fig. 2-17)。BRET シグナルは HeLa ゲノム DNA 濃度依存的に上昇した。つまり、BRET assay がヒトゲノム DNA 内の CpG を標的として行えることを示唆した。

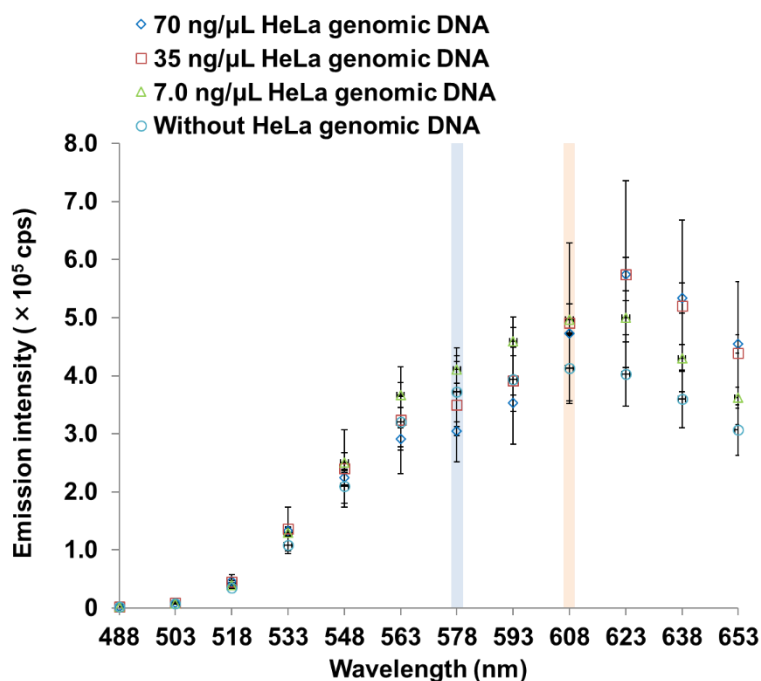


Figure 2-6 蛍光/発光スペクトル(raw データ)

異なる HeLa ゲノム DNA 濃度(0, 7.0, 35 および 70 ng/ μ L)の存在下で、8.5 nM MBD-Fluc と 7.0 μ M BOBO-3 を混合し、Fluc の基質として PicaGene (50 μ L)を加えることで、全量 200 μ L で発光/蛍光スペクトルを測定した(mean \pm SD, $N = 3$)。青色のハイライトは 578 nm の波長を表し、赤色のハイライトは 608 nm の波長を示す。

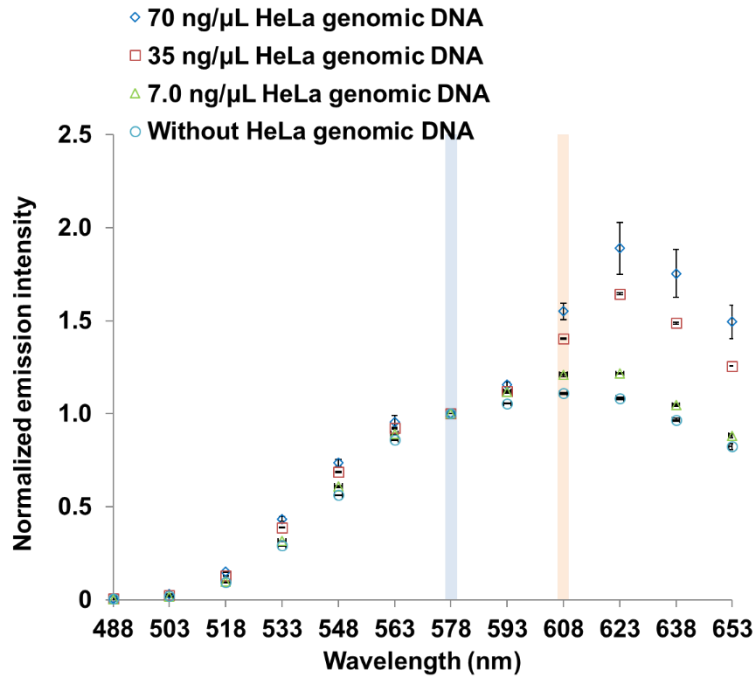


Figure 2-76 BOBO-3 の蛍光強度(BRET シグナル)

Raw データ(Fig. 2-16)の発光/蛍光スペクトルを 578 nm の発光/蛍光強度で補正した。青色のハイライトは 578 nm の波長を表し、赤色のハイライトは 608 nm の波長を示す。

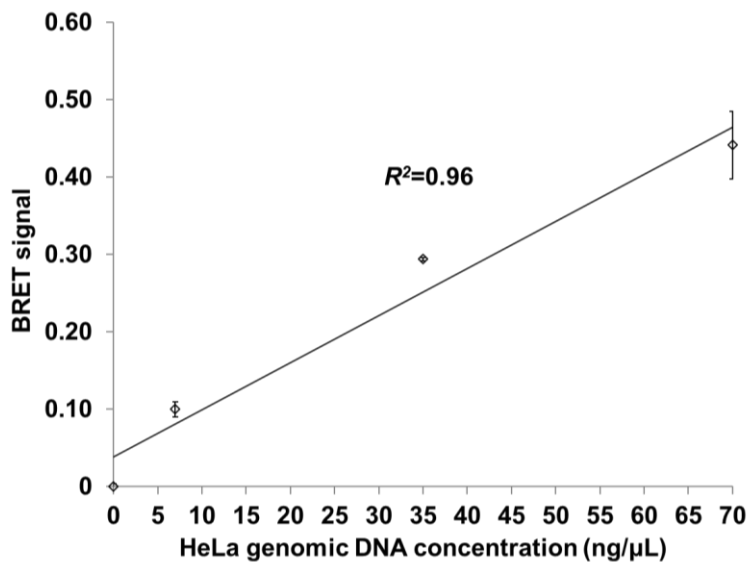


Figure 2-17 608nm における BRET シグナル

HeLa ゲノム DNA の濃度に対して BRET シグナルをプロットした。

4-5-3. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定

BRET assay により HeLa ゲノム DNA のメチル化レベル依存的なメチル化 CpG 量を測定した。メチル化レベルが 31, 43, 51 および 63% の HeLa ゲノム DNA (70 ng/μL) に 8.5 nM MBD-Fluc と 7.0 μM BOBO-3 を混合し、Fluc の基質として PicaGene を加えることで、発光/蛍光スペクトルを測定した。

BRET assay で測定した発光/蛍光スペクトルの raw データを Fig. 2-18 に示す。次に、各波長における発光/光強度を 578 nm の発光/蛍光強度で補正し、補正された発光/蛍光スペクトルを算出した(Fig. 2-19)。さらに、608 nm における BOBO-3 の蛍光強度(BRET シグナル)を算出した。BRET シグナルは HeLa ゲノム DNA のメチル化レベル依存的に上昇した。以上より、MBD-Fluc と BOBO-3 を用いて BRET シグナルを測定することによりヒトゲノム DNA のメチル化 CpG 量を測定できることが示された。

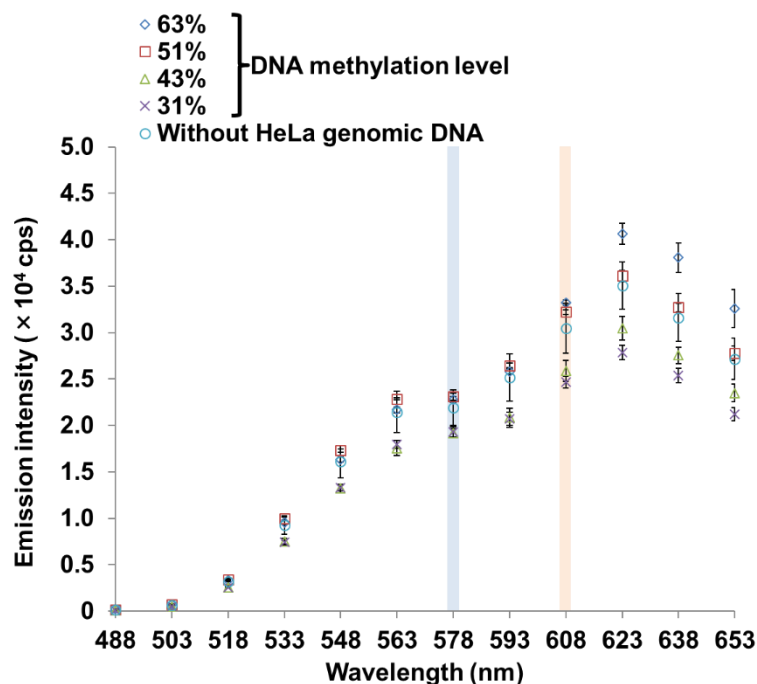


Figure 2-18 蛍光/発光スペクトル(raw データ)

メチル化レベルが 31, 43, 51 および 63% の HeLa ゲノム DNA (70 ng/μL) の存在下で、8.5 nM MBD-Fluc と 7.0 μM BOBO-3 を混合し、Fluc の基質として PicaGene (50 μL) を加えることで、全量 100 μL で発光/蛍光スペクトルを測定した(mean ± SD, N = 3)。青色のハイライトは 578 nm の波長を表し、赤色のハイライトは 608 nm の波長を示す。

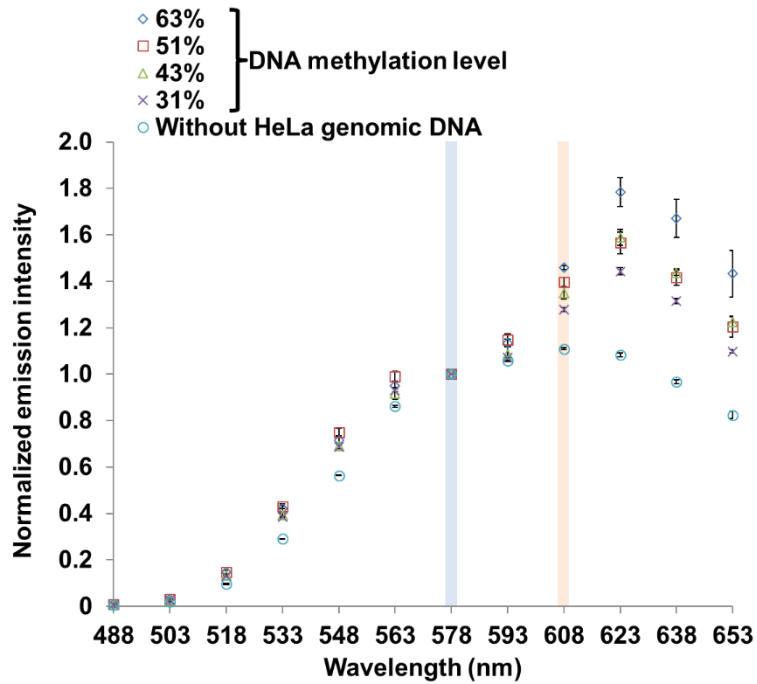


Figure 2-19 BOBO-3 の蛍光強度(BRET シグナル)

Raw データ(Fig. 2-19)の発光/蛍光スペクトルを 578 nm の発光/蛍光強度で補正した。青色のハイライトは 578 nm の波長を表し、赤色のハイライトは 608 nm の波長を示す。

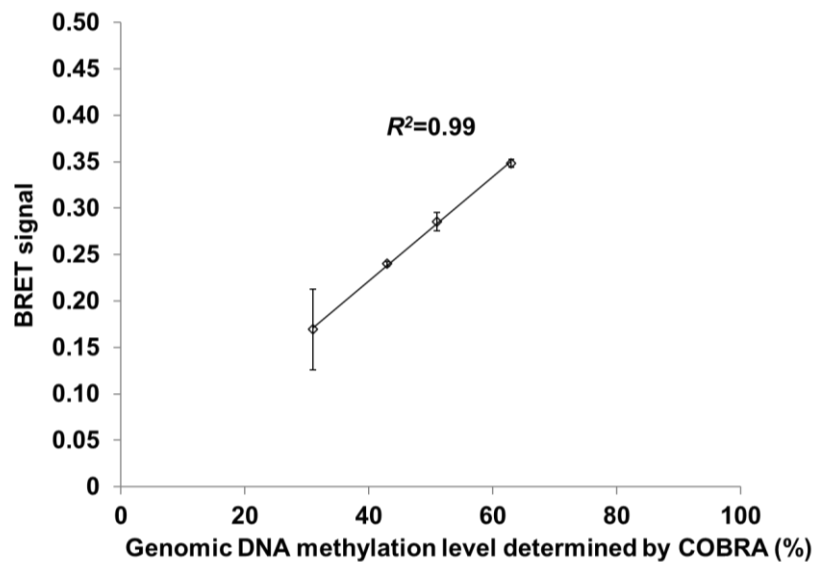


Figure 2-20 608nm における BRET シグナル

COBRA によって評価された HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルに対して BRET シグナルをプロットした。

5 節 結言

第 2 章の目的は、メチル化 CpG に特異的に結合する MBD に Fluc を融合させた MBD-Fluc と DNA intercalating dye 間で生じる BRET を利用したメチル化 CpG 量測定法を開発することである。この BRET assay において、MBD-Fluc がメチル化 CpG に結合し、BOBO-3 に近接することで、MBD-Fluc の発光により BOBO-3 が蛍光を発する BRET シグナルが観測されると考えた。この BRET シグナルはメチル化 CpG 量依存的に依存するため、この BRET シグナルを測定することにより、検体に試薬を混ぜるだけでメチル化 CpG 量を測定できると考えた。

実際に、MBD-Fluc 発現ベクターを構築し、大腸菌 BL21 (DE3)を用いて MBD-Fluc を組換え生産した。さらに、組換え生産した MBD-Fluc はメチル化 CpG 結合能と luciferase 活性の両方を保持していることが示された。HeLa ゲノム DNA を標的にして BRET assay を行った結果、HeLa ゲノム DNA 濃度依存的に BRET シグナルが上昇した。つまり、MBD-Fluc がメチル化 CpG に結合し、BOBO-3 に近接することで、MBD-Fluc の発光により BOBO-3 が蛍光を発していることが示された。さらに、5-Aza-2'-deoxycytidine で処理した低メチル化 HeLa ゲノム DNA を標的にして BRET assay を行った結果、メチル化 CpG 量依存的に BRET シグナルが上昇した。

以上より、本章では、MBD-Fluc と BOBO-3 を用いて、BRET シグナルを測定することにより検体に試薬を混ぜるだけでヒトゲノム 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

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

1節 緒言

がん細胞において、ゲノム DNA のメチル化パターンは異常になっている。一方で、DNA メチル化阻害剤は、抗がん剤として注目されている^[76]。骨髄異形性症候群に対する抗がん剤として、DNA メチル化阻害剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine が使用されている。5-Aza-2'-deoxycytidine は、プロモーター領域の CpG サイトを脱メチル化し、サイレンシングされていたがん抑制遺伝子の発現を回復させる^[77, 78, 79]。そのため、5-Aza-2'-deoxycytidine のような DNA メチル化阻害剤をスクリーニングする方法を開発することは重要であると考えられる。

本研究の第2章で、MBD-Fluc と BOBO-3 間で生じる BRET を利用してゲノムのメチル化 CpG 量を測定できる方法を開発した。第3章では、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を開発することを目的とした。

ゲノム DNA のメチル化状態を変化させるモデル分子で処理した細胞のゲノム DNA のメチル化 CpG 量の変化を BRET assay により測定できるのかを検討した。モデル分子は、DNA メチル化阻害剤の 5-Aza-2'-deoxycytidine と栄養素の葉酸を利用した^[80, 81]。生体内では葉酸から DNA メチルトランスフェラーゼの基質である SAM が合成されるため、葉酸はメチル基供与体として知られている。そのため、葉酸の欠乏によりゲノム DNA のメチル化レベルが低下することが報告されている。この二つのモデル分子で処理した細胞のゲノム DNA のメチル化 CpG 量の変化を BRET assay により測定した。

2節 使用した試薬、プレート、実験機器およびオリゴ DNA

2-1. 試薬・大腸菌

Table 3-1 使用した試薬・大腸菌

目的	品名	会社名
	Ultrapure™ distilled water	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	10×PBS (1.4 M Sodium chloride, 0.020 M Potassium, 0.080 M Sodium phosphate dibasic, 0.020 M Potassium phosphate monbasic)	Ambion, Austin, TX
PCR	Excelband 0.20 kb DNA ladder	SMObio, Hsinchu, Taiwan
	10×Ex tag HS buffer	Takara, Tokyo, Japan
	Ex tag HS	Takara, Tokyo, Japan
電気泳動	Agar	Wako, Tokyo, Japan
	Orange G	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	EtBr solution	Nippon gene, Tokyo, Japan
DNA 精製	Wizard® sv gel and PCR clean-up system	Promega, Madison, WI, USA
	DNeasy blood and tissue kit	Qiagen, Hilden, DE
活性測定	PicaGene	Toyo b-net, Tokyo, Japan
COBRA	Epitect bisulfite kits	Qiagen, Hilden, DE
	Max tract	Qiagen, Hilden, DE

	Taq ^o I	Takara, Tokyo, Japan
	Chloroform-isoamyl alcohol (24:1)	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	Phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol (25:24:1)	Wako, Tokyo, Japan
	3.0 M sodium acetate	Wako, Tokyo, Japan
	Ethachinmate	Wako, Tokyo, Japan
	Ethanol (99.5)	Wako, Tokyo, Japan
	15% polyacrylamide gel	Wako, Tokyo, Japan
BRET assay	BOBO-3 (570/602)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	PicaGene	Toyo b-net, Tokyo, Japan
細胞培養	HeLa cell	Reken, Ibaraki, Japan
	5-Aza-2'-deoxycytidine	Tokyo chemical industry, Tokyo, Japan
	DMEM	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	FBS	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	Penicillin-streptomycin l-glutamine	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	TrypLE™ select	Thermo fisher scientific, Tokyo, Japan
	10×RPMI-1640	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	L-glutamine	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	NaHCO ₃	Sigma aldrich, St. Louis, MO

2-2. プレート

Table 3-2 使用したプレート

目的	品名	会社名
細胞培養	100 mm cell culture dish-treated	Nippon genetics, Tokyo, Japan
活性測定	White plate	Greiner bio-one, Kremsmünster, AU

2-3. 実験機器

Table 3-3 使用した実験機器

機器名	品名	会社名
クリーンベンチ	CCV clean bench	Fujisawa, Osaka, Japan
卓上微量高速遠心機	Himac CT15RE	Hitachi, Tokyo, Japan
遠心分離機	Cubee	Recentteci, Tokyo, Japan
サーマルサイクラー	T100™ thermal cycler	Bio rad, Hercules, CA, USA
スラブ電気泳動装置	BE-220	Bio craft, Tokyo, Japan
	電源装置	Bio craft, Tokyo, Japan
電子天秤	分析用電子天秤 HR-202	AND, Tokyo, Japan

	電子上皿天秤 PL3002	Metter toledo, Columbus, OH, USA
	電子天秤 AW120	Shimazu, Kyoto, Japan
スターラー	Pasplina mini stirrer CT-1A	Aa one, Osaka, Japan
プレートリーダー	Spark 10M multimode microplate reader	Tecan, Männedorf, CH
フリーザー	超低温フリーザー(-80°C)	Panasonic, Osaka, Japan
	低温フリーザー (-20°C)	Sanyo, Osaka, Japan

2-4. オリゴ DNA

Table 3-4 使用したプオリゴ DNA の配列

名前	配列 5'-3'
LINE1 bisulfite forward primer	GYGTAAGGGGTTAGGGAGTTTTT (Y= T or C)
LINE1 bisulfite reverse primer	AACRTAAAACCCTCCRAACCAAATATAAA (R= A or G)

3 節 実験方法

3-1. 細胞内で作用する DNA メチル化阻害剤のスクリーニング法の開発

3-1-1. 5-Aza-2'-deoxycytidine 処理による低メチル化ヒトゲノム DNA の調製

低メチル化したゲノム DNA を調製するために、メチル化阻害剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine が終濃度 0, 0.10, 1.0 または 10 μ M を含む培養液(DMEM, 10%FBS および 1 \times PSG)を使用して HeLa 細胞 (5.0 \times 10⁵ cell/dish)を 100 mm dish 内で 5% CO₂ かつ 37°C の条件下で培養した。また、5-Aza-2'-deoxycytidine 処理によるメチル化 CpG 量の経時変化を測定するために培養の 1, 3, 5 日後に培養液を取り除き、新しい培養液に交換したサンプルもそれぞれ用意した。これらサンプルの細胞を回収する前に、細胞を 100 mm dish 内で 5% CO₂ かつ 37°C の条件下で 3 日間培養した。各培養したサンプルの合計培養日数は 3, 6, 8 日である。培養後、TrypLE™ select を用いて細胞を剥がし、1000 \times g の条件で 5 分間遠心分離することで HeLa 細胞を回収した。回収した HeLa 細胞からゲノム DNA を DNeasy Blood and Tissue Kit を用いて精製した。

3-1-2. 葉酸欠乏による低メチル化ヒトゲノム DNA の調製

低メチル化したゲノム DNA を調製するために、葉酸が終濃度 0, 0.010, 0.10, 1.0 mg/L を含む培養液 (1 \times RPMI-1640, 0.30 g/L L-glutamine, 2.0 g/L NaHCO₃, 1 \times FBS 及び 1 \times PSG)を使用して HeLa 細胞 (5.0 \times 10⁵ cell/dish)を 100 mm dish 内で 5% CO₂ かつ 37°C の条件下で培養した。培養液は 2 日間毎に新しい培養液に変えながら、4, 8 および 12 日目に HeLa 細胞を回収した。培養後、TrypLE™ select を用いて細胞を剥がし、1000 \times g の条件で 5 分間遠心分離することで HeLa 細胞を回収した。回収した HeLa 細胞からゲノム DNA を DNeasy Blood and Tissue Kit を用いて精製した。

3-1-3. MBD-Fluc を用いた BRET assay によるヒトゲノム DNA のメチル化 CpG 量測定

各低メチル化したゲノム DNA (終濃度 70 ng/ μ L)と 7.0 μ M BOBO-3 を 1 \times PBS 中で混合し、室温で 30 分間反応させた。この反応溶液の全量が 150 μ L になるように 8.5 nM MBD-Fluc を添加し、室温で 1 分

間反応させた。この全量 150 μL の反応溶液に 50 μL の PicaGene を添加した後、Spark 10M を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で発光蛍光ペクトル(488~653 nm)を測定し、MBD-Fluc の発光により励起される BOBO-3 の蛍光ペクトル(578~653 nm)を算出した。

4 節 実験結果及び考察

4-1. 細胞内で作用する DNA メチル化阻害剤のスクリーニング法の開発

4-1-1. MBD-Fluc を用いた BRET assay による 5-Aza-2'-deoxycytidine 処理したゲノム DNA のメチル化状態の測定

DNA メチル化阻害剤の 5-Aza-2'-deoxycytidine で処理した HeLa ゲノム DNA のメチル化状態を BRET assay により測定した。BRET assay において各スペクトルでは MBD-Fluc の発光と BOBO-3 の蛍光を含んだ発光/蛍光強度が観測される。そこで、波長 608 nm における発光/蛍光強度から MBD-Fluc の発光強度を差し引くことにより MBD-Fluc の発光によって励起された BOBO-3 の蛍光強度を算出した。算出された BOBO-3 の蛍光強度を BRET シグナルとした。また、各サンプルから得られた BRET シグナルの蛍光強度は、0 日目のサンプルを基準値の 100%として各パーセンテージを算出した。

算出した BRET シグナルに関して、培養日数で各サンプルをプロットした結果(Fig. 3-1 [A])と 5-Aza-2'-deoxycytidine 濃度で各サンプルをプロットした結果(Fig. 3-1 [B])を示す。

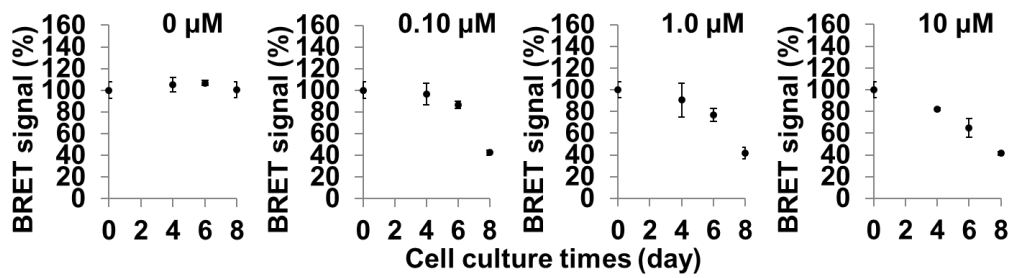
培養日数で各サンプルをプロットした結果(Fig. 3-1 [A])に関して、5-Aza-2'-deoxycytidine で処理しなかった HeLa ゲノム DNA のメチル化状態を BRET assay により測定した結果、BRET シグナルは培養日数に依存しない値を観測した。つまり、細胞培養の過程で DNA メチル化レベルが変化しなかったことを示している。一方で、5-Aza-2'-deoxycytidine で処理したサンプルの BRET シグナルは細胞培養日数依存的に減少した。

5-Aza-2'-deoxycytidine 濃度で各サンプルをプロットした結果(Fig. 3-1 [B])に関して、5-Aza-2'-deoxycytidine で処理していないサンプルの 0 日目では、BRET シグナルは、変化しなかったが、培養日数 4, 6 日目では、BRET シグナルは 5-Aza-2'-deoxycytidine の濃度依存的になり、培養 8 日目で BRET シグナルは飽和した。

がん細胞に対する 5-Aza-2'-deoxycytidine の効果は報告されている^[46]。異なる濃度の 5-Aza-2'-deoxycytidine (0, 0.10, 1.0, 10 および 100 μM)で処理されたラット骨肉腫細胞の生存率は、5-Aza-2'-deoxycytidine 濃度に関係なく約 20%に減少したことが示されている。つまり、0.1 μM の 5-Aza-2'-deoxycytidine 濃度がゲノム DNA の低メチル化を引き起こす十分な濃度であることを示しており、本 BRET assay の結果に反映されている。

以上これらの結果は、DNA メチル化阻害剤によるゲノム DNA のメチル化メチル化状態の変化を BRET assay によって検出することが可能であることを示した。

[A]



[B]

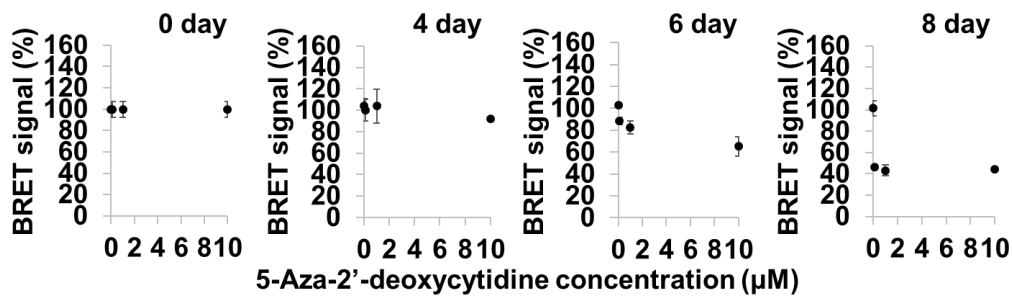


Figure 3-1 BRET assay によるゲノム DNA のメチル化状態の変化を解析した結果

異なる濃度の 5-Aza-2'-deoxycytidine で処理した HeLa ゲノム DNA (70 ng/μL) の存在下で、8.5 nM MBD-Fluc と 7.0 μM BOBO-3 を混合し、Fluc の基質として PicaGene (50 μL) を加えることで、全量 100 μL で発光/蛍光スペクトルを測定した (mean ± SD, N = 3)。[A] は培養日数で各サンプルをプロットした結果、[B] は 5-Aza-2'-deoxycytidine 濃度で各サンプルをプロットした結果を示す。

4-1-2. MBD-Fluc を用いた BRET assay による葉酸欠乏で処理したゲノム DNA のメチル化状態の測定

葉酸欠乏で処理した HeLa ゲノム DNA のメチル化状態を BRET assay により測定した。BRET assay において各スペクトルでは MBD-Fluc の発光と BOBO-3 の蛍光を含んだ発光/蛍光強度が観測される。そこで、波長 608 nm における発光/蛍光強度から MBD-Fluc の発光強度を差し引くことにより MBD-Fluc の発光によって励起された BOBO-3 の蛍光強度を算出した。算出された BOBO-3 の蛍光強度を BRET シグナルとした。また、各サンプルから得られた BRET シグナルの蛍光強度は、0 日目のサンプルを基準値の 100%として各パーセンテージを算出した。

算出した BRET シグナルに関して、培養日数で各サンプルをプロットした結果(Fig. 3-2 [A])と葉酸濃度で各サンプルをプロットした結果(Fig. 3-2 [B])を示す。

培養日数で各サンプルをプロットした結果(Fig. 3-2 [A])に関して、葉酸の濃度が標準濃度である 1.0 mg/L のサンプルは、培養日数に関係なく 100%以上を示した。一方で、葉酸の濃度を 0.10, 0.01, 0 mg/L と減少させたサンプルの BRET シグナルは、培養日数依存的に減少した。

葉酸濃度で各サンプルをプロットした結果(Fig. 3-2 [B])に関して、葉酸の濃度が標準濃度である 1.0 mg/L であるサンプルの BRET シグナルは、培養日数 0 日目と比較して変わらないが、葉酸の濃度が 0.10, 0.01, 0 mg/L であるサンプルの BRET シグナルは 12 日目で低下し、約 60%で飽和した。

葉酸はメチル化反応の基質である SAM の合成に関与している^[29]。そのため、処理した濃度および培養日数により、ゲノム DNA のメチル化レベルに影響を与える。また HeLa 細胞を培養する際の標準的な葉酸濃度は 1.0 mg/L である。そのため、葉酸の濃度が本 BRET assay の結果に反映されていると考えられる。

以上これらの結果は、BRET assay から得られたゲノム DNA のメチル化状態の変化を解析した結果は COBRA による HeLa ゲノム DNA 上の LINE1 領域のメチル化レベルを解析した結果と一致していると考えられる。つまり、BRET assay を用いてゲノム DNA のメチル化 CpG 量の変化を測定することにより、細胞内で作用する DNA メチル化阻害剤をスクリーニングできることが示された。

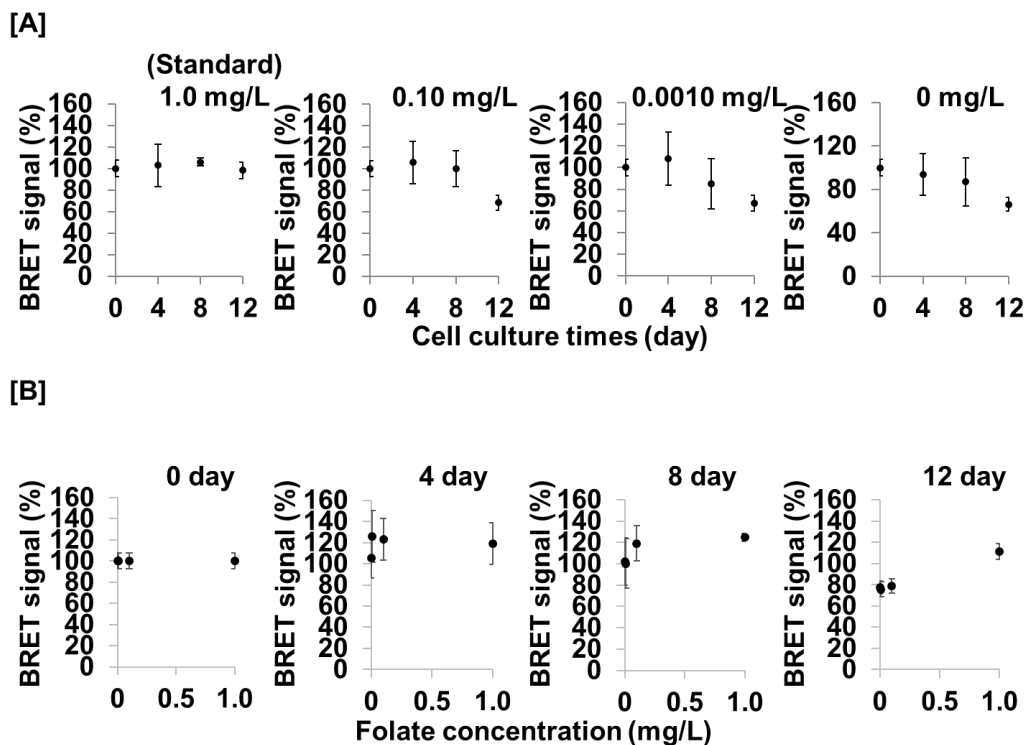


Figure 3-2 BRET assay によるゲノム DNA のメチル化状態の変化を解析した結果

異なる濃度の葉酸で処理した HeLa ゲノム DNA (70 ng/ μ L) の存在下で、8.5 nM MBD-Fluc と 7.0 μ M BOBO-3 を混合し、Fluc の基質として PicaGene (50 μ L) を加えることで、全量 100 μ L で発光/蛍光スペクトルを測定した(mean \pm SD, $N = 3$)。[A]は培養日数で各サンプルをプロットした結果、[B]は葉酸濃度で各サンプルをプロットした結果を示す。

4 節 結言

BRET assay を用いてゲノム DNA のメチル化 CpG 量の変化を測定することにより、細胞内における DNA メチル化阻害剤をスクリーニングできることを示した。

HeLa 細胞を 5-Aza-2'-deoxycytidine を含む培養液または葉酸欠乏培養液で培養し、HeLa ゲノム DNA を精製した。両方のサンプルを標的にして BRET assay を行った結果、ゲノム DNA のメチル化状態に依存した BRET シグナルが得られた。また、本手法は 35 分でゲノム DNA のメチル化状態を検出でき、かつ 96 well プレート内で複数のサンプルを一度に検出できる。つまり、BRET assay により細胞内で作用する DNA メチル化阻害剤をスクリーニングできることが示された。

第 4 章

CXXC-Fluc を用いたゲノム DNA の非メチル化 **CpG** 量測定法の開発

第4章 CXXC-Fluc を用いたゲノム DNA の非メチル化 CpG 量測定法の開発

1 節 緒言

第2章で MBD-Fluc を用い、MBD-Fluc と DNA インターカレーター間で生じる BRET を利用してゲノム DNA のメチル化 CpG 量を測定できる方法を開発した。本手法ではゲノム 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 Firefly luciferase (CXXC-Fluc) を用いれば、ゲノムの非メチル化 CpG 量を同様の方法で測定できると考えた。つまり、MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用いれば、検量線を必要とせずに、簡便にゲノムのメチル化レベルを測定できると考えた。

第4章では MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用いたゲノムのメチル化レベル簡易測定法を開発することを目的とした。

2 節 使用した試薬・大腸菌、プレート、実験機器およびオリゴ DNA

2-1. 試薬・大腸菌

Table 4-1 使用した試薬・大腸菌

目的	品名	会社名
	Ultrapure™ distilled water	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	10×PBS (1.4 M Sodium chloride, 0.020 M Potassium, 0.080 M Sodium phosphate dibasic, 0.020 M Potassium phosphate monobasic)	Ambion, Austin, TX
PCR	KOD-plus-neo	Toyobo, Osaka, Japan
	Excelband 1.0 kb DNA ladder	SMObio, Hsinchu, Taiwan
	Excelband 0.20 kb DNA ladder	SMObio, Hsinchu, Taiwan
	10×Ex tag HS buffer	Takara, Tokyo, Japan
	Ex tag HS	Takara, Tokyo, Japan
電気泳動	Agar	Wako, Tokyo, Japan
	Orange G	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	EtBr solution	Nippon gene, Tokyo, Japan
制限酵素処理	<i>Nde</i> I	NEB, Ipswich, MA, USA
	<i>EcoR</i> I	NEB, Ipswich, MA, USA
DNA 精製	Wizard® sv gel and PCR clean-up system	Promega, Madison, WI, USA
	DNeasy blood and tissue kit	Qiagen, Hilden, DE
	Wizard® plus sv minipreps DNA purification system	Promega, Madison, WI, USA
Ligation	Ligation high ver. 2	Toyobo, Osaka, Japan
Transformation	<i>E. coli</i> DH5α competent cells	Takara, Tokyo, Japan
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) competent cells	Biodynamics Laboratory Inc.
	グリセリン	Nacalai tesque, Kyoto, Japan

