

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

薬物代謝に関与する発現タンパク質の超高感度検出と解析
に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 甲斐 雅亮

平成18（2006）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

薬物代謝に関与する発現タンパク質の超高感度検出と解析に関する研究 ----- 1

甲斐 雅亮

II. 分担研究報告

薬物代謝関連タンパク質に対するアプタマー核酸の探索と超高感度検出
に関する研究 ----- 10

桃島 力

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 17

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 18

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総括研究報告書

薬物代謝に関与する発現タンパク質の超高感度検出と解析 に関する研究

主任研究者 甲斐 雅亮 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨

本研究の達成目標は、極微量の各種薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP) の一斉検出を可能にするために、当該主任研究者らが創製している化学発光性高分子を超高感度検出用プローブに適用することにより、プロテインチップ上の CYP 類を分子数レベルで検出できる新技術を開発することである。本年度の研究では、CYP タンパク質の超高感度化学発光検出用プローブとして、平均分子量 200 万または 50 万のデキストラン分子に、20～500 個のビオチンおよび 600～5000 個のイソルミノールを結合させた化学発光性デキストラン高分子を多数合成し、PVDF 膜に吸着しているビオチン化抗体との連鎖的な結合能について検討した。さらに、ウェスタンブロットなどのアッセイ系に適応するために、PVDF 膜に CYP タンパク質を吸着させ、それと CYP に特異的な一次抗体及びビオチン化抗 IgG 二次抗体との結合反応条件、それら抗体の膜への非特異的吸着を減少させるためのブロッキング及び洗浄条件等について調べた。これらの実験により、100 ng レベルの CYP タンパク質を検出測定できる簡易なプロテインチップ検出手法の開発に成功した。一方、当該研究者らが既に開発しているグアニン塩基を認識し化学発光体に変換できる TMPG 試薬を用いて、抗体の代替使用を目的とする CYP のアプタマー核酸の探索を試みた。この結果、あるヌクレオチドオリゴマー（24 mer の DNA）が、特定の CYP タンパク質と強く結合することが判明した。

分担研究者

梶島 力・長崎大学大学院医歯薬学総合
研究科 助教授

あり、同一の酵素であっても活性差が認められる場合や特定CYPの遺伝子が欠損している場合がある。これらのことが、薬の効き方に個人差を示す理由の一つと考えられている。したがって、個人のCYP多型を認知できれば、このタンパク質多型情報と従来のDNA多型情報を合わせることによって、薬効、副作用、重症化、

A. 研究目的

体内の薬物は、主にチトクロームP450 (CYP) 酵素によって代謝されたのち、体外に排出される。これらのCYPには多型が

合併症などに対して、よりの確な個人差の解析が可能になるものとする。

本研究の達成目標は、細胞内において極微量に発現しているCYP類をプロテインチップに一齐に結合させ、各種CYPの新しい超高感度多型解析手法を開発し、これを用いて薬の副作用との相関を調査することである。

CYPの多型解析には、現在、DNA検出技術が一般的に用いられている。それは、DNAや遺伝子検体は、ポリメラーゼチェーン反応(PCR)などによって直接コピー増幅できるので、従来のレーザー蛍光検出法を用いてチップ上で感度良く検出できるからである。しかし、タンパク質の場合、核酸のPCRのように検体が直接的に増幅されないため、日常検査として、チップ上でそれらを一齐に検出することは極めて困難となっている。

当該主任研究者らは、これまでDNAチップの新しい検出技術やペプチド及びタンパク質の高感度かつ高選択的検出手法について研究してきた[1-3]。これらの検出法の特色は、検体の増幅によって検出感度を得ることを望まず、究極的には、検体一分子に結合した一分子の高分子プローブからの発光シグナルを、その高分子内に結合している低分子量の化学発光物質の結合数を増大させることによって超高感度な検出を可能にすることである。すなわち、本研究で用いる水溶性の化学発光性デキストラン高分子プローブは、長い酵素反応時間でシグナル増幅する酵

素プローブと違って、化学的に酸化させると、結合している低分子量の化学発光物質の数に応じて強い光を瞬間的に発するものであり、検出装置は光を電流として捕える従来のCCDカメラ装置のみでよい。これは安価なナノデバイスとしても適応できるものとする。

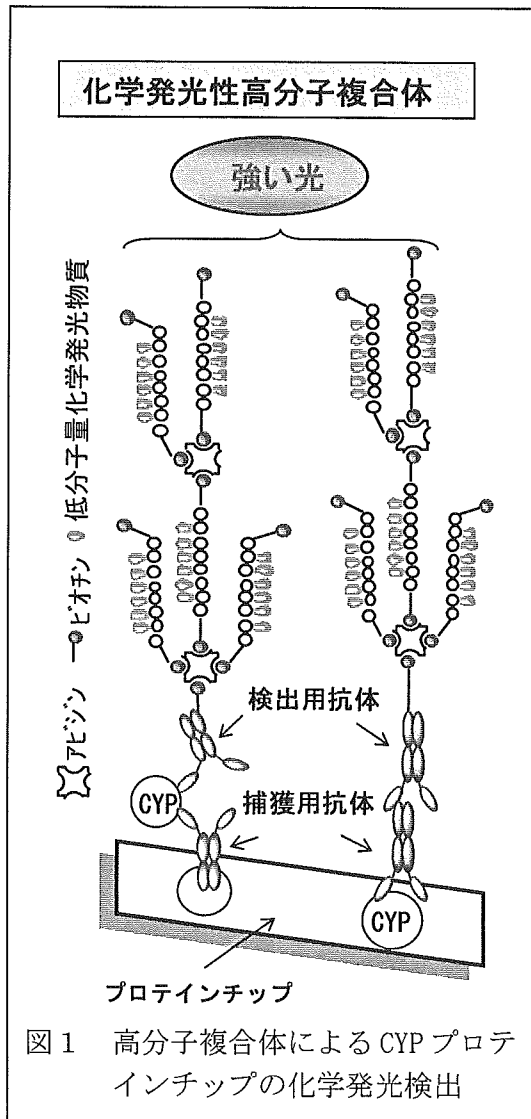


図1 高分子複合体によるCYPプロテインチップの化学発光検出

したがって、本研究では、各種CYPをプロテインチップ上で網羅的に検査できるようにするために、チップに各種CYPに対する特異的な捕獲用モノクローナル

抗体をあらかじめアレイ状に吸着させ、これに検体である各 CYP を結合させたのち、ビオチン化ポリクローナル抗体及びビオチン含有化学発光性デキストラン高分子を、アビジンタンパク質を介して連鎖的に結合させて、超高感度な検出を可能にする方法を考案している(図1)。この研究において、デキストラン高分子プローブを用いる CYP 検出系の研究開発は主任研究者が主に担当し、CYP に対するアプタマー核酸の探索と DNA を超高感度検出用プローブとして用いる手法の開発は分担研究者が担当した。なお、検体として用いた CYP は、多くの薬物代謝に関与している CYP3A4 を主に用いた。

