

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- κ 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

なし

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤研究推進研究事業：トキシコゲノミクス研究）
分担研究報告書

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

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

研究要旨

生体内の薬物代謝に関与するチトクローム P450 (CYP) は、テーラーメイド医療の指標となるものであり、臨床や薬学分野において重要な分子である。CYP には、様々な分子種が存在するが、これらの選択的な高感度検出法の開発を目的として、 4^{25} (1×10^{15}) 種類からなる RNA プールの作製と、CYP に特異的に結合する RNA アプタマーのスクリーニングを行なった。SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) と呼ばれる PCR と組み合わせた方法、及び PVDF 膜とグアニンに特異的な化学発光試薬 (3, 4, 5-trimethoxyphenylglyoxal ; TMPG) を用いた簡便なスクリーニング法について検討を行った。

A. 研究目的

ヒトゲノムの解読が終了し、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。また、多くの疾患関連遺伝子が同定され、その疾患と関わるメカニズムの解明も急速に進められている。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、特に薬物代謝に関与するチトクローム P450 (CYP) と呼ばれる酵素は、薬効評価において重要な分子である。

CYP は水酸化酵素ファミリーの総称であり、肝臓において解毒を行う酵素として知られているが、ステロイドホルモンの生合成、脂肪酸の代謝や植物の二次代謝など、生物の正常活動に必要な反応にも関与している。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、多数の分子種が存在しており、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を代謝している。このため、CYP による薬物相互作用が研究されている。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ため、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免疫法を用いた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 又は 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、ウイルスなどにも結合するものが報告されている。

また、アプタマーは、認識する対象物質に制約が無いだけでなく、抗体に匹敵する高い親和性と特異性をもって対象物質と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、同じ配列でも立体構造の異なる分子も区別できる。

さらに、大量の合成が容易である利点もあり、様々な分野で強力なツールとして期待されている。

当研究室では、DNA や RNA 中のグアニン塩基と特異的に反応し、化学発光する 3,4,5-trimethoxyphenylglyoxal (TMPG) 試薬を開発しており、核酸であるアプタマーを直接検出する試薬として有用であると考えられている。本研究は、CYP と特異的に結合する RNA 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 と親和性のある分子の探索を行った。

B. 研究方法

1. SELEX 法によるスクリーニング

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図 1 に示す。このとき、DNA プールとして 4^{25} 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'-TAATACGACTCACTATA-3' と 5'-TAGTTAT TGCTCAGCGG-3' を用いた。

まず、59 mer オリゴヌクレオチドを鋳型として、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 μ 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。

