

d 抗PCB-#126抗体(4-6B-19F)の特異性評価

抗PCB-#126抗体(4-6B-19F)については、cと同様に図6-12に示すように、PCB異性体との交差反応性をみるために予備試験を行った。PCB-#126との反応性が最も高いが、PCB-#77及びグループ11(PCB-#78とPCB-#81の混合物)とも交差反応性が認められた。そこで、PCB-#77、PCB-#78、PCB-#81、PCB-#169混合物を初濃度 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ に調整し、等量のPCB-#126を $2 \times 10^{-7} \text{M} \sim 1 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度範囲(初濃度)で混合して測定し、抗PCB-#126抗体(4-6B-19F)とPCB-#126との抗原抗体反応に与える影響を検討した。この結果、PCB-#126の測定系では、混在量が5倍以下であれば、混在の影響はほとんどないと考えられた。

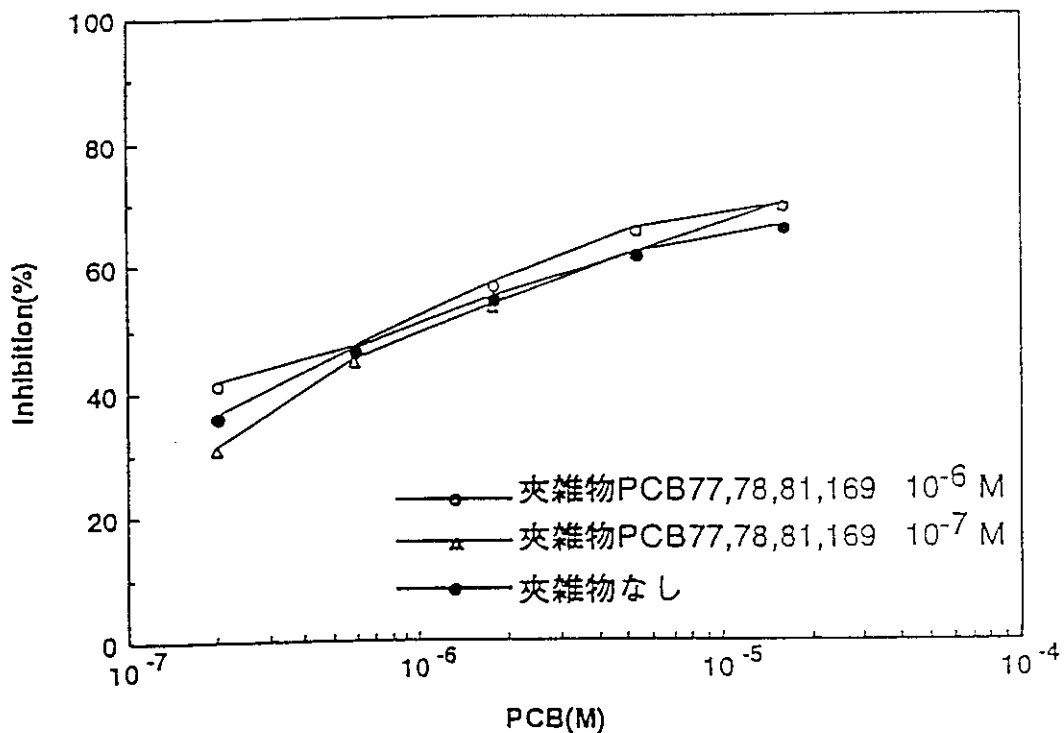


図6-12 夾雑PCB存在下でのPCB-#126の測定

e 抗PCB-#169抗体(7-3C-4C)の特異性評価

抗PCB-#169抗体(7-3C-4C)については、PCB異性体との交差反応性をみる目的で、PCB-#126とグループ11(PCB-#78とPCB-#81の混合物)、グループ12(PCB-#127)との交差反応性が認められた。そこで、PCB-#77、PCB-#126、グループ11(PCB-#78、PCB-#81の等濃度混合物)、グループ12(PCB-#127)混合物を $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 濃度で共存下に測定を行った。

その結果、図6-13に示すようにPCB-#169測定系においては、ppbレベルのPCB-#169の存在に対し、干渉する可能性のあるPCBの混在量が2倍以下であれば、測定結果への影響は少ないが、10倍量以上では測定値に正の誤差を与えることが分かった。

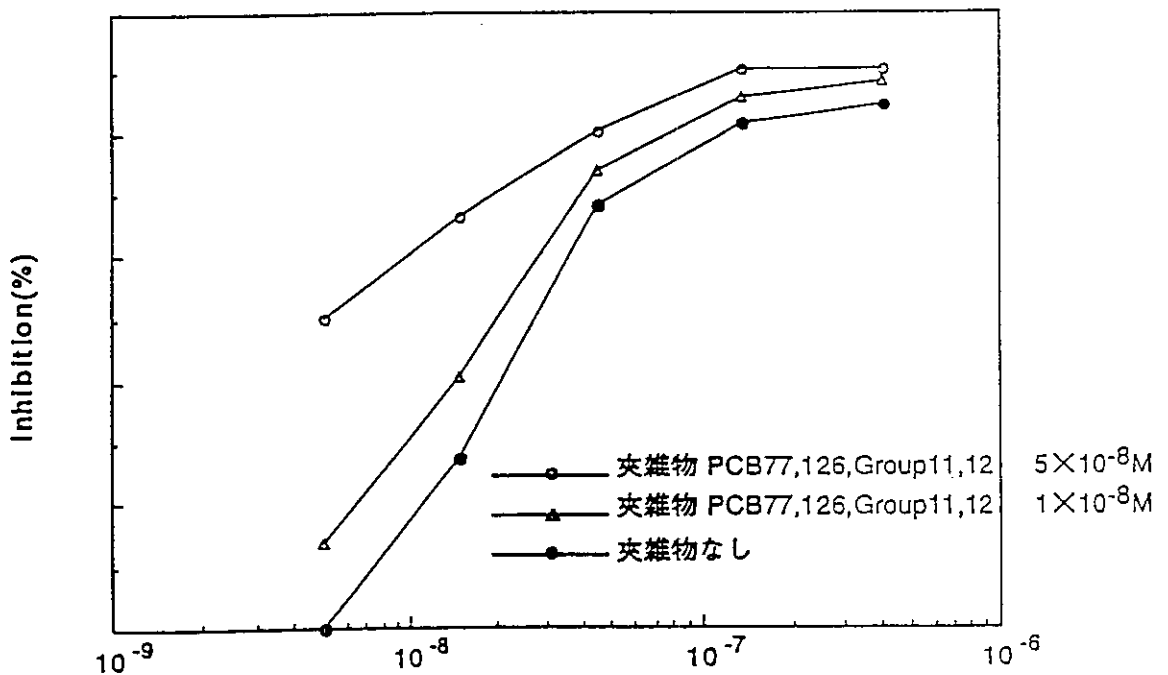


図-6-13 夾雑PCB存在下でのPCB-#169の測定

3) 溶媒耐性

本測定系では、試料の前処理として有機溶媒による抽出操作があるため、E L I S A系における溶媒耐性を確認するとともに、溶媒耐性をもつモノクローナル抗体の選択を行った。その結果、# 1 6 9抗体は70%メタノール耐性であり、他の抗体はメタノール50%までは、抗原抗体反応への実質的な影響はみられなかった。またジメチルスルホキシド (DMSO) 50%でも抗原抗体反応は可能であった。