B. 研究方法

1. ビオチン含有化学発光性デキストラン高分子の化学合成

平均分子量 2×10^6 Da または 5×10^5 Da のデキストラン 400 mg を超純水で膨潤させたのち、メタノールで再沈殿させた。それを超純水に溶解させ、 NaIO_4 を加えて、室温で約 60 分間酸化させた。生成した酸化デキストランを、メタノールで析出させ、沈殿物を DMSO に溶解し、ビオチン- AC_5 -ヒドラジドを適量加え、室温で 1 時間反応させた。続いて反応液に酢酸を 15%(v/v) 濃度になるように加え、適量のイソルミノールを加え、 60°C で 16 時間、または室温で 88 時間反応させた。反応液をメタノールに滴下し、析出した沈殿物をエチレングリコールに溶解させた。溶

液を氷水中で冷却しながら NaBH_4 を加え、 4°C で 18 時間還元反応させた。反応後、反応液をアセトンまたはメタノールに滴下し、生じた沈殿物を減圧乾燥して生成物であるイソルミノールおよびアビジン含有デキストラン $[(\text{IL})_x-(\text{Biotin})_y-(\text{Glc})_z]$ を回収した。

2. PVDF 膜上のビオチン化抗体とビオチン含有化学発光性デキストランとの結合反応

PVDF 膜に抗ウサギ IgG ビオチン化ヤギ抗体 (1xPBS 溶液) を吸着させ、15 分間減圧乾燥後、この膜をビオチン含有化学発光性デキストランおよびアビジンを加えた 1xPBS 溶液 (2 mL) に浸し、 37°C で 30 分間インキュベートした。1xPBS 溶液 15 mL で 2 回 (各 10 分間) 洗浄後、さらに 75 %メタノール水溶液で 5 分間 1 回洗浄後、化学発光試液 (70 % アセトニトリル、0.15 M テトラブチルアンモニウム及び 0.4 M 過酸化水素を含む水溶液) に 10 秒間浸し、直ちに 2 分間化学発光強度を暗室中 CCD カメラで測定した。

3. PVDF 膜上の CYP に対する捕獲用抗体及び検出用抗体との結合反応

PVDF 膜に CYP を吸着させ、15 分間減圧乾燥後、膜を 5 % メタノールを含む 25 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane に 20 分間浸した後、5 % スキムミルクを含む 1xPBS 溶液中で室温で 60 分間ブロッキングした。膜を 1xPBS 溶液で 1 回洗浄後、抗ヒト CYP ウサギ抗体を含む 1xPBS 溶液に浸して、室温で 1.5 時間反応させた。

反応後、膜を 1xPBS 溶液で 2 回洗浄し、抗ウサギ IgG のビオチン化ヤギ抗体を含む 1xPBS に浸して、室温で 60 分間インキュベートした。インキュベート後、膜を 1xPBS 溶液で 2 回洗浄し、ビオチン含有化学発光性デキストラン及びアビジンを加えた 1xPBS 溶液に浸し、37 °C で 30 分間インキュベートした。1xPBS 溶液で 2 回洗浄後、さらに 75 %メタノール水溶液で 5 分間 1 回洗浄後、膜を上記の化学発光試液に 10 秒間浸し、直ちに 2 分間化学発光強度を暗室中 CCD カメラで測定した。

4. 倫理面への配慮

本研究では、個人の遺伝情報およびタンパク質多型を解析するには至っていない。今後、研究が進展して、特定個人の試料を扱う場合は、各省庁の倫理規定を遵守し、当該大学機関の倫理委員会に諮る予定である。

C. 研究結果

1. ビオチン含有化学発光性デキストラン高分子の化学合成とプローブとしての評価

本研究では、まず、平均分子量が 200 万のデキストラン[(Glc) 12300]にイソルミノール(IL)およびビオチン(Bio)を導入し、かつそれらの導入数の異なる 6 種類の水溶性の化学発光性高分子 (IL)X-(Bio)Y-(Glc)12300 (X, Y は、デキストラン分子に導入した平均分子数を表す) を合成し、それらの化学発光性を調べた。すなわち、ナイロン膜に合成した

各種 (IL)X-(Bio)Y-(Glc)12300 をアレイ状に直接吸着させ、既に開発している低分子量化学発光物質の化学的な増感反応条件[2, 3]によって発光させ、暗室中で従来の CCD カメラで検出した。

