

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790042

研究課題名（和文） 遺伝子増幅法を用いた超高感度生物発光イムノアッセイの開発

研究課題名（英文） Development of ultrasensitive bioluminescent immunoassay by using DNA amplification technique

研究代表者

大野 賢一（KEN-ICHI OHNO）

東北薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20347272

研究成果の概要（和文）：

本研究では、イムノアッセイの高感度化を目的として遺伝子増幅法を検出系とする方法の開発を検討した。その遺伝子増幅法には等温条件下で連続的に DNA 伸長反応が進行する LAMP（Loop-mediated isothermal Amplification）反応と RCA（Rolling Circle Amplification）反応を検討した。物理的及び化学的に安定な DNA を標識とするイムノアッセイ系の構築により、酵素を標識とする従来法と比較して、高い安定性の標識抗原の調製と遺伝子工学技術の応用による高効率なシグナル増幅反応を達成した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, a highly sensitive immunoassay was developed by using DNA amplification technique as detection system. Under isothermal condition, LAMP (Loop-mediated isothermal Amplification) and RCA (Rolling Circle Amplification) reaction enable successive DNA amplification. In order to apply DNA amplification to the detection system on immunoassay, DNA-conjugated antigen was prepared for competitive immunoassay. As a result, physically and chemically stable DNA provided highly efficient and sensitive signal amplification based on genetic engineering.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：イムノアッセイ・遺伝子増幅法・生物発光検出・臨床検査・診断・スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国では高齢化の進展や生活習慣病の増大から、健康意識の変化が生じている。健康志向の高まりに伴って健康増進、疾病予防、早期発見、早期治療などの「予防医学」

的な考え方がクローズアップされている。またその一方で食料品の産地偽装や偽装表示、毒物混入事件などが社会問題化しており、健康を脅かす食の安全の確保に大きな関心が寄せられている。その結果として、迅速で正

確な診断や検査、スクリーニング技術が求められている。

現在、診断や検査に汎用されている方法の一つとして抗原抗体反応に代表される生物学的な特異的親和力を利用する分析法が用いられている。抗原抗体反応を利用する免疫アッセイは、抗体の高い特異性と強い親和力によって分析試料中の微量成分を測定する方法として欠くことができない手段であり、医療分野のみならず、残留農薬の測定、環境汚染物質の測定等広い領域で用いられている。この方法は、特異的な親和力を利用するため、複雑なマトリックスから分離操作することなく、簡便に特定分子を検出することが可能である。さらにその測定法ではプローブとして用いる標識分子を検出するため、適切な検出法を選択することにより極めて高感度に測定することができる。

1958年に Berson と Yalow らによって放射性同位体を標識分子としたラジオ免疫アッセイ (RIA) が開発された。RIA は高感度で特異性が高く、分析操作が簡易なことから、臨床検査など様々な領域で汎用されてきた。しかしその使用制限の厳しさから、最近では使用が困難となっている。これに代わる方法として非放射性検出法の開発が急速に進められ、酵素、蛍光性分子、化学・生物発光性分子などを標識に用いる免疫アッセイが広く利用されるようになった。その中でも酵素を標識分子として用いた酵素免疫アッセイ (EIA) では、酵素の高い触媒活性により高感度測定が可能となっている。現在、標識酵素としてはアルカリ性ホスファターゼ (ALP)、 β -D-ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) などが汎用されており、酵素の測定系として 10^{-21} – 10^{-19} mol/assay と非常に高い検出感度を実現している。いずれも高い回転数 (分子活性) を示す酵素であるが、酵素や基質の安定性や純度などの問題から更なる高感度化には困難を要する。当研究室においてもこれまでに化学発光や生物発光を利用した高感度な酵素検出法を開発し、免疫アッセイの検出系として利用してきたが検出感度の根本的な解決には至っていない。そこで本研究では酵素に代わる標識分子として DNA に着目した。