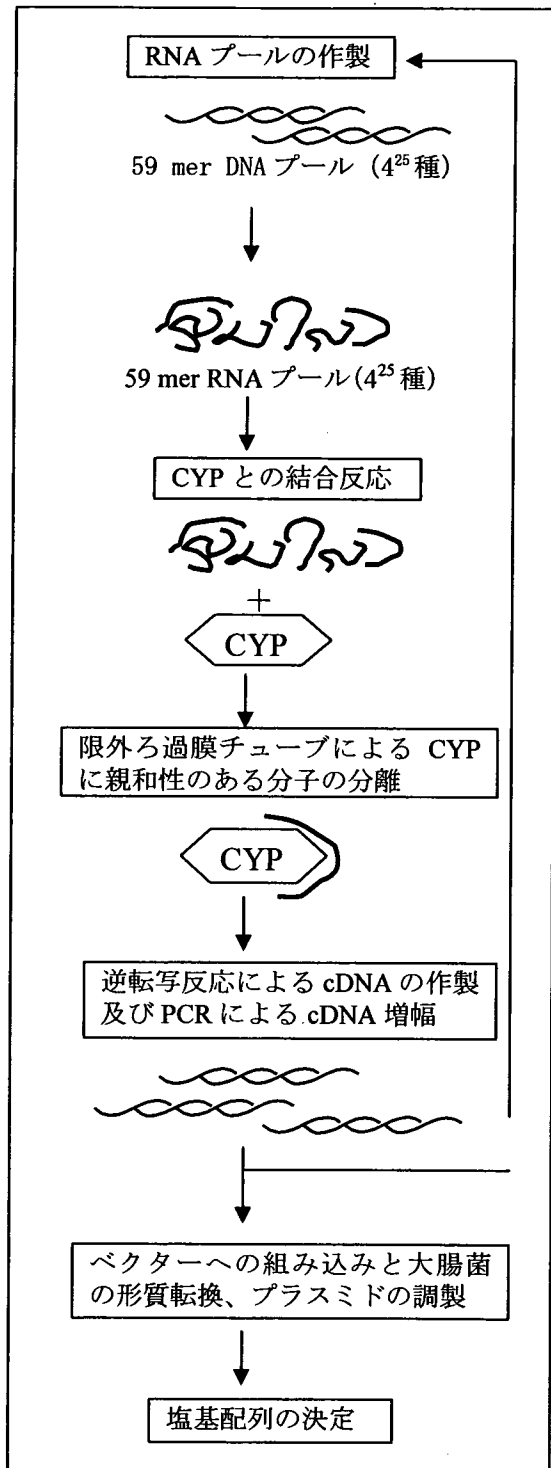


図1 SELEX 法による RNA アプタマーのスクリーニング

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 μ g) に、CYP3A4 (0 - 4 μ 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。
 2. PVDF 膜を用いたスクリーニング法の基礎検討

SELEX 法とは別に、CYP と RNA の結合力の差を利用したスクリーニング法の開発を試みた。この方法の原理を図2に示す。まず、PVDF 膜上に CYP1A2 (1.5 μ 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 μ 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 を用いて、RNA の脱離効果を検討した。