	IPTG	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	SOC medium	Takara, Tokyo, Japan
LB medium	Tryptone	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	Extract yeast dried	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	Kanamycin	Tokyo chemical industry, Tokyo, Japan
	Sodium chloride	Wako, Tokyo, Japan
	Bacto-agar	Wako, Tokyo, Japan
蛋白質精製	10×Bug Buster® protein extraction reagent	Novagen, Madison, WI, USA
	Sodium chloride	Wako, Tokyo, Japan
	Strept-tactin superflow plus (1.0 mL)	Qiagen, Hilden, DE
	Sodium dihydrogenphosphate dihydrate	Wako, Tokyo, Japan
	D-Desthiobiotin	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	HABA	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	(±) DTT	Wako, Tokyo, Japan
活性測定	PicaGene	Toyo b-net, Tokyo, Japan
SDS-PAGE	Acrylamide	Wako, Tokyo, Japan
	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	Sodium dodecyl sulfate	Wako, Tokyo, Japan
	Ammonium peroxodisulfate	Yoneyama yakuhin kogyo, Osaka, Japan
	TEMED	Tokyo chemical industry, Tokyo, Japan
	BES	Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan
	2×Tris-BES sample buffer	Tefco, Tokyo, Japan
	β-mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
	Sodium thiosulfate pentahydrate	Wako, Tokyo, Japan
	N, N-dimethyl formamide	Wako, Tokyo, Japan
	Quick-CBB plus	Wako, Tokyo, Japan
	Quick start™ braford 1.0xdye reagent	Bio rad, Hercules, CA, USA
	Alubmin, from bovine serum	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	銀染色 II キット	Wako, Tokyo, Japan
	Methanol	Wako, Tokyo, Japan
	Acetic acid	Wako, Tokyo, Japan
蛋白質濃度測定	DC protein assay kit	Bio rad, Hercules, CA, USA
Plate assay	MgCl ₂	Wako, Tokyo, Japan
	Tween® 20	Sigma aldrich, St. Louis, MO

	(+) Biotin	Wako, Tokyo, Japan
	PicaGene	Toyo b-net, Tokyo, Japan
COBRA	Epitect bisulfite kits	Qiagen, Hilden, DE
	Max tract	Qiagen, Hilden, DE
	Taq ^o I	Takara, Tokyo, Japan
	Chloroform-isoamyl alcohol (24:1)	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	Phenol/ Chloroform/ Isoamyl alcohol (25:24:1)	Wako, Tokyo, Japan
	3.0 M sodium acetate	Wako, Tokyo, Japan
	Ethachinmate	Wako, Tokyo, Japan
	Ethanol (99.5)	Wako, Tokyo, Japan
BRET assay	BOBO-3 (570/602)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	PicaGene	Toyo b-net, Tokyo, Japan
細胞培養	HeLa cell	Reken, Ibaraki, Japan
	5-Aza-2'-deoxycytidine	Tokyo chemical industry, Tokyo, Japan
	DMEM	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	FBS	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	Penicillin-streptomycin l-glutamine	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	TrypLE™ select	Thermo fisher scientific, Tokyo, Japan

2-2. プレート

Table 4-2 使用したプレート

目的	品名	会社名
細胞培養	100 mm cell culture dish	Full-steri, Shiga, Japan
	100 mm cell culture dish-treated	Nippon genetics, Tokyo, Japan
蛋白質濃度測定	Clear plate	Thermo fisher scientific, Tokyo, Japan
活性測定	White plate	Greiner bio-one, Kremsmünster, AU
Plate assay	Streptavidin coated white plate	Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan

2-3. 実験機器

Table 4-3 使用した実験機器

機器名	品名	会社名
クリーンベンチ	CCV clean bench	Fujisawa, Osaka, Japan
卓上微量高速遠心機	Himac CT15RE	Hitachi, Tokyo, Japan
遠心分離機	Cubee	Recenteci, Tokyo, Japan
サーマルサイクラー	T100™ thermal cycler	Bio rad, Hercules, CA, USA

	PCR thermal cycler dice touch TP350	Takara, Tokyo, Japan
	Veriti thermal cycler	Thermo fisher scientific, Tokyo, Japan
電気泳動槽	Mupid-2 plus	AND, Tokyo, Japan
スラブ電気泳動装置	BE-220	Bio craft, Tokyo, Japan
	電源装置	Bio craft, Tokyo, Japan
分光光度計	Biospectrometer basic	Eppendorf japan, Tokyo, Japan
電子天秤	分析用電子天秤 HR-202	AND, Tokyo, Japan
	電子上皿天秤 PL3002	Metter toledo, Columbus, OH, USA
	電子天秤 AW120	Shimazu, Kyoto, Japan
pH メーター	Seven easy S20	Metter toledo, Columbus, OH, USA
アルミブロック恒温槽	Eyela MG-1200	Tokyo rikakikai, Tokyo, Japan
	Vortex-genie® 2	Scientific industries, Bohemia, NY, USA
トランスイルミネーター	LED illuminator LI-410	Bio craft, Tokyo, Japan
恒温器	Incubator IC601	Yamato scientific, Tokyo, Japan
	低温インキュベーター BNC-110	Espec corp, Osaka, Japan
	マイクロチューブローテーター MTR-103	As one, Osaka, Japan
恒温器小型	クールインキュベーター	Mitsubish electric, Tokyo, Japan
	Rotary shaker NX-20D	Nisshn rika, Tokyo, Japan
スターラー	Pasplina mini stirrer CT-1A	As one, Osaka, Japan
プレートリーダー	Spark 10 M multimode microplate reader	Tecan, Männedorf, CH
	Microplate reader model 680	Bio rad, Hercules, CA, USA
チューブポンプ	Variable speed pump-low	Thermo fisher scientific, Tokyo, Japan
シェーカー	Seesaw shaker BC-700	Bio craft, Tokyo, Japan
フリーザー	超低温フリーザー(-80°C)	Panasonic, Osaka, Japan
	低温フリーザー (-20°C)	Sanyo, Osaka, Japan
レンジ	レンジ	Sanyo, Osaka, Japan

2-4. オリゴ DNA

Table 4-4 使用したプオリゴ DNA の配列

名前	配列 5'-3'
Forward primer for CXXC gene amplification	TGGAAATTGGCATATGTGGAGC
Reverse primer for CXXC gene amplification	CAAGAATTCTTTGGAAGGCATCC
Methylated DNA_Top	Biotin-AAAAAACAGGATXGAGCAGCTACCCT (X= methylated cytosine)
Methylated DNA_Bottom	AGGGTAGCTGCTXGATCCTG (X= methylated cytosine)
Unmethylated DNA_Top	Biotin-AAAAAACAGGATCGAGCAGCTACCCT
Unmethylated DNA_Bottom	AGGGTAGCTGCTCGATCCTG
LINE1 bisulfite forward primer	GYGTAAGGGGTTAGGGAGTTTTT (Y= T or C)
LINE1 bisulfite reverse primer	AACRTAAAACCCTCCRAACCAAATATAAA (R= A or G)

3節 実験方法

3-1. CXXC-Fluc 発現ベクターの構築

ヒト由来の MLL 内の 1147-1203 番目のアミノ酸(57 個のアミノ酸)に対応する CXXC ドメインをコードする配列を integrated DNA Technologies 社に合成委託した。そのオリゴ DNA を PCR により CXXC を増幅させた。PCR は 50 μ L の反応溶液[1 \times buffer for KOD-plus, 0.20 mM dNTPs, 1.0 mM MgCl₂, 0.3 μ M each primer, 0.20 ng/ μ L のオリゴ DNA および 50 mU/ μ L KOD-Plus (DNA polymerase)]を調製し、サイクルは 94°C で 2 分、[98°C で 10 秒、59°C で 30 秒、68°C で 30 秒] \times 25 サイクルの条件で行った後、電気泳動解析を行った。また、forward primer は N 末端に *Nde* I サイトと *streptag* 配列が付加されている primer を使用し、reverse primer は C 末端に *Eco*R I サイトが付加されている primer を使用した(Table 4-4 の Forward primer for CXXC gene amplification と Reverse primer for CXXC gene amplification)。増幅した 1.0 μ g の PCR 産物を 50 μ L の 1 \times NEBuffer 内で 10 U *Nde* I と 10U *Eco*R I により 37°C で 1 時間処理した後、PureYield™ Miniprep and SV Gel & PCR Clean-up により精製した。また、ベクターとなる pET30c-*Firefly luciferase* (pET30c-*Fluc*)を得るために、2.0 μ g の pET30c-*Streptag-MBD-Firefly luciferase* を 50 μ L の 1 \times NEBuffer 内で 20 U *Nde* I と 20 U *Eco*R I により 37°C で 2 時間処理した後、電気泳動解析から観測される目的バンド位置(pET30c-*Fluc*)を切り出し、PureYield™ Miniprep and SV Gel & PCR Clean-up により精製した。

pET30c-*Fluc* が 50 μ g に対してモル比が 3 倍の *Streptag-CXXC* となるように混合液を調製し、調製した混合液に対して半分量の Ligation High Ver.2 を添加することで反応液を調製した後、16°C で 30 分間処理した。このライゲーション産物 10 μ L を用いて、20 μ L の DH5 α を形質転換した(インキュベーターの条件：静置の状態 で 4°C で 30 分間、42°C で 42 秒間、4°C で 2 分間)。

形質転換された DH5 α を LB_Kanamycin プレート培地(pH 7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl, 15 g/L Bacto-agar および 20 ug/mL Kanamycin)に播種し、静置の状態 で 37°C で 16 時間培養した。得られたコロニーを 6 mL の LB_Kanamycin 液体培地(pH 7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl および 20 ug/mL Kanamycin)に添加し、180 r. p. m. で振盪しながら 37°C で 16 時間培養した。培養したサンプルからプラスミド DNA を Pure Yield™ Plasmid Midiprep System を用いて精製した。精製したプラスミド DNA が目的の配列(pET30c-*streptag-CXXC-Fluc*)であることを確認するために、精製したプラスミド DNA 配列の解析をマクロジェン社(Tokyo, Japan)に外注した。

3-2. CXXC-Fluc の組換え生産

構築した 1.0 ng の pET30c-*streptag-CXXC-Fluc* を用いて、*E. coli* BL21 (DE3)を形質転換した(インキュベーターの条件：静置の状態 で 4°C で 30 分間、42°C で 42 秒間、4°C で 2 分間)。

形質転換した *E. coli* BL21 (DE3)を 6.0 mL の LB_Kanamycin 液体培地(pH 7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5.0 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl および 20 ug/mL Kanamycin)に添加し、180 r. p. m. で振盪しながら 37°C で 16 時間培養した。この培養したサンプルを 40%グリセロール(40 mL グリセリン、60 mL MilliQ、オートクレーブ済み)と混合し、-80°C で保存した。

保存したサンプルから爪楊枝で適量を取り、1.5 mL の LB_Kanamycin 液体培地(pH 7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5.0 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl および 20 ug/mL Kanamycin)に添加し、180 r. p. m. で

振盪しながら 37°C で 16 時間培養した。培養したサンプル全量と 14 mL の LB_Kanamycin 液体培地(pH 7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5.0 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl および 20 ug/mL Kanamycin)を乾熱滅菌したバツフル付きフラスコに添加し、OD₆₀₀ 値が 0.50~1.0 ユニットになるまで 180 r. p. m. で振盪しながら 37°C で培養した。0.50~1.0 ユニットの際に、IPTG を終濃度 1.2 mM になるように添加し、140 r. p. m. で振盪しながら 20°C で 16 時間培養した。培養した 150 mL のサンプルを 4 つに分け、0.85% NaCl により重さを統一し、2500×g かつ 4°C で 10 分間遠心し、上清を捨てた。この操作を、4 回行った後、集菌したサンプルを-80°C で保存した。

集菌したサンプル 1.0 mg あたり 5.0 mL の細胞溶解液(1×Bug Buster[®] protein extraction reagent, 1×PBS)で懸濁し、ローテーターを用いて 5.0 r. p. m. かつ室温で 5 分間遠心した後、遠心機を用いて 16000×g かつ 4°C で 20 分間遠心した。得られた上清を水溶性画分のサンプルとする。水溶性画分を全量 10 mL の 1×PBS となるように PBS を添加した後、0.45 μm フィルターでろ過した。このろ過したサンプルをフィルターでろ過した水溶性画分とする。ろ過した水溶性画分の全量を strep-tactin[®] superflow plus (QIAGEN)のカラムに流速 1.0 mL/min の条件で流し、1.0 mL のフロースルー画分を 10 サンプルずつ回収した。次に、10 mL の洗浄 buffer (pH 8.0, 50 mM NaH₂PO₄ および 0.30 M NaCl)を流速 1.0 mL/min の条件で流し、1.0 mL の洗浄画分を 10 サンプルずつ回収した。最後に、10 mL の溶出 buffer (pH 8.0, 50 mM NaH₂PO₄, 0.30 M NaCl および 10 mM Desthiobiotin) を流速 1.0 mL/min の条件で流し、1.0 mL の溶出画分を 10 サンプルずつ回収し、終濃度 5.0 mM になるように DTT を添加した。精製の間、各サンプルは氷中に保存しながら作業した。得られたサンプルは、水溶性画分、希釈した水溶性画分、フィルターでろ過した水溶性画分、フロースルー画分、洗浄画分および溶出画分を-80°C で保存した。luciferase 活性測定は、得られた各サンプル 5.0 μL に対して、Fluc の基質として 45 μL Pica Gene を混合し、Spark 10M を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で luciferase 活性を測定した。また、測定の間、得られた各サンプルは氷中に保存している。

精製された溶出画分のサンプルを SDS-PAGE によって蛋白質の発現を確認するために、7.0 μL の各溶出画分に 7.0 μL の loading buffer (85% Tris BES sample buffer, 60 mM DTT, 5% β-mercaptoethanol) を混合することで 14 μL の loading サンプル(50%溶出画分, 43% Tris BES sample buffer, 30 mM DTT, 2.5% β-mercaptoethanol)を調製した後に、loading サンプルを 95°C で 10 分間処理した。電気泳動層は外層に 300 mL の running buffer (30 mM Tris base, 30 mM BES および 0.10% SDS)、内層に 200 mL の antioxidant mixture (0.050% Sodium thiosulfata pentahydrate, 0.025% N, N-Dimethyl formamide, Up to 200 mL with running buffer)を満たし、12% SDS-PAGE mini ゲルをセットした。その後、各 well に 10 μL の loading サンプルと 10 μL の loading marker (50% marker, 43% Tris BES sample buffer, 30 mM DTT, 2.5% β-mercaptoethanol)をアプライし、40 mA かつ 165 V の条件で電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルが完全に浸る 20 mL の CBB 染色液にゲルを入れ、シーソーシェーカーを用いて 30 r. p. m. で振盪しながら 60 分間染色した。染色後、CBB 染色液を取り除き、50 mL の MilliQ を入れ、シーソーシェーカーを用いて 30 r. p. m. で振盪しながら 60 分間洗浄した。その後、蛋白質発現の解析を行った。また、各溶出画分を DC protein assay kit を用いたスタンダードアッセイ法により染色し、microplate reader (λ=750 nm)を用いて蛋白質濃度を測定した。

3-3. CXXC-Fluc の特性検討

プレートに固定化するためのビオチン修飾された methylated double-stranded DNA (dsDNA) (25 bp, methylated CpG 1 カ所)を調製するために、1×PBS 内で 2 種類の 2.8 μM メチル化 single-stranded DNA (ssDNA) (Table. 2-4 の Methylated DNA_Top と Methylated DNA_Bottom)を混合し、95°C で 5 分間、30 分間かけて温度を 95°C から 25°C に下げる条件で methylated dsDNA (25 bp, CpG 1 ヶ所)を調製した。また非メチル化 ssDNA(Table. 2-4 の Unmethylated DNA_Top と Unmethylated DNA_Bottom)を用いてビオチン修飾された unmethylated dsDNA (25 bp, CpG 1 ヶ所)を同様の条件で調製した。

調製した dsDNA に 1×PBS (0.50% Tween 20)を混合し、固定化 dsDNA 溶液(2.5 μM ビオチン修飾された methylated dsDNA, 1×PBS および 0.050% Tween 20)を調製した。この固定化 dsDNA 溶液をストレプトアビジン修飾 96 well クリアプレート (25 pmol Streptavidin /well)に 100 μL/well ずつ入れ、シーソーシェーカーを用いて 30 r. p. m.で振盪しながら 30 分間固定化した。続いて 200 μL/well の洗浄 buffer (1×PBS, 0.050% Tween 20 および 250 mM NaCl)で 5 回洗浄した後、100 μL/well の biotin 水溶液(5.0 μM biotin と 1×PBS)を入れ、シーソーシェーカーを用いて 30 r. p. m.で振盪しながら 30 分間ブロッキングし、200 μL/well の洗浄 buffer (1×PBS, 0.050% Tween 20 および 250 mM NaCl)で 5 回洗浄した。その後、100 μL/well の蛋白質溶液(45 nM CXXC-Fluc と 1×PBS)を入れ、シーソーシェーカーを用いて 30 r. p. m.で振盪しながら 30 分間反応させた。最後に、200 μL/well の洗浄 buffer (1×PBS, 0.050% Tween 20 および 250 mM NaCl)で 5 回洗浄した後に、100 μL/well の PicaGene を添加し、Spark 10M を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で luciferase 活性を測定した。また、コントロールとしてビオチン修飾された unmethylated dsDNA (25 bp, CpG 1 ヶ所)を同様に調製し、plate assay を行った。

3-4. CXXC-Fluc を用いた BRET assay によるヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 量測定

3-4-1. 低メチル化したヒトゲノム DNA の調製

低メチル化した HeLa ゲノム DNA を調製するために、メチル化阻害剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine が終濃度 0, 0.10, 1.0 または 10 μM を含む培養液(DMEM, 10%FBS および 1×PSG)を使用して HeLa 細胞(4.0×10⁵ cell/dish)を 100 mm dish 内で 5% CO₂かつ 37°C の条件下で培養した。培養 24 時間後に培地を取り除き、新しい 10 mL DMEM 培地に交換してから 3 日間培養した。培養後、TrypLE™ select を用いて細胞を剥がし、1000×g の条件で 5 分間遠心分離することで HeLa 細胞を回収した。回収した HeLa 細胞からゲノム DNA を DNeasy Blood and Tissue Kit を用いて精製した。

5-Aza-2'-deoxycytidine で処理した HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルを評価するために、EpiTect Bisulfite Kit を用いて HeLa ゲノム DNA をバイサルファイト処理し、精製した。バイサルファイト処理した HeLa ゲノム DNA を標的にして、ヒトゲノム DNA のメチル化レベルと相関する LINE1 領域を PCR で増幅した。LINE1 領域に対応する forward primer は LINE1 bisulfite forward primer (Table 4-4), reverse primer は LINE1 bisulfite reverse primer (Table 4-4)を使用した。PCR は 50 μL の PCR 溶液(1× Ex Tag Buffer, 25 mU/μL Ex Tag HS, 5.0 ng/μL バイサルファイト処理した HeLa ゲノム DNA, 0.20 mM dNTP Mixture, 0.30 μM each primer)を調製し、サイクルは 95°C で 5 分、[98°C で 10 秒、50°C で 30 秒、72°C で 1 分]×30 サイクルの条件で行った後、電気泳動解析を行った。その後、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて PCR 産物を精製した。精製した 800 ng の PCR 産物を 50 μL の 1×Cut smart buffer 内で 2 U Taq^oI により 65°C で 1 時間処理した後、15 %ポリアクリルアミドゲルを用いて各処理

サンプルの電気泳動解析を行い、バンドの濃淡を画像解析ソフトである imageJ (Wayne Rasband, Bethesda, MD, USA)で解析することにより 5-Aza-2'-deoxycytidine で処理した HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルを評価した。

3-4-2. ヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定

HeLa ゲノム DNA (終濃度 0, 7.2, 15, 30, 45, 60, 65 ng/μL; CpG サイトは 0, 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 0.90 μM)と BOBO-3 (終濃度 0, 0.40, 0.80, 1.6, 2.3, 3.5, 3.6 μM)を 1×PBS 中で混合し、室温で 30 分間反応させた後に、45 nM CXXC-Fluc と 250 mM NaCl を添加し、室温で 1 分間反応させた。この反応溶液に 50 μL の PicaGene を添加し、全量 100 μL にした後、Spark 10M を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で発光蛍光ペクトル(488~653 nm)を測定し、CXXC-Fluc の発光により励起される BOBO-3 の蛍光ペクトル(578~653 nm)を算出した。

3-4-3. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定

5-Aza-2'-deoxycytidine で処理した HeLa ゲノム DNA (終濃度 22 ng/μL)と 1.2 μM BOBO-3 を 1×PBS 中で混合し、室温で 30 分間反応させた後に、45 nM CXXC-Fluc と 250 mM NaCl を添加し、室温で 1 分間反応させた。この反応溶液に 50 μL の PicaGene を添加し、全量 100 μL にした後、Spark 10M を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で発光蛍光ペクトル(488~653 nm)を測定し、CXXC-Fluc の発光により励起される BOBO-3 の蛍光ペクトル(578~653 nm)を算出した。

3-5. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル定量

CXXC-Fluc を用いた BRET assay と同じ条件で MBD-Fluc を用いた BRET assay によりメチル化 CpG 量を測定した。低メチル化ゲノム DNA (終濃度 22 ng/μL)と 1.2 μM BOBO-3 を 1×PBS 中で混合し、室温で 30 分間反応させた後に、45 nM MBD-Fluc を添加し、室温で 1 分間反応させた。この反応溶液に 50 μL の PicaGene を添加し、全量 100 μL にした後、Spark 10M を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で発光蛍光ペクトル(488~653 nm)を測定し、MBD-Fluc の発光により励起される BOBO-3 の蛍光ペクトル(578~653 nm)を算出した。

下記の数式を利用して、CXXC-Fluc と MBD-Fluc を用いた各 BRET assay の BRET シグナルからゲノム DNA のメチル化レベルを定量した。下記の数式で算出されるゲノム DNA のメチル化レベルは、各 BRET シグナルを足し合わせた値を 100%として計算している。

$$\text{Genomic DNA methylation level (\%)} = \text{IMBD} \times 100 / (\text{IMBD} + \text{ICXXC})$$

(IMBD = BRET signal of BOBO-3 by MBD-Fluc, ICXXC = BRET signal of BOBO-3 by CXXC-Fluc)

4 節 実験結果及び考察

4-1.CXXC-Fluc 発現ベクターの構築

ヒト由来の MLL 内の 1147-1203 番目のアミノ酸(57 個のアミノ酸)に対応する CXXC ドメインをコードする合成 DNA を *Streptag* と制限酵素サイトを含む primer を使用した PCR により増幅した。pET30c-*Streptag-MBD-Fluc* の *Streptag-MBD* 領域に *Streptag-CXXC* をクローニングするために、増幅した PCR 産物(*Streptag-CXXC*)と pET30c-*Streptag-MBD-Fluc* を制限酵素処理した後、制限酵素処理した PCR 産物(*Streptag-CXXC*)と pET30c-*Firefly luciferase* をライゲーションした。

シーケンス解析により、ヒト由来の MLL 内の 1147-1203 番目のアミノ酸(57 個のアミノ酸)に対応する CXXC ドメインと *streptag* をコードする配列をクローニングしたベクター pET30c-*streptag-CXXC-Fluc* を構築できたことが示された。構築したベクターマップとクローニングした塩基配列およびアミノ酸配列を Fig. 4-1, 4-2 および 4-3 に示す。

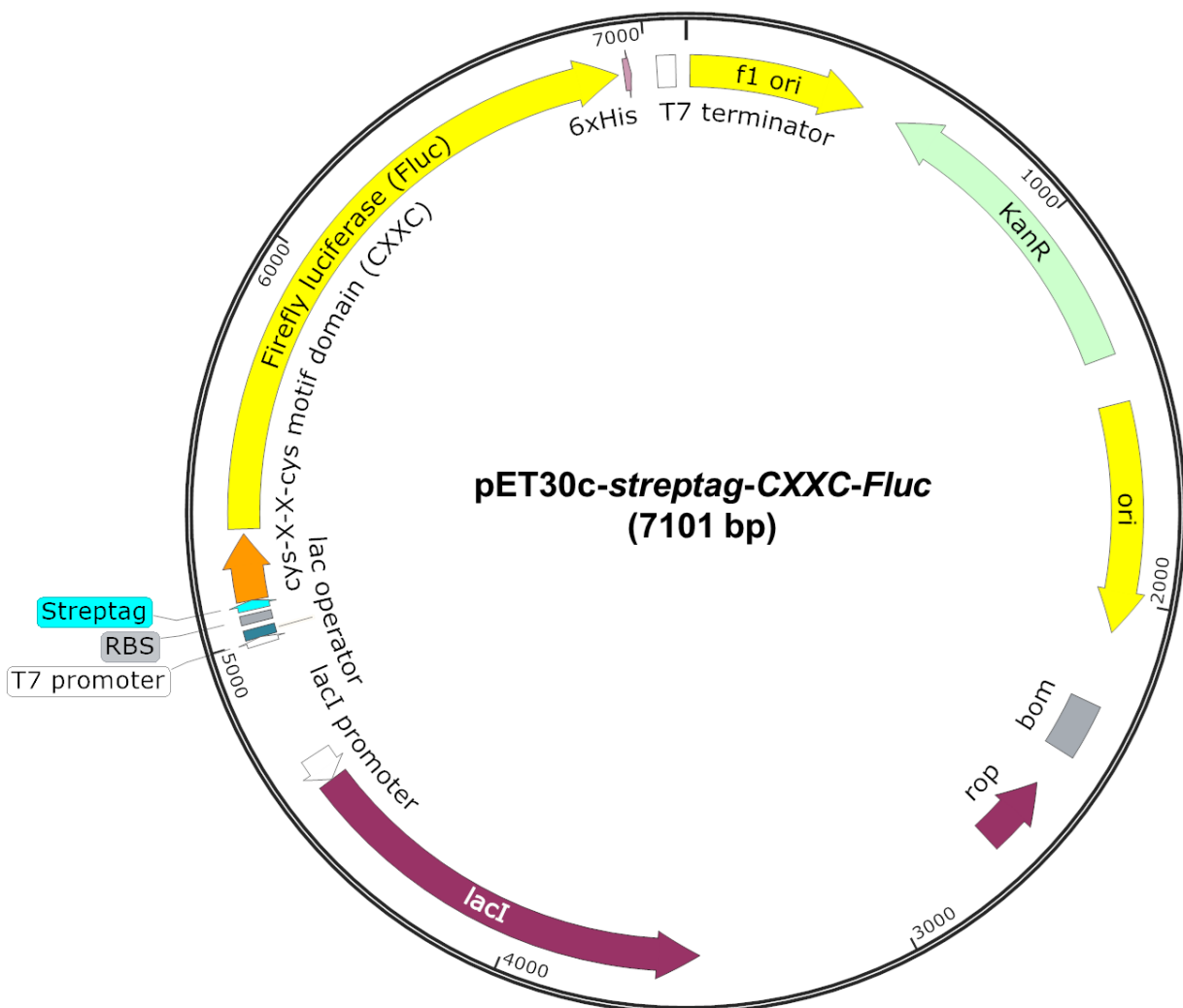


Figure 4-1 pET30c-streptag-CXXC-FLuc のベクターマップ

atgggagccatccgcagttgaaaagaagaaaggacgtcgatcgaggcgggtgggcagtgccccggctgccagggtgctgaggactg
tgggtttgtactaattgcttagataagcccaagtttgggtgcgaataaagaagcagtgctgcaagatgagaaaatgacagaatctaca
atggatgcctccaagaattcagaccaatggtttcatggagaacgatgaaaatattgtgatggctcgaaccattttacctattgaagag
ggatcgtgtagcacaattgcgcaagtataatggatcgacatgcaaaactggagcaattgctttactaacgcacttaccgggtgctgattata
cgtacgccgaatacttagaaaaatcatgctgtctaggagaggctttaaagaattatggtttggttgtgatggaagaattgcgttatgcagtg
aaactgtgaagagttcttattcctgtattagccggttattataggtgctgggtgctccaactaatgagattacactctacgtgaattgggtca
cagtttagcatctctaagccaacaattgtattagttctaaaaaaggattagataaagttataactgtacaaaaaacggtaactgctattaaa
accattgttatattggacagcaaaagtgattatagaggttatcaatccatggacaactttataaaaaaacactccacaaggttcaaaagga
tcaagtttaaaactgtaaaagtaaccgcaaaagaacaagttgctctataatgaactctcgggtcaaccggttgccaaaagggtgcaac
ttactcatgaaaatttggtcacgctttttctacgctagagatccaattatggaaaccaagttcaccaggcacggctatttactgtagtacc
attccatcatggttttggatgtttactacttttaggtatctaacttgggttctgattgtcattgacgaagagactttttaa
aacactgcaagattacaaatgtcaagcgttattctgtaccgacttgggtgcaattctaatagaaggaattactcgataaatatgattatcaaat
tgaattgaaattgcatctggcggagcaccttattctaaagaaattggtgaagctgtgctagacgtttatattaccgggtgctgcaaggctatgg
tttaacagaaaacaacctctgcaattattatcacaccggaaggcgatgataaaccaggtgcttctggcaagttgtccattattaaagcaaa
agttatcgatctgatactaaaaaacttgggcccgaacagacgtggagaagtttgtgtaaagggtcctatgcttatgaaaggtatgtagat
aatccagaagcaacaagagaaatcatagatgaagaaggttgggtgcacacaggagatattgggtattacgatgaagaaaaacatttctta
tcgtggatcgttgaagctttaatcaatacaaaaggatataagaccacgtgcaattagaatctgttctttgcaacatccaatattttgat
gccggcgtgctggcgtccagatcctatagctggtgagctccgggagctgtgtgtacttaagaaaggaaaaatctgactgaaaaagaa
gtaatggattacgtgctagtcagttcaaatgcaaaacgttgcgtgggtgctccgttttggacgaagtacctaaggtctcactggtaa
aattgacggtaaagcaattagaaaaactgaagaaaccagttgctaagtga

atg : 開始コドン

tga : 終止コドン

 : Streptag (24 bp)

 : CXXC (171 bp)

 : Fluc (1641 bp)

Figure 4-2 pET30c-streptag-CXXC-FLuc 内の streptag-CXXC-Fluc 塩基配列

MWSHPQFEKKKGRRSRRCGQCPGCQVPEDCGVCTNCLDKPKFGGRNIKKQCCKMRKCQNLQW
MPSKEFRPMVFMENDENIVYGPEPFYPIIEGSAGAQLRKYMDRHAKLGAI AFTNALTGV DYT YAEY
LEKSCCLGEALKNYGLVVDGRIALCSENCEEFFIPVLAGLFIGVGVAPTNEIYTLRELVHSLGISKPTIV
FSSKKGLDKVITVQKTVTAIKTIVILDSKVDYRGYQSMDFIKKNT PQGFKGSSFKTVK VNRKEQVALI
MNSSGSTGLPKGVQLTHENLVTRFSHARDPIYGNQVSPGTAILTVVPFHGFGMFTTLGYLTCGFRI
VMLTKFDEETFLKTLQDYKCSSVILVPTLFAILNRSELLDKYDLSNLVEIASGGAPLSKEIGEAVARRFN
LPGVRQGYGLTETTSIIITPEGDDKPGASGKVVPLFKAKVIDLDTKKTLPNRRGEVVCVKGPMMLMK
GYVDNPEATREIIDEEGWLHTGDIGYYDEEKHFFIVDR LKSLIKYKGYQVPPAELESVLLQHPNIFDA
GVAGVPDPIAGELPGA/VVLLKKGSMTEKEVMDYVASQV SNAKRLRGGVRFVDEV PKGLTGKIDG
KAIREILKKPVAK

 : Streptag (8 a.a.)

 : CXXC (57 a.a.)

 : Fluc (547 a.a.)

Figure 4-3 streptag-CXXC-Fluc のアミノ酸配列

4-2. CXXC-Fluc の組換え生産

Streptag-CXXC-Fluc 発現ベクターを用いて BL21 (DE3) を形質転換し、IPTG により streptag-CXXC-Fluc の発現誘導を行った。発現誘導 16 時間後に、精製用に付加した streptag を利用して streptag-CXXC-Fluc を水溶性画分から精製用カラムの strep-tactin[®] superflow plus (QIAGEN) を用いて精製した。

水溶性画分の調製に使用した菌体量は 3.3 g である。各精製画分における streptag-CXXC-Fluc の luciferase 活性を測定した結果、溶出画分全体の luciferase 活性は 8.0×10^{10} cps/mL を示し、2 番目の溶出画分の luciferase 活性は最も高い 4.0×10^{10} cps/mL を示した (Fig. 4-4)。この時、精製する前の水溶性画分の luciferase 活性は、 4.1×10^{11} cps/mL である。luciferase 活性の比率から、溶出画分全体で 20% の streptag-CXXC-Fluc を回収できたと考えられる。また SDS-PAGE の結果、溶出画分で目的の位置 (分子量: 6.8×10^4) にバンドが観察された (Fig. 4-5 [A])。この時の蛋白質濃度は、溶出画分全体 (10 mL) では 0.012 mg/mL、2 番目の溶出画分 (1 mL) では 0.040 mg/mL であった。一方で、 66×10^3 の下部と 56×10^3 の上部にバンドが確認されたが、これらのバンドは loading buffer のみをサンプルとして解析した場合でも同様の位置にバンドが確認されたことから、loading buffer に含まれる tris BES sample buffer, DTT または β -mercaptoethanol であると考えられる (Fig. 4-5 [B])。以上より、水溶性画分から溶出画分に 20% の streptag-CXXC-Fluc (0.12 mg) が精製できたことが示された。

溶出画分全体で 20% の streptag-CXXC-Fluc (0.12 mg) であることから、水溶性画分 (1.7 mL) および菌体 (3.3 g) には 0.60 mg の streptag-CXXC-Fluc が存在していると考えられる。一方で、strep-tactin[®] superflow plus (QIAGEN) の結合容量は 9.0 mg である。つまり、精製用カラムの結合容量に対して 93% 少ない量の streptag-CXXC-Fluc を流している。そのため、水溶性画分の調製に使用する菌体量を 5.0 g にすれば、水溶性画分に 9.0 mg の streptag-CXXC-Fluc が含まれることになり、溶出画分で streptag-CXXC-Fluc の収量を上げることができる。また、精製用に付加した streptag は N 末端と C 末端側の両方に付加することが可能である。そのため、CXXC-Fluc の両末端に streptag を付加すれば、溶出画分での精製効率を改善できると考えられる。

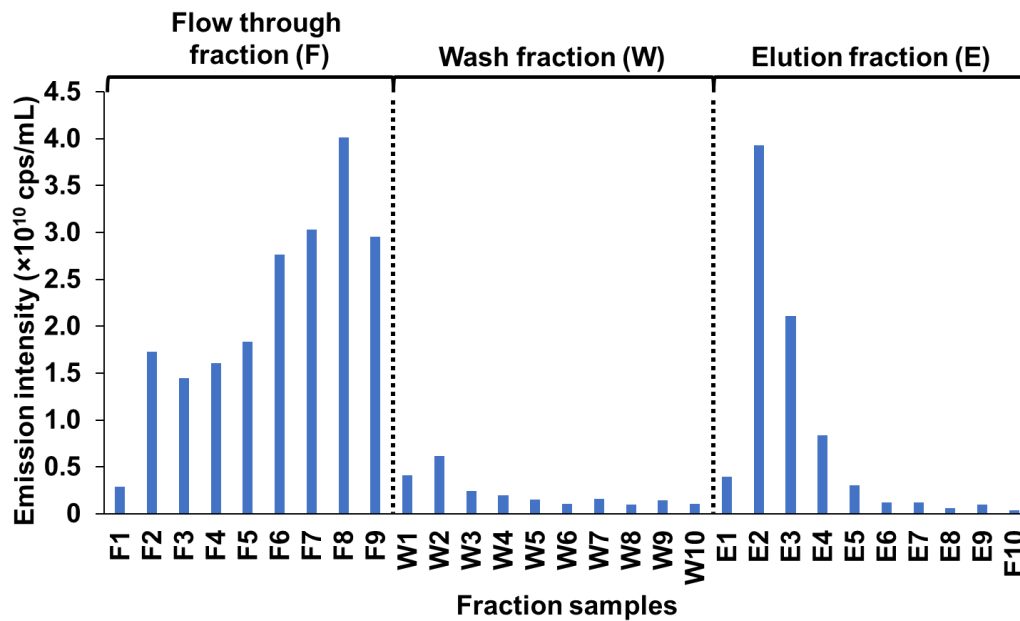


Figure 4-4 各精製画分の luciferase 活性

フロースルー画分(F1-10)、洗浄画分(W1-10)および溶出画分(E1-10)の luciferase 活性は、10 μ L の各サンプルと 90 μ L の PicaGene を用いて測定した。全ての段階で、各サンプル 1 mL を回収した。

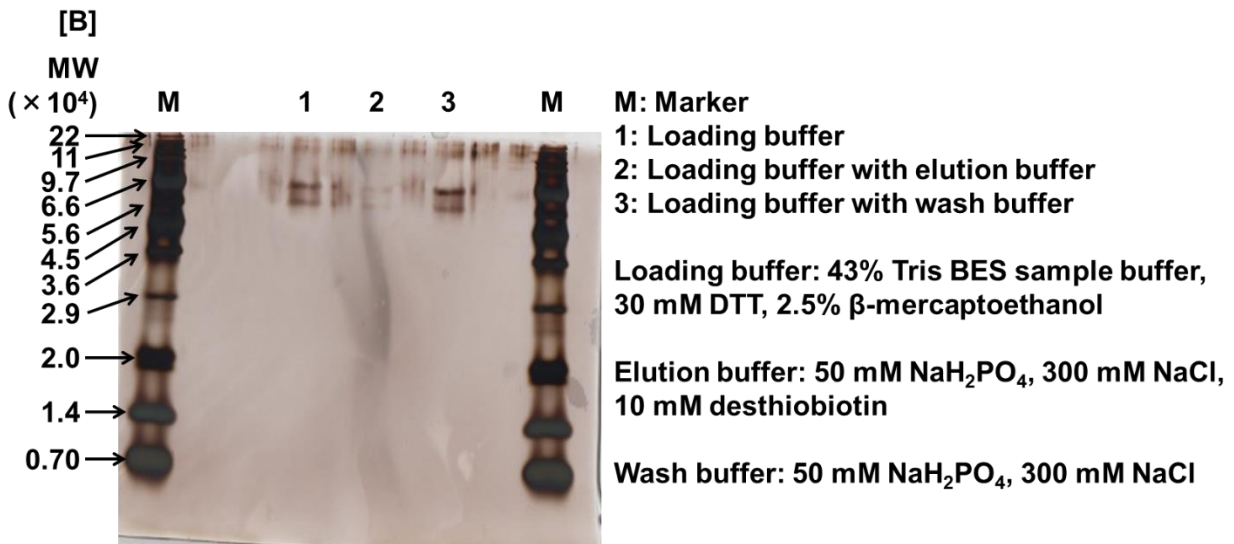


Figure 4-5 精製された streptag-CXXC-Fluc(分子量: 6.8×10^4)の SDS-PAGE 解析

[A]が蛋白質精製で得られた溶出画分を 12%SDS-PAGE に流し、銀染色で解析した。目的の streptag-CXXC-Fluc の分子量は 6.8×10^4 である。[B]が各 buffer を 12%SDS-PAGE に流し、銀染色で解析した。loading buffer 由来のバンドは 6.6×10^4 付近と 5.6×10^4 付近に観測される。