6-6 各種廃棄物試料への適用可能な測定キットの設計

1) コプラナPCB測定のエIA系

現時点でコプラナPCB (PCB-# 7 7, PCB-# 1 2 6, PCB-# 1 6 9) に対して特異的な抗体が得られ、標準品のPCBを測定する系については、その特異性、直線性、測定範囲、検出限界など基礎的な情報が得られている。

また、コプラナPCBについては、個々の濃度ではなく3種のコプラナPCBの総量を知りたい場合は、測定の際に上記の抗体を適当な比率で混和することで、一回の操作で3種類のコプラナPCBの総量を求めることも、理論的には可能である。今後、廃棄物、環境試料(水質、土壌等)や化学処理油中のコプラナPCBについて、前処理法も含めて、簡易測定法として、E I A法を採用した目的である簡易化のために、オンサイトで測定可能な測定系の開発を行う。

開発の課題は以下のとおりである。① 前処理法の検討、(有機溶媒の影響を含む)

② 環境中に存在する妨害物質との交差反応性、③ 抗PCB抗体のPCB異性体以外のダイオキシン類との交差反応性、④ E I A測定値とガスクロマトグラフ質量分析測定値との相関性

なお、④については、土壌試料によるE I A測定値とガスクロマトグラフ質量分析測定値の相関性をみる目的で作業を開始した。今後、水質試料など他の環境由来試料についても同一試料をそれぞれの測定方法により定量し相関性を求める予定である。

また、得られたモノクローナル抗体の特異性によっては、広く平面構造をとりうるPCB異性体の全てを測定できる可能性や、さらにダイオキシン類をも含めて認識する抗体の開発も考えられる。

2) コプラナPCBを広く認識する抗体の選択

PCB-# 7 7, PCB-# 1 2 6, PCB-# 1 6 9を特異的に認識する抗体とは別に、コプラナPCBを広く認識する抗体も、コプラナPCBのスクリーニングに有用であると考えられる。このようなコプラナPCBを広く認識する抗体については、マウスにPCB-# 7 7複合体、PCB-# 1 2 6複合体、PCB-# 1 6 9複合体で免疫し分離したハイブリドーマ細胞からコプラナPCBをはば広く認識する抗体を検索するため再度のスクリーニングを行っている。

メトトレキサートのルシフェラーゼ標識

A Bioluminescent Immunoassay for Methotrexate at the Subpicomole Level

Jon Wannlund, Jamshid Azari, Lawrence Levine, and Marlene DeLuca

Biochem. Biophys. Res. Commun. 96. (1) 440-446 (1980)

(要旨)

メトトレキサート測定のためのバイオルミネッセントイムノアッセイを開発した。メトトレキサートはホタルルシフェラーゼと共有結合し、1分子のルシフェラーゼにメトトレキサート2分子の生成物が生じた。この酵素は活性の60%を維持していた。ルシフェラーゼ-メトトレキサートはメトトレキサート-ヘモシアニンで作られた抗体と結合した。その結合率はもとのメトトレキサートと同じであった。複合体は抗体、様々な濃度のメトトレキサートとともにインキュベートした。複合体との結合量はメトトレキサートの結合に逆比例していた。この方法で2.5pmolのメトトレキサートを検出することが可能となる。2種類の抗体を用いた方法では0.5pmolまで感度が上昇する。

(緒論)

抗ガン剤やそれ以外の用途において、メトトレキサートの治療濃度域が示されている。メトトレキサートでの高投与量の治療はある種のガンに使われるが重篤な副作用が生じる。最小の副作用で適した治療効果を得るために、血清中のメトトレキサート濃度をモニターする必要がある。メトトレキサートのアッセイには様々な方法がある。ラジオイムノアッセイ (RIA) は最も感度が高く特異的であるが、問題は高価な β , γ カウンターを使用すること、 ^{125}I や ^{75}Se でラベルしたメトトレキサートは半減期が短いこと、廃棄が困難であることである。本研究では、RIA 並みに高感度なメトトレキサートのバイオルミネッセントイムノアッセイについて述べる。

(結果・考察)

・ 図1 → 固定化した抗体 50 μl に対し、 ^3H -メトトレキサートの最大結合量 1.7pmol (8pmol 添加)

図2 → 図1と同様にルシフェラーゼ-メトトレキサートの最大結合量 0.8pmol (40pmol 添加)

これらの結果からルシフェラーゼ1分子にメトトレキサート2分子が結合していると考えられる。

・ 図3 → 抗体との結合が飽和に達する時間は ^3H -メトトレキサートとルシフェラーゼ-メトトレキサートの両方とも2時間

・ 図4 → メトトレキサートの競合結合曲線
0-10pmol が直線範囲

・ 図5 → メトトレキサートの競合結合曲線 (サンドイッチイムノアッセイ)
0-1.0pmol が直線範囲で 50fmol の検出が可能

(考察)

・ 吸光光度法でのメトトレキサートの検出下限は 220pmol/ml、イムノアッセイでは β -ガラクトシダーゼを用いた EIA で 2.2pmol/ml、RIA では 0.2pmol/ml

・ イムノアッセイの標準曲線では、感度は抗体と標識した化合物の濃度に依存するのでどちらも新しく調製したもので行うことが必要

・ 図1・図2→トータルのメトトレキセートの結合量としては ^3H -メトトレキセートとルシフェラーゼ-メトトレキセートは等しいが、添加量を比較すると、メトトレキセートそのものの方が少量の添加で結合率が高い。

→(a)メトトレキセートの方が抗体との親和性が高い

(b)抗体は一部のルシフェラーゼ-メトトレキセートのみと結合する：ルシフェラーゼが、抗体作成に用いたキャリアタンパクであるヘモシアニンが結合していた位置と同じような位置に結合しているものと結合していると考えられる。

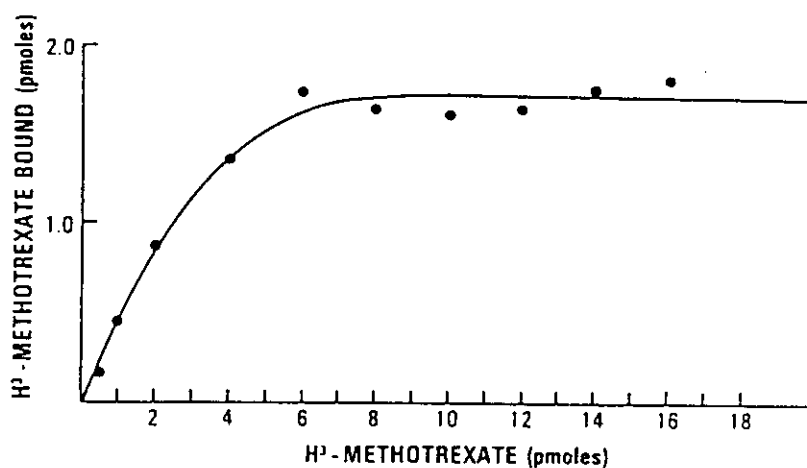


Figure 1. Binding curve of [³H]methotrexate to Sepharose-antibody. 50 μ l of Sepharose-antibody was incubated with increasing concentrations of [³H]-methotrexate. The amount bound was determined as described in Materials and Methods. The non-specific binding was only 0.5-1.0% of the total counts.

