

## 平成 16 年度科学研究費補助金 ( 基盤研究 ( S ) ) 研究状況報告書

ふりがな		かい まさあき					
研究代表者氏名		甲斐 雅亮		所属研究機関・部局・職		長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授	
研究課題名	和文	発光試薬による超高感度核酸解析手法の開発					
	英文	Development of Super-Sensitive Technique for the Detection of Nucleic Acids with Luminescent Reagent					
研究経費		平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計
16年度以降は内約額 金額単位：千円		33,500	18,400	13,900	7,500	7,500	80,800
研究組織 ( 研究代表者及び研究分担者 )							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門		役割分担 ( 研究実施計画に対する分担事項 )			
甲斐 雅亮	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授	生物物理化学 臨床検査学 分析化学		研究課題の総括的遂行			
椋島 力	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教授	生物物理化学 生物化学		DNAチップ検出系の応用研究			
太田 和子	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手	高分子化学 物理化学		細胞内の核酸検出系の確立 発光高分子プローブの開発			
当初の研究目的 ( 交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。 )							
<p>研究代表者らは、水溶性の高分子に低分子量の発光物質を多数標識すると、低分子量の発光物質の結合数に応じて、蛍光はかなり消光するが、化学発光は著しく増大する現象を見出した。</p> <p>そこで本研究では、現在の機器を改良することなく検出感度を飛躍的に高める手段として、核酸のハイブリダイゼーションアッセイに適応でき、かつ、ターゲット DNA の超高感度検出を可能にする(1) 化学発光検出用の水溶性高分子プローブを創製する。次に、検体である核酸 ( ゲノム DNA、 mRNA など ) をポリメラーゼチェーン反応(PCR)などによってコピーすることなく、細胞内の核酸を直接用いて、数塩基の異常配列又は mRNA の発現量が検査可能な(2) マイクロアレーDNA チップの解析技術、(3) 細胞内核酸の特定遺伝子の顕微鏡検査などの検出法を開発するために、(1)の化学発光検出用の水溶性高分子プローブを適応させた新しい検出技術の研究を行う。</p> <p>すなわち本研究課題の達成目標は、数塩基のオリゴマーである微小の DNA や RNA 断片とハイブリダイズする相補的な DNA(cDNA)に化学発光性の高分子を結合させることによって、分子数単位の検体量で目的核酸の数塩基の違いを識別できる新規の超高感度核酸検出技術を開発することである。</p>							

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

### 2002～2003 年度の研究計画

1) 比較的高い発光量子収率を示すルミノール、イソルミノールなどの低分子量化学発光物質を、水溶性高分子デキストランに多数結合させ、かつビオチンも複数個結合させる強化学発光性の高分子プローブの合成法を確立する。

2) 特定DNAに特異的に結合したビオチン化cDNAを超高感度で検出するために、1)で創製したビオチン化化学発光性デキストランとアビジンタンパク質を連鎖結合させる条件について検討する。

3) テロメアDNAの高感度化学発光検出において、核酸のグアニン塩基に特異的かつ迅速な発光試薬TMPGを用いて、ビオチン化長鎖DNAとアビジンとの連鎖結合による発光増幅について調べる。

### これまでの研究成果

1) DNA検出用の新規超高感度プローブの創製研究では、多糖分子に、水溶性を損なうことなく低分子量の化学発光物質であるルミノールまたはイソルミノールを多数結合させる強発光性デキストラン高分子の合成法の確立に成功した（図1参照）。この合成法に従い、平均分子量100万[(Glc)<sub>5300</sub>]又は200万[(Glc)<sub>12300</sub>]のデキストラン分子に、ビオチンを導入後、ルミノール(Lu)を結合させた(Lu)<sub>1800</sub>-(Bio)<sub>100</sub>-(Glc)<sub>5300</sub>及び、イソルミノール(Ilu)を結合させた(Ilu)<sub>1900</sub>-(Bio)<sub>400</sub>-(Glc)<sub>12300</sub>をそれぞれ合成した。低分子量化合物の導入比は元素分析によって決定できた。両者の分光学的測定値を比較した結果、両高分子の蛍光強度は、遊離のルミノールやイソルミノールの約60-70倍の強度しか得られなかったが、化学発光強度は、(Ilu)<sub>1900</sub>-(Bio)<sub>400</sub>-(Glc)<sub>12300</sub>では遊離のイソルミノールの7700倍を、(Lu)<sub>1800</sub>-(Bio)<sub>100</sub>-(Glc)<sub>5300</sub>では遊離のルミノールの137倍を示した。このことから、デキストランに導入する低分子量化学発光物質としてはイソルミノールの方が優れていることが分かった。また、水溶液中のこれらの化学発光性高分子は、約 $2 \times 10^{-16}$  molの検出限界(S/N=2)を示したので、世界最高の強発光性物質であることが分かった。