4-3. CXXC-Fluc の特性検討

非メチル化 CpG に対する CXXC-Fluc の結合能を plate assay により解析した。Streptag と streptavidin の相互作用を利用してメチル化または非メチル化 CpG を含む dsDNA をプレート上に固定化し、CXXC-Fluc を添加した。洗浄した後、luciferase 活性を測定するために、Fluc の基質として PicaGene を加えた。

標的の dsDNA (20 bp) は、1 カ所の CpG サイトを含んでいる。ここでは、1 カ所の CpG サイトがメチル化されていないサンプルを非メチル化 dsDNA (Table 4-4 の Unmethylated DNA_Top と Unmethylated DNA_Bottom をハイブリダイゼーションさせたサンプル) とし、メチル化されているサンプルをメチル化 dsDNA (Table 4-4 の Methylated DNA_Top と Methylated DNA_Bottom をハイブリダイゼーションさせたサンプル) とした。また、使用した plate は 1 well あたり最大 1.0 μ M の dsDNA を固定化することができる。そのため、非メチル化 dsDNA を plate に固定化した場合、1 well あたり非メチル化 CpG サイトが 1.0 μ M 存在することになる。このとき、MLL 由来の CXXC は非メチル化 CpG に対する結合解離定数が 33 nM、メチル化 CpG に対する結合解離定数が 7.0 μ M であるため、結合解離曲線から非メチル化 dsDNA 内の非メチル化 CpG サイトに対する CXXC の結合親和性を推測することができる。

推測された結合親和性の値は、非メチル化 CpG サイトに対して 97% である (Fig. 4-6)。加えた CXXC-Fluc の濃度は 45 nM であるため、1 well あたりの非メチル化 dsDNA 内に対して 44 nM の CXXC-Fluc が結合していることが推測される。一方で、メチル化 dsDNA を plate に固定化した場合、1 well あたりメチル化 CpG サイトが 1.0 μ M 存在することになる。このとき、結合解離曲線によりメチル化 dsDNA 内のメチル化 CpG サイトに対する CXXC の結合親和性が推測され、その値はメチル化 CpG サイトに対して 13% である (Fig. 4-6)。つまり、1 well あたりのメチル化 dsDNA に対して 5.9 nM の CXXC-Fluc が結合していることが推測される。そのため、メチル化 dsDNA を固定化した場合と比較して、非メチル化 dsDNA を固定化した場合では、CXXC の結合親和性は 7.5 倍高い値を示すことが推測される。実際に測定された luciferase 活性の値は、メチル化 dsDNA を固定化した場合と比較して、非メチル化 dsDNA を固定した場合は、luciferase 活性は 1.6 倍高い値を観測した (Fig. 4-7)。

以上の結果より、精製した CXXC-Fluc は非メチル化 CpG サイトを特異的に認識する能力と luciferase 活性能の両方を保持している事が示された。一方で、plate assay から得られた luciferase 活性の値が CXXC の結合解離曲線から推測された値よりも低い値を示した原因として、well 内で CXXC-Fluc が非特異的な吸着が起きていることが考えられる。実際に、標的 dsDNA を固定化していない場合でも、luciferase 活性がメチル化 dsDNA を固定化した場合と比較して差を示さなかった。つまり、well 内で CXXC-Fluc が非特異的な吸着が起きていることが考えられる。Well に対する CXXC-Fluc の非特異的吸着を減らすためには、洗浄操作の回数を改善することによって解決すると考えられる。

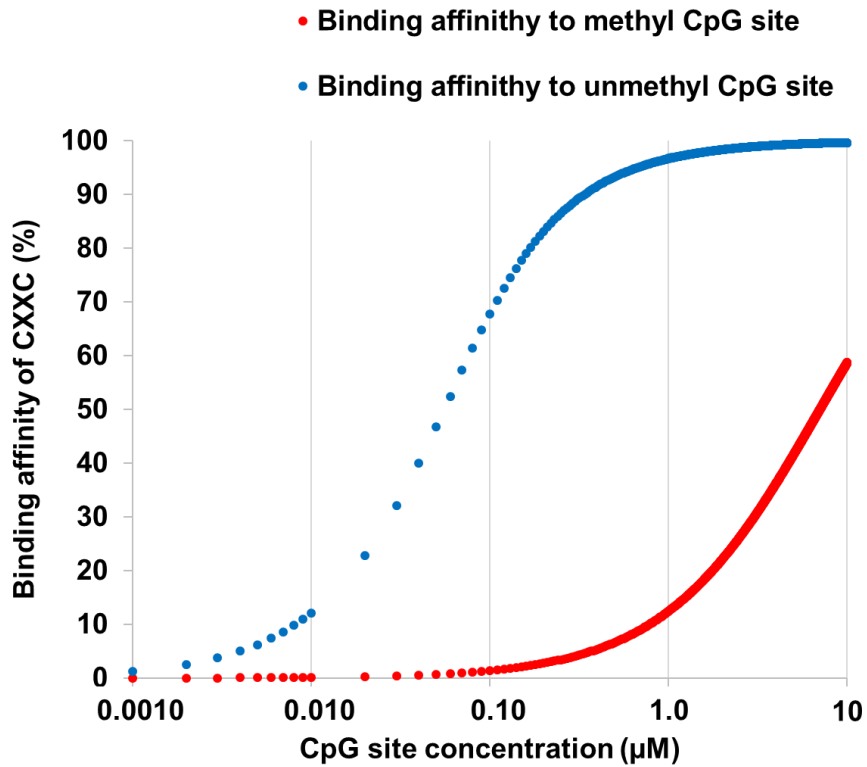


Figure 4-6 CpG サイトに対する MLL 由来の CXXC の結合解離曲線

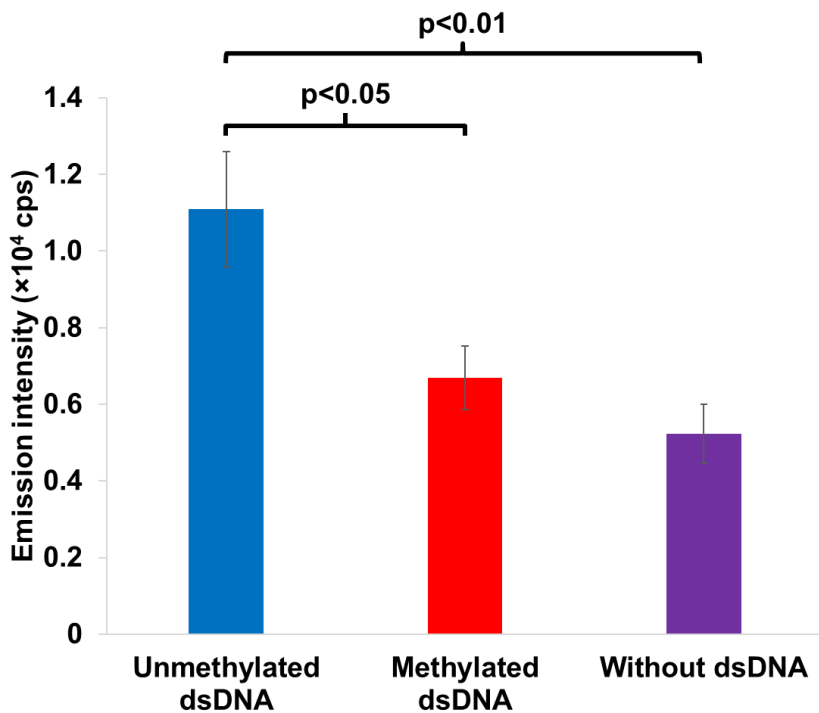


Figure 4-7 plate assay の結果

Streptag と streptavidin の相互作用を利用してメチル化または非メチル化 CpG を含む dsDNA (1.0 μM) をプレート上に固定化し、45 nM CXXC-Fluc を添加した。洗浄した後、luciferase 活性を測定するために、Fluc の基質の PicaGene を 100 μL を添加した。青色バーが非メチル化 CpG を含む dsDNA を固定化した場合、赤色バーがメチル化 CpG を含む dsDNA を固定化した場合、紫色バーが dsDNA を固定化していない場合の luciferase 活性測定の結果を示す。(mean ± SD, N = 3)。

4-4. CXXC-Fluc を用いた BRET assay によるヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 量測定

4-4-1. 低メチル化したヒトゲノム DNA の調製

メチル化阻害剤の 5-Aza-2'-deoxycytidine により HeLa 細胞を処理した後、HeLa ゲノム DNA を精製した。この HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルを COBRA により評価した。

HeLa ゲノム DNA をバイサルファイト変換し、PCR によりゲノム DNA のメチル化レベルと相関する反復配列で LINE1 領域を増幅させた。増幅させた領域は、LINE1 領域内の 160 bp である。その後、*taq*^α I により PCR 産物を処理し、電気泳動法にてメチル化レベルを評価した。

バンドの強度を *imagj* で解析した結果(Fig. 4-8)、0, 0.10, 1.0 および 10 μ M 5-Aza-2'-deoxycytidine で処理した HeLa 細胞から精製した HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルは $66\pm 3.6\%$, $54\pm 2.6\%$, $45\pm 2.7\%$ および $34\pm 2.8\%$ であった。つまり、HeLa ゲノム DNA のメチル化 CpG 量が低下していることが示された。

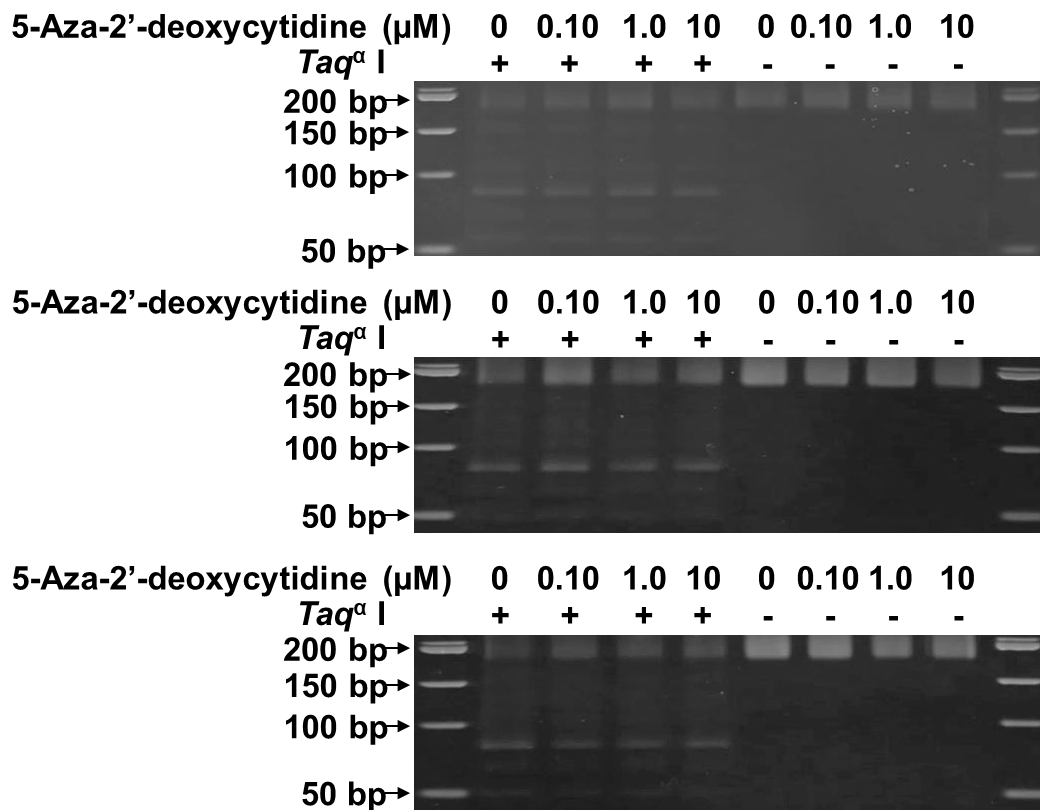


Figure 4-8 電気泳動によるメチル化感受性制限酵素処理の解析

調製した HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルを COBRA によって評価した。メチル化レベルを評価した領域は、ゲノム DNA のメチル化レベルと相関する LINE1 領域内の 160 bp である。LINE1 領域がメチル化されていない場合、*taq* ^{α} I では切断されない。一方でメチル化されている場合、*taq* ^{α} I により切断され、80 bp にバンドが観測される。観測されたバンドの強度から、LINE1 領域のメチル化レベルを算出した。プラス(+)は *taq* ^{α} I 処理したサンプルを示し、マイナス(-)は *taq* ^{α} I 処理していないサンプルを示す。

4-4-2. ヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定

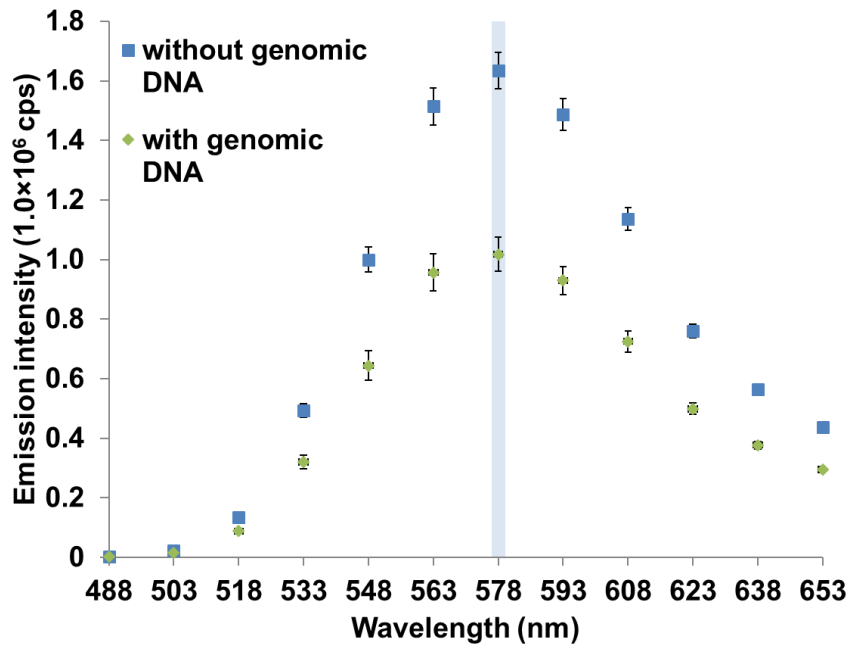
HeLa ゲノム DNA を標的分子として BRET assay による HeLa ゲノム DNA 量依存的な非メチル化 CpG 量を測定した。

HeLa ゲノム DNA 存在下または非存在下で CXXC-Fluc の発光スペクトル(488~653 nm)を測定した結果、CXXC-Fluc の発光スペクトルのピークは 578 nm 付近を示した(Fig. 4-9)。一方で、HeLa ゲノム DNA 非存在下と比較して存在下では、CXXC-Fluc の luciferase 活性は 62%に低下した(Fig. 4-9 [A])。この結果は、CXXC がゲノム DNA の非メチル化 CpG に結合することによって Fluc の構造変化が誘導され、その活性が低下する可能性があることを示した。一方、Fluc の最大発光波長である 578 nm の発光強度で各波長の発光強度を補正したスペクトル形状はゲノム DNA の添加による影響を受けていない(Fig. 4-9 [B])。つまり、CXXC-Fluc によって励起された BOBO-3 の 608 nm の発光/蛍光強度が補正されたスペクトルによって算出できることを示している。したがって、CXXC-Fluc によって励起された BOBO-3 の 608 nm の発光/蛍光強度を算出するためには、Fluc の最大発光波長である 578 nm の発光強度で各波長の発光/蛍光強度を補正する必要があることを示している。

異なるヒトゲノム DNA 濃度(終濃度 0, 7.2, 15, 30, 45, 60, 65 ng/μL; CpG サイトは 0, 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 0.90 μM)の存在下で、45 nM CXXC-FLuc と BOBO-3 (終濃度 0, 0.40, 0.80, 1.6, 2.3, 3.5, 3.6 μM)を加え、luciferase の発光により BOBO-3 が励起されるか検討した。BRET assay で測定した発光/蛍光スペクトルの raw データを Fig. 4-10 に示す。そこで、各波長における発光/光強度を 578 nm の発光/蛍光強度で補正し、補正された発光/蛍光スペクトルを算出した(Fig. 4-11)。さらに、ゲノム DNA 非存在時の発光強度からゲノム DNA 存在時の発光/発光強度の差から BOBO-3 の蛍光強度を算出される。つまり、CXXC-Fluc の発光によって励起された BOBO-3 の蛍光強度を算出した。算出された 608 nm における BOBO-3 の蛍光強度を BRET シグナルとした。その結果、HeLa ゲノム DNA 濃度依存的に BRET シグナルが低下した(Fig. 4-12)。

以上の結果より、CXXC-Fluc がゲノム DNA の非メチル化 CpG に結合し BOBO-3 に近接することで、CXXC-Fluc の発光により BOBO-3 が蛍光を発していることが示された。

[A]



[B]

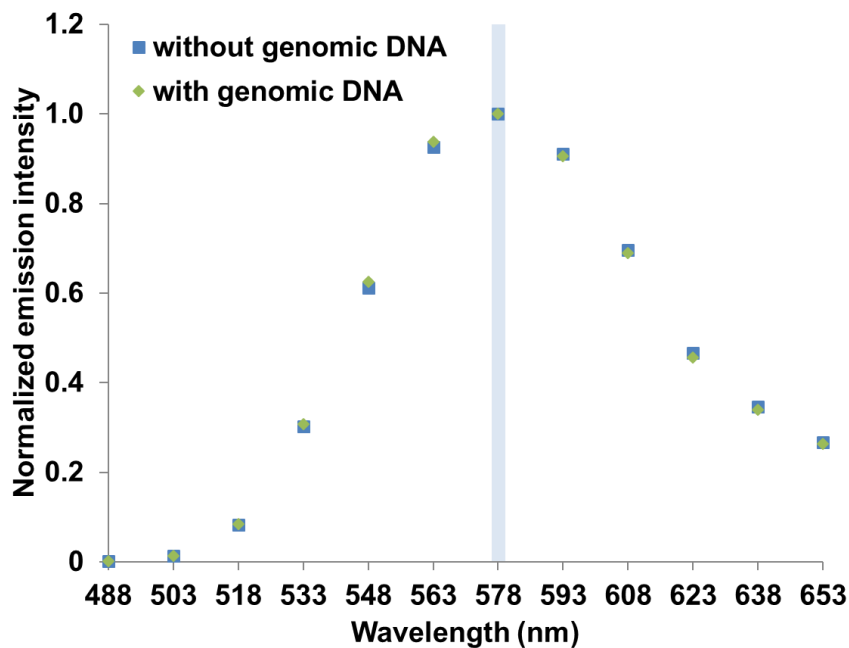


Figure 4-9 CXXC-Fluc の発光スペクトル

ゲノム DNA (65 ng/μL) 存在下または非存在下の条件で 45 nM CXXC-Fluc の発光スペクトルを全量 100 μL (1×PBS, 50 μL の PicaGene) 内で測定した (mean ± SD, N = 3)。[A] が raw データの発光スペクトルを示す。[B] が 578 nm の発光強度で補正された発光スペクトルを示す。青色のハイライトは 578 nm の波長を示す。

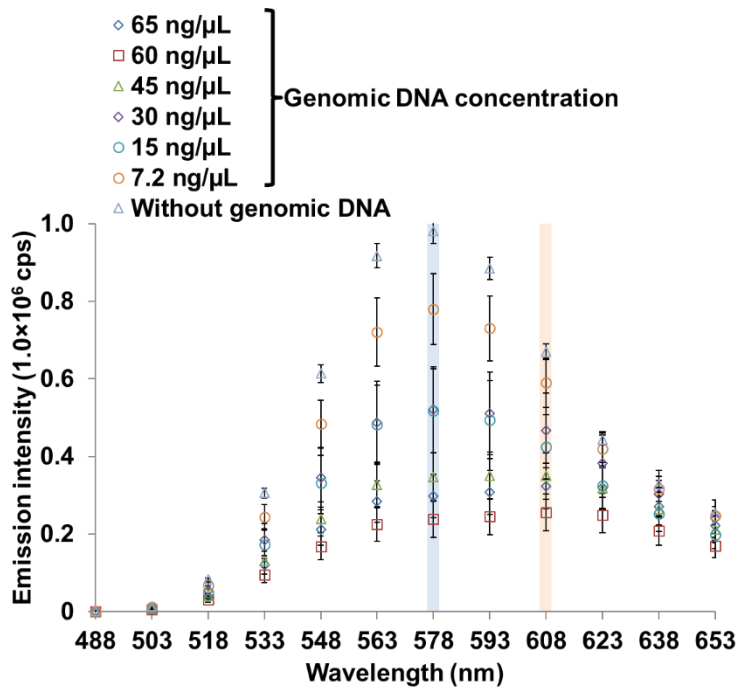


Figure 4-10 蛍光/発光スペクトル(raw データ)

異なる HeLa ゲノム DNA 濃度(0, 7.2, 15, 30, 45, 60, 65 ng/μL)の存在下で、45 nM CXXC-Fluc と BOBO-3 (0, 0.40, 0.80, 1.6, 2.3, 3.5, 3.6 μM)を混合し、Fluc の基質として PicaGene (50 μL)を加えることで、全量 100 μL で発光/蛍光スペクトルを測定した(mean ± SD, N = 3)。青色のハイライトは 578 nm の波長を表し、赤色のハイライトは 608 nm の波長を示す。

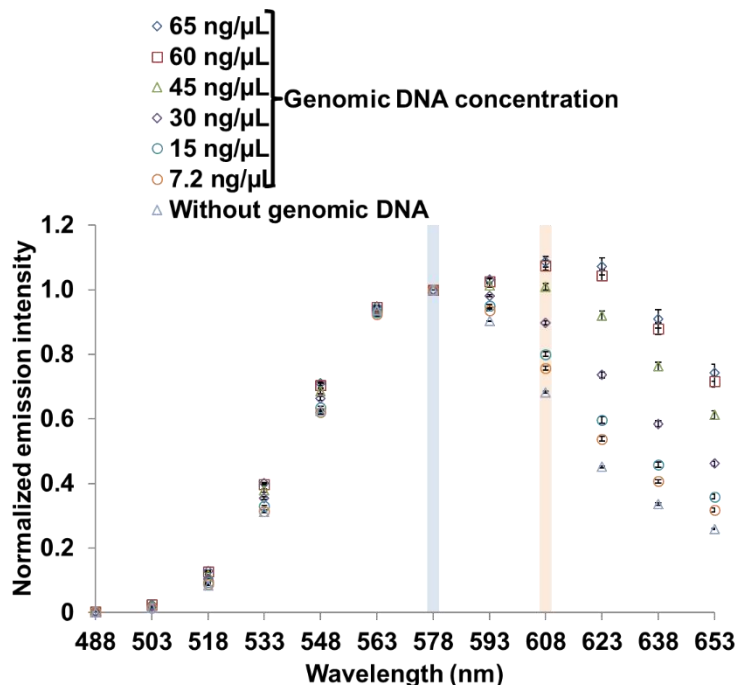


Figure 4-11 578 nm の発光蛍光強度で補正された発光蛍光スペクトル強度

Fig. 4-10 の raw データの発光/蛍光スペクトルを 578 nm の発光/蛍光強度で補正した。青色のハイライトは 578 nm の波長を表し、赤色のハイライトは 608 nm の波長を示す。

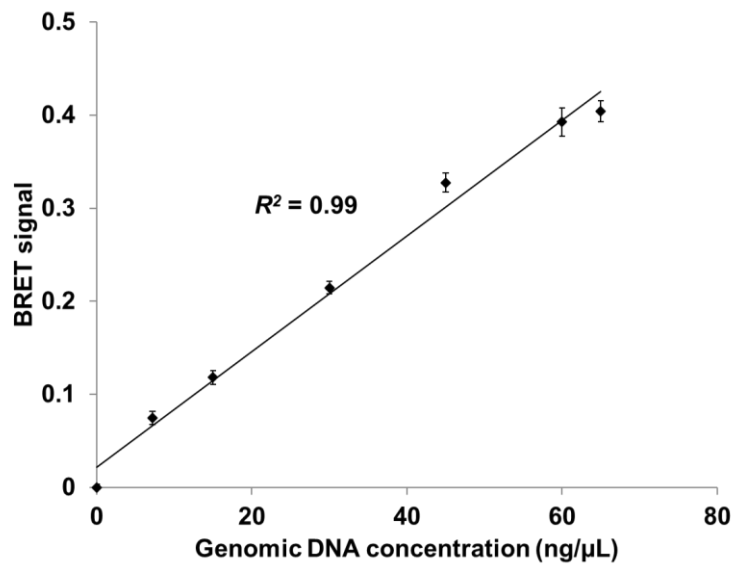


Figure 4-12 BOBO-3 の蛍光強度(BRET シグナル)

COBRA によって評価された HeLa ゲノムの濃度に対して BRET シグナルをプロットした。

4-4-3. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定

ヒトゲノム DNA の 32 億塩基対には CpG サイトが 2800 万ヶ所存在している。したがって、BRET assay で使用したヒトゲノム DNA の CpG サイトの濃度は 291 nM である。一方、COBRA により評価されたゲノム DNA のメチル化レベルは、 $66\pm 3.6\%$ 、 $54\pm 2.6\%$ 、 $45\pm 2.7\%$ および $34\pm 2.8\%$ であった。つまり、メチル化 CpG 濃度は、それぞれ 192, 157, 131 または 99 nM であり、非メチル化 CpG 濃度は、それぞれ 99, 134, 160 または 192 nM である。

CXXC-Fluc と BOBO-3 を用いた BRET assay により非メチル化 CpG 量を測定できるのか検討した。低メチル化したゲノム DNA (22 ng/ μ L) に、45 nM CXXC-Fluc と 1.2 μ M BOBO-3 を加え、Fluc の基質として PicaGene を加えることによって発光/蛍光スペクトルを測定した。測定した発光/蛍光スペクトルの raw データを Fig. 4-13 に示す。次に、各波長における発光/光強度を 578 nm の発光/蛍光強度で補正し、補正された発光/蛍光スペクトルを算出した (Fig. 4-14)。さらに、ゲノム DNA 非存在時の発光強度からゲノム DNA 存在時の発光/蛍光強度の差から BOBO-3 の蛍光強度を算出される。つまり、CXXC-Fluc の発光によって励起された BOBO-3 の蛍光強度を算出した。算出された 608 nm における BOBO-3 の蛍光強度を BRET シグナルとした。その結果、BRET シグナルがヒトゲノム DNA のメチル化レベル ($66\pm 3.6\%$ 、 $54\pm 2.6\%$ 、 $45\pm 2.7\%$ および $34\pm 2.8\%$) 依存的に低下した (Fig. 4-15)。

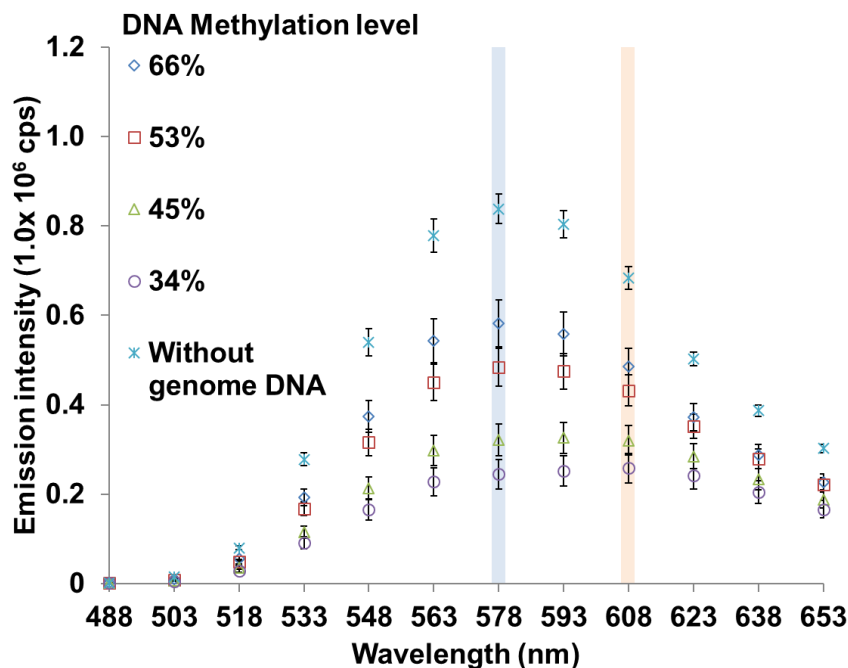


Figure 4-13 蛍光/発光スペクトル(raw データ)

メチル化レベルが $66\pm 3.6\%$ 、 $54\pm 2.6\%$ 、 $45\pm 2.7\%$ および $34\pm 2.8\%$ の HeLa ゲノム DNA (22 ng/ μ L) の存在下で、45 nM CXXC-Fluc と BOBO-3 (1.2 μ M) をを混合し、Fluc の基質として PicaGene (50 μ L) を加えることで、全量 100 μ L で発光/蛍光スペクトルを測定した (mean \pm SD, N = 3)。青色のハイライトは 578 nm の波長を表し、赤色のハイライトは 608 nm の波長を示す。

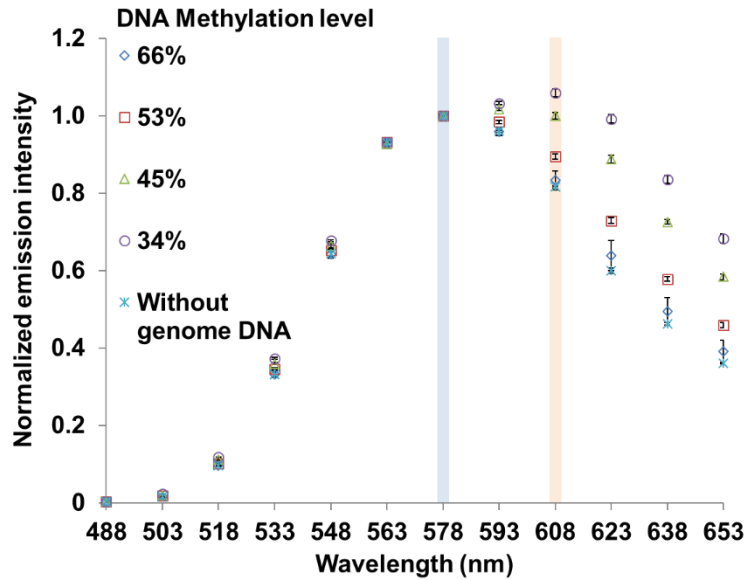


Figure 4-14 578 nm の発光蛍光強度で補正された発光蛍光スペクトル強度

Fig. 4-13 の raw データの発光/蛍光スペクトルを 578 nm の発光/蛍光強度で補正した(mean ± SD, N = 3)。青色のハイライトは 578 nm の波長を表し、赤色のハイライトは 608 nm の波長を示す。

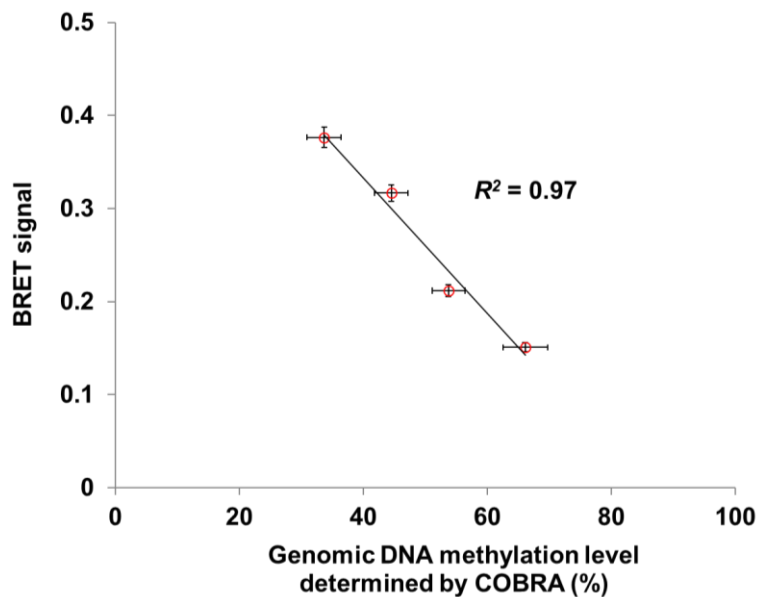


Figure 4-15 608 nm における BRET シグナル

COBRA によって評価された HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルに対して BRET シグナルをプロットした(mean ± SD, N = 3)。

4-5. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル定量

CXXC-Fluc と BOBO-3 を用いた BRET assay を利用すればゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を光学的に測定できることが示された。また、同様の条件で MBD-Fluc を用いた BRET assay を行った結果、HeLa ゲノム DNA のメチル化 CpG 量依存的に 608 nm における BRET シグナルが上昇した(Fig. 4-16, 4-17, 4-18)。さらに、CXXC-Fluc と MBD-Fluc の BRET シグナルは、負の相関関係を示した(Fig. 4-19)。つまり、MBD-Fluc を用いた BRET assay から得られた BRET シグナルは、メチル化 CpG 量を示し、CXXC-Fluc を用いた BRET assay から得られた BRET シグナルは、非メチル化 CpG 量を示している。

各 BRET シグナルを足し合わせた値はゲノム DNA 中の全 CpG 量となる。したがって、下記の方程式を使用すれば、CXXC-Fluc と MBD-Fluc を用いた各 BRET assay の 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と考えた。下記の方程式で算出されるゲノム DNA のメチル化レベルは、各 BRET シグナルを足し合わせた値を 100%として計算している。

$$\text{Genomic DNA methylation level (\%)} = \text{IMBD} \times 100 / (\text{IMBD} + \text{ICXXC})$$

(IMBD = BRET signal of BOBO-3 by MBD-Fluc, ICXXC = BRET signal of BOBO-3 by CXXC-Fluc)

COBRA によって評価されたゲノム DNA メチル化レベルと、MBD-Fluc および CXXC-Fluc を用いた各 BRET assay から得られた BRET シグナルの比率から算出されたゲノム DNA メチル化レベルとの間に、正の相関が示された(Table 4-5, Fig. 4-20)。

以上より、MBD-Fluc および CXXC-Fluc を用いた BRET assay によって、検量線を必要とせずに、ゲノム DNA のメチル化レベルを定量できることを示した。

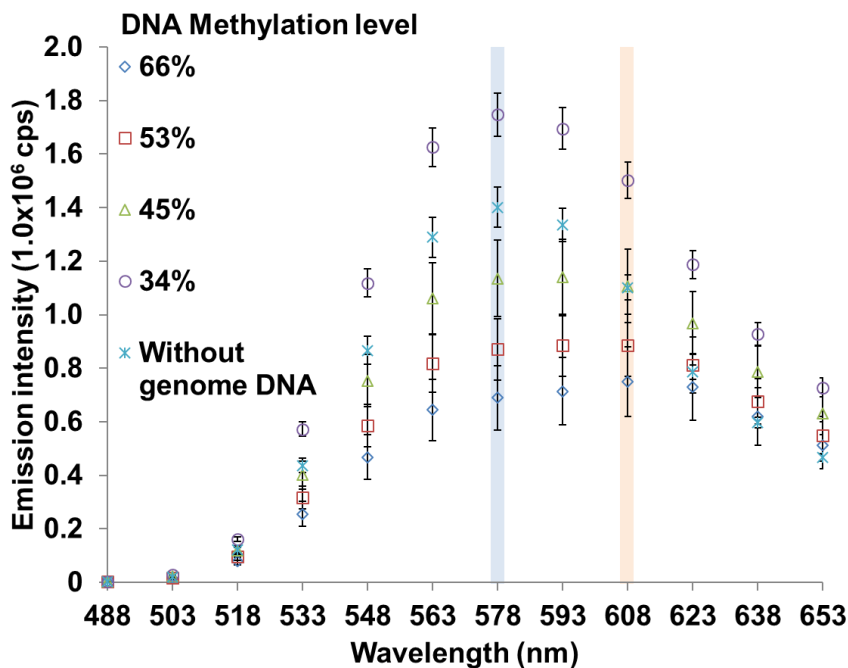


Figure 4-16 蛍光/発光スペクトル(raw データ)

