

論文内容の要旨

TMPG 化学発光試薬を用いた DNA 関連タンパク質の 新規測定法の開発研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 殿岡 恵子

近年のゲノム研究、及び、それに続くポストゲノム研究において、生体の未知の機能や病態を解明する遺伝子やタンパク質の解析技術が発展してきている。それに伴い、微量の核酸やタンパク質などを化学的な視点で捉え、その体内動態を追跡しうる迅速かつ高感度な検出手法の開発が要求されている。

現在、核酸関連物質の高感度検出に用いられている手段としては、主に、放射能計測あるいはレーザー色素を用いた蛍光分析法がある。しかし、前者は取り扱いが危険で限られた場所でのみ使用できず、廃棄物の処理も厳しく管理しなければならない。また後者では光源由来のバックグラウンド光が障害となり、感度の面で限界がある。最近、高感度な検出手段として、化学発光分析法が注目されている。当研究室では、以前にグアニンと特異的に反応し化学発光する 3,4,5-トリメトキシフェニルグリオキサール (TMPG) 試薬を開発しているが、DNA に対する溶液反応では、37°C、約 20 分間の反応操作を必要とする。本研究では、この TMPG 化学発光反応を再検討し、簡便、短時間、かつより高感度な条件を確立した (Fig. 1)。さらに確立した TMPG 化学発光反応を、配列特異的 DNA 結合性 NF- κ B の検出法へ応用した。続いて TMPG 試薬を用いて、悪性腫瘍、老化などに関与するテロメラーゼ活性の新規化学発光測定法の開発を試みた。

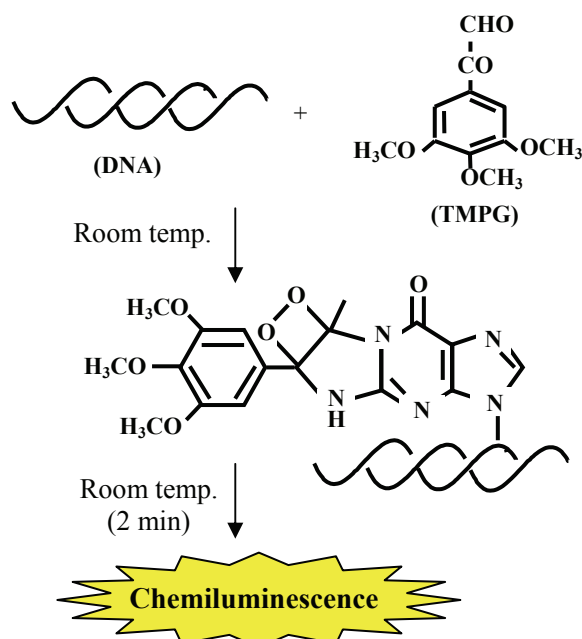


Fig.1 Chemiluminescence reaction of DNA with TMPG

[結果と考察]

1. TMPG 試薬による溶液中 DNA の迅速な化学発光検出反応

TMPG 試薬は、リン酸テトラ-*n*-プロピルアンモニウム (TPA) 存在下 DNA 鎖中のグアニン塩基に対して縮合反応し、DMF 中で化学発光することを見出した。そこで、新たな反応条件の最適化を検討した。その結果、試料 20 μ L、0.1 M TPA (pH 7.0)10 μ L、10 mM TMPG in DMF 200 μ L を、室温で混和し、2 分間発光強度を積算検出する迅速なバッチ操作法を確立した。この化学発光法は、再現性が良好で、かつ高感度 (3.3 nM オリゴヌクレオチドを検出可能) であった。

