

特集 バイオマーカー探索を指向した先端的薬学研究 —その1—

バイオマーカーの高感度分析法の開発

昭和大学薬学部物性解析薬学講座臨床分析化学部門

荒川 秀俊 佐野 佳弘 唐沢 浩二

バイオマーカーの高感度分析法の開発

疾病の診断や効率的な治療法の確立には、適切なバイオマーカーの選択とその高感度かつ特異的分析法の実現が必要である。本研究は、難治疾患である精神障害の自閉症、悪性腫瘍、免疫疾患であるアレルギーを取り上げ、そのバイオマーカーとしてオキシトシン (Oxytocin)、一酸化窒素 (NO)、テロメラーゼ (Telomerase)、硫化水素 (H_2S) を選択し、医療分野での利用を目的とするこれら新規分析法の確立について、検出に化学発光、生物発光、蛍光法からなる高感度分析法の開発を行った。

1. 腫瘍マーカー・テロメラーゼの高感度分析法

ヒトをはじめとする真核生物には、細胞の染色体の末端にテロメアと呼ばれる DNA 反復配列が存在する¹⁾。その配列は TTAGGG の 6 ヌクレオチドを単位とし、平均長は約 7 キロ～ 10 キロ塩基に達する。通常の体細胞では、その分裂に従いテロメアの長さは次第に減少し細胞死につながるが、がん細胞ではテロメラーゼ (Telomerase) と呼ばれる酵素によりテロメアが伸長され、細胞は不死化する。この酵素はリボヌクレオチドタンパク質からなり、構成成分である RNA を鋳型として反復配列を染色体両端に付加する作用がある²⁾。Telomerase は、きわめて多くのがん細胞でその活性が明らかになっており、早期がんから進行がんへと活性は徐々に上昇していくことが明らかになっている。ヒトがん細胞の Telomerase 活性の調査では、膵臓がんや子宮がん、神経芽細胞種では 90% 以上が、小細胞肺がんや肉腫では 100% の細胞で Telomerase 活性が陽性であると報告されている³⁾。このことから、各種がんの早期診断、モニタリング、治療効果予測に貢献

する新しい腫瘍マーカーとして、Telomerase の臨床応用は非常に重要視されている。現在、その活性測定法として、TRAP 法 (telomeric repeat amplification protocol) およびその変法が一般的に用いられているが³⁻⁵⁾、アクリルアミドゲル電気泳動などを用いるため簡便さや迅速さにおいて問題がある。

本研究では、腫瘍マーカーとしての迅速かつ高感度な 2 種類の新規 Telomerase 分析法を開発し (Fig. 1)、さらに、その方法を用いてのがん診断補助ならびに創薬的制癌剤スクリーニング法への適用を目的として、生物発光法ならびにマイクロチップ電気泳動による方法の開発を行った。

1) 原理

(1) 生物発光法

ルシフェラーゼ (Luciferase) の発光機構は、ATP、 Mg^{2+} 及び分子状酸素存在下、ルシフェリン (Luciferin) が Luciferase により酸化され、生じたオキシルシフェリン (Oxyluciferin) が励起状態を生成し、基底状態に戻る際に発光することに基づく⁶⁾とされる。今回、われわれは Pyruvate phosphate dikinase (PPDK) を用いて Telomerase 由来のピロリン酸 (PPi) を測定する新たな分析法を開発した。PPDK は分子量 230,000 であり、pH、熱安定性及び化学的修飾にも安定な酵素である。すでにわれわれは、PPDK を用いた齧蝕細菌遺伝子検出法やがん遺伝子の SNPs 解析法の実現等を報告してきた^{6,7)}。今回、細胞由来の Telomerase 活性を迅速かつ高感度に検出するために、Fig. 1 (右側の検出系) に示すように、テロメア修復反応と PCR で生じる PPi を PPDK により ATP に変換し Luciferin-Luciferase 反応により生物発光検出する新たな分析法 (PPDK-Luciferin-Luciferase system bioluminescence assay : PLLBA) を開発した。

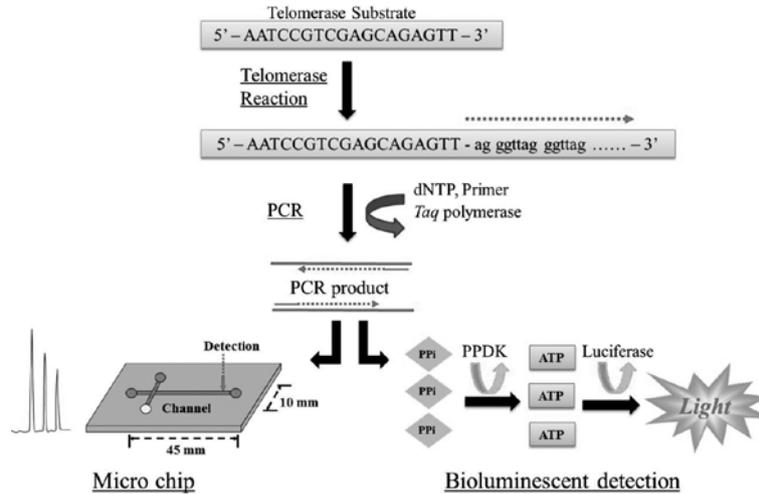


Fig. 1 Detection of telomerase activity using microchip electrophoresis or bioluminescence

(2) マイクロチップ電気泳動法

Telomerase 活性を検出するための装置は、共焦点検出方法を用いる蛍光検出器を装着した日立 SV1100 形マイクロチップ電気泳動装置コスモアイ[®]を用いた⁸⁾。ゲルは Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC: MW 4,000, SIGMA 製) と Polyethylene oxide (PEO: MW 8,000,000, Aldrich 製) の新規混合ゲルを i-chip (plastic: 8.5 cm × 5 cm, Channel: 100 μm × 30 μm) に注入した。Fig. 1(左側の検出系)のように、Telomerase 活性により伸長した Telomere repeat を Titanium *Taq* DNA polymerase により PCR 増幅し、蛍光色素として高感度な SYBR Gold を用いて、マイクロチップ電気泳動により Telomerase-PCR 生成物を解析した。

2) 方法

TRAP 法に準じた Telomerase Substrate とテロメリックリピート (GGTTAG) に特異的な primer を設計し、PCR product を 38 bp, 44 bp, 50 bp, 56 bp と GGTTAG が 6 bp ずつ増加するように設計した。Forward primer (sense) は 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3' とし、Reverse primer (antisense) は、5'-CTAACCCCTAACCCCTAACCC-3' とした。Telomerase 反応は、10 × TRAP reaction buffer 5 μl, 20 pmol/μl Telomerase Substrate 1 μl, 2.5 mmol/l dNTP Mixture (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 1 μl, sample 2 μl, PCR grade water 適量を混合し、30°C で 30 分反応させた。Sample として、telomerase posit-

ive cell (250 cells/μl) を 2 μl 用いた。対照として、telomerase inactive cell (ポジティブセルを 85°C 10 分加熱処理), telomerase negative cell (only CHAPS Lysis buffer) をそれぞれ 2 μl 用いた。PCR は、上記溶液に 20 pmol/μl reverse primer 1 μl, Titanium *Taq* DNA polymerase (クロンテック: Clontech Laboratories) 2U を加え、94°C 30 秒, 59°C 30 秒, 72°C 1 分を 33 サイクルで、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[®] (タカラバイオ: TAKARA BIO INC.) を用いて行った。