メチル化レベルが $66 \pm 3.6\%$, $54 \pm 2.6\%$, $45 \pm 2.7\%$ および $34 \pm 2.8\%$ の HeLa ゲノム DNA ($22 \text{ ng}/\mu\text{L}$) の存在下で、 45 nM MBD-Fluc と BOBO-3 ($1.2 \text{ }\mu\text{M}$) を混合し、Fluc の基質として PicaGene ($50 \text{ }\mu\text{L}$) を加えることで、全量 $100 \text{ }\mu\text{L}$ で発光/蛍光スペクトルを測定した ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $N = 3$)。青色のハイライトは 578 nm の波長を表し、赤色のハイライトは 608 nm の波長を示す。

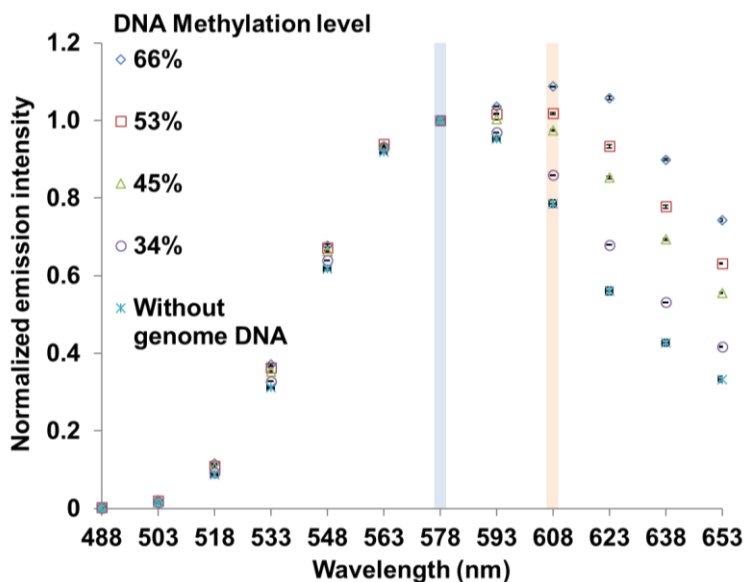


Figure 4-17 578 nm の発光蛍光強度で補正された発光蛍光スペクトル強度

Fig. 4-16 の raw データの発光/蛍光スペクトルを 578 nm の発光/蛍光強度で補正した ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $N = 3$)。青色のハイライトは 578 nm の波長を表し、赤色のハイライトは 608 nm の波長を示す。

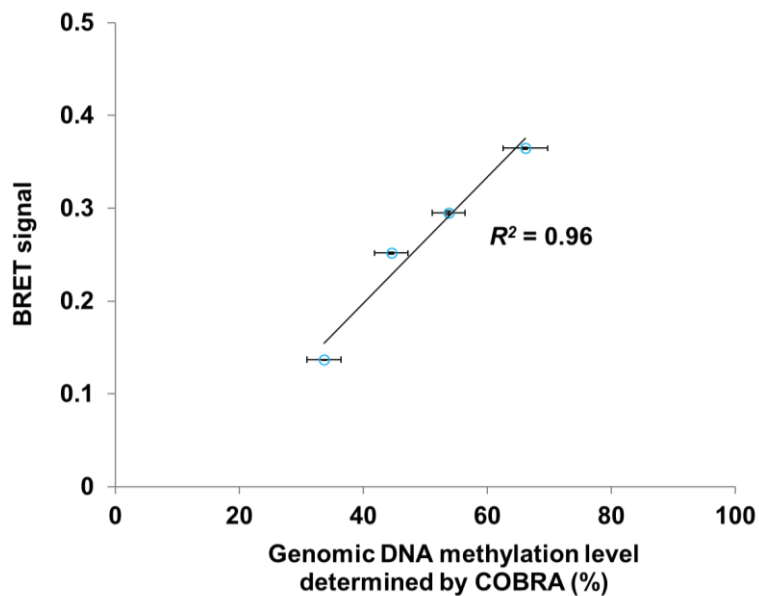


Figure 4-18 608 nm における BRET シグナル

COBRA によって評価された HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルに対して BRET シグナルをプロットした(mean \pm SD, $N = 3$)。

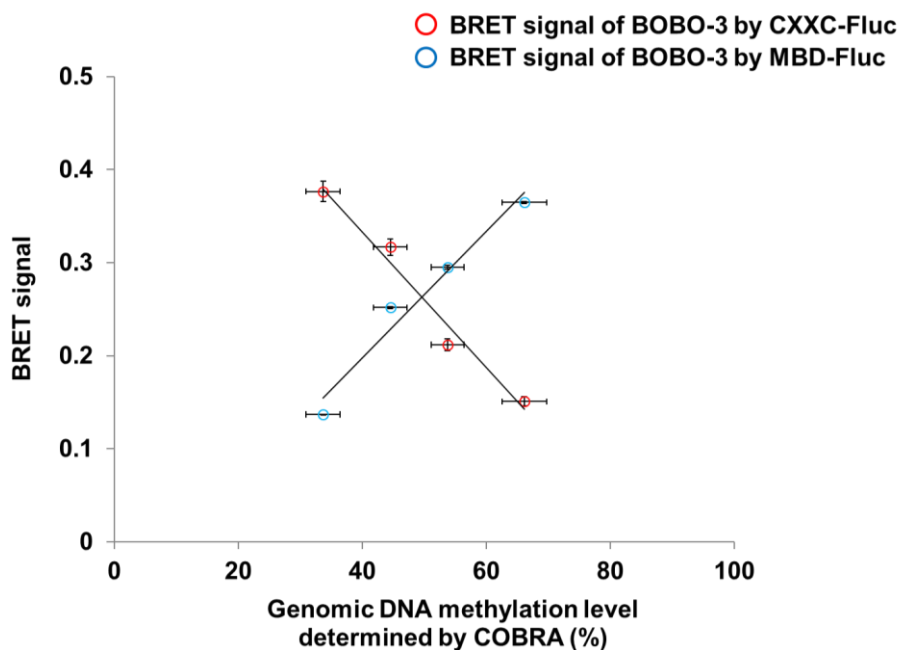


Figure 4-19 MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用いた各 BRET assay から得られた BRET シグナル
COBRA によって評価された HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルに対して MBD-Fluc と CXXC-Fluc
を用いた各 BRET assay から得られた BRET シグナルをプロットした(mean \pm SD, $N = 3$)。

Table 4-5 MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用いた各 BRET assay から得られた BRET シグナルの比率から算出されるゲノム DNA のメチル化レベル

Genomic DNA methylation level determined by COBRA (%)	66±3.6	54±2.6	45±2.7	34±2.8
ICXXC (BRET signal of BOBO-1 by CXXC-Fluc)	0.15±0.0050	0.21±0.0066	0.32±0.0086	0.38±0.011
IMBD (BRET signal of BOBO-3 by MBD-Fluc)	0.36±0.0012	0.30±0.0023	0.25±0.0013	0.14±0.00012
ICXXC+IMBD	0.52±0.0061	0.51±0.0087	0.57±0.0098	0.51±0.0011
Genomic DNA methylation level determined by BRET assay (%)	71±0.62	58±0.58	44±0.56	27±0.58

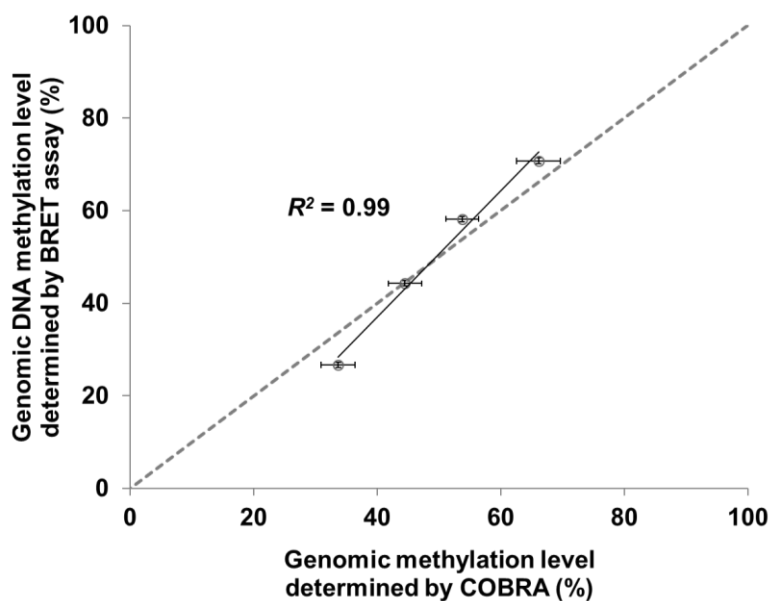


Figure 4-20 MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用いた BRET assay によるゲノム DNA のメチル化レベルの測定

COBRA によって評価されたゲノム DNA のメチル化レベルに対して MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用いた各 BRET assay から得られた BRET シグナルの比率から算出されるゲノム DNA のメチル化レベルをプロットした(mean ± SD, N = 3)。

5 節 結言

第4章の目的は、非メチル化 CpG に特異的に結合する CXXC ドメインに Fluc を融合させた CXXC-Fluc と DNA intercalating dye 間で生じる BRET を利用した非メチル化 CpG 量測定法を開発することである。第2章で MBD-Fluc を用いた BRET assay によりヒトゲノム DNA のメチル化 CpG 量を測定できることを示している。そのため、同様の方法で、CXXC-Fluc を用いれば非メチル化 CpG 量を測定できると考えた。さらに、MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用い各 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、簡便にゲノム DNA のメチル化レベルを定量できると想定した。

実際に、CXXC-Fluc 発現ベクターを構築し、大腸菌 BL21 (DE3)を用いて CXXC-Fluc を組換え生産した。組換え生産した CXXC-Fluc は非メチル化 CpG 結合能と luciferase 活性能の両方を保持していることを示した。ヒトゲノム DNA を標的にして CXXC-Fluc を用いた BRET assay を行った結果、ヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 濃度依存的に BRET シグナルが上昇した。つまり、CXXC-Fluc が非メチル化 CpG に結合し、BOBO-3 に近接することで、CXXC-Fluc の発光により BOBO-3 が蛍光を発していることが示された。さらに、低メチル化したヒトゲノム DNA を標的にして BRET assay を行った場合、非メチル化 CpG 量依存的に BRET シグナルが上昇した。

本章では、CXXC-Fluc と BOBO-3 を用いて、BRET シグナルを測定することにより検体に試薬を混ぜるだけでゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を測定できることが示された。また、MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用いた各 BRET assay の 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が示された。つまり、MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用いメチル化 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測定できることが示された。さらに、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 LC-MS は 2.0%以下、COBRA 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も示された。本 BRET assay は 35 分で測定できるため、MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用いれば、ゲノム DNA のメチル化レベルを迅速・簡便・正確に定量できることが示された。

第 5 章

マルチカラーアッセイを用いたゲノム DNA のメチル化レベル定量法の開発

第5章 マルチカラーアッセイを用いたゲノム DNA のメチル化レベル定量法の開発

1節 緒言

第4章で MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用いた各 BRET assay によってゲノム DNA のメチル化レベルを定量できる方法を開発した。MBD-Fluc と BOBO-3 間の BRET シグナルは、メチル化 CpG 量に依存し、CXXC-Fluc と BOBO-3 間の BRET シグナルは、非メチル化 CpG 量に依存する。したがって、ゲノム DNA メチル化レベルは、BRET assay を使用して定量できる。一方、同じ発光蛋白質 Fluc が MBD と CXXC の両方に融合させているため、これらの assay は別々に実行する必要がある。

そこで本章では、Fluc よりも波長が低い *Oplophorus luciferase* (Oluc) と Oluc で励起される DNA intercalating dye BOBO-1 (BOBO-1) に着目し、CXXC 融合 Oluc (CXXC-Oluc) と BOBO-1 を用いれば、ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を測定できると考えた。そのため、得られる CXXC-Oluc と BOBO-1 間の BRET シグナルは、MBD-Fluc と BOBO-3 間の BRET シグナルとは異なる波長領域で検出される。つまり、メチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量を異なる領域で測定することができる。

MBD-Fluc と CXXC-Oluc を同時に用いれば、BOBO-3 と BOBO-1 が励起され、得られる各蛍光強度の比率からゲノム DNA のメチル化レベルを定量できると考えた。そこで、第5章ではマルチカラーアッセイを用いたゲノム DNA のメチル化レベルを定量する方法を開発することを目的とした。

2節 使用した試薬・大腸菌、プレート、実験機器およびオリゴ DNA

2-1. 試薬・大腸菌

Table 5-1 使用した試薬・大腸菌

目的	品名	会社名
	Ultrapure™ distilled water	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	10×PBS (1.4 M Sodium chloride, 0.020 M Potassium, 0.080 M Sodium phosphate dibasic, 0.020 M Potassium phosphate monobasic)	Ambion, Austin, TX
PCR	KOD-plus-neo	Toyobo, Osaka, Japan
	Excelband 1.0 kb DNA ladder	SMObio, Hsinchu, Taiwan
	Excelband 0.20 kb DNA ladder	SMObio, Hsinchu, Taiwan
	10×Ex tag HS buffer	Takara, Tokyo, Japan
	Ex tag HS	Takara, Tokyo, Japan
電気泳動	Agar	Wako, Tokyo, Japan
	Orange G	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	EtBr Solution	Nippon Gene, Tokyo, Japan
制限酵素処理	<i>Not</i> I	NEB, Ipswich, MA, USA
	<i>Eco</i> R I	NEB, Ipswich, MA, USA
DNA 精製	Wizard® sv gel and PCR clean-up system	Promega, Madison, WI, USA
	DNeasy blood and tissue kit	Qiagen, Hilden, DE

	Wizard® plus sv minipreps DNA purification system	Promega, Madison, WI, USA
Ligation	Ligation high ver. 2	Toyobo, Osaka, Japan
Transformation	<i>E. coli</i> DH5α Competent Cells	Takara, Tokyo, Japan
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) competent cells	Biodynamics Laboratory Inc.
	グリセリン	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	IPTG	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	SOC medium	Takara, Tokyo, Japan
LB medium	Tryptone	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	Extract yeast dried	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	Kanamycin	Tokyo chemical industry, Tokyo, Japan
	Sodium chloride	Wako, Tokyo, Japan
	Bacto-agar	Wako, Tokyo, Japan
蛋白質精製	10×Bug Buster® protein extraction reagent	Novagen, Madison, WI, USA
	Sodium chloride	Wako, Tokyo, Japan
	Strept-tactin superflow plus (1.0 mL)	Qiagen, Hilden, DE
	Sodium dihydrogenphosphate dihydrate	Wako, Tokyo, Japan
	D-Desthiobiotin	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	HABA	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	(±) DTT	Wako, Tokyo, Japan
活性測定	PicaGene	Toyo b-net, Tokyo, Japan
	Coelenterazine h	Wako, Tokyo, Japan
	Methanol	Wako, Tokyo, Japan
SDS-PAGE	Acrylamide	Wako, Tokyo, Japan
	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Nacalai tesque, Kyoto, Japan
	Sodium dodecyl sulfate	Wako, Tokyo, Japan
	Ammonium peroxodisulfate	Yoneyama yakuhin kogyo, Osaka, Japan
	TEMED	Tokyo chemical industry, Tokyo, Japan
	BES	Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan
	2×Tris-BES sample buffer	Tefco, Tokyo, Japan
	β-mercaptoethanol	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	Sodium thiosulfate pentahydrate	Wako, Tokyo, Japan
	N, N-dimethyl formamide	Wako, Tokyo, Japan
Quick-CBB plus	Wako, Tokyo, Japan	

	Quick start™ braford 1.0xdye reagent	Bio rad, Hercules, CA, USA
	Alubmin, from bovine serum	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	銀染色 II キット	Wako, Tokyo, Japan
	Methanol	Wako, Tokyo, Japan
	Acetic acid	Wako, Tokyo, Japan
蛋白質濃度測定	DC protein assay kit	Bio rad, Hercules, CA, USA
Plate assay	MgCl ₂	Wako, Tokyo, Japan
	Tween® 20	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	Coelenterazine h	Wako, Tokyo, Japan
	(+) Biotin	Wako, Tokyo, Japan
COBRA	Epitect bisulfite kits	Qiagen, Hilden, DE
	Max tract	Qiagen, Hilden, DE
	Taq ^o I	Takara, Tokyo, Japan
	Chloroform-isoayl alcohol (24:1)	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	Phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol (25:24:1)	Wako, Tokyo, Japan
	3.0 M sodium acetate	Wako, Tokyo, Japan
	Ethachinmate	Wako, Tokyo, Japan
	Ethanol (99.5)	Wako, Tokyo, Japan
BRET assay	BOBO-3 (570/602)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	BOBO-1 (462/481)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	PicaGene	Toyo b-net, Tokyo, Japan
	Coelenterazine h	Wako, Tokyo, Japan
細胞培養	HeLa cell	Reken, Ibaraki, Japan
	5-Aza-2'-deoxycytidine	Tokyo chemical industry, Tokyo, Japan
	DMEM	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	FBS	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	Penicillin-streptomycin L-glutamine	Sigma aldrich, St. Louis, MO
	TrypLE™ select	Thermo fisher scientific, Tokyo, Japan

2-2. プレート

Table 5-2 使用したプレート

目的	品名	会社名
細胞培養	100 mm cell culture dish	Full-steri, Shiga, Japan
	100 mm cell culture dish-treated	Nippon genetics, Tokyo, Japan
蛋白質濃度測定	Clear plate	Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan
活性測定	White plate	Greiner bio-one, Kremsmünster, AU
Plate assay	Streptavidin coated white plate	Thermo fisher scientific, Tokyo, Japan

2-3. 実験機器

Table 5-3 使用した実験機器

機器名	品名	会社名
クリーンベンチ	CCV clean bench	Fujisawa, Osaka, Japan
卓上微量高速遠心機	Himac CT15RE	Hitachi, Tokyo, Japan
遠心分離機	Cubee	Recentteci, Tokyo, Japan
サーマルサイクラー	T100™ thermal cycler	Bio rad, Hercules, CA, USA
	PCR thermal cyclers dice touch	Takara, Tokyo, Japan
	TP350	
	Veriti thermal cyclers	Thermo fisher scientific, Tokyo, Japan
電気泳動槽	Mupid-2 plus	AND, Tokyo, Japan
スラブ電気泳動装置	BE-220	Bio craft, Tokyo, Japan
	電源装置	Bio craft, Tokyo, Japan
分光光度計	Biospectrometer basic	Eppendorf japan, Tokyo, Japan
電子天秤	分析用電子天秤 HR-202	AND, Tokyo, Japan
	電子上皿天秤 PL3002	Metter toledo, Columbus, OH, USA
	電子天秤 AW120	Shimazu, Kyoto, Japan
pH メーター	Seven easy S20	Metter toledo, Columbus, OH, USA
アルミブロック恒温槽	Eyela MG-1200	Tokyo rikakikai, Tokyo, Japan
	Vortex-genie®2	Scientific industries, Bohemia, NY, USA
トランスイルミネーター	LED illuminator LI-410	Bio craft, Tokyo, Japan
恒温器	Incubator IC601	Yamato scientific, Tokyo, Japan
	低温インキュベーター BNC-110	Espec corp, Osaka, Japan
	マイクロチューブローテーター	As one, Osaka, Japan
	MTR-103	

恒温器小型	クールインキュベータ Rotary shaker NX-20D	Mitsubish electric, Tokyo, Japan Nisshn rika, Tokyo, Japan
スターラー	Pasplina mini stirrer CT-1A	As one, Osaka, Japan
プレートリーダー	Spectra max iD5 Microplate reader model 680	Molecular devices, San Jose, CA, USA Bio rad, Hercules, CA, USA
チューブポンプ	Variable speed pump-low	Thermo fisher scientific, Tokyo, Japan
シェーカー	Seesaw shaker BC-700	Bio craft, Tokyo, Japan
フリーザー	超低温フリーザー(-80°C) 低温フリーザー (-20°C)	Panasonic, Osaka, Japan Sanyo, Osaka, Japan
レンジ	レンジ	Sanyo, Osaka, Japan

2-4. オリゴ DNA

Table 5-4 使用したプオリゴ DNA の配列

名前	配列 5'-3'
Forward primer for oplophorus luciferase	ATTGAATTCAGACCTATGGTATTCACCTTAGAGGATTTTCGTCGG
Reverse primer for oplophorus luciferase	CAAGCGGCCGCTTAGGCAAGGATACGCTCGCACAAACGC
Methylated DNA_Top	Biotin-AAAAACAGGATXGAGCAGCTACCCT (X= methylated cytosine)
Methylated DNA_Bottom	AGGGTAGCTGCTXGATCCTG (X= methylated cytosine)
Unmethylated DNA_Top	Biotin-AAAAACAGGATCGAGCAGCTACCCT
Unmethylated DNA_Bottom	AGGGTAGCTGCTCGATCCTG
LINE1 bisulfite forward primer	GYGTAAGGGGTTAGGGAGTTTTT (Y= T or C)
LINE1 bisulfite reverse primer	AACRTAAAACCCTCCRAACCAAATATAAA (R= A or G)

3節 実験方法

3-1. CXXC-Oluc 発現ベクターの構築

大腸菌用にコドンが最適化された *Oplophorus luciferase* (Oluc)をコードする配列を integrated DNA Technologies 社に合成委託した。そのオリゴ DNA を PCR により Oluc を増幅させた。PCR は 50 μ L の反応溶液[1 \times buffer for KOD-plus, 0.20 mM dNTPs, 1.0 mM MgCl₂, 0.30 μ M each primer, 0.20 ng/ μ L のオリゴ DNA および 50 mU/ μ L KOD-Plus (DNA polymerase)]を調製し、サイクルは 94°C で 2 分、[98°C で 10 秒、59°C で 30 秒、68°C で 30 秒] \times 25 サイクルの条件で行った後、電気泳動解析を行った。また、forward primer は N 末端に *EcoR* I サイトが付加されている primer を使用し、reverse primer は C 末端に *Not* I サイトが付加されている primer を使用した(Table 5-4 の Forward primer for oplophorus luciferase と Reverse primer for oplophorus luciferase)。増幅した 1.0 μ g の PCR 産物を 50 μ L の 1 \times NEBuffer 内で 10 U *Nde* I と 10U *EcoR* I により 37°C で 1 時間処理した後、PureYield™ Miniprep and SV Gel & PCR Clean-up により精製した。また、ベクターとなる pET30c-*Streptag*-CXXC を得るために、2.0 μ g の pET30c-*Streptag*-CXXC-*Firefly luciferase* を 50 μ L の 1 \times NEBuffer 内で 20 U *EcoR* I と 20 U *Not* I により 37°C で 2 時間処理した後、電気泳動解析から観測される目的バンド位置(pET30c-*Streptag*-CXXC)を切り出し、PureYield™ Miniprep and SV Gel & PCR Clean-up により精製した。

pET30c-*Streptag*-CXXC が 50 μ g に対してモル比が 3 倍の Oluc となるように混合液を調製し、調製した混合液に対して半分量の Ligation High Ver.2 を添加することで反応液を調製した後、16°C で 30 分間処理した。このライゲーション産物 10 μ L を用いて、20 μ L の DH5 α を形質転換した(インキュベーターの条件：静置の状態 で 4°C で 30 分間、42°C で 42 秒間、4°C で 2 分間)。

形質転換された DH5 α を LB_Kanamycin プレート培地(pH 7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5.0 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl, 15 g/L Bacto-agar および 20 ug/mL Kanamycin)に播種し、静置の状態 で 37°C で 16 時間培養した。得られたコロニーを 6.0 mL の LB_Kanamycin 液体培地(pH 7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5.0 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl および 20 ug/mL Kanamycin)に添加し、180 r. p. m. で振盪しながら 37°C で 16 時間培養した。培養したサンプルからプラスミド DNA を Pure Yield™ Plasmid Midiprep System を用いて精製した。精製したプラスミド DNA が目的の配列(pET30c-*streptag*-CXXC-Oluc)であることを確認するために、精製したプラスミド DNA 配列の解析をマクロジェン社(Tokyo, Japan)に外注した。

3-2. CXXC-Oluc の組換え生産

構築した 1.0 ng の pET30c-*streptag*-CXXC-Oluc を用いて、*E. coli* BL21 (DE3)を形質転換した(インキュベーターの条件：静置の状態 で 4°C で 30 分間、42°C で 42 秒間、4°C で 2 分間)。

形質転換した *E. coli* BL21 (DE3)を 6 mL の LB_Kanamycin 液体培地(pH 7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5.0 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl および 20 ug/mL Kanamycin)に添加し、180 r. p. m. で振盪しながら 37°C で 16 時間培養した。この培養したサンプルを 40%グリセロール(40 mL グリセリン、60 mL MilliQ、オートクレーブ済み)と混合し、-80°C で保存した。

保存したサンプルから爪楊枝で適量を取り、1.5 mL の LB_Kanamycin 液体培地(pH 7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5.0 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl および 20 ug/mL Kanamycin)に添加し、180 r. p. m. で振盪しながら 37°C で 16 時間培養した。培養したサンプル全量と 14 mL の LB_Kanamycin 液体培地(pH

7.2, 10 g/L Bact tryptone, 5.0 g/L Bactro yeast extract, 10 g/L NaCl および 20 ug/mL Kanamycin)を乾熱滅菌したバツフル付きフラスコに添加し、OD₆₀₀ 値が 0.50~1.0 ユニットになるまで 180 r. p. m. で振盪しながら 37°C で培養した。0.50~1.0 ユニットの際に、IPTG を終濃度 1.2 mM になるように添加し、140 r. p. m. で振盪しながら 20°C で 16 時間培養した。培養した 150 mL のサンプルを 4 つに分け、0.85% NaCl により重さを統一し、2500×g かつ 4°C で 10 分間遠心し、上清を捨てた。この操作を、4 回行った後、集菌したサンプルを-80°C で保存した。

集菌したサンプル 1.0 mg あたり 5.0 mL の細胞溶解液(1×Bug Buster[®] protein extraction reagent, 1×PBS)で懸濁し、ローテーターを用いて 5.0 r. p. m. かつ室温で 5 分間遠心した後、遠心機を用いて 16000×g かつ 4°C で 20 分間遠心した。得られた上清を水溶性画分のサンプルとする。水溶性画分を全量 10 mL の 1×PBS となるように PBS を添加した後、0.45 μm フィルターでろ過した。このろ過したサンプルをフィルターでろ過した水溶性画分とする。ろ過した水溶性画分の全量を strep-tactin[®] superflow plus (QIAGEN)のカラムに流速 1.0 mL/min の条件で流し、1.0 mL のフロースルー画分を 10 サンプルずつ回収した。次に、10 mL の洗浄 buffer (pH 8.0, 50 mM NaH₂PO₄ および 0.30 M NaCl)を流速 1.0 mL/min の条件で流し、1.0 mL の洗浄画分を 10 サンプルずつ回収した。最後に、10 mL の溶出 buffer (pH 8.0, 50 mM NaH₂PO₄, 0.30 M NaCl および 10 mM Desthiobiotin) を流速 1.0 mL/min の条件で流し、1.0 mL の溶出画分を 10 サンプルずつ回収し、終濃度 5.0 mM になるように DTT を添加した。精製の間、各サンプルは氷中に保存しながら作業した。得られたサンプルは、水溶性画分、希釈した水溶性画分、フィルターでろ過した水溶性画分、フロースルー画分、洗浄画分および溶出画分を-80°C で保存した。luciferase 活性測定は、得られた各サンプル 5.0 μL に対して、95 μL 発光基質溶液(終濃度 5.0 μg/mL coelenterazine h solution と 1×PBS)を混合し、SpectraMax iD5 (Molecular devices, CA, USA)を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で luciferase 活性を測定した。また、測定の間、得られた各サンプルは氷中に保存している。

精製された溶出画分のサンプルを SDS-PAGE によって蛋白質の発現を確認するために、7.0 μL の各溶出画分に 7.0 μL の loading buffer (85% Tris BES sample buffer, 60 mM DTT, 5.0% β-mercaptoethanol) を混合することで 14 μL の loading サンプル(50%溶出画分, 43% Tris BES sample buffer, 30 mM DTT, 2.5% β-mercaptoethanol)を調製した後に、loading サンプルを 95°C で 10 分間処理した。電気泳動層は外層に 300 mL の running buffer (30 mM Tris base, 30 mM BES および 0.10% SDS)、内層に 200 mL の antioxidant mixture (0.050% Sodium thiosulfata pentahydrate, 0.025% N, N-Dimethyl formamide, Up to 200 mL with running buffer)を満たし、12% SDS-PAGE mini ゲルをセットした。その後、各 well に 10 μL の loading サンプルと 10 μL の loading marker (50% marker, 42.5% Tris BES sample buffer, 30 mM DTT, 2.5% β-mercaptoethanol)をアプライし、40 mA かつ 165 V の条件で電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを CBB 染色した。その後、蛋白質発現の解析を行った。また、各溶出画分を DC protein assay kit を用いたスタンダードアッセイ法により染色し、microplate reader (λ=750 nm)を用いて蛋白質濃度を測定した。

3-3. CXXC-Oluc の特性検討

プレートに固定化するためのビオチン修飾された methylated double-stranded DNA (dsDNA) (25 bp, methylated CpG 1 カ所)を調製するために、1×PBS 内で 2 種類の 2.8 μM メチル化 single-stranded DNA (ssDNA) (Table 2-4 の Methylated DNA_Top と Methylated DNA_Bottom)を混合し、95°C で 5 分間、30 分間かけて温度を 95°C から 25°C に下げる条件で methylated dsDNA (25 bp, CpG 1 ヶ所)を調製した。また非メチル化 ssDNA(Table. 2-4. Unmethylated DNA_Top と Unmethylated DNA_Bottom)を用いてビオチン修飾された unmethylated dsDNA (25 bp, CpG 1 ヶ所)を同様の条件で調製した。

調製した ds DNA に 1×PBS (0.50% Tween 20)を混合し、固定化 dsDNA 溶液(2.5 μM ビオチン修飾された methylated dsDNA, 1×PBS および 0.05% Tween 20)を調製した。この固定化 dsDNA 溶液をストレプトアビジン修飾 96 well クリアプレート (25 pmol Streptavidin /well)に 100 μL/well ずつ入れ、シーソーシェーカーを用いて 30 r. p. m.で振盪しながら 30 分間固定化した。続いて 200 μL/well の洗浄 buffer (1×PBS, 0.050% Tween 20 および 250 mM NaCl)で 5 回洗浄した後、100 μL/well の biotin 水溶液(5.0 μM biotin と 1×PBS)を入れ、シーソーシェーカーを用いて 30 r. p. m.で振盪しながら 30 分間ブロッキングし、200 μL/well の洗浄 buffer (1×PBS, 0.050% Tween 20 および 250 mM NaCl)で 5 回洗浄した。その後、100 μL/well の蛋白質溶液(溶出画分 2 を 100 μL)を入れ、シーソーシェーカーを用いて 30 r. p. m.で振盪しながら 30 分間反応させた。最後に、200 μL/well の洗浄 buffer (1×PBS, 0.05 % Tween 20 および 250 mM NaCl)で 5 回洗浄した後に、100 μL/well の発光基質溶液(終濃度 5.0 μg/mL coelenterazine h solution と 1×PBS)を添加し、SpectraMax iD5 を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で luciferase 活性を測定した。また、コントロールとしてビオチン修飾された unmethylated dsDNA (25 bp, CpG 1 ヶ所)を同様に調製し、plate assay を行った。

3-4. マルチカラーBRET assay によるヒトゲノム DNA のメチル化レベル定量

3-4-1. 低メチル化したヒトゲノム DNA の調製

低メチル化したゲノム DNA を調製するために、メチル化阻害剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine が終濃度 0, 0.10, 1.0 または 10 μM を含む培養液(DMEM, 10%FBS および 1×PSG)を使用して HeLa 細胞(4.0×10⁵ cell/dish)を 100 mm dish 内で 5% CO₂かつ 37°C の条件下で培養した。培養 24 時間後に培地を取り除き、新しい 10 mL DMEM 培地に交換してから 3 日間培養した。培養後、TRYPLE™ SELECT を用いて細胞を剥がし、1000×g の条件で 5 分間遠心分離することで HeLa 細胞を回収した。回収した HeLa 細胞からゲノム DNA を DNeasy Blood and Tissue Kit を用いて精製した。

5-Aza-2'-deoxycytidine で処理した HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルを評価するために、EpiTect Bisulfite Kit を用いて HeLa ゲノム DNA をバイサルファイト処理し、精製した。バイサルファイト処理した HeLa ゲノム DNA を標的にして、ヒトゲノム DNA のメチル化レベルと相関する LINE1 領域を PCR で増幅した。LINE1 領域に対応する forward primer は LINE1 bisulfite forward primer (Table 2-4), reverse primer は LINE1 bisulfite reverse primer (Table 2-4)を使用した。PCR は 50 μL の PCR 溶液(1×Ex Tag Buffer, 25 mU/μL Ex Tag HS, 5.0 ng/μL バイサルファイト処理した HeLa ゲノム DNA, 0.20 mM dNTP Mixture, 0.30 μM each primer)を調製し、サイクルは 95°C で 5 分、[98°C で 10 秒、50°C で 30 秒、72°C で 1 分]×30 サイクルの条件で行った後、電気泳動解析を行った。その後、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA)を用いて PCR 産物を精製した。

精製した 800 ng の PCR 産物を 50 μ L の 1 \times Cut smart buffer 内で 2 U Taq^o I により 65 $^{\circ}$ C で 1 時間処理した後、15 %ポリアクリルアミドゲルを用いて各処理サンプルの電気泳動解析を行い、バンドの濃淡を画像解析ソフトである imageJ (Wayne Rasband, Bethesda, MD, USA)で解析することにより 5-Aza-2'-deoxycytidine で処理した HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルを評価した。

3-4-2. ヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定

HeLa ゲノム DNA (終濃度 0, 15, 23, 30 および 38 ng/ μ L)と BOBO-3 (終濃度 0, 0.90, 1.3, 1.6 および 2.2 μ M)を 1 \times PBS 中で混合し、室温で 30 分間反応させた。この反応溶液の全量が 50 μ L になるように 45 nM CXXC-Oluc を添加し、室温で 1 分間反応させた。この全量 50 μ L の反応溶液に 50 μ L の基質溶液(終濃度 5 μ g/mL coelenterazine h solution と 1 \times PBS)を混合した溶液を添加し、5 分後に、SpectraMax iD5 を用いて積分時間 1 秒かつ 37 $^{\circ}$ C の条件で発光/蛍光ペクトル(400~650 nm)を測定し、CXXC-Oluc の発光により励起される BOBO-1 の蛍光ペクトルを算出した。

3-4-3. BOBO-1 と BOBO-3 の濃度検討

HeLa ゲノム DNA (終濃度 38 ng/ μ L)と BOBO-1 (終濃度 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.0, 1.2, 1.6 μ M) および BOBO-1 と同濃度の BOBO-3 を 1 \times PBS 中で混合し、室温で 30 分間反応させた。この反応溶液の全量が 50 μ L になるように 45 nM CXXC-Oluc, 45 nM MBD-Fluc および 250 mM NaCl を添加し、室温で 1 分間反応させた。この全量 50 μ L の反応溶液に 25 μ L 1 \times PBS と 25 μ L 基質溶液(終濃度 5.0 μ g/mL coelenterazine h solution in 1 \times PBS)を添加し、5 分後に、SpectraMax iD5 を用いて積分時間 1 秒かつ 37 $^{\circ}$ C の条件で発光/蛍光ペクトル(400~650 nm)を測定し、CXXC-Oluc の発光により励起される BOBO-1 の蛍光ペクトルを算出した。

3-4-4. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定

低メチル化した HeLa ゲノム DNA (終濃度 38 ng/ μ L), 0.80 μ M BOBO-1 および 0.80 μ M BOBO-3 を 1 \times PBS 中で混合し、室温で 30 分間反応させた。この反応溶液の全量が 50 μ L になるように 45 nM CXXC-Oluc, 45 nM MBD-Fluc および 250 mM NaCl を添加し、室温で 1 分間反応させた。この全量 50 μ L の反応溶液に 25 μ L 1 \times PBS と 25 μ L 基質溶液(終濃度 5.0 μ g/mL coelenterazine h solution と 1 \times PBS)を添加し、5 分後に、SpectraMax iD5 を用いて積分時間 1 秒かつ 37 $^{\circ}$ C の条件で発光/蛍光ペクトル(400~650 nm)を測定し、CXXC-Oluc の発光により励起される BOBO-1 の蛍光ペクトルを算出した。また、ヒトゲノム DNA のメチル化レベル依存的な非メチル化 CpG 量を測定するために、基質溶液を Fluc の基質である PicaGene に変更し、同様の実験を行った。

3-4-5. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル定量

CXXC-Oluc と MBD-Fluc を用いた BRET assay によりメチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量を同時に測定した。低メチル化した HeLa ゲノム DNA (終濃度 38 ng/ μ L), 0.80 μ M BOBO-1 および 0.80 μ M BOBO-3 を 1 \times PBS 中で混合し、室温で 30 分間反応させた。この反応溶液の全量が 50 μ L になるように 45 nM CXXC-Oluc, 45 nM MBD-Fluc および 250 mM NaCl を添加し、室温で 1 分間反応させた。この全量 50 μ L の反応溶液に 25 μ L 基質溶液(終濃度 5.0 μ g/mL coelenterazine h solution と 1 \times PBS)と 25 μ L

