

厚生労働科学研究費補助金

トキシコゲノミクス研究事業

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 甲斐 雅亮

平成19（2007）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

化学発光性高分子プローブを用いるCYPタンパク質のプロテインチップ
高感度検出法の技術開発に関する研究 ----- 8

甲斐 雅亮

CYPタンパク質に対する抗体代替用アプタマー核酸の創製と
高感度検出に関する研究 ----- 16

椛島 力

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 24

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 25

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

ヒトの薬物代謝は、主にチトクローム P450 (CYP) の酵素類が担っている。これらの活性の違いは、DNA の塩基配列の違いに基づくタンパク質の一次構造の差以外にも、発現後のタンパク質の二次的な構造変化も重要な因子である。従って、薬に対する反応の個人差を調べるために、CYP 自体の個人差を直接解析できる新手法が必要である。我々は、デキストラン高分子や核酸高分子に、低分子量の化学発光物質を多数標識すると、その導入数に比例した発光シグナルが得られる現象を見出している。この現象に基づき、強発光性検出用プローブとして、平均分子量 50-200 万のデキストランに多数のルミノール及びビオチンを導入したものを創製し、さらにアビジンタンパク質との連鎖結合によってプローブ複合体の形成による発光の増幅も確認している。

本年度の研究では、この発光性デキストラン高分子プローブを用いて、膜上にスポットした CYP 類を検出するために、その CYP を特異的に認識する抗体、さらにそれを検出するためのビオチン化二次抗体と化学発光性高分子プローブを同時に結合させて測定する方法へ改善し、PVDF 膜上に吸着させた 10 ng レベルの CYP3A4 の定量的検出法の開発に成功した。さらに、各種 CYP の抗体アレイを PVDF 膜上に作成したのち、シャーレ中の多種類 CYP 検体を同時にかつ網羅的に検出できる手法として、検出用抗体および発光性高分子プローブをサンドイッチ状に結合させる抗体アレイチップ CYP アッセイ系の測定法を開発した。現在のところ 50 ng/ml の CYP3A4 の検出を可能にしている。

一方、CYP を認識する抗体の代替用として使用可能なアプタマー核酸の創製研究を行った。それは、試験管内で大量生産することが可能であり、さらにビオチン化反応などの化学修飾もより容易に行えるからである。その結果、25mer の全ての塩基配列を有する 59merDNA プールから、CYP と結合する DNA を探索し、CYP に結合する 59mer の特定配列の 2 本鎖 DNA を見出し、大腸菌にて大量培養できる組換えプラスミドの作成技術を確認した。

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

(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

A. 研究目的

体内の薬物は、主にチトクローム P450

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で、薬効、副作用、重症化、合併症などに対する個人差の解析がより的確になるものと考えられる。

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各種CYP類をプロテインチップ上で直接かつ一斉に定量的検出できる新しい超高感度多型解析手法を開発して、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。その理由は、DNAや遺伝子検体が、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斉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[1-4]。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、高い検出感度を得るところにある。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である。

したがって、本年度の研究では、まず、PVDF膜上にスポットしたCYP類を検出するために、そのCYPを特異的に認識する抗体、さらにビオチン化二次抗体と化学発光性デキストラン高分子を、それぞれ効率よく結合させて検出する高感度検査法について検討した。次に、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に対する特異的な認識用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、高感度な検出を可能にする新技術開発を検討した。この研究は主任研究者が主に担当した。

一方、上述の網羅的検出法を実用化するには、各種CYPを認識できるモノクローナル抗体ならびにそのビオチン化ポリクローナル抗体を必要とする。現在のところ、数種のCYPに対する抗体以外は市販されていない。各種のモノクローナ

ル抗体の作成には莫大な費用と時間が必要である。したがって、抗体と代替できるアプタマー核酸を見出すことができれば、試験管内で再現性よく大量生産することが可能であり、さらにビオチン化などの化学修飾も抗体よりもより容易に行える利点がある。そこで、本年度の研究では、25mer の全塩基配列を有する 59mer の DNA プールを用いて、CYP3A4 と結合する一本鎖 DNA と二本鎖 DNA を探索することにした。この手法の開発研究は、主に梶島分担研究者が担当した。

B. 研究方法

1. 化学発光性高分子プローブを用いる CYP タンパク質のプロテインチップ高感度検出法の技術開発

平均分子量 200 万または 50 万のデキストラン分子に、50～500 のビオチン及びイソルミノール又はルミノールを 2000～5000 結合させた約 20 種類の化学発光性デキストラン高分子を合成した。その中で、ルミノールを導入したビオチン化高分子がより強く化学発光することが分かり、これを検出用プローブとして用いた。

PVDF 膜へ CYP タンパク質類を吸着させ、CYP3A4 の認識用（一次）抗体、ビオチン化検出用（二次）抗体及びビオチン化発光性高分子プローブ複合体を、アビジンタンパク質、ブロッキング剤としての BSA およびデキストラン存在下、同時に結合反応させた。反応後、トライトン X-100 を含む PBS で洗浄後、化学発光試液に浸

して、暗箱中で化学発光を測定した。

また、PVDF 膜へ CYP3A4 のモノクローナル抗体を吸着させ、シャーレ中で検体である CYP3A4 結合させたのち、CYP3A4 のビオチン化ポリクローナル抗体、ビオチン化発光性高分子プローブ複合体、アビジンタンパク質、BSA、デキストランを、1xPBS 中で同時に結合反応させた。反応後、トライトン X-100 を含む PBS で洗浄後、化学発光試液に浸して、暗箱中で化学発光を測定した。