生物発光検出法では、得られた telomerase-PCR 産物 10 μl に phosphoenol pyruvate (PEP), PPK (pyruvate phosphate dikinase), Luciferin, Luciferase 等からなる発光試薬 100 μl を加え、生じる発光を LUMINESCENCE READER (Aloka) にて測定した。

マイクロチップ電気泳動法では、生成した Telomerase-PCR 産物をチップ上で電気泳動し、インターカレーション試薬 (SYBR Gold) を用いて蛍光検出した。

Telomerase 分析では、最初に、Telomerase により伸長したテロメアリピート (TTAGGG) に特異的なプライマーを設計し、次に数種類の *Taq* DNA polymerase を検討した。その結果、増幅効率のよい Titanium *Taq* DNA polymerase を選択することで最適な PCR が構築できた。

生物発光検出法では、Telomerase 反応時と PCR

時に生成する PPI を ATP に変換後, Luciferin-Luciferase 反応により発光検出する方法であるが, 対象となる PPI はフェムトモル (10^{-15} mol) まで検出が可能であった (Fig. 2).

得られた Telomerase-PCR 産物から生成する PPI を生物発光検出した結果, Telomerase positive cell, inactive cell, negative cell を明瞭に判定することができた (Fig. 3).

次に, マイクロチップ電気泳動による検出を検討した. Telomerase-PCR 産物を迅速かつ高感度に分離検出するために, マイクロチップに注入するゲルとインターカレーション試薬の検討を行った. その結果, 0.8% HPMC および 0.3% PEO の混合ゲルと蛍光色素 SYBR Gold の条件により, Telomerase により伸長した 6 bp の違いを明瞭かつ高感度に分離検出することができた.

これらの方法により, 生物発光検出法およびマイクロチップ電気泳動法による検出限界を検討した. その結果, 両検出法とものがん細胞 1 個が検出可能になった. Fig. 4 にマイクロチップ電気泳動による検出限界の検討結果を示す. また, 両検出法によるヒトがん由来細胞中の Telomerase 活性検出を検討した. ヒト繊維肉腫細胞株 (HT1080) とヒト膀胱がん細胞株 (MIAcapa2) 用いて行った結果, 細胞中に含まれる Telomerase 活性は両検出法で検出が可能であった^{9,10}. Fig. 5 に生物発光法による検出結果を示す.

本研究では, Telomerase 活性を検出するために 2 種類の方法を開発した. 生物発光法は, 測定が迅速であり検出器も小型であるため, 手術室での簡易病理検査や診察室などでのオンサイト診断法としても利用可能である. 検出時間は約 10 秒であり, 既存の TRAP 法 (ゲル調製を含めて数十分~数時間) よりも大幅に短縮されている. また, 試料も数 μ l で分析可能である. ただし, PPI をターゲットとしているために副産物による偽陽性を起こしうることや, どの臓器由来の Telomerase 活性かを判定するのは困難であるという欠点もある. 一方のマイクロチップ電気泳動法は, 高感度で詳細なピーク解析が可能であるため臨床検査室などでの詳細検査が可能である. 例えば臓器特異的なマーカーを Telomerase 活性と同時検出することで, どのがん細胞由来の Telomerase 活性かを判断するといった臓器別の

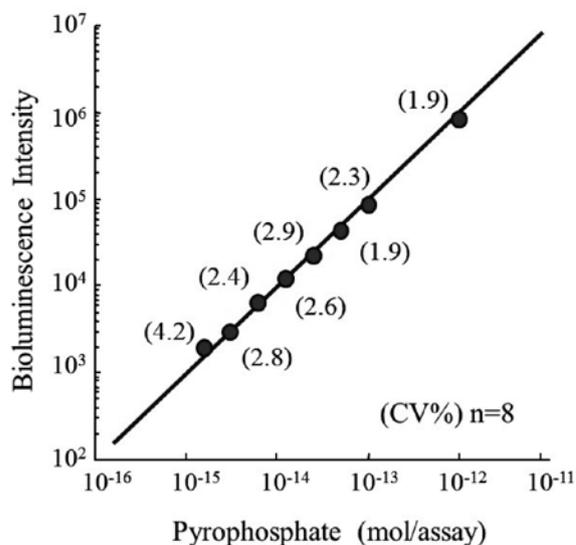


Fig. 2 Calibration curve of pyrophosphate

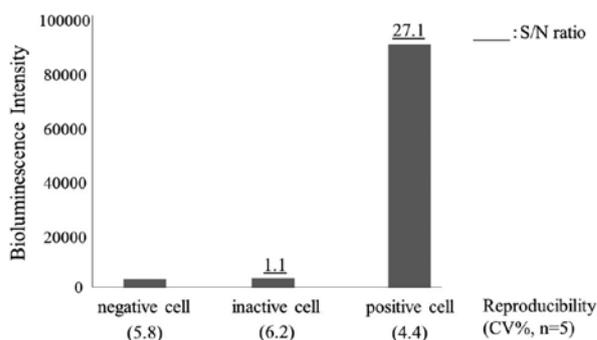


Fig. 3 Bioluminescent assay of telomerase-PCR product

がん診断への応用も可能になると考えられる. 2つの方法の利点に合わせて, 臨床条件に合った検出法を使用することが望ましい. また, 現在はさらに迅速かつ高感度な検出のためにイムノアッセイを用いた Telomerase 活性検出法や PCR-free の検出法を検討中である. 今後はこれらの研究が, がんの臨床化学ならびに再生医療などの基礎研究においても有用な分析法として利用されることが望まれる.