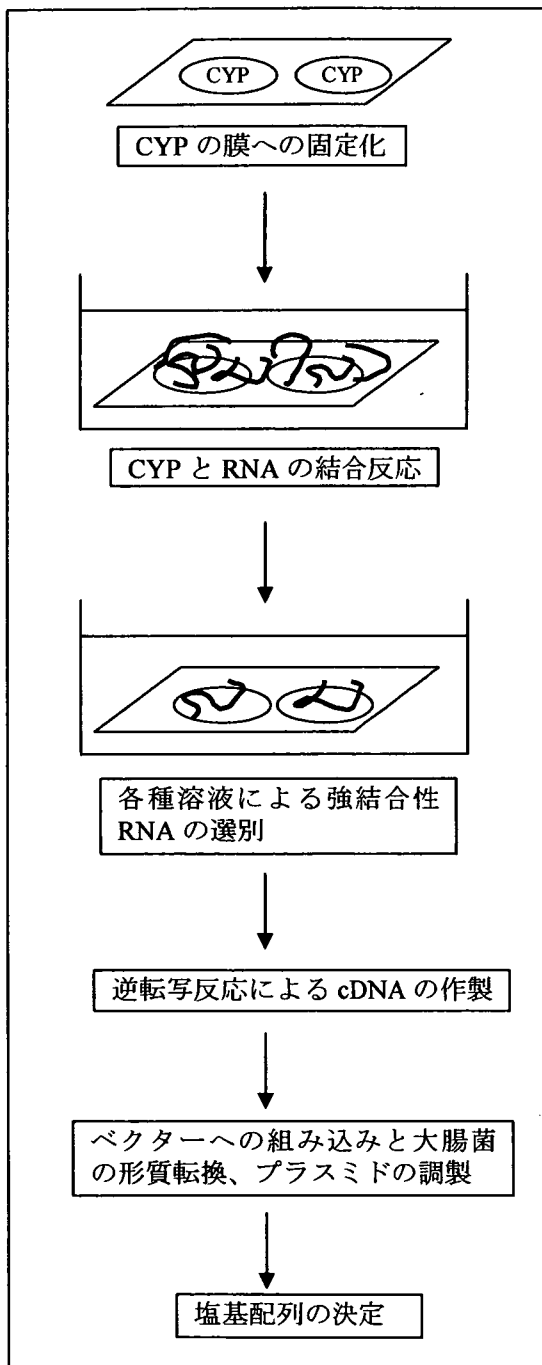


図 2 PVDF 膜を用いた RNA アプタマーのスクリーニング

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。

C. 研究結果

1. SELEX 法による RNA アプタマーのスクリーニング

SELEX 法を基に、CYP3A4 に結合する RNA の探索を試みた。59 mer RNA プールに含まれる RNA の平均分子量は約 20,000, CYP3A4 の分子量は約 66,000 なので、RNA プールの中に CYP3A4 と結合する分子が存在すれば、分子量の差により、結合型と非結合型の RNA を遠心限界ろ過膜チューブで分離できると考えた。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、研究方法 1 の操作により、結合型と非結合型 RNA を分離した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により調べた結果を図 3 に示す。CYP3A4 の非存在下、同様の操作を行なった場合、全ての RNA が限外ろ過膜を通過していた (lane 1, 2)。これに対して、CYP3A4 を 1 μ g (lane 3, 4) 又は 4 μ g (lane 5, 6) 結合反応に用いた場合、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。

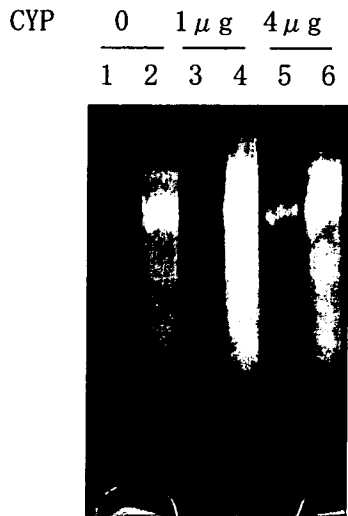


図3 CYP 結合型、非結合型 RNA の分離
Lanes 1, 3, 5: 膜上の RNA (結合型 RNA)
Lanes 2, 4, 6: ろ液画分 (非結合型 RNA)

次に、得られた結合型 RNA を用いて、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 (図4)。

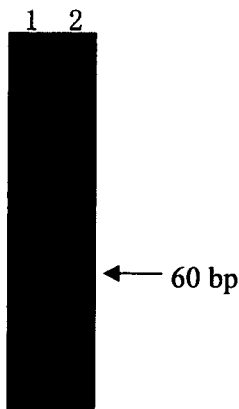


図4 cDNA の電気泳動
Lane 1: cDNA, lane 2: marker DNA

2. PVDF 膜を用いたスクリーニング法の開発

研究方法2によるCY3A4PとRNAの結合力の差を利用したスクリーニング法の開発を試みた。PVDF膜上に固定化したCYP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を図5に示す。

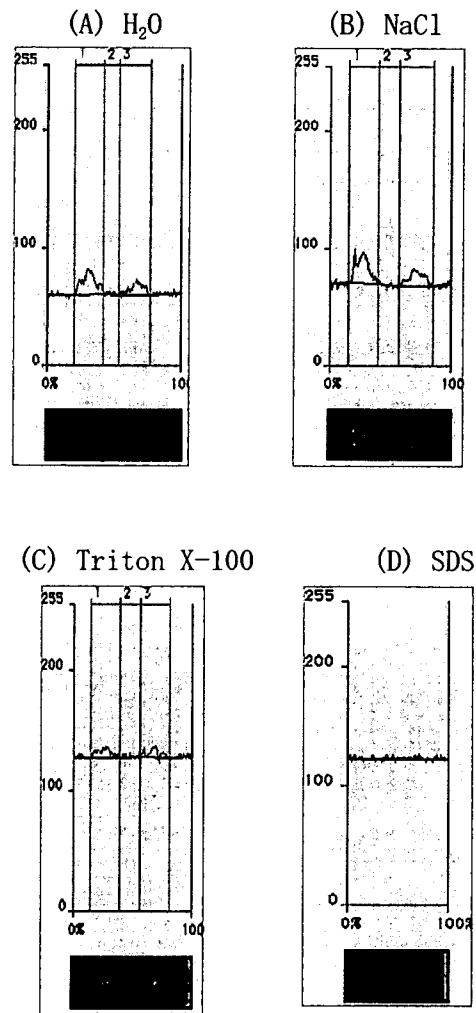


図5 各種溶液によるRNAの脱離効果
スポット: 1.5 μ g CYP3A4
洗浄液: (A) 純水、(B) 0.5 M NaCl 水溶液、(C) 10% Triton X-100 水溶液、(D) 1%

