

# 厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス研究

## 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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 甲斐 雅亮

平成20(2008)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

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 --- 13

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に関する研究 ---- 21

椛島 力

CYPタンパク質に対する抗体代替用アプタマー核酸の発光プローブと  
検出法の開発に関する研究 ----- 30

柴田 孝之

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 38

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 39

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** 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。そ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。したがって、薬に対する反応の個人差を調べるためには、CYP 自体の個人差を直接解析できる新手法の開発も必要である。当該主任研究者らは、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。本研究事業では、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 50-200 万のデキストランに多数のルミノール（又はイソルミノール）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の連鎖結合によるプローブの複合体形成によって発光強度を増幅させることに成功している。本年度の研究では、この化学発光性デキストランプローブ自体が、膜上にスポットした CYP 類を認識できることが分かり、化学発光性デキストランプローブを牛血清アルブミン存在下、pH 7.2 のトリス塩酸緩衝液中で混合させるのみで、PVDF 膜上の 10 ng レベルの CYP 類を直接化学発光検出することに成功した。一方、CYP を認識する抗体の代替用として、試験管内で大量生産することができ、かつビオチン化反応などの化学修飾もより容易に行えるアプタマー核酸の創製研究を昨年度に引き続き行った。その結果、4<sup>25</sup> 種類の塩基配列を有する 59merDNA プールから、転写酵素によって RNA プールを作成後、CYP と結合する RNA を探索する新たな手法を検討し、CYP と結合する 59merRNA 鎖を確認した。さらに、デキストラン高分子プローブの合成戦略に基づき、水溶性の DNA やタンパク質にイソルミノールとビオチンを結合させた高分子プローブも合成し、今後の CYP やアプタマー検出用プローブとしての基礎的評価を行った。

分担研究者

梶島 力・長崎大学大学院医歯薬学  
総合研究科 准教授

紫田孝之・長崎大学大学院医歯薬学  
総合研究科 助教

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多型情報を組み合わせることによって、薬効、副作用、重症化、合併症などに対して、よりの確な個人差の解析が可能になるものとする。

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

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一斉に検出できる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ので、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高分子内に結合している低分子量化学発光物質の結合数の増大によって、超高感度な検出を可能にすることである。

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。

本研究事業において、当該主任研究者らは、これまで、CYPタンパク質と特異的に結合できる化学発光性のデキストラン高分子を合成し、それらを $10^{-16}$  molレベルで検出できる化学発光反応条件を設定した。次に、CYPタンパク質やその抗体を安価なPVDF膜に効率よく、かつ簡便にアレイ状に吸着させるプロテインチップ膜を開発した。そのチップ膜上にスポットした各種CYPアレイに抗体との結合反応及びそれらの非特異的な吸着を減少させる諸条件について検討し、10 ngレベルのCYP類のアッセイ法の開発に成功した。さらに、PVDF膜上の各種CYPの抗体アレイに、シャーレー中のCYPを捕獲し、検出用抗体及び発光高分子プローブをサンドイッチ的に結合させる抗体アレイチップアッセイ系について検討した結果、50 ng/mlのCYP3A4溶液の検出を可能にした。

しかしながら、この網羅的なアッセイ法を実用化するには、各種CYPのモノクローナル抗体やビオチン化ポリクローナル抗体が必要である。これら多種類の抗体の入手が困難であることから、本年度の研究においても、梶島分担研究者らは、CYPと結合するRNAアプタマーの創製研究を行った。一方、当該主任研究者らは、本研究に用いている化学発光性デキスト

ラン高分子プローブが、CYP類など特定の生体タンパク質と直接結合することを、本年度の研究において見出した。この新たな結合現象に基づき、固相膜上にスポットしたCYP類を極めて、簡便かつ容易に検出できるプロテインチップ化学発光アッセイ系を開発した。さらに、デキストラン高分子プローブの合成戦略に基づき、柴田分担研究者らは、水溶性のDNAやタンパク質にイソルミノールとビオチンを結合させた新たな化学発光性高分子プローブの開発を試み、今後のCYPやアプタマー検出用プローブとして適応化を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 化学発光性デキストランプローブの直接結合によるPVDF膜上のタンパク質類の化学発光検出

各種タンパク質を 25 mM トリス緩衝液 (pH7.2) に溶解した。その試料を PVDF 膜にスポットした。その膜を 30 分間乾燥させ、3%牛血清アルブミン(BSA)を含む 1×PBS 溶液中 37°C10 分間浸漬し、膜を BSA でブロッキングした。その後、2mg 化学発光性デキストラン高分子プローブと 4 mg BSA を含む 25 mM トリス緩衝液 (pH7.2) 2 mL 中に 37°C30 分間浸漬して結合反応させた。反応後、1%トライトン X-100 と 10 mM リン酸生理食塩水で 3 回膜を洗浄し、さらに 75 %メタノール水で洗浄した。洗浄後、膜を 20 分間減圧乾燥後、化学発光試液 (アセトニトリル 700 μL、1.0 M テトラブチルアンモニウム水溶液

300 μL 及び 30 % 過酸化水素水 50 μL:用事調製) に浸して、2 分間の発光強度を積算測定した。

### 2. ゲルクロマトグラフィーによるチトクローム C と化学発光性デキストラン高分子との複合体の分離

チトクローム C と化学発光性デキストランプローブ (各 1.0 mg/mL) を 25 mM トリス緩衝液 (pH7.2) に溶解し、37°C で 1 時間インキュベートした。その反応液 10 μL をゲルクロマトグラフィーに用いた。溶離液には 20 mM PBS を用い、その流速は 1.0 mL/min とした。カラムには TSK gel T2000SW を用いた。分離される複合体の検出は、ルミノールの蛍光をモニターできる 254 nm 励起波長及びカットフィルターによる 360 nm 以上の蛍光を検出した。さらに、蛍光検出後、溶出液を吸光度検出器に通して、チトクローム C を選択的に検出できる波長 408 nm で吸光度測定した。