2. オキシトシンの高感度測定法の開発

自閉症スペクトラム (Autistic spectrum disorder : ASD) は「コミュニケーションの質的障害」「行動, 興味, 活動の限局された反復的, 常同的な様式」という特徴を有し¹¹, 100 人に 1 人の罹患率であると

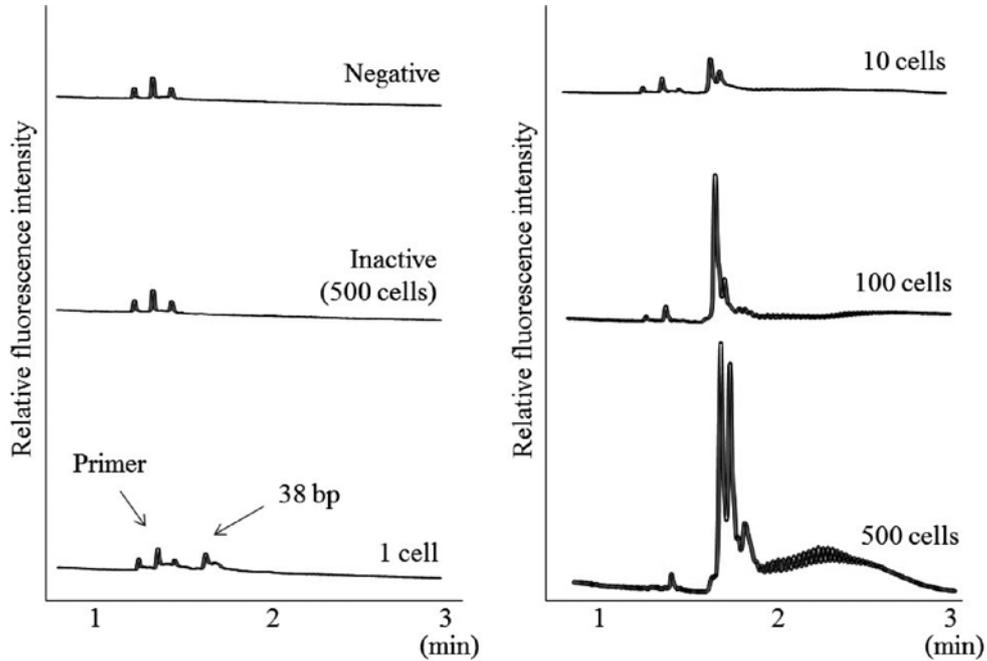


Fig. 4 Detection limit of telomerase-positive cells on microchip electrophoresis

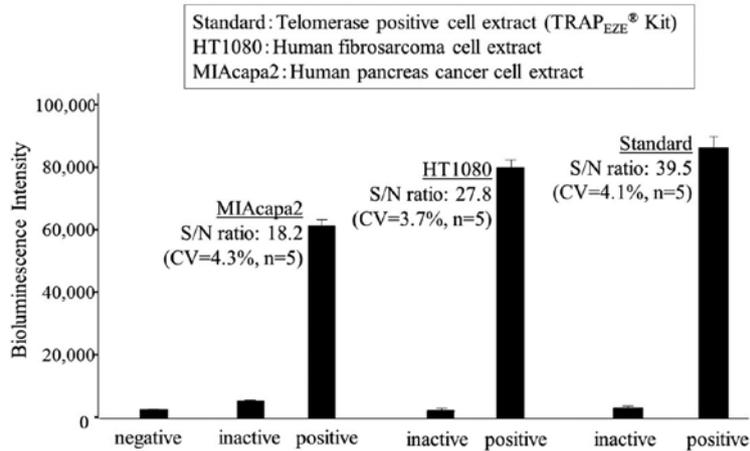


Fig. 5 Telomerase activity of human cancer cell lines using bioluminescence

報告されている¹²⁾。現在、診断は世界的な診断基準である DSM-V により行われているが、ASD の症状に個人差があることや統合失調症などと特徴が重なることから適切な診断を集団検診（マスキング）に適応することが困難な状況にある¹¹⁾。そのため、診断が遅れ、治療がなされないまま成人した ASD 患者がうつ病や不安障害などの二次障害を引き起こすケースも存在する¹¹⁾。これらのことか

ら、精神科専門医でなくても簡便に診断できる基準、たとえば、臨床検査値のような客観的データに基づく診断基準が望まれている。

近年、ASD とペプチドホルモンであるオキシトシン (Oxytocin) との関連性が注目されており、ASD の病態と血中 Oxytocin 量の相関性を明らかにすることが ASD 診断の発展や ASD 高リスク群の早期発見・治療に貢献できるひとつの手段であるとも考

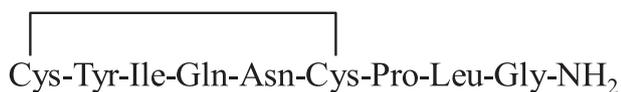


Fig. 6 Oxytocin

えられている。Oxytocin は視床下部で合成され、脳下垂体後葉より分泌されるペプチドホルモンである。その構造は9アミノ酸により構成され、分子量は1,007である (Fig. 6)。また構造類似物質であるバソプレシン ([Arg⁸]-Vasopressin : AVP) などが存在することが知られている。

現在、臨床検査値の測定やマスキングでは抗原抗体反応を利用した酵素免疫測定法 (Enzyme immunoassay : EIA) が汎用されている。EIA は標的分子を高感度に測定することが可能であり、また標識する酵素により様々な検出法に対応することも可能である。そこで、ASD 関連分子である Oxytocin の高感度測定を目指した EIA の確立を生物発光法を用いて検討した。

1) 方法

(1) Oxytocin の生物発光 EIA (Bioluminescent enzyme immunoassay : BLEIA)

ガラスチューブに二次抗体固相化磁気ビーズ 20 μ l を添加し、洗浄を行った。その後 Oxytocin 標準液 100 μ l、抗 Oxytocin 抗体希釈液 50 μ l を添加した。4°C で一晩インキュベート後、ビオチン標識 Oxytocin 50 μ l を添加し、室温で 30 分間インキュベートさせた。洗浄後、ストレプトアビジン-ビオチン標識 Luciferase 複合体 200 μ l を添加し、室温で 30 分間インキュベートさせた後洗浄した。反応用 buffer 100 μ l を添加後、Luciferase 基質溶液 100 μ l を添加し、発光測定機 SEH (株式会社柴崎製作所) により発光強度の測定を行った。

本研究では、最初に標識酵素である Luciferase の検出感度の検討を行った。標識酵素の感度比較では、一般に比色法や蛍光法、化学発光法では、それぞれ 10^{-17} mol、 10^{-18} mol、 10^{-19} mol 程度の検出が可能である¹³⁾。これに対し、生物発光法では、より高感度検出が期待できる¹³⁾。そこで本測定法では、高感度な生物発光法として Luciferase を適用し生物発光 EIA (Bioluminescent enzyme immunoassay : BLEIA) を検討した。

筆者らは、Luciferase 生物発光のさらなる高感度

化のために Table 1 に示す 15 種の化合物を選択し検討を行った。その結果、これら化合物の中で、ピロリン酸カリウム (Pyrophosphate potassium salt : PPIK)、Tripolyphosphate sodium salt : STPP)、コエンザイム A (Coenzyme A : CoA)、イノシン酸三リン酸 (Inosine 5'-triphosphate sodium salt : ITP) がそれぞれ 138%、174%、228%、157% と 100% 以上の測光値増加が認められた。さらに、これら PPIK や STPP、CoA、ITP の至適濃度や発光寿命延長効果、Luciferase 濃度と増感効果の関連性について詳細に検討した結果、PPIK が最適であった。これらより、Luciferase 生物発光測定系に PPIK を増感剤として加えることで発光強度の増強、また発光寿命が延長可能となることで発光測定の積算により、さらに高感度検出が可能になった¹⁴⁾。その増感法を用いてビオチン標識 Luciferase の検量線を作成した結果、検出限界は 1.0×10^{-20} mol/assay (Blank + 3SD) であり、平均 CV 値 (n = 8) 2.8% であった。