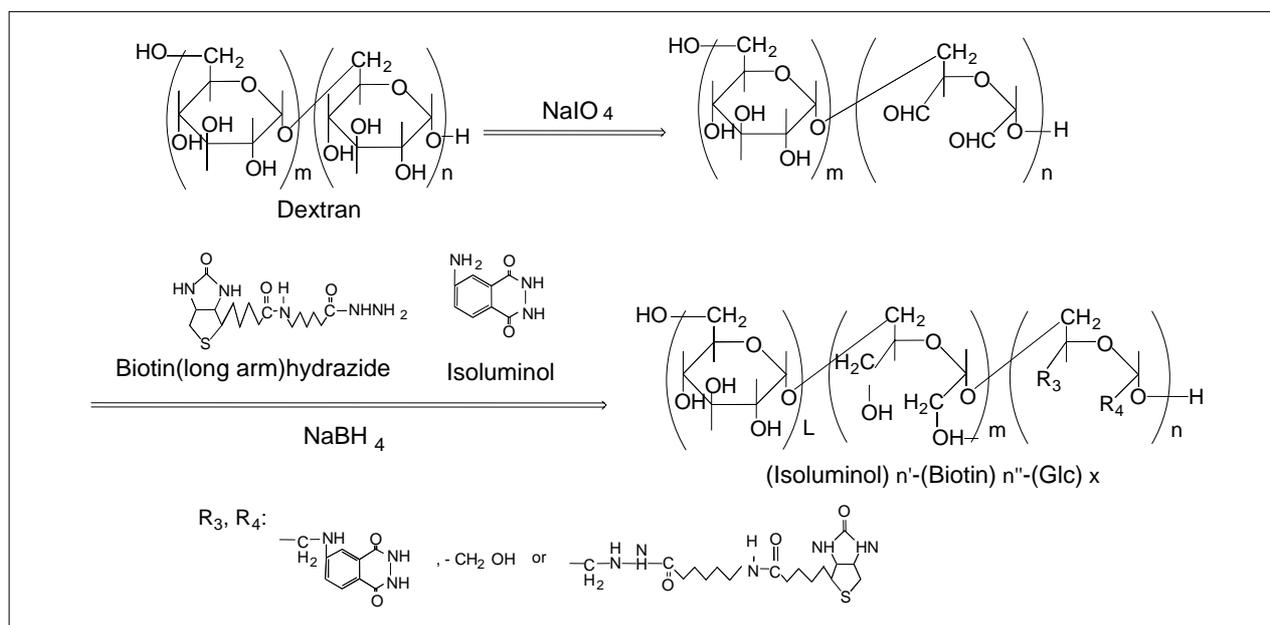


図1 イソルミノール及びビオチン修飾デキストラの合成

2) 次に、平均分子量200万のデキストラン分子に、イソルミノールとビオチンの結合数をコントロールした3種の化学発光性デキストラン分子(Ilu)<sub>850</sub>-(Bio)<sub>330</sub>-(Glc)<sub>12300</sub>、(Ilu)<sub>600</sub>-(Bio)<sub>660</sub>-(Glc)<sub>12300</sub>及び(Ilu)<sub>400</sub>-(Bio)<sub>1100</sub>-(Glc)<sub>12300</sub>を合成した。これら3者の化学発光性デキストランを、膜に固定したアビジン蛋白質と結合させると、特異的にプローブの化学発光スポットが検出された（図2参照）。そこで、Scatchardプロットによりアビジンの一分子に対する結合数を求めた結果、それぞれ、 $2.13 \times 10^{-3}$ 、 $2.67 \times 10^{-3}$ 及び $4.75 \times 10^{-3}$ の結合数を示した。これらの結果より、アビジンに結合した高分子の化学発光の強さは、その高分子中のイソルミノールの結合数とアビジンに対する親和性を乗じたものに相当するものと示唆され、今後の連鎖結合により、超高感度化が期待される。（次ページに続く）