2. CYP タンパク質に対する抗体代替用アプタマー核酸の創製と高感度検出

PCR 増幅のプライマーならびに逆転写酵素（DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ）の認識部位にもなる 17mer のプライマーを 5' 側と 3' 側に導入させて、かつ中央の部位に 25mer の全ての塩基配列を有する 59mer の鋳型 DNA（DNA プール）を依頼合成した。これらを鋳型 DNA として、ビオチン化プライマーを用いて PCR 増幅したのち、市販のアビジン結合ミニアフィニティーカラムでビオチン化一本鎖の DNA（4²⁵ 種類から成る）混合物を調製した。

これらを CYP3A4 タンパク質と結合反応させたのち、結合した一本鎖 DNA を分子量分画ミニカラムによってランダムに精製した。それを二本鎖 DNA に PCR 変換後、プラスミドに組換えし大腸菌に導入して、培養後、同一遺伝子を持つ大腸菌コロニーを 12 個スクリーニングし、塩基配列を決定した。次に、ナイロン膜に吸着させた CYP3A4 に対するそれら DNA の結合性を

調べた。

3. 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. 化学発光性高分子プローブを用いる CYP タンパク質のプロテインチップ高感度検出法の技術開発

膜上に吸着させた CYP 類を検出するために、その CYP を特異的に認識する一次抗体、さらにそれを検出するためのビオチン化二次抗体と予め形成させた化学発光性デキストラン高分子の複合体を、同時に結合させることによって、昨年度よりも迅速かつ高感度な方法へ改善でき、PVDF 膜上に吸着させた 10 ng レベルの CYP3A4 が検出できるプロテインチップ検査法の開発に成功した。

次に、CYP の抗体アレイを PVDF 膜上に作成したのち、シャーレ中の多種類 CYP 検体を同時にかつ網羅的に検出できる手法として、検出用抗体および発光性高分子プローブをサンドイッチ状に結合させる抗体アレイチップ CYP アッセイ系の検査法を開発した。現在のところ 50 ng/ml の CYP3A4 の検出が可能になっている。

2. CYP タンパク質に対する抗体代替用アプタマー核酸の創製と高感度検出

25mer の全ての塩基配列を有する 59merDNA プールから、CYP3A4 と結合する 9 種類の一本鎖及び二本鎖 59merDNA を作成することができた。次に、それらの CYP3A4 に対する結合性を、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迅速(2分間以内)に化学発光体に変換できる TMPG 試薬を用いて調べた結果、予想に反して、二本鎖 DNA の方が強く結合することが判明した。大腸菌にて、その DNA を大量生産できる組換えプラスミドの作成技術を確立した。

D. 考察

本年度の研究において、一次抗体、二次抗体及び発光性高分子プローブを、アビジンならびにブロッキング剤として BSA 及びデキストランを共存させて1時間インキュベートさせることによって、世界最高感度を与える膜上の CYP3A4 を定量的に検出できるプロテインチップ検査法の開発に成功した。この方法は、多検体中の特定 CYP を一枚の膜アレイ上で一斉に検出する方法として優れている。

一方、各個人（検体が一種類）が有する多種類の CYP をプロテインチップ上で網羅的に検出する方法としては、各種 CYP サブタイプの抗体を膜にスポットした抗体アレイ膜を用いるサンドイッチアッセイ系が優れている。そこで、CYP3A4 を認識できるモノクローナル抗体を PVDF 膜に吸着させたのち、それに検体である CYP3A4 とそのビオチン化ポリクロ

ーナル抗体、さらにビオチン化発光性高分子プローブを連鎖的に検体に連結させて検出する方法を開発した。しかしながら、この網羅的検出法を実用化するには、現在のところ、CYP3A4、CYP2E1、CYP1A2 以外にはモノクローナル抗体は市販されていないので、各種 CYP に対するモノクローナル抗体の作成が必要であり、さらに結合部位が異なるビオチン化ポリクローナル抗体も作成する必要性があることが分かった。

一方、抗体代替用アプタマー核酸の創製研究では、CYP3A4 と結合する 9 種類の一本鎖及び二本鎖 59merDNA を作成することができ、それらの CYP3A4 に対する結合性を、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迅速 (2 分間以内) に化学発光体に変換できる TMPG 試薬[4]を用いて調べた結果、予想に反して、二本鎖 DNA の方が強く結合することが判明した。今後、この手法を用いて、安定なアプタマー核酸として二本鎖 DNA の再探索、また、文献上では一本鎖 RNA の方がより強い結合性を示すので、一本鎖 RNA の探索、さらに、それらを抗体の代替として使用する評価研究などを行う必要があると考える。

E. 結論

本年度の研究において、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、化学発光性のデキストラン高分子プローブを用いて、多検体中の特定 CYP を

一枚の膜アレイ上で一斉に高感度に検出する簡便な方法を開発した。さらに各個人 (一種類の検体) が有する多種類の CYP を網羅的に一斉検出する方法とし、CYP 3A4 の抗体を膜にスポットした抗体アレイ膜を用いたサンドイッチアッセイ系を開発した。

なお、この網羅的検出法を実用化するには、各種の CYP サブタイプを認識できるモノクローナル抗体ならびにそれらのビオチン化ポリクローナル抗体が必要である。これらの大部分は市販されていないので、新たに創製する必要がある。しかし、試作したビオチン化抗体は、CYP 以外にも他の抗体と非特異的に若干結合しており、各種のモノクローナル抗体の作成には莫大な費用と時間が必要である。したがって、今後、これらの抗体の代替として、CYP を特異的に認識でき、かつ強い結合性を示すアプタマー核酸の創製研究と超高感度検出系の構築研究が急務である。

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).