次に、Oxytocin 抗体として PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC. 製、標識抗原をビオチン標識 Oxytocin (PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC.)、ストレプトアビジン (MERCK)、ビオチン標識 Luciferase (栄研化学株式会社より恵与) を用いて Oxytocin BLEIA の条件検討を行った。その結果、平均 CV 値 (n = 4) 6.7% と良好な検量線を得た。検量域は 5.0 ~ 100 pg/assay、検出限界は 1.0 pg/assay (B₀-3SD) であった (Fig. 7)。また、特異性は交差反応性の検討により行った。本実験では、Oxytocin 構造類似物質である AVP、[Lys⁸]-バソプレシン (LVP : SIGMA)、[Arg⁸]-バソトシン (VT : SIGMA) においてその交差反応性を検討した。その結果、AVP、LVP、VT、全て 0.01% 以下と、極めて特異性の高い方法であった。

生物発光法は比色法と比べて高感度分析に適している。本研究で使用しているビオチン標識 Luciferase の検出感度は 1.0×10^{-20} mol/assay と優れた検出感度を示し、その感度は HRP 標識アビジンに *o*-Phenylenediamine を用いた比色法と比べ約 2,500 倍高感度であった。また、本イムノアッセイは、交差反応性試験の結果から Oxytocin に特異的な測定法であり、現時点で健常人の Oxytocin 量を測定することは可能であると考えますが、低値を示すことが予想される ASD 患者に適應するためには、さらなる高感度化

Table 1 The screening of sensitizer for bioluminescent assay utilizing luciferase

compound	luminescence intensity
non	100%
Pyrophosphate potassium salt (PPiK)	138%
Tripoly phosphate sodium salt (STPP)	174%
Coenzyme A (CoA)	228%
Inosine 5'-triphosphate sodium salt (ITP)	157%
Inosine	98%
FAD	97%
FMN	98%
NADP ⁺	101%
NADPH	98%
GTP	105%
Glutathion	100%
Sodium Azide	98%
Imidasol	105%
Sodium Sulfite	104%
Luminol	99%

$$\left(\begin{array}{l} 10^{-10} \text{ M Luciferase } 10 \mu\text{l} \\ 100 \text{ mM TrisHCl (pH8.5) } 25 \mu\text{l} \\ 2 \text{ mM Compound } 25 \mu\text{l} \\ 1 \text{ mM Luciferin } 50 \mu\text{l} \end{array} \right)$$

→ delay 5 sec → measure 0.1 sec

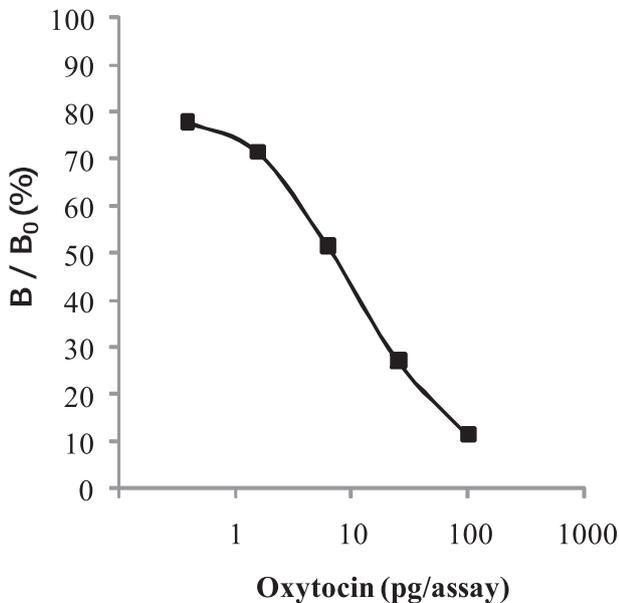


Fig. 7 Standard curve of oxytocin

が必須である。以上のことから、今後は抗Oxytocin抗体の作製や標識抗原誘導体の調製を行い、さらな

る高感度化を検討していく予定である。

3. 蛍光法と生物発光を用いる NO 測定法の開発

1) セサモールによる NO 蛍光測定法の開発

フリーラジカルは、さまざまな疾患に関与しているといわれている。一酸化窒素 (NO) もまた重要なフリーラジカルのひとつで、循環系、免疫系、中枢系の情報伝達物質として機能し、さまざまな疾患に大きく関わっているとされる。しかし、その役割は未だ不明な点も多い。その原因の一つとして、細胞や組織中の NO は、他の分子と容易に反応するため、その寿命は数秒と短く、*in vivo*での NO の検出・定量は極めて困難である。現在、NO 測定法としては、比色法、蛍光法、発光法、電子スピン共鳴 (ESR) 法が知られているが、これらの方法は、特異性に優れているものの、生体内での NO を測定できる方法には至っていない¹⁵⁾。そこで、著者らは新たな NO の蛍光分析法を確立するため、3-(*p*-ヒドロキシフェニル)プロピオン (HPPA) などの *p*-フェノール誘導体に着目し、その誘導体につい

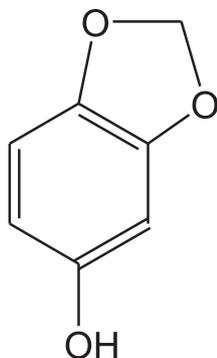


Fig. 8 Sesamol

てスクリーニングを行った。その結果、ゴマの成分であるセサモール (Sesamol) が NO と反応することにより蛍光が生じることを見出し、新たな NO 測定法を開発した。(Fig. 8)

(1) 方法

10 mmol/l セサモール (SIGMA-ALDRICH CO. : 1 mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解) 100 μ l を試験管にとり、これに NO 発生剤 (NOC 7) 25 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 15 分間反応した。反応後、蛍光増強剤として DMSO 1 ml 加え、蛍光分光光度計を用いて、励起波長 365 nm、蛍光波長 447 nm で蛍光強度を測定した。

セサモールを基質とする NO 測定法の原理を Fig. 9 に示す。NO 測定として汎用されている NO 発生剤 (供与剤) である NOC 7 を用いて測定法の検討を行った。反応 pH、塩濃度、セサモール濃度、反応時間を検討した結果、NOC 7 は、 $2.5 \times 10^{-13} \sim 2.5 \times 10^{-9}$ mol/assay 間で測定可能であった。検出限界は 4.0×10^{-13} mol/assay で、この感度は、すでに NO の蛍光分析法として使用されている DAF-2 に匹敵した¹⁶⁾。また、精度 (CV%, n=7) も、平均 2.0% と良好であった (Fig. 10)。