### 3. CYP に対する RNA アプタマーの検索

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。このとき、DNA プールには 4<sup>25</sup>種の分子種を含む 59 mer オリゴヌクレオチド (5' -TAATACGACTCACTATAN<sub>25</sub>CCGCTGAGCAATAACTA-3' ) を、PCR プライマーには 5' -TAATACGACTCACTATA-3' 及び 5' -TAGTTATTGCTCAGCGG-3' をそれぞれ用いた。

まず、59 mer DNA プールを鋳型として、PCR (反応条件 ; 94°C : 30 秒、45°C : 30 秒、72°C : 10 秒 ; 30 cycle) を行ない、二本鎖 DNA プールの作製と増幅を行なっ

た。エタノール沈殿により、DNA プールを精製し、この精製 DNA プール (15  $\mu$ g) を鋳型に、T7 Ribo MAX™ express RNA production system により、RNA プールの作製を行なった。作製した RNA プールは、フェノール抽出及びエタノール沈殿により精製した。

この精製した RNA プール (60  $\mu$ g) に、CYP3A4 (0 - 4  $\mu$ g) を加え、室温で 1 時間、RNA と CYP の結合反応を行なった。反応液を遠心限界ろ過膜チューブに加え、8,000 g で 5 分間遠心分離することで、分子量の差を利用して、CYP と結合した RNA と結合していない RNA を分離した。PBS による洗浄後、フィルター上の RNA を回収し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した。この RNA を基に Prime Script RT-PCR kit を用いて、逆転写反応により cDNA を作製し、さらに、PCR により cDNA の増幅を行った。

以上の工程【RNA への転写→CYP3A4 との結合反応→遠心限界ろ過膜チューブによる結合型 RNA の回収→逆転写及び PCR による cDNA の増幅→(RNA への転写)】を 1 サイクルとして、2 サイクル繰り返した。

#### 4. CYP に対する RNA アプタマーの結合性評価と洗浄による回収法

PVDF 膜上に CYP1A2 (1.5  $\mu$ g) をスポットし、10 分間減圧乾燥することで固定化した。この膜を、RNA プールを含む溶液 (15  $\mu$ g/1.5 mL) に 37°C、4 時間浸し、CYP と RNA の結合を行なった。次に、この膜を界面活性剤や塩濃度の異なる溶液に浸

すことで、CYP と非特異的又は弱く結合した RNA を除いた。このとき、使用する溶液として純水、0.5 M NaCl, 10% Triton X-100, 1% SDS などを用いて、RNA の脱離効果を検討した。

PVDF 膜上の CYP と結合した RNA の検出には、当研究室で開発した TMPG 化学発光試薬を使用した。各種溶液中に浸した PVDF 膜を、水で洗浄し、0.2 M tetra-*n*-propylammonium phosphate (pH 7.5) / 50%メタノール溶液に 10 秒間、次いで 30 mM TMPG 溶液 (THF:DMF=1:1, v/v) に 10 秒間浸した後、CCD カメラで 2 分間化学発光を測定した。

#### 5. 大腸菌 DNA を基本骨格に持つ化学発光性高分子プローブの合成

大腸菌由来の DNA を TE バッファーに溶解し、11.5 mg/5.7 mL 溶液を調製した。これにビオチン化試薬の水溶液 (0.8 mg/0.17 mL) を加え、室温で 12 時間静置した。反応液に酢酸カリウム溶液 0.69 mL と冷エタノール 17.4 mL を加え、6,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を廃棄した後、残渣に 70%冷エタノール 3.0 mL を加え、6,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を廃棄して真空乾燥を行い、ビオチン化 DNA 19 mg を得た。このビオチン化 DNA を精製水に溶解し、30 mg/2.7 mL 溶液を調製した。これにイソルミノールイソチオシアネートの DMSO 溶液 (30 mg/0.3 mL) を加え、80°C で 24 時間加熱した。反応液に酢酸カリウム溶液 0.69 mL と冷エタノール 17.4 mL を加え、

6,000 rpm、4°Cで 20 分間遠心分離した。上清を廃棄した後、残渣に冷エタノール 3.0 mL を加え、6,000 rpm、4°Cで 10 分間遠心分離した。上清を廃棄して真空乾燥を行い、ビオチン - イソルミノール - DNA 複合体 (化学発光性 DNA プローブ) 44 mg を得た。

#### 6. BSA を基本骨格に持つ化学発光性高分子プローブの合成

BSA 水溶液 (10 mg/0.9 mL) にイソルミノールイソチオシアネートの DMSO 溶液 (10 mg/0.1 mL) を加え、室温で 24 時間静置した。反応液に冷エタノール 5.8 mL を加え、6,000 rpm、4°Cで 20 分間遠心分離した。上清を廃棄した後、残渣に冷エタノール 1.0 mL を加え、6,000 rpm、4°Cで 10 分間遠心分離した。上清を廃棄して真空乾燥を行い、イソルミノール - BSA 複合体 23 mg を得た。この複合体 20 mg を 10 mL の精製水に溶解し、10 mM ビオチン化試薬の水溶液 0.58 mL を加え、室温で 30 分間静置した。反応液に酢酸カリウム溶液 0.23 mL と冷エタノール 5.8 mL を加え、6,000 rpm、4°Cで 20 分間遠心分離した。上清を廃棄した後、残渣に 70 %冷エタノール 3.0 mL を加え、6,000 rpm、4 °Cで 10 分間遠心分離した。上清を廃棄して真空乾燥を行い、ビオチン - イソルミノール - BSA 複合体 (化学発光性 BSA プローブ) 16 mg を得た。