[4] Keiko Tonooka, Tsutomu Kabashima, Mutsumi Yamasuji and Masaaki Kai; Facile determination of DNA-binding nuclear factor- κ B by chemiluminescence detection; *Anal. Biochem.*, **364**, 30-36 (2007).

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) Keiko Tonooka, Tsutomu Kabashima, Mutsumi Yamasuji and Masaaki Kai; Facile determination of DNA-binding nuclear factor- κ B by chemiluminescence detection; *Anal. Biochem.*, **364**, 30-36 (2007).

(2) 甲斐雅亮, 梶島 力: ベーシック分析化学 (第 13 章 質量分析, 第 16 章 タンパク質と核酸の標識); 梶化学同人, 東京, pp.169-185, pp.210-222, 2006.

2. 学会発表

(1) 殿岡恵子、太田和子、梶島 力、甲斐雅亮: TMPG 試薬による DNA 結合タンパク質の高感度簡易化学発光検出; 日本薬学会第 126 年会、要旨集 2P36、仙台(2006).

(2) 伊藤佳代、梶島 力、太田和子、甲斐雅亮: 糖質応答領域結合タンパク質の変異体の機能解析; 日本薬学会第 126 年会、要旨集 2P36、仙台(2006).

(3) Moses N. Wainaina, 太田和子、梶島 力、甲斐雅: Sensitization of amino acids derivatives using 4-cyanoisindolyl aniline in the post cleavage conversion of peptide for protein sequence; 日本薬学会第 126 年会、要旨集 2P36、仙台(2006).

(4) Huan Zhang、梶島 力、甲斐雅亮: Detection of CYP3A4 by chemiluminescent polymeric probes on PVDF membrane; 生物発光化学発光研究会第 24 回学術講演会、抄録集 P56-57、東京(2006).

(5) 殿岡恵子、梶島 力、甲斐雅亮: DNA 結合型 NF- κ B の簡易化学発光検出; 生物発光化学発光研究会第 24 回学術講演会、抄録集 P58-59、東京(2006).

(6) Zhang Huan、梶島 力、甲斐雅亮: Chemiluminescent detection of cytochrome P450 by polymeric isoluminol probes; 日本分析化学会第 55 年会、講演要旨集 P287、大阪(2006).

(7) Wainaina N. Moses、梶島力、甲斐雅亮: Fluorescent derivatization with CIA in an alternate post cleavage conversion of anilinothiazolinone deriv

atives for protein sequencing; 日本分析化学会第 55 年会、講演要旨集 P287、大阪(2006).

(8) 殿岡恵子、椛島 力、甲斐雅亮: 標識 DNA を必要としない DNA 結合タンパク質の発光検出、日本分析化学会第 55 年会、講演要旨集 P288、大阪(2006).

(9) 殿岡恵子、椛島 力、甲斐雅亮: TMP G による溶液中 DNA の迅速な化学発光検出反応; 第 23 回日本薬学会九州支部大会、講演要旨集 P130、熊本(2006).

(10) 山筋睦美、椛島 力、甲斐雅亮: TMP G 反応の PVDF 膜上での核酸化学発光検出; 第 23 回日本薬学会九州支部大会、講演要旨集 P131、熊本(2006).

(11) 古村匡崇、椛島 力、甲斐雅亮: ルミノールデキストランプローブによるナイロン膜上の DNA 化学発光画像検出; 第 23 回日本薬学会九州支部大会、講演要旨集 P132、熊本(2006).

(12) Huan Zhang、椛島 力、甲斐雅亮: Application of dextran luminol probe on cytochrome p450 detection; 第 23 回日本薬学会九州支部大会、講演要旨集 P133、熊本(2006).

(13) Moses N.Wainaina, Tsutomu Kabashima, Masaaki Kai: Sequencing of native insulin by HPLC derivatized with fluorescent CIA in alternative post cleavage conversion; 第 23 回日本薬学会九州支部大会、講演要旨集 P134、熊本(2006).

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称: LUMINESCENT POLYMER AND USE THEREOF IN BIOASSAY。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

化学発光性高分子プローブを用いる CYP タンパク質のプロテインチップ
高感度検出法の技術開発に関する研究

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

本研究事業では、CYP 多型を的確に把握するために、細胞内に極微量発現している CYP 類を一斉に、かつ直接検出できる簡便かつ高感度な検査法を開発している。この研究目標を達成するためには、従来にない新しい検出原理が必要である。我々は、デキストラン高分子や核酸高分子に、低分子量の化学発光物質を多数標識すると、その導入数に比例した発光シグナルが得られる現象を見出している。この現象に基づき、強い化学発光性検出用プローブとして、平均分子量 200 万または 50 万のデキストランに多数のルミノール及びビオチンを導入したものを合成して、アビジンタンパク質との連鎖複合体の形成によって発光の増幅を確認した。

本年度の研究では、この発光性高分子プローブを用いて、膜上にスポットした CYP 類を検出するために、その CYP を特異的に認識する抗体、さらにそれを検出するためのビオチン化二次抗体と化学発光性デキストラン高分子を同時に結合させて検出する方法へ改善し、PVDF 膜上に吸着させた 10 ng レベルの CYP3A4 の定量的検出法の開発に成功した。さらに、各種 CYP の抗体アレイを PVDF 膜上に作成したのち、シャーレ中の多種類 CYP 検体を同時にかつ網羅的に検出できる手法として、検出用抗体および発光性高分子プローブをサンドイッチ状に結合させる抗体アレイチップ CYP 検査法を開発した。

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、

合併症などに対する個人差の解析がより的確になるものと考ええる。

本研究の達成目標は、薬に対する反応の個人差を調べるために、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、それらと結合する各種 CYP タンパク質量を一斉に膜上において超高感度検出できるハイスループットなプロテインチップアッセイ法を開発することである。