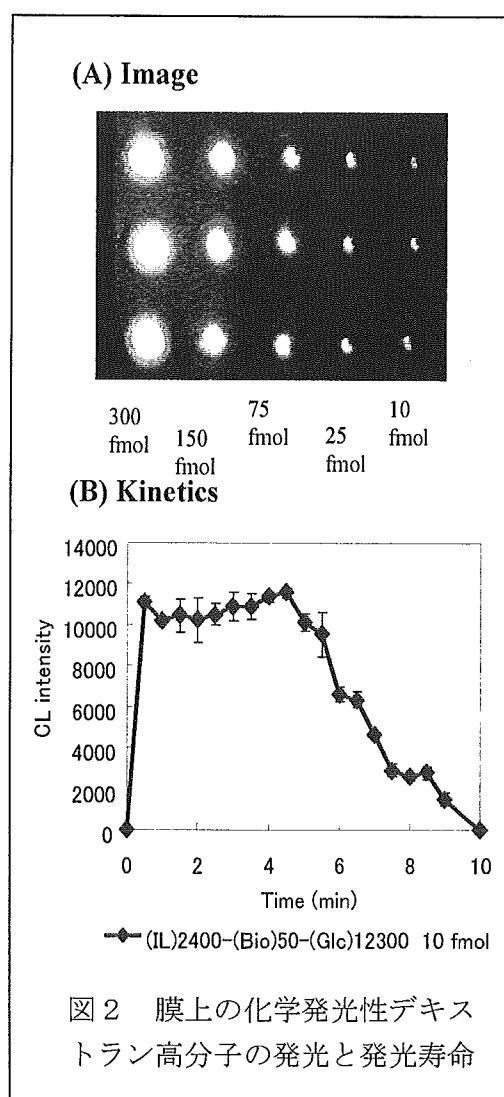


図2 膜上の化学発光性デキストラン高分子の発光と発光寿命

その結果、デキストラン高分子内に結合している IL の数に比例して化学発光は強くなるのに対し、そのときの蛍光は IL の数が多くなっても分子内消光によって増大率が徐々に減少することが分かった。また、2000-3000 個の IL を導入した化学

発光性高分子は、ナイロン膜上で約 1 fmol まで化学発光のシグナルが確認でき、検量線は少なくとも 1 pmol までの広範囲な比例関係を示した(図 2A)。また、これらの高分子は、我々が開発した発光試液 [2, 3] に浸すと、固相膜上では、約 30 秒後から 5 分間最大かつ持続的な発光を与えることが分かった (図 2B)。

一方、これらの化学発光性デキストラン高分子は、分子内にビオチンを有しているので、アビジンタンパク質と結合することができる。そこで、PVDF 膜に予めアビジンタンパク質を吸着させて、シャーレ中の合成した各種 (IL)X-(Bio)Y-(Glc)12300 と結合させ、Scatchard プロットによりアビジンに対する結合数と結合定数を調べた (表 1)。その結果、50-350 個の Bio 導入数の異なる 6 種類の化学発光性デキストラン高分子は、その 1 分子当たりの Bio の結合した数の増加とともに、アビジンタンパク質に対して高い結合定数を示し、デキストラン高分子 1 分子当たりに結合するアビジン数も増加することが分かった。

表 1 化学発光性高分子プローブのアビジンタンパク質との結合能

Probe	Binding constant ($K M^{-1}$)	Scatchard analysis
		Binding number Avidin/probe
(A) (IL) ₂₄₀₀ -(Bio) ₅₀ -(Glc) ₁₂₃₀₀	5.4×10^6	45
(B) (IL) ₂₂₀₀ -(Bio) ₁₆₀ -(Glc) ₁₂₃₀₀	5.6×10^6	53
(C) (IL) ₂₃₀₀ -(Bio) ₃₅₀ -(Glc) ₁₂₃₀₀	7.1×10^6	76
(D) (IL) ₃₁₀₀ -(Bio) ₇₀ -(Glc) ₁₂₃₀₀	0.8×10^6	14
(E) (IL) ₃₄₀₀ -(Bio) ₁₃₀ -(Glc) ₁₂₃₀₀	1.8×10^6	33
(F) (IL) ₃₂₀₀ -(Bio) ₃₂₀ -(Glc) ₁₂₃₀₀	5.4×10^6	100

2. PVDF 膜上のビオチン化抗体とビオチン含有化学発光性デキストラン高分子との結合反応

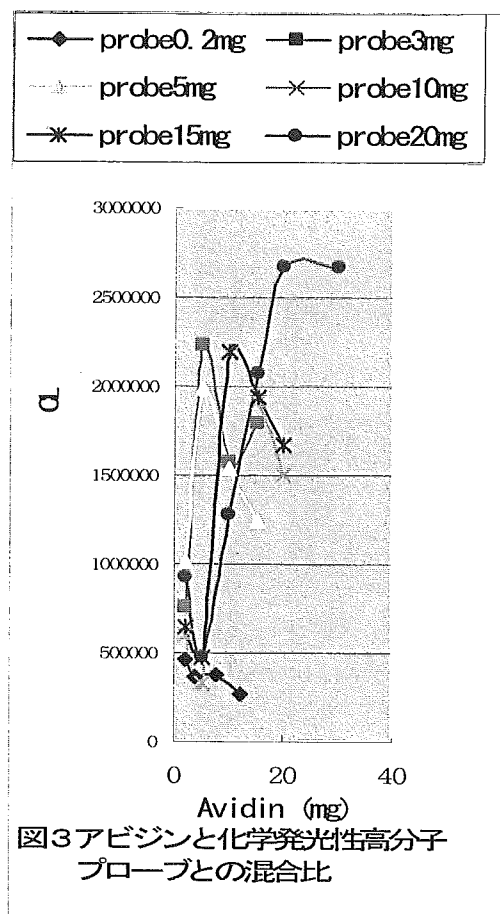


図3 アビジンと化学発光性高分子プローブとの混合比

図 1 に示した原理では、CYP を認識できるビオチン化抗体が必要であるが、現在のところそのような抗体は市販されていない。そこで、本年度の研究では、PVDF 膜に市販の抗 IgG ビオチン化抗体を直接吸着させ、合成したビオチン含有化学発光性デキストラン高分子を、アビジンタンパク質を介して、連鎖的に結合させる条件について検討した。この実験では、シャーレ中の 1xPBS 溶液にアビジンとビオチン含有化学発光性デキストラン [(IL)884-(Bio)82-(Glc)3090] を予め混合

溶解 (37°Cで 60 分間) させ、その溶液中で膜上の抗 IgG ビオチン化抗体 (800 ng) に対してビオチン含有デキストランが最も結合するときの、アビジンとビオチン含有化学発光性デキストランの最適な量比を求めることにした (図 3)。この結果、アビジンとビオチン含有化学発光性デキストランプローブとの連鎖複合体の形成は、重量比がほぼ 1 : 1 であるときに良好になることが分かった。