反応機構は、NO とセサモールに反応後高速逆相クロマトグラフィーにより分画し蛍光物質の含まれる画分を濃縮し、四重極マススペクトロメトリーで解析した。さらに、NMR の測定より本蛍光物質は 2 量体を主とする化学構造であることがわかった。以上のことから、本蛍光反応は、Fig. 9 に示すような反応機構によるものと断定した^{17,18)}。以上より、本測定法は、セサモールを利用した簡便な高感度 NO 測定法である。しかし、OH ラジカルに対し

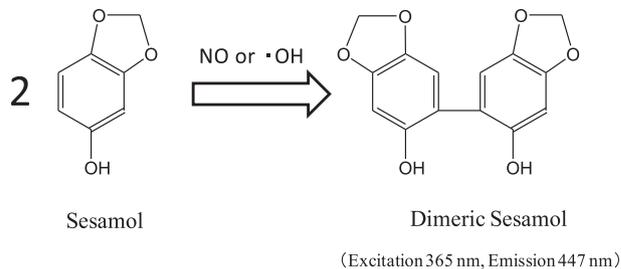


Fig. 9 A possible mechanism of fluorescent reaction for sesamol with NO

ても同様に反応することから、本測定法は医薬品などの NO 生成剤である虚血剤のスクリーニングならびにセサモール服用による生体ストレス測定などの生体分析への適用を考えている。

2) 可溶性グアニル酸シクラーゼによる NO 生物発光測定法

NO 測定法は現在までに様々な測定法が開発されている。その中で蛍光法のジアミノフルオレセイン (DAF) 法や化学発光法のオゾン化学発光法は、検出限界が 5 nmol/l、0.01 ppm と高感度である。しかし、これらの方法はその反応に酸化反応を用いるため特異的方法とは言い難い。

われわれは、近年この問題を解決するために先に述べた NO ラジカルと反応するセサモールを用いた新たな蛍光法を開発した^{17,18)}。この方法は、従来の方法に比べより特異性が向上したものの、OH ラジカルとも反応し、NO に特異的ではなかった。

そこで、より特異的にかつ高感度に NO を測定する目的で生物本来の活性反応を利用した新たな NO 分析法の開発を検討した。その方法の原理を Fig. 11 に示す。

この原理の中心となる酵素は、生体内 NO センサーとして知られている可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) である。生体内では、血管内皮細胞内で NO が可溶性グアニル酸シクラーゼ (soluble guanylate cyclase : sGC) を活性化しセカンドメッセンジャーの cGMP にシグナルを伝達し血管を弛緩させる。この sGC のシグナル伝達システムを基にした測定法、すなわち NO により活性化した sGC の反応により GTP が cGMP に変換される際に放出される PPI を PPK/Luciferase で検出する NO の生物発光法を検討した。さらに、NO の測定法並びに、高感度測定のための新たな sGC の発現についても検

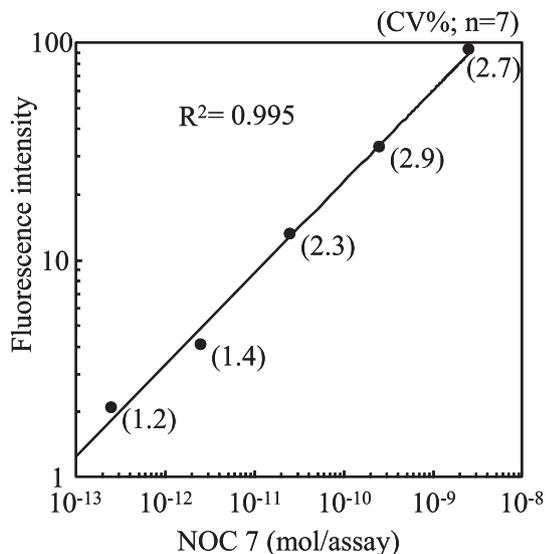


Fig. 10 Standard curve of NOC 7

討を行った。

(1) 方法

10 μg/ml sGC (和光純薬工業株) 1 μl に 10⁻⁵ mol/l GTP (Roche Diagnostics, Inc.) 8 μl と NOC7 (株同仁化学研究所) (10⁻⁷ ~ 10⁻⁵ mol/l) 1 μl を加え 37℃ 10 分間反応する。GTP は 2 mmol/l MgCl₂ を含む Tricine 緩衝液 (pH 7.7) に溶解し調製した。NOC7 は 10 mmol/l NaOH にて調製, 希釈して測定に用いた。反応終了後, 氷浴で数分間の冷却を行い, 反応を停止させた。反応液 10 μl に PDK/Luciferase 試薬 (キッコーマン株より恵与) 10 μl を加え生じる発光を LUMINESCENCE READER (Aloka) で一定時間積算し記録した。

本研究では, 最初に, Fig. 11 の原理に基づき NO の高感度測定のための, 測定法の各条件, 金属イオン種 (Mn²⁺, Mg²⁺) 及び GTP 量, sGC 量, 緩衝液 pH について検討した。その結果, 金属イオンでは, Mg²⁺ を用いた測定法が Mn²⁺ よりも最大発光強度が約 5 倍増加した。GTP 量では 10⁻¹⁴ ~ 10⁻¹⁰ mol/assay の範囲で検討したところ 10⁻¹² mol/assay で最大の発光強度が得られた。一方, sGC 量は 10 ~ 1000 pg/assay の範囲で検討を行ったところ 1000 pg/assay で最大の発光強度となった。pH 検討においては pH 5 ~ pH 11 の範囲で行った結果, pH 8 で最大の発光強度が得られた。以上の最適化条件により NO を測定した結果, NOC7(NO 供与剤)

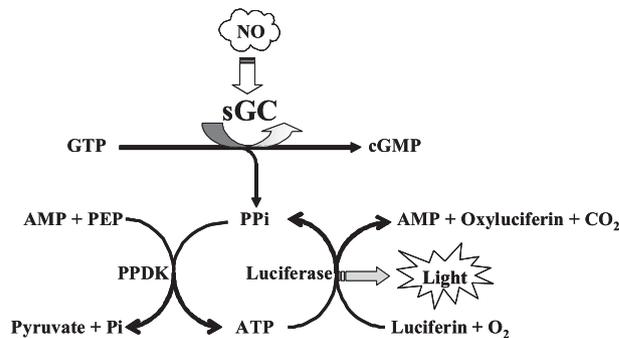


Fig. 11 Principle of the bioluminescent assay for NO utilizing sGC

として 10⁻¹³ ~ 10⁻¹¹ mol/assay の範囲で検量線を作成することができた (Fig. 12)。また, Fig. 13 に示すように他のラジカル種との反応性は NO に比べて低く, NO 特異的測定法であると考えられる。