当該研究者らは、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[1-4]。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、高感度検出を可能にするところにある。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。

本年度の研究では、まず、PVDF膜上にスポットしたCYP類を検出するために、そのCYPを特異的に認識する抗体、さらにビオチン化二次抗体と化学発光性デキストラン高分子を、それぞれ効率よく結合させて検出する方法について検討した(図1右)。さらに、各種CYPを認識できるモノクローナル抗体のアレイをPVDF膜上に作成したのち、シャーレ中の多種類CYP検体を同時にかつ網羅的に検出するために、検出用ポリクローナル抗体および発光性高分子プローブをサンドイッチ状に結合させる抗体アレイチップCYPの検査法についても検討した(図1左)。

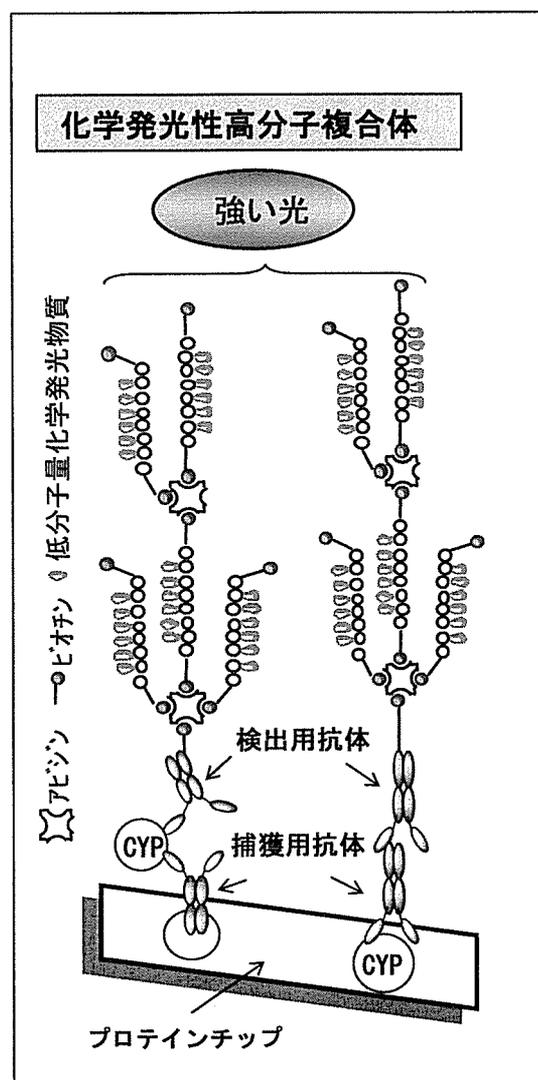


図1 高分子複合体によるCYP
プロテインチップの化学発光検出

B. 研究方法

1. PVDF膜に吸着させたCYP3A4の検出

シャーレ (35 mm ID) に1xPBS (pH 7.4) 2 mL を加えて、化学発光性デキストランプローブ 2 mg、アビジンタンパク質 2 mg、牛血清(BSA) 3 mg、デキストラン 3 mg を順次加えて、攪拌後、1分間超音波をかけて溶かした。これを、37°Cで1時間イン

キュベートして、プローブの複合体を形成させた。

一方、PVDF 膜にリコンビナントヒト CYP3A4 (0, 53, 106 ng/2 μ L ; 1xPBS 溶液)を吸着させ、10 分間減圧乾燥後、先のプローブ複合体形成反応液中に浸して、同時に、その溶液に認識用抗体として抗ヒト CYP3A4 ウサギポリクローナル抗体(46 μ g/8 μ L)、検出用抗体として抗ウサギ IgG ヒツジビオチン化抗体(40 μ g/80 μ L)を加えて、37°Cで1時間インキュベートした。膜を 1xPBS (0.15 % w/v トライトン X-100 含む) 溶液 15 mL で10 分間洗浄した。この洗浄を3回繰り返したのち、75 %メタノール水溶液で5分間1回洗浄後、膜についている過剰のメタノール洗浄液を紙で吸い取り、減圧下10分間膜を乾燥させた。化学発光試液 (アセトニトリル 700 μ L、0.5 M テトラブチルアンモニウム水溶液 280 μ L 及び 30 % 過酸化水素水 30 μ L:用事調製) に10秒間浸し、直ちに2分間化学発光画像を暗室中 CCD カメラで測定した。

2. PVDF 膜に吸着させたモノクローナル抗体による CYP3A4 の検出

シャーレ(35 mm ID)に 1xPBS (pH 7.4) 2 mL を加えて、化学発光性デキストラン プローブ 2 mg、アビジンタンパク質 2 mg、牛血清(BSA) 3 mg、デキストラン 3 mg を順次加えて、攪拌後、1分間超音波をかけて溶かした。これを、37°Cで1時間インキュベートして、プローブの複合体を形成させた。

その間に、PVDF 膜に抗ヒト CYP3A4 マウスモノクローナル抗体 (0, 53, 105 ng/2 μ L ; 1xPBS 溶液) を吸着させ、10分間減圧乾燥後、シャーレ中 1xPBS 2 mL に検体としてリコンビナントヒト CYP3A4 (265 ng/50 μ L ; 1xPBS 溶液)を加えて、37°Cで30分間インキュベートした。膜を取り出し、1xPBS で10分間洗浄したのち、予め反応させていたプローブ複合体形成反応液中(2mL)に浸漬し、同時に、その溶液に検出用抗体として試作したビオチン化抗ヒト CYP3A4 ウサギポリクローナル抗体(40 μ g/100 μ L)を加えて、37°Cで1時間インキュベートした。膜を 1xPBS (0.15 % w/v トライトン X-100 含む) 溶液 15 mL で10分間洗浄した。この洗浄を3回繰り返したのち、75 %メタノール水溶液で5分間1回洗浄後、膜についている過剰のメタノール洗浄液を紙で吸い取り、減圧下10分間膜を乾燥させた。化学発光試液 (アセトニトリル 700 μ L、0.5 M テトラブチルアンモニウム水溶液 280 μ L 及び 30 % 過酸化水素水 30 μ L:用事調製) に10秒間浸し、直ちに2分間化学発光画像を暗室中 CCD カメラで測定した。