#### 7. 化学発光性 DNA 及び BSA プローブによるアビジンの検出

シャーレー (35 mm ID) にメタノールを

加え、PVDF 膜を 30 秒間浸した後、膜を水で洗浄した。この膜にアビジン、HRP-SA、又はフィコエリスリン - ストレプトアビジン融合タンパク質 (PE-SA) を吸着させ、5 分間膜を減圧下乾燥させた。

別のシャーレー (35 mm ID) に 1×PBS を加え、化学発光性 DNA プローブあるいは化学発光性 BSA プローブとアビジンをそれぞれ添加した。このプローブ溶液に膜を浸し、DNA プローブの場合は 37°Cで 1 時間、BSA プローブの場合は 37°Cで 30 分間、それぞれインキュベートした。膜を 1×PBS に浸し、37°Cで 10 分間洗浄した。この洗浄を 2 回繰り返したのち、10 分間膜を減圧下で乾燥させた。この膜を化学発光試液 (アセトニトリル 300  $\mu$ L、0.5 M リン酸テトラブチルアンモニウム水溶液 700  $\mu$ L、30 % 過酸化水素水 50  $\mu$ L 及び 10 mM 塩化鉄 50  $\mu$ L) に 10 秒間浸漬させ、直ちに暗室に移し、CCD カメラで化学発光強度を 2 分間測定した。

#### 8. 倫理面への配慮

本研究では、個人の遺伝情報及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. 化学発光性デキストランプローブの直接結合による PVDF 膜上のタンパク質類の化学発光検出

トリス緩衝液中で BSA のブロッキング剤のみでは、化学発光性デキストランプローブ自体が CYP 類を直接結合して簡便かつ迅速に発光検出できることが分かった。そこで、約 50 種類の市販の各種タンパク質を PVDF 膜に吸着させてスクリーニングした。その結果、本研究で用いた化学発光性デキストランプローブは、繊維芽細胞増殖因子と CYP2E1 に特に強く結合し高い発光強度を示した。その他、CYP1A2、CYP3A4、 $\beta$ -神経成長因子、チトクローム c、プロラクチン、ヘモグロビンなどにも直接結合することが分かった。しかしながら、他の大部分のタンパク質やペプチドには結合しなかった。

そこで、PVDF 膜上の CYP2E1 に対する化学発光性デキストランプローブの結合反応液の最適 pH を調べた。この結果、結合反応は、pH 7 の中性で最も効率良く進行することが分かった。また、PVDF 膜上のタンパク質の量と結合した化学発光性デキストランプローブから得られた発光強度は、膜上のタンパク質の量に比例して増大し、定量的な検出も可能であることが分かった。

## 2. ゲルクロマトグラフィーによるチトクローム C と化学発光性デキストラン高分子との複合体の分離

タンパク質に対する化学発光性デキストランプローブの結合性をゲルクロマトグラフィーによって調べた結果、反応に用いたチトクローム c がデキストランプローブと結合して、より大きな高分子複

合体を形成していることが分かった。さらに、ルミノール及びビオチンを導入していない化学発光性デキストランプローブを用いても、チトクローム c と複合体を形成していることが分かった。しかし、チトクローム c はデキストランそのものと複合体を形成しないことも分かった。これから、チトクローム c は、酸化還元反応で処理したデキストランプローブの骨格と結合して複合体を形成していることが分かった。

## 3. CYP に対する RNA アプタマーの検索と結合性評価及び洗浄による回収法

より結合定数が高い RNA アプタマーを検索するために、DNA プールから転写酵素により、RNA プールを作成した。次に、CYP3A4 に結合した一本鎖 RNA を単に抽出するのではなく、結合定数がより高いものをスクリーニングする新規の手法を検討した。DNA アプタマーの検索法と同様に、使用する遠心限界ろ過膜チューブの分画サイズや緩衝液を検討し、CYP3A4 の量に応じて、限外ろ過膜上に保持されている RNA 量が増加した。このことから、遠心限界ろ過膜チューブを用いて、CYP 結合型 RNA と非結合型 RNA が分離可能であることが確認できた。得られた結合型 RNA を基に、逆転写反応により cDNA を作製したところ、目的のサイズ (59 bp) の cDNA が得られた。

次に、PVDF 膜上に固定化した CYP1A2 を、RNA と結合反応させ、各種溶液により洗浄した後、結合している RNA を TMPG 試



薬により化学発光検出した結果、0.5 M NaCl では PVDF 膜上の CYP と結合した RNA は脱着し難く、結合性の強い RNA の選択には利用できないことが分かった。これに対して、10% Triton X-100 では、比較的弱い結合性の RNA は脱離し、強い結合性の RNA は、CYP 分子内に保持されていることが推察された。さらに、1% SDS では、CYP に結合した RNA のほぼ全てが脱着することが分かった。

#### 4. 大腸菌 DNA 及びウ BSA を基本骨格に持つ化学発光性プローブの合成とアビジンタンパク質との結合性

化学発光性 DNA プローブの合成は、大腸菌由来の長鎖 DNA 分子中のアミノ基と反応するビオチン化試薬を用いて、室温で反応を行った。生成したビオチン化 DNA は、エタノール沈殿によって精製した。次にこのビオチン化 DNA を用いて、DNA 中のアミノ基と反応するイソルミノールイソチオシアネートと縮合反応を行った。反応を加速するため、反応温度を 80°C に設定した。生成した化学発光性 DNA プローブは、再度エタノール沈殿を行うことによって簡易に精製できた。