PicaGene を添加し、SpectraMax iD5 を用いて積分時間 1 秒かつ 37°C の条件で発光/蛍光ペクトル (400~650 nm)を測定し、CXXC-Oluc と MBD-Fluc の発光により励起される BOBO-1 と BOBO-3 の蛍光ペクトルを算出した。

下記の方程式を利用して、BRET シグナルからゲノム DNA のメチル化レベルを定量した。下記の方程式で算出されるゲノム DNA のメチル化レベルは、各 BRET シグナルを足し合わせた値を 100%として計算している。

$$\text{Genomic DNA methylation level (\%)} = \text{IMBD} \times 100 / (\text{IMBD} + \text{ICXXC})$$

(IMBD = BRET signal of BOBO-3 by MBD-Fluc, ICXXC = BRET signal of BOBO-1 by CXXC-Oluc)

4 節 実験結果及び考察

4-1. CXXC-Oluc 発現ベクターの構築

大腸菌用にコドンが最適化された *Oluc* をコードする配列を *Streptag* と制限酵素サイトを含む primer を使用した PCR により増幅した。pET30c-*Streptag*-CXXC-*Fluc* の *Fluc* 領域に *Oluc* をクローニングするために、増殖した PCR 産物(*Oluc*)と pET30c-*Streptag*-CXXC-*Fluc* を制限酵素処理した後、制限酵素処理した PCR 産物(*Oluc*)と pET30c-*Streptag*-CXXC をライゲーションした。シーケンス解析により、大腸菌用にコドンが最適化された *Oluc* をコードする配列をクローニングしたベクター pET30c-*streptag*-CXXC-*Oluc* を構築できたことが示された。構築したベクターマップとクローニングした塩基配列およびアミノ酸配列を Fig. 5-1, 5-2 および 5-3 に示す。

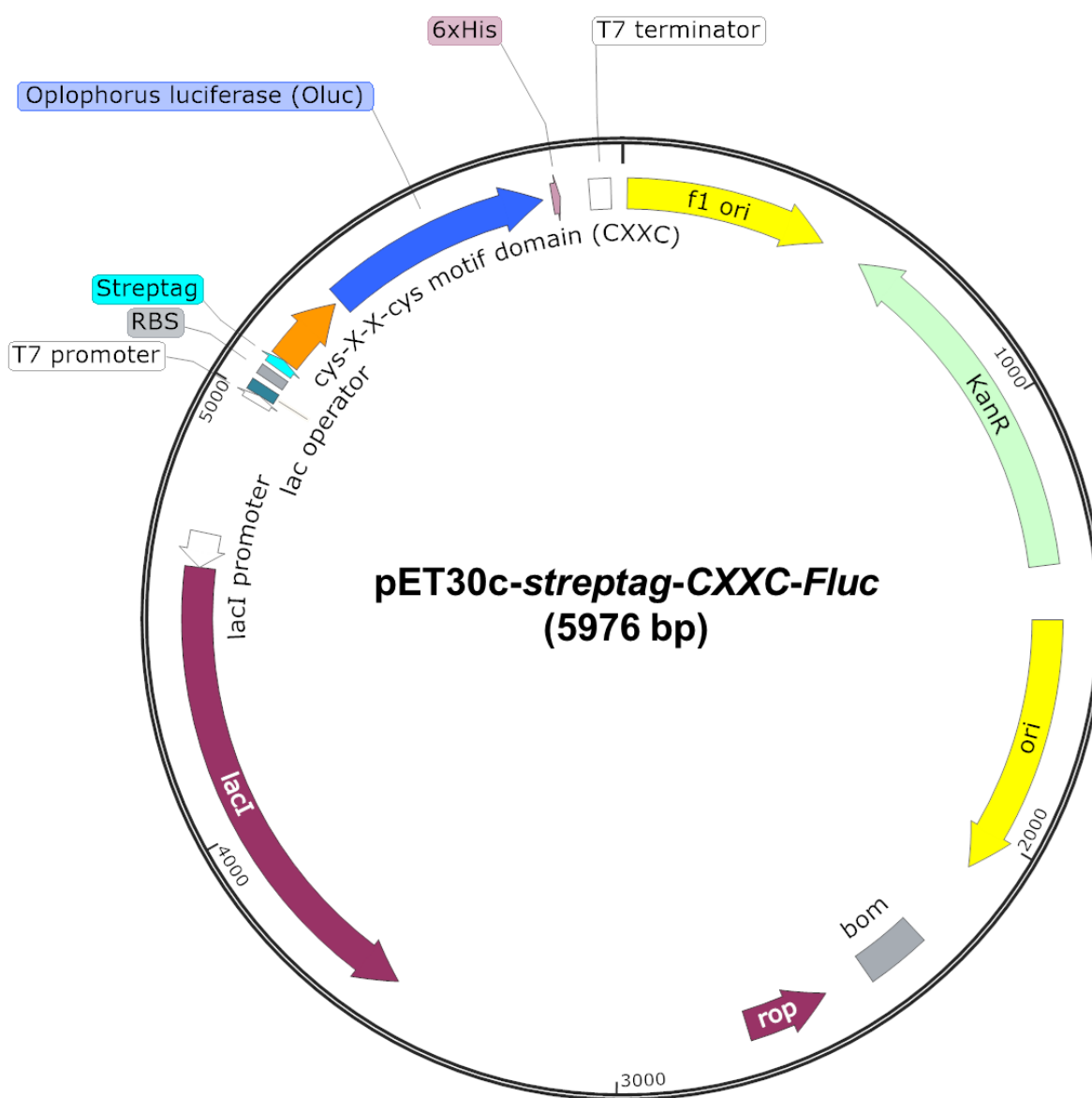


Figure 5-1 pET30c-streptag-CXXC-Oluc のベクターマップ

atg tggagccatccgcagttgaaaag aagaaaggacgtcgatcgaggcgggtgtgggcagtggtcccggctgccaggtgcctgaggactg
 tgggtttgtactaattgcttagataagcccaagttggtggtcgcaatataaagaagcagtgctgcaagatgagaaaatgcagaatctaca
 atggatgccttccaaagaattcagacca atggattcaccttagaggatttcgtcggggattggcgccagacagcaggttataac
 cttgaccaggtcctggaacaaggaggggtatcttctctgttcagaacctggagtgccgtcacgcctattcagcgtattgtac
 tttctggggagaacgggctgaagattgatattcacgtcattattccatacgaaggcttgagcggcgatcaaatgggtcaaatac
 gaaaaattttcaaagtcgtatataccgggtgatgatcatattttaaggtattctgcactacggaacgctggttattgacgggg
 tcacacctaacaatgattgattacttcgggcgtccgtatgaaggaatcgctgtgttgacggaaagaagattaccggtactggg
 actttatggaatggcaataaaattatcgatgagcgtctgatcaatcctgacggctcgttactttccgcgttaccattaacggcgt
 taccgggtggcgtttgtgagcgtatccttgcc taa

atg : 開始コドン

taa : 終止コドン

 : Streptag (24 bp)

 : CXXC (171 bp)

 : Oluc (513 bp)

Figure 5-2 pET30c-streptag-CXXC-Oluc 内の streptag-CXXC-Oluc 塩基配列

MWSHPQFEK KKGRRSRRCGQCPGCQVPEDCGVCTNCLDKPKFGGRNIKKQCCKMRKCQNLQW
 MPSKEFRP MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDI
 HVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMDYFGRPYEGIAVFDGKKI
 TVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILA

 : Streptag (8 a.a.)

 : CXXC (57 a.a.)

 : Oluc (513 a.a.)

Figure 5-3 streptag-CXXC-Oluc のアミノ酸配列

4-2. CXXC-Oluc の組換え生産

Streptag-CXXC-Oluc 発現ベクターを用いて BL21 (DE3)を形質転換し、IPTG により streptag-CXXC-Oluc の発現誘導を行った。発現誘導 16 時間後に、精製用に付加した streptag を利用して streptag-CXXC-Oluc を水溶性画分から精製用カラムの strep-tactin® superflow plus (QIAGEN)を用いて精製した。

水溶性画分の調製に使用した菌体量は 0.30 g である。各精製画分における streptag-CXXC-Oluc の luciferase 活性を測定した結果、溶出画分全体の luciferase 活性は 3.9×10^{10} cps/mL を示し、2 番目の溶出画分の luciferase 活性は最も高い 1.0×10^{10} cps/mL を示した(Fig. 5-4)。この時、精製する前の水溶性画分の luciferase 活性は、 2.1×10^{11} cps/mL である。luciferase 活性の比率から、溶出画分全体で 19%の streptag-CXXC-Oluc を回収できたと考えられる。また SDS-PAGE の結果、溶出画分で目的的位置(分子量: 2.7×10^4)にバンドが観察された(Fig. 5-5)。この時の蛋白質濃度は、溶出画分全体(10 mL)では 0.071 mg/mL, 2 番目の溶出画分(1 mL)では 0.067 mg/mL であった。以上より、水溶性画分から溶出画分に 19%の streptag-CXXC-Oluc (0.71 mg)が精製できたことが示された。

溶出画分全体で 19%の streptag-CXXC-Oluc (0.71 mg)であることから、水溶性画分(1.5 mL)および菌体(0.30 g)には 3.7 mg の streptag-CXXC-Oluc が存在していると考えられる。一方で、strep-tactin® superflow plus (QIAGEN)の結合容量は 9.0 mg である。つまり、精製用カラムの結合容量に対して 59% 少ない量の streptag-CXXC-Oluc を流している。そのため、水溶性画分の調製に使用する菌体量を 0.73 g にすれば、水溶性画分に 9.0 mg の streptag-CXXC-Oluc が含まれることになり、溶出画分で streptag-CXXC-Oluc の収量を上げることができると考えられる。また、精製用に付加した streptag は N 末端と C 末端側の両方に付加することが可能である。そのため、CXXC-Oluc の両末端に streptag を付加すれば、溶出画分での精製効率を改善できると考えられる。

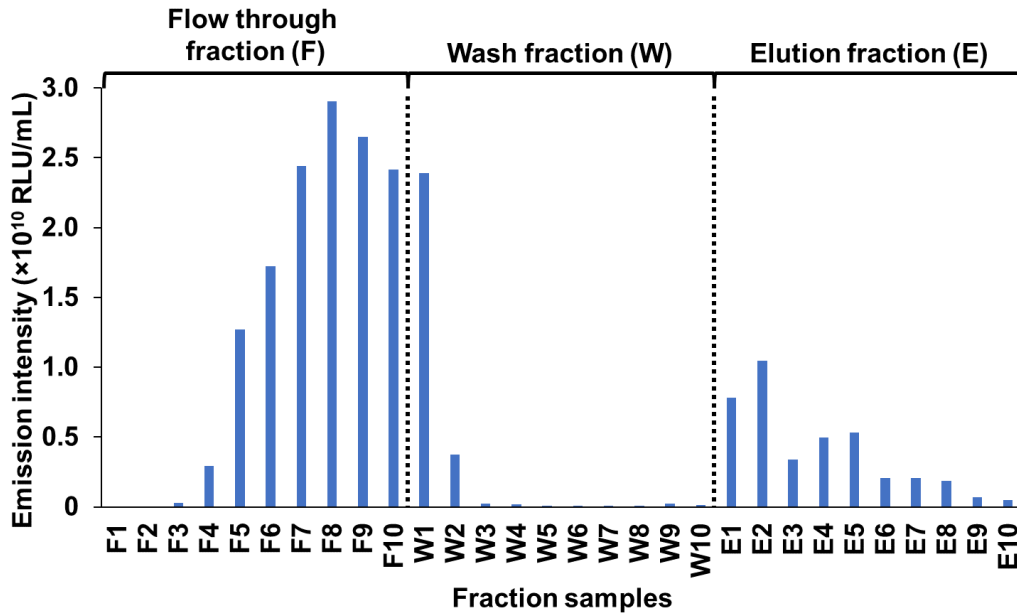


Figure 5-4 各精製画分の Luciferase 活性

フロースルー画分(F1-10)、洗浄画分(W1-10)および溶出画分(E1-10)の luciferase 活性は、5 μ L の各サンプルと 95 μ L 発光基質溶液(終濃度 5.0 μ g/mL coelenterazine h solution と 1 \times PBS)を用いて測定した。全ての段階で、各サンプル 1 mL を回収した。

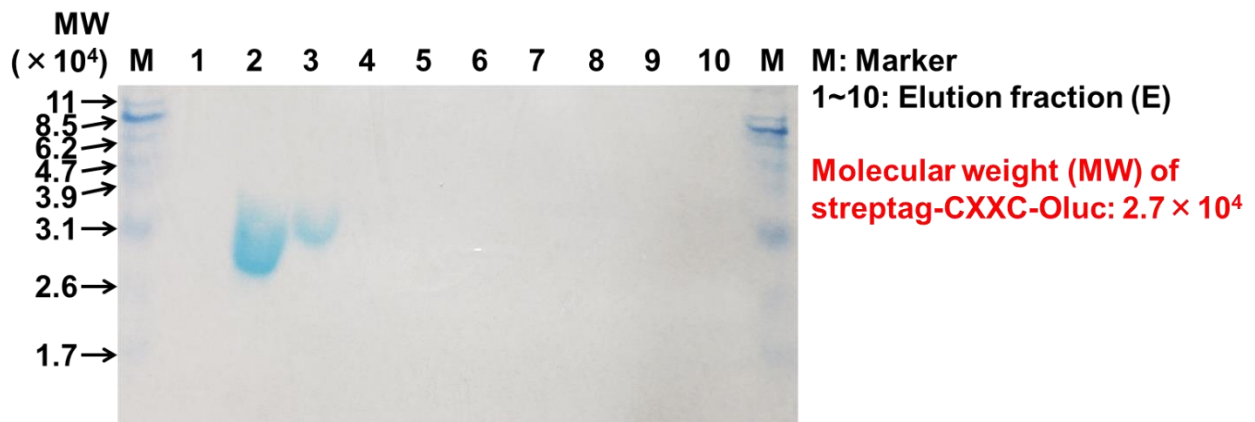


Figure 5-5 精製された streptag-CXXC-Oluc(分子量: 2.7×10^4)の SDS-PAGE 解析

蛋白質精製で得られた溶出画分を 12%SDS-PAGE に流し、CBB で染色した。目的の streptag-CXXC-Oluc の分子量は 2.7×10^4 である。

4-3. CXXC-Oluc の特性検討

非メチル化 CpG に対する CXXC-Oluc の結合能を plate assay により解析した。Streptag と streptavidin の相互作用を利用してメチル化または非メチル化 CpG を含む dsDNA をプレート上に固定化し、CXXC-Oluc を添加した。洗浄した後、luciferase 活性を測定するために、Oluc の基質を添加した。

標的の dsDNA (20 bp) は、1 カ所の CpG サイトを含んでいる。ここでは、1 カ所の CpG サイトがメチル化されていないサンプルを非メチル化 dsDNA (Table 5-4 の Unmethylated DNA_Top と Unmethylated DNA_Bottom をハイブリダイゼーションさせたサンプル) とし、メチル化されているサンプルをメチル化 dsDNA (Table 4-4 の Methylated DNA_Top と Methylated DNA_Bottom をハイブリダイゼーションさせたサンプル) とした。また、使用した plate は 1 well あたり最大 1.0 μ M の dsDNA を固定化することができる。そのため、非メチル化 dsDNA を plate に固定化した場合、1 well あたり非メチル化 CpG が 1.0 μ M 存在することになる。このとき、MLL 由来の CXXC は非メチル化 CpG に対しての結合解離定数が 33 nM、メチル化 CpG に対しての結合解離定数が 7.0 μ M であるため、結合解離曲線から非メチル化 dsDNA 内の非メチル化 CpG サイトに対する CXXC の結合親和性を求めることができる。

推測された結合親和性の値は、非メチル化 CpG サイトに対して 97% である (Fig. 5-6)。加えた CXXC-Oluc の濃度は 45 nM であるため、1 well あたりの非メチル化 dsDNA 内に対して 44 nM の CXXC-Oluc が結合していることが推測される。一方で、メチル化 dsDNA を plate に固定化した場合、1 well あたりメチル化 CpG サイトが 1.0 μ M 存在することになる。このとき、結合解離曲線によりメチル化 dsDNA 内のメチル化 CpG サイトに対する CXXC の結合親和性が求められ、その推測された結合親和性の値はメチル化 CpG サイトに対して 13% である (Fig. 5-6)。つまり、1 well あたりのメチル化 dsDNA に対して 5.9 nM の CXXC-Oluc が結合していることが推測される。そのため、メチル化 dsDNA を固定化した場合と比較して、非メチル化 dsDNA を固定化した場合では、CXXC の結合親和性は 7.5 倍高い値を示すことが推測される。実際に測定された luciferase 活性の値は、メチル化 dsDNA を固定化した場合と比較して、非メチル化 dsDNA を固定した場合は、luciferase 活性は 3.5 倍高い値を観測した (Fig. 5-7)。

以上の結果より、精製した CXXC-Oluc は非メチル化 CpG サイトを特異的に認識する能力と luciferase 活性の両方を保持している事が示された。一方で、plate assay から得られた luciferase 活性の値が CXXC の結合解離曲線から推測された値よりも低い値を示した原因として、well 内で CXXC-Oluc が非特異的な吸着が起きていることが考えられる。実際に、標的 dsDNA を固定化していない場合でも、luciferase 活性がメチル化 dsDNA を固定化した場合と比較して差を示さなかった。つまり、well 内で CXXC-Oluc が非特異的な吸着が起きていることが考えられる。Well に対する CXXC-Oluc の非特異的な吸着を減らすためには、洗浄操作の回数を改善することによって解決すると考えられる。

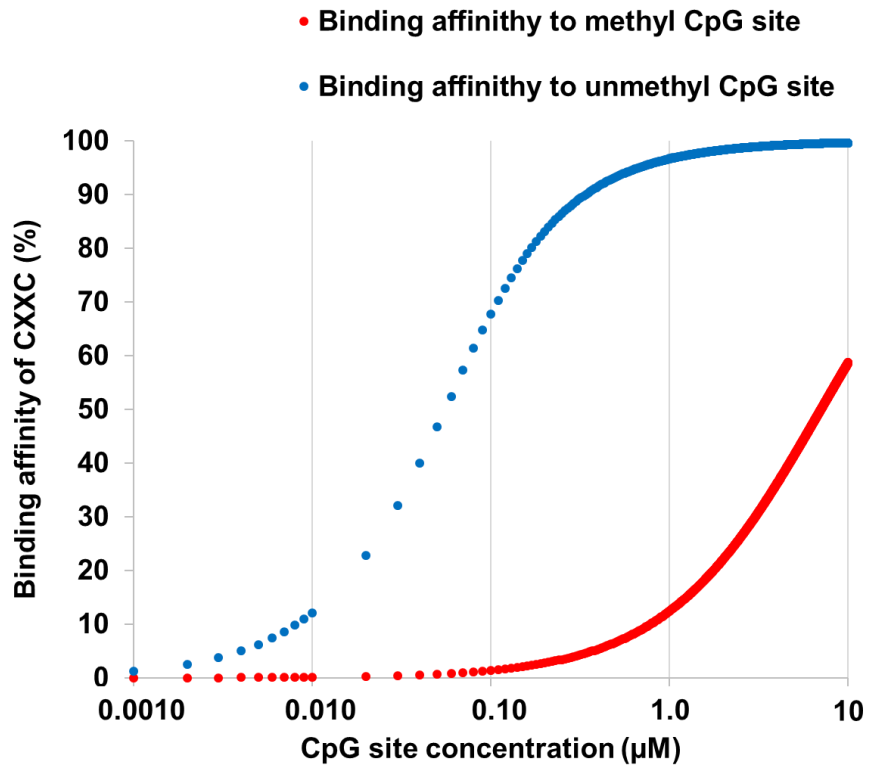


Figure 5-6 CpG サイトに対する MLL 由来の CXXC の結合解離曲線

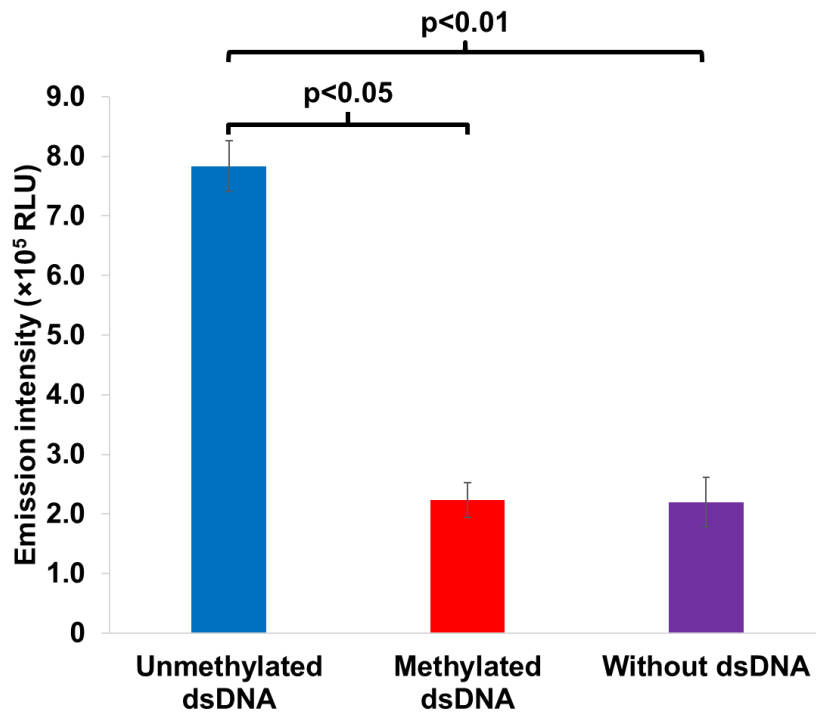


Figure 5-7 Plate assay の結果

Streptag と streptavidin の相互作用を利用してメチル化または非メチル化 CpG サイトを含む dsDNA (1.0 μ M)をプレート上に固定化し、45 nM CXXC-Oluc を添加した。洗浄した後、luciferase 活性を測定するために、Oluc の発光基質溶液として 100 μ L (5.0 μ g/mL coelenterazine h solution と 1 \times PBS)を添加した。青色バーが非メチル化 CpG サイトを含む dsDNA を固定化した場合、赤色バーがメチル化 CpG サイトを含む dsDNA を固定化した場合、紫色バーが dsDNA を固定化していない場合の luciferase 活性測定の結果を示す。(mean \pm SD, N = 3)

4.4. マルチカラーBRET assay によるヒトゲノム DNA のメチル化レベル定量

4.4-1. 低メチル化したヒトゲノム DNA の調製

メチル化阻害剤の 5-Aza-2'-deoxycytidine により HeLa 細胞を処理した後、HeLa ゲノム DNA を精製した。この HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルを COBRA により評価した。HeLa ゲノム DNA をバイサルファイト変換し、PCR によりゲノム DNA のメチル化レベルと相関する反復配列で LINE1 領域を増幅させた。増幅させた領域は、LINE1 領域内の 160 bp である。その後、*taq^α* I により PCR 産物を処理し、電気泳動法にてメチル化レベルを評価した。

バンドの強度を *imagj* で解析した結果(Fig. 5-8)、0, 0.10, 1.0 および 10 μ M 5-Aza-2'-deoxycytidine で処理した HeLa 細胞から精製したゲノム DNA のメチル化レベルは $60\pm 2.9\%$, $47\pm 1.3\%$, $37\pm 2.7\%$ および $32\pm 3.5\%$ であった。つまり、HeLa ゲノム DNA のメチル化 CpG 量が低下していることが示された。

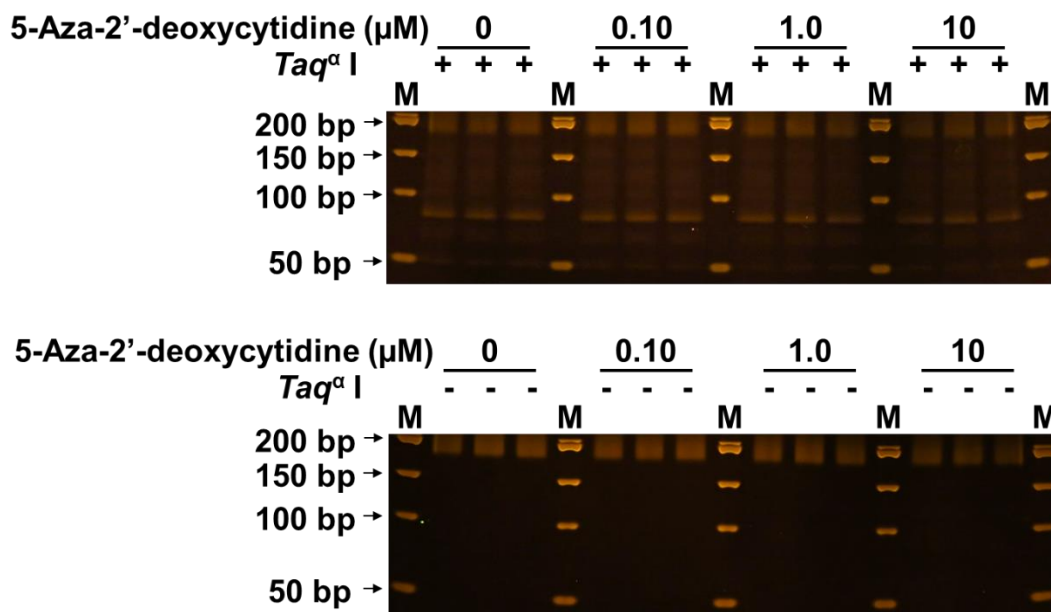


Figure 5-8 電気泳動によるメチル化感受性制限酵素処理の解析

調製した HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルを COBRA によって評価した。メチル化レベルを評価した領域は、ゲノム DNA のメチル化レベルと相関する LINE1 領域内の 160 bp である。LINE1 領域がメチル化されていない場合、*taq^α* I では切断されない。一方でメチル化されている場合、*taq^α* I により切断され、80 bp にバンドが観測される。観測されたバンドの強度から、LINE1 領域のメチル化レベルを算出した。プラス(+)は *taq^α* I 処理したサンプルを示し、マイナス(-)は *taq^α* I 処理していないサンプルを示す。

4-4-2. ヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 濃度依存的な BRET シグナルの測定

ヒトゲノム DNA を標的分子として CXXC-Oluc を用いた BRET assay によるヒトゲノム DNA 量依存的な非メチル化 CpG 量を測定した。異なるヒトゲノム DNA 濃度(終濃度 0, 15, 23, 30 および 38 ng/ μ L) の存在下で、45 nM CXXC-Oluc と BOBO-1 (終濃度 0, 0.90, 1.3, 1.6 および 2.2 μ M)を加え、luciferase の発光により BOBO-1 が励起されるかを検討した。

CXXC-Oluc の発光スペクトル(400~660 nm)を測定した結果、CXXC-Oluc の発光スペクトルのピークは 460 nm 付近を示した。また、BOBO-1 の最大励起波長は約 461 nm 付近であり、最大蛍光波長は 484 nm 付近である。そのため、BRET assay において各スペクトルでは CXXC-Oluc の発光と BOBO-1 の発光を含んだ発光/蛍光強度が観測された(Fig. 5-9)。一方で、BOBO-1 を含まない条件下においてゲノム DNA 非存在下と比較してゲノム DNA 存在下では、CXXC-Oluc の luciferase 活性は 79%に低下した(Fig. 5-10)。BOBO-1 の蛍光強度を算出するためには、Oluc の最大発光波長である 460 nm の発光強度で各波長の発光/蛍光強度を補正する必要があるが、BOBO-1 の最大蛍光波長である 480 nm を 100%とした際の BOBO-1 の相対的蛍光スペクトルにおいて、460 nm の相対的蛍光強度は、8.9%である(Fig. 5-11)。つまり、Oluc の最大発光波長である 460 nm の発光強度は BOBO-1 の蛍光強度に影響される。BOBO-1 の最大蛍光波長である 480 nm を 100%とした際の BOBO-1 の相対的蛍光スペクトルにおいて 440 nm の相対的蛍光強度は、1%未満である(Fig. 5-11)。したがって、各波長における発光/蛍光強度を 440 nm の発光/蛍光強度で補正し、発光/蛍光スペクトルを算出した(Fig. 5-12)。

BOBO-1 の蛍光強度はゲノム DNA 非存在時の発光強度とゲノム DNA 存在時の発光/蛍光強度の差から算出される。算出された 485 nm における BOBO-1 の蛍光強度を BRET シグナルとした。その結果、HeLa ゲノム DNA 濃度依存的に BRET シグナルが上昇した(Fig.5-13)。

以上の結果より、CXXC-Oluc がゲノム DNA の非メチル化 CpG に結合し BOBO-1 に近接することで、CXXC-Oluc の発光により BOBO-1 が蛍光を発していることが示された。

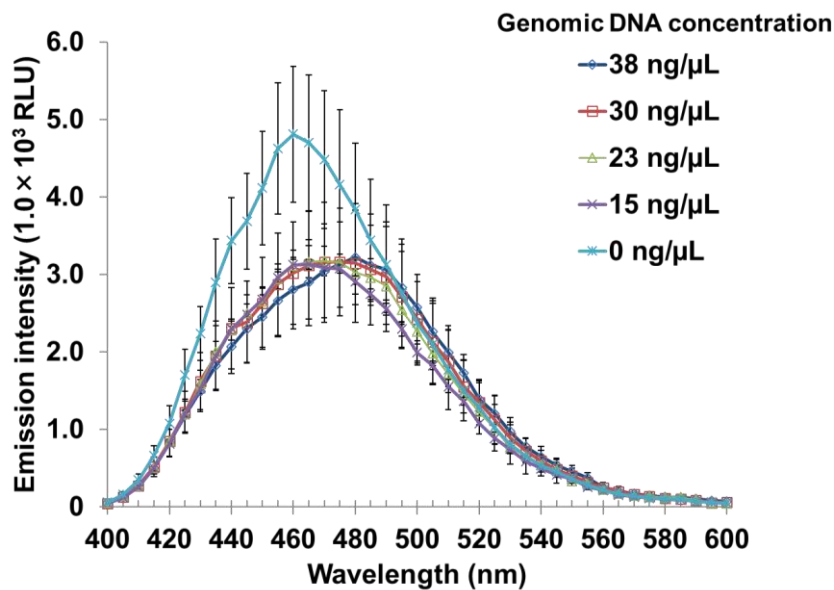


Figure 5-9 蛍光/発光スペクトル(raw データ)

異なる HeLa ゲノム DNA 濃度(0, 15, 23, 30 および 38 ng/ μ L)の存在下の 1 \times PBS (50 μ L)内で、45 nM CXXC-Oluc と BOBO-3 (0, 0.90, 1.3, 1.6 および 2.2 μ M)を混合し、Oluc の発光基質溶液 50 μ L (5.0 μ g/mL coelenterazine h)を添加することで、発光/蛍光スペクトルを測定した(mean \pm SD, N = 3)。

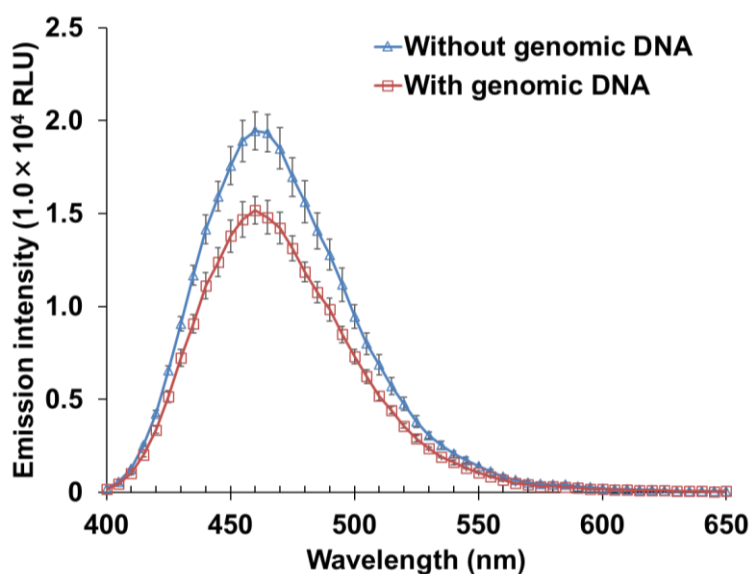


Figure 5-10 CXXC-Oluc の発光スペクトル

ゲノム DNA (38 ng/ μ L)存在下または非存在下の条件で 45 nM CXXC-Oluc の発光スペクトルを全量 100 μ L (5.0 μ g/mL coelenterazine h solution と 1 \times PBS)内で測定した(mean \pm SD, N = 3)。

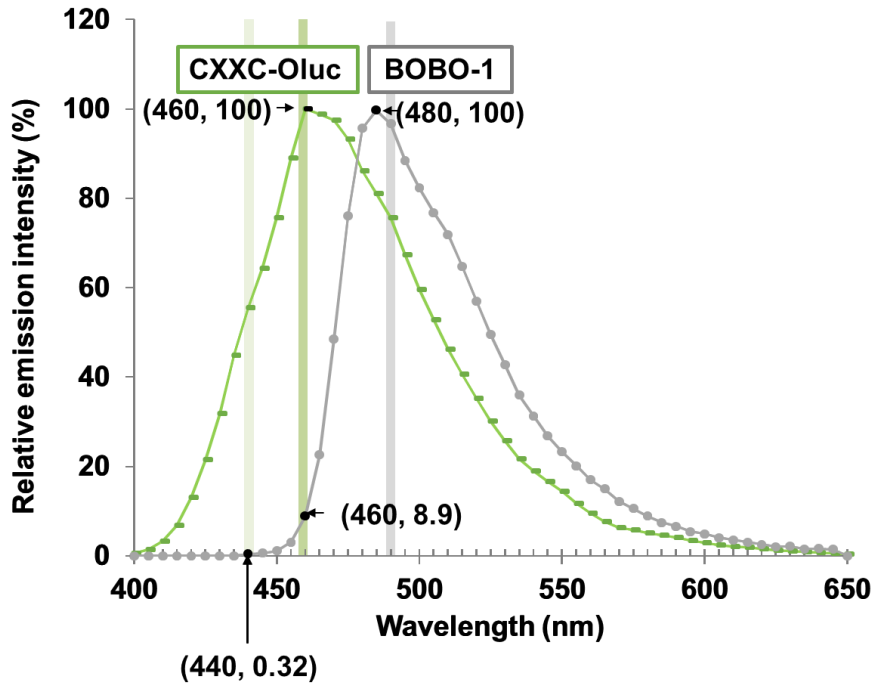


Figure 5-11 CXXC-Oluc および BOBO-1 の相対的発光/蛍光スペクトル

緑のスペクトルが CXXC-Oluc の最大蛍光波長である 460 nm を 100%とした際の CXXC-Oluc 相対的蛍光スペクトルを示す。灰色のスペクトルが BOBO-1 の最大蛍光波長である 480 nm を 100%とした際の BOBO-1 の相対的蛍光スペクトルを示す。薄い緑のハイライトが 440 nm の波長を示す。濃い緑のハイライトが 460 nm の波長を示す。灰色のハイライトが 480 nm の波長を示す。

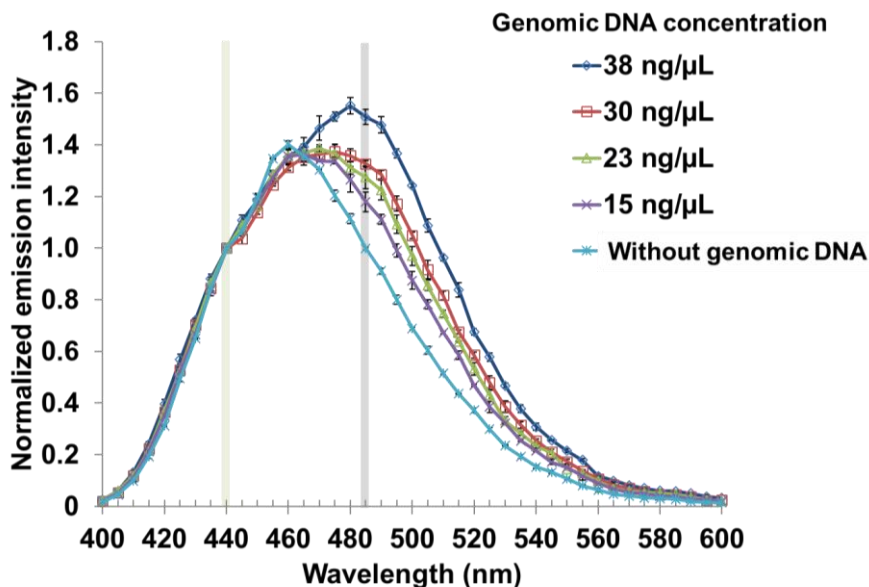


Figure 5-12 440 nm の発光/蛍光強度で補正された発光/蛍光スペクトル強度

Raw データ (Fig. 5-10) の発光/蛍光スペクトルを 440 nm の発光/蛍光強度で補正した (mean \pm SD, $N = 3$)。薄い緑のハイライトが 440 nm の波長を示す。灰色のハイライトが 485 nm の波長を示す。

