

酵素標識を用いた蛍光シグナルの増幅法

鍵山直人¹、初山政慶^{1, 2}、近藤恭光^{1, 2}、西谷内美穂¹、藤田 聡¹、堀 浩³
(株式会社アイシン・コスモス研究所¹、北海道大・地球環境²、東京理科大・基礎工学³)

特異的な核酸配列の検出には、近年、非RI検出法が広く用いられるようになってきた。その背景には放射性同位元素 (RI) の不安定性のほか、設備や廃棄物処理、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、その性能については問題を残している。

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。前者のための非RI 検出法では酵素標識法が主流であり、用いる基質の違いで発色法と化学発光法に分けられる。発色法はRI法に比べ高解像度であるが、検出感度が低い上、定量に適さない。また、化学発光法は、高感度であるが、正確な定量には高価な検出システムを要するという欠点がある。一方、*in situ* ハイブリダイゼーションの検出に用いる方法としては、発色法は感度が低く、また、化学発光法は解像度が悪いため、抗体等を蛍光色素で直接標識したものを用いる蛍光抗体法が主流である。しかし、FITCを用いた蛍光抗体法では、染色体上での単一コピー遺伝子の検出や共焦点レーザー顕微鏡による解析等において、蛍光の退色が早く、微弱なシグナルの観察が難しいという欠点がある。

我々は非RI 検出法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、フィルターや組織・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・高解像度の新しい方法の開発に成功した。

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 (ALP) 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、フルオレセイン、ペリレン、ナフトール、アントラセン等の誘導体105種を合成し、まず、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。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こと、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こと、③ 沈着後の比蛍光強度が高いことである。スクリーニングの結果、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。HNPPはALPとの反応により、脱リン酸化されてHNP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。このHNPPを用いることによって、サザンハイブリダイゼーションでは 0.1 pgの標的DNAを検出することができる。

In situ ハイブリダイゼーションのためには、HNPPはそれ自体では組織細胞や染色体へ沈着しないのでアゾ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、2-Biphenyldiazonium chloride、Fast red TRやFast red KB等が有用であることが分かった。この方法（HNPP / Fast red 法）によって、440 bpのcDNAクローンをプローブとした染色体マッピングが可能となった。ALP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。

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、幅広い分野への貢献が期待される。