DNA は物理的、化学的及び生物学的にも比較的安定であり、また近年の遺伝子工学の発展により様々な遺伝子解析法や増幅法が開発され、1 分子検出に迫る超高感度検出法も報告されている。遺伝子増幅法では PCR (Polymerase Chain Reaction) が最も汎用され、免疫アッセイの検出法として応用した Immuno-PCR が数多く検討されている。すでに我々は PCR よりも迅速で増幅効率に優れる LAMP 法 (Loop-mediated isothermal amplification) を用いた標的 DNA の定量分

析法を開発し、その成果を学会発表にて報告している。LAMP 反応は 60-65°C の一定温度で PCR の 100-1000 倍程度の増幅効率を示すことから、当研究室で開発した化学発光、生物発光酵素免疫アッセイに匹敵する超高感度検出が可能である。

2. 研究の目的

現段階では、DNA 増幅反応の際に生じるピロリン酸 (PPi) をカルセインを用いてリアルタイム PCR モニタリング装置で蛍光検出している。カルセインは蛍光性金属キレート指示薬であり、そのマンガンイオン (Mn^{2+}) との錯体ではカルセイン蛍光が抑制される。PPi の生成により Mn^{2+} -PPi 錯体が形成されると Mn^{2+} から解離したカルセインの蛍光が回復することから DNA 増幅反応をリアルタイムモニタリングできる。またその一方で、当研究室ではすでにホタルルシフェリン-ルシフェラーゼ反応に基づく PPi の生物発光検出系を構築して一塩基多型 (SNPs) 解析へ展開していることから、DNA 増幅反応への応用も可能と考えられる。そこで本研究では、DNA 増幅反応の免疫アッセイへの応用と、簡易、高感度検出が可能な生物発光反応との組み合わせによる超高感度化について検討することを目的とする。

本研究は免疫アッセイにおける標識分子として DNA を用いる手法を提案するものである。酵素よりも安定な DNA を用いることにより簡便で信頼性の高いアッセイ系の構築が可能であり、更に汎用性も高い手法と考えられる。また生物発光検出との組合せによる高感度化は、試料の微少化に繋がることから医療現場における患者の肉体的負担の軽減に貢献する。また生物発光検出では一般的な光計測に用いられる光源を必要としないため、測定機器の小型化 (ポータブル化) などに寄与することから医療現場での POC (Point-Of-Care) や様々な検査を必要とする際のオンサイト分析に大きく貢献するものとする。

3. 研究の方法

(1) LAMP 反応の最適化: 直鎖状 2 本鎖 DNA (500 bp) を鋳型として 6 種類のプライマー設計や各プライマーの濃度、反応温度などの条件を検討した。即ち、標的遺伝子である λ phage DNA 内の 500 bp に対して 5' 末端及び 3' 末端からそれぞれ 3 つの領域 (F1-F3, B1-B3) を設定した。これら 6 つの領域を用いてインナープライマー (FIP, BIP) とその外側に位置するアウタープライマー (B3, F3) を設計した。Bst DNA ホリメラーゼ、インナープライマー、アウタープライマー、PPi 検出試薬を含む LAMP 反応試液 23 μ L を LAMP 検出用反応チューブ

に移し、鋳型 DNA として λ phage DNA の PCR 産物 (500 bp) $2 \mu\text{L}$ を添加した。試料をリアルタイム PCR 測定装置 (ABI PRISM 7000) により一定温度で加温して LAMP 反応をリアルタイム測定した。LAMP 反応により生成される PPi の検出にはカルセイン-マンガン (Mn^{2+}) キレートを利用した。

鋳型 DNA を標識したエストラジオール誘導体を調製して競合イムノアッセイを構築した

(2) LAMP 法を検出系とした競合イムノアッセイ: エストラジオール (E_2) をモデル試料とした競合イムノアッセイを検討した。DNA 標識 E_2 の調製では 6-Ketoestradiol 6-(O-carboxy-methyl) oxime ($\text{E}_2\text{-6-CMO}$) を用いて活性エステル法により PCR 産物の 5'-アミノリンカーを利用して 500 bp DNA を標識した。競合イムノアッセイは第二抗体を固相化した 96 ウェルマイクロプレートに抗 $\text{E}_2\text{-6-CMO}$ 抗体、 E_2 標準溶液または 0.1% BSA-PBS を加え 37°C で 1 時間インキュベートした。次に DNA 標識 E_2 を加え 37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、固相上の DNA 標識 E_2 を過剰の E_2 で遊離し、その溶液の一部を LAMP 検出用反応チューブに移した。