3. PVDF 膜上の CYP に対する捕獲用抗体及び検出用抗体との結合反応

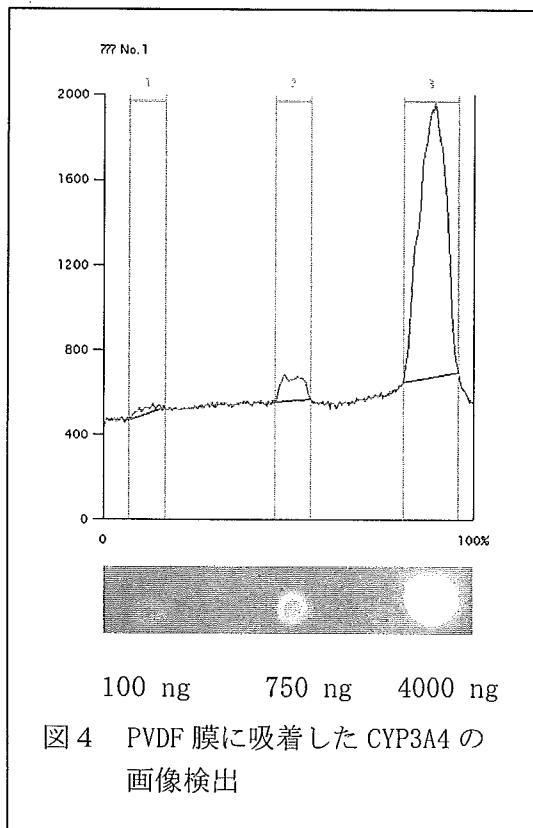


図 1 に示したように、PVDF 膜に予め吸着させた CYP タンパク質の検出を試みた。そのアッセイ系を構築するために、PVDF

膜への非特異的な吸着を減少させるためのブロッキング条件、CYP に対する特異的な一次抗体との結合反応条件、一次抗体を認識する抗 IgG 抗体 (二次抗体) との結合反応条件、さらに結合しなかった抗体の洗浄条件 (洗浄剤の組成、回数) 等について検討した。その結果、実験方法に記述した操作法を得た。

次に、このアッセイ系における CYP の検量線を作成した。この結果、CYP3A4 は、約 100 ng から 4000 ng まで定量的に化学発光により検出された (図 4)。

D. 考察

本研究では、CYP タンパク質の化学発光検出用プローブとして、多糖分子に水溶性を損なうことなく、強発光性の化学発光物質であるイソルミノールを多数結合させたデキストラン高分子を合成した。これらの化合物は、いずれも一分子あたり世界最高レベルの化学発光強度を示し、水溶液中では 10^{-16} mol、PVDF 膜やナイロン膜などの固相膜上では 10^{-15} mol レベルの分子が検出される発光強度であった。したがって、CYP タンパク質に化学発光性高分子を 10^8 個ほど連結させれば、形成されるターゲット複合体の一分子から発する光が検出できるものと考えられた。さらに、これらの水溶性の化学発光性デキストラン高分子は、長い酵素反応時間でシグナル増幅する酵素プローブと違って、化学的に酸化させると、結合している低分子量の化学発光物質の数に応

じて強い光を発するものであり、今後より高感度な計測が可能になるものと思われる。

E. 結論

今回は、ウエスタンブロットなどのアッセイ系に適用するために、CYP タンパク質を PVDF 膜にアレイ状に吸着させる簡易な方法を見出し、膜上の CYP 検体に特異的な一次抗体つづいて検出用のビオチン化二次抗体を結合させたのち、アビジンタンパク質を介し、ビオチン含有化学発光性高分子プローブを効率よく連鎖的に連結させる最適な諸条件を検討した。

これらの実験により、約 100 ng レベルの CYP タンパク質を一斉に検出測定できる簡易なプロテインチップ手法を開発できた。

一方、本研究の達成目標は、CYP のサブタイプ別に捕獲できる各 CYP 抗体を PVDF 膜にアレイ状に吸着させたのち、それらに検体である各種 CYP タンパク質を一斉に膜上に結合させ、さらにビオチン化抗体と結合させることによって、アビジンを介し、ビオチン含有化学発光性高分子プローブを効率よく連鎖的に検体と連結させることによって、各種 CYP タンパク質の一斉超高感度検出手法を開発することである。

したがって、今後は、まず各種 CYP タンパク質に特異的な市販の一次抗体にビオチンまたはアビジンタンパク質を直接付加したものを検出用抗体として調製す

る必要がある。同時に、分子数レベルの極微量 CYP タンパク質をより強い発光シグナルで検出するために、イソルミノールの代わりにさらに強い発光が期待できるルミノールを導入した化学発光性デキストラン高分子の合成と検出用プローブとして適用化するための諸条件について検討する必要がある。その後、本研究成果に基づき、PVDF 膜上において、調製する検出用抗体と CYP との結合能を検証して、より汎用性の高い CYP プロテインチップ検出システムの構築を目指すことが重要である。

参考文献

- [1] M. Kai, K. Ohta, N. Kuroda, K. Nakashima: Chemiluminescence in Analytical Chemistry (Chapter 19, Chemiluminescence and bioluminescence in DNA analysis); Ed. by A. M. Garcia-Campana, W. R. G. Baeyens; *Marcel Dekker, Inc., New York·Basel*, pp. 551-566 (2001).
- [2] J. Lu, C. Lau, M. Morizono, K. Ohta and M. Kai: A chemiluminescence reaction between hydrogen peroxide and acetonitrile and its applications, *Anal. Chem.*, 73, 5979-5983 (2001).
- [3] C. Lau, J. Lu, T. Yamaguchi and M. Kai: Controlled kinetics of non-enzymatic chemiluminescence reactions for simple imaging of DNA and protein; *Anal. Biochemical. Chem.*, 374,

1064-1068 (2002).

F. 健康危険情報

本研究においては、特記事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) M. Kai, M. Morizono, M. N. Wainaina, T. Kabashima, M. K. Lee and J. Lu: Chemiluminescence detection of amino acids using an Edman-type reagent, 4-(1'-cyanoisindolyl)phenylisothiocyanate; *Anal. Chim. Acta*, **535**, 153-159 (2005).

2. 学会発表

(1) 奥村亨輔、太田和子、椛島力、甲斐雅亮: 蛍光誘導体化反応を用いる PVDF 膜上ペプチドホルモンの画像検出; 日本薬学会第 125 年会 講演要旨集 (2) P73 東京 (2005) .