2. TMPG 化学発光による DNA 結合性 NF- κ B の新規測定法の開発

炎症やストレスシグナルに関与する転写因子である NF- κ B をモデルタンパク質として、TMPG 試薬を用いた配列特異性 DNA 結合性タンパク質の測定法の開発を試みた。この方法は、配列特異的に DNA と結合した NF- κ B の複合体を遠心限外ろ過膜により分離し、結合した DNA を TMPG 試薬で化学発光検出する方法である (Fig. 2)。この測定法では NF- κ B と DNA 複合体からの DNA の分離は、0.1 % SDS により効果的に行うことができ、化学発光強度と NF- κ B 濃度間で直線性を示し、NF- κ B の検出限界は約 5 nM であった。実際に、HeLa 細胞中の DNA 結合性 NF- κ B の測定を行い、本法が生体サンプルに対しても適用可能であることを示した。また本法は、操作も簡便で、1 時間以内で測定を行うことができ、ゲルシフトアッセイ法や ELISA 法などの従来法で必要とされる標識プローブ又は特異的な抗体などを必要としない利点を有し、他の DNA 結合性タンパク質の検出にも有用であると考えられる。

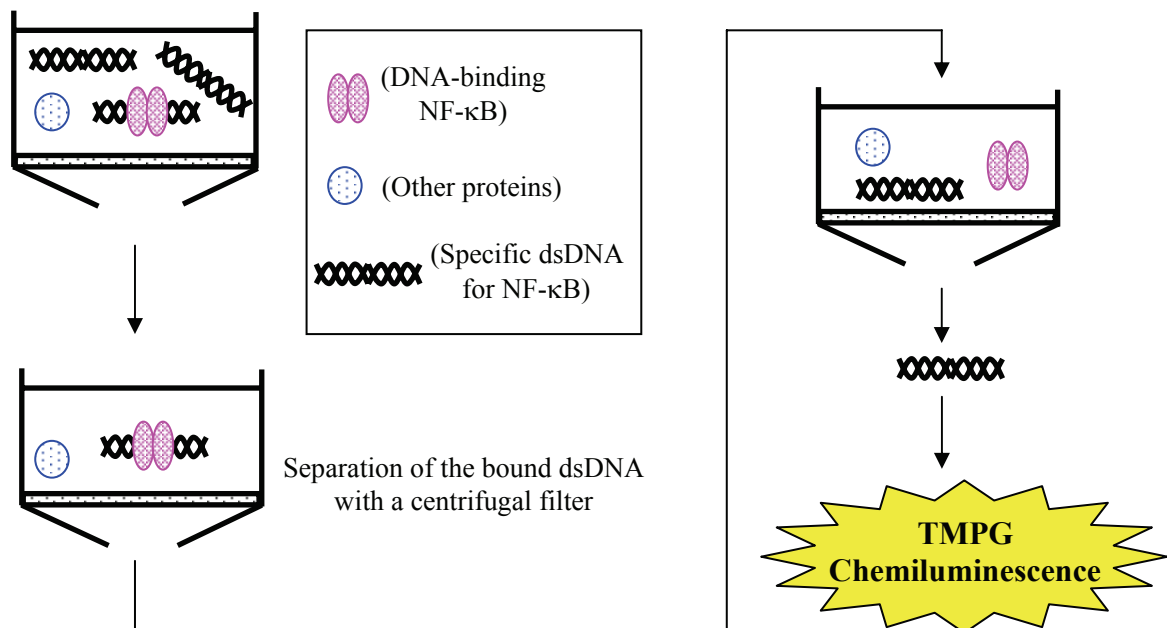


Fig. 2 Schematic protocol for the assay of DNA-binding NF- κ B by means of chemiluminescence reaction with TMPG.

3. TMPG 化学発光によるテロメラーゼ活性の新規測定法の開発

TMPG 化学発光反応と PCR を組み合わせた新規テロメラーゼ活性測定法を開発した(Fig. 3)。PCR 反応中のプライマーダイマーの形成を防ぐために、本測定法では部分的にミスマッチを含むプライマーを使用した。また、テロメラーゼ活性測定の方法を検討することで、最終的に得られる PCR 生成物を TMPG 化学発光反応により高感度に検出することが可能となった。本測定法は、不死化培養細胞 (HeLa 及び HepG2 細胞) や正常細胞中の高い活性を示すものから極めて低い活性を示すものまで広範囲のテロメラーゼ活性を測定することができた。既報の FRET 蛍光法や電気泳動法は、本測定法と比較して感度及び定量性も劣っており、PCR においても蛍光標識したプライマーを必要としている。これに対して、TMPG 試薬を用いる本測定法は、各種のプライマーを使用することができるので、プライマーの設計も容易であり、かつ化学発光反応も室温で短時間に進行するので迅速で簡便であった。