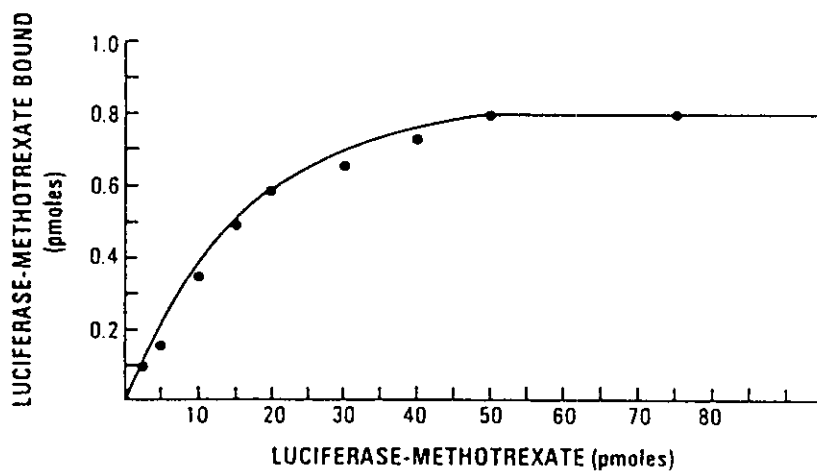


Figure 2. Binding curve of luciferase-methotrexate to Sepharose-antibody. Conditions are described in Materials and Methods. There was no detectable non-specific binding.

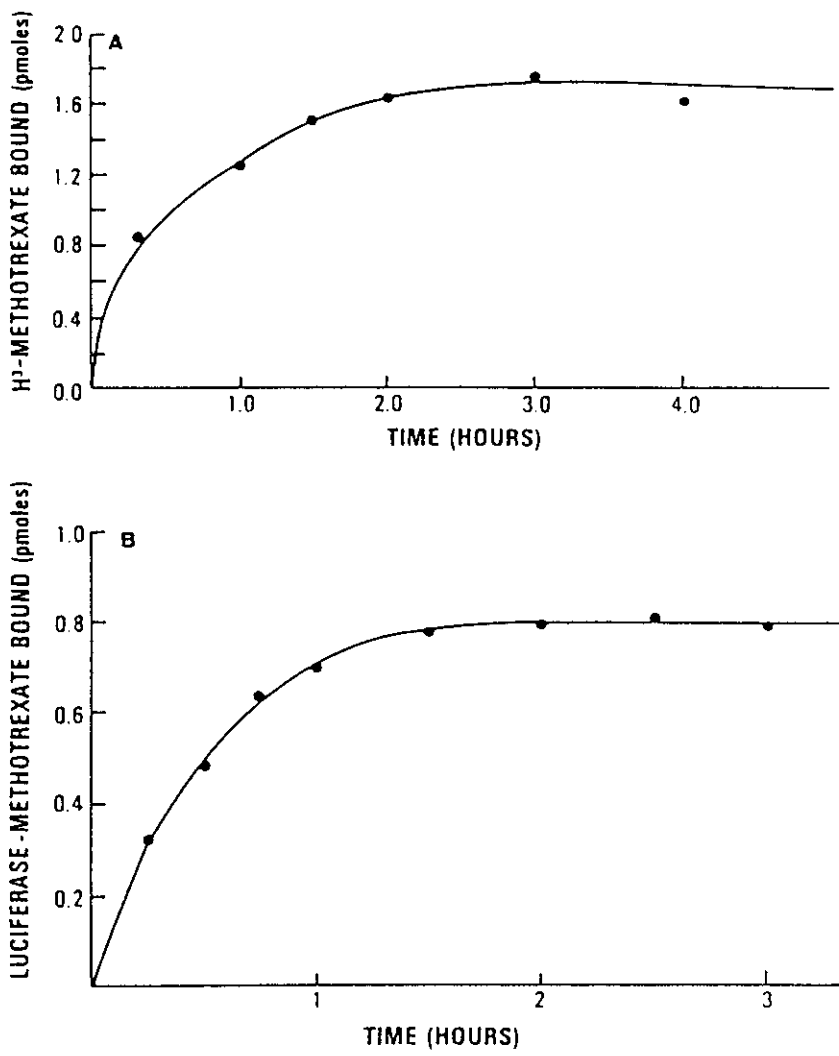


Figure 3. Time course of binding of methotrexate to Sepharose-antibody. 50 μ l of Sepharose-antibody was incubated with 25 pmoles of [³H]-methotrexate (A) or 25 pmoles of luciferase-methotrexate (B) in 0.4 ml final volume. Binding was determined as described in Materials and Methods.

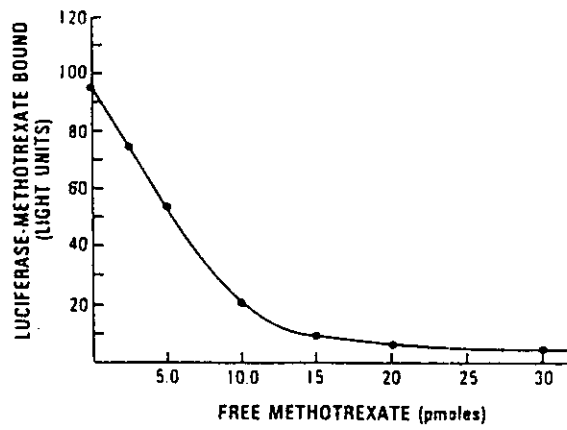


Figure 4. Competitive binding curve of free methotrexate with luciferase-methotrexate to Sepharose-antibody as measured by bioluminescence.

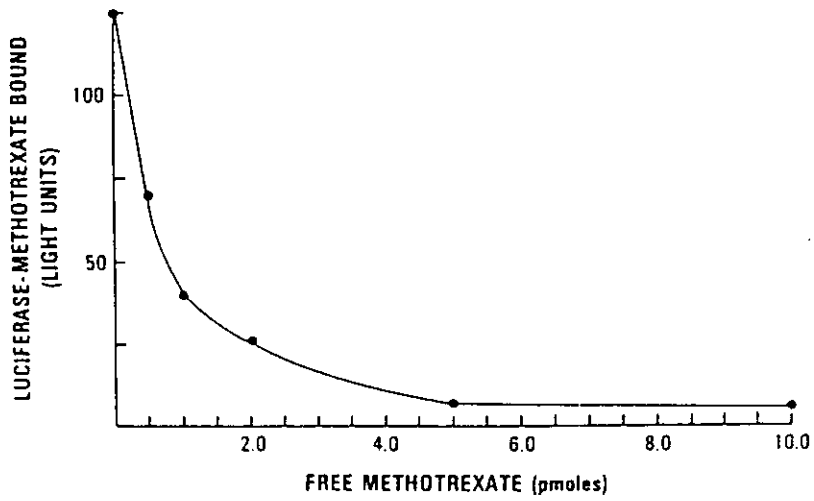


Figure 5. Competitive binding curve of free methotrexate with luciferase-methotrexate using the double antibody technique. Conditions are described in Materials and Methods.

