

3P-1081 **メチル化 CpG 結合タンパク質を用いた新規メチル化頻度評価法の開発**

○平岡 大介¹, 村上 慶行¹, 吉田 亘², 秦 健一郎², 池袋 一典¹
(¹ 東京農工大院・工・生命工,² 成育医療セ研)

【背景・目的】

DNAのメチル化異常はがん等の疾患に関連することが報告されており、それら疾患群の診断に際して、ヒトゲノム中における特定領域のDNAメチル化頻度を測定することは重要である。そして実際に臨床応用する際には迅速性が求められる。そこで本研究ではメチル化CpG特異的に結合するMBD及び我々が構築したルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質を用いて、迅速なDNAのメチル化頻度測定法の開発を試みた。

【実験方法・結果】

二本鎖非メチル化DNAと二本鎖メチル化DNAを混合し、メチル化頻度の異なる試料を調製した。ビーズ上に固定化したMBDに同試料を添加し、インキュベート後に洗浄及び溶出を行った。これをPCRにより増幅し、増幅産物をビーズに固定化した。洗浄を行い、ルシフェラーゼ融合ジンクフィンガー蛋白質とインキュベートした後、洗浄を行った。本試料にルシフェラーゼの基質を加え、発光量を測定した。その結果、メチル化頻度依存的な発光量の増加が観察された。これより本手法によってメチル化頻度が測定できることが示唆された。

Novel method for evaluation of DNA methylation level using methyl CpG binding domain

○Daisuke HIRAOKA¹, Yoshiyuki MURAKAMI¹, Wataru YOSHIDA², Kenichiro HATA², Kazunori Ikebukuro¹
(¹Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol.,²National Center for Child Health and Development)

Key words DNA methylation, MBD, zinc finger, magnetic beads

3P-1083 **ルシフェラーゼ融合 Zn フィンガー蛋白質を用いた Norovirus GI の検出**

○村上 慶行¹, 高橋 千明¹, 平岡 大介¹, 本木 昭宏², 志村 宣明², 松尾 隆文², 堀内 道雄², 早出 広司¹, 池袋 一典¹
(¹ 東京農工大院・工・生命工,² システム・インスツルメンツ (株))

【背景・目的】様々な感染症やバイオテロに対処するために、病原性微生物を正確、迅速に検出する技術の開発が求められている。そこで、我々はルシフェラーゼ融合Znフィンガー蛋白質(ZF-luc)を用いて標的病原性微生物を検出する方法を報告している。本研究ではウイルス性下痢症の主たるウイルスであるNorovirus genogroupI(GI)を検出対象とし、これを検出するためのZF-lucを新たに構築し、これらの検出を試みた。

【実験方法・結果】BLASTにより、Norovirus GIのORF1の末端領域から他の微生物に保存されていない、プライマー配列を含む49 bpの標的配列を決定した。次にModular assembly法により標的配列に結合する新規ZFの構築を試みた。その結果、標的配列に対して選択的に結合するZF (B2)の構築に成功した。さらに、B2にルシフェラーゼを融合することで、既報の手法により、Norovirus GIが迅速・簡便・高感度に検出できることが示唆された。

Detection method of PCR products from Norovirus GI using luciferase fused Zn finger protein

○Yoshiyuki MURAKAMI¹, Chiaki TAKAHASHI¹, Daisuke HIRAOKA¹, Akihiro MOTOKI², Noriaki SHIMURA², Takahumi MATSUO², Michio HORIUCHI², Koji SODE¹, Kazunori Ikebukuro¹
(¹Dep. Biotechnology, Tokyo Univ. of Agric. & Technol.,²SYSTEM INSTRUMENTS Co., Ltd)

Key words Norovirus GI, Luciferase fused Zn finger protein (ZF-luc), Modular assembly, Rapid, easy and high sensitive detection

3P-1082 **Sortase を用いた Streptavidin の新規修飾技術の開発**

○松本 拓也¹, 田中 勉², 近藤 昭彦¹
(¹ 神戸大院・工,² 神戸大・研究環)