3. 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

平均分子量 200 万または 50 万のデキストラン分子に、50～500 のビオチン及びビソルミノール又はルミノールを 2000～5000 結合させた約 20 種類の化学発光性デキストラン高分子を合成した。その中で、ルミノールを導入したビオチン化高分子がより強く化学発光することが分かり、これを検出用プローブとして用いた。

1. PVDF 膜に吸着させた CYP3A4 の検出

図 1 (右側) に示したように、PVDF 膜に吸着させた 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 を認識する一次抗体 (認識用抗体) との結合反応条件、一次抗体を認識する抗 IgG 抗体 (検出用抗体) との結合反応条件、さらに結合しなかった抗体及び化学発光性高分子プローブ複合体の洗浄条件 (洗浄剤の組成、回数) 等について検討した。その結果、ルミノール及びビオチンを多数含むデキストラン高分子プローブは、予めアビジンタンパク質と反応させることによってプローブの複合体を形成させることが効果的であることが分かった。その際、プローブ自身とアビジンとの非特異的な結合、さらに PVDF 膜上の CYP と結合させる際に、タンパク質であるアビジンや抗体が PVDF 膜に吸着し易いので、この非特異的な結合を防止するために、プローブ複合体形成溶液と CYP との結合反応液には、BSA と非修飾デキストランを加えるこ

とにした。

また、迅速なアッセイ系を構築するために、各抗体とプローブ複合体を同時に膜上の CYP に結合させることにした。これにより、それぞれ段階的に結合させた場合に較べて、アッセイ時間が約 1/2 に減少し、操作も極めて簡便になり、かつ感度も約 10 倍高くなった。

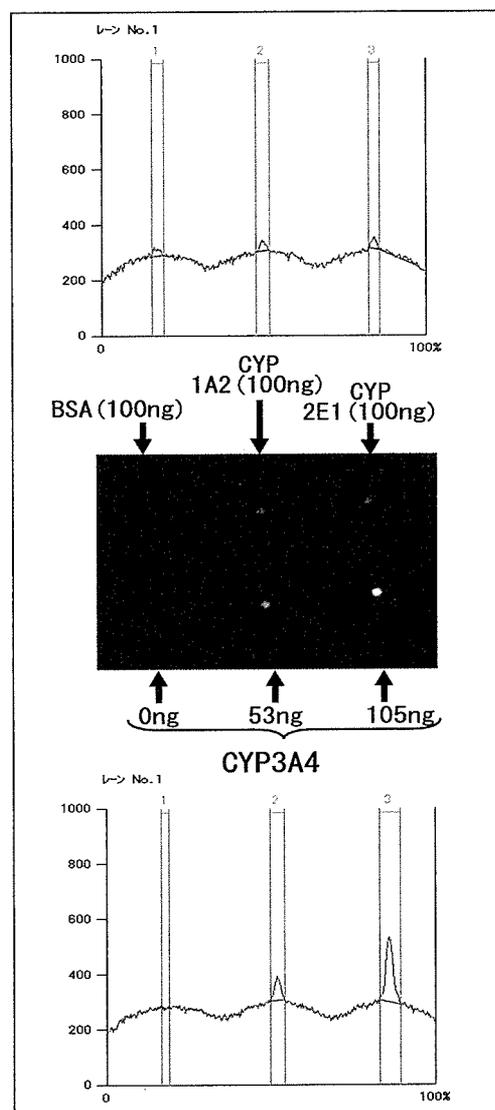


図 2 膜にスポットした CYP3A4 の免疫化学発光画像測定

以上の検討結果、図2に示すように、約 10ng の CYP3A4 が定量的に発光イメージとして検出できることが分かった。また、関連するタンパク質 (BSA、CYP1A2、CYP2E1 ; 各 100 ng/spot) を同じ膜上にスポットさせて、特異性を調べた結果、約 2% の非特異的な結合が認められたものの、ほぼ満足できる結果が得られた。

2. PVDF 膜に吸着させた認識用抗体による CYP3A4 の検出

図1 (左側) に示すように、CYP の抗体アレイを PVDF 膜上に作成し、シャーレ中の多種類 CYP 検体を結合させることによって、一枚のプロテインチップ上で各人が有する多種類の CYP 量比を網羅的に検出できる手法として、検出用モノクローナル抗体に対して、検体 CYP、検出用アビジン化ポリクローナル抗体及び発光性高分子プローブの複合体をサンドイッチ状に結合させる抗体アレイチップ CYP アッセイ系を開発できた。

図3に示すように、PVDF 膜に吸着させた BSA(100 ng)、抗 CYP3A4 ポリクローナル抗体(100 ng)、抗 IgG 抗体(199 ng)などのタンパク質には、ビオチン化発光性デキストラン高分子プローブは結合していないことが分かった。現在のところモノクローナル抗体に結合した 50 ng/ml の CYP3A4 の検出が可能になっている。