A Sensitive Bioluminescent Immunoassay for Dinitrophenol and Trinitrotoluene

Jon Wannlund and Marlene DeLuca

Anal. Biochem., 122, 385-393 (1982)

(要旨)

ジニトロフェノール (DNP) およびトリニトロトルエン (TNT) を測定するバイオルミネッセントイムノアッセイを開発した。DNP と TNT はそれぞれホタルルシフェラーゼと 1 : 1 で共有結合し複合体を形成した。複合体は 90%以上活性を維持していた。各々の複合体と固定化した抗体、ラベルしていない TNT (又は DNP -ロイシン) をインキュベートすると、複合体の結合量はラベルしていない化合物の量に逆比例した。ルシフェラーゼの代わりにグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼを標識するとより少量の抗原を検出できた。これは酵素のターンオーバー数が高く、シグナルの増幅をより多くすることができるためである。微生物由来の NADH:FMN 酸化還元酵素とルシフェラーゼを固定化して用い、生成した NADH を測定した。本方法では、 1.0 amol (1.0^{-17} mol) の抗原を測定できる。これらの方法は様々な抗原の測定に適している。

(緒論)

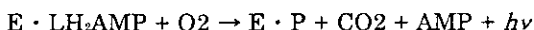
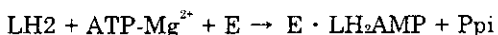
高感度で多用途であるラジオイムノアッセイは臨床診断において革新的な技術であった。しかしラジオアイソトープの半減期が短い (保存期間が短い) ことや、ラジオアイソトープによって抗体の反応性が弱まること、高価であること、健康に有害であることから、近年非放射性物質を標識したイムノアッセイに関心が持たれている。イムノアッセイに用いられている標識の例では、バクテリオファージ、フリーラジカル、蛍光化合物、高電子密度物質、酵素があげられる。

ここでは、TNT および DNP のバイオルミネッセントイムノアッセイ (BIA) について報告する。アッセイの原理は RIA と同様であり、シグナルが発光か放射活性であるかの違いである。BIA の感度は殆どの RIA に匹敵する。

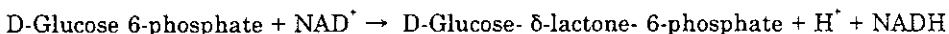
他にシグナルを増幅させる酵素としてグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G-6-PDH) を用いたイムノアッセイもある。この方法では RIA より感度が高く、 amol レベルでの抗原の検出が可能となる。この方法は高感度が求められる研究分野で有用である。

今回イムノアッセイに用いた酵素反応を以下に示す。

ホタルルシフェラーゼは ATP-Mg^{2+} を用いルシフェリンを活性化し、酵素と結合した中間体は発光を伴い酸化脱炭酸を受ける。



G-6-PDH は下に示すようにグルコースを酸化する。



同様に、NADH を *Beneckea haveyi* 由来の 2 つの酵素で測定することができる。1 つは酸化還元酵素で、 $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{FMN} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{FMNH}_2$ の反応を触媒する。もう 1 つはルシフェラーゼで、 $\text{FMNH}_2 + \text{RCHO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{FMN} + \text{RCOOH} + \text{H}_2\text{O} + h\nu$ の反応を触媒する。

生成物は発光で測定するため、このアッセイは非常に感度が良く、約 1.0^{-14} mol の NADH を測定できる。実験条件を調節することによって発光は G-6-PDH の濃度に比例する。

我々は、異なった 3 種類のイムノアッセイ (a) 抗体をセファロースに固定化し、ルシフェラーゼ-TNP

またはルシフェラーゼ-DNP を用いたもの (b) ルシフェラーゼ-TNP またはルシフェラーゼ-DNP を用い、抗体を2種類用いたもの (c) 固定化した抗体と G-6-PDH-TNP を用いたもの について調べた。これらの方法を迅速さと感度の下限の点で比較した。

(結果)

1. ルシフェラーゼ標識反応における DNP, TNT 添加量と酵素活性の関係
 - ・ ルシフェラーゼは ATP-Mg²⁺ の存在下で活性中心を保護し、それぞれ様々な濃度の FDNB および TNBS と反応させた。
 - ・ 表 1 → FDNB, TNBS の割合が増加するとルシフェラーゼへの結合が増加するが、ルシフェラーゼの活性が低下する。
 - ・ この結果から TNBS : ルシフェラーゼ = 5 : 1 (1 mol 酵素あたり 1.4mol TNT、活性 95%)、FDNB : ルシフェラーゼ = 10 : 1 (1 mol 酵素あたり 1.3mol DNP、活性 90%) の条件を定めた。
 - ・ これらの複合体は 1mM EDTA と 0.1mM DTT を含む 0.1M リン酸 (pH7.0) 中で保存すると2ヶ月間 85%活性を維持する。さらに 1mg/ml HSA を添加すると安定性が増す。
2. セファロースに固定化した抗 DNP 抗体への標識 DNP の結合
 - ・ 図 1 → 最大結合量は [³H]DNP -ロイシンでは 1.9pmol、DNP -ルシフェラーゼでは 1.2pmol であり、DNP -ルシフェラーゼはセファロース上の全ての抗体に結合しているわけではない。
 - ・ [³H]DNP -ロイシンと DNP -ルシフェラーゼの両方とも 40pmol 添加で抗体との結合が飽和している。
3. セファロースに固定化した抗 DNP 抗体を用いた抗原抗体反応のタイムコース
 - ・ 図 2 → [³H]DNP -ロイシンと DNP -ルシフェラーゼの両方とも (30pg 添加) 23℃、1.5 時間で完全に反応する。
4. セファロースに固定化した抗 DNP 抗体と DNP -ルシフェラーゼを用いた競合曲線
 - ・ 図 3 → DNP -ロイシンの添加量が増加すると蛍光が減少、検出の直線範囲は 5 - 20 pmol であった。
5. セファロースに固定化した抗 TNP 抗体と TNP -ルシフェラーゼを用いた競合曲線
 - ・ DNP での結果と同様に、セファロースに固定化した抗 TNP を用いた実験で、最大結合量は [³H]TNP -ロイシンでは 1.1pmol、TNP -ルシフェラーゼでは 0.7pmol であり、結合時間は 1.5 時間であった。→低分子の方がより多く結合する。
 - ・ 図 4 → TNT の添加量が増加すると蛍光が減少する。直線範囲は 0 - 20 pmol であった。
6. TNP-G-6-PDH 複合体の作成 - 抗体との結合
 - ・ TNBS : G-6-PDH = 10 : 1 で 1 mol 酵素あたり 1mol TNP、活性 80-95%。
抗体への結合量は [³H]TNP -ロイシン、TNP-G-6-PDH の両方とも同じ。
反応時間は 2 時間で完全に反応する。
7. TNP-G-6-PDH による NADH 生成反応時間
 - ・ 図 5 → 2 分より 10 分の方の発光が強い = NADH の生成量が多いため
8. セファロースに固定化した抗 TNP 抗体と TNP-G-6-PDH を用いた競合曲線
 - ・ TNT と抗 TNP 抗体を 30 分インキュベートした後 TNP-G-6-PDH を添加

図6 →直線範囲は10 - 100 amol

TABLE I

RECOVERY OF ENZYMIC ACTIVITY WITH INCREASING AMOUNTS OF DNP OR TNP BOUND

A. DNP: Luciferase with substrate protection		
Ratio of luciferase to FDNB in the initial reaction	Amount of DNP bound to luciferase	Enzymatic activity (% recovery)
1:1	0.4	100
1:10	1.3	90
1:50	7.2	17
1:100	14.0	0
1:300	19.0	0

B. TNP Luciferase with substrate protection		
Ratio of luciferase to TNBS in the initial reaction	Amount of TNP bound to luciferase	Enzymatic activity (% recovery)
1:1	0.5	100
1:5	1.4	94
1:50	6.1	40
1:100	20.0	0
1:300	20.0	0