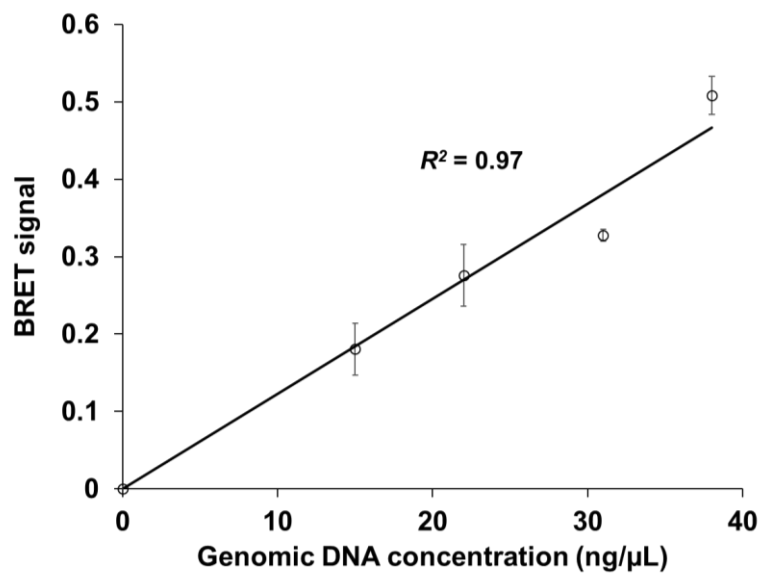


Figure 5-13 BRET assay から得られた BRET シグナル
HeLa ゲノムの濃度に対して BRET シグナルをプロットした(mean ± SD, N = 3)。

4-4-3. BOBO-1 と BOBO-3 の濃度検討

マルチカラーBRET assay によりゲノム DNA の非メチル化 CpG 量とメチル化 CpG 量を同時に測定するためには、BOBO-1 と BOBO-3 をゲノム DNA に同時に混合させる必要がある。

BOBO-1 と BOBO-3 は二量体シアニンを骨格にして開発された DNA intercalating dye であるため、類似した化学構造を持つ。そのため、BOBO-1 と BOBO-3 は DNA に対して同程度の結合定数で結合すると考えられる。そこで、同濃度の BOBO-1 と BOBO-3 をゲノム DNA に混合し、CXXC-Oluc を用いた BRET assay によりヒトゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を測定できるのか検討した。BOBO-1 と BOBO-3 (0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.0, 1.2, 1.6 μM BOBO-1 および 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.0, 1.2, 1.6 μM BOBO-3)を加えた HeLa ゲノム DNA (38 ng/ μL)に、45 nM CXXC-Oluc, 45 nM MBD-Fluc を加え、Oluc の発光基質溶液(5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ coelenterazine h)のみを加えることによって発光/蛍光スペクトルを測定した。測定した発光/蛍光スペクトルの raw データを Fig. 5-14 に示す。

各波長における発光/蛍光強度を 440 nm の発光/蛍光強度で補正した発光/蛍光スペクトルを算出し、485 nm における BOBO-1 の蛍光強度を算出した(Fig. 5-15)。算出された 485 nm における BOBO-1 の蛍光強度を BRET シグナルとした。その結果、BRET シグナルは BOBO-1 と BOBO-3 の濃度が 0.80 μM までは濃度に依存して上昇し、0.80 μM 以上では飽和した(Fig. 5-16)。つまり、マルチカラーBRET assay において、BOBO-1 と BOBO-3 の最適な濃度は 0.8. μM であることが示された。

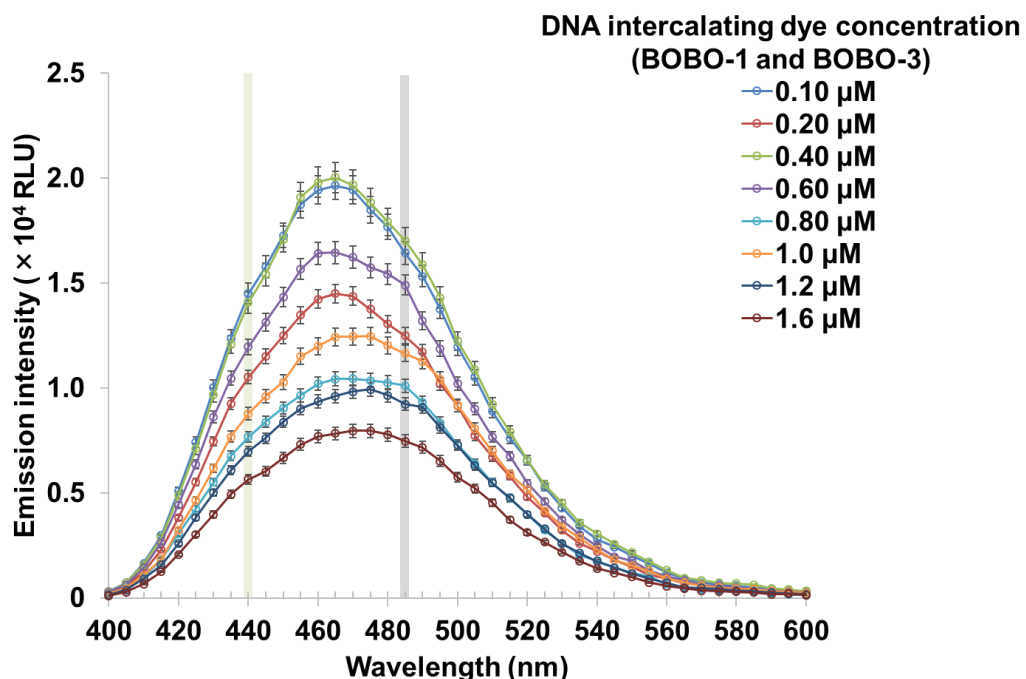


Figure 5-14 蛍光/発光スペクトル(raw データ)

BOBO-1 と BOBO-3 (0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.0, 1.2, 1.6 μM BOBO-1 および 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.0, 1.2, 1.6 μM BOBO-3)を混合させた HeLa ゲノム DNA (38 ng/ μL)に、45 nM CXXC-Oluc, 45 nM MBD-Fluc を混合し、Oluc の発光基質溶液 50 μL (5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ coelenterazine h)を添加することで、luciferase の発光により BOBO-3 が励起されるかを検討した(mean \pm SD, N = 3)。薄い緑のハイライトが 440 nm の波長を示す。灰色のハイライトが 485 nm の波長を示す。

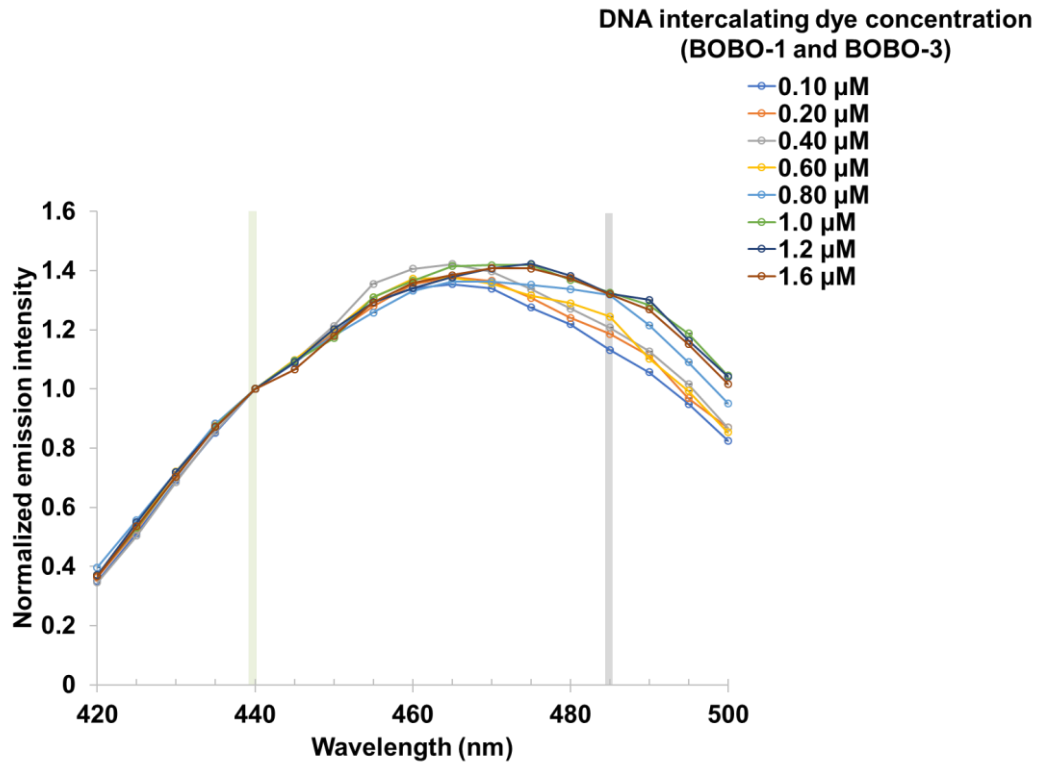


Figure 5-15 440 nm の発光/蛍光強度で補正された発光/蛍光スペクトル強度

Raw データ (Fig. 5-14) の発光/蛍光スペクトルを 440 nm の発光/蛍光強度で補正した (mean \pm SD, $N = 3$)。薄い緑のハイライトが 440 nm の波長を示す。灰色のハイライトが 485 nm の波長を示す。

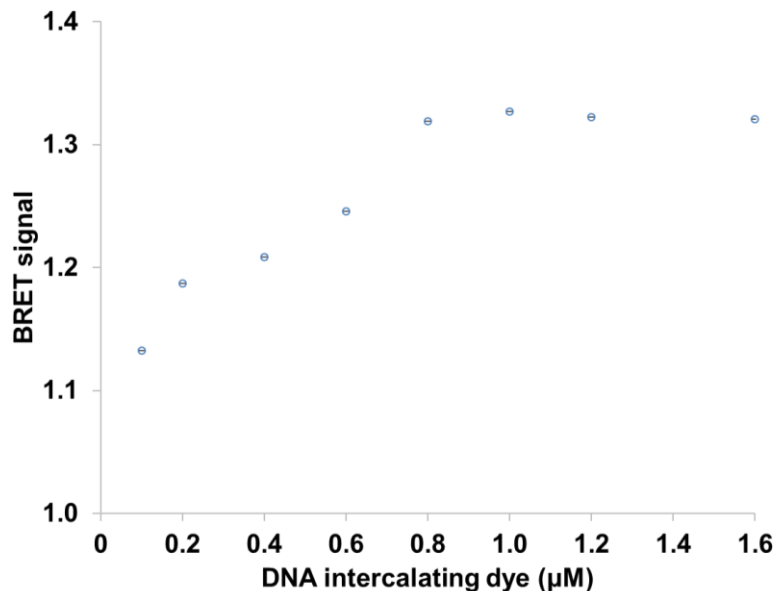


Figure 5-16 BRET assay から得られた BRET シグナル

DNA intercalating dye の濃度に対して BRET シグナルをプロットした (mean \pm SD, $N = 3$)。

4-4-4. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル依存的な BRET シグナルの測定

MBD-Fluc 存在下で CXXC-Oluc と BOBO-1 を用いた BRET assay によりメチル化レベル依存的な非メチル化 CpG 量を測定できるのか検討した。低メチル化したゲノム DNA (38 ng/ μ L)に、45 nM CXXC-Oluc, 45 nM MBD-Fluc, 0.80 μ M BOBO-1 および 0.80 μ M BOBO-3 を加え、Oluc の発光基質溶液(5.0 μ g/mL coelenterazine h)のみを加えることによって発光/蛍光スペクトルを測定した。測定した発光/蛍光スペクトルの raw データを Fig. 5-14 に示す。

各波長における発光/蛍光強度を 440 nm の発光/蛍光強度で補正した発光/蛍光スペクトルを算出し (Fig. 5-17)、ゲノム DNA 非存在時の発光強度からゲノム DNA 存在時の発光/蛍光強度の差から BOBO-1 の蛍光強度を算出した。つまり、CXXC-Oluc の発光によって励起された BOBO-1 の蛍光強度を算出した。算出された 480 nm における BOBO-1 の蛍光強度を BRET シグナルとした。その結果、BRET シグナルがヒトゲノム DNA のメチル化レベル(60 \pm 2.9%, 47 \pm 1.3%, 37 \pm 2.7%および 32 \pm 3.5%)依存的に低下した(Fig. 5-18)。また、MBD-Fluc が Oluc の発光基質溶液(coelenterazine h)に反応しないことも示された。

次に、CXXC-Oluc 存在下で MBD-Fluc と BOBO-3 を用いた BRET assay によりメチル化レベル依存的なメチル化 CpG 量を測定できるのか検討した。低メチル化したゲノム DNA (38 ng/ μ L)に 45 nM CXXC-Oluc, 45 nM MBD-Fluc, 0.80 μ M BOBO-1 および 0.80 μ M BOBO-3 を加え、Fluc の基質である PicaGene のみを加えることによって発光/蛍光スペクトルを測定した。測定した発光/蛍光スペクトルの raw データを Fig. 5-19 に示す。本 assay も同様に Fluc の最大発光波長である 560 nm の発光強度で各波長の発光/蛍光強度を補正する必要があるが、BOBO-3 の最大蛍光波長である 605 nm を 100%とした BOBO-3 の相対的蛍光スペクトルにおいて 560 nm の相対的蛍光強度は、2.1%の蛍光強度である(Fig. 5-20)。つまり、Fluc の最大発光波長である 560 nm の発光強度は BOBO-3 の蛍光強度に影響される。一方、BOBO-3 の最大蛍光波長である 605 nm を 100%とした BOBO-3 の相対的蛍光スペクトルにおいて 550 nm の相対的蛍光強度は、1%未満である(Fig. 5-21)。したがって、各波長における発光/蛍光強度を 550 nm の発光/蛍光強度で補正し、発光/蛍光スペクトルを算出し(Fig. 5-22)、ゲノム DNA 非存在時の発光強度からゲノム DNA 存在時の発光/蛍光強度の差から BOBO-3 の蛍光強度を算出した。算出された 605 nm における BOBO-3 の蛍光強度を BRET シグナルとする。その結果、BRET シグナルが HeLa ゲノム DNA のメチル化レベル(60 \pm 2.9%, 47 \pm 1.3%, 37 \pm 2.7%および 32 \pm 3.5%)依存的に増加した(Fig. 5-23)。また、CXXC-Oluc が Fluc の基質である PicaGene に反応しないことも示された。

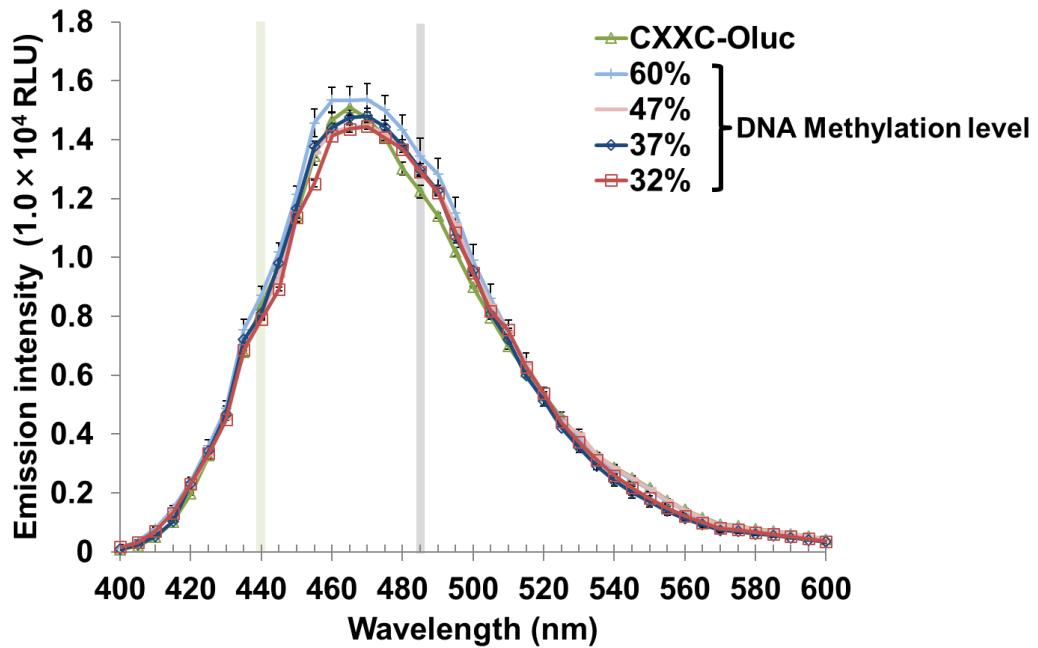


Figure 5-17 蛍光/発光スペクトル(raw データ)

メチル化レベルが $60 \pm 2.9\%$, $47 \pm 1.3\%$, $37 \pm 2.7\%$ および $32 \pm 3.5\%$ の HeLa ゲノム DNA ($38 \text{ ng}/\mu\text{L}$) の存在下の $1 \times \text{PBS}$ ($50 \mu\text{L}$) 内で、 45 nM CXXC-Oluc, 45 nM MBD-Fluc, $0.80 \mu\text{M}$ BOBO-1 および $0.80 \mu\text{M}$ BOBO-3 を混合し、Oluc の発光基質溶液 $50 \mu\text{L}$ ($5.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ coelenterazine h) を添加することで、luciferase の発光により BOBO-3 が励起されるかを検討した ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $N = 3$)。薄い緑のハイライトが 440 nm の波長を示す。灰色のハイライトが 485 nm の波長を示す。

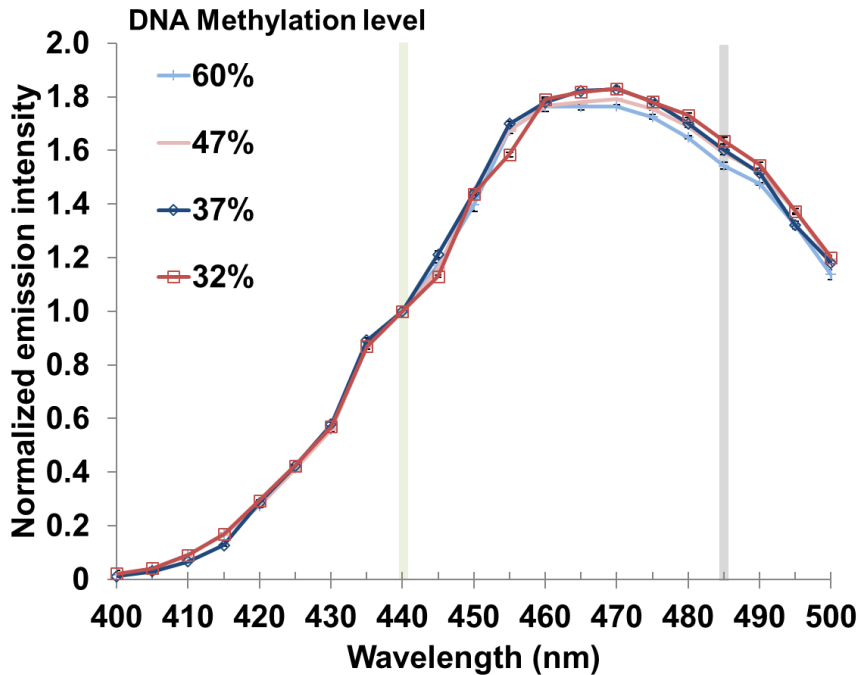


Figure 5-18 440 nm の発光/蛍光強度で補正された発光/蛍光スペクトル強度

Raw データ (Fig. 5-14) の発光/蛍光スペクトルを 440 nm の発光/蛍光強度で補正した (mean \pm SD, $N = 3$)。薄い緑のハイライトが 440 nm の波長を示す。灰色のハイライトが 485 nm の波長を示す。薄い緑のハイライトが 440 nm の波長を示す。灰色のハイライトが 485 nm の波長を示す。

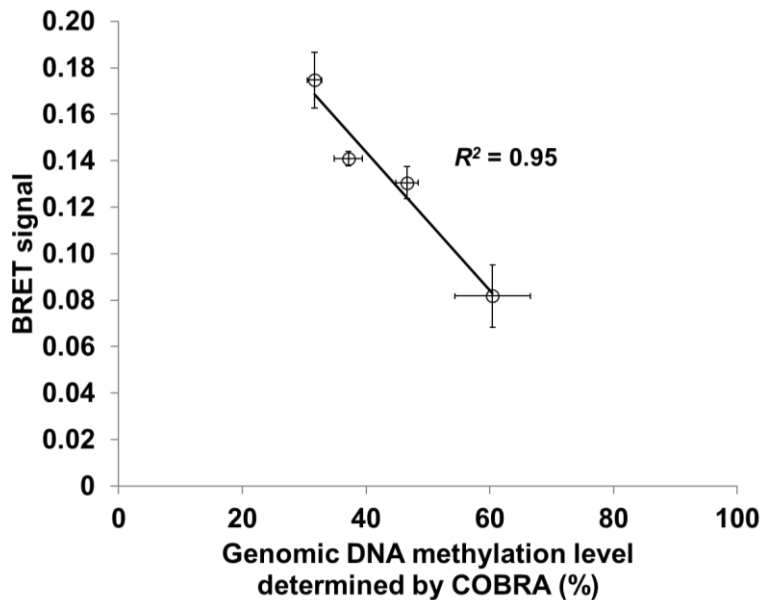


Figure 5-19 BRET assay から得られた BRET シグナル

COBRA によって評価された HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルに対して BRET シグナルをプロットした (mean \pm SD, $N = 3$)。

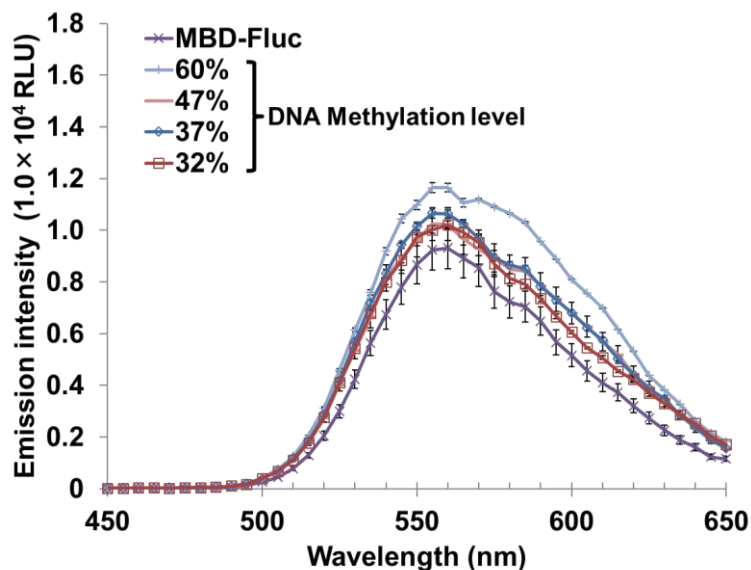


Figure 5-20 蛍光/発光スペクトル(raw データ)

メチル化レベルが $60 \pm 2.9\%$, $47 \pm 1.3\%$, $37 \pm 2.7\%$ および $32 \pm 3.5\%$ の HeLa ゲノム DNA ($38 \text{ ng}/\mu\text{L}$) の存在下で、 45 nM CXXC-Oluc, 45 nM MBD-Fluc, $0.80 \text{ }\mu\text{M}$ BOBO-1 および $0.80 \text{ }\mu\text{M}$ BOBO-3 を混合し、Fluc の発光基質溶液 ($50 \text{ }\mu\text{L}$ PicaGene) を添加することで、luciferase の発光により BOBO-3 が励起されるかを検討した (mean \pm SD, $N = 3$)。

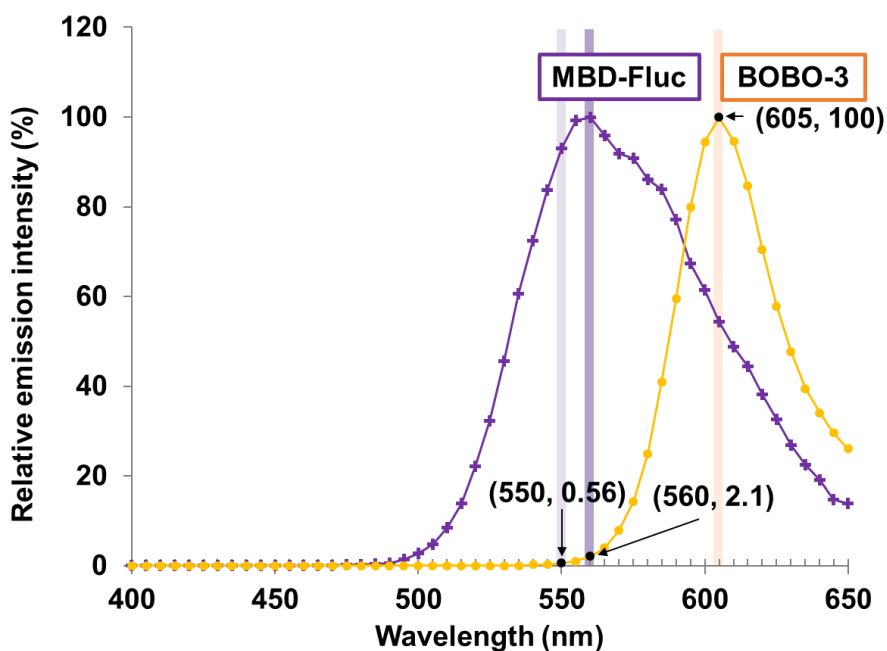


Figure 5-21 MBD-Fluc および BOBO-3 の相対的発光/蛍光スペクトル

紫色のスペクトルが MBD-Fluc の最大蛍光波長である 560 nm を 100% とした際の MBD-Fluc 相対的蛍光スペクトルを示す。黄色のスペクトルが BOBO-3 の最大蛍光波長である 605 nm を 100% とした際の BOBO-3 の相対的蛍光スペクトルを示す。薄い紫色のハイライトが 550 nm の波長を示す。濃い紫色のハイライトが 560 nm の波長を示す。黄色のハイライトが 605 nm の波長を示す。

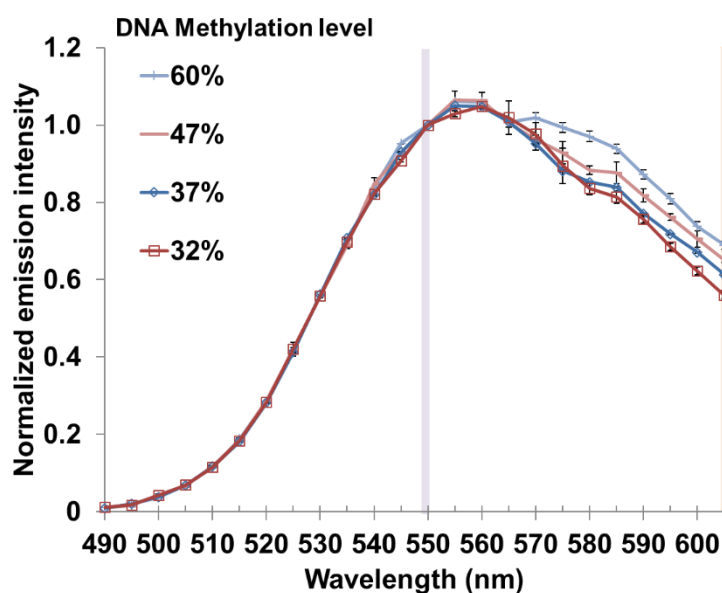


Figure 5-22 550 nm の発光/蛍光強度で補正された発光/蛍光スペクトル強度

Raw データ (Fig. 5-21) の発光/蛍光スペクトルを 550 nm の発光/蛍光強度で補正した (mean \pm SD, $N = 3$)。薄い紫色のハイライトが 550 nm の波長を示す。黄色のハイライトが 605 nm の波長を示す。

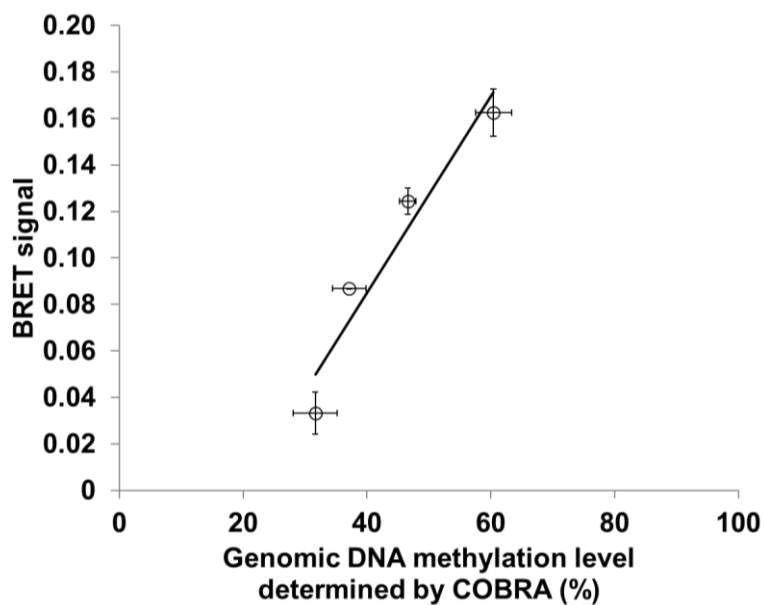


Figure 5-23 BRET assay から得られた BRET シグナル

COBRA によって評価された HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルに対して BRET シグナルをプロットした (mean \pm SD, $N = 3$)。

4-4-5. ヒトゲノム DNA のメチル化レベル定量

CXXC-Oluc と MBD-Fluc を用いたマルチカラー-BRET assay でゲノム 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のか検討した。HeLa ゲノム DNA (38 ng/μL) に 45 nM CXXC-Oluc, 45 nM MBD-Fluc, 0.80 μM BOBO-1 および 0.80 μM BOBO-3 を加え、Oluc と Fluc の発光基質溶液(5.0 μg/mL coelenterazine h と PicaGene)を加えることによって発光/蛍光スペクトルを測定した。HeLa ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量とメチル化 CpG 量をマルチカラー-BRET assay で測定した発光/蛍光スペクトルの raw データを Fig. 5-24 に示す。

各測定された raw データは、CXXC-Oluc, BOBO-1, MBD-Fluc, BOBO-3 の各発光/蛍光スペクトルを総和したデータである。この raw データから BOBO-1 の最大蛍光波長である 485 nm の蛍光強度と BOBO-3 の最大蛍光波長である 605 nm の蛍光強度を算出するために、CXXC-Oluc, BOBO-1, MBD-Flu および BOBO-3 の相対的発光/蛍光スペクトルを使用した(Fig. 5-25)。

BOBO-1 の最大蛍光波長である 485 nm の蛍光強度は MBD-Fluc と BOBO-1 の発光/蛍光強度の影響を受けない。したがって、BOBO-1 の最大蛍光波長である 485 nm の蛍光強度を抽出するために、CXXC-Fluc の発光強度を差し引く必要がある。

まず初めに、実際の raw データから CXXC-Oluc の発光スペクトルを算出するために、BOBO-1 の蛍光強度を受けない raw データの 440 nm (Fig. 5-24)の値と CXXC-Oluc の相対的発光スペクトルの比率 (Fig. 5-25)を用いることで CXXC-Oluc の各発光スペクトルを抽出した(Fig. 5-26)。

抽出された CXXC-Oluc の発光スペクトル(Fig. 5-26)と raw データの発光スペクトル(Fig. 5-24)の各波長における発光/蛍光強度を 440 nm の発光/蛍光強度で補正した(Fig. 5-27)。

補正された各サンプルの発光/蛍光スペクトルから CXXC-Oluc の発光スペクトルを差し引いた BOBO-1 の蛍光強度を BRET シグナルとした。この抽出された BRET シグナルは、HeLa ゲノムのメチル化レベル依存的に低下したことが示された(Fig. 5-28)。

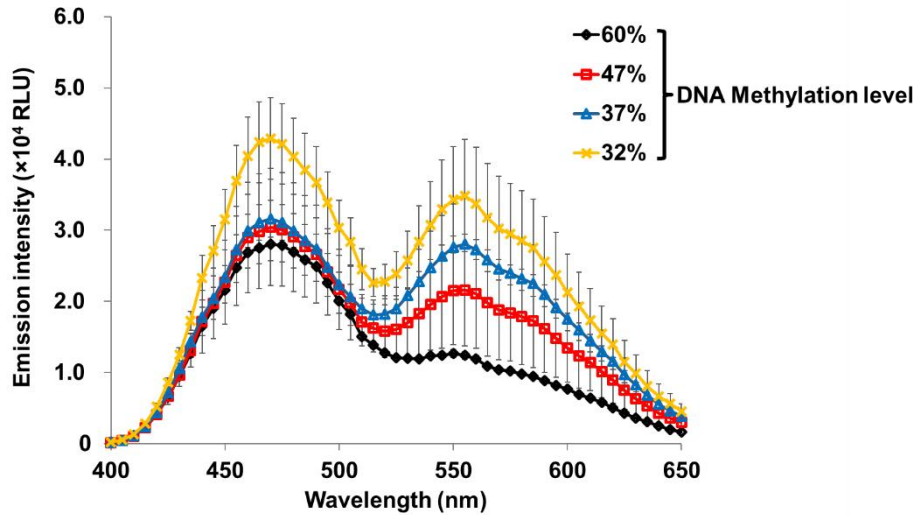


Figure 5-24 マルチカラー-BRET assay から得られた蛍光/発光スペクトル(raw データ)

メチル化レベルが $60 \pm 2.9\%$, $47 \pm 1.3\%$, $37 \pm 2.7\%$ および $32 \pm 3.5\%$ の HeLa ゲノム DNA ($38 \text{ ng}/\mu\text{L}$) の存在下の $1 \times \text{PBS}$ ($50 \mu\text{L}$) で、 45 nM CXXC-Oluc, 45 nM MBD-Fluc, $0.80 \mu\text{M}$ BOBO-1 および $0.80 \mu\text{M}$ BOBO-3 を混合し、Fluc の発光基質溶液 ($25 \mu\text{L}$ PicaGene) と Oluc の発光基質溶液 $25 \mu\text{L}$ ($5.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ coelenterazine h) を添加することで、luciferase の発光により BOBO-1 と BOBO-3 が励起されるかを検討した (mean \pm SD, $N = 3$)。

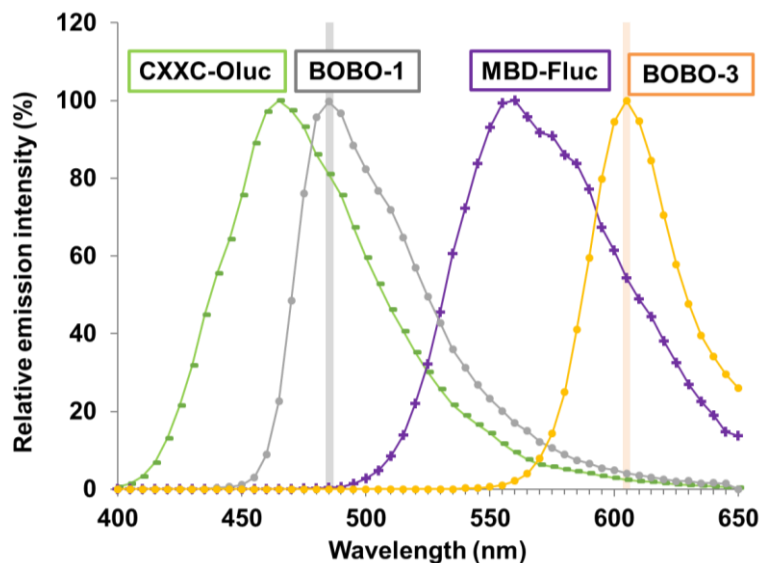


Figure 5-25 CXXC-Oluc, BOBO-1, MBD-Fluc および BOBO-3 の相対的発光/蛍光スペクトル

緑のスペクトルが CXXC-Oluc の最大蛍光波長である 460 nm を 100% とした際の CXXC-Oluc 相対的蛍光スペクトルを示す。灰色のスペクトルが BOBO-1 の最大蛍光波長である 480 nm を 100% とした際の BOBO-1 の相対的蛍光スペクトルを示す。紫色のスペクトルが MBD-Fluc の最大蛍光波長である 560 nm を 100% とした際の MBD-Fluc 相対的蛍光スペクトルを示す。黄色のスペクトルが BOBO-3 の最大蛍光波長である 605 nm を 100% とした際の BOBO-3 の相対的蛍光スペクトルを示す。灰色のハイライトが 485 nm の波長を示す。黄色のハイライトが 605 nm の波長を示す。

