

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17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 甲斐 雅亮

平成20（2008）年 4月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	23
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	24

総合研究報告書

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。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。本研究事業では、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膜に効率的かつ簡便にアレイ状に吸着させる方法を開発し、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、CYPの抗体アレイをPVDF膜上に作成し、シャーレー中のCYPを捕獲させ、さらに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 CYP3A4の検出に成功した。しかし、この網羅的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り、そのような抗体の入手が困難であることから、CYPと結合するアプタマー核酸の創製研究を行った。25 merの全塩基配列を有する59 mer DNA プールからCYPと結合するDNAを探索し、CYPに結合する59 merの特定配列のDNA（結合定数、約 $1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ）を見出し、そのDNAを大腸菌で大量培養できる組換えプラスミドの作成技術を設定した。さらに、その59 mer DNA 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について検討し、CYP3A4と結合する59 mer RNA 鎖を確認した。一方、本研究で用いている化学発光性デキストランプローブが、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も開発した。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、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を合成した。合成した両化学発光性高分子は、今後、CYPやアプタマー検出用プローブとして適応可能であることが示唆された。

分担研究者

梶島 力(平成17-19年度)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
准教授

柴田孝之(平成19年度)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
助教

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える。

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。

本研究事業で用いた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考ええる。

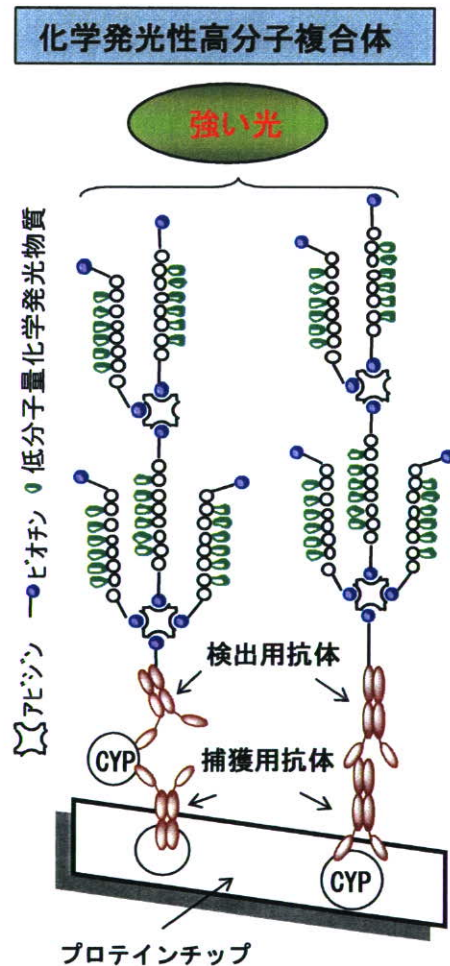


図1 CYPプロテインチップの化学発光検出

本研究では、まず、薬物代謝酵素である CYP 類を PVDF 膜に直接吸着させたのち、捕獲用抗体及び検出用（ビオチン化）抗体を結合させ、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連結させる手法を検討した（図 1 右）。

次に、各個人の検体中の各種 CYP を網羅的に検出するために、サブタイプ別に捕獲できる各種 CYP の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 類とビオチン化ポリクローナル抗体を結合させ、アビジンを介し、ビオチン修飾化学発光性デキストランプローブを効率よく連鎖的に検体と連結させるサンドイッチアッセイ法を検討した（図 1 左）。

この際、膜のブロッキング剤として多糖分子と牛血清 (BSA) が必要であったが、BSA ブロッキング剤のみを用いたときは、化学発光性デキストラン高分子プローブ自体が、直接 CYP 類と結合した。そこで、多種類の生体タンパク質との結合性を調べ、そのメカニズムを精査すると共に、この現象に基づく各種 CYP 類のアッセイ系を検討した（図 2 左）。

一方、上述の各種 CYP を検査する網羅的なサンドイッチアッセイ系を実用化するには、CYP に対する認識用抗体としてのモノクローナル抗体や認識部位が異なるビオチン化ポリクローナル抗体が多種類必要であった。しかしながら、モノクローナル抗体は 2～3 しか市販されておら

