

Dextran-Based Polymeric Chemiluminescent Compounds for the Sensitive Optical Imaging of Proteins on a Solid-Phase Membrane

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻

張 寰

[目的]

化学発光法は、高い感度、高い選択性、簡便な操作、さらに放射性同位体を必要としないことなどから、非常に有用な検出技術であると考えられており、既に医療検査において、生体物質の定量や分析対象の局在を調べるための必要不可欠なツールとなっている。膜上での化学発光イメージングの場合、従来法として、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)やアルカリ性フォスファターゼなどの酵素が一般的に用いられている。しかし、これら酵素を用いた化学発光法には、酵素が室温で不安定なために再現性が得にくいことや、膜・試料への非特異的吸着による高いバックグラウンドシグナルなどの問題点が存在する。そのため、化学発光法の臨床検査、特に血漿の分析への応用が制限されている。本研究では、核酸・タンパク質のマイクロアレイへの適用を目的として、非酵素的な化学発光検出を実現できる、ポリマー性の新規化学発光性プローブの創製および膜上でのタンパク質イメージング法の開発を行った。

[結果]

デキストラン（平均分子量 200 万あるいは 50 万）を基本骨格とし、化学発光物質（イソルミノールあるいはルミノール）およびビオチンを導入した、4 種類の高分子化学発光性プローブを合成した。プローブの純度は、ゲルろ過液体クロマトグラフィー(GFLC)によって確認し、それぞれ 99%以上の純度であることが分かった。また、元素分析によってプローブの構造決定および分子量決定を行い、これらの分子式はそれぞれ $(IL)_{3260}-(Biotin)_{270}-(Glc)_{12300}$ 、 $(IL)_{320}-(Biotin)_{15}-(Glc)_{3100}$ 、 $(Lu)_{2620}-(Biotin)_{380}-(Glc)_{12300}$ 、 $(Lu)_{560}-(Biotin)_{34}-(Glc)_{3100}$ であった(Table 1)。

Table 1. Elemental Analysis of Dextran-based isoluminol / luminol-Biotin probes

	Original Data				Calculated Composition	
	C%	H%	N%	S%	Composition of probe	MW($\times 10^5$ Da)
Isoluminol-Biotin-Dextran T2000	43.7	5.7	6.0	0.31	$(IL)_{3260}-(Biotin)_{270}-(Glc)_{12300}$	28
Isoluminol-Biotin-Dextran T500	42.0	5.8	2.8	0.08	$(IL)_{320}-(Biotin)_{15}-(Glc)_{3100}$	5.9
Luminol-Biotin-Dextran T2000	44.4	5.8	5.5	0.46	$(Lu)_{2620}-(Biotin)_{380}-(Glc)_{12300}$	27
Luminol-Biotin-Dextran T500	43.6	5.8	4.4	0.17	$(Lu)_{560}-(Biotin)_{34}-(Glc)_{3100}$	6.3

IL=Isoluminol; Lu=Luminol; Glc= Glucose; MW= molecular weight of Dextran-based CL probe

合成したこれらのプローブは、アビジンに対する強い結合力を有しており、プローブとアビジンを 1:1(w/w)で混合することによって、アビジンを介してプローブ中のビ

オチンが次々と分子間で連結した、プローブの高分子複合体が形成された。このプローブ連鎖複合体を、膜に固定化した CYP3A4 タンパク質の検出に用いたところ、抗 CYP3A4 抗体とビオチン化抗 IgG 抗体を介して、CYP3A4 を選択的かつ高感度に検出できた(Figure 1)。その検出限界は 190 fmol であった。この検出を、酵素(HRP)で標識されたアビジンを用いて同様に行ったところ、デキストランプローブのバックグラウンドシグナルは、HRP-アビジンに比べて低いことが示された。これは、デキストランプローブがタン