SDS 水溶液

今回検討した溶液において、0.5 M NaCl は、純水とほぼ同じ発光強度だったことから、0.5 M NaCl では PVDF 膜上の CYP と結合した RNA は脱離せず、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、発光強度が減少していることから、比較的弱い結合性の RNA は脱離し、強い結合性の RNA は、膜上に保持されていると推察された。さらに、1% SDS では、発光強度が観察されなかったことから、この濃度の SDS により結合するほぼ全ての RNA が脱離できると考えられた。

D. 考察

アプタマーは、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、などの利点があり、抗体に替わるものとして期待されている。本研究では、テーラーメイド医療の指標となる CYP の選択的な高感度検出を目的として、59 mer の RNA プールから CYP と親和性を持つアプタマーの探索を、2つの方法を用いて試みた。分子量の違いを利用した SELEX 法では、使用する限外ろ過膜の分画サイズや緩衝液を検討することで、RNA プールから CYP3A4 と結合する RNA を分離することができた。今回、結合反応に PBS 緩衝液を用いたが、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。現在、2 サイクル目が終了しているが、さらに数サイクル繰り返し、結合力の強い RNA アプタマーの検索を行ない、結合定数や特異性を調べる予定である。

CYP と RNA の結合力の差を利用した PVDF 膜を用いる方法では、Triton X-100 や SDS により、結合性の高い RNA を選別できることが分かった。これらの溶液の濃度や浸す時間を検討することで、さらに詳細に結合力に応じた RNA の選別が可能であると考えられる。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。今後、試薬の濃度や時間の検討を行う予定である。

E. 結論

CYP に対する RNA アプタマーの探索を、2つの方法で試みた。現在、目的とする RNA アプタマーは得られていないが、両方法とも、さらに実験条件を検討することで、CYP に対する RNA アプタマーが得られると期待できる。さらに、この情報をもとに、CYP 分子種に特異的な RNA アプタマーが得られれば、発光性の高分子プローブを用いることにより、CYP の特異的な検

出法の構築が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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).

(2) 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).

(3) 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).

(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**, *Ana. Sci.*, in press (2008).

2. 学会発表

(1) 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)

(2) 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)

(3) 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)

(4) 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)

(5) 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)
- (6) 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)
- (7) 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)
- (8) 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)
- (9) 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)
- (10) 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- κ 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)
- (11) 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)
- (12) 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)
- (13) 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)
- (14) 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)
- (15) 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)
- (16) 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)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

CYP タンパク質に対する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

分担研究者 柴田 孝之 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 助教

研究要旨

本研究では、薬物代謝酵素であるチトクローム P450 (CYP) の多型を網羅的に検出できる検査法の開発を目的として、CYP と特異的に結合するアプタマー核酸を高感度かつ定量的に検出できる新規化学発光性プローブの開発を行った。この研究目標を達成するために、まず、DNA やウシ血清アルブミン (BSA) を基本骨格に持つ発光性高分子プローブをデザインした。このプローブは、分子内に多数のビオチンと化学発光物質を含んでおり、アビジンを介して連鎖複合体を形成することによって、プローブの発光シグナルを増幅することができる。本研究の結果、分子内に多数のビオチンとイソルミノールを持つ化学発光性 DNA プローブ及び BSA プローブの開発に成功した。また、これらのプローブによって、膜上の微量検体を特異的に検出できる可能性が得られた。

A. 研究目的

CYPは、脂溶性の薬物を水溶性に変換して体外排出を促す薬物代謝酵素である。ヒトの肝細胞内には約100種類のCYPが存在しているが、これらをコードする遺伝子の塩基配列が、人によってわずかに異なることが知られている。そのため、翻訳されるCYPにも多型が生じ、同一のCYPであっても活性に個人差が現れる。このCYPの多型は、薬の効き方に大きな影響を与える。すなわち、ある薬物に対するCYPの機能が欠損した場合、その薬物が代謝されずに体内に蓄積されるため、予期しない副作用を示す可能性がある。したが