化学発光性 BSA プローブの合成は、市販の BSA にイソルミノールイソチオシアネートを導入して化学発光標識を行った。次に、このイソルミノール-BSA 複合体にビオチンを導入させた。生成した化学発光性 BSA プローブは、エタノール沈殿によって精製した。

合成した高分子プローブが化学発光性

物質で標識されていることを確認するために、化学発光性 DNA プローブ及び BSA プローブを PVDF 膜に直接吸着させ、化学発光反応を行った。その結果、DNA プローブ及び BSA プローブのどちらも強く化学発光した。また、その発光量は、上述している化学発光デキストランプローブと同程度であった。

本研究事業の原理は、プローブ上のビオチンがアビジンを介して連鎖複合体を形成し、膜上の検体に多くのプローブを結合させることを基本としている。そこで合成した新規のビオチンを導入している化学発光性 DNA 及びタンパク質プローブとアビジンとの結合性を評価した。PVDF 膜に種々のアビジン類を吸着させ、アビジン存在下、化学発光性 DNA プローブ及び BSA プローブによる結合反応を行った。その際、結合しなかった高分子プローブ連鎖複合体を除去するための洗浄条件（洗浄液の組成、洗浄回数）について検討した。また、効率的に化学発光検出を行うための、化学発光反応条件（アセトニトリルの量、リン酸テトラブチルアンモニウム水溶液の量、過酸化水素水の量、金属触媒の種類及び量）についても検討した。合成した化学発光性 DNA プローブを用いて PVDF 膜上のアビジンを検出した結果、500 ng の膜上のアビジンタンパク質が検出された。また、化学発光性 BSA プローブを用いて、HRP-SA 及び PE-SA の検出を行った結果、ストレプトアビジン部位にプローブが結合することによ

て、強い検出シグナルを与えた。

#### D. 考察

本年度の研究に用いている化学発光性デキストランプローブは、1-6 結合しているグルコースの多糖を過ヨウ素酸酸化によって開裂させて、生じるアルデヒド基にルミノールとビオチンを結合させ、かつ未反応のアルデヒド基を還元反応によってアルコール体に変化させたものである。CYP などのタンパク質は、このプローブ分子中にあるビオチン、ルミノール及びグルコースなどには直接結合しないが、デキストランの糖鎖の部位が酸化・還元された高分子骨格部位と立体特異的に結合していることが推察された。すなわち、この化学的に変化した糖鎖の長い部位が CYP などの特定のタンパク質の立体構造を認識するドメインになっているものと考えられ、これまで開発してきた化学発光性デキストランプローブ自体が、CYP タンパク質類を認識し、かつ高感度検出できる極めてユニークな CYP プロテインチップ検出法であると考ええる。

一方、抗体代替用 RNA アプタマーの創製研究では、RNA プールから CYP3A4 と結合する RNA を分離検出することができた。今回、結合反応に PBS を緩衝液として用いたが、この代わりに TE buffer や純水を用いた場合、非結合型 RNA が限外ろ過膜上に保持されていた。これは、塩濃度や pH により RNA の立体構造が変化するためだと考えられ、実際に RNA アプタマー

を使用する際の注意点であると考ええる。

また、4<sup>25</sup>種類から成る RNA 分子種の中から、CYP とより強い結合定数を示す RNA アプタマーを抽出するために、CYP タンパク質を PVDF 膜に吸着させて、結合定数の低い RNA を脱離させる新たな手法を考案した。これには、当該研究者らが開発した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 試薬を活用することによって簡便に調べることができた。その結果、適切に濃度調整した Triton X-100 や SDS などの界面活性剤を用いることにより、より結合性の高い RNA アプタマーを選別回収することが分かった。この方法は、SELEX 法と比較して、短時間に RNA アプタマーの取得が可能であり、この方法が確立できれば、CYP 以外にも、様々な分子に対するアプタマー探索に有用であると考えられる。

デキストランを基本骨格に持つ高分子プローブの合成法に関する当該研究者らの研究戦略を応用し、水溶性の DNA やタンパク質などの生体高分子を基本骨格に持つプローブを合成した研究では、ビオチン及び化学発光試薬のプローブ骨格への導入反応が水溶液中で可能であった。また、エタノール沈殿法により、簡易にそれらの高分子プローブを精製できた。これらのことから本法は、非常に簡便な操作で DNA や BSA などの高分子を基本骨格とする化学発光性高分子プローブを創製できる、有用な手法になり得るものと考ええる。また、これらのプローブのアピ

ジンに対する結合性を膜上のアビジンを検出することによって調べた結果、アビジン又はストレプトアビジンに対して強い化学発光を与えた。この結果は、これらのプローブによるアビジンの認識、アビジンを介した連鎖複合体の形成を示すものである。すなわち、新たに合成した化学発光性高分子プローブが、膜上の微量 CYP の検出に適用できることが示唆された。

#### E. 結論

本研究事業では、主に、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、それを活用した。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た。

本年度の研究によって、トリス緩衝液中で BSA ブロッキング剤のみを使用した場合、この化学発光性デキストランプローブ自体が CYP 類と直接結合して、CYP 類を簡便かつ迅速に発光検出できることを明らかにした。今後、この新しい技術は、CYP 類のプロテオミクスに対して、迅速、簡便、かつ安価な分析法として、他法を陵駕することが期待される。