(2) 蛭子耕一、古村匡崇、太田和子、椛島力、甲斐雅亮: イソルミノールデキストランプローブの連鎖増幅効果と核酸の画像検出; 日本薬学会第 125 年会 講演要旨集 (2) P73 東京 (2005) .

(3) 椛島力、伊藤佳代、太田和子、甲斐雅亮: 糖質応答領域結合タンパク質と Mlx の相互作用に関する研究; 日本薬学会第 125 年会 講演要旨集 (3) P57 東京 (2005) .

(4) 椛島力、伊藤佳代、太田和子、甲斐雅亮: Thr666 in ChREBP doesn't relate directly to protein interaction and DNA

binding ability; 第 78 回日本生化学会大会 講演要旨集 P828 神戸 (2005) .

(5) 伊藤佳代、太田和子、椛島力、甲斐雅亮: 糖質応答領域結合タンパク質の DNA 結合能には Glu671 と Arg675 が重要である; 第 22 回日本薬学会九州支部大会 講演要旨集 P113 福岡 (2005) .

(6) 殿岡恵子、太田和子、椛島力、甲斐雅亮: TMPG 化学発光法による DNA 結合タンパク質の簡便な検出と評価; 第 22 回日本薬学会九州支部大会 講演要旨集 P154 福岡 (2005) .

(7) 奥村亨輔、太田和子、椛島力、甲斐雅亮: ペプチドの特異的蛍光反応の開発と HPLC 検出への適用; 第 18 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 講演要旨集 P155 静岡 (2005) .

(8) Masaaki Kai: Development of chemiluminescent polymeric probes and their use for the sensitive detection of DNA; The Kenya Chemical Society 5th International Conference, Abstract P12, Nairobi (Kenya) (2005).

(9) Samuel S. Libendi, Osamu Onomura, Masaaki Kai, Yoshihiro Matsumura: Stereoselective introduction of acetoxyl group to the 4-position of piperidine ring; The Kenya Chemical Society 5th International Conference, Abstract P34, Nairobi (Kenya) (2005).

(10) Moses N. Wainaina, Kazuko Ohta, Tsutomu Kabashima, Yoshihiro Matsumura, Masaaki Kai: Fluorescent detection of

amino acids derivatives sensitized by primary amines in the post cleavage conversion of peptides; The Kenya Chemical Society 5th International Conference, Abstract P36, Nairobi (Kenya) (2005).

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：発光性高分子化合物、及びそのバイオアッセイにおける利用。出願番号：国際出願番号 PCT/JP02/09649。
出願人：第一化学薬品株式会社。発明者：甲斐 雅亮。

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

薬物代謝関連タンパク質に対するアプタマー核酸の探索と 超高感度検出に関する研究

分担研究者 椛島 力 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 助教授

研究要旨

薬物代謝酵素であるチトクローム P450 (CYP) の酵素活性以外の機能を調べるために、CYP と DNA の結合性を、化学発光試薬 (3',4',5'-trimethoxyphenylglyoxal ; TMPG) を用いて調べた。この結果、CYP がある種の DNA と結合することを確認できた。これより、CYP に特異的なアプタマーの作製が可能であると考えられる。また、CYP を TMPG 化学発光反応によって高感度に検出する手法の開発のために、架橋剤を用いた DNA 標識抗体の作製を試みた。なお、TMPG 試薬は、当該研究者らが開発した化学発光試薬であり、DNA 中のグアニンと特異的に反応し、化学発光体に導くものである。

A. 研究目的

体内に投与された薬物は、肝臓において主にチトクローム P450 (CYP) と呼ばれる酵素により酸化還元され、体外へと排泄される。CYP は、多様な分子種から成り、ヒトの場合、遺伝的に規定されたアイソタイプにより、CYP1A2 (〜10%)、CYP2C9 (〜20%)、CYP2C19 (〜3%)、CYP2D6 (〜3%)、CYP3A4 (〜30%) など、約 20 種類以上の分子種が確認されている。これらの CYP が、外界から体内に入りうる一万種以上の薬物の代謝に関与するため、一つの CYP が異なる化学構造を持つ多数の薬物に作用出来るようになってい

る。このため、CYP による薬物相互作用が問題となってくる。例えば、薬物によっては CYP の発現誘導、つまり肝細胞内での産生を高めるものがあり、薬効の減弱の原因となる。また逆に、ある薬物の代謝に関与する CYP が欠損していると、体内に薬物が長く高い濃度で貯留することになり、副作用の危険性が増加する。以上のことから、CYP は、酵素としてはよく研究されているが、その他の機能に関してはあまり知られていない。

そこで、本研究では、CYP の酵素活性以外の機能を調べることを目的に、まず、CYP と DNA の結合性について調べた。

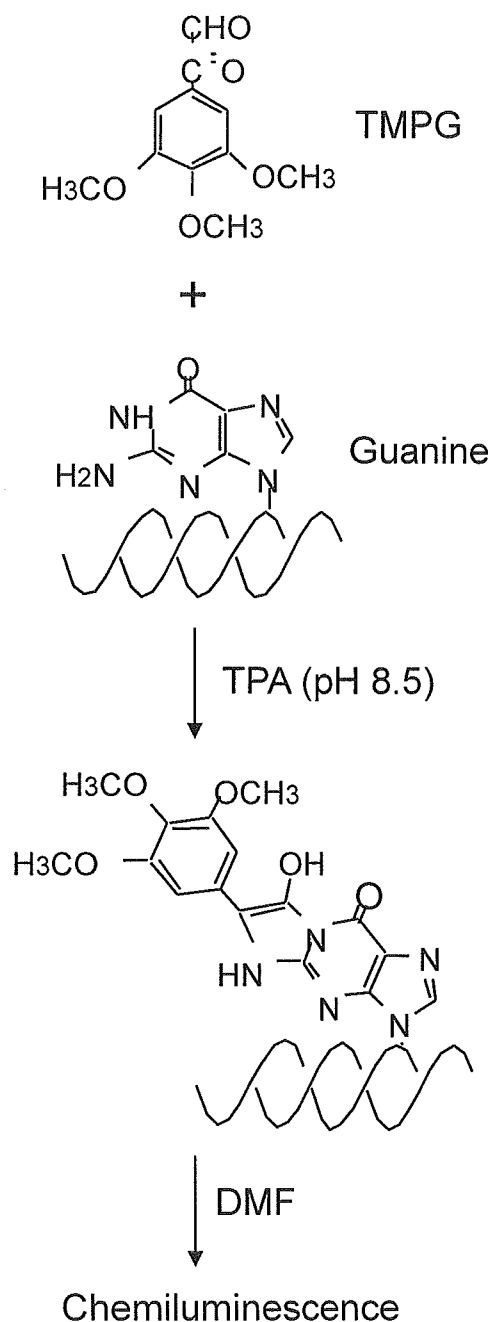


Fig.1 A chemiluminescence reaction between TMPG and DNA.

また、CYP の発現や酵素活性には個人差があり、これを調べることで、各個人に有効な投薬が可能になると期待される。

そこで、当研究室で開発した 3',4',5'-trimethoxyphenylglyoxal (TMPG) 試薬[4, 5]を用いる CYP の化学発光検出法の開発を試みた。TMPG は、DNA 中のグアニン塩基と特異的に反応する化学発光試薬である。Fig. 1 に TMPG とグアニン塩基の反応機構を示す。TMPG は、弱アルカリ性の tetra-*n*-propylammonium phosphate (TPA) 存在下、DNA 鎖中のグアニン塩基と縮合反応し特異的に発光性の物質を生成する。この生成物は、DMF などの極性非プロトン溶媒を共存させることにより化学的に発光する。このため、抗 CYP 抗体に DNA を結合させ、これを TMPG により発光検出することで、CYP の特異的な検出が可能と考えられる。この検出法は、抗体に結合させる DNA をポリグアニンにすることで、高感度化が期待できる。そこで、まず初めに、この DNA を結合させた抗体 (DNA 標識抗体) の作製を試みた。

B. 研究方法

1. CYP と DNA 間の結合測定

CYP と DNA の結合性は、ゲルシフトアッセイ、および、TMPG による化学発光検出により調べた。材料として、CYP は、CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 を用いた。DNA は、ヒト肝臓 cDNA ライブラリー、オリゴヌクレオチド、サケ精液 DNA を用いた。

ゲルシフトアッセイは、以下の方法により行った [6]。まず、cDNA ライブラリーを制限酵素 (*Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI,

Hind III, *Sal* I, *Sma* I, *Pvu* II, *Xho* I) で消化後、CYP と混合し、30 分間室温で反応させた。反応物をアガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルをエチジウムブロミドまたはクマシーブリリアントブルー溶液に浸し、DNA またはタンパク質の検出を行った。また、オリゴヌクレオチドを用いたゲルシフトアッセイには、FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識オリゴヌクレオチド (5'-FGGGCGCACGTGGCACTCACGTGGTTCC-3'および5'-FAG T TGAGGGGACTTTCCCACTAGGA ATCT-3'; F は FITC を示す) を用い、CYP と反応後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、FITC 由来の蛍光を検出した。

また、TMPG 試薬による CYP-DNA 間結合の化学発光検出は、以下のように行った。ナイロン膜 (1×2cm) に CYP (0-4 μg) を吸着させ、10 分間風乾後、膜を 6% スキムミルク水溶液に 10 分間浸しブロッキングした。膜を PBS 溶液 (1 ml) で 3 回洗浄後、サケ精子 DNA 溶液または 4 種類のオリゴヌクレオチド溶液 (5'-GGGCGCACGTGGCACTCACGTGGTTCC-3', 5'-GCAGAGCAGAAGAGGGCTTCAAT-3', 5'-GGGCGCACGGGGCCTCCGTGGTTCC-3', または 24 mer の未公開シーケンス) (各 25 μg/ml) に浸し、室温で 1 時間反応させた。反応後、膜を TE buffer (pH 7.0) (2 回) および水 (1 回) で洗浄し、0.1M TPA 溶液に 10 秒間、次いで 30 mM TMPG 溶液に 15 秒間浸した後、

CCD カメラで 2 分間化学発光を測定した。CYP と DNA 間の結合定数の測定は、サケ精子 DNA 溶液またはオリゴヌクレオチド溶液の濃度を変化させ、上記と同様に TMPG 化学発光検出により行った。

2. DNA 標識抗体の作製

TMPG 試薬を用いた CYP の化学発光検出法開発のために、DNA を結合させた抗体 (DNA 標識抗体) の作製を試みた。DNA としてオリゴヌクレオチド (5'-GGGCGCACGTGGCACTCACGTGGTTCC-3')、モデル抗体として抗マルトース結合タンパク質 (MBP) 抗体を材料として用い、これらを架橋剤により結合させることで、DNA 抗体の作製を行った。架橋剤としては、1-ethyl-3-[3-dimethylamino propyl]carbodiimide, hydrochloride (EDC)、または、succinimidyl 4-hydrazinonicotinate acetone hydrazone (SANH) と succinimidyl 4-formylbenzoate (SFB) を用いた。様々な濃度の DNA、抗体、架橋剤を 0.1 M MES buffer (pH 7.0) 中、室温で 2 時間反応させた後、未反応の架橋剤を Sephadex G-10 によるゲルろ過により除いた。その後、SDS-PAGE による分子量変化または TMPG による化学発光検出により、DNA と抗体間の架橋状態を調べた。

C. 研究結果

1. CYP と DNA 間の結合の確認

CYP と cDNA 制限酵素消化物の結合をゲルシフトアッセイにより調べたが、DNA サンプル自身の泳動像がスミアな

め、シフトしたバンドを確認することができなかつた。そこで、2種類の FITC 標識オリゴヌクレオチド (27-30 mer) を用いて、同様にゲルシフトアッセイを行ったところ、2種の FITC 標識オリゴヌクレオチドともにバンドのシフトが確認された。また、ナイロン膜に CYP を吸着後、サケ精子 DNA またはオリゴヌクレオチドと反応させ、TMPG により化学発光検出した場合も、CYP とそれら DNA との結合が確認された (Fig. 2A)。