って、CYP多型を迅速かつ網羅的に解析できれば、薬効の個人差や副作用の軽減を考慮した投薬が可能となるだけでなく、テーラーメイド薬剤の開発につながると期待される。

近年、タンパク質を特異的に認識できる分子として、核酸アプタマーが注目されている。核酸アプタマーは、長い一本鎖RNA又はDNA鎖が分子内で高次構造を形成することによって、特定のタンパク質と強く結合する人工抗体である。一般的に、タンパク質の特異的認識には抗体が用いられているが、高価なこと、取り扱いに注意が必要なこと、一度に調製できる量

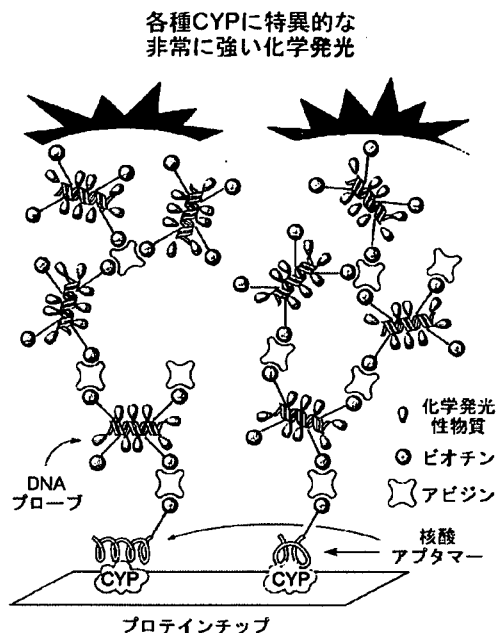
が少ないことなどの制限が存在する。一方、核酸分子は安価に大量合成でき、取り扱いが容易であるといった利点がある。したがって、各種CYPと結合できる核酸アプタマーは、ハイスループットなCYP検出のための理想的な分子であると考えられる。

そこで本研究では、極微量のCYPに結合した核酸アプタマーを、高感度かつ定量的に解析できる新規発光性プローブの開発を目的とした(図1)。当該研究者らは以前より、デキストランを基本骨格に持つ発光性高分子プローブの開発研究を行っている。このプローブは分子内に多数のビオチンと化学発光性物質を含んでおり、アビジンを介して連鎖複合体を形成することにより、プローブの発光量を大幅に増幅することを期待して設計されている。昨年、この高分子プローブを用いることによって、膜上の微量タンパク質を高感度かつ定量的に解析できる新規検出法の開発に成功した。

本年度は、さらに簡便なプローブ調製法の開発及び感度の向上を目的として、水溶性のDNA分子やタンパク質を基本骨格とし、多数のビオチンと化学発光性物質を持つ新規高分子プローブの開発研究を行った。具体的には、大腸菌由来の長鎖DNA(図1-①)、又はBSA(図1-②)を選択し、それらに、低分子量化学発光物質であるイソルミノール及びアビジンの導入化を試みた。また、これら合成した化学発光性高分子プローブを用いて、膜上の微量検体を検出するための基礎検討

を行った。

- ① DNAを基本骨格に持つ化学発光プローブによるプロテインチップ上の極微量CYPの検出



- ② BSAを基本骨格に持つ化学発光プローブによるプロテインチップ上の極微量CYPの検出

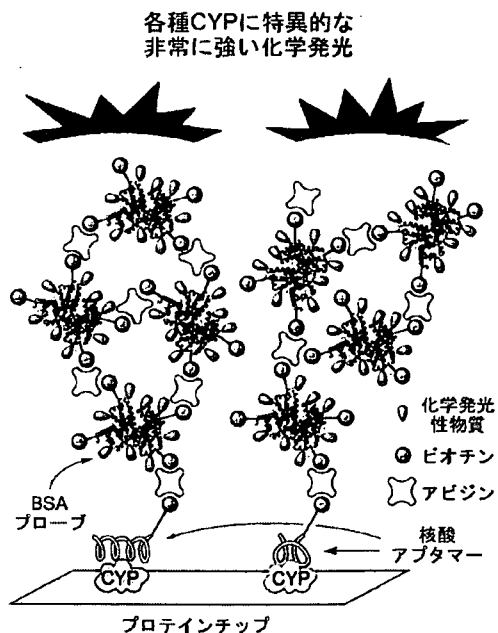


図1. 化学発光性高分子プローブによる膜上CYPの網羅的検出法の概念図。①DNAを基本骨格に持つプローブ、②BSAを基本

骨格に持つプローブ

B. 研究方法

1. 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 をトリスヒドロキシメチルアミノメタン - EDTA 緩衝液 (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。