さらに, 本測定法を硝酸薬から遊離する NO の測定に応用した。硝酸イソソルビドから遊離する NO を測定した結果, Fig. 14 に示すように濃度依存的な測定値が得られた¹⁹⁾。この結果は, 硝酸イソソルビドから直接 NO が放出することを示している。

PPDK/Luciferase 生物発光法は, PPI を 10⁻¹⁵ mol/assay 程度高感度に測定することが可能であるが, 本測定法では NO として 10⁻¹³ mol/assay (100 fmol/assay) であり生物発光の感度に至っていない。その理由は, sGC は本来 NO の非存在下においても可逆的の反応が生じており, よって, 高い background を生じ, これが感度の低下に起因したものと考えられる。そこでわれわれは, NO に特異的な sGC の構築を目的として新たな sGC の作製について検討した。

sGC は 82 kDa の α サブユニットと 70 kDa の β サブユニットからなるヘテロ二量体であり, C 末端のグアニル酸シクラーゼ領域が存在する。また, β サブユニット N 末端の第 105 番目のヒスチジンにプロトポルフィリン IX タイプのヘムが 1 分子結合しており, デオキシヘモグロビンやデオキシミオグロビンと同様の 5 配位ハイスピンヒスチジル複合体として存在し, ヘム結合領域を持つことが明らかになっている。

組換えタンパク質発現のシステムには, 大腸菌発現系, 昆虫細胞発現系, 哺乳動物細胞発現系などがある。哺乳動物細胞発現系による組換えタンパク質

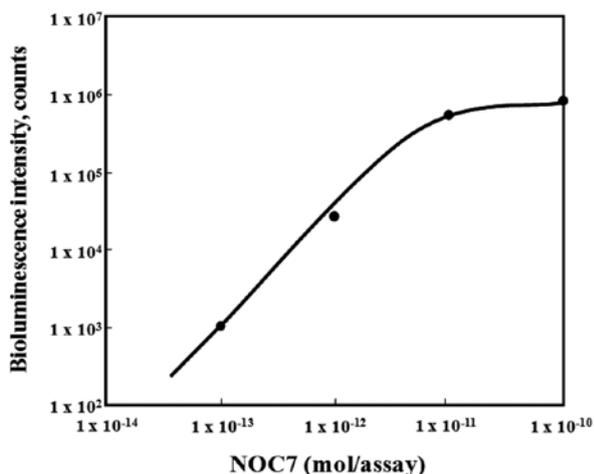


Fig. 12 Standard curve for NOC7

作製では、測定法の開発に十分なタンパク質量を得ることが困難である。大腸菌発現系では、大量にタンパク質を発現できる利点があるが複雑な構造をもつタンパク質の発現は難しい場合がある。一方、昆虫細胞発現系では、タンパク質発現量も多く、立体構造も比較的正確に構築できる可能性がある。そこでsGCはヘテロ二量体といった複雑な立体構造をとるため、大腸菌発現系ばかりではなく昆虫細胞発現系についても研究を行なう必要があると考え、現在、両発現系による発現系の構築、改良型変異体sGC作製について検討を進めている。

4. 新規化学発光法による硫化水素分析法

硫化水素は、長い間、毒ガスとして扱われ、生体にとっては有害な物質とされてきた。しかし、2004年 Kamoun²⁰⁾、2009年 Kimuraら²¹⁾により、生体内のシスタチオンinβ-シクターゼ (CBS)、シスタチオンγ-リアーゼ (CSE)、3-メルカプトピルピン酸サルファトランスフェラーゼ (3MST) により硫化水素が生成されていることが発見され、さらに硫化水素受容体、イオンチャンネル、酸素、転写因子を標的として、神経伝達調節、平滑筋弛緩、細胞保護、インスリン分泌調節など多彩な作用を示し、生体にとって有用な物質であることが明らかになってきた。また、腎透析²²⁾ やがん患者においては、血中の硫化水素濃度が有意に上昇することが報告されている。このことは硫化水素がある種の病態を把握するためのバイオマーカーとして利用でき、臨床で

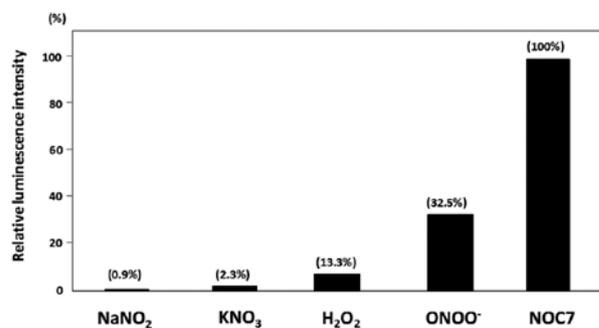


Fig. 13 Specificity of sGC reaction for NO, NO₂⁻, NO₃⁻, H₂O₂ and ONOO⁻ on this bioluminescent assay

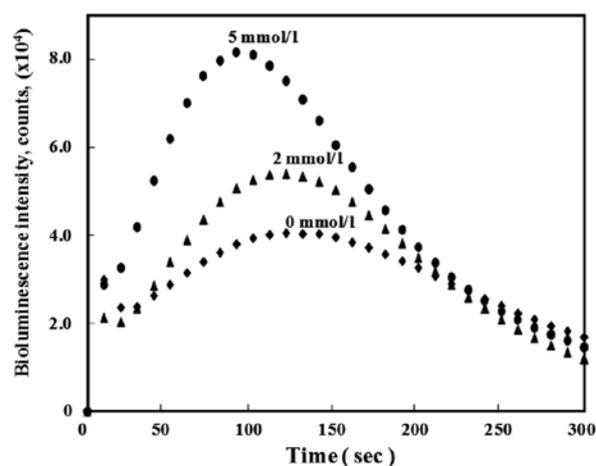


Fig. 14 Measurement of NO release from nitrate medicine on this bioluminescent assay

の検体検査への応用が期待される。現在、硫化水素の測定法としては、メチレンブルーを用いた発色反応²³⁾ (Fig. 15a) やガスクロマトグラフィーなどが古くから用いられているが、前者は感度や特異性、後者は簡便性などに問題がある。最近、硫化水素の動態解明に向けた新たな可視化プローブとして、いくつかの蛍光プローブが開発されている。その中で注目されるのは、Qianらによる求核反応型のSFP-2プローブ²⁴⁾、またSasakuraらによる金属イオン放出型のHSip-1プローブ²⁵⁾などがある。これらは、通常では消光状態であるが、硫化水素が存在することにより発蛍光性物質となる。前者は有機反応であるため、反応時間が約1時間かかるのに対し、後者は銅イオンと硫化水素イオンのイオン反応のため反応は瞬時に進行する。そのため、細胞など