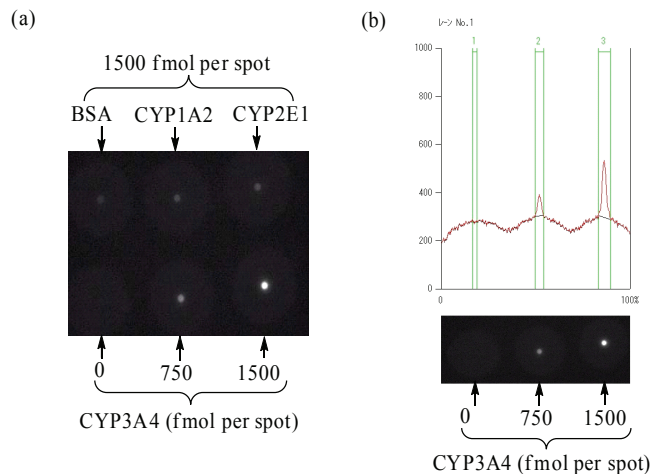


Figure 1. CL image of CYP3A4 spotted on a PVDF membrane detected by a polymeric dextran-based CL probe

パク質プローブより親水性であるため、疎水性膜である PVDF 膜に吸着されにくいことに起因すると考えられる。また、デキストランプローブのサンドイッチ法への応用を行った。まず、ビオチン化試薬である 6-hydrazidoethyl D-biotinamide を用いて、抗 CYP3A4 ポリクローナル抗体(pAb)の標識化を行い、CYP3A4 への親和性を保持したまま抗 CYP3A4 pAb をビオチン化できた。このビオチン化抗 CYP3A4 pAb、抗 CYP3A4 モノクローナル抗体(mAb)およびデキストランプローブを用いて、CYP3A4 溶液のサンドイッチ法による検出を行ったところ、2 pmol/mL という低濃度の CYP3A4 の高感度検出に成功した。

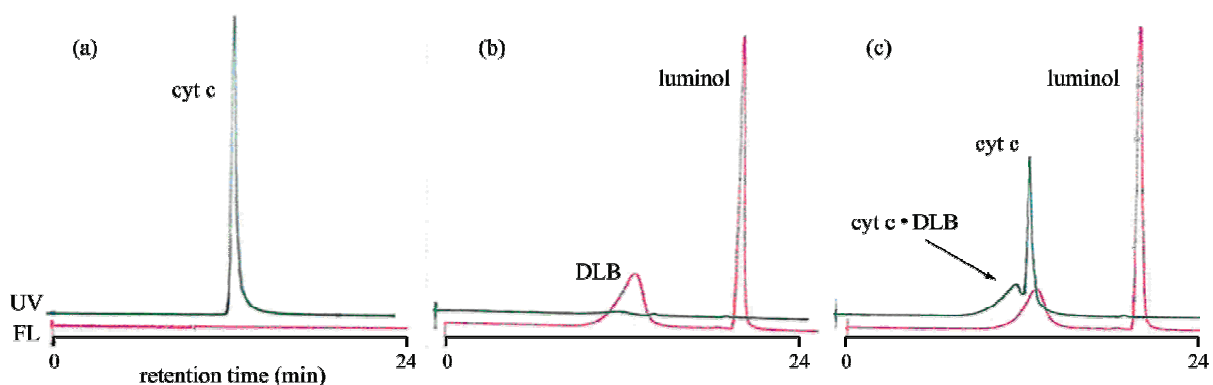


Figure 2. GFLC identification of the interaction between the DLB probe and cytochrome c

次に、上述のルミノールとビオチンを導入したデキストランプローブ(DLB プローブ)を用いて、網羅的タンパク質検出への応用を検討した。検査対象として、チトクローム類、腫瘍マーカー、炭水化物結合タンパク質、ホルモン、血漿タンパクや酵素など、50 種類のタンパク質を PVDF 膜に固定化して検出を行った。その結果、DLB プローブはブロッキングの非存在下、CYP1A2 と直接結合し、強く発光することが分かった。FGF5 と CYP2E1 は、評価したタンパク質の中で比較的強い結合を示した。Prolactin, bNFG, lysozyme, CYP3A4, cytochrome c, concanavalin A, serum amyloid A, hemoglobin は、弱いながらも DLB プローブと結合したが、その他のタンパク質は DLB プローブと結合しなかった。この DLB プローブのタンパク質への相互作用を調べるために、cytochrome c を用いて GFLC によって評価した。