2. ウシ血清アルブミン (BSA) を基本骨格に持つ化学発光性プローブの合成

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 を精製水 10 ml 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。

3. PVDF 膜に吸着させたアビジンタンパク質類の検出

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、西洋ワサビペルオキシダーゼ - ストレプトアビジン融合タンパク質 (HRP-SA)、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 分間膜を減圧下で乾燥させた。

別のシャーレー (35 mm ID) にリン酸緩衝生理食塩水 (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 μL、0.5 M リン酸テトラブチルアンモニウム水溶液 700 μL、30 % 過酸化水素水 50 μL 及び 10 mM 塩化鉄 50 μL）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。

C. 研究結果

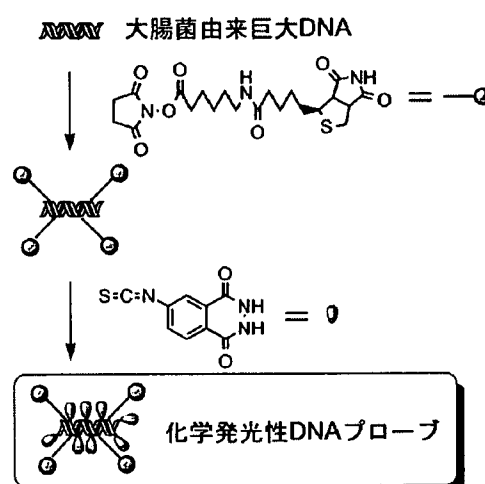
1. 化学発光性高分子プローブの合成

化学発光性 DNA プローブの合成は、大腸菌由来の長鎖 DNA 分子を出発原料として行った（図 2-①）。まず、DNA 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 を出発原料として行った（図 2-

②）。この合成では、まずイソルミノールイソチオシアネートを用いて化学発光標識を行った。次にこのイソルミノール-BSA 複合体のビオチン化を行った。生成した化学発光性 BSA プローブも同様に、エタノール沈殿によって精製することができた。

① 化学発光性 DNA プローブの合成法



② 化学発光性 BSA プローブの合成法

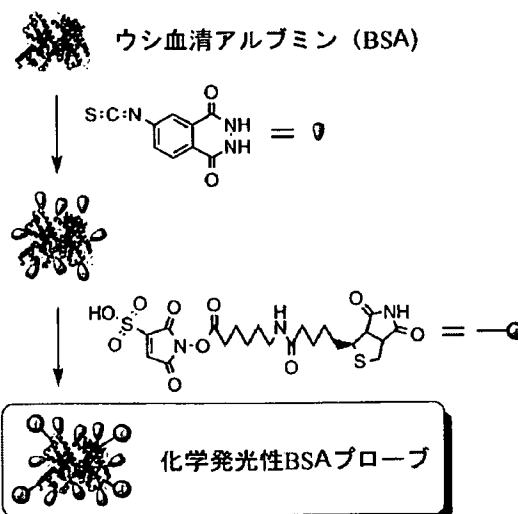


図 2. ①DNA を基本骨格に持つ発光性プローブの合成経路、②BSA を基本骨格に持つ発光性プローブの合成経路

2. PVDF 膜に吸着させた化学発光性高分子プローブの検出

まず、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実験を行った。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い化学発光を与えた(図 3-①、②)。またこの発光量は、以前に報告したデキストランを基本骨格に持つ化学発光プローブと同程度であることが明らかになった(図 3-①)。

① DNAプローブのおよびデキストランプローブの化学発光



デキストラン プローブ 500 ng DNA-イソル ミノール 500 ng ビオチン-DNA-イソルミノール 500 ng

② BSAプローブの化学発光



BSA-イソル ミノール 500 ng ビオチン-BSA-イソルミノール 500 ng ブランク (水)