D. 考察

本年度の研究において、一次抗体、二次抗体及び発光性高分子プローブを、アビ

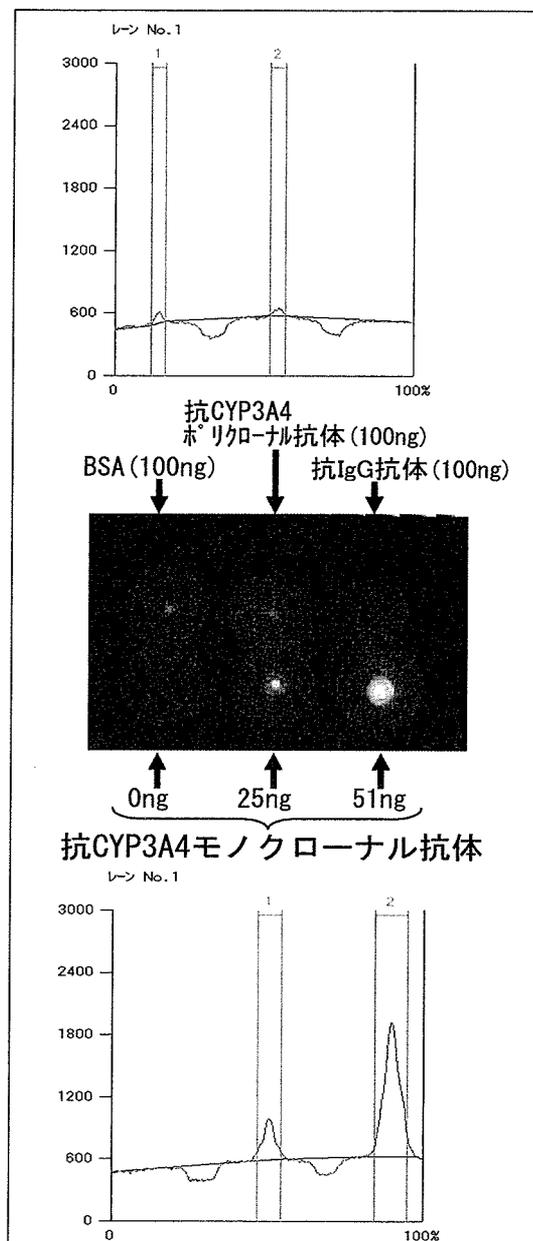


図3 膜にスポットしたモノクローナル抗体による CYP3A4 のサンドイッチ免疫化学発光画像検出

ジンタンパク質ならびにブロッキング剤として BSA 及びデキストランを共存させて1時間インキュベートさせることによって、世界最高感度を与える膜上の

CYP3A4 を定量的に検出できる手法の開発に成功した。この方法は、多検体中の特定 CYP を一枚の膜アレイ上で一斉に検出する方法として優れているが、各個人（検体が一種類）が有する多種類の CYP を網羅的に検出する方法としては、各種 CYP の抗体を膜にスポットした抗体アレイ膜を用いるサンドイッチアッセイ系が優れている。そこで、各種サブタイプの CYP を認識できるモノクローナル抗体を PVDF 膜に吸着させたのち、それらに検体である各種 CYP タンパク質とビオチン化ポリクローナル抗体、さらにビオチン化発光性高分子プローブを連鎖的に検体に連結させて検出する方法を開発した。しかしながら、この網羅的検出法を実用化するには、現在のところ、CYP3A4、CYP2E1、CYP1A2 以外にはモノクローナル抗体は市販されていないので、各種 CYP に対するモノクローナル抗体の作成が必要であり、さらに結合部位が異なるビオチン化ポリクローナル抗体もそれぞれ作成する必要があることが分かった。

E. 結論

本年度の研究において、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、化学発光性のデキストラン高分子プローブを用いて、多検体中の特定 CYP を一枚の膜アレイ上で一斉に高感度に検出する簡便な方法を開発した。さらに各個人（一種類の検体）が有する多種類の CYP を網羅的に一斉検出する方法とし、CYP

3A4 の抗体を膜にスポットした抗体アレイ膜を用いたサンドイッチアッセイ系を開発した。しかし、この網羅的検出法を実用化するには、各種の CYP サブタイプを認識できるモノクローナル抗体ならびにそれらのビオチン化ポリクローナル抗体が必要であった。これらの大部分は市販されていないので、新たに創製する必要がある。

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).
- [4] Keiko Tonooka, Tsutomu Kabashima, Mutsumi Yamasuji and Masaaki Kai: Facile determination of DNA-binding

nuclear factor- κ B by chemiluminescence detection; Anal. Biochem., **364**, 30-36 (2007).

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) Keiko Tonooka, Tsutomu Kabashima, Mutsumi Yamasuji and Masaaki Kai; Facile determination of DNA-binding nuclear factor- κ B by chemiluminescence detection; Anal. Biochem., **364**, 30-36 (2007).

(2) 甲斐雅亮, 梶島 力: ベーシック分析化学 (第 13 章 質量分析, 第 16 章 タンパク質と核酸の標識); 梶化学同人, 東京, pp.169-185, pp.210-222 (2006).

2. 学会発表

(1) 殿岡恵子、太田和子、梶島 力、甲斐雅亮: TMPG 試薬による DNA 結合タンパク質の高感度簡易化学発光検出; 日本薬学会第 126 年会、要旨集 2P36、仙台(2006).

(2) 伊藤佳代、梶島 力、太田和子、甲斐雅亮: 糖質応答領域結合タンパク質の変異体の機能解析; 日本薬学会第 126 年会、要旨集 2P36、仙台(2006).

(3) Moses N. Wainaina, 太田和子、梶島 力、甲斐雅: Sensitization of amino acids derivatives using 4-cyanoisindolyl aniline in the post cleavage conversion of peptide for protein seque-

nance; 日本薬学会第 126 年会、要旨集 2P36、仙台(2006).

(4) Huan Zhang、梶島 力、甲斐雅亮: Detection of CYP3A4 by chemiluminescent polymeric probes on PVDF membrane; 生物発光化学発光研究会第 24 回学術講演会、抄録集 P56-57、東京(2006).

(5) 殿岡恵子、梶島 力、甲斐雅亮: DNA 結句型 NF- κ B の簡易化学発光検出; 生物発光化学発光研究会第 24 回学術講演会、抄録集 P58-59、東京(2006).

(6) Zhang Huan、梶島 力、甲斐雅亮: Chemiluminescent detection of cytochrome P450 by polymeric isoluminol probes; 日本分析化学会第 55 年会、講演要旨集 P287、大阪(2006).

(7) Wainaina N. Moses、梶島力、甲斐雅亮: Fluorescent derivatization with CIA in an alternate post cleavage conversion of anilinothiazolinone derivatives for protein sequencing; 日本分析化学会第 55 年会、講演要旨集 P287、大阪(2006).

(8) 殿岡恵子、梶島 力、甲斐雅亮: 標識 DNA を必要としない DNA 結合タンパク質の発光検出、日本分析化学会第 55 年会、講演要旨集 P288、大阪(2006).

(9) 殿岡恵子、梶島 力、甲斐雅亮: TMPG による溶液中 DNA の迅速な化学発光検出反応; 第 23 回日本薬学会九州支部大会、講演要旨集 P130、熊本(2006).

(10) 山筋睦美、梶島 力、甲斐雅亮: TMPG 反応の PVDF 膜上での核酸化学発光検

出；第23回日本薬学会九州支部大会、講演要旨集 P131、熊本(2006)。

(11) 古村匡崇、椛島 力、甲斐雅亮：ルミノールデキストランプローブによるナイロン膜上のDNA化学発光画像検出；第23回日本薬学会九州支部大会、講演要旨集 P132、熊本(2006)。

(12) Huan Zhang、椛島 力、甲斐雅亮：Application of dextran luminol probe on cytochrome p450 detection；第23回日本薬学会九州支部大会、講演要旨集 P133、熊本(2006)。

(13) Moses N. Wainaina, Tsutomu Kabashima, Masaaki Kai: Sequencing of native insulin by HPLC derivatized with fluorescent CIA in alternative post cleavage conversion；第23回日本薬学会九州支部大会、講演要旨集 P134、熊本(2006)。

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：LUMINESCENT POLYMER AND USE THEREOF IN BIOASSAY。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

CYP タンパク質に対する抗体代替用アプタマー核酸の創製と 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

薬物代謝を司るチトクローム P450 (CYP) と呼ばれる酵素は、テーラーメイド医療の指標となるものであり、薬学分野において重要な分子である。CYP の高感度検出法開発を目的として、59 mer の DNA プールから CYP に特異的なアプタマーのスクリーニングを行った。SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) と呼ばれる PCR と組み合わせた方法を参考にスクリーニングを行ったところ、CYP に親和性を持つ DNA 配列が得られた。

A. 研究目的

ヒトゲノムの解析により、ヒトには約 2-4 万種類のタンパク質が存在していると推定されており、生命活動は、これらのタンパク質が量的・質的に変化し営われている。これらの中には、病気の診断・治療マーカーや創薬の標的分子となるもの、テーラーメイド医療の指標となるものが多数含まれているが、特に薬物代謝を司るチトクローム P450 (CYP) と呼ばれる酵素は、薬学分野において重要なタンパク質である。体内に投与された薬物は、肝臓において主に CYP により酸化還元され、体外へと排泄される。CYP は、多種多様な分子種から成り、ヒトの場合、CYP1A2 (～10%)、CYP2C9 (～20%)、

CYP2C19 (～3%)、CYP2D6 (～3%)、CYP3A4 (～30%) など、20 種類以上の分子種が確認されている。これら CYP は、それぞれの基質特異性が広く、一つの CYP が異なる化学構造を持つ多数の薬物に作用できるようになっており、体内に取り込まれる多種類の薬物の代謝に関与している。このため、CYP による薬物相互作用が研究されてきた。例えば、薬物によっては CYP の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。また現在では、CYP サブタイプの生体内での発現や活性

は、個人差があるため、これらと一塩基多型の関係解明が盛んに研究されている。

しかし、一塩基多型解析のような遺伝子研究は、実際のタンパク質の情報を反映していない。このことから、CYP の分子種の存在比を調べることは、テーラーメイド医療において重要である。現在行われているウエスタンブロットなどのタンパク質の検出には、抗体が必要であるが、これに代わるものとしてアプタマーと呼ばれる DNA または RNA 分子が注目されている。アプタマーは、様々なタンパク質をはじめ、金属イオン、分子量の小さい有機化合物、ペプチド、複雑な構造を持つ多量体、ウイルスなどと結合するものが報告されている。

また、アプタマーは結合する対象に制約が無いだけでなく、抗体では実現できなかった高い親和性と特異性をもって対象に結合させることが可能であり、96% 相同な配列のタンパク質や、同じ配列で立体構造の異なる分子も区別できる。さらに、大量の合成が容易、作用機序が単純といった利点もあり、様々な分野で強力なツールとして期待されている。我々は、核酸とタンパク質との結合能を簡便に測定する方法を開発している[1]。本研究は、CYP と特異的に結合する DNA アプタマーを開発し、これをプローブとした個々の CYP の高感度検出を目的として、核酸プールから CYP と親和性のある核酸分子の探索を行った。