ず、ビオチン化抗体は皆無であった。

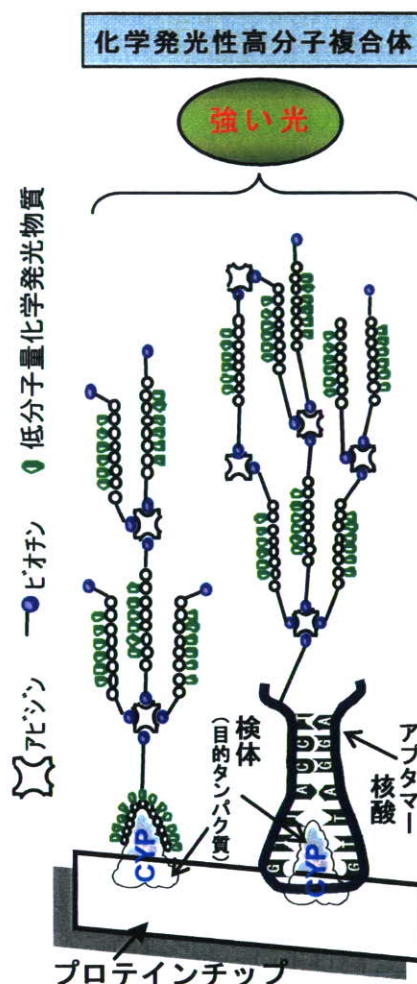


図 2 CYP プロテインチップの化学発光検出

そこで、CYP タンパク質と特異的に結合するアプタマー核酸を開発する実験を行った。アプタマー核酸が創製できれば、その塩基配列に基づき、アプタマー核酸をポリメラーゼチェーン反応 (PCR) によって試験管内において大量に合成でき、かつ、高分子プローブと結合させるために必要なビオチン化アプタマー核酸の作

成も容易である。したがって、特異性の高いアプタマー核酸を用いることによって、安価、簡便かつ実用的なプロテインチップアッセイ系（図2右）が構築できるものと考えた。そこで、59 mer の鋳型 DNA プールを用いて、CYP タンパク質のアプタマーとしての DNA や RNA の探索手法を検討した。

さらに、核酸やタンパク質にビオチンと低分子量化学発光物質ルミノールを多数導入させた化学発光性の核酸及びタンパク質プローブの合成とそれらの基礎的なプローブ評価も行った。

B. 研究方法

1. ビオチン含有化学発光性デキストランプローブの化学合成

平均分子量 2×10^6 Da 又は 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 2 時間酸化させた。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、室温で約 3 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又はルミノールを加え、 60°C で 18 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 17 時間還元反応させた。反応後、反応

液をアセトン又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（又はルミノール）及びアビジン含有デキストランを回収した。

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 ($1 \times \text{PBS}$ 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プローブ及びアビジンを加えた $1 \times \text{PBS}$ 溶液 (2 mL) に浸し、 37°C で 30 分間インキュベートした。 $1 \times \text{PBS}$ 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 (アセトニトリル 700 μL 、0.5 M テトラブチルアンモニウム水溶液 280 μL 及び 30 % 過酸化水素水 30 μL : 用事調製) 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と化学発光性デキストランプローブによる検出

シャーレー (35 mm ID) に $1 \times \text{PBS}$ (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、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、予め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; 1 \times PBS 溶液) を吸着させ、10 分間減圧乾燥後、膜を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 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。膜を 1 \times PBS (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 分間化学発光強度を暗室中 CCD カメラで測定した。

4. PVDF 膜上の認識用抗体に結合した CYP の化学発光性デキストランプローブによる検出

シャーレー (35 mm ID) に 1 \times PBS (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、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 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートして、予め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, 103

ng/2 μ L; 1 \times PBS 溶液) を吸着させ、10 分間減圧乾燥後、シャーレー中 1 \times PBS 2 mL に検体としてリコンビナントヒト CYP3A4 (265 ng/50 μ L; 1 \times PBS 溶液) を加えて、37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。膜を取り出し、1 \times PBS 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 (2 mL) 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 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。膜を 1 \times PBS (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。上述の化学発光試液に 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。