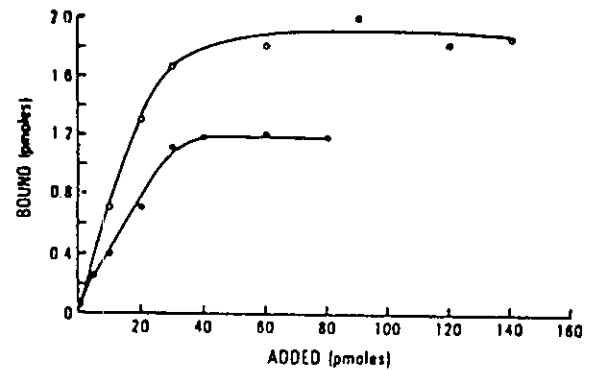


FIG. 1. Binding curve of DNP-luciferase and [³H]DNP-leucine. The amounts of DNP-luciferase (●) and [³H]DNP-leucine (○) binding to Sepharose-anti-DNP are shown as a function of increasing amounts of the two conjugates. The Sepharose contained 40 μg of serum protein. The numbers of antigenic sites available to the two conjugates are different as described in the text.

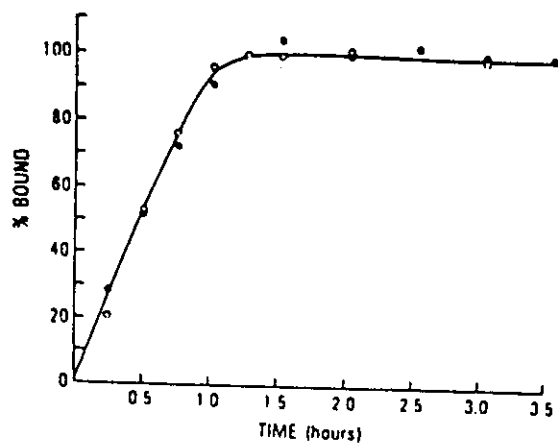


FIG. 2. Rate of binding for DNP-luciferase and [³H]DNP-leucine. The time required for equilibrium binding of DNP-luciferase (●) and [³H]DNP-leucine (○) to Sepharose antibody is shown. Thirty picomoles of each are incubated with 25 μl of Sepharose-antibody (about 40 μg serum protein) in a final volume of 400 μl at 23°C.

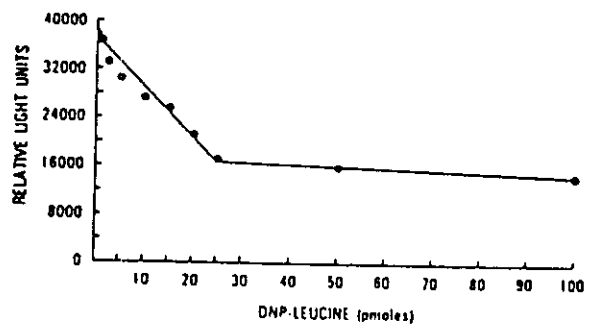


FIG. 3. Competitive binding curve of DNP-leucine with DNP-luciferase. Thirty picomoles of DNP-luciferase, 25 μl of Sepharose-antibody, and 0-100 pmol of DNP-leucine are incubated in a final volume of 400 μl. The amount of luciferase-DNP bound was assayed as described under Materials and Methods.

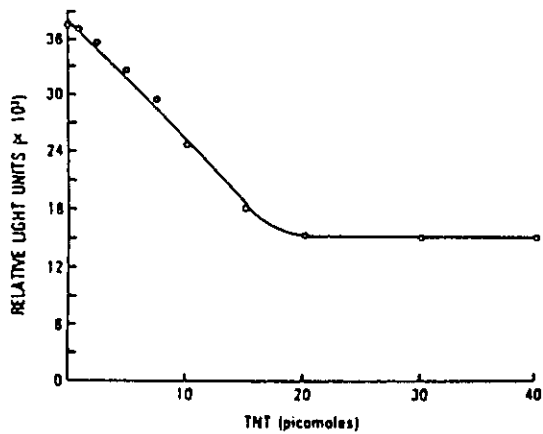


FIG. 4. Competitive binding curve of TNT with TNP-luciferase. Thirty picomoles of TNP-luciferase, 25 μ l of Sepharose-antibody, and increasing amounts of free TNT are incubated in a final volume of 400 μ l. Bound luciferase-TNP was assayed as described.

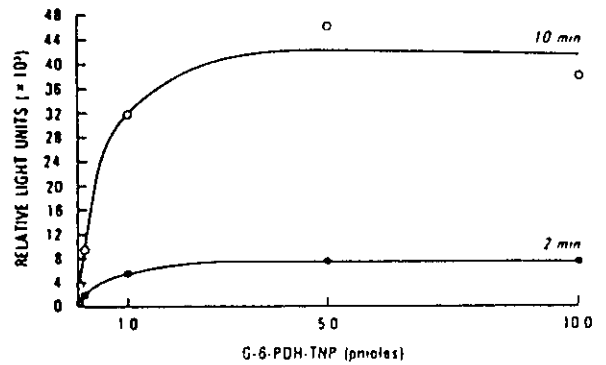


FIG. 5. Binding curve of G-6-PDH-TNP to Sepharose-antibody. G-6-PDH was incubated with 25 μ l Sepharose-antibody. The bound enzyme was then incubated with its substrate for a 2-min (\bullet) or a 10-min period (\circ). The NADH produced was assayed with the bacterial oxidoreductase-luciferase as described under Materials and Methods. The relative light units are directly proportional to the amount of NADH produced.

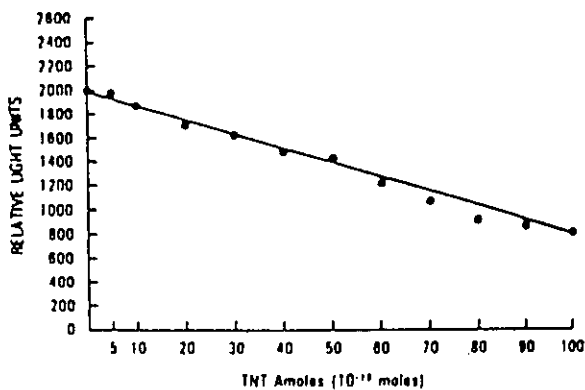


FIG. 6. Competitive binding curve of free TNT with G-6-PDH-TNP. Increasing amounts of free TNT were added to 25 μ l of Sepharose-antibody. After 30 min 500 fmol of G-6-PDH-TNP was added and allowed to incubate for 2 h. The amount of G-6-PDH bound to the Sepharose-antibody was assayed as described under Materials and Methods. The lowest detectable concentration of TNT by this method is approximately 1.0 amol (1×10^{-18} mol).

