



東西南北ブロット法：東は終着駅？

森永 紀

一般的に分子量が10,000以上のものは高分子とみなされ、炭素を主骨格とする有機高分子の中にタンパク質、核酸の天然高分子（生体高分子）がある。1970年代、世界で初めてDNAの断片をメンブレン上で検出することにより、エジンバラ大学（英国）のエドウィン・サザンが成功した¹⁾。この方法は制限酵素で断片化したDNAを電気泳動した後、アガロースゲルからニトロセルロース膜へDNA断片をブロット（転写）し、UVなどにより膜上に固定化、その後、放射性同位体や酵素で標識されたプローブ（対象物質と相互作用するような物質、ここでは核酸プローブのこと）とハイブリダイズ（相補的に複合体を形成すること）させ、DNAを検出する方法である。開発者の名前にあやかり、本法は、「サザンブロット法」（サザンブロット法）と呼ばれ、ゲノムDNAの構造解析などに応用されている。

1970年代後半、米国スタンフォード大学の研究グループのオールウィンらは、RNAを電気泳動によって展開・分離後、ゲルからニトロセルロース膜にブロットし、核酸プローブを用いてハイブリダイズし、RNAを検出する方法を試みた。しかしながら、ニトロセルロース膜上でRNAを固定化することができず、サザンブロット法によるRNAの検出には至らなかった。そこで、活性化したdiazobenzyloxymethyl-paper（ワットマンろ紙）をブロット素材として使用しRNAを固定化、RNAを検出することに成功した²⁾。本法は、「サザンブロット法」に倣って、「ノーザンブロット法（ノーザンブロット法）」と呼ばれ、転写レベルの遺伝子発現解析に応用されている。

その後、スイスの研究グループのトウビンらは、タンパク質を電気泳動により分離し、ニトロセルロース膜へブロットして、膜上で抗原抗体反応により染色する方法を開発した³⁾。この方法は「ウェスタンブロット法（ウェスタンブロット法）」と呼ばれ、特定のタンパク質に対する抗体で免疫染色する方法であり、抗原抗体反応と可視化の2つのプロセスにより成り立っている。

一方、セラミド（スフィンゴシンと脂肪酸がアミド結合した化合物群）のような低分子化合物に対してはポリアクリルアミドゲルなどを用いた電気泳動では分離能が低い⁴⁾ため、TLC（薄層クロマトグラフィー、thin-layer chromatography）を用いて分離するのが一般的である。TLCでセラミドを展開・分離後、熱転写にてPVDF（ポ

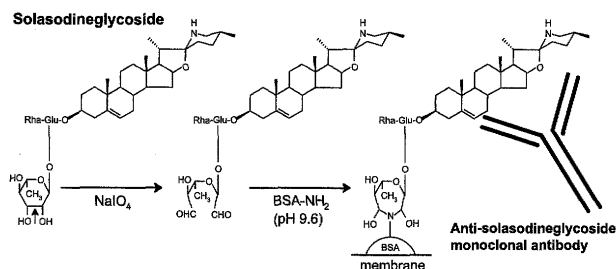


図1. イースタンブロット法の染色模式図

リフッ化ビニリデン）膜へブロットし、抗セラミド抗体を用いて免疫染色する方法が開発され、本法は「TLCブロット」と呼ばれ、さまざまな糖脂質の解析に応用されている。

セラミドなどの従来のTLCブロットでは固定化のステップを必要としないのに対し、植物の二次代謝産物である配糖体は、膜上に固定化されず反応緩衝液で簡単に洗い流されてしまう。そこで九州大学の正山らはTLCで展開したソラソジン配糖体（ナス科植物のアルカロイド）をPVDF膜に熱転写し、膜を過ヨウ素酸ナトリウム（ NaIO_4 ）で処理することで糖部を開環し、BSA（ウシ血清アルブミン）を加え Schiff ベースを形成し、BSAを介して膜上に配糖体を固定化、抗体染色する方法を見いだした（図1）。後にこの方法はアメリカ化学会誌 *Analytical Chemistry* のチーフエディターにより「イースタンブロット法（イースタンブロット法）」と命名され⁴⁾、さらに、エドウィン・サザンも Royal Society of Chemistry のインタビューにおいて、糖部を利用した正山らの方法を「イースタン」とコメントしている⁵⁾。

以上のようにターゲット分子、化合物をより簡便に検出するために、さまざまなブロット法が開発されている。イースタン（東）を出発駅として、低分子化合物の新たな検出方法が開発されることを期待したい。

- 1) Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 503 (1975).
- 2) Alwine, J. C. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5350 (1977).
- 3) Towbin, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350 (1979).
- 4) Shan, S. *et al.*: *Anal. Chem.*, **73**, 5784 (2001).
- 5) <http://www.rsc.org/chemistryworld/News/2007/May/04050701.asp>