

学 位 論 文 題 名

New chemifluorescence detection systems for DNA hybridization by use of novel fluorogenic substrates

(新規蛍光基質を用いたDNAハイブリダイゼーションのための新たな蛍光検出システム)

学位論文内容の要旨

近年発展してきたDNA・RNAなどの核酸ハイブリダイゼーション法、塩基配列決定法やPCR法などにより遺伝子の構造・機能などの解析が可能となり、その情報は理学、医学農学、工学など広い分野で利用されている。核酸ハイブリダイゼーション法には、メンブレンフィルターに固定化された核酸を検出するフィルターハイブリダイゼーション法と組織、細胞、染色体上の核酸を検出する*in situ* ハイブリダイゼーション法があり、従来、これらの核酸の検出には、放射性同位元素(RI)を用いたオートラジオグラフィ法が用いられてきたが、これには特定の設備を必要としさらに研究者の健康管理上の問題などから、非RI検出法の開発が望まれ、種々の手法が発展してきた。例えば、発色基質を使う発色法、化学発光基質を使う化学発光法、蛍光基質を使う化学蛍光法などの酵素反応系による酵素法などがある。溶液中でのタンパク質の検出などに用いられている酵素標識蛍光法 (Enzyme linked fluorescence assay, ELFA) は高感度であるが、この蛍光基質が水溶性であるため、ナイロンフィルターや組織・細胞・染色体などへの沈着性が悪く、また、解像度が著しく低いという問題があり、ハイブリダイゼーションへの適用に改良すべき点が多い。本研究では、沈着性が高く、さらに高感度・高解像度の蛍光基質の開発と、それを応用したフィルターおよび*in situ*ハイブリダイゼーションにおける蛍光検出システムを確立した。

第1章では、フィルターハイブリダイゼーションに用いるアルカリホスファターゼの蛍光基質の開発について述べた。ナフトール誘導体32種、アントラセン誘導体10種、フルオレセイン誘導体6種を合成し、ナイロンメンブレン上での検出感度を調べた。その結果、ナフトール誘導体の1つである3-hydroxy-N-2'-biphenyl-2-naphthalenecarboxamide (HNPP)と、フルオレセイン誘導体である、phosphorylated 5-(4-biphenylcarboxamido)-3'-O-(1-naphthyl)methylfluorescein (BNFP)が最も高感度であることが分かり、これらの基質を用いた、サザンハイブリダイゼーションやウエスタンブロッティングのための化学蛍光法を確立した。ここで開発した化学蛍光法は、現在のところ最も高感度であるとされている化学発光法と同等の感度を有することが分かり、極めて有用性が高い。さらに、HNPPとBNFPを組み合わせた2色検出法を確立し、同一フィルター上で異なる2種の核酸あるいはタンパクの同時検出を可能にした。

第2章では、HNPPの*in situ* ハイブリダイゼーションへの適用について述べた。脱リン酸化したHNPP (HNP) は、組織や細胞に対する沈着性が極端に低いいため、*in situ* ハイブリダイゼーションには利用出来なかった。そこで、HNPをジアゾニウム塩とアゾカップリングさせ、組織に対する沈着性を上げることにした。組織や細胞に最も効果的

に反応生成物を沈着させられるジアゾニウム塩をスクリーニングした結果、HNPPとFast Red TRの組み合わせが沈着性が高く最も高感度であることがわかった。HNP-Fast Red TRの沈着物は、強いオレンジの蛍光を発し、励起光による退色が遅く、染色体上での蛍光シグナルは、キナクリンヘキスト33258で対比染色したQ・バンド染色体とよい対比をなしシグナルの検出が容易であり、また、ユニーク配列を染色体上で検出できるだけの感度を有し、遺伝子マッピングへの有用性が極めて高いことを示した。

第3章では、ホースラディッシュパーオキシダーゼの基質を合成し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。基質として、芳香族アミン誘導体19種とフェノール誘導体11種を合成した。その中で、芳香族アミン誘導体の一つである、N-(4-amino-5-methoxy-2-methylphenyl)benzamide (AMMB)がメンブレンブロットティング分析に最も適したパーオキシダーゼ蛍光基質であることが分かった。AMMBは、パーオキシダーゼと反応すると、黄色蛍光の沈着物をナイロンメンブレン上に形成する。さらに、AMMBとHNPPを組み合わせたフィルターハイブリダイゼーションやウェスタンブロットティングのための2色検出法を確立した。この手法では、AMMBとHNPPを同時に酵素反応させることができるため、第1章における2色検出法よりも早く簡便な手法としてより有用性が高い。

第4章では、細胞や染色体への沈着性を有する蛍光基質の合成と、その蛍光基質を用いた*in situ*ハイブリダイゼーション法の確立について述べた。蛍光基質は第3章で合成した芳香族アミン誘導体4種とフェノール誘導体11種のなかから、核及び染色体への沈着性と蛍光強度を指標としてスクリーニングした。その結果、フェノール誘導体の一つである、N-(4-hydroxy-2-methylphenyl)benzamide (HMPB)が最も*in situ* ハイブリダイゼーションに適していることが分かった。HMPBは、パーオキシダーゼと反応すると、青緑色蛍光を発し、さらに、蛍光退色が極めて遅い特徴がみられた。この蛍光基質を単独で用いたシグナル検出法とさらに、HNPP-Fast Red TRと組み合わせた2色検出法を開発した。2色検出法では、青緑(HMPB)とオレンジ(HNPP-Fast Red TR)の蛍光色が同時に検出することができる。また、これらの蛍光基質による蛍光シグナルは、いずれも他のどの蛍光色素よりも退色が極めて遅いため、共焦点レーザー顕微鏡を用いた3次元解析などにおいて非常に有用であると考えられる。