次に、より結合定数が高いアプタマー核酸を検索するために、DNA プールから転写酵素により、RNA プールを作成した。この際、単に結合した一本鎖 RNA を抽出するのではなく、結合定数がより高いものをスクリーニングする新規の手法を検討した結果、固相膜や限外ろ過膜を活用することによって、CYP タンパク質と強く結合する RNA や DNA の回収法を設定できた。

一方、当該主任研究者ら開発したデキストラン高分子プローブの合成戦略に基づき、水溶性高分子である DNA やタンパク質にイソルミノールとビオチンを結合させた高分子プローブも合成し、かつそれらの発光性とアビジンタンパク質に対する結合性を評価した。その結果、いずれも CYP の検出用プローブとして適応可能であることが示唆され、これらの化学発光性 DNA 及び BSA 高分子プローブは、自由な骨格の選択、簡便な調製が可能であり、超高感度アッセイ法を今後提供するものと期待できる。

今後、本研究戦略によって、各種 CYP 類

の超高感度な定量的検査法が構築できれば、各個人のCYPタンパク質の日常検査、各種がんマーカーやプリオンタンパク質などの迅速な検査法としても応用できる。そのためには、CYP類の日常検査として肝細胞を用いるのは不適切であるので、肝細胞の代替としてCYP発現量を測定できる口内粘膜細胞の培養技術と評価法を開発し、正常及び患者個人の簡易なCYP発現量を検査できる新手法の開発研究を引き続き行うことが重要である。

#### 参考文献

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

[2] 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).

[3] 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).

[4] 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) H. Zhang, C. Smanmoo, T. Kabashima, J. Lu and M. Kai: Dextran-Based Polymeric Chemiluminescent Compounds for the Sensitive Optical Imaging of a Cytochrome P450 Protein on a Solid-Phase Membrane; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 8226-8229 (2007).

(2) T. Kabashima, Z. Yu, C. Tang, Y. Nakagawa, K. Okumura, T. Shibata, J. Lu and M. Kai: A selective fluorescence reaction for peptides and chromatographic analysis; *Peptides*, 29, 356-363 (2008).

(3) M. N. Wainaina, T. Shibata, C. Smanmoo, T. Kabashima and M. Kai: Fluorescence detection of amino acids in the postcleavage conversions for manual sequencing of a peptide; *Anal. Biochem.*, 374, 423-425 (2008).

(4) Keiko Tonooka, Tsutomu Kabashima, Takayuki Shibata, Chenhong Tang,

Zhiqiang Yu, and Masaaki Kai: Facile Assay of Telomerase Activity Utilizing a DNA-Detectable Chemiluminogenic Reagent; 24, Anal. Sci., in press (2008).

## 2. 学会発表

(1) 山筋睦美, 殿岡恵子, 柴田孝之, 梶島 力, 甲斐雅亮: 核酸を化学発光プローブとする膜上NF- $\kappa$ Bタンパク質の高感度検出法の開発; 日本薬学会第127年会, 講演要旨集(3) P73, 富山(2007)

(2) Chaiwat Smanmoo, 柴田孝之, 梶島 力, 甲斐雅亮: The Development of a Novel DNA Probe for Biosensor of Proteins on Microchips; 日本薬学会第127年会, 講演要旨集(3) P73, 富山(2007)

(3) 張寰, 柴田孝之, 梶島 力, 甲斐雅亮: Sensitive Detection of Cytochrome P450 Proteins on PVDF Membrane Employing Macromolecular Probe; 日本薬学会第127年会, 講演要旨集(3) P73, 富山(2007)

(4) Tang Chenhong, 梶島 力, 柴田孝之, Yu Zhiqiang, 甲斐雅亮: ChREBP-GFP fusion protein in mammalian cells; 第24回日本薬学会九州支部大会, 講演要旨集 P123, 福岡(2007)

(5) 木場健仁, 梶島 力, 柴田孝之, 甲斐雅亮: マウスプリオンタンパク質の発現と精製; 第24回日本薬学会九州支部大会, 講演要旨集 P124, 福岡(2007)

(6) 川崎慎也, 柴田孝之, 梶島 力, 甲斐雅亮: シトシン及びウラシルに特異的な新規蛍光反応; 第24回日本薬学会九州支

部大会, 講演要旨集 P125, 福岡(2007)  
(7) 山筋睦美, 張寰, 柴田孝之, 梶島 力, 甲斐雅亮: DNAを検出プローブに用いた膜上タンパク質の検出; 第24回日本薬学会九州支部大会, 講演要旨集 P126, 福岡(2007)

(8) Kawasaki S, Shibata T, Kabashima T, Kai M: Development of Novel Fluorescence Detection Method for Uracil and Cytosine; International Conference in Structural Biology, Abstract p42, HongKong (China), (2007)

(9) Koba K, Kabashima T, Shibata T, Kai M: Expression of Mouse Prion Protein in *E. coli* to Develop Aptamer; International Conference in Structural Biology, Abstract p43, HongKong (China), (2007)

(10) Shibata T, Wainaina MN, Nakamura M, Shiozaki M, Kabashima T, Kai M: Sensitive Fluorescence-Detection Method of Amino Acids for Protein Sequencing; International Conference in Structural Biology, Abstract p66, HongKong (China), (2007)

(11) Tang CH, Yu ZQ, Kabashima T, Shibata T, Kai M: Expression of Carbohydrate-Response Element-Binding Protein Fused with GFP in Two Cell Lines; International Conference in Structural Biology, Abstract p67, HongKong (China), (2007)