Bioluminescent Enzyme Immunoassay for Estriol. Use of Reversibly Inactivated Bacterial Luciferase as Label

Frederick S. Yein, Charles K. Marschke, Philip C. Deming, Thomas F. Holzman, and Paul S. Satoh

Anal. Biochem., 149, 309-315 (1985)

(要旨)

可逆的に不活性化した微生物ルシフェラーゼでラベルしたエストリオールを用いたバイオルミネッセントエンザイム免疫アッセイについて述べる。アルキルチオスルホン酸を有するエストリオール誘導体はジスルフィド結合によってルシフェラーゼのチオールと結合する。従ってルシフェラーゼは失活する。免疫アッセイ後、抗原抗体反応によって結合したラベルの失活型ルシフェラーゼはジチオスレイトールとのインキュベーションで活性型に変換し、20秒間の酵素反応の活性を定量した。確立した条件下では、ラベルは4℃で14日以上安定であった。標準曲線は50から6000 pgの広い範囲で直線性を示した。この技術はエストリオールの高感度で迅速なエンザイム免疫アッセイの可能性をもたらす。

(緒論)

ラジオ免疫アッセイ (RIA) は様々な生体試料分析について非常に効果的な方法であり、クロマトグラフ分析に代る方法として現在幅広く用いられている。RIAには半減期が短いことと廃棄が困難であるという欠点があり、近年ラジオアイソトープを使用しない免疫アッセイ法の開発が進んでいる。そのうち最も有望な方法の1つがエンザイム免疫アッセイ (EIA) である。しかし、EIAでは酵素の発色反応でシグナルを増幅し、反応生成物を比色定量するため定量範囲がmg/lからμg/lに限られている。

EIA法の酵素反応を発色反応から蛍光反応にすると感度が100倍に増加し、RIAに匹敵する定量下限が得られる。多くの蛍光反応はルシフェラーゼの触媒する反応を用いており、基質が酸化されて生じた励起状態の中間体が蛍光を発する。

Vibrio harveyi 由来のルシフェラーゼは16個のシステイン残基をもち、活性中心に反応性の高いシステイン性スルフヒドリル基が存在する。このシステイン残基のジスルフィド結合による修飾は酵素活性を失わせるが、2-メルカプトエタノールのような還元剤で処理すると活性は回復する。これらに基づいて著者らは可逆的に不活性化させたルシフェラーゼをレポーター酵素として用いたバイオルミネッセントエンザイム免疫アッセイを開発した。誘導体化したエストリオールをアルキルチオスルホン化してルシフェラーゼのスルフヒドリル基とジスルフィド結合させ、活性型 (ルシフェラーゼ-SH) のルシフェラーゼを不活性型 (ルシフェラーゼ-S-S-エストリオール) に変換する。この複合体を競合免疫アッセイに用いて抗体に結合していないものを除き、ルシフェラーゼをジチオスレイトールで還元した後、酵素活性を測定する。

本報告はエストリオールのバイオルミネッセント EIA の有効性を確立し、RIA に匹敵する感度があることを示している。

(結果・考察)

1. エストリオール誘導体 (EMTS) の合成～ルシフェラーゼ複合体 (EL) の作成

- ・ エストリオールにスルフヒドリル基を導入し、ルシフェラーゼのスルフヒドリル基とジスルフィド結合させた (図1)。
 - ・ ELはルシフェラーゼ:EMTS = 1 : 2で反応させて作成。ELはルシフェラーゼ活性を示さないが50 mMジチオスレイトールで処理 (25℃、30分)すると100%活性が回復する。→ルシフェラーゼの活性中心においてジスルフィド結合が起こっている
2. ELと抗体との反応性・活性の回復度
- ・ アッセイの手順→図2
 - ・ ルシフェラーゼに対するEMTSの割合を変えてELを作成し、それらの抗体との反応性、活性の回復を調べた。→図3:EMTSの割合の増加に伴い活性の回復度は減少し、抗体との反応性は増加する。
 - ・ 以降の実験ではEMTS:ルシフェラーゼ=12:1 (抗体結合率24%、活性の回復12%)で作成したELを用いている。
 - ・ 作成したELはPBS中では不安定であるが、0.1%BSAまたは0.5%ゼラチンを含むPBS中では4℃、14日間安定である。
3. 2次抗体との反応
- ・ 本アッセイでは1次抗体 (ウサギ-抗エストリオール抗体)と結合したELを2次抗体 (ヤギ-抗ウサギ抗体)で免疫沈降させるため、2次抗体との反応時間の検討を行った。→3時間のインキュベーションで回収したルシフェラーゼの活性がプラトーに達する。2次抗体濃度は1/25希釈で回収したルシフェラーゼ活性が最も高かった。
4. 競合イムノアッセイ
- ・ 本方法の原理:ELと試料中のエストリオールとが抗体の結合部位をとりあい、抗体に結合したELが蛍光を発する。→エストリオール量が多いほど蛍光は弱い。
 - ・ 標準曲線→図5:50から6000pg/tubeの範囲で直線性が得られた。この結果はRIAの感度に匹敵しており、臨床において非常に低濃度である妊娠していない女性の末梢血中エストリオール(0.05-0.5ng/ml)の測定や、妊娠中や重篤な疾患によって起こりうる高濃度エストリオール (3.0-35ng/ml)の測定に適用できる幅広い測定範囲をカバーしている。

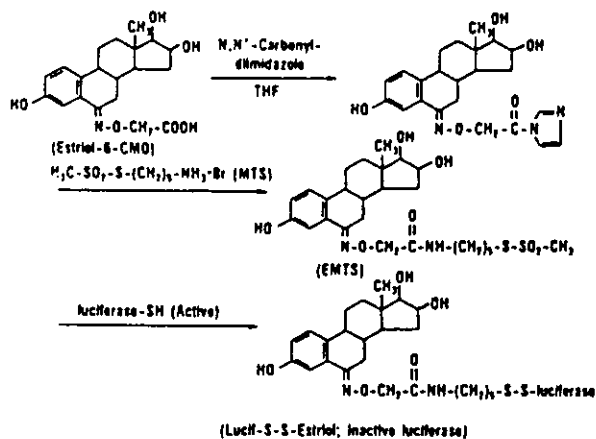


FIG. 1. Synthesis scheme for luciferase-labeled estriol.

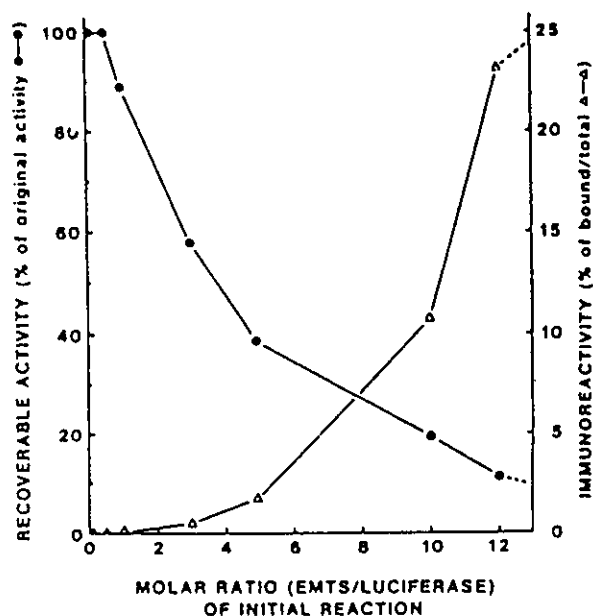


FIG. 3. Immunoreactivity and recoverable luciferase activity of label prepared by different ratios of EMTS/Luciferase.

