

## 学位論文題名

## Development of a highly sensitive fluorescent method for detection of nucleic acids

(核酸検出のための新しい蛍光法の開発)

## 学位論文内容の要旨

分子生物学の分野においては、核酸ハイブリダイゼーション法、塩基配列決定法やPCR法などの技術開発の結果、遺伝子に関する構造・機能の解析が可能となり、その情報は理学、医学、農学、工学など幅広い分野で利用されるようになった。核酸の検出には、従来、放射性同位元素(RI)が広く用いられていたが、最近では非RI検出法も用いられるようになった。その背景にはRIの不安定性のほか、設備や廃棄物処理の問題、さらには研究者の健康管理の問題等がある。非RI検出法はこれらの問題を解決したが、核酸検出の感度や解像度の面で問題を残している。そのため、高感度が要求されない塩基配列決定法やPCR法では非RI検出法が広く用いられているが、核酸ハイブリダイゼーションでは必ずしもそうではない。

核酸ハイブリダイゼーションには、抽出精製した核酸を解析するフィルターハイブリダイゼーションと、組織細胞や染色体上で核酸を検出する*in situ* ハイブリダイゼーションがある。前者では、酵素標識が主流であり、用いる基質の違いで発色法と化学発光法に分けられるが、発色法はRI法に比べ高解像度であるという長所を持つ反面、検出感度が低い。化学発光法は、感度はRIに匹敵するが、解像度や定量性という点で問題がある。最近になってイメージングプレート(IP)を用いた機器の開発によりRIシグナルや化学発光シグナル検出の感度・定量性が飛躍的にアップしたが、IPを用いたシステムは高価であり普及性という点で難点がある。また、このシステムは放射線・発光を蛍光シグナルに変換するというステップを含んでいるので、結局は高感度で定量性に優れている方法は蛍光検出法であることを示唆している。

*in situ* ハイブリダイゼーションでは、抗体等を蛍光色素で直接標識したものをを用いる蛍光法が主流である。RIは検出に数週間もの長時間を要し、化学発光法は解像度が低く利用に適さない。酵素標識を利用した発色法は解像度と検出の簡便さという点で優れているが感度が低い。FITCを用いた蛍光抗体染色法は組織細胞中や染色体上での核酸の検出に広く用いられているが、標的に結合させうる色素数に限りがあるため感度をさらに向上させることは容易ではない。また、この方法は共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)による解析にも用いられるが蛍光の退色が早いという欠点がある。

本研究では核酸ハイブリダイゼーションにおける上述の問題を解決するために、酵素による蛍光シグナル増幅系の導入を試み、フィルターや細胞・染色体に強く沈着する蛍光基質の開発を行った結果、高感度・高解像力の新しい方法の開発に成功した。

第一章ではフィルターハイブリダイゼーションに用いる蛍光基質の開発について述べた。標識酵素としては比活性が高く安定なアルカリ性ホスファターゼを採用し、その基質となる蛍光物質の合成を行った。クマリン誘導体26種、フレオレセイン誘導体6種、ペリレン誘導体7種、ナフトール誘導体50種、アントラセン誘導体10種、その他2種を合成し、ナイロンメンブレンフィルター上でスクリーニングを行った。合成する蛍光物質の決定に当たっては、共役二重結合が多く存在し、化合物の構造が平面であるという条件を満たすようにし、スクリーニングを行った結果をもとに、経験的に、置換基の種類と数や位置を変えて一連の合成を行った。スクリーニングの基準は①ナイロンの自家蛍光のない480 nm以上の長波長

域に蛍光をもつ、②酵素反応後の生成物がナイロンに対し強い沈着能を有する、③沈着後の比蛍光強度が高い（濃度消光が少ない）ことである。これらの基準に従ってスクリーニングを行った結果、ナフトール誘導体である3-Hydroxy-N-2'-biphenyl-2-naphthalenecarboxamide phosphate ester (HNPP) が最も適していることが分かった。標識酵素であるアルカリ性ホスファターゼとの反応により、HNPPは脱リン酸化されてHN Pとなり、ナイロンフィルターに強く沈着すると同時に紫外線照射下で510 nmの蛍光を発する。

第二章ではHNPP法の応用と現在最も高感度な非RI法とされている化学発光法との比較を行うとともに、様々なフィルターハイブリダイゼーションへの応用を試み、その有用性を立証した。現在、非RIプローブによるフィルターハイブリダイゼーションにおいては化学発光法が主流となりつつあるが、HNPP法は感度・解像度・定量性のすべての面で化学発光法より優れている。

第三章ではHNPP-アゾ色素法の開発について述べた。HNPPはそれ自体では組織細胞や染色体へ沈着せず*in situ*ハイブリダイゼーションに用いることができない。これを解決するため、アゾ色素とのカップリング反応を利用することとし、マウス肝切片およびショウジョウバエ唾腺染色体を用いて32種のジアゾニウム塩をスクリーニングしたところ、Fast red TRと2-biphenyldiazonium chlorideが有用であることが分かった。アルカリ性ホスファターゼの基質となる沈着性蛍光色素の開発はここ数年いくつかのグループで行われてきており、なかには商品化されているものもあるが、HNPP法は他のいずれをも凌駕している。