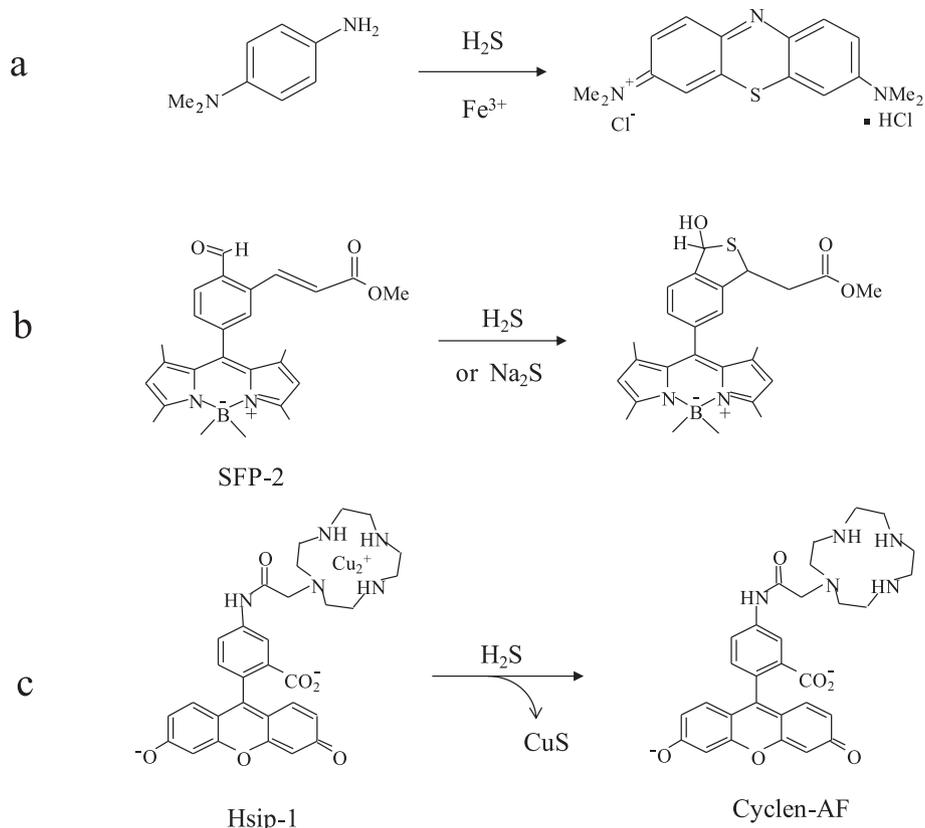


Fig. 15 Schematic representations of methylene blue method (a) and fluorimetric methods (b: SFP-2, c: Hsip-1) for hydrogen sulfide

のリアルタイム検出ではより効果的である。それぞれの化学反応式を Fig. 15b と Fig. 15c に示す。これらは、特異性には優れているものの、検出感度や測定簡便性においては未だ不十分なことがあり、臨床への応用は適用されていない。一方、硫化水素は、毒性のガスでもあり、また火山災害や廃棄物の悪臭の原因にもなっている。したがって、硫化水素を特異的にかつ高感度に測定することは、人の疾病ばかりではなく、衛生環境を守る意味でも大変重要とされている。本研究では、より迅速で高感度に硫化水素を検出し、臨床分野や環境分野に適用可能な分析法を確立するための新たな化学発光法について検討した。

1) 方法

(1) 化学発光による硫化水素測定法

リン酸緩衝液 (pH 11.7) で希釈した Na_2S 溶液 20 μl にルシゲニン発光試薬 (5 $\mu\text{mol/l}$ 塩化銅 (II), 0.04 mg/ml Lucigenin) 0.2 ml を加え、生じる発光を LUMINESCENCE READER (Aloka) で測定し

た (Waiting time 10s, Integral time 10s)。

本法は、硫化水素と金属イオンにより発生する活性酸素をルシゲニンにより発光測定することを原理とする (Fig. 16)。金属イオンとしては、銅 (II)、銅 (I)、亜鉛、鉄、マグネシウム、マンガン、アルミなどのイオンについて検討した。その結果、銅 (II) で強い発光が生じ、その発光は superoxide dismutase (SOD) でほぼ消失した。また、生じる活性酸素種は DMPO をスピントラップ剤とした ESR 法により解析した。その結果、ラジカル種はスーパーオキシドアニオンであることが判明した。次に発光反応における pH、塩濃度、ルシゲニン濃度の至適条件を検討した。これらの条件を下に Na_2S の検量線を作製したところ、 Na_2S 20 pmol/assay ~ 20 nmol/assay、再現性は平均 6.0% ($n = 7$) であった。この感度は、生体中の硫化水素の測定に適用可能である。この方法は、測定時間が 10 秒と迅速であり、かつリアルタイム測定も可能であることから、診断を目的とした臨床分析や組織、細胞のリ

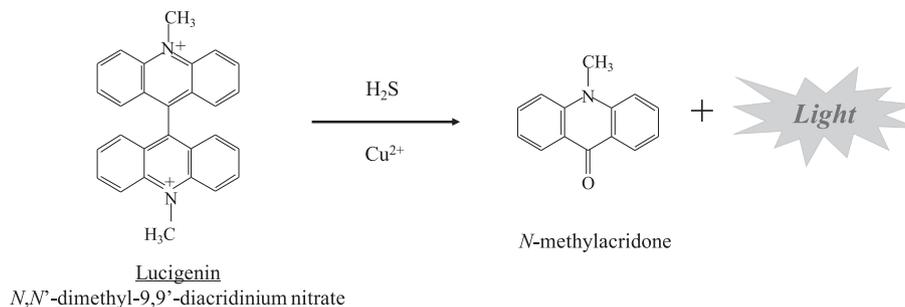


Fig. 16 The principle of lucigen chemiluminescent method for hydrogen sulfide

アルタイム測定にも応用可能である。一方、温泉水や環境分析での on-site 分析（現場測定）では、硫化水素をより簡単に測定できる方法の開発が望まれている。そこで、携帯タイプの発光測定器（6 × 16 cm）であるルミテスター（PD-20）を用いて硫化水素測定を行った。この機器は、卓上の発光測定器と比べ、測定できる最小発光強度の閾値が低いことから、on-site で測定を行うのであれば、発光強度そのものをさらに高める必要がある。そこで、発光の増感剤を見出す目的で、界面活性剤 17 種類について検討した。その結果、両性イオン界面活性剤 3-((3-Cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate (CHAPS) を加えることで、発光強度を約 10 倍高めることを見出した。この試薬を簡易分析に適用したところ、検出限界もルミテスターで 1×10^{-5} mol/l (100 pmol/assay) という感度を得ることができた。この方法を温泉水に適用したところ、卓上の機器を用いた結果とほぼ同等の硫化水素が検出できた。現在、硫化銅からの活性酸素生成機構とその発光機構について、さらに本発光反応を比色、蛍光、電気化学検出への展開について検討している。

まとめ

1) テロメラーゼ分析：

本研究では、臨床における重要な腫瘍マーカーであるテロメラーゼ (Telomerase) 活性を検出するための 2 つの方法を開発した。一つは生物発光法で、Telomerase 活性由来の PPI を簡便かつ迅速に検出することが可能であった。二つ目はマイクロチップ電気泳動法で、Telomerase 活性で伸長したテンプレートを増幅効率の良い Titanium *Taq*

