

博士学位論文審査結果要旨

西暦 2021年 1月 28日

研究科、専攻名 バイオ・情報メディア研究科 バイオニクス専攻

学位申請者氏名 馬場 勇次

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

審査結果の要旨

西暦2021年1月19日火曜日に東京工科大学において、学位申請者 馬場勇次 の博士学位論文公開審査会が開催され、以下の要旨に示す博士学位論文に関する発表と関連する質疑応答が行われた。

DNAのメチル化とは、シトシンとグアニンの連続した配列(CpG)中のシトシンの5位にメチル基が付加される反応であり、プロモーターがメチル化されるとその遺伝子の発現は抑制される。ヒトゲノムDNAの約45%はレトロトランスポゾン由来の反復配列で構成され、この反復配列内に95%以上のCpGサイトが存在している。そのため、反復配列のメチル化レベルがゲノムDNA全体のメチル化レベルに相関している。正常細胞ではこの反復配列が高度にメチル化されているが、がん細胞ではメチル化レベルが低下しているため、ゲノムDNAのメチル化レベルはがんのバイオマーカーとしての利用が期待されている。これまでに、検量線を必要としないで迅速・簡便にゲノムDNAのメチル化レベルを測定する方法は開発されていない。そこで本研究では、検量線を必要としない迅速・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することを目的とした。

はじめに、ゲノムDNAのメチル化CpG量測定法の開発を行った。先行研究で、二本鎖DNA結合蛋白質であるZinc finger proteinにFirefly luciferase (Fluc)を融合させた蛋白質とDNA intercalating dye BOBO-3間で生じる生物発光共鳴エネルギー移動(bioluminescence resonance energy transfer: BRET)法を利用した迅速・簡便な二本鎖DNA検出法が開発されている。そこで、メチル化CpG結合蛋白質(methyl-CpG-binding domain: MBD)をFlucに融合させた蛋白質(MBD-Fluc)を用いれば、ゲノムDNAのメチル化CpG量を測定できると考えた。本手法はゲノムDNAに結合させたBOBO-3とメチル化CpGサイトに結合したMBD-Fluc間で起こるBRETを利用した測定法であり、検体に試薬を混ぜるだけでゲノムDNAのメチル化CpG量を35分で測定できる。実際に、MBD-Flucを組換え生産し、MBD-Flucとその発光で励起されるBOBO-3をゲノムDNAに混合し、そのBRETシグナルを測定した結果、ゲノムDNAのメチル化CpG量に依存してBRETシグナルが増加することが示された。つまり、MBD-Flucを用いたBRET法によりゲノムDNAのメチル化CpG量を測定できることが示された。また、本手法を用いたDNAメチル化酵素阻害剤のスクリーニング法を開発した。

次に、非メチル化CpG結合蛋白質であるCys-X-X-Cys (CXXC)に着目し、CXXC融合Fluc (CXXC-Fluc)とBOBO-3を用いたBRET法によるゲノムDNAの非メチル化CpG量測定法の開発を行った。MBD-Flucを用いたBRET法は、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。MBD-FlucとCXXC-Flucを用いて得られるBRETシグナルはメチル化CpG量と非メチル化CpG量に相関するため、これらBRETシグナル

の比率からゲノムDNAのメチル化レベルを定量できると考えた。実際に、CXXC-Flucを組換え生産し、CXXC-Flucとその発光で励起されるBOBO-3をゲノムDNAに混合し、そのBRETシグナルを測定した結果、ゲノムDNAの非メチル化CpG量に依存してBRETシグナルが減少することが示された。さらに、MBD-FlucとCXXC-Flucを用いて得られるBRETシグナルの比率から算出された値は、ゲノムDNAのメチル化レベルに依存することが示された。つまり、MBD-FlucとCXXC-Flucを用いたBRET法によりゲノムDNAのメチル化CpG量と非メチル化CpG量を別々に測定し、それらの比率からメチル化レベルを定量できることが示された。

さらに、Flucとは最大発光波長が異なるluciferaseを用いてメチル化CpG量と非メチル化CpG量を同時測定する方法を開発した。Flucよりも最大発光波長が短いOplophorus luciferase (Oluc)をCXXCに融合させた蛋白質(CXXC-Oluc)を組換え生産した。MBD-FlucとCXXC-Olucを同時に用いてBRETシグナルを測定した結果、MBD-FlucとBOBO-3のBRETシグナルはメチル化CpG量に、CXXC-OlucとBOBO-1のBRETシグナルは非メチル化CpG量に依存することが示された。つまり、MBD-FlucとCXXC-Olucを用いたマルチカラーBRET法を用いれば一度の解析でメチル化CpG量と非メチル化CpG量を同時に測定でき、ゲノムDNAのメチル化レベルを定量できることが示された。以上より、マルチカラーBRET法により検量線を必要としない迅速・簡便なゲノムDNAのメチル化レベル定量法が開発されたことが示された。

最後に、本手法の精度や検出限界、領域特異的なDNAメチル化レベルを測定する方法の開発に関する考察がなされ、本研究成果の展望が述べられた。

上記の研究に対する博士学位論文公開審査会での発表および質疑応答は妥当なものであり、筆記試験の結果も合格と判定するに十分な点数であった。以上のことより、審査委員会は、本論文の著者に対して、博士（工学）の学位を授与するに十分な学識と能力を有していることを認めることとした。

審査委員 主査

東京工科大学 講師 吉田 亘