(12) Yamasuji M, Zang H, Takahashi M,

Shibata T, Kabashima T, Kai M: Chemiluminescence Detection of Proteins on Membranes Employing DNA probe and TMPG Reagent; International Conference in Structural Biology, Abstract p76, HongKong (China), (2007)

(13) Yu ZQ, Tang CH, Kabashima T, Shibata T, Kai M: Highly Selective Fluorometric Assay for HIV-1 Protease Activity; International Conference in Structural Biology, Abstract p81, HongKong (China), (2007)

(14) Zang H, Shibata T, Kabashima T, Kai M: Evaluation of Dextran-Based Polymeric Chemiluminescent Compounds for the Direct Detection of Proteins on a Membrane; International Conference in Structural Biology, Abstract p82, HongKong (China), (2007)

(15) Chaivat Smanmoo, Tomoko Sagawa, Tsutomu Kabashima, Takayuki Shibata, Masaaki Kai: Preparation of super-sensitive luminescent probe for detection genes and proteins on microchips; Pure and applied chemistry international conference 2008, Abstract P78, Bangkok (Thailand), (2008)

(16) Tsutomu Kabashima, Keiko Tonooka, Takayuki Shibata, Masaaki Kai: Application of DNA-detectable chemiluminogenic reagent (TMPG) to telomerase assay; Pure and applied

chemistry international conference 2008, Abstract P256, Bangkok (Thailand), (2008)

#### 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

分担研究者 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

本研究では、チトクローム P450 (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。

本年度の研究において、当該主任研究者らが開発している高感度化学発光性デキストランプローブ、すなわち低分子量の化学発光物質ルミノールで多数標識しているデオキシ化デキストラン高分子が CYP 類など特定タンパク質と直接結合することを見出した。この新たな検出現象に基づき、固相膜上にスポットした CYP 類を極めて、簡便かつ容易に検出できるプロテインチップ化学発光アッセイ系を開発した。

A. 研究目的

体内の薬物は、主に 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 多型情報を組み合わせることによって、薬効、副作用、重症化、合併症などに対して、よりの確な個人差の解析が可能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 CYP 類をプロテインチップに一斉に結合させ、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。

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。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ルミノール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考えている。

本年度の研究では、昨年度に引き続き、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、シャーレー中の多種類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及び化学発光性デキストラン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の検査法を確立する予定であったが、このアッセイ系において、抗体を用いずとも、化学発光性デキストランプローブが、直接CYPタンパク質類と結合する現象を見出した。すなわち、このデキストラン高分子プロブ自体が特異的な抗体と成り得ることであり、画期的な検出法の構築が可能になってきた。そこで、この高分子プロブとCYPタンパク質との最適結合パラメーターを調べ、かつ、その特異性及び結合するCYPタンパク質との結合メカニズムを検討した。

## B. 研究方法

### 1. 化学発光性デキストランプローブの直接結合によるPVDF膜上のタンパク質類の化学発光検出

各種タンパク質を 25 mM トリス緩衝液

(pH7.2)に溶解した。その試料を PVDF 膜にスポットした。その膜を 30 分間乾燥させ、3 % 牛血清アルブミン(BSA)を含む 1 ×PBS 溶液中 37°C10 分間浸漬し、膜を BSA でブロッキングした。その後、2 mg デキストランプローブと 4 mg BSA を含む 25 mM トリス緩衝液 (pH7.2) 2 mL 中に 37°C30 分間浸漬して結合反応させた。反応後、1 % トライトン X-100 と 10 mM リン酸生理食塩水で 3 回膜を洗浄し、さらに 75 % メタノール水で洗浄した。洗浄後、膜を 20 分間減圧乾燥後、化学発光試液 (アセトニトリル 700  $\mu$ L、1.0 M テトラブチルアンモニウム水溶液 300  $\mu$ L 及び 30 % 過酸化水素水 50  $\mu$ L:用事調製) に浸して、2 分間の発光強度を積算測定した。

### 2. ゲルクロマトグラフィーによるチトクローム C と化学発光性デキストラン高分子との複合体の分離

チトクローム C と化学発光性デキストランプローブ (各 1.0 mg/mL) を 25 mM トリス緩衝液 (pH7.2) に溶解し、37°C で 1 時間インキュベートした。その反応液 10  $\mu$ L をゲルクロマトグラフィーに用いた。溶離液には 20 mM PBS を用い、その流速は 1.0 mL/min とした。カラムには TSK gel T2000SW を用いた。分離される複合体の検出は、ルミノールの蛍光をモニターできる 254 nm 励起波長及びカットフィルターによる 360 nm 以上の蛍光を検出した。さらに、蛍光検出後、溶出液を吸光度検出器に通して、チトクローム C を選択的に検出できる波長 408 nm で吸光度測定した。



### 3. 倫理面への配慮

本研究では、個人の遺伝情報及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。

表1 各種タンパク質の分子量及び等電点並びに化学発光性プローブとの直接結合性

Protein (200 ng/spot)	MW ( $\times 10^3$ D)	pI	CLI %
Lysozyme	14	11	0
CYP1A2 peptide (12 residues)	1.3	10	0
CYP3A4 peptide (21 residues)	2.6	9.7	0
Fibroblast growth factor 5 (FGF5)	27	9.4	100
Cytochrome C	13	9.4	3
$\beta$ -Nerve growth factor 8 ( $\beta$ NGF)	27	9.3	17
CYP1A2	58	9.2	15
Luteinizing hormone	29	8.8	0
Insulin-like growth factor-1	7.7	8.4	0
CYP2E1	53	8.3	55
CYP3A4	66	8.3	9
Adrenocortico- tropin hormone (40 residues)	4.5	8.1	2
Parathyroid hormone	9.6	8.1	1
Myoglobin	18	8.1	0
Hemoglobin	64	6.9	4
Prostate specific antigen	34	6.9	0