(3) RCA 法を利用した標的遺伝子の生物発光検出: 鋳型 DNA として環状一本鎖 DNA を使用することから、その原料となる 5'-リン酸化一本鎖 DNA (5'-PssDNA) の調製法について検討した。Forward 側にビオチン標識プライマー、Reverse 側に 5' リン酸標識プライマーを使用して得られた 262 bp DNA の PCR 産物をストレプトアビジン-セファロースを用いて固相化した。洗浄後、アルカリ溶液により Reverse 側の DNA 鎖を回収してエタノール沈殿により精製した。得られた 5'-PssDNA についてパドロックプローブ法を利用して耐熱性 DNA リガーゼにより環状化した。得られた環状一本鎖 DNA とそのプライマーを用いて、鎖置換型 DNA 合成酵素により伸長反応を検討した。そこで生じる PPi を Pyruvate phosphate dikinase (PPDK) を用いて酵素的に ATP へと変換しルシフェリンルシフェラーゼ反応により生物発光検出した。

4. 研究成果

(1) LAMP 反応の最適化: 最適条件における鋳型 DNA の検量線を作成した結果、 2×10^{-21} - 2×10^{-17} mol/assay の範囲で鋳型 DNA の良好な検量線が得られ、 zmol (10^{-21}) レベルの高感度検出に成功した (図 1)。また再現性は 2×10^{-20} と 2×10^{-18} mol/assay において、それぞれ 4.86%, 2.04% (CV%, $n=8$) と非常に良好であった。

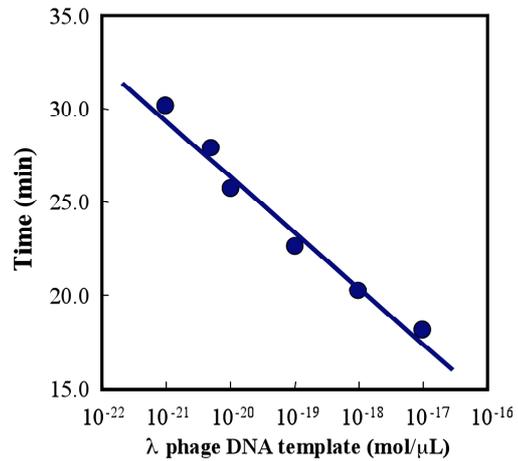


図 1. 鋳型 DNA の検量線

(2) LAMP 法を検出系とした競合イムノアッセイ: 鋳型 DNA を標識したエストラジオール誘導体を調製して競合イムノアッセイを構築した。DNA 標識 E_2 の非特異的な吸着を抑制するために洗浄条件を含む種々の条件を検討した結果、5-5000 pg/mL の E_2 範囲で良好な検量線が得られた (図 2)。しかし現状ではリアルタイム PCR 装置により LAMP 反応を検出しているために、わずか $2 \mu\text{L}$ の試料しか用いることができない。試料全量を用いることができれば、更に 10-100 倍の高感度化が期待できる。

またこれらの成果については、現在投稿論文を作成中である。

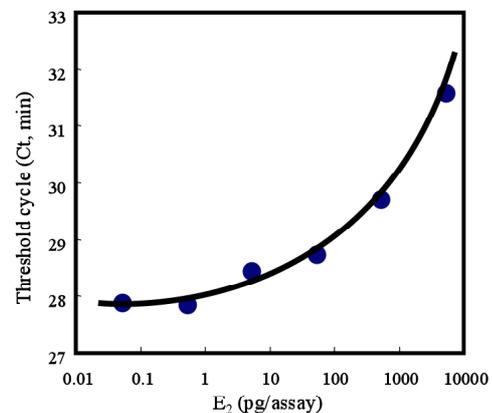


Fig.2 Standard curve of E_2

図 2. エストラジオールの検量線

(3) RCA 法を利用した標的遺伝子の生物発光検出: 上記した方法により目的とする 5'-PssDNA を大量に得ることができた。種々条件検討の結果、耐熱性 DNA リガーゼを用いたパドロックプローブ法により約 30% の収率で目的とする環状一本鎖 DNA を得た。次に得られた環状一本鎖 DNA を用いて RCA 法に最適な DNA 合成酵素を検討した。酵素に望まれる特