5. 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 CYP の化学発光検出

CYP 又は他の生体タンパク質を 25 mM トリス緩衝液 (pH 7.2) に溶解し、PVDF 膜にスポットした。その膜を 30 分間乾燥させ、3 % BSA を含む 1 \times PBS 溶液中 37 $^{\circ}$ C 10 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 (pH 7.2) 2 mL 中に 37 $^{\circ}$ C 30 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 回膜を洗淨し、さらに 75 %メタノール水で洗淨した。洗淨後、膜を 20 分間減圧乾燥後、上述の化学発光試液に浸して、2 分間の発光強度を積算測定した。

6. CYP に対する DNA 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。DNA プールとして 4²⁵ 種の分子種を含む 59 mer オリゴヌクレオチド (5' -TAAT ACGACTCACTATAN₂₅CCGCTGAGCAATAAC TA-3') を選択し、PCR プライマーとして 5' -biotin-TAATACGACTCACTATA-3' 及び 5' -TAGTTATTGCTCAGCGG -3' を用いた。

まず、DNA プールに CYP (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。反応液を限界ろ過膜 (分画分子量 5 万) チューブに入れて 2,000 g で 3 分間遠心分離し、分子量の差を利用して、CYP に対する結合性 DNA と非結合性 DNA を分離した。TE buffer 100 μ L で洗淨した (2 回、2,000 g で 3 分間遠心)。TE buffer を 20 μ L 加え、4°C で 30 分間以上放置して、膜上の DNA を回収した (\times 2)。回収液 (合計約 30 μ L) 中の DNA をテンプレートとして、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、4°C で 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 で洗淨後、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一本鎖 DNA を除いた。カラムを TE buffer 2 mL で洗淨後、5 mM ビオチン 50 μ L をカラムに加え、4°C 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 をカラムに加えて、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→限界ろ過膜による結合性 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→ (CYP 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。

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 酵素 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 酵素を失活させるため 70°C、10 分間加熱し、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 分間培養後、アンピシリン (50 μ g/mL) を含

んだ寒天培地で、37°C、一晚培養した。一晚培養したコロニーを液体培地に植菌し、37°Cで一晚培養し、この培養液からプラスミドを QIA Spin Miniprep Kit を用いて調製した。このプラスミドに組み込んだ DNA の塩基配列は、BigDye Terminator 1.1 Cycle Sequencing Kit を用いて決定した。

7. CYP に対する DNA アプタマーの結合性評価

(A) HRP-SA による検出

ナイロン膜に CYP3A4 (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) を 1 μL と 2 μL ドットプロットし、ドライヤーで乾燥後、スキムミルク 50 mg を含む PBS 2 mL に膜を 30 分間浸し、ブロッキングした。膜を PBS 2 mL で 3 回洗浄した後、一本鎖又は二本鎖ビオチン化 DNA 10 μg を含む TE buffer 1.5 mL 中、室温で 3 時間反応させた。反応後、膜を TE buffer 1.5 mL で 5 分間 3 回洗浄し、horse radish peroxidase-streptavidine (HRP-SA) 3 μL を含む PBS 1.5 mL に浸し、室温で 30 分間反応させた。0.15% トライトン X-100 を含む PBS 1.5 mL で 5 分間洗浄を 3 回行い、Lumi Glo kit を用いて化学発光させ CCD カメラにより画像検出した。

(B) TMPG による検出

ナイロン膜に CYP3A4 (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) を 1 μL と 2 μL ドットプロットし、ドライヤーで乾燥後、膜をスキムミルク 50 mg を含む PBS 2 mL に 30 分間浸し、ブロッキングした。膜を PBS 2 mL で 3 回洗浄した後、一本鎖又は二本鎖ビオチン化 DNA

10 μg を含む TE buffer 1.5 mL 中、室温で 3 時間反応させた。反応後、膜を TE buffer 1.5 mL で 5 分間 2 回、さらに水 1.5 mL で 5 分間 1 回洗浄した。洗浄した膜を、0.1 M tetra-*n*-propylammonium phosphate 溶液 (pH 8.5) に 10 秒間、30 mM TMPG 溶液に 15 秒間浸した後、CCD カメラで 2 分間化学発光を画像検出した。