cytochrome c は、UV 検出において保持時間が 15 分の場所に単一のピークを示し、蛍光検出ではピークは観測されなかった(Figure 2a)。DLB プローブ溶液は、13.5 分と 20.5 分において、それぞれ DLB プローブと遊離ルミノールに相当する 2 本の蛍光ピークを示したが、UV ではピークは見られなかった (Figure 2b)。一方、DLB プローブを cytochrome c と混合すると、12.5 分において、新しいピークが UV・蛍光共に現れた。この結果より、DLB プローブは種々のタンパク質と直接結合する能力を持つことが示された。

DLB プローブによるタンパク質結合の効率を評価するために、異なる量のタンパク質を PVDF 膜上に固定化し、DLB プローブを用いて化学発光検出を行った。その結果、膜上タンパク質の量の増加に伴って得られる化学発光は強くなった(Figure 3)。この実験で得られた検量線を解析したところ、タンパク質の量は、化学発光量の対数と比例関係になることが分かった。

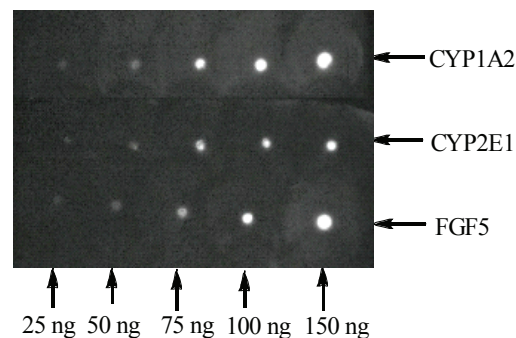


Figure 3. CL imaging of proteins with different amounts (25-150 ng) on a PVDF membrane

[考察]

本研究では、デキストランを基本骨格に持ち、化学発光物質としてルミノールまたはイソルミノールを、リンカーとしてビオチンをそれぞれ導入した、非酵素的な高分子化学発光プローブを開発し、その簡便な合成法を確立した。これらのプローブは、ルミノールを導入したプローブで 1 fmol、イソルミノールを導入したプローブで 10 fmol、それぞれナイロン膜上で可視化できる感度を示した。そこで、このプローブを、超高感度な新規光学イメージング法の開発を指向して、PVDF 膜上の CYP タンパク質の検出に応用した。その結果、抗 CYP3A4 抗体とビオチン化抗 IgG 抗体を介して、190 fmol の膜上 CYP3A4 までデキストランプローブで特異的に検出できた。さらに、抗 CYP3A4 mAb とビオチン化抗 CYP3A4 pAb を用いたサンドイッチ法においても、2 pmol/mL もの低濃度の CYP3A4 を検出することに成功した。次に、タンパク質の網羅的検出技術への展開を目指し、ルミノールとビオチンを含有するデキストランプローブ(DLB プローブ)によるタンパク質の直接検出を行った。50 種類のタンパク質を選択して PVDF 膜上での検出を試み、そのうち 9 種類のタンパク質が DLB プローブと強く結合することを明らかにした。種々の検討の結果、タンパク質中にデキストランプローブが結合できる特殊な領域が存在する可能性が示唆された。本研究で開発した、デキストランを基本とする非酵素的な新規高分子プローブは、タンパク質・核酸やその他の生物学的サンプルを膜上で定量・定性的に解析できる、強力なツールに成り得るものと期待できる。

[基礎となった学術論文]

1. [Zhang H.](#), Smanmoo C., Kabashima T., Lu J., Kai M.: Dextran-based polymeric chemiluminescent compounds for the sensitive optical imaging of a cytochrome p450 protein on a solid-phase membrane. *Angew. Chem. Int. Edit*, 46, 8226-8229 (2007)
2. [Zhang H.](#), Shibata T., Krawczyk T., Kabashima T., Lu J., Kai M.: Evaluation of Dextran-Based Luminol-Biotin Chemiluminescent Probe for the Direct Detection of Proteins on a PVDF Membrane. *Proteomics* (in preparation)