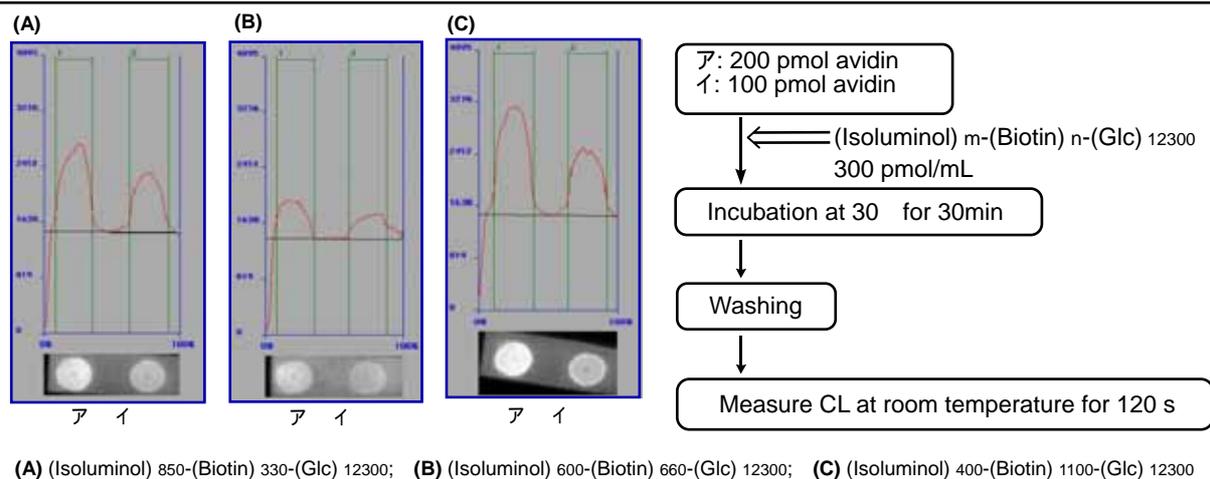


図2 アビジン蛋白質に結合した化学発光性デキストランの発光度合

3) 一方、研究代表者らが既に開発しているTMPG試薬は、グアニン塩基を特異的に化学発光性に導くことができる。そこで、グアニン塩基を含まないテロメア遺伝子のcDNA [(CCCTAA)n] を膜に固定させ、テロメアDNA[(TTAGGG)n]とハイブリダイズさせたのち、TMPG反応によって検出した。この方法は、検体核酸を分離せずに直接テロメア遺伝子を検出することが可能で、細胞分裂によって短縮するテロメアDNAの長さに比例した発光シグナルを与えた。しかし、検出感度は $10^{-12}$  molレベルであった。そこで、TMPG試薬による検出感度を増大させるために、ビオチン化長鎖DNA (テロメアシーケンスを持たないもの) を合成し、それとアビジンとの連鎖結合によるシグナル増幅について検討した (図3参照)。その結果、ターゲットDNAにグアニン塩基を多量に含む長鎖DNAを連鎖結合させることに成功し、千倍以上の検出感度を得ることができた。