8. CYP に対する RNA アプタマーの検索

上述の 59 mer DNA プール (5' -TAATAC GACTCACTATAN₂₅CCGCTGAGCAATAACTA-3')、5' -TAATACGACTCACTATA-3' プライマー、及び 5' -TAGTTATTGCTCAGCGG-3' プライマーを用いて、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 μg) を基質として、T7 Ribo MAXTM 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 μg) に、CYP (0-4 μg) 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 分間遠心し、結合型と非結合型 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、逆転写反応により一本鎖 cDNA を作製

し、さらに、PCRにより二本鎖 cDNA の増幅を行った。

以上の工程【RNA への転写→CYP 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。

9. 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 CYP (1.5 μ g) をスポットし、10 分間減圧乾燥した。この膜を、RNA プールを含む溶液 (15 μ g/1.5 mL) に 37°C で 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 % トライトン X-100, 1 % SDS を用いて、RNA の脱離効果を検討した。

10. 大腸菌 DNA を基本骨格に持つ化学発光性プローブの合成

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。

11. 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 プロープ) 16 mg を得た。

12. 化学発光性 DNA 及び BSA プロープ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 プロープあるいは化学発光性 BSA プロープとアビジンをそれぞれ添加した。このプロープ溶液に膜を浸し、DNA プロープの場合は 37°C で 1 時間、BSA プロープの場合は 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 μ L、0.5 M リン酸テトラブチルアンモニウム水溶液 700 μ L、30 % 過酸化水素水 50 μ L 及び 10 mM 塩化鉄 50 μ 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。

1. 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。

C. 研究結果

1. ビオチン含有化学発光性デキストランプロープの化学合成

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)及びビオチン(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 [3, 4] によって発光させ、暗室中で従来の CCD カメラで検出した。

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、2,000-3,000 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。また、これらの高分子は、我々が開発した発光試液 [3, 4] 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。

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 膜に予めアビジンを吸着させて、シャーレー中の合成した各種 $(IL)_x-(Bio)_y-(Glc)_{12300}$ 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。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。

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、シャーレー中の $1\times$ PBS 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た。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と化学発光性デキストランプローブによる検出

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、プローブ中のビオチン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には、BSA と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。それぞれ段階的に結合させて、それぞれの段階で洗浄した場合と比較した場合よりも、アッセイ時間が約 1/3 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。これらの検討の結果、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。

4. PVDF 膜上の認識用抗体に結合した CYP の化学発光性デキストランプローブによる検出

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、シャーレー中の多種類 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 アッセイ系を開発した。現在のところ 50 ng/mL の CYP3A4 の検出を可能にしている。

しかしながら、この方法は、各種 CYP に対するモノクローナル抗体は 2～3 種類しか市販されておらず、かつビオチン化したポリクローナル抗体も市販されていない。今回は、CYP3A4 のポリクローナル抗体にビオチンヒドラジドを導入したものを化学合成したものを使用した。

5. 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 CYP 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 類と直接結合し、それらを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、 β -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では発光しなかった。

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、pH7 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った。

6. CYP に対する DNA アプタマーの検索と CYP に対する結合性

4^{25} 種の分子種を含む 59 mer DNA プールを材料として、CYP3A4 に結合する DNA アプタマーの探索を試みた。DNA の分子量は約 18,000、CYP3A4 の分子量は約 66,000 なので、DNA の中に CYP3A4 と結合する DNA アプタマーと非結合性 DNA を限界ろ過膜

で分離した。また、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 DNA の 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 PCR によって二本鎖 DNA へ変換後、プラスミドに導入して大腸菌に組み込み、培養後、同一遺伝子を持つ大腸菌コロニーが約 200 個生育した。その中から無作為に 12 個のコロニーを選択し、プラスミドを調製して、塩基配列を調べた結果、全ての DNA において、5' 末側プライマー配列の直後に GGGA という配列が同じ位置に存在しており、5' 末側プライマー配列を含めた GGGA 周辺の配列が CYP との結合部である可能性が示唆された。

一定量の CYP3A4 をナイロン膜に吸着させて、それに、当モル濃度の二本鎖 DNA 及び一本鎖 DNA アプタマーと 3 時間結合反応させたところ、それらの結合定数は 10⁵~6 M⁻¹ レベルであった。なお、ナイロン膜上の CYP3A4 に結合した一本鎖及び二本鎖ビオチン化 DNA を、HRP-SA と Lumi Glo キットにより、或いは TMPG 試薬により、CYP に結合した DNA を直接検出したが、HRP-SA と Lumi Glo キットを用いる検出法に比べて、TMPG 化学発光検出法の感度が約 10 分の 1 であった。