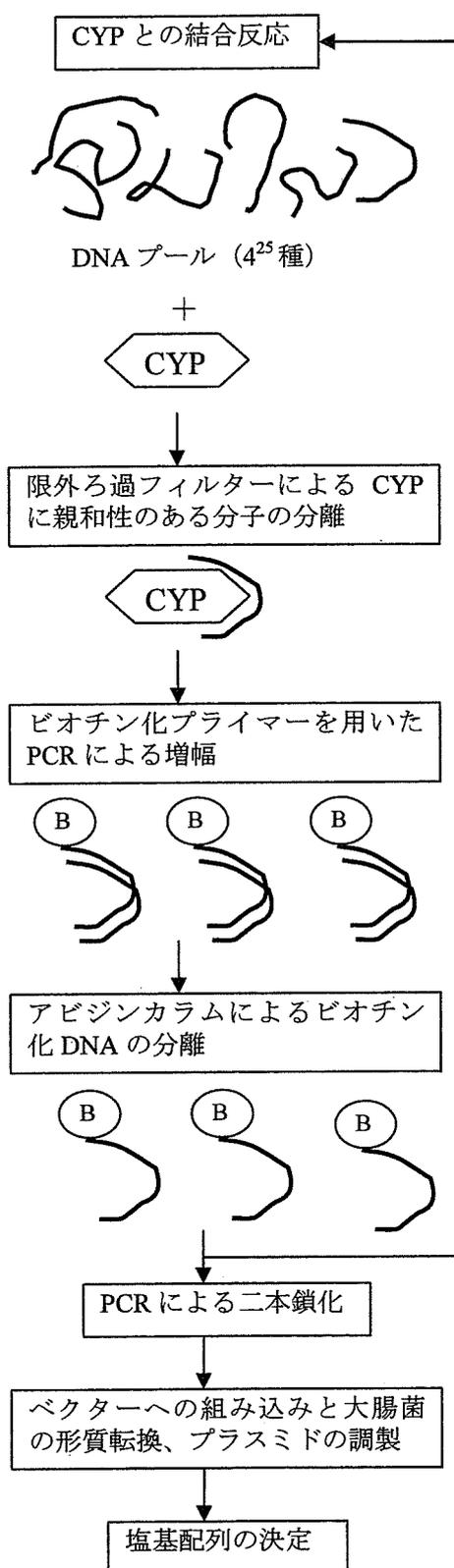


Fig. 1 Scheme of screening for anti CYP aptamer.

B. 研究方法

1. CYP アプタマーのスクリーニング

CYP に特異的なアプタマーの探索は、PCR を組み合わせた SELEX 法を参考に行った。今回用いた方法の原理を Fig. 1 に示す。このとき、DNA プールとして 4^{25} 種の分子種を含む 59 mer オリゴヌクレオチド (5'-TAATACGACTCACTATAN₂₅CCGCTGAGCAATAACTA-3') を、PCR プライマーとして 5'-biotin-TAATACGACTCACTATA-3' と 5'-TAGTTATTGCTCAGCGG-3' を用いた。

まず、DNA プールに CYP3A4 (4 μ g/2 μ l) を加えて室温で 1 時間、チューブの中で結合反応をした。反応液を限界ろ過フィルター(分画分子量 5 万)に入れて 2,000 g で 3 分間遠心分離し、分子量の差を利用して、CYP と結合した DNA と結合していない DNA を分離した。TE buffer 100 μ l を加え、2,000 g で 3 分間遠心することで洗浄した ($\times 2$)。TE buffer を 20 μ l 加え、30 分間以上冷蔵庫に置き、フィルター上の DNA を回収した ($\times 2$)。回収した液は 1 つにまとめ (合計約 30 μ l)、これを template として、一方のみをビオチン化したプライマーを用いて PCR を行った (反応条件; 94°C : 30 秒、50°C : 30 秒、72°C : 10 秒; 30 cycle)。増幅した DNA はエタノール沈澱により回収し、TE buffer 100 μ l に溶解後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した。この DNA 溶液を、Soft Link Soft Release Avidin Resin を用いたカラムに加え、冷蔵庫に 1 時間放置した (ビ

オチン-アビジン結合の形成)。カラムを TE buffer 1 ml で洗浄後、0.01 M NaOH 300 μ l をカラムに加えて、ビオチンが付加していない方の一本鎖 DNA を除いた。カラムを TE buffer 2 ml で洗浄後、5 mM ビオチン 50 μ l をカラムに加え、冷蔵庫に 1 時間放置し、ビオチン-アビジン結合を解離させた。さらに、5mM ビオチン 200 μ l をカラムに加え、ろ液を一本鎖ビオチン化 DNA として回収した。

以上の工程【CYP3A4 との結合反応→限界ろ過フィルターによる結合型 DNA の回収→PCR による DNA の増幅→アビジンカラムによる一本鎖ビオチン化 DNA の単離→ (CYP3A4 との結合反応)】を 1 サイクルとして、10 サイクル繰り返した。

2. 増幅 DNA のクローニングと塩基配列の決定

10 サイクル後に得られた DNA を pMOS Blue Blunt Ended kit を用いて pMOS Blue vector へ組み込んだ。DNA サンプル 7.5 μ l、10 \times PK buffer 1 μ l、100 mM DTT 1 μ l、PK enzyme 0.5 μ l をチューブ内で混合し、16°C で 1 時間反応した。PK enzyme を失活させるため 70°C、10 分間処理し、氷冷後、pMOS Blue vector (50 ng/ μ l) 1 μ l と ligation high 5.5 μ l を加え、16°C で 2 時間ライゲーションを行なった。

感受性菌 (DH5 α) 100 μ l にライゲーション反応溶液 10 μ l を加え、氷中で 10 分間静置した。37°C で 1 分間ヒートショックを行なった後、氷中に 5 分間放置した。SOC 培地 500 μ l を加え、37°C で 20 分間