従来の蛍光基質はナイロンフィルターや組織細胞・染色体などへの沈着性が劣り、解像度が著しく低いため、ELFAのハイブリダイゼーションへの応用は不可能であった。しかし、本研究で見られたように沈着性蛍光基質の開発により、最大の欠点である沈着性の問題を解決したばかりでなく、新たに開発した蛍光基質は高感度・高解像度および遅い退色性という特徴をもつことから、これらを用いた蛍光検出システムは核酸検出のみならず、酵素標識を利用した様々な物質の検出・可視化が可能であり、基礎科学分野への大きな貢献が期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	吉田 勉 弘
副査	教授	高木 信 夫
副査	教授	西 則 雄
副査	助教授	阿 部 周 一
副査	助教授	井 上 勝 一

学 位 論 文 題 名

New chemifluorescence detection systems for DNA hybridization by use of novel fluorogenic substrates

(新規蛍光基質を用いたDNAハイブリダイゼーションのための新たな蛍光検出システム)

分子生物学、遺伝学、医学などの広い分野で利用されている核酸ハイブリダイゼーション法には、メンブレンフィルターに固定化された核酸を検出するフィルターハイブリダイゼーション法と組織、細胞、染色体上の核酸を検出する*in situ* ハイブリダイゼーション法に大別される。従来、これらの核酸の検出には放射性同位元素を用いていたが、最近、発色基質を使う発色法、化学発光基質を使う化学発光法、蛍光基質を使う化学蛍光法などの酵素反応系による酵素法などの核酸検出法が開発されている。しかし、これらはいずれも感度、解像度やさらに沈着性などに問題点が多く、改良すべき点が多い。本研究では、沈着性が高く、さらに高感度・高解像度の蛍光基質を開発し、それを応用したフィルターおよび*in situ*ハイブリダイゼーションにおける新たな蛍光検出システムを確立した。

フィルターハイブリダイゼーションの化学蛍光法の開発では、アルカリホスファターゼの蛍光基質として、ナフトール誘導体32種、アントラセン誘導体10種、フルオレセイン誘導体6種を合成し、さらに、ホースラディッシュパーオキシダーゼ蛍光基質として、芳香族アミン誘導体19種とフェノール誘導体11種を合成し、ナイロンメンブレン上での沈着性と検出感度を調べた。その結果、ナフトール誘導体の3-hydroxy-N-2'-biphenyl-2-naphthalenecarboxamide (HNPP)およびフルオレセイン誘導体phosphorylated 5-(4-biphenyl-carboxamido)-3'-O-(1-naphthyl)methylfluorescein (BNFP)、さらに、芳香族アミン誘導体のN-(4-amino-5-methoxy-2-methylphenyl)benzamide (AMMB)が最も有効で、高感度であり、フィルターハイブリダイゼーションに使用可能であることが分かり、次にこれらの基質を用いた高感度化学蛍光法を確立した。この方法では核酸のみならずタンパクのウェスタンブロッティングにも有効であった。また、申請者は、HNPPとBNFPを組み合わせた2色

検出法も併せて確立し、同一フィルター上で異なる2種の核酸あるいはタンパクの同時検出を可能にし、フィルターハイブリダイゼーションに新機軸をうち立てた。

次に、細胞や染色体への沈着性のある蛍光基質の合成と、その蛍光基質を用いた*in situ* ハイブリダイゼーション検出法の確立を行った。HNPPは組織や細胞に沈着性が低いため、Fast Red TRを用いたアゾカップリング法を確立した。この反応沈着物(HNP-Fast Red TR)は、強いオレンジの蛍光を発し、退色が遅く、染色体上での蛍光シグナルは、キナクリンヘキスト33258で染色したQ-バンド染色体とよい対比をなしシグナルの検出が容易であることが分かった。また、パーオキシダーゼの蛍光基質についても、合成した芳香族アミン誘導体4種とフェノール誘導体11種のなかから、フェノール誘導体の *N*-(4-hydroxy-2-methylphenyl)benzamide (HMPB)が最も有効な基質であることが分かった。HMPBは、パーオキシダーゼと反応すると、青緑色蛍光を発し、蛍光退色が極めて遅い特徴をもつ。このシグナル検出法と、さらに、HNPP-Fast Red TRと組み合わせた2色検出法も併せて開発した。これらの手法はいずれも種々のプローブのシグナル検出が可能であり、遺伝子マッピングが可能であった。さらに、2色検出法では、HMPBによる青緑とHNPP-Fast Red TRによるオレンジの蛍光色が同時に検出できた。また、これらの蛍光シグナルは、退色が極めて遅い特色がみられた。

以上、本研究では、化学蛍光法のハイブリダイゼーションの最大の欠点である沈着性の問題を解決したばかりでなく、新たに開発した蛍光基質は高感度・高解像度および遅い退色性という特徴をもつことから、これらを用いた蛍光検出システムは核酸検出のみならず、酵素標識を利用した様々な物質の検出・可視化が可能であり、基礎科学分野への大きな貢献が期待される。

審査員一同は、これらの成果および主論文の内容に直接関与した3編の論文（英文）と他の7編の英文論文計10編の参考論文を高く評価し、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。