Calcitonin peptide (32 residues)	1.4	6.7	1
Monoclonal anti-CYP1A2 antibody	150	6.5	0
Lectin	110	6.5	0
Prolactin	23	6.1	5
Apolipoprotein A-I	28	6	0
Breast tumor antigen	43	6	0
Collagen	300	6	0
Epidermal growth factor	6.2	6	0
Serum amyloid A	12	5.9	0
Fibrinogen	341	5.6	0
Follicle stimulating hormone	36	5.6	0
Catalase	245	5.5	0
Ovarian tumor antigen	58	5.5	0
Polyclonal anti-CYP1A2 antibody	150	5.5	0
$\alpha$ -Amylase	45	5.5	0
Thrombin	34	5.5	0
$\beta_2$ -Micro- globulin	12	5.5	0
Carcino- embryonic antigen	29	5.4	0
Insulin	36	5.3	0
Transferrin	80	5.3	0
$\beta$ -Lactoglobulin	18	5.1	0
Cytokeratin 19	44	5	0
Phytohemag glutinin-M	30	5	0
Concanavalin A	104	5	0
Growth hormone	20	5	0

Urease	485	5	0
BSA	66	4.8	0
Superoxide dismutase	32	4.8	0
S 100 protein	21	4.6	0
Thyroglobulin	660	4.5	0
Ceruloplasmin	134	4.4	0
Haptoglobin	86	4.2	0
Prostatic acid phosphatase	100	4	0
Erythropoietin	37	3.5	0

### C. 研究結果

#### 1. 化学発光性デキストランプローブの直接結合による PVDF 膜上のタンパク質類の化学発光検出

化学発光性デキストランプローブが直接結合し発光するか否かを、約 50 種類の市販の各種タンパク質を PVDF 膜に吸着させてスクリーニングした(表 1)。その結果、本研究で用いた化学発光性デキストランプローブは、繊維芽細胞増殖因子と CYP2E1 に特に強く結合し高い発光強度を示した。その他、CYP1A2、CYP3A4、 $\beta$ -神経成長因子、チトクローム c、プロラクチン、ヘモグロビンなどにも直接結合することが分かった。しかしながら、他の大部分のタンパク質やペプチドには結合しなかった。

そこで、当該研究者らは、CYP2E1 を選択して、PVDF 膜上のタンパク質に対する化学発光性デキストランプローブの結合反応液の最適 pH を調べた(図 1)。この結