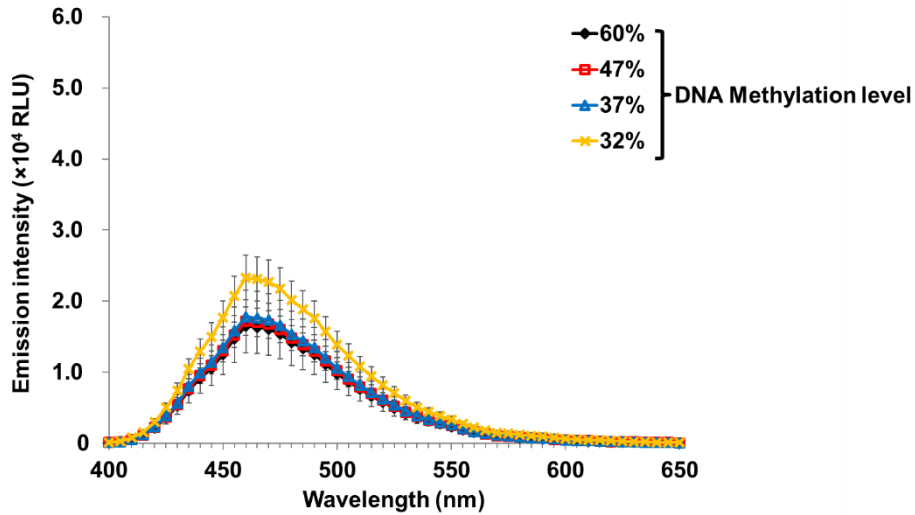


Figure 5-26 抽出された CXXC-Oluc の各発光スペクトル

Fig. 5-24 の raw データから CXXC-Oluc の発光スペクトルを算出するために、BOBO-1 の蛍光強度を受けない raw データの 440 nm (Fig. 5-24) の値と CXXC-Oluc の相対的発光スペクトルの比率 (Fig. 5-23) を用いることで CXXC-Oluc の各発光スペクトルを抽出した (mean \pm SD, $N = 3$)。

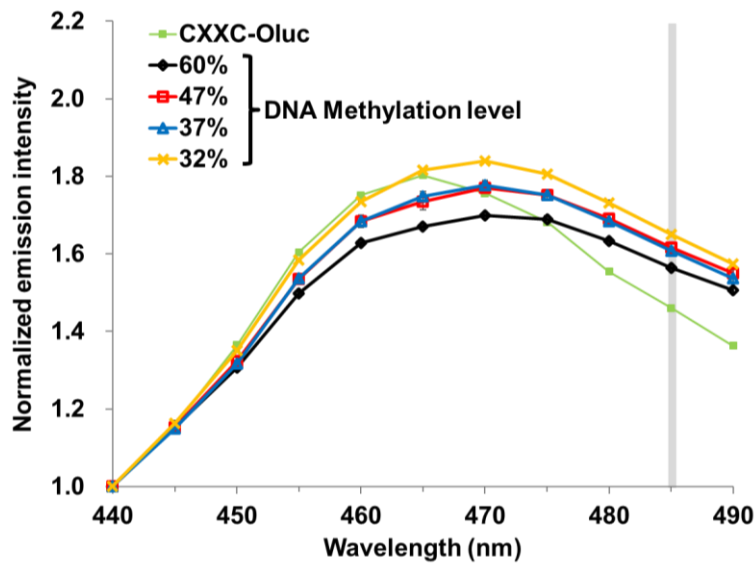


Figure 5-27 440 nm の発光/蛍光強度で補正した発光/蛍光スペクトル

抽出された CXXC-Oluc の各発光スペクトル (Fig. 5-26) と raw データ (Fig. 5-24) の各波長における発光/蛍光強度を 440 nm の発光/蛍光強度で補正した (mean \pm SD, $N = 3$)。灰色のハイライトが 485 nm の波長を示す。

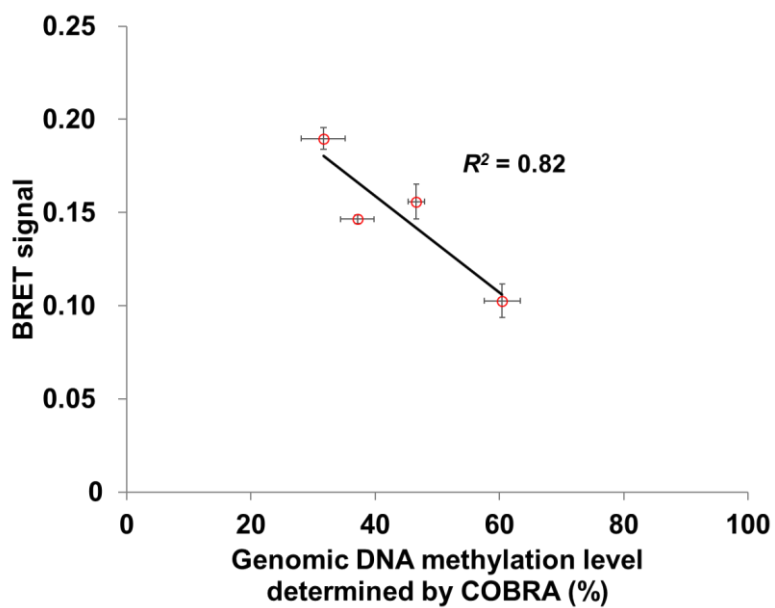


Figure 5-28 485 nm における BRET シグナル

COBRA によって評価された HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルに対して BOBO-1 の BRET シグナルをプロットした(mean \pm SD, $N = 3$)。

次に、BOBO-3 の最大蛍光波長である 605 nm の蛍光強度を抽出するためには、CXXC-Oluc, BOBO-1 および MBD-Fluc の発光/蛍光強度を差し引く必要がある。そのため、まず実際の raw データから抽出された CXXC-Oluc の各発光スペクトル(Fig. 5-24)を差し引くことにより、BOBO-1, MBD-Fluc および BOBO-3 を含む発光/蛍光スペクトルを抽出した(Fig. 5-29)。

抽出された発光/蛍光スペクトルの 485 nm の値と BOBO-1 の相対的蛍光スペクトルの比率(Fig. 5-25)を用いることで BOBO-1 の各蛍光スペクトルを抽出した(Fig. 5-30)。この抽出された BOBO-1 の各蛍光スペクトルを BOBO-1, MBD-Fluc および BOBO-3 を含む発光/蛍光スペクトル(Fig. 5-29)から差し引くことにより、MBD-Fluc と BOBO-3 を含む発光/蛍光スペクトルを抽出した(Fig. 5-31)。

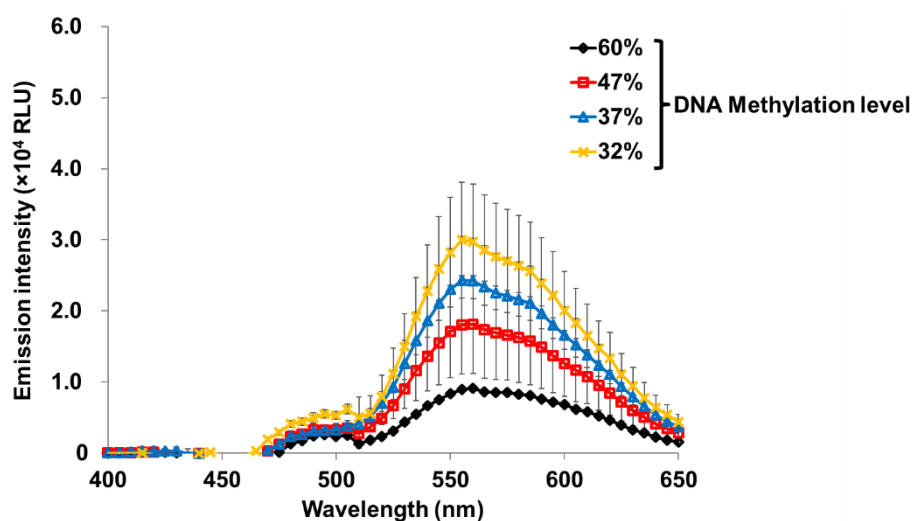


Figure 5-29 BOBO-1, MBD-Fluc および BOBO-3 を含む発光/蛍光スペクトル

抽出された CXXC-Oluc の各発光スペクトル(Fig. 5-26)を raw データ(Fig. 5-24)から差し引くことにより、BOBO-1, MBD-Fluc および BOBO-3 を含む発光/蛍光スペクトルを抽出した(mean \pm SD, $N = 3$)。

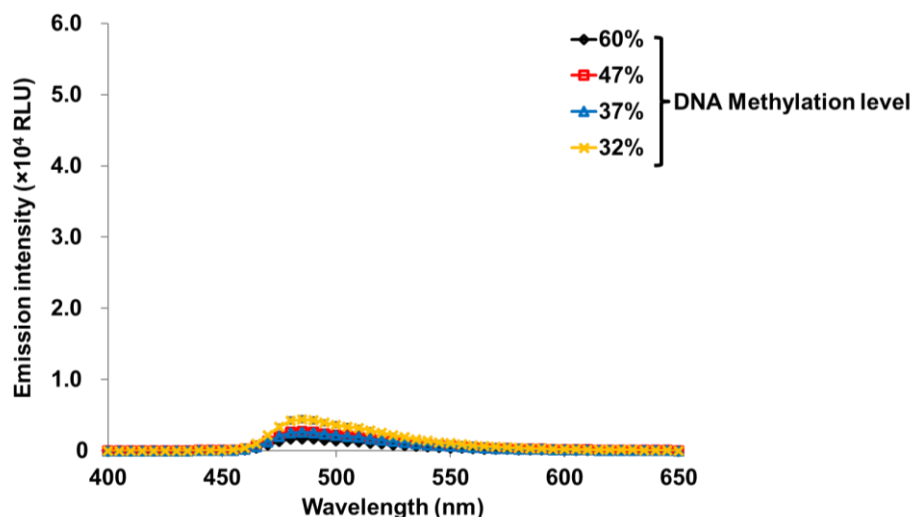


Figure 5-30 抽出された BOBO-1 の各蛍光スペクトル

抽出された発光/蛍光スペクトルの 485 nm の値(Fig. 5-29)と BOBO-1 の相対的蛍光スペクトルの比率(Fig. 5-25)を用いることで BOBO-1 の各蛍光スペクトルを抽出した(mean \pm SD, $N = 3$)。

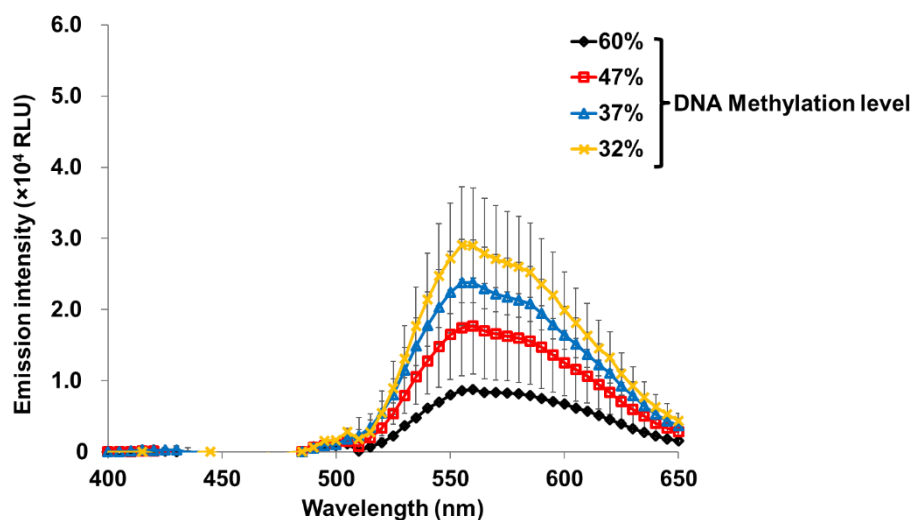


Figure 5-31 抽出された MBD-Fluc と BOBO-3 を含む発光/蛍光スペクトル

抽出された BOBO-1 の各蛍光スペクトル(Fig. 5-30)を BOBO-1, MBD-Fluc および BOBO-3 を含む発光/蛍光スペクトル(Fig. 5-29)から差し引くことにより、MBD-Fluc と BOBO-3 を含む発光/蛍光スペクトルを抽出した(mean \pm SD, $N = 3$)。

次に、抽出された発光/蛍光スペクトルの 550 nm の値(Fig. 2-31)と MBD-Fluc の相対的蛍光スペクトルの比率(Fig. 5-25)を用いることで MBD-Fluc の各発光スペクトルを抽出した(Fig. 5-32)。

抽出された MBD-Fluc の各発光スペクトルと MBD-Fluc と BOBO-3 を含む発光/蛍光スペクトル(Fig. 5-32)の各波長における発光/蛍光強度を 550 nm の発光/蛍光強度で補正した(Fig. 5-33)。補正された各サンプルの発光/蛍光スペクトルから MBD-Fluc の発光スペクトルを差し引いた BOBO-3 の蛍光強度を BRET シグナルとした。抽出された BRET シグナルは、HeLa ゲノムのメチル化レベル依存的に増加したことが示された(Fig. 5-34)。

以上より、BOBO-1 由来の BRET シグナルと BOBO-3 由来の BRET シグナルとの間に負の相関関係が示された(Fig. 5-35)。つまり、マルチカラー-BRET assay によりゲノム DNA の非メチル化 CpG 量とメチル化 CpG 量を同時に測定できたことが示された。

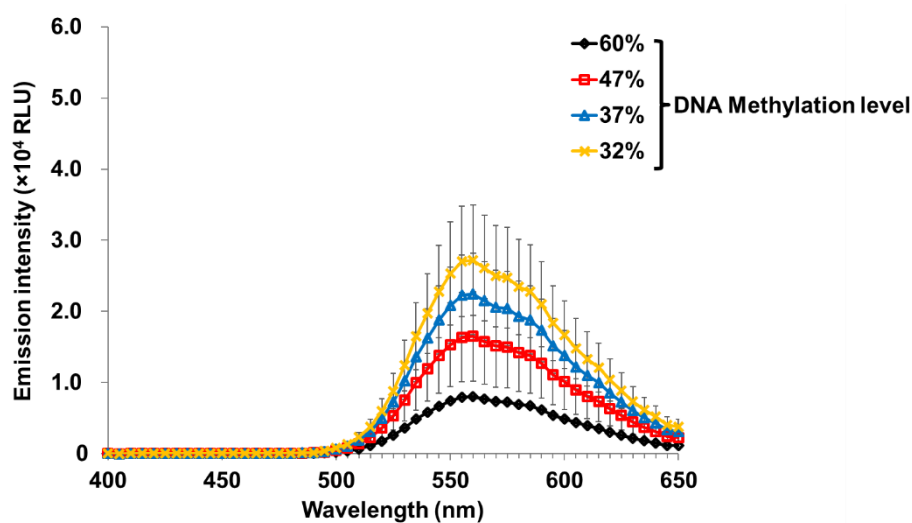


Figure 5-32 抽出された MBD-Fluc の各発光スペクトル

抽出された発光/蛍光スペクトルの 550 nm の値(Fig. 5-31)と MBD-Fluc の相対的蛍光スペクトルの比率(Fig. 5-25)を用いることで MBD-Fluc の各発光スペクトルを抽出した(mean \pm SD, $N = 3$)。

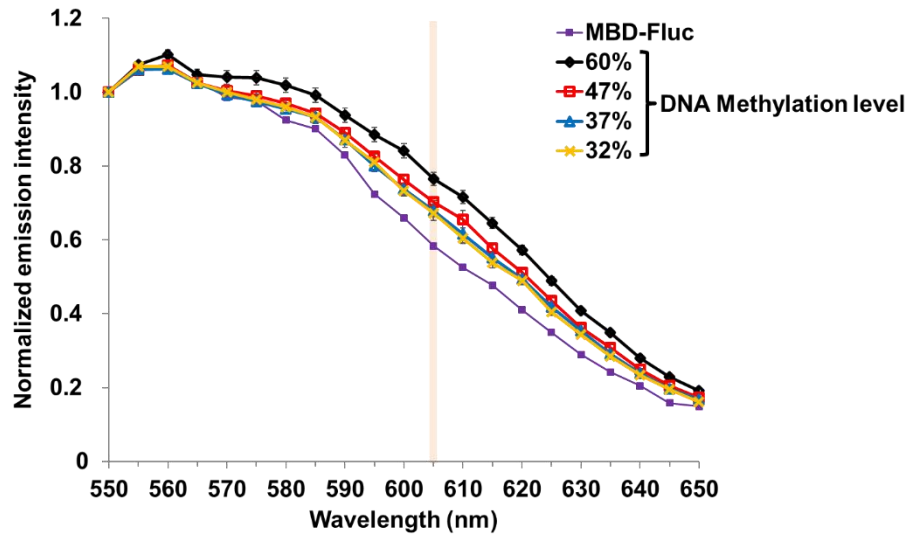


Figure 5-33 550 nm の発光/蛍光強度で補正した発光/蛍光スペクトル

抽出された MBD-Fluc の各発光スペクトル(Fig. 5-32)と MBD-Fluc と BOBO-3 を含む発光/蛍光スペクトル(Fig. 5-31)の各波長における発光/蛍光強度を 550 nm の発光/蛍光強度で補正した(mean \pm SD, $N = 3$)。黄色のハイライトが 605 nm の波長を示す。

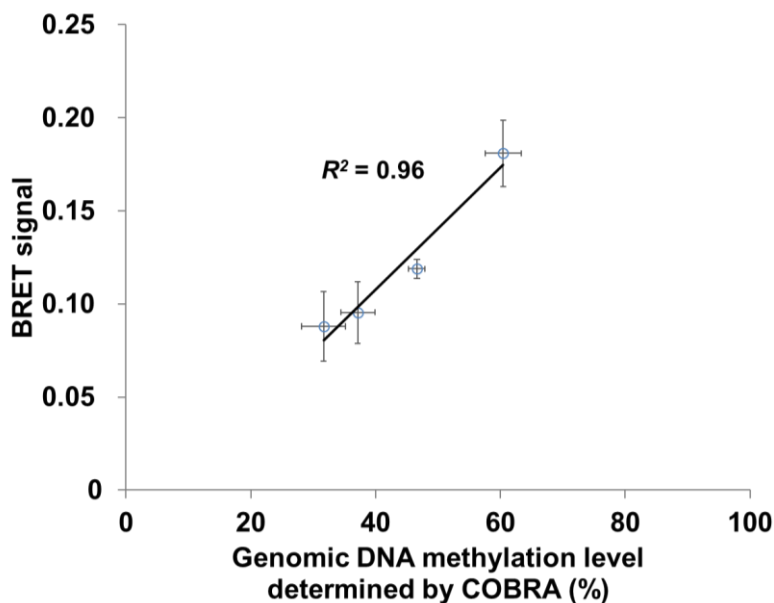


Figure 5-34 605 nm における BRET シグナル

COBRA によって評価された HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルに対して BOBO-3 の BRET シグナルをプロットした(mean \pm SD, $N = 3$)。

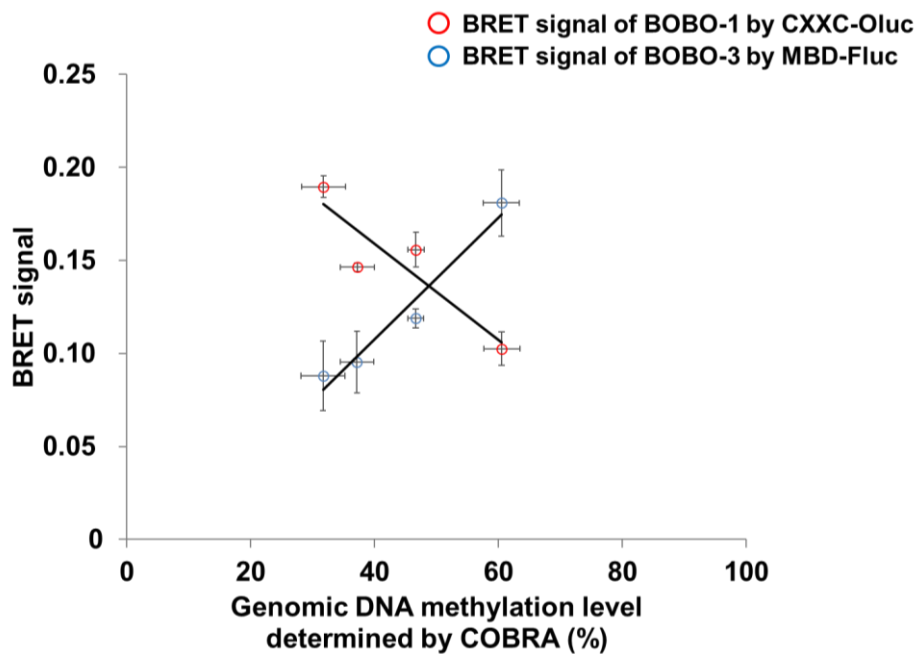


Figure 5-32 マルチカラー-BRET assay から得られた BRET シグナル

COBRA によって評価された HeLa ゲノム DNA のメチル化レベルに対してマルチカラー-BRET assay から得られた各 BRET シグナルをプロットした(mean \pm SD, $N = 3$)。

最後に、下記の方程式を使用すれば、マルチカラー-BRET assay から得られたの BOBO-1 の BRET シグナル(非メチル化 CpG 量)と BOBO-3 の BRET シグナル(メチル化 CpG 量)の比率からゲノム DNA のメチル化レベルを定量できると考えた。下記の方程式で算出されるゲノム DNA のメチル化レベルは、各 BRET シグナルを足し合わせた値を 100%として計算している。

$$\text{Genomic DNA methylation level (\%)} = \text{IMBD} \times 100 / (\text{IMBD} + \text{ICXXC})$$

(IMBD = BRET signal of BOBO-3 by MBD-Fluc, ICXXC = BRET signal of BOBO-1 by CXXC-Oluc)

COBRA によって評価されたゲノム DNA のメチル化レベルと、マルチカラー-BRET assay から得られた BRET シグナルの比率から算出されたゲノム DNA のメチル化レベルとの間に、正の相関が示された (Table 5-5, Fig. 5-36)。

以上の結果より、マルチカラー-BRET assay によって、検量線を必要とせずに、ゲノム DNA のメチル化レベルを簡便に定量できることを示している。さらに、この時の決定係数 R^2 値は 0.96 であり、相対標準偏差は 7.4%以下であった。

Table 5-5 MBD-Fluc と CXXC-Oluc を用いたマルチカラー-BRET assay から得られた BRET シグナルの比率から算出されるゲノム DNA のメチル化レベル

Genomic DNA methylation level determined by COBRA (%)	60±2.9	47±1.3	37±2.7	32±3.5
ICXXC (BRET signal of BOBO-1 by CXXC-Oluc)	0.10±0.0091	0.16±0.0092	0.15±0.0024	0.19±0.0058
IMBD (BRET signal of BOBO-3 by MBD-Fluc)	0.18±0.018	0.12±0.0051	0.095±0.017	0.088±0.019
ICXXC+IMBD	0.28±0.025	0.27±0.014	0.24±0.019	0.28±0.013
Genomic DNA methylation level determined by BRET assay (%)	64±1.6	43±0.70	39±3.6	31±5.1

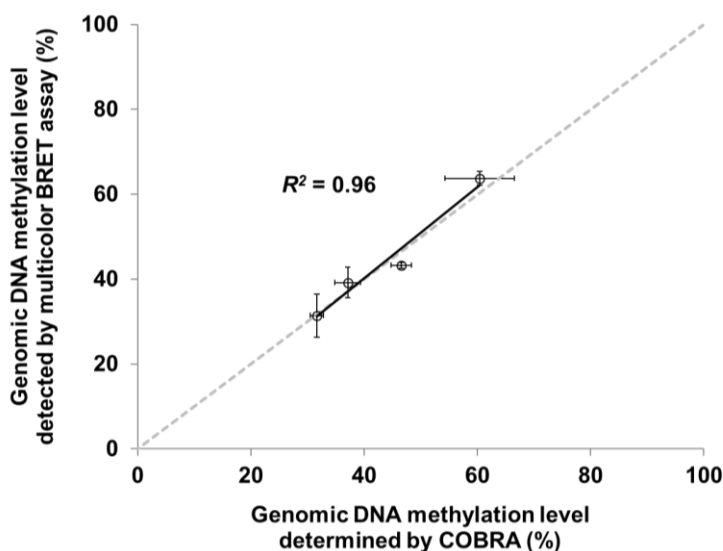


Figure 5-36 マルチカラー-BRET assay によるゲノム DNA のメチル化レベルの定量

COBRA によって評価されたゲノム DNA のメチル化レベルに対して、マルチカラー-BRET assay から得られた各 BRET シグナルの比率から算出されるゲノム DNA のメチル化レベルをプロットした (mean ± SD, N = 3)。

5 節 結言

第 5 章の目的は、マルチカラーアッセイを用いたゲノム DNA のメチル化レベルを定量する方法を開発することである。第 4 章で MBD-Fluc と CXXC-Fluc を用いた各 BRET assay によりヒトゲノム DNA のメチル化レベルを定量できることを示した。一方、同じ発光蛋白質 Fluc が MBD と CXXC の両方に融合されているため、これらの assay は別々に実行する必要がある。

そこで本章では、Fluc よりも波長が低い Oluc に着目し、CXXC-Oluc と BOBO-1 を用いれば、ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を測定できると考えた。そのため、得られる CXXC-Oluc と BOBO-1 間の BRET シグナルは、MBD-Fluc と BOBO-3 間の BRET シグナルとは異なる波長領域で検出される。つまり、メチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量を異なる領域で測定することができる。したがって、MBD-Fluc と CXXC-Oluc を同時に用いれば、BOBO-3 と BOBO-1 が励起され、得られる各蛍光強度の比率からゲノム DNA のメチル化レベルを定量できると考えた。

実際に、CXXC-Oluc 発現ベクターを構築し、大腸菌 BL21 (DE3)を用いて CXXC-Oluc を組換え生産した。さらに、組換え生産した CXXC-Oluc は非メチル化 CpG 結合能と luciferase 活性の両方を保持していることが示された。ヒトゲノム DNA を標的にしてマルチカラー-BRET assay を行った結果、ヒトゲノム DNA 濃度依存的に BOBO-1 の蛍光強度は低下し、BOBO-3 の蛍光強度は増加した。さらに、各蛍光強度から定量されたゲノム DNA のメチル化レベルは、COBRA によって定量されたメチル化レベルと正の相関を示した。

本章では、CXXC-Oluc と MBD-Fluc を用いて、各 BOBO-1 と BOBO-3 蛍光強度を測定することにより検体に試薬を混ぜるだけでゲノム 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ことが示された。また各 BOBO-1 と BOBO-3 蛍光強度の比率は、ゲノム DNA のメチル化レベルと相関することが示された。LC-MS を利用した assay は 3.0 μg のゲノム DNA が必要であることが報告されている^[82]。バイサルファイト変換法を利用した assay は約 1.0 μg が必要である^[83]。マルチカラー-BRET assay は約 1.3 μg のゲノム DNA で測定可能である。つまり、マルチカラー-BRET assay の検出限界が LC-MS を利用した assay やバイサルファイト変換法を利用した assay の検出限界に同等であることを示した。

第 6 章 考察

第6章 考察

本研究において、ゲノム DNA のメチル化レベルを迅速・簡便に定量する方法を開発した。その原理は、BRET assay に基づいた方法である。MBD-Fluc をゲノム DNA に混合すると、MBD-Fluc がメチル化 CpG に結合する。そこに、Fluc の基質として PicaGene を加えると Fluc が発光する。その際に、BOBO-3 を予めゲノム DNA に結合させておくと、Fluc の発光により BOBO-3 が励起され、蛍光を発する。この蛍光強度はゲノム DNA のメチル化 CpG 量に依存する。また、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、検量線を必要としないでゲノム DNA のメチル化レベルを定量できる方法も開発した。さらに、Fluc よりも最大発光波長が短い Oluc を組み合わせることにより、CXXC-Oluc, MBD-Fluc, BOBO-1 および BOBO-3 を用いたマルチカラーBRET assay によりゲノム DNA のメチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量を異なる蛍光波長領域で同時に測定できる方法も開発した。

1節 CpG サイトに対する MBD と CXXC の認識機構

ヒトゲノム DNA の約 32 億塩基中には約 2800 万カ所の CpG が存在し、正常な細胞では 70-80%メチル化されている^[75]。また、CpG アイランドと呼ばれる CpG が密な領域は、500 塩基以上内に 50%以上の CpG を含んでいる^[84, 85]。そのため、CpG サイトの確率的出現頻度が 6%以上であり、CpG アイランドでは、平均 30 塩基毎に CpG サイトが存在することになる。本測定法で使用した MBD と CXXC は、CpG サイトを含む 6 塩基を認識している^[57, 66]。そのため、平均 30 塩基毎に CpG サイトが存在する CpG アイランド内でも蛋白質同士の障害は起きにくいと考えられる。

BOBO-1 と BOBO-3 の結合様式に関して、BOBO-1 と BOBO-3 の NMR 解析は行われていないが、BOBO-1 と BOBO-3 と同様の二量体シアニンを持つ TOTO-1 が NMR で解析されている(Fig. 6-1, 2)^[86]。そのため、BOBO-1 と BOBO-3 は TOTO-1 と同様の二量体シアニンを持つため、TOTO-1 と同じような結合様式であると考えられる。そのため、BOBO-1 と BOBO-3 が CpG サイトに結合した際、認識蛋白質(MBD や CXXC)の結合を妨げる可能性がある。

本マルチカラーBRET assay では、0.12 fmol の BOBO-1, BOBO-3 および 1.8 amol のゲノム DNA (3.8 μ g)を使用した。このとき、BOBO-1 と BOBO-3 は TOTO-1 と同様の結合様式でゲノム DNA の塩基対間に挿入されると考えられるため、使用したゲノム DNA の 32 億塩基間に挿入される BOBO-1 と BOBO-3 の挿入箇所は 3.2 nmol となる。そのため、使用した BOBO-1 と BOBO-3 (0.12 fmol)がゲノム DNA の 32 億塩基間(3.2 nmol)を占める割合は、1%未満である。またヒトゲノム DNA において、CpG サイトの確率的出現頻度は 6%である。したがって、BOBO-1 と BOBO-3 が CpG サイトに挿入される確率は低いと考えられる。そのため、BOBO-1 と BOBO-3 は認識蛋白質(MBD や CXXC)が結合した近傍の塩基内に結合していることが予想される。

以上より本 BRET assay では、認識蛋白質(MBD と CXXC)は、CpG が密な領域においても蛋白質同士の立体障害や BOBO-1 と BOBO-3 の影響を受けないで標的領域に結合していると考えられる。

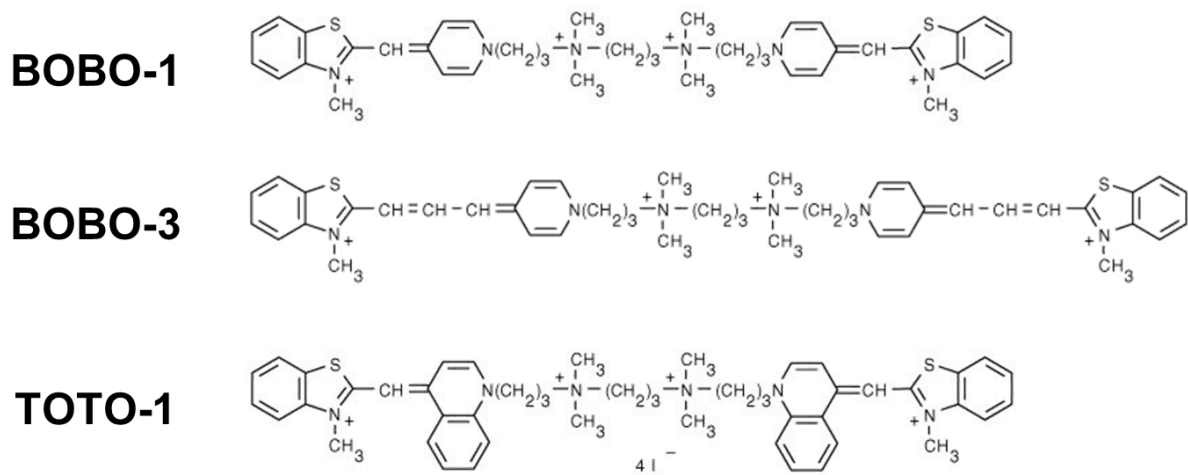


Figure 6-1 二量体シアニンを持つ **BOBO-1**, **BOBO-3** および **TOTO-1** の化学構造

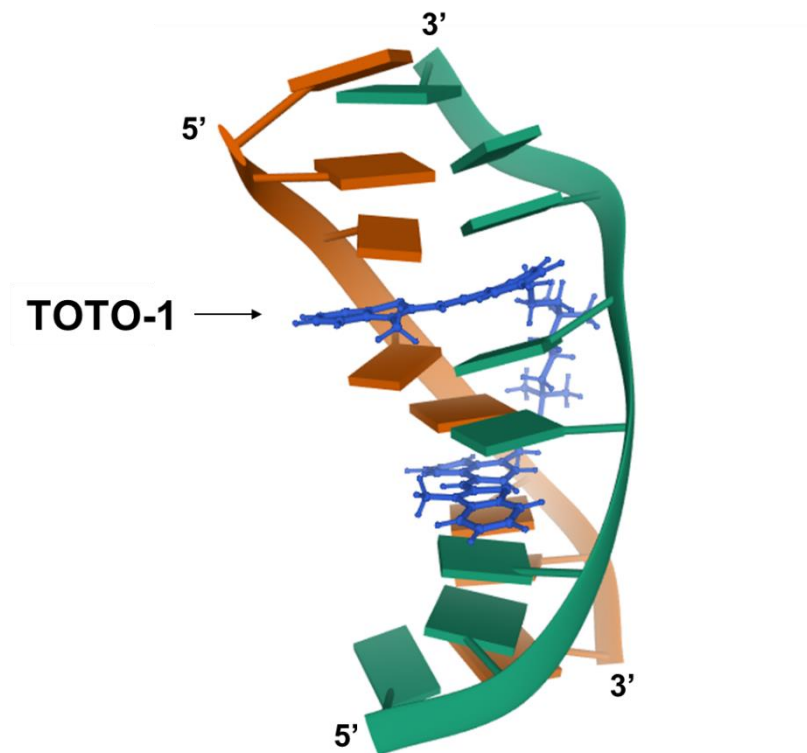


Figure 6-2 NMR 解析による **TOTO-1** の結合様式

2節 本 BRET assay における融合蛋白質の発光強度

本 BRET assay において、異なる融合蛋白質(MBD-Fluc, CXXC-Fluc, CXXC-Oluc)から得られる発光強度は異なる。非メチル化 CpG 量またはメチル化 CpG 量に依存する BRET シグナルは、補正されたスペクトルの BOBO-3 の最大蛍光波長の発光強度で算出される。したがって、異なる発光強度で BRET assay を行っても得られる BRET シグナルの値は変わらないため、BRET シグナルの比率からゲノム DNA のメチル化レベルを算出できる。同様に、ロット間で得られる融合蛋白質の発光強度も異なるが、得られる BRET シグナルの値は変わらない。

実際に、第 5 章で使用した CXXC-Oluc (lot 1)と MBD-Fluc (lot 1)よりも発光強度が低い CXXC-Oluc (lot 2)と MBD-Fluc (lot 2)でマルチカラー-BRET アッセイを行った。CXXC-Oluc (lot 1), MBD-Fluc (lot 1), CXXC-Oluc (lot 2)および MBD-Fluc (lot 2)の発光スペクトルを Fig. 6-3 に示す。CXXC-Oluc (lot 2)と MBD-Fluc (lot 2)を用いたマルチカラー-BRET assay の結果、BRET シグナルから算出されたゲノム DNA のメチル化レベルは COBRA で評価したゲノム DNA のメチル化レベルと正の相関を示した(Fig. 6-4)。

以上より、異なる発光強度の融合蛋白質を使用した場合においても、得られる BRET シグナルの値は変わらないためゲノム DNA のメチル化レベルを測定することができることが示された。

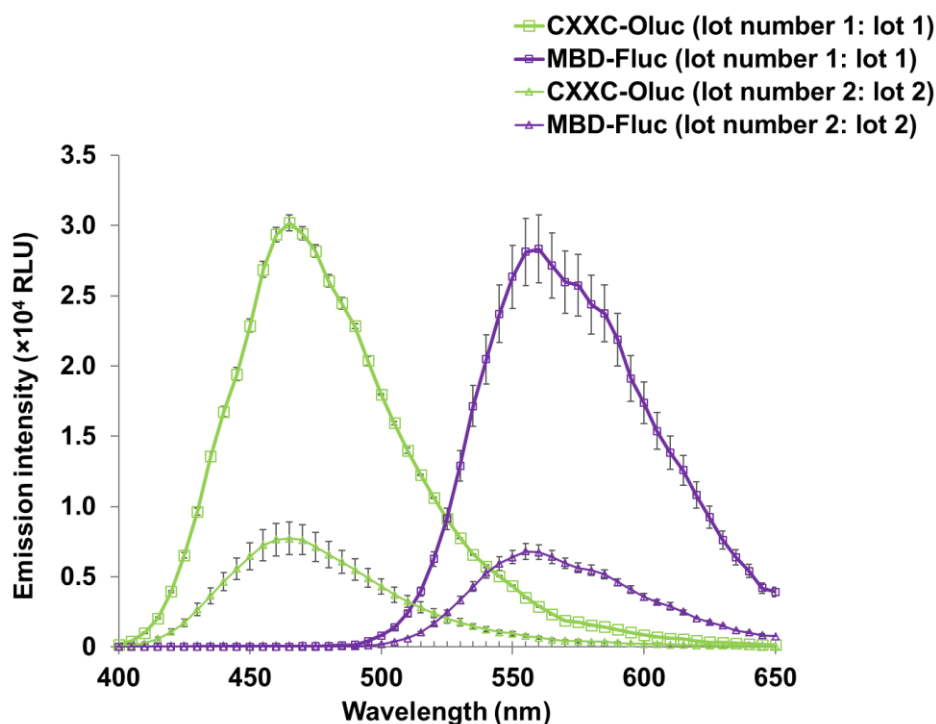


Figure 6-3 異なるロット間の CXXC-Oluc と MBD-Fluc の発光スペクトル

HeLa ゲノム DNA (38 ng/ μ L)の存在下の 1 \times PBS (50 μ L)に、45 nM CXXC-Oluc または 45 nM MBD-Fluc を混合し、Fluc の発光基質溶液(25 μ L PicaGene)と Oluc の発光基質溶液 25 μ L (5.0 μ g/mL coelenterazine h)を添加した後に、発光スペクトルを測定した(mean \pm SD, N = 3)。橙色は、第 5 章で使用した CXXC-Oluc (#1)の発光スペクトルを示す。紫色は、第 5 章で使用した MBD-Fluc (#1)の発光スペクトルを示す。緑色は異なるロットの CXXC-Oluc (#2)の発光スペクトルを示す。赤色は、異なるロットの MBD-Fluc (#2)の発光スペクトルを示す。