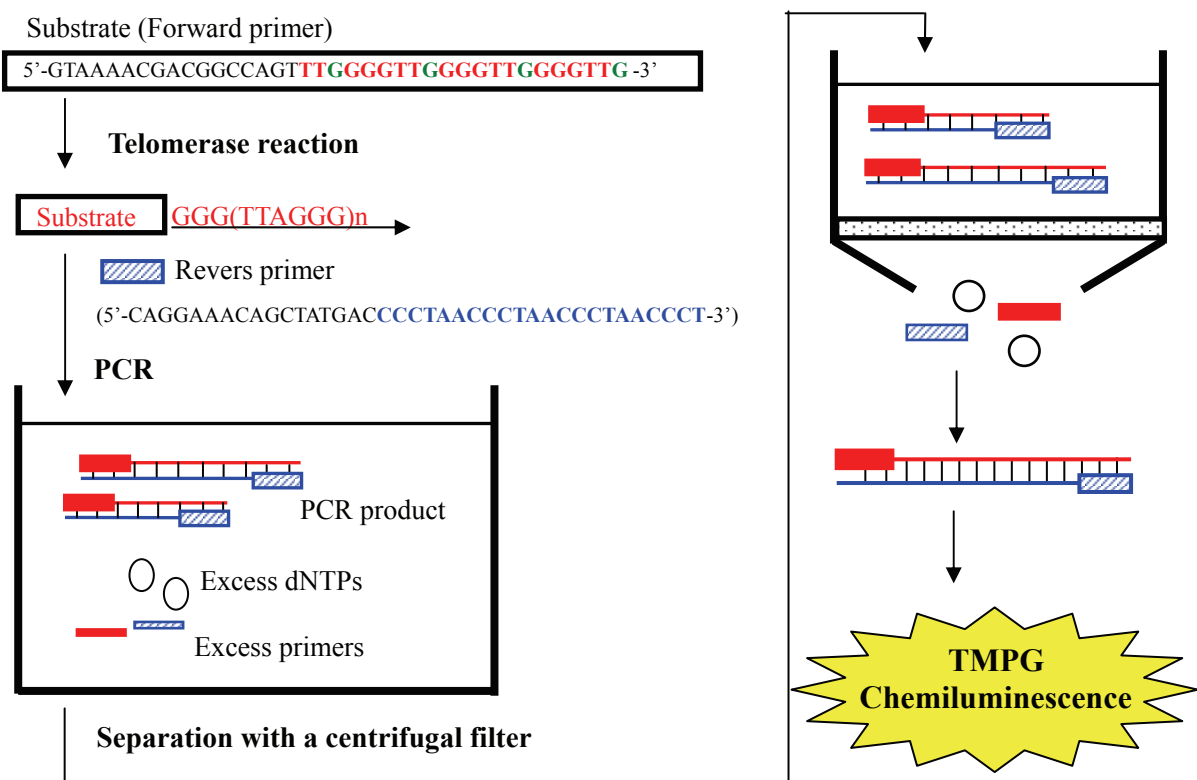


Fig. 3 Schematic protocol for the assay of telomerase activity by means of chemiluminescence reaction with TMPG.

以上、TMPG 化学発光反応を利用することによって、DNA 結合性 NF- κ B 及びテロメラーゼ活性の高感度、簡便かつ迅速な新規測定法をそれぞれ開発することができた。これらの測定法は、実試料に適用できるので、今後疾病の臨床化学的、生化学的研究手段の一助と成り得るものと期待される。

文献 K. Tonooka, et al. : *Anal. Biochem.*, **364**, 30-36 (2007).