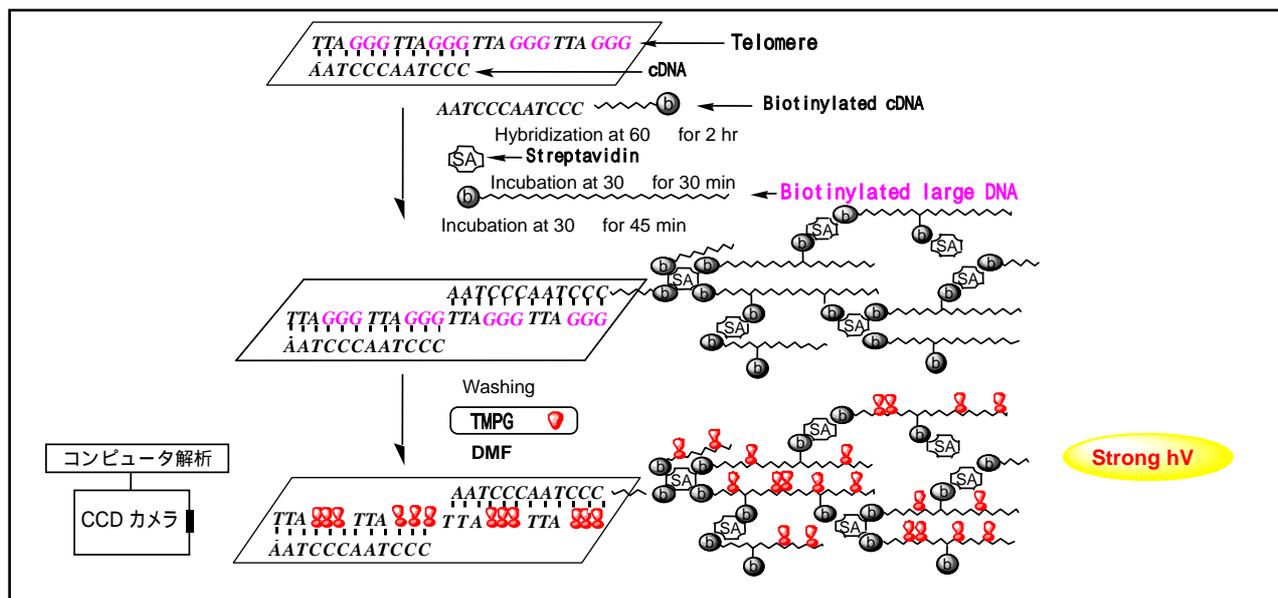


図3 アビジンとビオチン化長鎖DNAを用いたテロメアDNAの連鎖増幅法

特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

デキストランに2000個ほど化学的に結合させたイソルミノールの発光量は、 $10^{-16}$  molレベルのプロープ分子を検出できるものであった。したがって、今後、デキストラン分子に水溶性を保ちつつ、イソルミノールを4000個ほど結合させ、さらに、そのプロープをアビジンを介して $10^3$ 倍ほど多岐的に連結させることによって、核酸のハイブリッドを少なくとも $10^{-20}$  molレベルで検出できるものと考えられる。このことは、一細胞内のmRNAをPCRによってコピーすることなく、直接検出する研究目標の達成が期待される。

このような化学発光性高分子プロープを用いる核酸の超高感度検出法は国内及び国外において初めてのものであり、しかも検出に必要な時間は数分間で終了する迅速な検出技法が開発できるものと考えられる。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

#### 学術論文

1. C. Lau, J. Lu, T. Yamaguchi and M. Kai; Controlled kinetics of non-enzymatic chemiluminescence reactions for simple imaging of DNA and protein; *Anal. Bioanal. Chem.*, **374**, 1064-1068 (2002).
2. C. Lau, J. Lu, S. Yagisawa, K. Ohta and M. Kai; Simple chemiluminescence method for the determination of mercaptopurine; *Anal. Sci.*, **18**, 1043-1045 (2002).
3. D. -Q. Yuan, J. Lu, M. Astumi, A. Izuka, M. Kai and K. Fujita; The first successful investigation into a cyclodextrin-based enzyme model as an efficient catalyst for luminol chemiluminescent reaction; *Chem. Commun.*, 730-731 (2002).
4. J. Lu, C. Lau, M. K. Lee, and M. Kai; Simple and convenient chemiluminescence method for the determination of melatonin; *Anal. Chim. Acta*, **455**, 193-198 (2002).
5. J. Lu and M. Kai; Chemiluminescence at the Turn of the Millennium; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, No 5, 865-866 (2002).
6. M. Kai, H. Kinoshita, K. Ohta, S. Hara, M K. Lee and J. Lu; Sensitive determination of a  $\beta$ -lactam antibiotic, cefaclor by liquid chromatography with chemiluminescence detection; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1765-1771 (2003).
7. M. Kai, H. Kinoshita and M. Morizono; Chromatographic determinations of a  $\beta$ -lactam antibiotic, cefaclor by means of fluorescence, chemiluminescence and mass spectrometry; *Talanta*, **60**, 325-334 (2003).
8. J. Lu, C. Lau and M. Kai; Magnetic bead-based label-free chemiluminescence detection of telomeres; *Chem. Commun.*, 2888-2889 (2003).
9. J. Lu, C. Lau, S. Yagisawa, K. Ohta, M. Kai; A simple and sensitive chemiluminescence method for the determination of tiopronin for a pharmaceutical formulation; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33**, 1033-1038 (2003).
10. C. Lau, J. Lu, M. Kai; Chemiluminescence determination of tetracycline based on radical production in a basic acetonitrile-hydrogen peroxide reaction; *Anal. Chim. Acta*, **503** (2004) 235-239.
11. Kabashima T., Kawaguchi T., Wadzinski B.E., Uyeda K; Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated proteinphosphatase in rat liver; *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **100**(9), 5107-5112 (2003).

#### 外国発表 (国内発表は省略)

1. Kai Masaaki, Hirayama Fumiko, Ohta Kazuko, Kabashima Tsutomu, Lee MyungKoo; Chemiluminogenic imaging for highly sensitive detection of DNA; *The 51<sup>st</sup> Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea*, Abstract p407, Korea (October 2002) .
2. Masaaki Kai, Junko Hayashi, Kazuko Ohta; Chemiluminogenic imaging of DNA by hybridization assay; *III International Symposium of Dresden Chemiluminescence Days*, Abstract p564, Germany (May 2003) .