代わりに BSA とリゾチームを膜に固定化後、同様に化学発光検出を行ったが、これらのタンパク質では発光が見られなかつた (Fig. 2B)。CYP3A4 を膜に固定化後、サケ精子 DNA またはオリゴヌクレオチド (5'-GGGCGCACGTGGCACTCACGTGG TTCC-3') と結合させ、TMPG によって化学発光検出して、その結合定数を求めたところ、サケ精子 DNA では $1.1 \times 10^4 M^{-1}$ 、そのオリゴヌクレオチドでは $5.3 \times 10^6 M^{-1}$ であった。

(A) CYP (B) control proteins

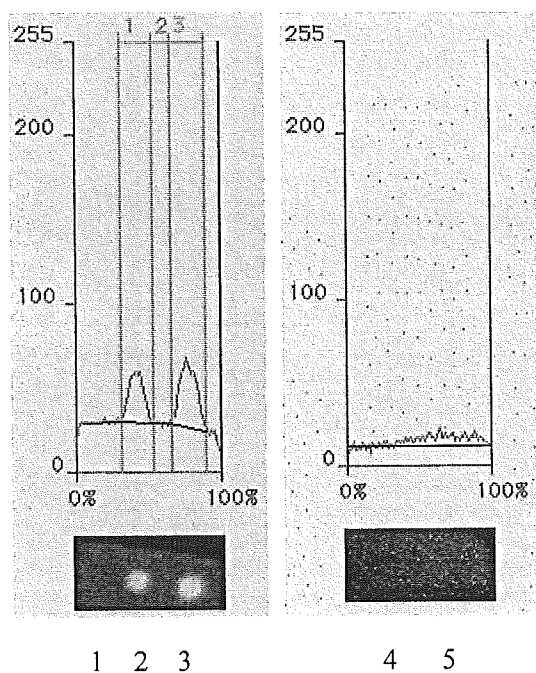


Fig. 2 Chemiluminescence image of CYP.

Spots 1-3, CYP 0, 2, 4 μg ; Spot 4, BSA 5 μg ; Spot 5, Lysozyme 5 μg .

さらに、CYP の種類やオリゴヌクレオチドの配列により、発光の度合いが異なっていた。コントロールとして、CYP の

2. DNA 標識抗体の作製

架橋剤による DNA を結合させた抗体 (DNA 標識抗体) の作製を試みた。最初に、架橋剤として、カルボキシル基とアミノ基を架橋する EDC を用いた。抗 MBP 抗体とオリゴヌクレオチド、および、EDC を混合し室温で反応させ、SDS-PAGE による分子量の変化を調べた。その結果、抗 MBP 抗体よりも高分子のバンドが確認でき、さらにこのサンプルを膜に固定化後 TMPG により化学発光させたところ、発光が検出できたことから、目的の DNA 標識抗体を作製できたと考えられる。しかし、SDS-PAGE の結果から、未反応の抗 MBP 抗体が多量に残っており、量比や時間、pH などの反応条件を検討したが、目的の DNA 標識抗体の収量を上げることはできなかった。また、架橋剤を EDC から SANH と SFB に変更したが、わずかな収量の改善は見られたが、未反応の抗体が多量に残っていた。抗 MBP 抗体の代

わりに BSA を用いた場合では、いずれの架橋剤においても、ほぼ全ての BSA が DNA と架橋していた。

D. 考察

CYP の酵素活性以外の機能を調べるために、まず CYP とサケ精子 DNA の結合性を調べたところ、弱く結合することが分かった。そこで、CYP の種類や 24-27 mer のオリゴヌクレオチドとの結合性を調べた結果、配列の違いにより、化学発光の度合いが異なっていたことから、CYP とオリゴヌクレオチド間の結合力は、ヌクレオチド配列により異なると考えられた。今回使用したオリゴヌクレオチドは、当研究室で別の研究に使用していたものであり、配列を変更することにより、CYP とより強固に結合するオリゴヌクレオチドを見出すことが可能であると推定された。最近、標的分子に特異的に結合する核酸分子が注目されている。このような核酸分子はアプタマーと呼ばれ、抗体に替わるものとして期待されている。アプタマーの利点として、化学合成による大量生産が可能、抗体のような変性の心配がない、様々な物質（毒性物質や低分子物質など）を標的分子にできる、などが挙げられる。今回の研究結果から、CYP に特異的なアプタマー（CYP と強固に結合するオリゴヌクレオチド）の開発が可能であると期待できた。このようなアプタマーが作製できれば、CYP の特異的な検出に応用でき、さらに、今回使用した

TMPG は、直接アプタマーを化学発光で検出することが可能である。今後、今回用いたオリゴヌクレオチドの配列をもとに、CYP に特異的なアプタマーの探索を行う予定である。

また、TMPG を用いた CYP の化学発光検出法の開発のために、DNA 標識抗体の作製を試みた。TMPG は DNA 中のグアニンの量に比例して発光強度が増幅する化学発光試薬であり、抗体にポリグアニンを結合させることで、標識抗体として様々な分野で利用できると考えられる。現在、抗体の標識には酵素標識や蛍光標識があるが、DNA 標識は、これらに比べて安定性がよい、発光の増強が容易であるという利点が考えられる。今回の架橋剤を用いた方法では、BSA と DNA の架橋反応はほぼ完全に進行したが、抗体と DNA の架橋反応では、同一条件でもあまり反応が進まなかった。この原因として、抗体のアミノ酸配列や立体構造に由来するものと考えられる。今後、架橋剤の種類や抗体の分子種について検討していく予定である。

E. 結論

CYP と DNA の結合性を調べたところ、弱いながらも結合することがわかった。このことから、CYP に特異的なアプタマーの作製が可能であると推定できる。また、TMPG を用いた CYP の化学発光検出法のための DNA 標識抗体の作製に関しては、架橋剤や抗体の分子種、反応条件

などについて検討する必要がある。

参考文献

[4] M. Kai, S. Kishida and K. Sakai: A chemiluminescence derivatisation method for detecting nucleic acids and DNA probes using a trimethoxyphenylglyoxal reagent that recognizes guanine; *Anal. Chim. Acta*, **381**, 155-163 (1999).

[5] J. Lu, C. Lau and M. Kai: Magnetic bead-based label-free chemiluminescence detection of telomeres; *Chem. Commun.*, 2888-2889 (2003).