図 3. ①化学発光性 DNA プローブ及び化学発光性デキストランプローブの PVDF 膜上での発光、②化学発光性 BSA プローブの PVDF 膜上での発光

パク質の検出

本研究の原理は、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。そこで次に、合成した高分子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タンパク質を吸着させ、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(図 4-①、②)。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、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、化学発光反応条件(アセトニトリルの量、リン酸テトラプロピ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)についての検討も行った。

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を図 4-①に示す。図のように、このプローブによって、500 ng の膜上のアビジンタンパク質が検出されることが分かった。図 4-②には、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を示している。図 4 に示すように、標識タンパク質の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って、強い検出シグナルを与えることが分かった。

3. PVDF 膜に吸着させたアビジン類タン

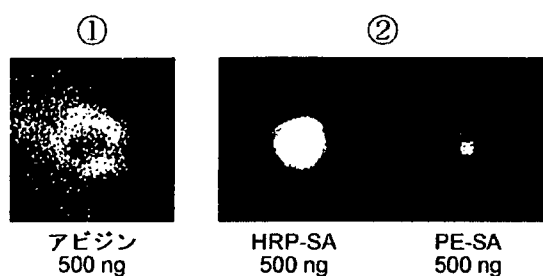


図 4. ①化学発光性 DNA プローブを用いた PVDF 膜上のアビジンの検出、②化学発光性 BSA プローブを用いた PVDF 膜上の HRP-SA 及び PE-SA の検出

D. 考察

デキストランを基本骨格に持つ高分子プローブに関する当該研究者らの研究戦略を応用し、DNA やタンパク質など反応性官能基を多数持つ生体高分子を基本骨格に持つプローブの開発を行った。本研究で開発した新規高分子プローブの合成法では、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を、水溶液中で行うことができた。また、エタノール沈殿法で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とする化学発光性プローブを創製できる、有用な手法になり得ることが分かった。

次にこのプローブの化学発光性を調べたところ、DNA 及び BSA のどちらのプローブも強い化学発光性を示した。この発光を、以前報告したデキストラン高分子プローブの発光と比較したところ、どちらも同程度の発光強度であった。これらの

ことから、調製した化学発光性高分子プローブは、どちらも膜上の微量検体検出に適応できる可能性が示された。

そこで、これらのプローブを膜上のアビジン類の検出に応用した。その結果、アビジン及びストレプトアビジン標識タンパク質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、及びアビジンを介した連鎖複合体の形成を示唆するものである。すなわち、本研究で合成した化学発光性高分子プローブが、膜上の微量検体の検出に適用できるものと期待される。

E. 結論

本年度の研究では、核酸アプタマーを用いた CYP 多型の検出を到達目標として、世界最高水準の感度を与え、さらに簡便かつ迅速なアッセイを可能にする新規化学発光性高分子プローブを開発した。またこのプローブが、PVDF 膜上に吸着させた極微量検体のアッセイに適応可能であることを示した。本研究では、アッセイ条件の最適化を行っておらず、今後、膜洗浄条件、発光反応や、複合体形成反応の条件（高分子プローブやアビジンの濃度、反応液の温度や組成など）について詳細に検討する必要がある。しかしながら、本研究で開発した化学発光性 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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).

(2) 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).

(3) 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) 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), January (2008)

(2) 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), January (2008)

(3) 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), November (2007)

(4) 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), November (2007)

(5) 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), November (2007)

(6) 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), November (2007)

(7) 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), November (2007)

(8) 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), November (2007)

(9) 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), November (2007)

(10) 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- κ 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, 要旨集(3) P73, 富山(2007)

(11) 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)

(12) 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)

(13) 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)

(14) 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)

(15) 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)

(16) 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)

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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
M. N. Wainaina, T. Shibata, C. Smanmoo, T. Kabashima and M. Kai	Fluorescence detection of amino acids in the post-cleavage conversions for manual sequencing of a peptide	Anal. Biochem.	374	423-425	2008
Keiko Tonooka, Tsutomu Kabashima, Takayuki Shibata, Chenhong Tang, Zhiqiang Yu, and Masaaki Kai	Facile Assay of Telomerase Activity Utilizing a DNA-Detectable Chemiluminogenic Reagent	Anal. Sci.	24	印刷中	2008