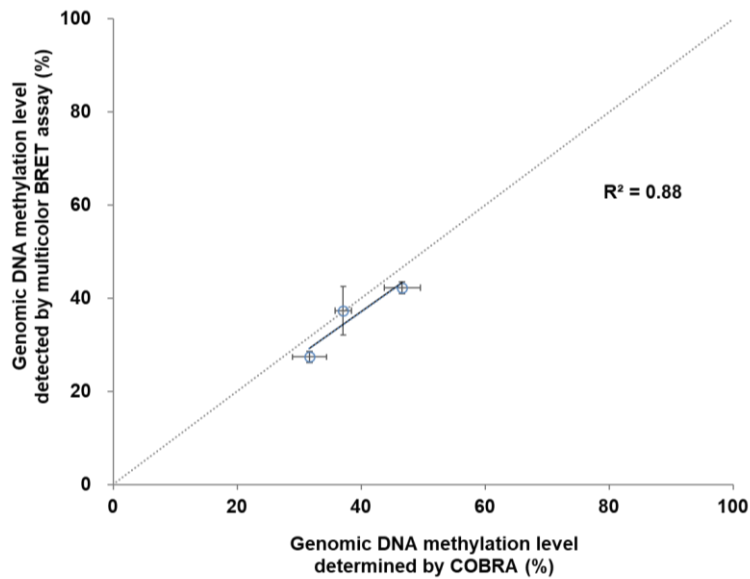


Figure 6-4 マルチカラー-BRET assay によるゲノム DNA のメチル化レベルの定量

COBRA によって評価されたゲノム DNA のメチル化レベルに対して、マルチカラー-BRET assay から得られた各 BRET シグナルの比率から算出されるゲノム DNA のメチル化レベルをプロットした。

3 節 本 BRET assay の精度および疾患診断への展望

MBD-Fluc を使用した BRET assay は、ゲノム DNA 内のメチル化状態の変化を観測することができるが、メチル化 CpG 量の濃度に依存するためゲノム 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。検量線を必要としない方法を開発するために、CXXC-Flu を使用した BRET assay によって非メチル化 CpG 量を測定する方法を開発した。このときの BRET assay の相対標準偏差は、2.2% 以下であるため、ゲノム DNA のメチル化レベルに対して 2.2% 以上の差異を検出できる。その正確性は LC-MS を用いた方法と同程度である。また、マルチカラー-BRET assay の相対標準偏差は 7.3% 以下であった。健常者と比較して、肺がん、結腸がん、食道がん、胃がん患者から採取したゲノム DNA のメチル化レベルは約 6.0~16% 低下していることが報告されている^[21, 22, 23, 24]。つまり、本 BRET assay ががん診断に適用できると考えられる。

また、がんのバイオマーカーとして遊離 DNA を使用した場合、健常者の血中遊離 DNA のメチル化レベルと比較して、肝細胞がんや神経膠腫患者の血中遊離 DNA のメチル化レベルは約 12% 低下していることが報告されている。がん患者のメチル化 DNA 血中濃度は 25-75 ng/mL であるのに対して、本 BRET assay の測定限界は 1.5 µg/mL であるため、20-60 倍向上させる必要がある。

本 BRET assay の検出限界を向上させる方法として、認識蛋白質の結合能の向上が挙げられる。単量体 MBD を四量体 MBD にすることにより結合能が 50 倍に向上することが報告されている^[87]。つまり、四量体 MBD-Fluc を用いた BRET assay を開発することができれば、血中遊離 DNA を標的にできると考えられる。同様に CXXC も四量体 CXXC に改良すれば、BRET assay ベースの血中がん診断を開発することができると思われる。

がん以外でも統合失調症や双極性障害といった精神疾患等においてゲノム DNA のメチル化レベルが減少していることが報告されているが^[42]、ゲノム DNA のメチル化レベルから精神疾患患者とがん患者を区別することは難しいと考えられるが、健常者と統合失調症患者から採取される全血において特異的な領域の DNA メチル化レベルが有意に変化することが報告されている。その同定された特異的な領域は、family with sequence similarity 63, member B (*FAM63B*), Rho GTPase activating protein 26 (*ARHGAP26*), CTAGE family member 11, pseudogene (*CTAGE11P*), TBC1 domain family member 22A (*TBC1D22A*), 染色体 16 番 intergenic 領域(IR in chr 16)の 5 カ所である^[88, 89, 90]。双極性障害疾患においては、統合失調症患者とは異なり、健常者と比較して *TBC1D22A* 領域のメチル化レベルは有意に高メチル化されていることが報告されている^[91]。つまり、特異的な領域のメチル化レベルを測定することができれば、精神疾患患者とがん患者を区別できると考えられる。

領域特異的に認識できる蛋白質として、transcription-activator-like effector (TALE)が知られている^[92]。TALE は約 34 個のアミノ酸残基からなる相同な構造である。このアミノ酸残基中に repeat-variable di-residues (RVD)とよばれる可変残基が 1 塩基(A, G, T, C)を特異的に認識する^[93, 94, 95, 96, 97]。この RVD を改変することにより、任意の配列に結合する TALE-repeat を設計することができる。また、5mC, 5hmC, 5foC および 5caC に特異的な RVD も同定されている^[98, 99, 100]。そのため、本 BRET assay に使用される MBD の領域を TALE に改変すれば、特異的な領域の DNA メチル化レベルを測定できる。

以上より、本 BRET assay は、メチル化レベルに対して 2.2%以上の差異を検出でき、患者の血中から採取されるゲノム DNA のメチル化レベルだけでなく特異的な領域のメチル化レベルを測定できることが予想される。

第 7 章 結論

第7章 結論

本研究はがんのバイオマーカーであるヒトゲノム DNA のメチル化レベルを迅速・簡便・正確に定量する方法を開発することを目的とした。

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 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5mC抗体やMBDを用いる方法と3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-Fluc と DNA intercalating dye 間で生じる BRET を利用した二本鎖 DNA 検出法が開発されている。そこで、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。

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を示した。

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。

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、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 LC-MS 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 のメチル化レベル定量法の開発」では、簡便にゲノム DNA のメチル化レベルを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。

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定量できることを示した。

以上より、本研究において、BRET に基づいたゲノム DNA のメチル化レベルを定量する方法を開発した。本研究で開発したゲノム DNA メチル化レベル測定法は、検量線を必要とせず、検体に試薬を混ぜるだけで測定可能な方法である (Table 7-1)。また、その正確性は、LC-MS 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を示した(Fig. 7-1)。また、本BRET assayは認識蛋白質をTALENに改変すれば、患者の血中から採取されるゲノムDNAのメチル化レベルだけでなく特異的な領域のメチル化レベルを測定できることが予想される。

Table 7-1 各ゲノム DNA のメチル化レベル測定法と本 BRET assay の特徴

Method	Time	Standard curve	Amount of genomic DNA	R. S. D.
LC-MS	1.0 h	Not required	3.0 μ g	< 2.0%
WGBS	10 h	Not required	1.0 μ g	< 2.0%
COBRA	10 h	Not required	1.0 μ g	< 2.0%
MeDIP-seq	3.0 h	Required	1.0 μ g	< 2.6%
ELISA	1.5 h	Required	0.010 μ g	< 1.5%
MBD-split luc	30 min	Required	0.50 μ g	< 10%
MBD-Fluc CXXC-Fluc	35 min	Not required	1.5 μ g	< 2.2%
Multi-color	35 min	Not required	1.3 μ g	< 7.2%

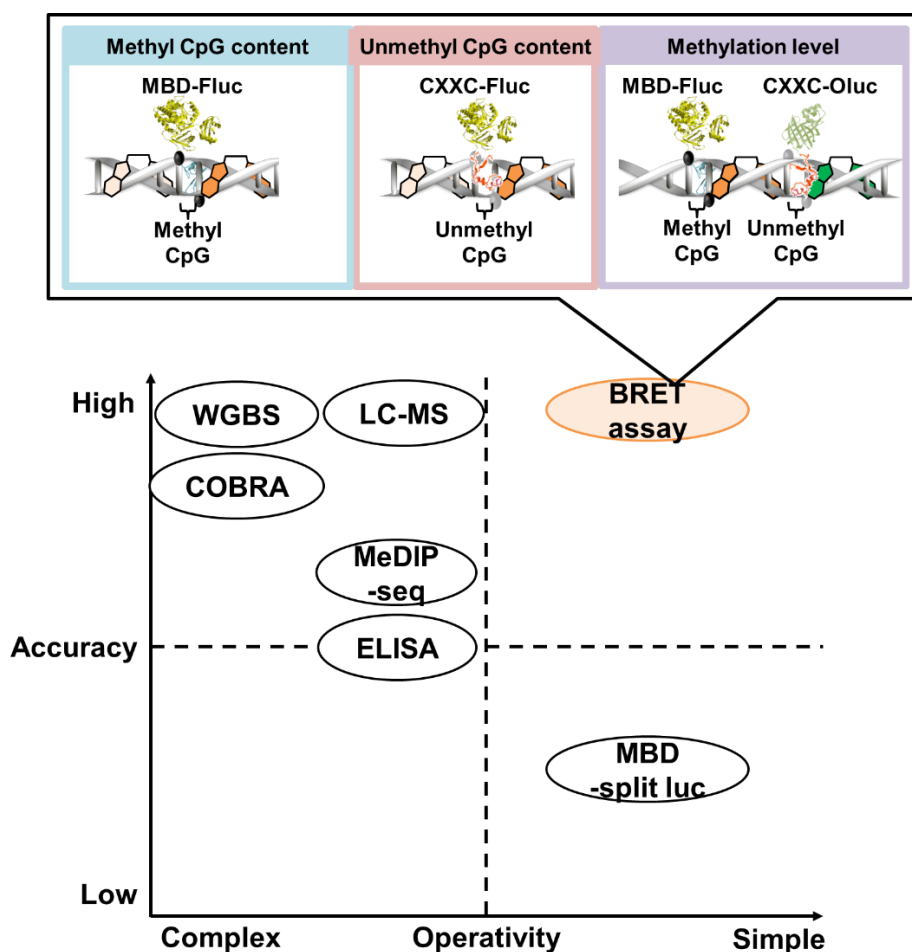


Figure 7-1 ゲノム DNA のメチル化レベル測定法に関する本研究の開発領域

引用文献および論文目録

引用文献および論文目録

【引用文献】

1. Li E., Bestor T. H. and Jaenisch R., Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 1992; 69: 915-926.
2. Chen R. Z., Pettersson U., Beard C., Jackson-Grusby L. and Jaenisch R., DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*, 1998; 395: 89-93.
3. Law J. A. and Jacobsen S. E., Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.*, 2010; 11: 204-220.
4. Bestor T., Laudano A., Mattaliano R., and Ingram V., Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J. Mol. Biol.*, 1988; 203: 971-983.
5. Okano M., Bell D. W., Haber D. A., and Li E., DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 1999; 29: 247-257.
6. Jurkowska, R. Z., Jurkowski T. P. and Jeltsch. A., Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem.*, 2011; 12: 206-222.
7. Daura-Oller E., Cabre M., Montero M. A., Paternain J. L., and Romeu A., Specific gene hypomethylation and cancer: new insights into coding region feature trends. *Bioinformatics*. 2009; 3: 340-343.
8. Taby R., and Issa J. P., Cancer epigenetics. *C. A. Cancer J. Clin.* 2010; 60: 376-392.
9. Torano E. G., Petrus S., Fernandez A. F., and Fraga M. F., Global DNA hypomethylation in cancer: review of validated methods and clinical significance. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2012; 50: 1733-1742.
10. Schulz, W. A., Steinhoff, C., and Florl, A. R., Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006; 310: 211-250.
11. Barchitta M., Quattrocchi A., Maugeri A., Vinciguerra M., and Agodi A., LINE-1 hypomethylation in blood and tissue samples as an epigenetic marker for cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014; 9: e109478.
12. Law J. A., and Jacobsen S. E., Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 2010; 11: 204-220.
13. Jones P. A. and Baylin S. B., The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007; 128: 683-692.
14. Hansen K. D., Timp W., Bravo H. C., Sabunciyan S., Langmead B., McDonald O. G. Wen B., Wu H., Liu Y., Diep D., Briem E., Zhang K., Irizarry R. A. and Feinberg A. P., Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat. Genet.*, 2011; 43: 768-775.
15. Berman B. P., Weisenberger D. J., Aman J. F., Hinoue T., Ramjan Z., Liu Y. Noushmehr H., Lange C. P. E., Dijk C. M., Tollenaar R. A. E. M., Berg D. V. D. and Laird P. W., Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat. Genet.*, 2012; 44: 40-46.
16. Bert S. A., Robinson M. D., Strbenac D., Statham A. L., Song J.Z., Hulf T. Sutherland R. L., Coolen M W., Stirzaker C. and Clark S. J., Regional activation of the cancer genome by long-range epigenetic

- remodeling. *Cancer Cell*, 2013; 23: 9-22.
17. Ehrlich M. and Lacey M., DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013; 754: 31-56.
 18. Zhang Y., Yang L., Kucherlapati M., Hadjipanayis A., Pantazi A., Bristow C. A., Lee E. A., Mahadeshwar H. S., Tang J., Zhang J., Seth S., Lee S., Ren X., Song X., Sun H., Seidman J., Luquette L. J., Xi R., Chin L., Protopopov A., Park P. J., Kucherlapati R. and Creighton C. J., Global impact of somatic structural variation on the DNA methylome of human cancers. *Genome Biol.*, 2019; 20: 209.
 19. Mikeska T., and Craig J. M., DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. *Genes.*, 2014; 5: 821-864.
 20. Nebbioso A., Tambaro F. P., Dell'Aversana C., and Altucci L., Cancer epigenetics: moving forward. *PLoS Genet.*, 2018; 14: e1007362.
 21. Daskalos A., Nikolaidis G., Xinarianos G., Savvari P., Cassidy A., Zakopoulou R., Kotsinas A., Gorgoulis V., Field J. K. and Liloglou T., Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*, 2009; 124: 81-87.
 22. Hur K., Cejas P., Feliu J., Moreno-Rubio J., Burgos E., Boland C. R. and Goel A., Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of protooncogenes in human colorectal cancer metastasis. *Gut.*, 2014; 63: 635–646.
 23. Iwagami S., Baba Y., Watanabe M., Shigaki H., Miyake K., Shigaki H., Miyake K., Ishimoto T., Iwatsuki M., Sakamaki K., Ohashi Y. and Baba H., LINE-1 Hypomethylation Is Associated With a Poor Prognosis Among Patients With Curatively Resected Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann. Surg.* 2013; 257: 449-445
 24. Shigaki H., Baba Y., Watanabe M., Murata A., Iwagami S., Miyake K., Ishimoto T., Iwatsuki M. and Baba H., LINE-1 hypomethylation in gastric cancer, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. *Gastric Cancer*. 2013; 16: 480-487.
 25. Schwarzenbach H., Hoon D. S. B., and Pantel K., Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer*, 2011; 11:426-437.
 26. Chen J., Huan W., Zuo H., Zhao L., Huang C., Liu X., Hou S., Qi J., and Shi W., Alu methylation serves as a biomarker for non-invasive diagnosis of glioma. *Oncotarget.*, 2016; 7: 26099-26106.
 27. Chan K. C. A., Jiang P., Chan C. W. M., Sun K., Wong J., Hui E. P., Chan S. L., Chan W. C., Hui D. S. C., Ng S. S. M., Chan H. L. Y., Wong C. S. C., Ma B. B. Y., Chan A. T. C., Lai P. B. S., Sun H., Chiu R. W. K., and Loa Y. M. D., Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2013; 110: 18761-18768.
 28. Jones P. A. and Takai D., The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science*, 2001; 293: 1068-1070.
 29. Niculescu, M. D., and S. H. Zeisel., Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *The Journal of Nutrition*, 2002; 132: 2333s-2335s.

30. Lu S. C., Alvarez L., Huang Z. Z., Chen L., An W., Corrales F. J., Avila M. A., Kanel G. and Mato J. M., Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2011; 98: 5560-5565.
31. Kim Y., Pogribny I., Basnakian A., Miller J., Selhub J., James S. and Mason J., Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997; 65: 46-52.
32. Alonso-Aperte E. and Varela-Moreiras G., Brain folates and DNA methylation in rats fed a choline deficient diet or treated with low doses of methotrexate. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 1996; 66: 232-236.
33. Fang J. Y., Xiao S. D., Zhu S. S., Yuan J. M., Qiu D. K. and Jiang S. J., Relationship of plasma folic acid and status of DNA methylation in human gastric cancer. *J. Gastroenterol.*, 1997; 32: 171-175.
34. Jacob R. A., Gretz D. M., Taylor P. C., James S. J., Pogribny I. P., Miller B. J., Henning S. M. and Swendseid M. E., Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J. Nutr.*, 1998; 128: 1204-1212.
35. Fowler B. M., Giuliano A. R., Piyathilake C., Nour M. and Hatch K., Hypomethylation in cervical tissue: is there a correlation with folate status? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998; 7: 901-906.
36. Lee J. W., Jaffar Z., Pinkerton K. E., Porter V., Postma B., Ferrini M., Holian A., Roberts K. and Cho Y. H., Alterations in DNA methylation and airway hyperreactivity in response to in utero exposure to environmental tobacco smoke. *Inhal. Toxicol.*, 2015; 27: 724-730.
37. Bollati V., Baccarelli A., Hou L., Bonzini M., Fustinoni S., Cavallo D., Byun HM., Jiang J., Marinelli B., Pesatori A. C., Bertazzi P. A., and Yang A. S., Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer Res.*, 2007; 67: 876-880.
38. Sartor M. A., Leikauf G. D., and Medvedovic M., LRpath. a logistic regression approach for identifying enriched biological groups in gene expression data. *Bioinformatics.*, 2009; 25: 211-217.
39. Baccarelli A., Wright R. O., Bollati V., Tarantini L., Litonjua A. A., Suh H. H., Zanobetti A., Sparrow D., Vokonas P. S., and Schwartz J., Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2009; 179: 572-578.
40. Wright R. O., Schwartz J., Wright R. J., Bollati V., Tarantini L., Park S. K., Hu H., Sparrow D., Vokonas P., and Baccarelli A., Biomarkers of lead exposure and DNA methylation within retrotransposons. *Environ. Health Perspect.*, 2010; 118: 790-795.
41. Kile M. L., Baccarelli A., Hoffman E., Tarantini L., Quamruzzaman Q, Rahman M., Mahiuddin G., Mostofa G., Hsueh Y. M., Wright R. O., and Christiani D. C., Prenatal arsenic exposure and DNA methylation in maternal and umbilical cord blood leukocytes. *Environ. Health Perspect.*, 2012; 120: 1061-1066.
42. Murata Y., Ikegame T., Koike S., Saito T., Ikeda M., Sasaki T., Iwata N., Kasai K., Bundo M., and Iwamoto K., Global DNA hypomethylation and its correlation to the betaine level in peripheral blood of patients with schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, 2020; 99: 109855.
43. Koike S., Bundo M., Iwamoto K., Suga M., Kuwabara H., Ohashi Y., Shinoda K., Takano Y., Iwashiro

- N., Satomura Y., Nagai T., Natsubori T., Tada M., Yamasue H., and Kasai K., A snapshot of plasma metabolites in first-episode schizophrenia: a capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry study, *Transl. Psychiatry.*, 2014; 4: e379.
44. Sakaguti Y., 蛋白質標準物質に関する調査研究. *測定と制御*, 2016 ; 55: 448-457.
 45. Kok R. M., Smith D. E. C., Barto R., Spijkerman A. M. W., Teerlink T., Gellekink H. J., Jakobs C. and Smulders Y. M., Global DNA methylation measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: analytical technique, reference values and determinants in healthy subjects. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007; 45: 903-911.
 46. Tahiliani M., Koh K. P., Shen Y., Pastor W. A., Bandukwala H., Brudno Y., Agarwal S., Iyer L. M., Liu D. R., Aravind L. and Rao A., Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009; 324: 930-935.
 47. Ito S., D'Alessio A. C., Taranova O. V., Hong K., Sowers L. C. and Zhang Y., Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010; 466: 1129-1133.
 48. He Y. F., Li B. Z., Li Z., Liu P., Wang Y., Tang Q., Ding J., Jia Y., Chen Z., Li L., Sun Y., Li X., Dai Q., Song C. X., Zhang K., He C. and Xu G. L., Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*. 2011; 333: 1303-1307.
 49. Yang H., Liu Y., Bai F., Zhang J.-Y., Ma S.-H., Liu J., Xu Z.-D., Zhu H.-Q., Ling Z.-Q., Ye D., Guan K.-L., and Xiong Y., Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene*, 2013; 32: 663-669.
 50. Jin S.-G., Jiang Y., Qiu R., Rauch T. A., Wang Y., Schackert G., Krex D., Lu Q., and Pfeifer G. P., 5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations. *Cancer Res.*, 2011; 71: 7360-7365.
 51. Tang Y., Zheng S.-J., Qi C.-B., Feng Y.-Q., and Yuan B.-F., Sensitive and simultaneous determination of 5-methylcytosine and its oxidation products in genomic DNA by chemical derivatization coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Anal. Chem.*, 2015; 87: 3445-3452.
 52. Shapiro R., and Yamaguchi H., Nucleic acid reactivity and conformation. I. Deamination of cytosine by nitrous acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972; 281: 501-506.
 53. Adusumalli S., Omar M. F. M., Soong R., and Benoukraf T., Methodological aspects of whole-genome bisulfite sequencing analysis. *Brief. Bioinform.*, 2015; 16: 369-379.
 54. Xiong Z., and Laird P. W., COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.*, 1997; 25: 2532-2534.
 55. Li D., Zhang B., Xing X., and Wang T., Combining MeDIP-seq and MRE-seq to investigate genome-wide CpG methylation. *Methods*, 2015; 72: 29-40.
 56. Kremer D., Metzger S., Kolb-Bachofen V., and Kremer D., Quantitative measurement of genome-wide DNA methylation by a reliable and cost-efficient enzyme-linked immunosorbent assay technique. *Anal. Biochem.*, 2012; 422: 74-78.
 57. Ohki I., Shimotake N., Fujita N., Jee J., Ikegami T., Nakao M., and Shirakawa M., Solution structure

- of the methyl-CpG binding domain of human MBD1 in complex with methylated DNA. *Cell*, 2001; 105: 4874-97.
58. Badran A. H., Furman J. L., Ma A. S., Comi T. J., Porter J. R., and Ghosh I., Evaluating the Global CpG Methylation Status of Native DNA Utilizing a Bipartite Split-Luciferase Sensor. *Anal. Chem.*, 2011; 83: 7151-7157.
59. Cross S. H., Meehan R. R., Nan, X. and Bird, A. A., Component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat. Genet.*, 1997; 16: 256-259.
60. Hendrich B. and Bird, A., Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 1998; 18: 6538-6547.
61. Nan X., Meehan, R. R., and Bird, A., Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic. Acids. Res.*, 1993; 21: 4886-4892.
62. Roloff T. C., Ropers H. H., and Nuber U. A., Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins. *BMC. Genomics.*, 2003; 4: 1.
63. Inomata K., Ohki I., Tochio H., Fujiwara K., Hiroaki H., and Shirakawa M., Kinetic and thermodynamic evidence for flipping of a methyl-CpG binding domain on methylated DNA. *Biochemistry*, 2008; 47: 3266-3271.
64. Cierpicki T., Risner L. E., Grembecka J., Lukasik S. M., Popovic R., Omonkowska M., Shultis D. D., Zeleznik-Le N. J., and Bushweller J. H., Structure of the MLL CXXC domain-DNA complex and its functional role in MLL-AF9 leukemia. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2010;17: 62-68.
65. Li Y., Han J., Zhang Y., Cao F., Liu Z., Li S., Wu J., Hu C., Wang Y., Shuai J., Chen J., Cao L., Li D., Shi P., Tian C., Zhang J., Dou Y., Li G., Chen Y. and Lei M., Structural basis for activity regulation of MLL family methyltransferases. *Nature*, 2016; 530: 447-452.
66. Risner L. E., Kuntimaddi A., Lokken A. A., Achille N. J., Birch N. W., Schoenfelt K., Bushweller J. H., and Zeleznik-Le N. J., Functional specificity of CpG DNA-binding CXXC domains in mixed lineage leukemia. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 29901-29910.
67. Seliger H. H., and Mcelroy W. D., Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960; 88: 136-141.
68. Shimomura O., Masugi T., Johnson F. H. and Haneda Y., Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilirostris*. *Biochemistry*, 1978; 17: 994-998.
69. Inouye K., Watanabe H., Nakamura O. and Shimomura., Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase. 2000; 481: 19-25.
70. Ruedas-Rama M. J., Alvarez-Pez J. M., Paredes J. M., Talavera E. M., and Orte. A., Binding of BOBO-3 intercalative dye to DNA homo-oligonucleotides with different base compositions. *J. Phys. Chem. B.*, 2010; 114: 6713-6721.
71. Madeira C., Loura L. M. S., Aires-Barros M. R., Fedorov A., and Prieto M., Characterization of

- DNA/Lipid Complexes by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Biophys. J.*, 2003; 85: 3106-3119.
72. Yoshida W., Kezuka A., Abe K., Wakeda H., Nakabayashi K., Hata K., and Ikebukuro K., Detection of histone modification by chromatin immunoprecipitation combined zinc finger luciferase-based bioluminescence resonance energy transfer assay. *Anal. Chem.*, 2013; 85: 6485-6490.
73. Hiraoka D., Yoshida W., Abe K., Wakeda H., Hata K., and Ikebukuro K., Development of a method to measure DNA methylation levels by using methyl CpG-binding protein and luciferase-fused zinc finger protein. *Anal. Chem.*, 2012; 84: 8259-8264.
74. Wang X., Song Y., Song M., Wang Z., Li T., and Wang H., Fluorescence polarization combined capillary electrophoresis immunoassay for the sensitive detection of genomic DNA methylation. *Anal. Chem.*, 2009; 81: 7885-7891.
75. Stirzaker C., Taberlay P. C., Statham A. L. and Clark S. J., Mining cancer methylomes: prospects and challenges. *Trends. Genet.* 2014; 30: 75-84.
76. Agrawal K., Das V., Vyas P., and Hajduch M., Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs - A comprehensive review from discovery to clinic. *Pharmacol. Ther.*, 2018; 188: 45-79.
77. Fojtova M., Piskala A., Votruba I., Otmar M., Bartova E. and Kovarik A., Efficacy of DNA hypomethylating capacities of 5-aza-2'-deoxycytidine and its alpha anomer. *Pharmacol. Res.*, 2007; 55: 16-22.
78. Matousova M., Votruba I., Otmar M., Tloustova E., Gunterova J. and Mertlikova-Kaiserova H., 2-deoxy-5,6-dihydro-5-azacytidine-a less toxic alternative of 2-deoxy-5-azacytidine: A comparative study of hypomethylating potential. *Epigenetics*, 2011; 6: 769-776.
79. Agrawal K., Das V., Otmar M., Krecmerova M., Dzubak P., Hajduch M., Cell-based DNA demethylation detection system for screening of epigenetic drugs in 2D, 3D, and xenograft models. *Cytometry A.*, 2017; 91: 133-143.
80. Shen L., Kantarjian H., Guo Y., Lin E., Shan J., Huang X., Berry D., Ahmed S., Zhu W., Pierce S., Kondo Y., Oki Y., Jelinek J., Saba H., Estey E., and Issa J-P. J., DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.*, 2010; 28: 605-613.
81. Hamm C. A., Xie H., Costa F. F., Vanin E. F., Seftor E. A., Sredni S. T., Bischof J., Wang D., Bonaldo M. F., Hendrix M. J. C., and Soares M. B., Global demethylation of rat chondrosarcoma cells after treatment with 5-Aza-2'-deoxycytidine results in increased tumorigenicity. *PLoS One*, 2009; 4: e8340.
82. Armstrong K. M., Bermingham E. N., Bassett S. A., Treloar B. P., Roy N. C., and Barnett M. P. G., Global DNA methylation measurement by HPLC using low amounts of DNA. *Biotechnol. J.*, 2011; 6: 113-117.
83. Xiong Z., and Laird P. W., COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.*, 1997; 25: 2532-2534.
84. Gardiner-Garden M. and Frommer M., CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.*, 1987; 196: 261-282.

85. Takai D. and Jones P. A., Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002; 99: 3740-3745.
86. Spielmann H. P., Wemmer D. E., and Jacobsen J. P., Solution structure of a DNA complex with the fluorescent bis-intercalator TOTO determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 1995; 34: 8542-8553.
87. Jørgensen H. F., Adie K., Chaubert P. and Bird A. P., Engineering a high-affinity methyl-CpG-binding protein. *Nucleic Acids Res.*, 2006; 34: e96.
88. Aberg K.A., McClay J.L., Nerella S., Clark S. Kumar G, Chen W., Khachane A. N., Xie L., Hudson A., Gao G., Harada A., Hultman C. M., Sullivan P. F., Magnusson P. K. E. and Oord E. J. C. G., Methylome-wide association study of schizophrenia: Identifying blood biomarker signatures of environmental insults. *JAMA. Psychiatry*, 2014; 71: 255-264.
89. Li L. C. and Dahiya R., MethPrimer: Designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 2002; 18: 1427-1431.
90. Sugawara H., Murata Y., Ikegame T, Sawamura R., Shimanaga S., Takeoka Y., Saito T., Ikeda M., Yoshikawa A., Nishimura F., Kawamura Y., Kakiuchi C., Sasaki T., Iwata N., Hashimoto M., Kasai K., Kato T., Bundo M. and Iwamoto K., DNA methylation analyses of the candidate genes identified by a methylome-wide association study revealed common epigenetic alterations in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatry. Clin. Neurosci.*, 2018; 72: 245-254.
91. Sugawara H., Murata Y., Ikegame T, Shimanaga S., Takeoka Y., Saito T., Ikeda M., Yoshikawa A., Nishimura F., Kawamura Y., Kakiuchi C., Sasaki T., Iwata N., Hashimoto M., Kasai K., Kato T., Bundo M. and Iwamoto K., 統合失調症と双極性障害における共通の DNA メチル化変化. *精神神経学雑誌*, 2019; 121: 251-258.
92. Cermak T., Doyle E. L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J. A., Somia N. V., Bogdanove A. J. and Voytas D. F., Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39: e82.
93. Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A. and Bonas U., Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009; 326:1509-1512.
94. Moscou M. J. and Bogdanove A. J., A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009; 326: 1501.
95. Kay S., Boch J. and Bonas U., Characterization of AvrBs3-like effectors from a Brassicaceae pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2005; 18: 838-848.
96. Schornack S., Minsavage G. V., Stall R. E., Jones J. B. and Lahaye T., Characterization of AvrHah1, a novel AvrBs3-like effector from *Xanthomonas gardneri* with virulence and avirulence activity. *New Phytol.*, 2008; 179: 546-556.
97. Cermak T., Doyle E. L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J. A., Somia N. V., Bogdanove A. J. and Voytas D. F., Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL

- effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39: e82.
98. Kubik G., Batke S. and Summerer D., Programmable sensors of 5-hydroxymethylcytosine. *J. Am. Chem. Soc.*, 2015; 137: 2-5.
99. Maurer S., Giess M., Koch O. and Summerer D., Interrogating Key Positions of Size-Reduced TALE Repeats Reveals a Programmable Sensor of 5-Carboxylcytosine. *A. C. S. Chem. Biol.*, 2016; 11: 3294-3299.
100. Rathi P., Maurer S., Kubik G. and Summerer D., Isolation of Human Genomic DNA Sequences with Expanded Nucleobase Selectivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 2016; 138: 9910-9918.

【本博士学位論文を構成する論文】

第 2 章を構成する論文

1. Yoshida W., Baba Y., Banzawa K., and Karube I., Global DNA methylation detection system using MBD-fused luciferase based on bioluminescence resonance energy transfer assay. *Anal. Chem.*, 2016; 88: 9264-9268.

第 3 章を構成する論文

2. Baba Y., Karube I., and Yoshida W., DNA methylation level monitoring by methyl-CpG binding domain-fused luciferase. *Anal. Lett.*, 2019; 52: 754-760.

第 4 章を構成する論文

3. Yoshida W., Baba Y., Banzawa K., and Karube I., A quantitative homogeneous assay for global DNA methylation levels using CpG-binding domain- and methyl-CpG-binding domain-fused luciferase. *Anal. Chim. Acta*, 2017; 990: 168-173.

第 5 章を構成する論文

4. Baba Y., Yamamoto K., and Yoshida W., Multicolor bioluminescence resonance energy transfer assay for quantification of global DNA methylation. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019; 411: 4765-4773.

【本博士学位論文に関連した学会発表】

1. 口頭発表

- 1) °山本 佳歩, 馬場 勇次, 吉田 亘、マルチカラー生物発光共鳴エネルギー移動を用いたゲノム DNA メチル化レベル絶対定量法の開発、第 41 回 日本分子生物学会年会、日本分子生物学会、2018 年 12 月
- 2) °馬場 勇次、軽部 征夫、吉田 亘、MBD と CXXC 融合 Luciferase を用いたグローバル DNA メチル化レベル簡易測定法の開発、第 40 回 日本分子生物学会年会、2017 年 12 月
- 3) °馬場 勇次、軽部 征夫、吉田 亘、MBD-luciferase と CXXC-luciferase を用いたグローバル DNA メチル化レベル測定法の開発、第 7 回 CSJ 化学フェスタ、2017 年 10 月
- 4) °馬場 勇次、軽部 征夫、吉田 亘、MBD-luciferase 融合蛋白質を用いたゲノムヒトゲノムの体のメチル化レベル簡易測定法の開発、第 39 回 日本分子生物学会年会、2016 年 12 月
- 5) °馬場 勇次、軽部 征夫、吉田 亘、MBD 融合 luciferase 蛋白質を用いたグローバル DNA メチル化レベル簡易測定法の開発、第 10 回 バイオ関連化学シンポジウム、2016 年 9 月
- 6) °馬場 勇次、軽部 征夫、吉田 亘、MBD-Luciferase 融合蛋白質を用いたグローバル DNA メチル化レベル測定方法の開発、第 38 回 日本分子生物学会年会、名古屋、2015 年 12 月

2. ポスター発表

- 7) °馬場 勇次、軽部 征夫、吉田 亘、MBD-luciferase と CXXC-luciferase 融合蛋白質を用いたゲノム DNA メチル化レベル測定法の開発、第 98 回日本化学会春季年会、2018 年 3 月
- 8) °馬場 勇次、人口発光蛋白質を利用した簡易癌診断法の開発、第 9 回大学コンソーシアム八王子学生発表会、2017 年 12 月
- 9) °馬場 勇次、スマートフォンを利用したがん診断法の開発、第 8 回大学コンソーシアム八王子学生発表会、2016 年 12 月
- 10) °馬場 勇次、MBD1 融合 Luciferase を用いたメチル化二本鎖 DNA 検出法の開発、第 7 回大学コンソーシアム八王子学生発表会、2015 年 12 月

謝辞

本研究を進めるにあたり、プレゼンテーションや研究の進め方、ヒトとしての心構えと多岐にわたる場面において終始適切なお指導と激励を賜りました、同専攻吉田亘講師に心から深くお礼申し上げます。注意力不足のために失敗をおこしてはたびたびご迷惑をお掛けしましたが、未熟な私を一から鍛え上げ、寛大な姿勢で見守ってくださり、さらには成長の機会を数多く与えて頂き誠に有難うございました。

本研究において、軽部征夫教授(2020年2月逝去)には多大なご協力とご支援を頂きました。また、同専攻横山憲二教授、佐藤淳教授、矢野和義教授ならびに秋元卓夫教授は副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を賜りました。ここに心から深く感謝申し上げます

同専攻中西昭仁助教には常にあたたかく見守っていただきました。そして共に研究に取り組んできた全ての卒業生の皆様、研究だけでなく様々な日常の場面で助けて頂きました。自身の博士論文がより良いものになったと思っております。この場を借りて心から深く感謝申し上げます。

最後に、博士課程への進学を応援し、学校生活を支えて下さった両親に心から感謝したいと思います。両親の支援がなければ到底ここまで来ることはできませんでした。

2021年3月16日

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
エビジェネティック工学研究室

馬場 勇次