【研究背景・目的】

Streptavidinはビオチンと非常に強い親和性を持つ。この親和性を利用すると、例えば、目的物質をビオチンで標識した後、Streptavidinと蛍光物質のコンジュゲートを反応させることで、目的物質の蛍光ラベリングが可能になる。このような形で、Streptavidinと蛍光物質（あるいは酵素など）のコンジュゲートは蛍光ラベリングやタンパク質の検出など、生化学の分野で幅広く利用されている。一般的に、Streptavidinコンジュゲートは化学修飾法で調製される。しかしながら、化学修飾法ではStreptavidinや蛍光物質の機能が一部損なわれてしまい、コンジュゲート全体としての機能が低下してしまう。そこで、このような問題を解決するためにSortaseを用いた。Sortaseはタンパク質のC末端に付与した特定のアミノ酸配列を認識・切断し、修飾対象のタンパク質のN末端に連結するペプチド転移反応を触媒する。この反応を利用することで、Streptavidinの部位特異的な修飾が可能となり、機能の大幅な向上が期待できる。

【研究方法・結果】

Sortaseの認識配列をC末端に付与したStreptavidinを大腸菌で発現・精製した。その後、Sortaseを用いてGFP・グルコースオキシダーゼ (GOD) を連結した。SDS-PAGEの解析結果から、Streptavidinの修飾反応に成功したことを確認できた。また、得られたStreptavidin - GODコンジュゲートの活性を検討したところ、化学修飾法で得られたコンジュゲートに比べて高い活性を保持していたことが示された。以上の結果から、Sortaseを用いることで、Streptavidinの部位特異的な修飾が可能となったことが示された。

Site-specific modification of Streptavidin using Sortase

○Takuya Matsumoto¹, Tanaka Tsutomu², Kondo Akihiko¹
(¹Grad.Sch.Eng.Kobe Univ.,²Org.Adv.Sci.Tech.Kobe Univ.)

Key words streptavidin, sortase, protein modification

3P-1084 **発光酵素を用いた迅速高感度な汎用分子間相互作用検出系の構築**

○大室 (松山) 有紀, 中野 耕太, 上田 宏
(東大院・工・化生)

【目的】分子間相互作用検出は、創薬・診断など幅広い分野で応用可能な重要技術である。現在、細胞内の高感度な検出系としてホタルルシフェラーゼ(Fluc)の Protein-fragment Complementation Assay (PCA)が知られているが、細胞外での精製蛋白質を用いたPCAについては、これまで殆ど報告がない。昨年本大会で我々は、触媒活性に重要な残基に変異を施したFlucを用いた固定化DNAの検出について報告したが、今回反応中間体を介した相補性を原理とする、溶液中での相互作用検出系の構築について報告する。

【実験方法】Flucの二段階の半反応の一段階目の変異体として知られるK529Q(K5Q)、及び二段階目の変異体で反応中間体を酵素外に顕著に放出するH245D/K443A/L530R(H245D+)のN末端側に、ラバマイシン結合により会合が促進されるFKBP12(FK)あるいはFRB(FR)を融合させ、大腸菌で発現・精製した。ラバマイシン存在下のFKとFRの相互作用時に、変異体H245D+から放出された中間体を変異体K5Qが消費することにより生じる、発光活性上昇を検討した。

【結果と考察】100 nMのFK/H245D+とFR/K5Qの混合液、及びFR/H245D+とFK/K5Qの混合液に各濃度のラバマイシンを加えた場合、1 nM以上加えた場合に基質添加から1秒以内に、顕著な発光量の増大が見られた。また、両方ともFKあるいはFRを持つ変異体同士にラバマイシンを加えた場合には、有意な発光量変化は見られなかった。また、相互作用ドメインとしてFK, FRのかわりに抗リゾチーム(HEL)抗体VH/VLを用いた場合には抗原HEL依存的な発光量増加が観察された。これらの結果から、本法は、迅速、かつ高感度な試験管内分子間相互作用検出系であると考えられる。

Novel protein-protein interaction assay using luminescent protein

○Yuki Ohmuro-Matsuyama, Kota Nakano, Ueda Hiroshi
(Dept. Chem. Biotech., Univ. Tokyo)

Key words luciferase, protein interaction, sensor