[6] T. Kawaguchi, M. Takenoshita, T. Kabashima, and K. Uyeda: Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation / dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13710-13715 (2001).

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) M. Kai, M. Morizono, M. N. Wainaina, T. Kabashima, M. K. Lee and J. Lu: Chemiluminescence detection of amino acids using an Edman-type reagent, 4-(1'-cyanoisindolyl)phenylisothiocyanate; *Anal. Chim. Acta*, **535**, 153-159 (2005).

2. 学会発表

(1) 奥村亨輔、太田和子、椛島力、甲斐雅亮：蛍光誘導体化反応を用いる PVDF 膜上ペプチドホルモンの画像検出；日本薬学

会第 125 年会 講演要旨集 (2) P73 東京 (2005) .

(2) 蛭子耕一、古村匡崇、太田和子、椛島力、甲斐雅亮：イソルミノールデキストランプローブの連鎖増幅効果と核酸の画像検出；日本薬学会第 125 年会 講演要旨集 (2) P73 東京 (2005) .

(3) 椛島力、伊藤佳代、太田和子、甲斐雅亮：糖質応答領域結合タンパク質と Mlx の相互作用に関する研究；日本薬学会第 125 年会 講演要旨集 (3) P57 東京 (2005) .

(4) 椛島力、伊藤佳代、太田和子、甲斐雅亮：Thr666 in ChREBP doesn't relate directly to protein interaction and DNA binding ability；第 78 回日本生化学会大会 講演要旨集 P828 神戸 (2005) .

(5) 伊藤佳代、太田和子、椛島力、甲斐雅亮：糖質応答領域結合タンパク質の DNA 結合能には Glu671 と Arg675 が重要である；第 22 回日本薬学会九州支 講演要旨集 P113 福岡 (2005) .

(6) 殿岡恵子、太田和子、椛島力、甲斐雅亮：TMPG 化学発光法による DNA 結合タンパク質の簡便な検出と評価；第 22 回日本薬学会九州支部大会 講演要旨集 P154 福岡 (2005) .

(7) 奥村亨輔、太田和子、椛島力、甲斐雅亮：ペプチドの特異的蛍光反応の開発と HPLC 検出への適用；第 18 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 講演要旨集 P155 静岡 (2005) .

(8) Moses N. Wainaina, Kazuko Ohta,

Tsutomu Kabashima, Yoshihiro Matsumura,
Masaaki Kai: Fluorescent detection of
amino acids derivatives sensitized by
primary amines in the post cleavage
conversion of peptides; The Kenya
Chemical Society 5th International
Conference, Abstract P36, Nairobi
(Kenya) (2005).

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Kai, M. Morizono, M. N. Wainaina, T. Kabashima, M. K. Lee, J. Lu	Chemiluminescence detection of amino acids using an Edman-type reagent, 4-(1'-cyanoisindolyl) phenylisothiocyanate	<i>Anal.</i> <i>Chim. Acta</i>	535	153-159	2005



Chemiluminescence detection of amino acids using an Edman-type reagent, 4-(1'-cyanoisindolyl)phenylisothiocyanate

Masaaki Kai^{a,*}, Mikio Morizono^a, Moses Njoroge Wainaina^a, Tsutomu Kabashima^a,
Myung Koo Lee^b, Jianzhong Lu^c

^a School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-Machi, Nagasaki 852-8521, Japan

^b College of Pharmacy, and Research Center for Bioresource and Health, Chungbuk National University,
San 48, Kaeshin-Dong, Heungduk-Gu, Cheongju 361-763, South Korea

^c School of Pharmacy, Fudan University, 138 Yixueyuan Road, Shanghai 200032, PR China

Received 23 August 2004; received in revised form 23 November 2004; accepted 23 November 2004

Available online 28 December 2004

Abstract

The 4-(1'-cyanoisindolyl)phenylisothiocyanate (CIPIC) could be used as a chemiluminescence (CL) Edman-type reagent. Firstly, CL reaction conditions such as pH, buffer types, H₂O₂ concentration and organic solvents were optimized in detail. Secondly, the CL sensitivity of the derivative of Ala was compared with fluorescence and absorbance detections. Thirdly, the structures of the CL intermediate and emitter were elucidated by liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) and NMR of CIPIC and its analogues after their CL reactions. Consequently, the thiohydantoin derivatives for 16 kinds of amino acids were separated and sensitively detected by CL with lower detection limits of 0.3–0.8 pmol at a signal-to-noise ratio of 3, after the coupling reaction of amino acids with CIPIC and their cyclisation reaction.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Chemiluminescence detection; Amino acid; Derivatisation; Edman-type reagent; CIPIC

1. Introduction

With the complete sequence of human genome, the whole genomic and proteomic expressions have been recently investigated. It will provide various informations about the coordinate regulation among many genes since almost all cell activation or phenotypes are the sum of a series of molecular and biochemical events interacting with each other in a complex fashions. It is well known that gene expression is controlled by numerous fundamental and selective protein–protein, protein–DNA, protein–RNA and protein–ligand interaction. Therefore, the post-genomic era has been a rapidly increasing need and desire to enhance and support genomic studies with proteomic data. The medical rationale behind analyzing proteins is to improve our understanding of normal and disease

processes. Consequently the development of protein technology is beginning to move forward rapidly. Most importantly, the ability to characterize the composition and amino acid sequence of proteins is highly desirable.

However, phenylisothiocyanate (PITC), the Edman reagent, is still the most widely used for the determination of the amino acid composition and sequence of protein and peptides [1–5]. The Edman procedure consists of three steps: a coupling reaction with Edman reagent; a cyclisation/cleavage reaction in the presence of anhydrous acid and generation of amino acids thiazolinone derivatives; and a conversion reaction to stable thiohydantoin derivatives. The reactivity with PITC is high and the repetitive yield is good (more than 95%). However, the sensitivity of UV absorbance detection for the amino acid derivatives with PITC is fairly low compared with generally used laser-based fluorescence method for the detection of DNA sequence. Therefore the main drawback of this UV detection method is that at least 100 pmol peptide

* Corresponding author. Tel.: +81 95 819 2438; fax: +81 95 819 2438.

E-mail address: ms-kai@net.nagasaki-u.ac.jp (M. Kai).