- Binding
 $\text{Ab}_1 + \text{Lucif-S-S-E} \rightleftharpoons \text{Ab}_1\text{-E-S-S-Lucif}$
- Separation (Immunoprecipitation)
 $\text{Ab}_2 + \text{Ab}_1\text{-E-S-S-Lucif} \rightleftharpoons \text{Ab}_2\text{-Ab}_1\text{-E-S-S-Lucif}$
- Reactivation (reduction of disulfide linkage)
 $\text{Ab}_2\text{-Ab}_1\text{-E-S-S-Lucif} + \text{RSH} \rightleftharpoons \text{Lucif-SH} + \text{Ab}_2\text{-Ab}_1\text{-E-SH}$
- Quantitation by oxidoreductase coupled assay for luciferase activity.
 $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{FMN} \xrightarrow{\text{oxidoreductase}} \text{NAD}^+ + \text{FMNH}_2$
 $\text{FMNH}_2 + \text{RCHO} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{luciferase}} \text{FMN} + \text{RCOOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{Light}$

FIG. 2. Immunoassay procedures using luciferase-labeled estriol. Lucif-S-S-E (luciferase-S-S-estriol synthesized as in Fig. 1). Ab₁ (rabbit anti-estriol antiserum), Ab₂ (goat anti-rabbit-IgG antiserum), RSH (dithiothreitol).

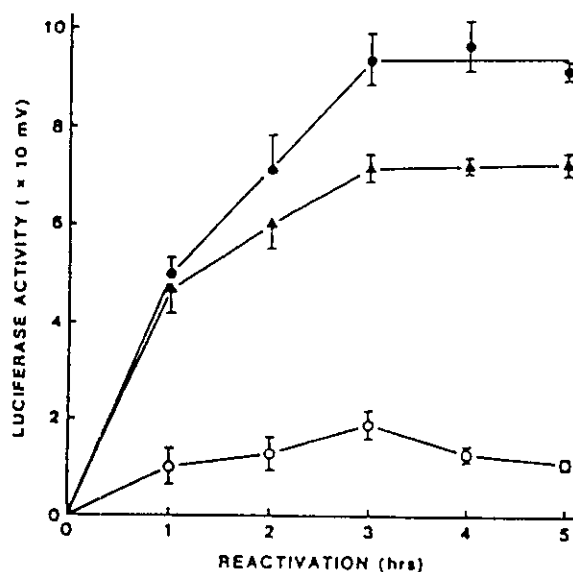


FIG. 4. Reactivation of luciferase-labeled estriol bound to immunoprecipitate. The immune complex of label (prepared by 12:1 of EMTS:luciferase) and antibody was precipitated by the second antibody of different concentration: ● 1:25 dilution; ▲, 1:50 dilution; ○, 1:125 dilution. After a washing, the label in the immunoprecipitate was reactivated with 50 mM dithiothreitol. At different time intervals, the luciferase activity was determined by the "FMNH₂ Injection Method" (9). Total label of 483 mV was used for each assay. The values represent avg ± 1 SD from triplicate samples.

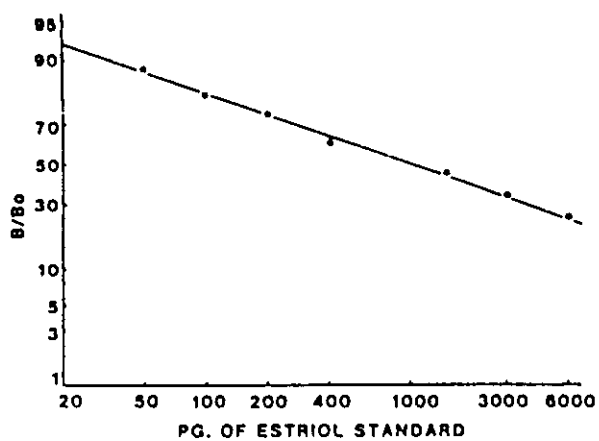


FIG. 5. Standard curve of estriol. The label prepared by 12:1 of EMTS:luciferase was used. Total label of 1200 mV approximately equal to 0.2 pmol of luciferase was added to each tube. The luciferase activity was determined by the oxidoreductase coupled assay. Standard curve: slope = $-1.382(\text{logit}/\text{log})$, $r = 0.986$. The abscissa and ordinate are in log and logit function, respectively.

(要旨)

微生物およびホタル由来のルシフェラーゼの分析への応用に関する近年の発展を概説する。ルシフェラーゼは様々な酵素や基質、補酵素の分析において、可溶化や固定化の状態で行われてきた。ホタルルシフェラーゼの反応は迅速な微生物試験に用いられ、感受性試験、細菌の検出、活性汚泥の分析、食品の試験での応用が進んでいる。迅速な微生物の分析は *Vibrio harveyi* 由来の *lux* 遺伝子を組み込んだバクテリオファージを用いることによって可能となった。ホタル由来ルシフェラーゼおよび微生物由来ルシフェラーゼの両反応は免疫アッセイや DNA プローブに応用され、また、アルカリ性ホスファターゼ標識のためのホタルルシフェリンリン酸基質は部分的に成功した。

(1. 結論)

ルシフェラーゼとルシフェリンは生体蛍光反応に関わる酵素とその基質を指した一般的名称である。ルシフェラーゼの構造は種によってかなり違いがあり、*Photinus pyralis* (ホタル) 由来ルシフェラーゼ (EC1.13.12.7, 50kDa) と *Benickea harveyi* (海洋微生物) 由来ルシフェラーゼ (EC1.14.3, 39kDa と 42kDa のヘテロダイマー) の構造が最も研究が進んでいる。同様に、基質であるルシフェリンもかなり構造が異なっており、ホタル由来ルシフェリンでは 6-aminobenzotriazole であるが、海洋微生物由来ルシフェリンでは長鎖脂肪酸アルデヒドである。

蛍光を発するルシフェラーゼ-ルシフェリンの反応 (図 1) は幅広い物質の簡便、迅速、高感度分析を可能にする。これらの特徴のため、生体蛍光アッセイは研究・開発が進められてきた。ここでは、ホタルおよび微生物のルシフェラーゼおよびルシフェリンに関する臨床や生化学への応用について述べる。

(2. 試薬)

2.1. ルシフェラーゼ

ルシフェラーゼは不安定であるが、アルブミンのようなタンパクによって溶液中で安定化することができる。近年、補酵素、金属イオン、緩衝液、キレート剤、炭化水素、抗酸化剤を含むホタルルシフェラーゼの安定化剤が市販されている。この安定化剤の存在下では、ホタルルシフェラーゼの溶液は 0.5℃で1日間失活せず活性を保った。今後、ホタルや微生物ルシフェラーゼの遺伝子操作により安定性を改善できると思われる。さらに、将来は最近報告されたβ-ガラクトシダーゼ-インターフェロン分子と同様にルシフェラーゼ遺伝子と抗体の遺伝子とを融合させた融合分子が開発できるかもしれない。

2.2. ルシフェラーゼの固定化

ホタルおよび微生物ルシフェラーゼを活性を持った状態で化学的に固定化することに成功したのは1976年に DeLuca の報告が最初である。これに続いて多くの研究グループが分析への応用を広げ、高感度アッセイを開発してきた。最初ルシフェラーゼはアリルアミンガラスビーズ上に固定化されていたが、後にセファロースやナイロン、セルロースといった他の固定相が試されるようになった。化学的固定化 (臭化シアンで活性化したセファロース、グルタルアルデヒドで活性化したナイロン) の方法は優れているが、微生物ルシフェラーゼでは可逆的な物理的吸着が起こる。Roger と Romacle はこれらのルシフェラーゼが poly-L-lysine または poly-L-lysine-phenylalanine で前もって処理したポリスチレンに