DNA polymerase を用いて SYBR Gold で検出する迅速かつ高感度な分析法を開発した。これらの分析法により、がん細胞 1 個の検出が可能になった。

2) オキシトシン分析：

自閉症スペクトラム (ASD) のバイオマーカーとしてペプチドホルモンオキシトシン (Oxytocin) の高感度分析の開発を生物発光酵素免疫測定法で検討した。その結果、検量域 5.0-100 pg/assay, 検出限界 1.0 pg/assay と高感度測定が可能になった。現在は、さらなる高感度化としてハプテン調製による新規抗体の作製、さらにリジン残基 ($n = 3 \sim 6$) を架橋とするビオチン標識 Oxytocin を合成し、抗体と標識抗原とのヘテロログスな組合せのイムノアッセイを検討している。現在、実用分析に耐える高感度 EIA が確立され、臨床検体への応用が期待されている。

3) 一酸化窒素 (NO) 分析：

本研究では、NO 測定法として蛍光法と生物発光法による 2 つの測定法を開発した。蛍光法は、ゴマ成分セサモールが NO により 2 量体となることで蛍光を生じることを原理とした簡便な測定法である。発光法は、生体内 NO センサーといわれる可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) の細胞内カスケードを利用し、sGC が特異的に NO と結合し GTP を cGMP に変換する際に生じるピロリン酸を PPK-luciferin-luciferase 生物発光法により検出する方法である。これにより、NO 以外のラジカル種とは反応しない特異的測定が可能になった。以上より、これら NO 測定法は、生体による NO 生成の作用機序解明や医薬品開発における虚血剤などのスクリーニング法として、また生体ストレスの解析法としての応用に有用と考える。

4) 硫化水素分析：

本法は、硫化水素と金属イオンにより発生する活性酸素をルシゲニンにより発光測定することを原理とする。金属イオンとしては、銅 (II) で強い発光が生じ、その発光はSODで大きく消失したことから、関与するフリーラジカルは、スーパーオキシドアニオンであると考えられる。本法の検量域はNa₂S 1 μmol/l (20 pmol/assay)~10 mmol/l (20 nmol/assay)、再現性は平均6.0% (n = 7)であった。本法は界面活性剤の添加により、発光強度が約10倍高めることができ、これは、ハンディタイプの測定装置により on-site での簡易分析を可能にした。この方法はPOCTとしての臨床診断ばかりではなく、温泉水や下水などの環境分析にも適用可能である。

謝辞 本研究の一部は文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (平成22~26年度) による研究助成を受けて行われた。ここに記して謝意を表する。

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991;350:569-573.
- 2) Feng J, Funk WD, Wang SS, *et al.* The RNA component of human telomerase. *Science*. 1995;269:1236-1241.
- 3) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266:2011-2015.
- 4) Wright WE, Shay JW, Piatyszek MA. Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acids Res*. 1995; 23:3794-3795.
- 5) Hirose M, Abe-Hashimoto J, Ogura K, *et al.* A rapid, useful and quantitative method to measure telomerase activity by hybridization protection assay connected with a telomeric repeat amplification protocol. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1997;123:337-344.
- 6) Arakawa H, Karasawa K, Igarashi T, *et al.* Detection of cariogenic bacteria genes by a combination of allele-specific polymerase chain reactions and a novel bioluminescent pyrophosphate assay. *Anal Biochem*. 2004;333: 296-302.
- 7) Arakawa H, Karasawa K, Munakata E, *et al.* Development of bioluminescent pyrophosphate assay using pyruvate phosphate dikinase and its application to single-nucleotide polymorphism analysis. *Anal Biochem*. 2008;379:86-90.
- 8) Karasawa K, Arakawa H, Igarashi T, *et al.* Detection of cariogenic bacterial genes by microchip electrophoresis. *J Chromatogr B*. 2004;810: 41-47.
- 9) Karasawa K, Sano Y, Arakawa H. Development of novel telomerase assay using PPKK-luciferin-luciferase detection system. *Luminescence*. 2014;29:52-57.
- 10) Karasawa K, Arakawa H. Detection of telomerase activity using microchip electrophoresis. *J Chromatogr B*. 2015;993-994:14-19.
- 11) 加藤進昌. ササッと分かる「大人のアスペルガー症候群」との接し方. 東京：講談社；2009.
- 12) Sumi S, Taniai H, Miyachi T, *et al.* Sibling risk of pervasive developmental disorder estimated by means of an epidemiologic survey in Nagoya, Japan. *J Hum Genet*. 2006;51:518-522.
- 13) 荒川秀俊, 佐野佳弘. 免疫測定法の検出系. 生物化学的測定研究会編. 免疫測定法. 東京：講談社；2014,pp96-108.
- 14) Minekawa T, Ohkuma H, Abe K, *et al.* Practical application of bioluminescence enzyme immunoassay using enhancer for firefly luciferin-luciferase bioluminescence. *Luminescence*. 2011;26:167-171.
- 15) 吉村哲彦編. 生体内一酸化窒素 (NO) 実験プロトコール. 東京：共立出版；2000.
- 16) Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, *et al.* Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem*. 1998;70:2446-2453.
- 17) Abe S, Nakabayashi S, Murayama J, *et al.* Development of a novel fluorometric assay for nitric oxide utilizing sesamol and its application to analysis of nitric oxide-releasing drugs. *Luminescence*. 2010;25:456-462.
- 18) Makino Y, Uchiyama S, Ohno K, *et al.* Low-cost fluorimetric determination of radicals based on fluorogenic dimerization of the natural phenol sesamol. *Anal Chem*. 2010;82:1213-1220.
- 19) Sano Y, Seki M, Abe S, *et al.* Bioluminescent assay for nitric oxide utilizing the biological enzyme activity of soluble guanylate cyclase. *Anal Lett*, 2011;44:2834-2840.
- 20) Kamoun P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids*. 2004;26:

- 243-254.
- 21) Ishigami M, Hiraki K, Umemura K, *et al.* A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11:205-214.
- 22) 三橋秀基, 後藤真弓, 真下啓一, ほか. 慢性腎不全患者での血漿中硫化水素濃度の測定. 日透析医学会誌. 2011;44:427-433.
- 23) Fogo JK, Popowsky M. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide. *Anal Chem.* 1949;21:732-734.
- 24) Qian Y, Karpus J, Kabil O, *et al.* Selective fluorescent probes for live-cell monitoring of sulphide. *Nat Commun.* 2011;2:495.
- 25) Sasakura K, Hanaoka K, Shibuya N, *et al.* Development of a highly selective fluorescence probe for hydrogen sulfide. *J Am Chem Soc.* 2011;133:18003-18005.
- [受付：1月6日, 受理：2月20日, 2015]