8. 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% トライトン 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。

9. 大腸菌 DNA 及び 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く化学発光をした。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連結させるものである。そこで合成した新規の化学発光性 DNA 及びタンパク質両

プローブのアビジンに対する結合性を評価した。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、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。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って、強い検出シグナルを与えた。

D. 考察

本研究事業において、一次抗体、二次抗体、及び化学発光性デキストランプローブを、アビジン及びブロッキング剤である BSA とデキストランを共に短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 の定量的検出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、さらにビオチン化化学発光性デキストラン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、各種 CYP に対するモノクローナル抗体及びビオチン化ポリクローナル抗体の独自の開発が必要である。

なお、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。CYP などの特定タンパク質は、そ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することが分かった。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、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が開発が可能になった。

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 59 mer DNA アプタマーを作成することができた。これらの結合定数は $10^5 \sim 10^6 M^{-1}$ レベルを示した。核酸アプタマーは、化学合成による大量生産が可能であり、抗体のような変性の心配がなく、抗体に替わる分子認識高分子として期待できる。また、文献上では一本鎖 RNA が、より強い結合性を示しているので、一本鎖 RNA アプタマーの探索を試み、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。

さらに、 4^{25} 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

調整したトライトン 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できることが分かった。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。

また、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の開発を行った研究では、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手法は、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ことが期待できる。また、これらのプローブのアビ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と結合して強く化学発光した。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。

また、安価で汎用されている PVDF 膜へのタンパク質の吸着方法について検討した結果、各種 CYP の簡易な PVDF 膜アレイチップの作成に成功した。

このアレイチップ上の CYP に、CYP 認識用一次抗体、ビオチン化二次抗体、及びビオチン化発光性デキストランプローブを段階的に結合させる条件等を検討した結果、一次抗体、二次抗体、及び発光性

高分子プローブを、アビジンタンパク質とブロッキング剤としての BSA と多糖と共に短時間リン酸塩緩衝液中でインキュベートさせることによって、膜上の CYP3A4 を定量的に検出できる世界最高感度の手法を開発した。

さらに、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。

上述の方法は、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。しかし、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、各種サブタイプの CYP 抗体を膜にスポットしている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 (100 ng/mL レベル) 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、アビジンタンパク質を介して連鎖的に連結させて検出する方法を開発した。

しかし、この網羅的検査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並びにそのビオチン化ポリク

ローナル抗体が必要であった。しかし、これらの大部分は市販されていないこと、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すること、さらに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ことなどを鑑みて、今後も、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 aptamer 核酸の創製、さらにそれを用いた超高感度検出系の構築する必要がある。

そこで、分担研究者らは、この研究事業においても、まず PCR 増幅ならびに転写酵素 (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 4²⁵ 種類からなる DNA プールを入手した。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 DNA 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 PCR によって二本鎖 DNA へ変換後、プラスミドに導入して大腸菌に組み込み、培養後、同一遺伝子を持つ大腸菌コロニーを 10 種類スクリーニングした。その結果、CYP3A4 と結合する 9 種類の一本鎖及び二本鎖 59 mer DNA の精製に成功した。次に、それらの CYP に対する結合性を、ナイロン膜上で調べた。すな

わち、一定量の CYP3A4 を固相膜に吸着させて、それに作成した当モル濃度の二本鎖 DNA 及び一本鎖 DNA と 3 時間結合反応させたところ、それらの結合定数は $10^{5\sim 6}$ (M^{-1}) レベルであった。

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。

さらに、当該主任研究者らが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 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応用する。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. 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) 甲斐雅亮, 梶島力: ベーシック分析化学 (第 16 章 タンパク質と核酸の標識); ㈱化学同人, 東京, pp. 210-222 (2006).
- (3) 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).
- (4) 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).
- (5) 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).

- (6) 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).
- (7) 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) 奥村亨輔、太田和子、梶島力、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、梶島力、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) 梶島力、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) 梶島力、伊藤佳代、太田和子、甲斐雅亮: Thr666 in ChREBP doesn't relate directly to protein interaction and DNA