吸着することを示した。吸着したルシフェラーゼは数日間にわたりきわめて安定であった。それとは対照的に処理を施していないポリスチレンに吸着させた場合では速やかに活性を失う。

2.3. ルシフェリン

6位の位置が硫酸、リン酸、ガラクトシド、アルギニン、L-フェニルアラニン、エステル基で誘導体化された一連のホタルルシフェリン誘導体が現在利用されている。誘導体化したルシフェリンはホタルルシフェラーゼと反応しないが、適当な酵素で6位を分解してもとのルシフェリンに戻すことは可能である。

これらの新しいルシフェリンはバイオルミネッセントアッセイの基質に有用であり、これらのイムノアッセイへの使用については3.4.で述べる。

(3. 応用)

3.1. 迅速な微生物試験

細胞からの ATP の放出をルシフェラーゼ-ルシフェリンを用いて測定することは細胞の検出や細胞数を測定するのに簡便な方法である。表1にバイオルミネッセントを用いた ATP アッセイでの微生物試験の例を示す。これらの試験の欠点は、特異的でないことである。しかし、*Vivrio fischeri* 由来の蛍光に必要なタンパクをコードする *lux* 遺伝子を用いた方法では特異性を得ることができる。これらの遺伝子を特定の微生物にのみ吸着するバクテリオファージを介して微生物に導入すると、遺伝子の翻訳産物が蛍光を発する。発光はバクテリオファージに感染したバクテリアにのみ起こり、その発光強度は感染した細胞数に相関する。このアッセイの特異性は特定の微生物種に感染することのできるバクテリオファージの特異性によるものである。このアッセイでは1 mlの牛乳または尿中に存在する10菌体を1時間で検出することができ、簡単に抗生物質感受性試験の結果と適合する結果が得られる。

3.2. 毒性および催奇形性試験

Uritzyl はメチルメタン硫酸を用いて蛍光を発しない *Photobacterium fischeri* 由来の変異体 (Pf-13) を作成した。この変異体は変異原性 (塩基置換もしくはフレームシフト) を持つ化合物や DNA 合成阻害剤、DNA 障害性の化合物、DNA に割り込む性質のある化合物に曝されることによって蛍光を発するようになる。この試験は近年液体や固体中の金属化合物の遺伝毒性の検出にまで応用が広がった。

3.3. 酵素・基質・補酵素のアッセイ

ルシフェラーゼ-ルシフェリンの蛍光反応を用いて反応系の酵素、基質、補酵素のアッセイを行った例を表2に示す。これらの方法では可溶化したルシフェラーゼでも固定化したルシフェラーゼでも利用できる。例えば、Girotti らはロイシン脱水素酵素をナイロンのコイルの内側に固定化し、分枝 L-アミノ酸の continuous flow bioluminescence 分析を開発した。アミノ酸と固定化した酵素との反応で生じた NADH が、微生物ルシフェラーゼと NAD(P)H:FMN 酸化還元酵素を内側に固定化した2番目のコイルで検出される。このアッセイでは1時間に20-30サンプルを処理でき、20-2000 pgの範囲で直線性が得られる。

β -ガラクトシダーゼの生体蛍光アッセイはルシフェラーゼの反応に基づいて酵素反応を組み合わせている。図2に反応系を示す。 β -ガラクトシダーゼは2-nitro-phenyl- β -D-galactopyranoside を基質として D-ガラクトースが生成し、D-ガラクトースとガラクトース脱水素酵素が反応して NADH が生成

する。そして NADH を微生物ルシフェラーゼの反応で検出する。β-ガラクトシダーゼの定量下限は 2×10^{21} mol であり、さらに galactopyranoside とのインキュベーションを 100 分から 1000 分に増やせば 2×10^{22} mol (120 分子) にまで改善することができる。

3.4. イムノアッセイ、タンパクブロッティング、DNA プローブアッセイ

ルシフェラーゼは抗原や抗体への標識などの化学反応によって失活する。その結果として、イムノアッセイにおいてこれらの酵素を使って成功している例はわずかである。特に微生物ルシフェラーゼは活性中心のチオール基、または α-アミノ基が反応することによって失活する傾向がある。Baidwin らはルシフェラーゼの活性中心を可逆的に修飾することによって、イムノアッセイに利用することができた。このアッセイは抗原と微生物ルシフェラーゼを、メチルアルカンチオールスルホン酸を用いて活性中心で特異的に標識している (図 3)。このルシフェラーゼ活性を持たない複合体は抗体の結合部位において抗原と競合し、二次抗体で液相に遊離したものは除かれる。抗体に結合したものは還元剤 (ジチオスレイトール) でルシフェラーゼと抗原とのジスルフィド結合を還元し、酵素の活性中心であるチオール基を再生させる。このアッセイはインスリン、エストリオールへの応用に成功しているが、現在のところ臨床サンプルへの応用はされていない。

ホモジニアスイムノアッセイは微生物ルシフェラーゼを用い、図 4 に示したように酵素経路を組み立てることで可能である。あるアッセイでは、微生物ルシフェラーゼ、NADH:FMN 酸化還元酵素、抗原をセファロースビーズ上に固定化している。固定化した抗原とサンプル中の抗原はグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) 標識した抗体の結合において競合する。適当な基質混液 (G6P, NAD, FMN, decanal) を添加し、標識した G6PDH によって NADH を生成させる。ビーズ上で生じた NADH は固定化したルシフェラーゼと還元酵素と反応し、蛍光を発する。これはビーズ上に 3 つの酵素が近接しており、効率よいプロセスである。溶液中では、NADH は抗原と結合していない G6PDH 複合体からも生じるが、NADH を NAD に酸化する乳酸デヒドロゲナーゼを添加することによって選択的に除くことができる。この反応は溶液中であることと発光がサンプル中の抗原濃度と逆比例する G6PDH の活性にのみ依存することが確かである時のみに効果的である。このアッセイは抽出した血漿中のプロゲステロン濃度の測定に用いられている (定量下限 98pg/tube)。他には、抗体または二次抗体を酸化還元酵素、ルシフェラーゼとともに固定化したものを用いたものがあり、α-フェトプロテイン、プロラクチン、黄体ホルモンの検出に用いられている。

最近までアルカリ性ホスファターゼ標識はバイオルミネッセントアッセイには馴染みの薄いものであった。しかし、現在では Miska と Geiger によって合成された D-ルシフェリン-O-phosphate を用いてアルカリ性ホスファターゼ標識でバイオルミネッセントアッセイを行うことが可能である。アルカリ性ホスファターゼ標識は基質のリン酸基を切断して D-ルシフェリンを生成し、光を発する (図 5)。この方法でのイムノアッセイの報告は限られており、例えば尿カリクレイン、ブラジキニン、カリクレイン抗体の測定である。

タンパクのブロッティング分析は研究や臨床の実験室的な診断において確立された技術である。ブロッティングされたタンパクは標識された抗体で検出される。アルカリ性ホスファターゼ標識の場合、D-ルシフェリン-O-phosphate を用いて蛍光を検出する。この方法ではブロッティングした 5pg のウサギ IgG (30×10^{18} mol) を検出でき、RI 標識やその他の非 RI 標識のものより 100 倍以上の高い感度を示した。近年この技術は DNA ハイブリダイゼーションにまで広がっている。

特許報告にルシフェラーゼ標識およびフルオロフォア標識したプローブを用いた DNA プローブアッ