第四章ではHNPP-アゾ色素法を用いて種々の*in situ*ハイブリダイゼーションを行った例を示した。近年、ゲノム解析が世界的規模で行われているが、中でも遺伝子マッピングは重要な技術である。しかし数キロベース以下のプローブの場合、マッピングが困難なことが多い。本章では、まずFITCを用いた従来の蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション法（FISH法）との比較を行い、本法の有用性を示し、次に従来のFISH法では出来なかった短いcDNAプローブを用いたマッピングを行い、従来法より高感度であることを示した。また、酵素反応により生成した蛍光色素は励起光による退色が少ないという利点があるので、CLSMによる検出など比較的強い励起光源に曝される場合に適している。本章では実際にショウジョウバエ3齢幼虫の複眼成虫原基での*in situ*ハイブリダイゼーションを行いCLSMでの検出を行ってその有用性を実証した。

従来の蛍光基質はナイロンフィルターや組織細胞への沈着能が劣り、解像度が著しく低かった。そのことが酵素標識蛍光法（enzyme linked fluorescence assay、ELFA）のハイブリダイゼーションへの応用を妨げてきた。HNPPの開発によってELFA法の最大の欠点である沈着性の問題を解決したが、この方法は、核酸の検出のみでなく、酵素標識を利用した様々な物質の検出にも応用が可能であり、これまで見えなかったものを可視化するなど基礎科学分野への貢献が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 堀 浩  
副 査 教 授 吉 田 迪 弘  
副 査 教 授 高 木 信 夫  
副 査 助 教 授 木 村 正 人

## 学位論文題名

### Development of a highly sensitive fluorescent method for detection of nucleic acids

#### (核酸検出のための新しい蛍光法の開発)

分子生物学的手法による遺伝子の構造及び機能の解析には、従来放射性同位元素 (R I) が一般に用いられてきたが、R I 法には (1) R I が不安定であること、(2) 特殊な設備・機器を必要とすること、(3) 廃棄物処理の問題があること、(4) 取扱者は特別の訓練を受けなければならないこと、(5) 取扱者に対するバイオハザードの問題がある。従って、R I を用いず核酸研究を可能とする技術の開発がつよく望まれていたが、この10年間にかなり有望ないくつかの方法が欧米において開発された。それら非R I 法は、(1) 酵素を用いた色素法、(2) 蛍光法、(3) 酵素を用いた化学発光法に大別される。これらの方法は用途により使い分けることで、R I 法よりは簡単に核酸研究に利用しうるし、実際にかかなり広く用いられるようになってきた。しかし、これら三つの方法はそれぞれ、(1) 検出感度が低い、(2) シーケンシングのようにかなり多量の核酸を対象とするときはよいが、単一遺伝子を染色体上にマッピングするときには感度が悪く、退色も早い、(3) 組織や染色体上での検出には解像度が悪く利用できないなどの欠点を持っている。

申請者は、これらの欠点を持たない汎用性の高い非R I 法の開発を目的として、まず、水溶性で無蛍光のアルカリ性フォスファターゼ (A P a s e) の基質となりうる磷酸化合物でありながら、脱磷酸されたときには蛍光を発し、不溶性となるような物質の合成を試みた。クマリン、ナフトール、アントラセン、ペリレンの誘導体100種

以上を合成し上記の条件を満たす物質をスクリーニングしたところ、3-Hydroxy-N-2'-biphenyl-2-naphthalenecarboxamide phosphate ester (HNPP) が得られた。 ついでナイロン膜上に固定した核酸に対し、ハプテン (biotin または digoxigenin) 化プローブをハイブリした後、APase で標識したハプテンに対する Fab' をカップルさせ、HNPPを含む緩衝液中で反応を行ったところ、10fgまでのDNAを510nmの蛍光として検出することに成功した。

つぎに、HNPPを用いた方法 (HNPP法) と現在広く使用されている化学発光法の比較をフィルターハイブリダイゼーションを用いて行ったところ、検出感度、解像度、定量性いずれにおいてもHNPP法が優れていることが分かった。

ところが、脱リン酸されたHNPPはナイロン膜には結合するが、組織や染色体には沈着しないため *in situ hybridization* には使用できないことが分かった。そこでこの問題を解決するために、HNPPを含む緩衝液中にアゾ色素を共存させ、HNPPをアゾ色素とカップルさせることとし、これに用いるための最良のアゾ色素の探索を行った。その結果、Fast red TRと2-biphenyldiazonium chloride が有用であることが分かった。この方法 (HNPP/AZO法) をショウジョウバエ、マウス、ヒトの染色体における単一遺伝子のマッピングに適用したところ、従来の蛍光法より遥かに安定で強い蛍光が得られ、これまでRI法でも蛍光法でも成功しなかった遺伝子のマッピングにも成功した。さらにこの方法は、蛍光が強いためレーザー顕微鏡による観察が可能であると共に、Qバンド染色を施した染色体上でバンド・パターンと遺伝子の位置を同時観察できるという利点を有する他、組織切片上での遺伝子産物の検出も可能という極めて優れた方法であることが分かった。

以上のように申請者は世界一検出感度の高い極めて有用な非RI法の開発に成功したが、これは申請者の独創性と努力の賜物である。よって審査員一同は申請者が博士の学位を受けるに十分な資質を有するものと認めた。