果、結合反応は、pH7 の中性で最も効率良く進行することが分かった。このことは、体液の pH と同じであり、生理学的な状態を検査するには、都合が良い。

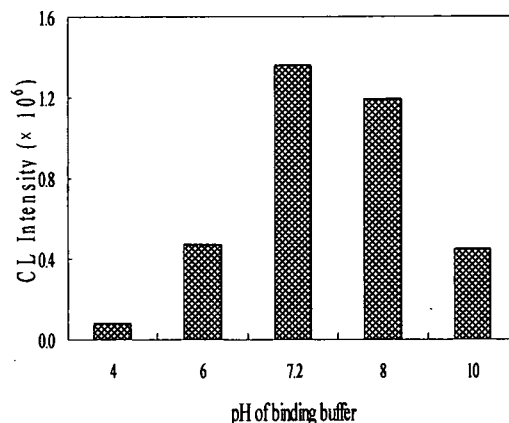


図 1 CYP2E1 と化学発光性デキストランプローブとの結合反応における最適 pH

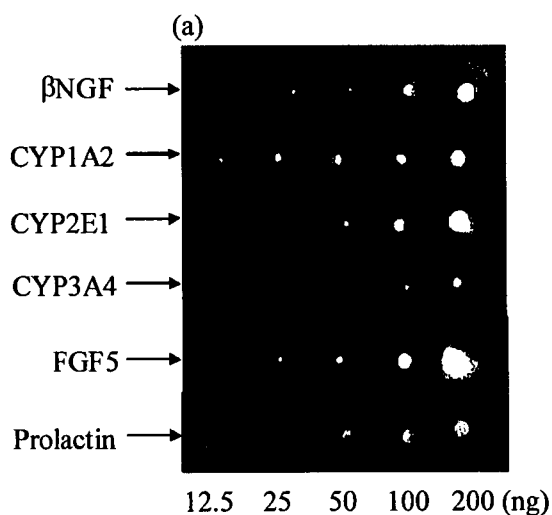


図 2 化学発光性デキストランプローブと直接結合するタンパク質量と膜洗浄後の発光強度

図 2 は、PVDF 膜上のタンパク質量と結合した化学発光性デキストランプローブから得られた発光強度との関係を示した

ものである。発光強度は、膜上のタンパク質の量に比例して増大しており、定量的な検出が可能であることが分かった。

## 2. ゲルクロマトグラフィーによるチトクローム C と化学発光性デキストラン高分子との複合体の分離

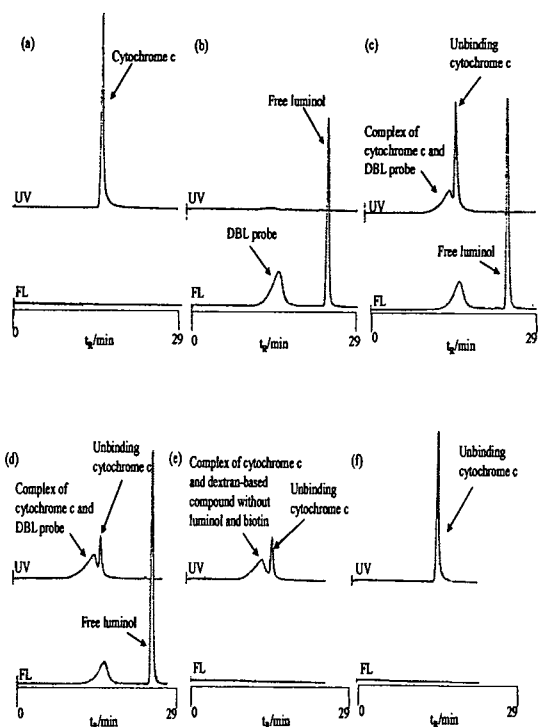


図3 ゲルクロマトグラフィーによるチトクローム c と化学発光性デキストランプローブとの結合性の評価

試料：(a) 1 mg/mL チトクローム c 溶液；  
 (b) 1 mg/mL 化学発光性デキストランプローブ溶液；  
 (c) 1 mg/mL チトクローム c と 1 mg/mL 化学発光性デキストランプローブの混合液；  
 (d) 0.5 mg/mL チトクローム c と 1 mg/mL 化学発光性デキストランプローブの混合液；  
 (e) 0.5 mg/mL チトクローム c と 1 mg/mL 合成デキストラン（酸化反応と還元反応を行ったもの）の混合

液；(f) 1 mg/mL デキストラン。

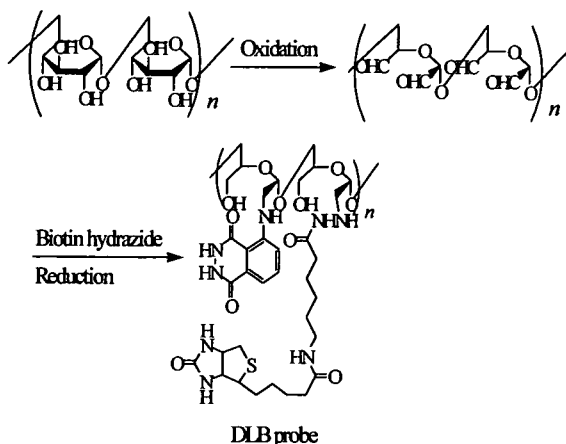


図4 化学発光性デキストランプローブの合成法と化学構造

タンパク質に対する化学発光性デキストランプローブの結合性をゲルクロマトグラフィーによって調べた。図3の上段はUV 検出したもので、デキストランプローブは検出できないが、タンパク質を検出できる。また、下段の蛍光検出では、タンパク質は検出されないが、遊離のルミノール及びデキストランプローブ中に存在するルミノールを検出できる。図3の(c)及び(d)の結果より、反応に用いたチトクローム c の一部がデキストランプローブと結合して、より大きな高分子複合体を形成していることが分かった。また、同図(c)では、ルミノール及びビオチンを導入しないで化学発光性デキストランプローブの合成操作と同様に処理して得たプロブを用いて、チトクローム c と反応させたものであり、複合体を形成

していることが分かった。また、同図(f)では、デキストランそのものとチトクローム c を反応させたものであり、複合体は形成されていない。これらの実験から、チトクローム c は、デキストランプローブの骨格と結合して複合体を形成していることが分かった。

#### D. 考察

図4に示すように、本研究に用いている化学発光性デキストランプローブは、1-6 結合しているグルコースの多糖を過ヨウ素酸酸化によって開裂させて、生じるアルデヒド基にルミノールとビオチンを結合させ、かつ未反応のアルデヒド基を還元反応によってアルコール体に変化させたものである。これから、CYP などのタンパク質は、プローブ分子中に存在するビオチン、ルミノール及びグルコースなどには結合していないが、デキストランの糖鎖の部位が酸化・還元された高分子骨格部位と立体特異的に結合していることが分かった。すなわち、この化学的に変化した糖鎖の長い部位が CYP などの特定のタンパク質の立体構造を認識するドメインになっているものと考えられた。以上の検討により、これまで開発してきた化学発光性プローブ自体によって、CYP タンパク質類が認識され、かつ、高感度検出される極めてユニークな CYP プロテインチップ検出法の開発が可能になった。

#### E. 結論

本研究において、これまで開発してきた化学発光性デキストランプローブが、偶然にも目的とする CYP タンパク質類と高選択的に直接結合することが分かった。このことは、当該主任研究者らが合成したデキストランプローブを使用することによって、PVDF 膜上で CYP タンパク質類を選択的かつ高感度に化学発光で検出する新たな手法の開発が可能になったと考える。今後、この新しい技術は、CYP 類のプロテオミクスに対して、迅速、簡便、かつ安価な分析法として、他法を陵駕することが期待される。

#### 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) H. Zhang, C. Smanmoo, T. Kabashima, J. Lu and M. Kai: Dextran-Based Polymeric Chemiluminescent Compounds for the Sensitive Optical Imaging of a Cytochrome P450 Protein on a Solid-Phase Membrane; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 8226-8229 (2007).

(2) T. Kabashima, Z. Yu, C. Tang, Y. Nakagawa, K. Okumura, T. Shibata, J. Lu and M. Kai: A selective fluorescence reaction for peptides and chromatographic analysis; *Peptides*, **29**, 356-363 (2008).

(3) M. N. Wainaina, T. Shibata, C.