性としては、連続した DNA 伸長反応により構築される二本鎖 DNA を解離して伸長する「鎖置換活性」とシグナル増幅に関与する「伸長反応速度」である。「鎖置換活性」を有する酵素が少ないため、4 種類の DNA 合成酵素について検討した。その結果、各酵素において経時的な生物発光シグナルの増加を観測した。電気泳動法においても様々なサイズの DNA を確認したことから、DNA 合成酵素の鎖置換活性による連続的な DNA 伸長が行われたものと考えられる。またプライマーの濃度依存的な発光強度の増加も確認した。Bst DNA polymerase ではエンドポイント測定による生物発光検出が可能であることが示唆された。Phi29 DNA polymerase は高い鎖置換活性を示すが、高い DNA 修復能力（校正機能）も有しているために伸長速度が遅く、緩やかに発光強度が増加していると考えられた（図 3）。Bsu DNA polymerase 及び Exo⁻klenow DNA polymerase では同様な発光シグナル挙動を示した。今後は、RCA 条件の最適化及び標識に用いる DNA の検量線の作成やイムノアッセイの検出系への応用について検討する予定である。

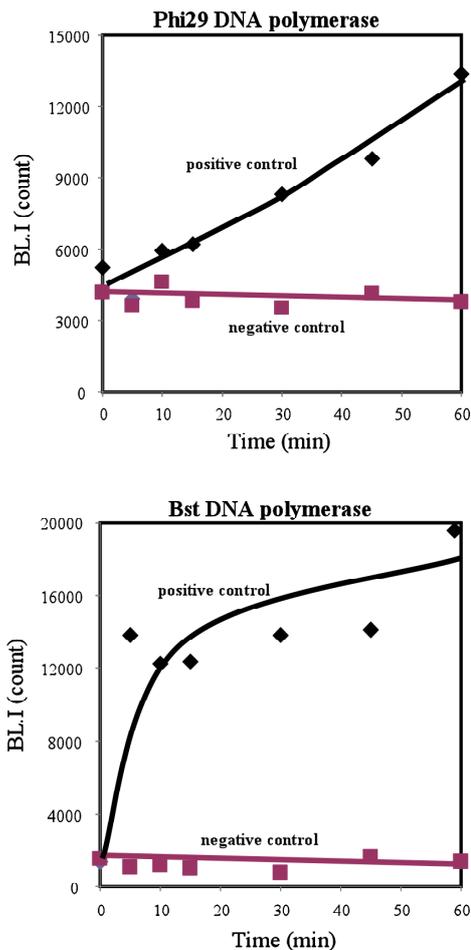


図 3. 生物発光検出による RCA 反応の経時変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① Development of ultrasensitive immunoassay based on DNA amplification technique as detection system

K. Ohno, M. Takahashi, Y. Ban, H. Arakawa
16th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2010)

2010 年 4 月 20-22 日, Lyon, France

② 等温遺伝子増幅法を利用した高感度イムノアッセイの開発

潘 裕星、大野賢一、荒川秀俊

日本薬学会 129 年会 2009 年 3 月 30 日, 岡山大学津島キャンパス

③ LAMP 遺伝子増幅法を利用した高感度イムノアッセイの開発

大野賢一、潘 裕星、高橋真紀子、荒川秀俊
第 22 回バイオメディカル分析科学シンポジウム

2009 年 7 月 16 日, エーザイ川島工園内 内藤記念くすり博物館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 賢一 (KEN-ICHI OHNO)

東北薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 20347272

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: