

名古屋工業大学博士論文

甲第215号（課程修了による）

平成10年3月24日授与

博士論文

新規蛍光化合物の合成とその応用研究

1998年

藤田 聡

目 次

緒言	1
----	---

第1章 新規なナフタレン誘導体又はアントラセン誘導体の合成とDNAの高感度検出

序	6
1-1 ナフタレン誘導体の蛍光特性及びスポットテスト法によるDNAの検出	7
1-2 アントラセン誘導体の蛍光特性とそれを用いたスポットテスト法によるDNAの検出	14
1-3 ナフトール誘導体 <u>1-11</u> の蛍光特性	16
1-4 N-(2-ビフェニル)-3-ヒドロキシ-2-ナフタレンカルボキサミドリン酸エステル (HNPP) を用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法によるDNAの検出	20
1-5 HNPPを用いたDNAの塩基配列決定	23
1-6 まとめ	26

第2章 新規なフルオレセイン誘導体ジリン酸エステルの合成とDNAの高感度検出

序	27
2-1 新規なフルオレセイン誘導体の合成	28
2-2 N-置換フルオレセイン誘導体の蛍光強度のpH依存性	29
2-3 N-置換フルオレセイン誘導体の蛍光特性	32
2-4 N-置換フルオレセイン誘導体のジリン酸エステルを用いたスポットテスト法によるDNAの検出	35
2-5 N-(4-ビフェニルカルボニル)-5-アミノフルオレセイン <u>2-17</u> ジリン酸エステルを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法によるDNA検出	39

2-6	まとめ	40
-----	-----	----

第3章 新規なフルオレセイン誘導体モノリン酸エステル合成とDNAの高感度検出

序	4	2
3-1	新規なフルオレセイン誘導体モノエーテル体の合成	4 2
3-2	3'-O-アラルキルフルオレセイン誘導体の蛍光特性	4 4
3-3	3'-O-アラルキルフルオレセイン誘導体のモノリン酸エステルを用いた スポットテスト法によるDNAの検出	4 6
3-4	フルオレセイン誘導体モノリン酸エステル (BNFP) とジリン酸エステルの アルカリホスファターゼの反応性とナイロンメンブレン上のDNAの定量性の 比較	4 9
3-5	BNFP を用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法におけるDNAの検 出	5 2
3-6	まとめ	5 3

第4章 異なる塩基配列を有する2種類のDNAの2段階法による同時検出

序	55
4-1 同一メンブレン上での2種類の異なったターゲットDNAの検出	56

第5章 ペルオキシダーゼ用新規蛍光基質の合成とDNAの高感度検出及び異なる塩基配列を有するDNAの同時検出

序	60	
5-1	ペルオキシダーゼ用の新規蛍光基質の合成	61
5-2	新規なフルオレセイン誘導体及び芳香族アミノ化合物を用いたペルオキシダーゼの検出	62

5-3	新規なフルオレセイン誘導体及び4-アミノフェニルベンズアミド誘導体を用いたメンブレン上のDNAの検出	75
5-4	AMMBを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション	78
5-5	同一メンブレン上での2種類の異なったターゲットDNAの1段階検出法	79
5-6	まとめ	81

第6章 酵素標識用新規ラベリング試薬の開発

序	8 2	
6-1	GA4 標識 dUTP を用いたプローブ DNA	8 3
6-2	GA4 標識 dUTP 及び GA4 標識 プローブ DNA の合成	8 6
6-3	DNA の検出感度の比較	1 0 0
6-4	Fast Tag System 用 GA4 マレイミド体の合成	1 0 9
6-5	DNA 検出感度の比較	1 1 4
6-6	まとめ	1 1 8

第7章 総括

実験の部	121
------	-----

引用文献	166
------	-----

論文リスト	172
-------	-----

参考論文リスト	173
---------	-----

謝辞	174
----	-----

緒言

DNAハイブリダイゼーション技術及び核酸塩基配列決定技術は、遺伝子診断・分子生物学・組織科学の分野において欠くことのできない基本技術である。DNAハイブリダイゼーション技術には、メンブレン上でのDNA検出であるフィルターハイブリダイゼーション法と染色体又は組織上でのDNA検出である*in situ*ハイブリダイゼーション法の2つがある。前者の方法は、特定DNA配列の検出に使われるサザンブロット法、特定のRNAの検出に使われるノーザンブロット法、特定のタンパクの検出に使われるウェスタンブロット法が知られている。またサザン法・ノーザン法より定量性の高い方法であるドットブロット法も良く用いられている。一方、*in situ*ハイブリダイゼーション法は、ある遺伝子の発現を、動物発生段階を追って調べるという面に、'80年代前半より急速に多く用いられるようになってきた。ハイブリダイゼーション法や核酸塩基配列決定法における検出系としては、従来、放射性同位元素(RI)による標識¹⁾が行われてきたが、研究者の健康管理、特別な施設・設備の必要性、取り扱い管理責任者を置く必要性、廃棄物の処理、RIの半減期、年間使用量の制限等の問題や、放射性プローブの比活性化を上げすぎるとプローブの自己崩壊が促進されるため、RI法の高活性化は限界があり原理的にこれ以上の感度の向上は見込まれないといった観点から非RI法の開発が重要視されてきた。

非RI法には、酵素標識を行いシグナルを発生させることができる基質と反応させる酵素法と、シグナル発生物質でDNAを直接標識する非酵素法に分けられる。

非酵素法には、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)ーテトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)のエネルギー・トランスファーを利用した蛍光法²⁾があり、さらに、未反応のプローブを除く操作を必要としない方法としてアクリジニウム・エステルを用いた化学発光法³⁾やルシフェリン・ルシフェラーゼ系を利用した生物発光法⁴⁾がある。しかし、これらの方法をフィルターハイブリダイゼーション法に用いた場合、いずれの場合も、DNAの検出感度が1ng以上と低いため実用的ではない。これは、DNAの固定担体であるメンブレン自身が蛍光を持つため、非酵素法では十分な

S/Nが得られないからである。非酵素法における蛍光法は、主として*in situ* ハイブリダイゼーションに用いられている^{5, 6, 7)}。プローブをビオチンで標識し、ストレプトアビジンに結合したFITCの蛍光を検出する蛍光法は、ヒト中期染色体上で数kb以下の単一コピー遺伝子を検出することができる⁸⁾。この方法は非常に高感度であるが、FITCの蛍光の退色が早いため検出に熟練を要しさらに画像処理法が必要であり高額な機器が必要であるという欠点がある。最近、(株)アイシン・コスモス研究所と北海道大学の共同研究グループによりFITC法より高感度で簡便な酵素を用いた蛍光検出法が報告された^{9, 10)}。また、この検出法を用いて、サルモネラ菌¹¹⁾やO-157¹²⁾の食中毒菌の最も迅速高感度な検出に成功した例が報告されている。

このようなことから、フィルターハイブリダイゼーション法では、現在、酵素反応により高い検出感度を得られる酵素法が最もよく使われてきている。酵素法の感度は酵素と基質の組み合わせや酵素の結合後の比活性で決まる。酵素としてはアルカリホスファターゼ (ALP) やペルオキシダーゼ (POD) が比活性が高いため良く用いられている。プローブDNAに酵素を標識する際には、酵素の比活性を下げないことが必要である。標識法として、化学的方法で直接プローブDNAに導入する方法¹³⁾やUV照射によりチミンダイマーを導入する方法¹⁴⁾が行われているが感度の面で劣る。高感度な方法として、ハプテンであるディゴキシゲニン¹⁵⁾やビオチン¹⁶⁾をニクトランスレーション法やランダムプライマー法でプローブDNAに導入し、抗体を介して酵素を結合させる方法が良く用いられている。ビオチンの場合、感度の面で若干劣るがストレプトアビジンを介して酵素を標識する方法¹⁷⁾も知られている。基質としては、発色基質・化学発光基質が知られている。発色基質としては、ALPの基質である5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatae / nitro blue tetrazolium (BCIP / NBTTM)¹⁸⁾やPODの基質であるジアミノベンジジン (DAB)¹⁹⁾は、*in situ*ハイブリダイゼーションに於いて単一コピー遺伝子の検出に成功した^{20, 21)}という報告例があるが、再現性がない。また、フィルターハイブリダイゼーションでは、RI法に比べて感度が低い。化学発光基質としては、PODの基質であるルミノール^{22, 23, 24)}、ALPの基質であるダイオキセタン系のリン酸体化合物である adamantyl-1,2-dioxetane phosphate (AMPPDTM)²⁵⁾、Disodium-3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3,3,1,1^{1,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate (CSPDTM)²⁶⁾、

CDP^{STAR TM 2 7)} が市販されている。特にALPの基質であるダイオキセタン系の基質は、ディゴキシゲンをハプテンとするキット^{2 8)} 及びアビジン-ビオチン系のキット^{2 9)} の両方に用いられており、現在、ディゴキシゲニン-AMPPD法は非RI法の中でも最も高感度を達成している^{3 0)}。AMPPD法は、検出感度においてRI法の感度と同等であるが、検出シグナルをX線フィルムに取り込むため、ダイナミックレンジが狭いというRI法の欠点をそのまま引き継いでいるという問題点がある。最近、AMPPDをクロロ化したCSPD^{3 1)} が開発されたが、酵素反応時間が短縮されただけで、検出感度は向上していないので、現在のところ、これらの化学発光法は、RI法の代替法となっている。実施例として、マルチプレックスシーケンスといったDNAの塩基配列決定法に応用されている^{3 2、3 3)}。それ以外の発光法として、生物発光現象のプロープへの応用も試みられている。ルシフェラーゼとエクオリンという2種類の生物発光酵素について研究されたが、プロープとして使用したときの酵素の失活が起こるため実用化されていない。

このような状況下の中で、蛍光検出法は、化学発光物質より非常に安定な物質であり、さらに化学発光法では絶対達成できないマルチカラープロープ技術に応用できるという非常に大きな利点がある。又、発色物質は、蛍光物質同様マルチカラープロープ技術に応用できるが、発光量子収量が蛍光物質より低いという欠点がある。実際、DNA塩基配列決定・*in situ*ハイブリダイゼーション・通常の非特異的核酸検出であるエチジウムブロマイド染色・PCR産物の検出など幅広い分野で実用化されている。しかし、フィルターハイブリダイゼーション法においては蛍光検出法は、ほとんど開発されずに来た。その理由として、ナイロンメンブレンフィルターが自家蛍光を持ち、既存の蛍光色素はそのバックグラウンド蛍光と同色であるため、理論上で、高感度を達成することができないと考えられた。さらに、ナイロンメンブレン沈着性の蛍光基質が開発されていないことより、発色法の検出感度を向上させる際に蛍光検出法の検討無しに発光法が採用されるに至ったと考えられる。

蛍光物質が持つ優れた特性をフィルターハイブリダイゼーション法に適用できれば、高感度検出・異なった塩基配列を持つDNAの同時検出が可能となり、今まで解明されなかった新しい遺伝子の検出や診断の確立が期待できる。メンブレン上のDNAを高感度に検出できる酵素免疫測定法を利用した新しい蛍光検出法の開発を行うためには、酵

素の新しい蛍光基質の開発が必要であるので、以下の観点から新規合成蛍光基質のスクリーニングを行った：1) 480 nm以上の長波長域に蛍光を示す。2) 酵素反応後の蛍光生成物がナイロンメンブレンに対し高い沈着性を持つ。3) 相対蛍光強度が十分に高い。条件1) は、ナイロンメンブレンの自家蛍光が、短波長域から460 nmまでの幅を持つため、S/N比を向上させるためには、より長波長の蛍光が必要。条件2)・3) は、高感度を達成するために必要であり、特に条件2) は、解像度を高めるためにも必要である。

第1章では、酵素として最も活性が高いアルカリホスファターゼ (ALP) を用い、酵素可水分解体のナイロンメンブレンへの沈着性を向上させるために、リジットな分子骨格を持つ新規なナフタレン及びアントラセン誘導体の合成を行い、これらの誘導体の蛍光特性を測定した。次いで、これらの誘導体をリン酸エステル体に変換し、そのリン酸エステル体を用いて、DNAの検出限界を検討した。

第2章では、ALP基質で、第1章で示した最もDNAを高感度に検出できる蛍光基質の加水分解体とは違った蛍光色を持ち、その基質と同等の検出感度を有する新規な蛍光色素の開発を行った。新規な蛍光色素として、非常に蛍光強度や発光量子収率が高い、フルオレセインに着目し、その誘導体を合成し、蛍光特性を測定し、第1章と同様なDNAの検出感度に関するスクリーニングを行った。

第3章では、さらに酵素反応時間を短縮し、バックグランド蛍光を完全になくす目的で、フルオレセイン誘導体モノリン酸体を合成し、同様の評価を行った。フルオレセイン誘導体モノリン酸体を合成するにあたって、フルオレセインはフェノール性のOH基を2個有するため片側のOH基にのみ選択的にかつ高収率で置換基を導入することは難しい。今までには、非常に低収率で置換基を導入する方法しか報告されていない。そこで、高収率なフルオレセインモノ置換体の合成方法を検討した。

第4章では、第1章と第3章で得た最も優れた蛍光基質を用いて、2段階法での異なった塩基配列を持つDNAの同時検出を行った。

第5章では、1段階法による異なった塩基配列を持つDNAの同時検出法を開発を行った。そのためには、2種類のDNAプローブにそれぞれ異なった酵素を標識する必要がある。2種類の酵素としてALPと西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼを選択した。そ

こで、ペルオキシダーゼの蛍光基質をとなる種々のフルオレセイン誘導体及び芳香族アミン誘導体を合成し、DNA検出感度評価した。次いで、1段階法で、異なった塩基配列を持つDNAの同時検出を行った。

第6章では、プローブDNAに酵素を標識するための新しいラベリング試薬の開発を行った。標識方法としてdUTP法とFast Tag System法を利用し、それぞれに用いることが出来るジベレリンA4誘導体を合成し、DNAの検出感度を評価した。

第7章では、本研究を総括する。

第1章 新規なナフタレン誘導体又はアントラセン誘導体の合成とDNAの高感度検出

序

DNAハイブリダイゼーション技術を利用したメンブレン上でのDNA検出であるフィルターハイブリダイゼーション法は、特定のDNA塩基配列の検出に使われる方法である。従来、この検出には、放射性同位元素（RI）による標識方法が用いられてきたが、近年は、研究者の健康管理、特別な施設の必要性などの問題から非RI法に置き変わりつつある。特に最近では、最も高感度なDNA検出方法として、酵素標識法を利用した化学発光法^{25, 26, 27)}が開発されたことにより、飛躍的に非RI法が延びてきている。しかし、この化学発光法でもRI法を凌駕するに至っていない。そこで、酵素基質として安定で、発光量子収率が高く、定量性に優れた新規な蛍光化合物を合成し、それを用いてメンブレン上のDNAをさらに高感度にできる新しい蛍光検出法の開発を検討した。

ナイロンメンブレン上のDNAを高感度に検出するにあたって、酵素として、最も高い活性を有するアルカリホスファターゼを選択し、さらに、アルカリホスファターゼを標識するためのラベリング試薬として最も高感度にDNAを検出する試薬として知られているディゴキシゲニン^{28, 30)}を選択した。酵素標識法によるDNAの検出法の概念図を図1-1に示す。

ナイロンメンブレン上に固定化したターゲットDNAに、ディゴキシゲニン標識したプローブDNAを相補的結合させる。次いで、アルカリホスファターゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体を結合させ、次いで、基質を反応させる。この加水分解体は、水に対して不溶性となり、蛍光色素としてその場所に沈殿化する必要がある。この蛍光色素が発する蛍光シグナルによりナイロンメンブレン上のDNAを検出する。検出方法としては、この蛍光シグナルをカメラに取り込み、写真として保存する。これらの基質の条件として、酵素反応前は、無蛍光で水溶性であるが、酵素反応後は、高い蛍光を発する蛍光色素となり水不溶性となりその場所に沈着する。このような特長を持つ種々のナフタレン誘導体とアントラセン誘導体系の蛍光基質の合成を行った。

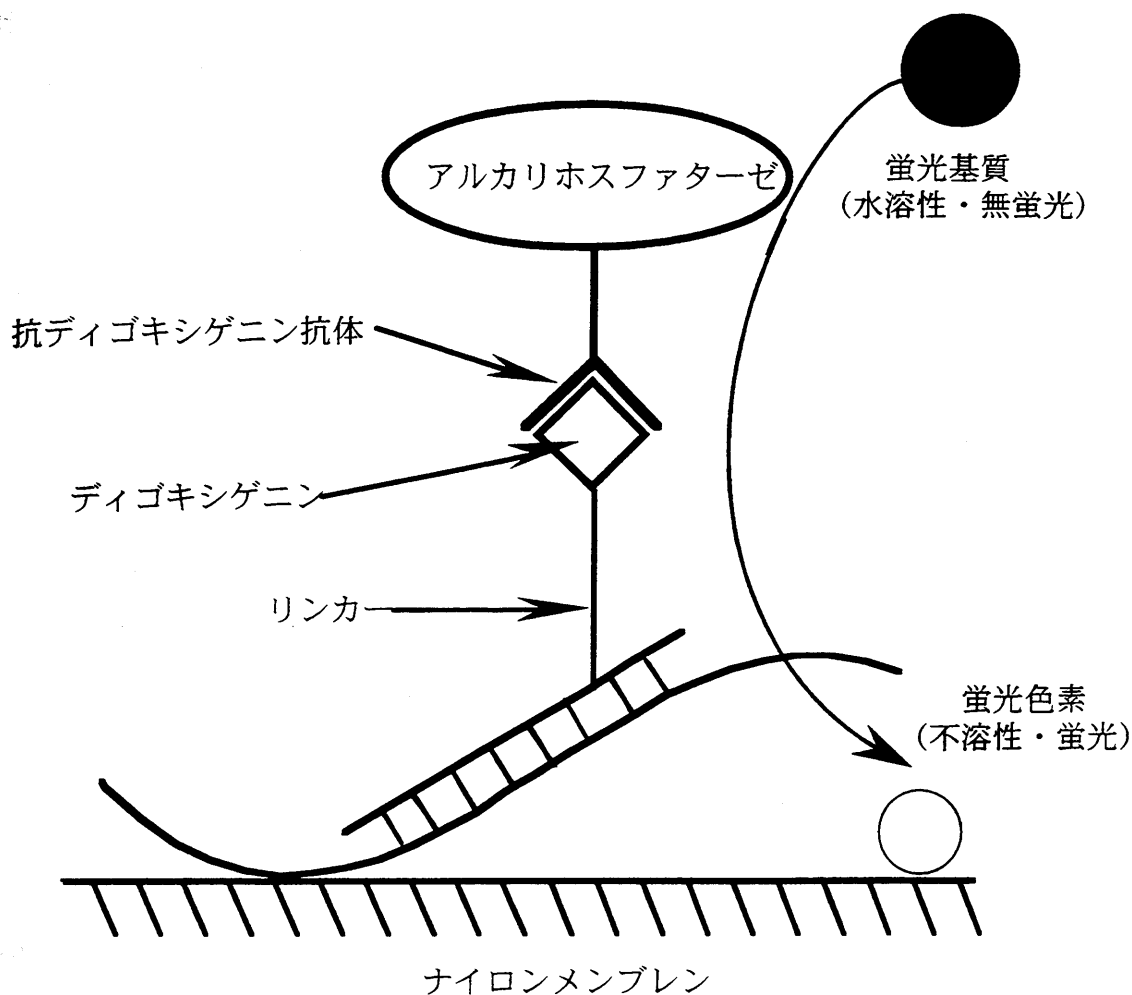


図1-1

1-1 ナフトレン誘導体の蛍光特性及びスポットテスト法によるDNAの検出

表1-1に、ナフトール誘導体の最大励起波長・最大蛍光波長・相対蛍光強度及びスポットテスト法によるDNAの検出感度を示す。スポットテスト法とは、ナイロンメンブレンにディゴキシゲニン標識したDNAをある希釈倍率でスポットし、次いで、アルカリホスファターゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体をカップリングさせ、次いで、アルカリホスファターゼの蛍光基質であるナフトレン誘導体リン酸エステルを反応させ、その蛍光シグナルよりDNAスポットの存在量を確認する方法である。蛍光強度は、商品名がナフトールAS-MX（シグマ社）であるN-（2,4-ジメチルフェニル）-3-ヒドロキシー-2-ナフトレンカルボキサミド^{3,4)}の蛍光強度に対する相対

値で示した。リン酸化されたN-フェニル-3-ヒドロキシ-2-ナフタレンカルボキサミド 1 を用いると少なくとも10 fgのスポットされたDNAが検出できた。しかし、そのスポットから加水分解生成物のわずかな拡散が観察された。カルボキサミド基に結合しているフェニル基のモノ置換体の中で、N-(2-ビフェニル)-3-ヒドロキシナフタレンカルボキサミド 1-11 が5 fgという最も高い検出感度を示した。この誘導体 1-11 のリン酸体をHNPPと略す。

このスポットは、拡散が全くなくさらにバックグランド蛍光も全く観察されなかった。N-2'-メチルフェニル置換した誘導体 1-2 も 1-11 (HNPP) と同等の高い検出感度を示したが、スポットのわずかな拡散が観察された。そのフェニル基への色々な置換基による効果を評価した。2'-イソプロピル、2'-メトキシ、4'-クロロ置換した誘導体 1-3 ~ 1-5 は、10 fgという高い検出感度を示した。4'-シアノ、アセトアミド置換した誘導体 1-6、1-8、1-9 は、加水分解体のメンブレンに対する吸着性が非常に弱いので、この系には適していないことが分かった。

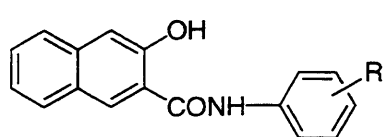
3'-ニトロ置換体7は無蛍光であった。3'-フェニルや2'-フェニル-2-フェニル置換した誘導体 1-10、1-12 は検出感度を悪くした。ジメチル誘導体 1-13、1-14 はバックグランド蛍光が高いため検出感度はモノメチル誘導体 1-2 より悪かった。イソプロピル置換体 1-15、1-16 もスポットの拡散が観察されさらにバックグランド蛍光も観察されたためモノ置換体より悪くなった。ナフタレン環の8位にブロモ基や7位にヒドロキシル基が置換している誘導体は、ナフタレンの3位にヒドロキシル基が置換している誘導体に比べて、感度の向上は見られなかった (1-31 と 1-13、1-32 と 1-4、1-49 と 1-11 を参照)。次に、フェニル基とは違う置換基を有する3-ヒドロキシ-2-ナフタレンカルボキサミド誘導体进行评估した。カルボキサミドの基のN基に置換したN-ナフチル誘導体 1-33 と 1-34 は、蛍光強度がより悪くなった。また、ジベンゾフラノ基やアントラセニル基を有する誘導体 1-35 と 1-36 は、バックグランドが非常に高くなった。フルオレセインを置換基とする誘導体は 1-46 ~ 1-48 は、水溶性が増大したので、検出感度は極端に悪くなった。アミノペリレンを直接ナフトエ酸に結合させた誘導体 1-38 ~ 1-40 は、誘導体 1-13 に比べて蛍光強度が20から100倍増

えたが、それらの化合物は、アルカリホスファターゼとの反応性が非常に悪かった。この事実は、ペリレンが立体的に非常に嵩高いために、立体障害によって基質反応が低下したと考えられたので、アルキル直鎖やオレフィンのスペーサーを介してペリレンをナフタレン環に結合させた誘導体 1-4-1 と 1-4-2 を合成した。その結果、誘導体 1-4-2 は、アルカリホスファターゼにより加水分解することができ、80 fgのDNAを検出することができた。しかし、バックグラウンドは非常に高かった。より長いスペーサーを有する誘導体 1-4-3 と 1-4-4 は、リン酸体が非特異的にナイロンメンブレンに吸着するため、非常にバックグラウンドが高くなった。復素環誘導体 1-5-1 と 1-5-2 は、加水分解体のメンブレンに対する吸着性が非常に悪く、さらに、リン酸体が非特異的にメンブレンに吸着しやすいためバックグラウンドが非常に高くなった。

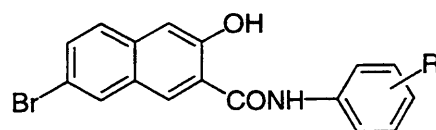
以上をまとめると、蛍光強度が高いことが、必ずしも検出感度を向上させることには繋がらない。なぜならば、OH体の蛍光強度が向上することによって対応するリン酸体の蛍光も向上し、その結果、S/N比が低下することがあるからである。実際にHNPPは、ナイロンメンブレン上のDNAを最も高感度に検出できたが、相対蛍光強度は、0.3であった。また、OH体のナイロンメンブレンに対する吸着性とリン酸体の水溶性は、高い検出感度や高い解像度を示すには、最も重要な要因であった。なぜならば、リン酸体の水溶性が低いとそのリン酸体が非特異的にナイロンメンブレンに吸着し、その結果、ナイロンメンブレン上でのバックグラウンドノイズ蛍光が向上するからである。

ナフタレン誘導体 1-1 ~ 1-52 の構造を図 1-2 に示す。

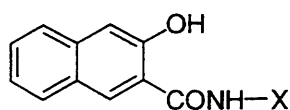
図 1-2 ナフタレン誘導体 1-1 ~ 1-52 の構造式



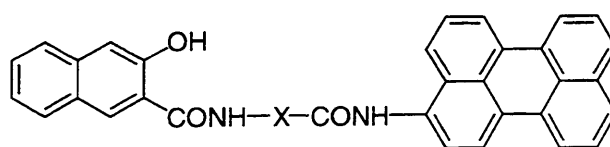
No. 1-1~1-30



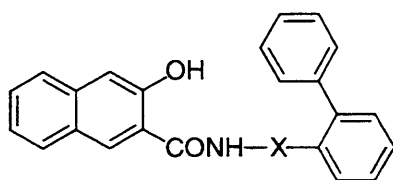
No. 1-31, 1-32



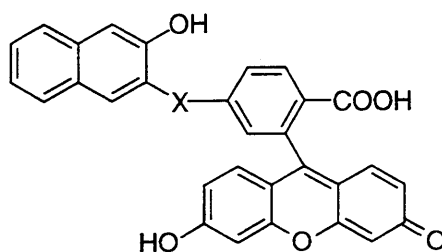
No. 1-33~1-40



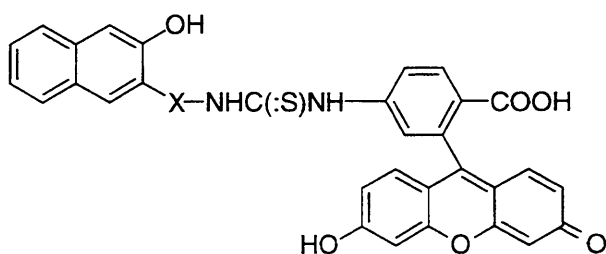
No. 1-41~1-44



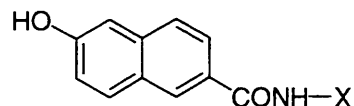
No. 1-45



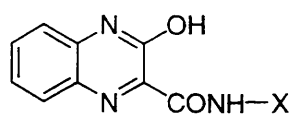
No. 1-46



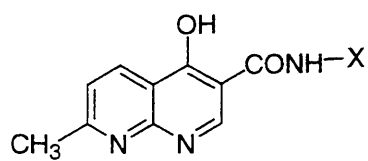
No. 1-47, 1-48



No. 1-49, 1-50



No. 1-51



No. 1-52

表 1-1 ナフタレン誘導体の蛍光特性及びDNAの検出感度

NO.	R	detection limit (fg)	fluor. properties in solution			fluor. properties on membrane	
			λ_{ex}	λ_{em}	relative fluorescence intensity	substantivity of a OH form	nonspecific adsorption of a phosphate ester
1-1	none	10	348	498	0.41	+	low
1-2	2-methyl	5	430	493	0.74	±	low
1-3	2-isopropyl	20	405	480	0.39	+	low
1-4	2-methoxy	10	437	494	0.56	+	low
1-5	4-chloro	20	400	515	0.3	+	low
1-6	4-cyano	5000	356	522	1.2	-	high
1-7	3-nitro		no fluorescence			+	
1-8	3-acetoamide	5000	437	512	1.0	-	high
1-9	4-acetoamide	none	362	480	2.5	none	high
1-10	3-phenyl	200	437	496	1.3	±	moderate
1-11	2-phenyl	5	290	510	0.3	+	low
1-12	2-phenyl-2'-phenyl	40	315	510	1.7	+	moderate
1-13	2,4-dimethyl	40	436	490	1.0	+	moderate
1-14	3,5-dimethyl	20	316	505	0.4	+	moderate
1-15	2-isopropyl-6-methyl	200	428	484	0.4	±	moderate
1-16	2,6-diisopropyl	200	341	388	0.9	±	moderate
1-17	2,4-dimethoxy	20	436	495	0.5	+	low
1-18	3,5-dimethoxy	20	316	506	0.2	+	low
1-19	2-methyl-4-chloro	20	335	500	0.3	+	low
1-20	2-methyl-5-chloro	10	266	509	0.3	+	low

NO.	R	detection limit (fg)	fluor. properties in solution			fluor. properties on membrane	
			λ_{ex}	λ_{em}	r.f.i.	substan tivity of a OH form	nonspecific adsorption of a phosphate ester
1-21	2-methyl-4-bromo	20	441	501	2.3	+	low
1-22	2-bromo-4-methyl	40	435	508	0.8	+	moderate
1-23	2-methoxy-5-chloro	40	400	515	0.3	+	moderate
1-24	2-phenyl-5-methoxy	200	420	490	1.8	\pm	moderate
1-25	2,6-diphenyl	20	285	347	0.7	+	low
1-26	2,4,6-trimethyl	250	344	405	0.7	\pm	moderate
1-27	3,4,5-trimethoxy	125	398	508	1.1	\pm	moderate
1-28	5-chloro-2,4-dimethoxy	2000	337	506	1.1	—	high
1-29	4-chloro-2,5-dimethoxy	400	420	491	1.0	—	moderate
1-30	4-chloro-2-methoxy-5-methyl	400	395	494	0.2	—	moderate
1-31	2,4-dimethyl	40	440	501	0.4	+	moderate
1-32	2-methoxy	20	450	508	0.6	+	low
1-33	1-naphthyl	200	428	493	0.4	+	moderate
1-34	2-naphthyl	100	436	498	0.9	+	moderate
1-35	2-anthryl	10	337	490	0.2	+	high
1-36	2-fluorene	1000	330	480	0.2	+	high
1-37	2-(6-methylbenzothiazolyl)	5000	382	509	1.4	—	high
1-38	2-perylenyl	N. D.	412	436	22.7	N.D.	high
1-39	1-perylenyl	N. D.	438	472	52.7	N.D.	high
1-40	3-perylenyl	N. D.	417	449	102.3	N.D.	high

NO.	R	detection limit (fg)	fluor. properties in solution			fluor. properties on membrane	
			λ_{ex}	λ_{em}	r.f.i.	substan tivity of a OH form	nonspecific adsorption of a phosphate ester
1-41	CONH(CH ₂) ₁₁	1000	412	442	46.5	±	high
1-42	(CH=CH) ₂	80	442	468	71.3	±	moderate
1-43	(CH=CH) ₄	N.D.	438	469	36.1	N.D.	high
1-44	CONH-Ph-CH=CH	N.D.	437	469	71.3	N.D.	high
1-45	CH=CH-CH=CH	400	368	470	0.07	—	moderate
1-46	(CH=CH) ₂ -CONH	2000	345	475	0.25	—	high
1-47	CH=CH-CONH-Ph	2000	484	512	1.5	—	high
1-48	(CH=CH) ₂ CONH(CH ₂) ₅ CONH-Ph	10 ⁴	438	510	2.0	—	high
1-49	2-biphenyl	10 ⁴	266	462	0.4	+	high
1-50	3-perylenyl	N.D.	360	512	0.04	N.D.	high
1-51	3,5-dimethylphenyl	5000	370	450	0.05	—	high
1-52	3,5-dimethylphenyl	2500	336	472	0.6	—	high

1-2 アントラセン誘導体の蛍光特性とそれを用いたスポットテスト法によるDNAの検出

N-アリール置換した3-ヒドロキシ-2-アントラセンカルボキサミド誘導体の蛍光特性とそれを用いたスポットテスト法によるDNAの検出感度評価結果を表1-2に示す。カルボキサミド基のN基に結合しているフェニル基の置換基が、ジ置換体及びトリ置換体1-56、1-62は、モノ置換体1-53、1-55に比べて検出感度は悪かった。この結果は、ナフタレンカルボキサミド誘導体と同じ結果である。ナフタレンカルボキサミド誘導体とアントラセンカルボキサミド誘導体の間で、置換基の効果で幾つかの異なった結果が観察された。1-53と1-2、1-54と1-4、1-55と1-11を比較すると、アントラセンカルボキサミド誘導体のモノ置換体は、ナフタレンカルボキサミド誘導体のモノ置換体より検出感度が低いことが分かった。2'、4'位へのジメチル置換基は、両方の誘導体(1-57と1-13)においてほとんど同じ検出感度を示したが、一方、ジメトキシ置換体(1-59と1-17)は、ナフタレンカルボキサミド誘導体の方が高い検出感度を示した。3'、5'位へのジメトキシ基の導入は、1-58と1-14を比較して分かるように、アントラセン誘導体の方は、極端に検出感度が低くなった。N-フェニル基への他の置換基の導入は、全てアントラセンカルボキサミド誘導体1-60、1-61、1-62の方が、ナフタレンカルボキサミド誘導体1-21、1-19、1-27より検出感度は悪くなった。次にストークス・シフトに関して評価した。このストークス・シフトとは、G. G. Stokesが見出した法則で、一般に吸収光の振動数に比べて発光の振動数は小さくなるという法則である。即ち、励起されるときに吸収した光のエネルギーは、放射されるときに光のエネルギーとは一致しない。そこで、両基質のストークス・シフトを評価した結果、ほとんどのナフタレンカルボキサミド誘導体のストークス・シフトは、アントラセンカルボキサミド誘導体のストークス・シフトに比べて非常に大きいことが分かった。例えば、ナフタレンカルボキサミド誘導体は、150～200 nmであるが、一方のアントラセンカルボキサミド誘導体は、最大でも117 nmで、ほとんどが30～60 nmであった。ほとんどのアントラセン誘導体は、ナフタレン誘導体より検出感度が低かった。これは、アントラセン誘導体のリン酸体のナイロンメ

ンブレンへの非特異的吸着によるバックグラウンド蛍光が高かったためである。

アントラセン誘導体 1-53 ~ 1-62 の構造を示す

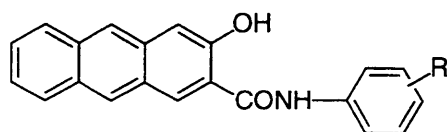


表 1-2 アントラセン誘導体の蛍光特性及びDNAの検出感度

NO.	R	detection limit (fg)	fluor. properties in solution			fluor. properties on membrane	
			λ_{ex}	λ_{em}	relative fluorescence intensity	substant ivity of a OH form	nonspe.a dsor. of a O-P form
1-53	2-methyl	20	415	480	1.1	+	low
1-54	2-methoxy	20	417	462	1.5	+	low
1-55	2-phenyl	20	318	406	9.0	+	low
1-56	2-phenyl-2'-phenyl	2000	434	472	5.3	-	high
1-57	2,4-dimethyl	40	435	465	2.0	+	moderate
1-58	3,5-dimethyl	2000	360	477	0.75	-	high
1-59	2,4-dimethoxy	80	436	466	0.4	±	moderate
1-60	2-methyl-4-bromo	none	409	467	1.1	N.D.	high
1-61	2-methyl-4-chloro	400	412	465	1.4	-	moderate
1-62	3,4,5-trimethoxy	2000	435	465	1.1	-	high

1-3 ナフトール誘導体 1-11 の蛍光特性

UVスペクトルで、 0.3×10^{-4} Mで誘導体 1-11 のpH依存性を調べた。pHが10以下では、溶解しないためそれ以上で評価した。その結果、励起波長・蛍光波長ともpHによる影響はなかった。ナフトール誘導体 1-11 の酸解離定数は、 $pK_a = \text{約}11.5$ であった。2-ナフトール誘導体の pK_a 値は、一般的に、8～10の間であるので、ナフトール誘導体 1-11 の中性領域の値は、分子内水素結合が起きているためだと考えている。

図1-3に緩衝液中の励起スペクトルと蛍光スペクトルのpH変化による影響を示した。pHが、10.5～13.5の間では、最大励起波長は、410 nmで、最大蛍光波長は、510 nmであった。

図1-3a 緩衝液中のナフトール誘導体 1-11 の励起スペクトルのpHによる影響

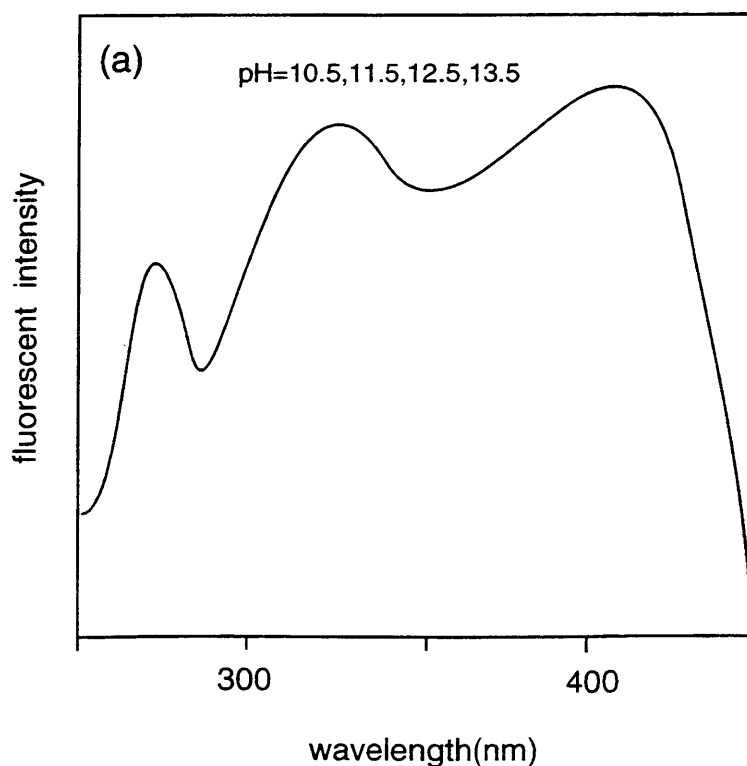
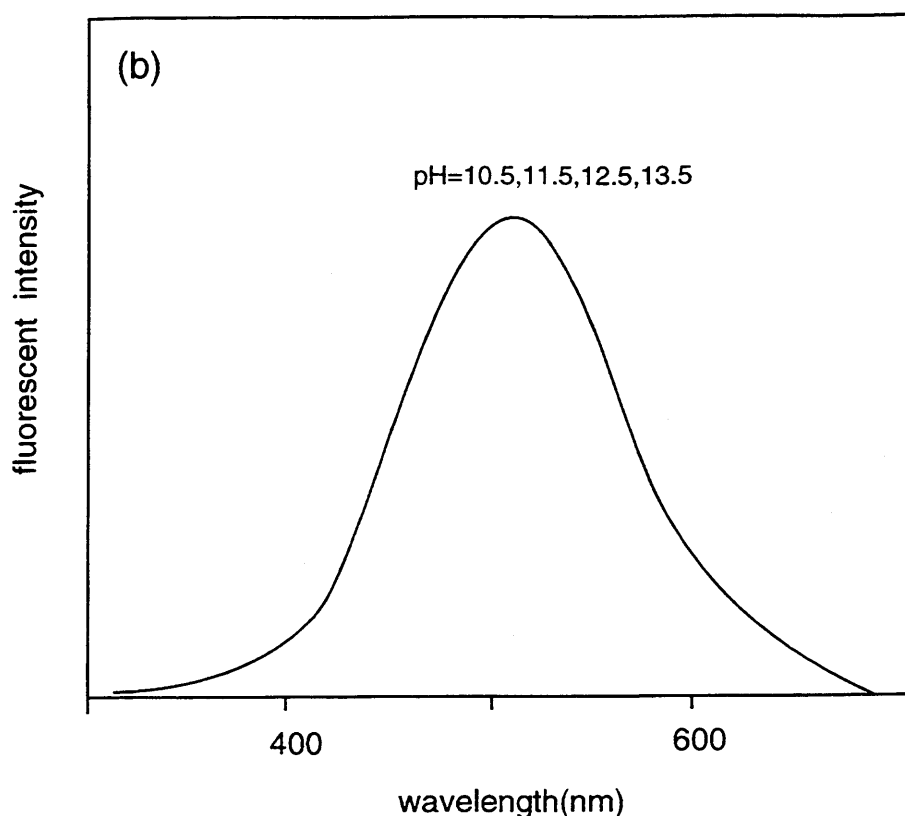


図 1-3b 水溶液中のナフトール誘導体1-11の蛍光スペクトルのpHによる影響



次に、ナイロンメンブレン上におけるナフトール誘導体1-11の励起スペクトルと蛍光スペクトルのpHによる影響を測定した。方法として、ジメチルホルムアミドに10mg/mlの濃度でナフトール誘導体1-11を溶解し、その溶液2 μ lをナイロンメンブレンにスポットし、そのメンブレンをリン酸水素二ナトリウムとリン酸二水素ナトリウムと水酸化ナトリウムで調製したpH9.5~13.5の緩衝液に2分間浸した後、緩衝液で濡れた状態のそのナイロンメンブレンを蛍光分光光度計で固体測定治具ホルダーに固定して、励起スペクトル及び蛍光スペクトルを測定した。図1-4aにナイロンメンブレン上のナフトール誘導体1-11の励起スペクトルのpHによる影響を示した。また、図1-4bにナイロンメンブレン上のナフトール誘導体1-11の蛍光スペクトルのpHによる影響を示した。

図1-4a ナイロンメンブレン上のナフトール誘導体 1-11 の励起スペクトルにおけるpHの影響

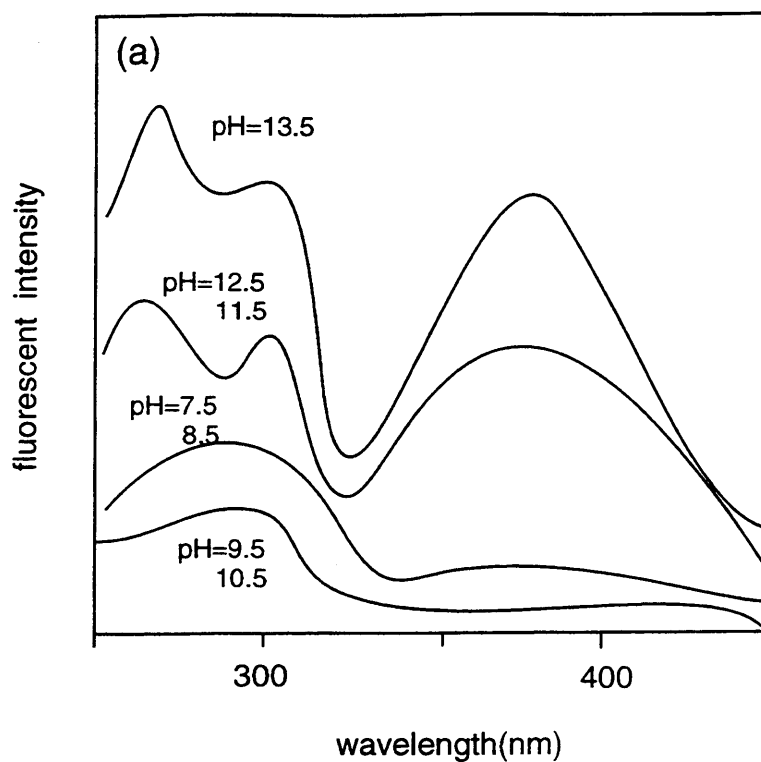
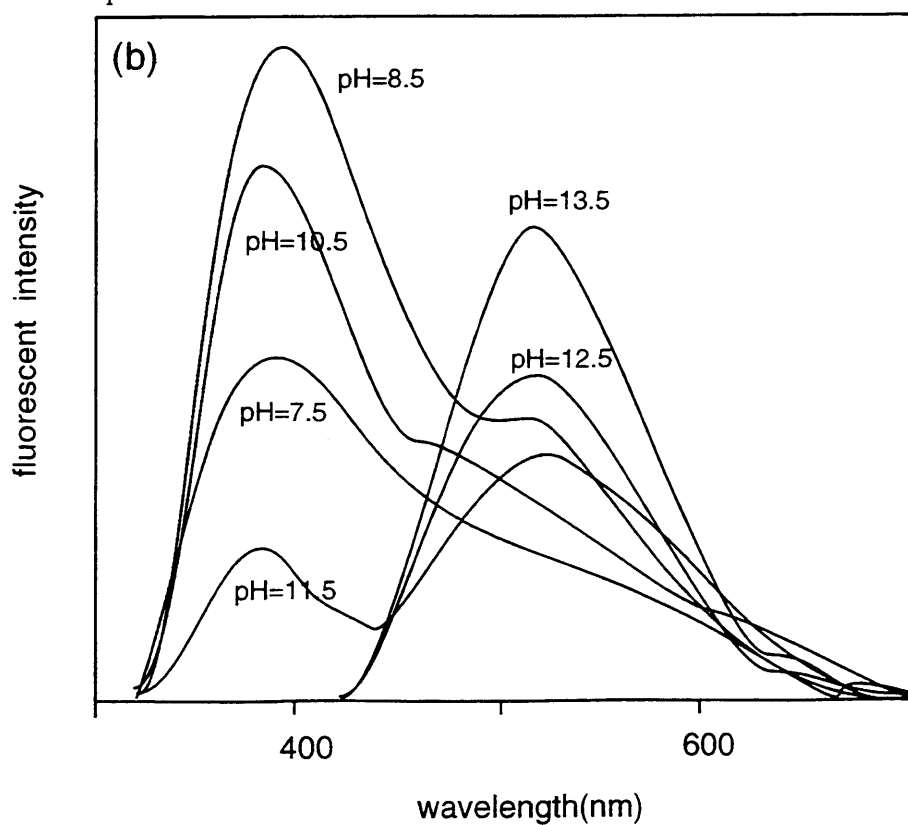


図1-4b ナイロンメンブレン上のナフトール誘導体 1-11 の蛍光スペクトルにおけるpHの影響



ナイロンメンブレン上におけるナフトール誘導体 1-11 は、励起スペクトルと蛍光スペクトルどちらの場合もpHを変えることによって大きく変化した。励起スペクトルの場合は、pH7.5と8.5、pH9.5と10.5、pH11.5と12.5がそれぞれ同じ励起スペクトルを示した。また、pH8.5からpH9.5に変わると強度が減少し、さらにpHを上げていくと今度は、強度がpH8.5の時より高くなった。一方、蛍光スペクトルにおいては、さらに劇的な変化が見られた。pH7.5～10.5までは、最大蛍光波長は410nmであったが、さらにアルカリ性になると510nmまで長波長シフトした。さらに詳細に観察すると、pH7.5からpH8.5にすると蛍光強度が非常に高くなり、さらにpHを1ずつ11.5まで上げると順に蛍光強度は減少していった。pH11.5の時、最大蛍光波長は510nmまで長波長シフトした。しかし、pH11.5では410nmにもピークが観察されるが、さらにpHを上げ12.5にすると510nmのピークのみ観察される。さらにアルカリ性になると蛍光強度は向上した。また、1-11を固定化したナイロンメンブレンをpH13.5の緩衝液に浸しスペクトルを測定後、そのメンブレンをすぐにpH7.5の緩衝液に5分間浸した後スペクトルを測定するとpH7.5の時のスペクトルと一致した。即ち、メンブレン上の1-11のpHによる変化は、可逆的であることがわかった。以上のことをまとめると、ナイロンメンブレンの表面は、1-11の蛍光スペクトルのpH依存シフトにとって絶対必要な存在となっていることが分かった。この事実は、アニオン領域で、ナイロンメンブレンと特異的な相互作用、例えば、分子間水素結合を示唆していると考えられる。又、ナフトール誘導体 1-11 のリン酸エステル (HNPP) のナイロンメンブレン上での非常に高いDNAの検出感度は、この様なナイロンメンブレンとの相互作用に起因しているかもしれない。

1-4 N-(2-ビフェニル)-3-ヒドロキシ-2-ナフタレンカルボキサミドリン酸エステル (HNPP) を用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法によるDNAの検出

サザンブロットハイブリダイゼーション法とは、例えば λ DNAを*Hind* IIIという制限酵素で消化したDNAを用いて、そのDNAを0.8%アガロースゲル上で、電気泳動法によりサイズ分離する。次いで、アルカリ水溶液にそのアガロースゲルを浸すことにより、2本鎖DNAを1本鎖DNAに変性する。次いで、そのDNAをナイロンメンブレンに転写し、そのメンブレンにUV光を照射することにより、そのDNAをナイロンメンブレン上に固定化する。次いで、ディゴキシゲン標識した λ DNAを*Hind* IIIという制限酵素で消化したプローブDNAをターゲットDNAと相補的結合させる。次いで、リン酸緩衝液で、非特異的なプローブDNAを洗浄し除く、次いで、アルカリホスファターゼ標識抗ディゴキシゲニン抗体複合体をカップリングさせ、再度、リン酸緩衝液で非特異的複合体を洗浄し除く、次いで、酵素反応を行い得られたシグナルにより特異的なDNAの塩基配列を検出する方法である。

全長が48502塩基対の λ DNAを用いたスポットテストで、5 fgの検出感度は、 3.1×10^{22} mol に匹敵する。そして、ハプテンであるディゴキシゲニンは、最適標識化条件では、36塩基対に1分子ずつ導入されると言われている³⁵⁾。よって、 λ DNAを用いたスポットテストで、5 fgの検出感度は、ディゴキシゲニンの検出感度として約 4.2×10^{19} molに匹敵する。アルカリ性ホスファターゼの検出感度としては、ディゴキシゲニンと抗ディゴキシゲニン抗体は、1:1でカップリングし、抗ディゴキシゲニン抗体とアルカリ性ホスファターゼは、1:3の比率でカップリングすると言われている³⁶⁾ので、計算すると、アルカリ性ホスファターゼの検出感度は約 1.3×10^{18} molとなる。N-(2-ビフェニル)-3-ヒドロキシ-2-ナフタレンカルボキサミドリン酸エステル (HNPP) を用いたサザンブロットハイブリダイゼーションの結果を、図1-5に示す。

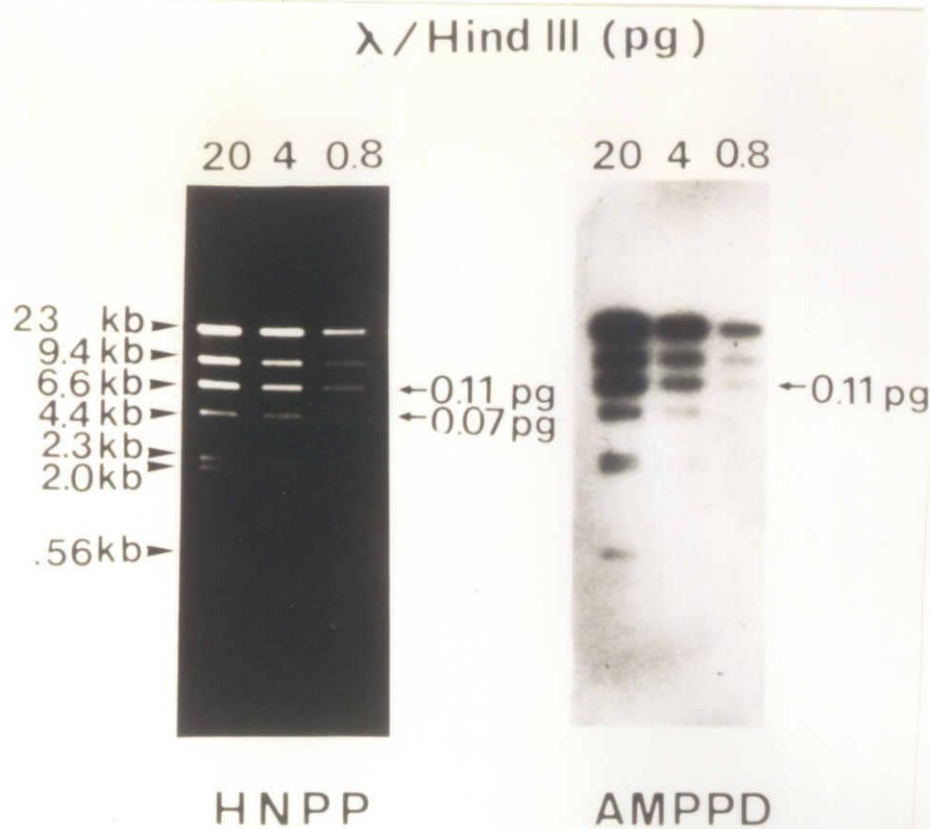


図 1-5

それぞれのレーンに注入したDNA量は、左側のレーンからそれぞれ、20 pg、4 pg、0.8 pgである。比較として、今まで知られているアルカリホスファターゼの基質の中で、最も高感度にDNAを検出できる化学発光基質であるAMPPD™も同様にサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。その結果、それぞれのDNAバンドの解像度は、HNPPの方が、AMPPDよりかなり優れていることが判明した。検出感度においては、HNPPを用いた場合は、70 fg (2.5×10^{-20} mol)であったが、AMPPDを用いた場合は、それより悪かった。検出感度70 fgは、アルカリホスファターゼの検出感度として、 5.9×10^{-18} mol に匹敵する。サザンブロットハイブリダイゼーション法でのDNAの検出感度が、スポットテスト法より低いのは、ナイロンメンブレンへのターゲットDNAへの転写効率及びターゲットDNAとプローブDNAとのハイブリダイゼーション効率が影響しているためである。

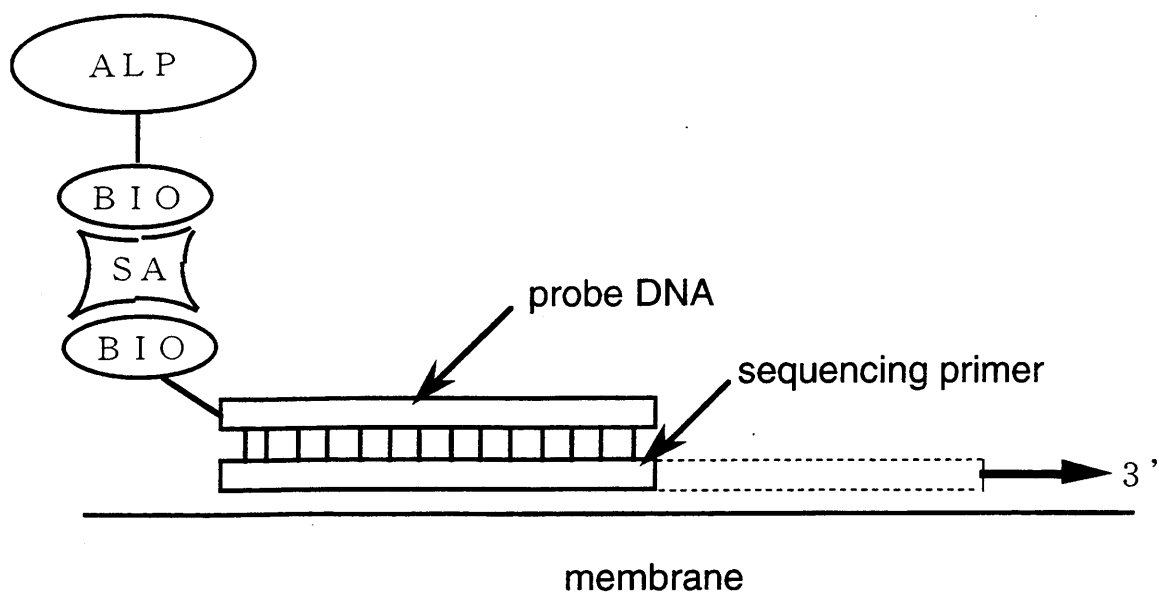
DNA検出に対して、化学発光法は、有用であると幾人かの研究者が報告している^{37, 38, 39, 40, 41)}。その中で、化学発光法は、発色法より検出感度が高いと報告されてきたが、本研究において開発した、HNPPは、化学発光法であるAMPPD法より

DNA検出において優れていることが分かった。DNAの検出感度及びメンブレン上のシグナルバンドの解像度以外に、HNPPを用いる方法がAMPPD法より優れている非常に大きい点としては、HNPPは、UVライト下での蛍光消光がほとんど見られなく、ナイロンメンブレン上の蛍光シグナルは、暗い場所に保存すれば少なくとも1年間は、高いS/N比を保つ事ができる。また、HNPP法は、EU-1150II-plus（アイシン・コスモス研究所）を用いて、CCDカメラで蛍光シグナルを取り込み、そのシグナルを画像処理によって定量化を行っているため、RI法・化学発光法で用いられるイメージング・プレート法と同等の短い検出時間・高い定量性が得られることが分かった。また、HNPP法は、ナイロンメンブレン上の蛍光シグナルを長期間保存することができるため、酵素反応後、直ちに検出操作を行わない場合にも対応できる。一方、化学発光基質であるAMPPD法は、反応開始後、30分から数時間以内に検出しないとバックグラウンドが上昇してしまい検出感度が著しく低下し、別の化学発光法であるECL法の発光はさらに一過性であり、数10分以内に検出操作を行わないと感度が著しく低下するという大きな欠点がある。この点でもHNPP法は化学発光法より優れている事を見出した。さらに、クローニング過程で多用されるコロニーハイブリダイゼーション、プラークハイブリダイゼーションにおいて、HNPP法は、UV照射下で観察できる蛍光シグナルをペンでチェックし、可視光下でコロニー、プラークの選別をすることができる。これは、化学発光法などで感光操作を必要とする技術では行うことができない。この点でもHNPP法は優れている事を見出した。

1-5 HNPPを用いたDNAの塩基配列決定

DNAの塩基配列の決定（シーケンス）は、従来最もよく使われている方法として、マクサム・ギルバート法がある。この方法について簡単に説明をする。DNAは、核酸塩基グアニン（G）、アデニン（A）、シトシン（C）及びチミン（T）を付けた細長い鎖である。この塩基にメチル基が結合すると鎖が切れやすくなる。MaxamとGilbertらはこの反応を巧みに利用し、画期的なシーケンス法へと発展させた^{42, 43}。以下、グアニンの反応を例にとりその方法を説明する。この方法は、従来より行われている放射性同位元素を用いた方法である。

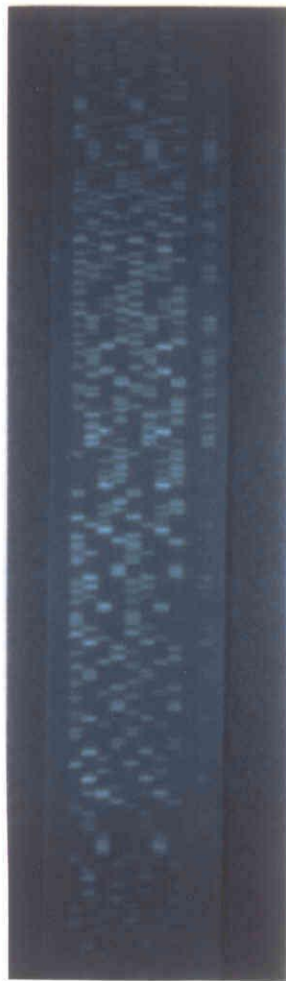
制限酵素で切り出したDNAの断片の一方の末端を放射性³²Pで標識する。これにジメチル硫酸を加えるとグアニンにメチル基が結合する。さらにアルカリで処理するとグアニン骨格が解裂し核酸をつなぐ鎖の切断が起こる。メチル化は、反応条件によってどの位置に存在していても全てのグアニンに特異的に起こる。その結果、一端は、³²Pで標識した制限酵素であるので、分子的にそろっているが、他の端は、グアニンの手前で切れた色々な長さの断片が得られる。これらは、電気泳導で鎖の短い順に分けられ、次いで、オートラジオグラフィーで³²Pを持つ断片だけがX線フィルム上にバンドとして現れる。この塩基特異的な修飾部分分解反応は、さらにグアニン+アデニン、シトシン、シトシン+アデニンなどで見出された。従って、これらの反応を個別に行い、そして同時に電気泳導で分離すると移動度の大きい順から塩基配列を決定していく。そこで、このマクサム・ギルバート法を用いて、³²Pの代わりに制限酵素で切り出した末端にビオチンを標識し、ビオチン-ストレプトアビジン結合を利用してアルカリホスファターゼを標識し、HNPPによってシーケンスを行った。図1-6にその方法の模式図を示す。



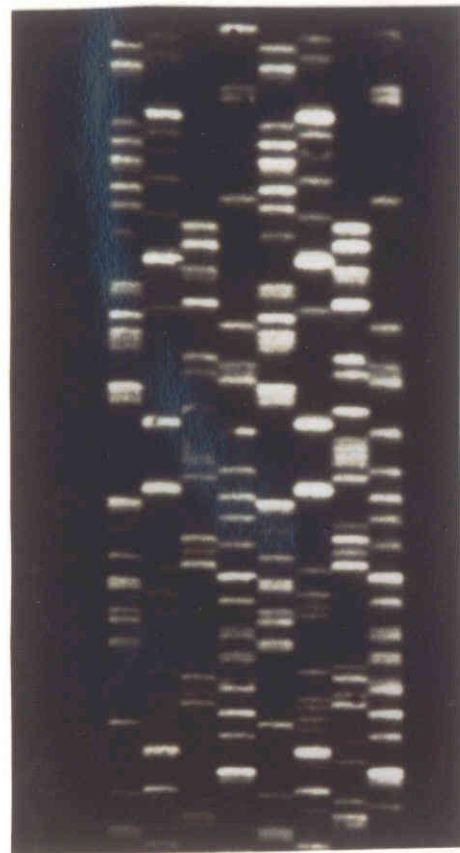
ALP：アルカリホスファターゼ、BIO：ビオチン、SA：ストレプトアビジン

図1－6

この方法は、シーケンシングプライマーDNAから伸張したDNAを電気泳動し、それをメンブレンに転写する。次いで、このシーケンシングプライマーDNAと相補的な配列を持つビオチン標識したプローブDNAを結合させる。次いで、ストレプトアビジンを結合させ、次いで、アルカリホスファターゼ標識ビオチンをさらにカップリングさせる。そして、HNPPを反応させ、アルカリホスファターゼによって加水分解され、メンブレンに沈着したHNPの蛍光を検出することにより塩基配列を決定していく。そこで、M13のベクターDNAを用いて、上記の方法によりシーケンスを行った。図1－7にその結果を示す。



HNPP



AMPPD

図1-7 M13ベクターDNAのシーケンスの写真

左側の写真が、HNPPを用いて行った結果である。全体像は、この様に非常に鮮明な青色蛍光のバンドとなる。この写真は、CCDカメラで撮像した写真である。一方、AMPPDを用いた場合、シグナルをX線フィルムに感光させるため、露光し過ぎるとこのようにバンドがつながってしまうことがあり、また露光し直さなければならぬ。しかし、HNPPを使った場合は、そのようなことがなく、操作が非常に簡単である。HNPPのナイロンメンブレンに対する吸着性が非常に強く、バンドの解像度が高いため、バンドがつながってしまうことはないからである。また青色蛍光を発するため、酵素反応の進行度を容易に観察できるというメリットもある。

1-6 まとめ

本章では、酵素法を用いて、メンブレン上のDNAを高感度に検出するためのアルカリホスファターゼの基質となる新しい蛍光基質の開発を目的として、新規な種々のナフタレン誘導体やアントラセン誘導体を合成し、溶液中やナイロンメンブレン上の蛍光特性及びスポットテスト法やサザンブロット法を用いてDNAの検出感度を評価した。

その結果、リン酸化したN-(2-ビフェニル)-3-ヒドロキシ-2-ナフタレンカルボキサミド (HNPP) が、DNAを最も高感度に検出できる基質であることが判明した。さらに、サザンブロットハイブリダイゼーション法を行うと、HNPPは、化学発光基質であるAMPPDより検出感度や解像度が高いことが分かった。さらに、解像度の比較として、M13のベクターDNAの塩基配列決定をHNPPとAMPPDを用いて行ったところ、HNPPは全てのDNAを識別できたが、AMPPD法は、重なってしまうバンドが数多く観察された。

HNPPの加水分解体であるN-(2-ビフェニル)-3-ヒドロキシ-2-ナフタレンカルボキサミド (HNP) は、緩衝液中では、pHの影響はないが、ナイロンメンブレン上では、pHに非常に影響を受け、強アルカリ域では、長波長シフトした。又、この影響は、可逆的であることが分かった。

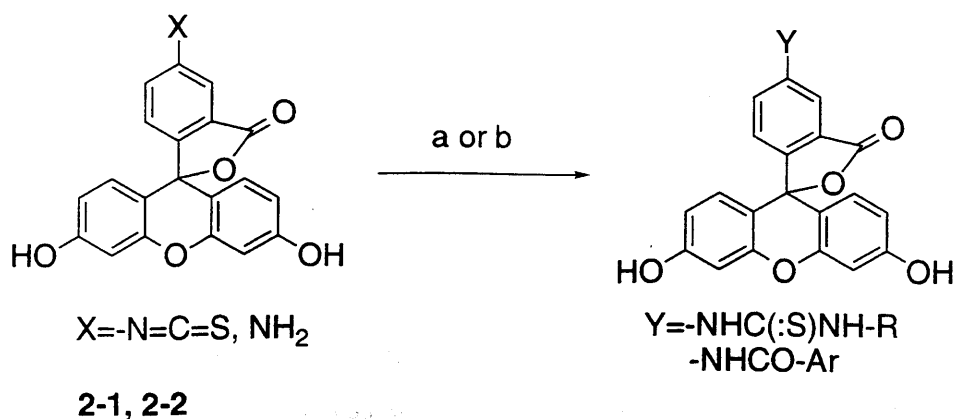
序

最近、メンブレンや組織・染色体のような担体上で正確なDNA診断を行うには、異なった塩基配列を持つDNAを同一担体上で、同時に検出できる方法の開発が必要不可欠であることが分かってきた。その方法の確立には、異なった酵素の基質と酵素による加水分解体は異なった蛍光色を持つことが必要である。まず始めに、酵素が同じで、その加水分解体は異なった蛍光色を発する蛍光基質を2種類開発することを考えた。第1章で記載したリン酸化されたナフタレンカルボキサミド誘導体 1-11 (HNPP) がアルカリホスファターゼによって加水分解されると、その加水分解体 (HNP) は、青色蛍光を発する。そこで、アルカリホスファターゼの基質となり、HNPとは異なった蛍光色を発する化合物としてフルオレセイン誘導体に着目した。フルオレセインそのものは、水溶液中で非常に強い蛍光を発し、発光量子収量が、0.9と非常に高いことが知られている⁴⁴⁾。フルオレセイン誘導体を用いた応用例として、例えば、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) は、主として蛍光抗体法などの組織化学の分野で用いられている。反応特異性について、Bromerらによってインシュリンを用いて調べられた⁴⁵⁾。pH 9.1、室温で、インシュリン当たり1モルから4モルのFITCを加えたとき、2つの α -アミノ基とは速やかに反応するが、 ϵ -アミノ基とはかなりゆっくりと反応する。これは、 ϵ -アミノ基がプロトン化しているためと解釈された。Bromerらは、この反応性の違いを利用して、モル当たり1モルのFITCラベルを行ったインシュリンはかなりの生理活性を保持していることを示し、組織化学上の有用性を示した。又、エステラーゼの基質となるフルオレセインジアセテート (FDA) を用いた細胞内流動性^{46, 47)}やpHの測定⁴⁸⁾の報告がある。FDAは細胞に取り込まれ、細胞内のエステラーゼによって加水分解を受けフルオレセインを生成する。このフルオレセインの偏光度から細胞質の流動性を求めて診断に利用したり⁴⁷⁾、励起スペクトルの変化から代謝に伴う細胞内pH変化が測定できる⁴⁸⁾。このようにフルオレセインは、*in vivo*での検出では、非常に有効であるが、*in vitro*の検出である担

体上での検出では、水溶性のため、担体に沈着せず用いることはできなかった。そこで、この非常に高い蛍光強度及び発光量子収率を保持したまま、水に対する不溶性を向上させる事を考え、ナイロンメンブレンフィルターに対する吸着性が高い新しいフルオレセイン誘導体の合成を行った。そしてこれらの誘導体の蛍光特性及びナイロンメンブレン上のDNAの検出感度を検討した。

2-1 新規なフルオレセイン誘導体の合成

フルオレセインの4位に置換基を有する誘導体の合成を行った。その反応式を式2-1に示す。合成方法としては、フルオレセインイソチオシアナート(2-1)に種々のアミノ化合物を反応させると、フルオレセイン・チオウレア誘導体が70~95%の収率で得られた。また、4-アミノフルオレセイン(2-2)を、種々の芳香族酸塩化物と反応させ、フルオレセイン・カルボキサミド誘導体を78~98%の収率で得た。得られたフルオレセイン誘導体は、表2-1にその蛍光特性と共に示す。



a : X = -N=C=S, Y = -NHC(:S)NH-R : RNH₂, ethanol, r.t., 2h
 b : X = -NH₂, Y = -NHCO-Ar : ArCOCl, acetone, r.t., 0.5h

式2-1

2-2 N-置換フルオレセイン誘導体の蛍光強度のpH依存性

フルオレセインと新規に合成したN-n-ブチル-5-チオウレイドフルオレセイン 2-3 を用いて、蛍光強度のpH依存性を調べた (図2-1)。

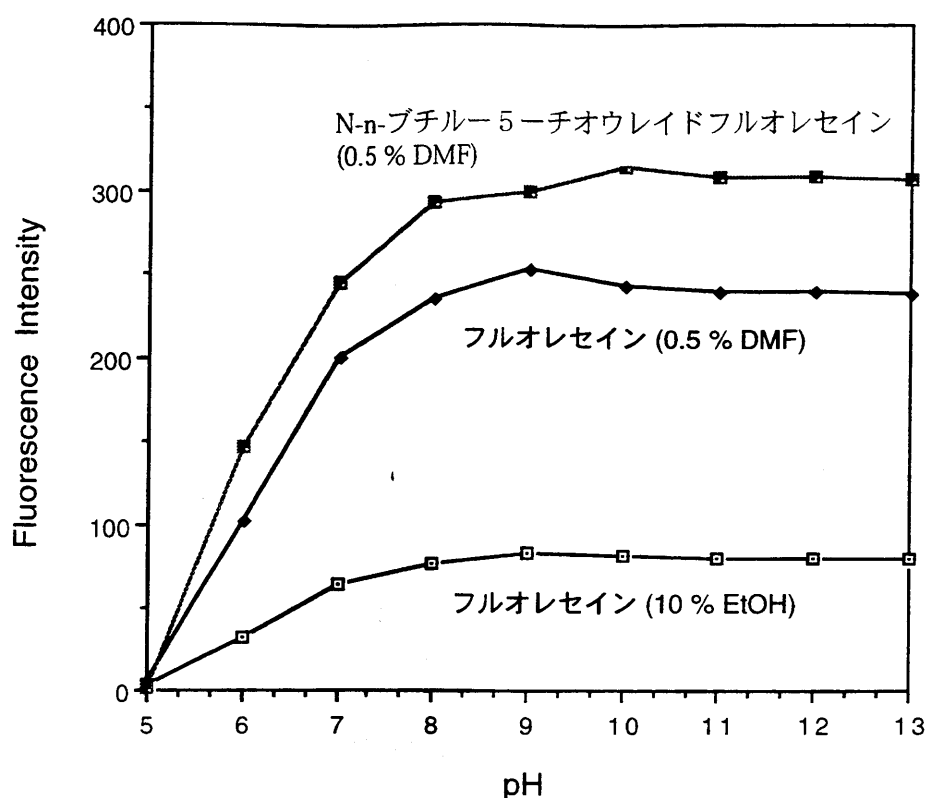


図2-1

フルオレセインの蛍光強度は、測定溶液のpHに依存することは知られており^{4,9,50)}、測定溶液として、10%エタノールを含んだ 3×10^{-7} Mのリン酸緩衝液を用いた時の結果が報告されている。0.5% DMFを含んだ 3×10^{-7} Mのリン酸緩衝液中で測定したところ、これまでに報告されている10%エタノールを含んだ 3×10^{-7} Mのリン酸緩衝液とは異なる結果が得られた。DMFを選択した理由として、DMFは種々の化合物の溶解性が非常に高いため、緩衝液中の有機溶媒の存在量を最少限にすることができるためである。フルオレセインを用いて行った結果、10%エタノールを含んだ 3×10^{-7} Mのリン酸緩衝液を用いた場合、pH 8.0の蛍光強度は、pH 5.0の蛍光強度の20倍であったのに対し、0.5% DMFを含んだ 3×10^{-7} Mのリン酸緩衝液を用いた場

合は 50 倍となった。またこの場合は、pH 5.0～8.0の範囲で蛍光強度が増大し、pH 8.0で最大蛍光強度となり、それ以上高いpH領域では、最大値とほぼ同じ値を示した。この様に、蛍光強度の増感は、0.5 % DMFを含んだ 3×10^{-7} M のリン酸緩衝液を用いた場合の方が10 %エタノールを含んだ 3×10^{-7} M のリン酸緩衝液を用いた場合より高くなることが分かった。この差は、有機溶媒が多く含まれることによって起こるフルオレセインの蛍光消光が原因であろう。次いで、*N*-n-ブチルー5-チオウレイドフルオレセイン 2-3 を用いて、0.5 % DMFを含んだ 3×10^{-7} M のリン酸緩衝液中で、蛍光強度のpH依存性を調べた。蛍光強度は、フルオレセインと同様にpH 5.0～10の範囲で蛍光強度の増感し、pH 10で最大蛍光強度となり、それ以上高いpH領域では、最大値とほぼ同じ値を示した。また、pH 10での蛍光強度は、pH 5.0での蛍光強度の60倍となった。pH 5.0～13の範囲で蛍光強度を調べた結果、*N*-n-ブチルー5-チオウレイドフルオレセイン 2-3 は、フルオレセインより最適pH値での蛍光強度は高いことが分かった。新規に合成した種々のフルオレセイン誘導体も同様のpH依存性を検討した。そして、最適pH値での蛍光強度をFITCのそれと比較した。全てのN-置換フルオレセイン誘導体を0.5 % DMFを含んだ 3×10^{-7} M のリン酸緩衝液中で、蛍光強度のpH依存性を調べた結果、図2-1と同様の結果が得られた。

次いで、pH=11の時の蛍光強度をFITCの蛍光強度と相対比較した。その結果を表2-1に示す。表2-1に示した誘導体 2-3 ～ 2-18 の構造式を図2-2に示す。

図2-2 フルオレセイン誘導体 2-3 ～ 2-18 の構造式

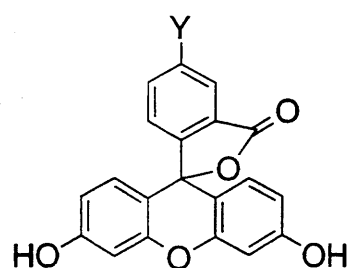
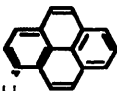
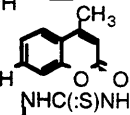
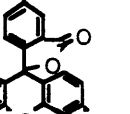
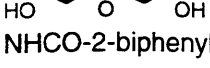


表 2-1 フルオレセイン誘導体のリン酸緩衝液中での蛍光特性

compound	Y	relative fluorescence intensity ^a
2-3	NHC(:S)NHbutyl	1.1
2-4	NHC(:S)NHcyclohexyl	0.67
2-5	NHC(:S)NH1-adamantyl	0.51
2-6	NHC(:S)NH-4-chlorophenyl	0.025
2-7	NHC(:S)NH-2-methylphenyl	1.1
2-8	NHC(:S)NH-4-methylphenyl	0.92
2-9	NHC(:S)NH-4-methoxyphenyl	1.1
2-10	NHC(:S)NH-2-biphenyl	1.1
2-11	NHC(:S)NH-3,5-dimethylphenyl	1.2
2-12	NHC(:S)NH-2,4-dimethoxyphenyl	1.2
2-13		0.73
2-14		1.2
2-15		0.09
2-16	 NHCO-2-biphenyl	1.1
2-17	NHCO-4-biphenyl	1.2
2-18	NHCO-1-naphthyl	0.79

全ての誘導体の最大励起波長は、492 nmで、最大蛍光波長は、512 nmであった。N-ピレン置換チオウレイドフルオレセイン誘導体 2-13 及びN-クマリン置換チオウレイドフルオレセイン誘導体 2-14 は、ピレン又はクマリン蛍光団の最大励起波長、それぞれ 339 nm^{51-54} ・ 396 nm^{55-60} で照射したときでも、両誘導体とも最大蛍光波長は、512 nmに現れた。492 nmで照射したときの蛍光強度は、FITCと同等であったのに対して、それぞれ 339 nm ・ 396 nm で照射したときの蛍光強度は、FITCの $1/10$ であった。N-4-クロロフェニル置換チオウレイドフルオレセイン誘導体 2-6 とN-フルオレセイン置換チオウレイドフルオレセイン誘導体 2-15 は、蛍光強度がFITCより非常に低かった。それ以外のN-置換チオウレイドフルオレセイン誘導体の蛍光強度は、FITCの蛍光強度とほぼ同等であった。また、N-(ビフェニルカルボニル)-5-アミノフルオレセイン誘導体 2-16 と 2-17 は、FITCの蛍光強度とほぼ同等であった。

2-3 N-置換フルオレセイン誘導体の蛍光特性

N-(4-ビフェニルカルボニル)-5-アミノフルオレセイン 2-16 とそのジリン酸エステルの励起スペクトルと蛍光スペクトルを、pH=11の0.5 % DMFを含んだ $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ のリン酸緩衝液中で測定した。その結果を図 2-3a と 3b に示す。

励起スペクトル

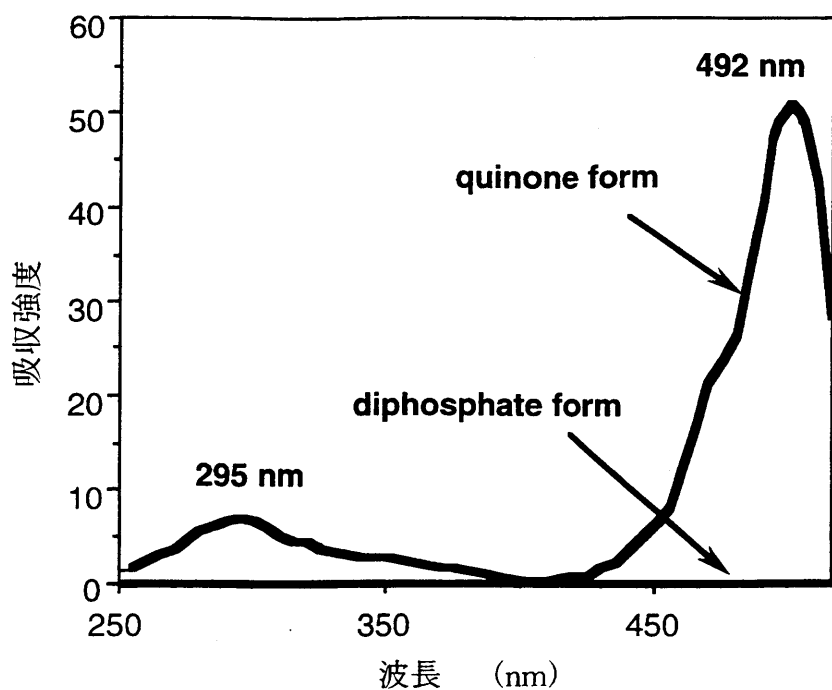


図 2-3 a

誘導体 2-16 は、励起波長のピークとして 492 nm と 295 nm が観察されが、最大励起波長は、492 nm であった。

蛍光スペクトル

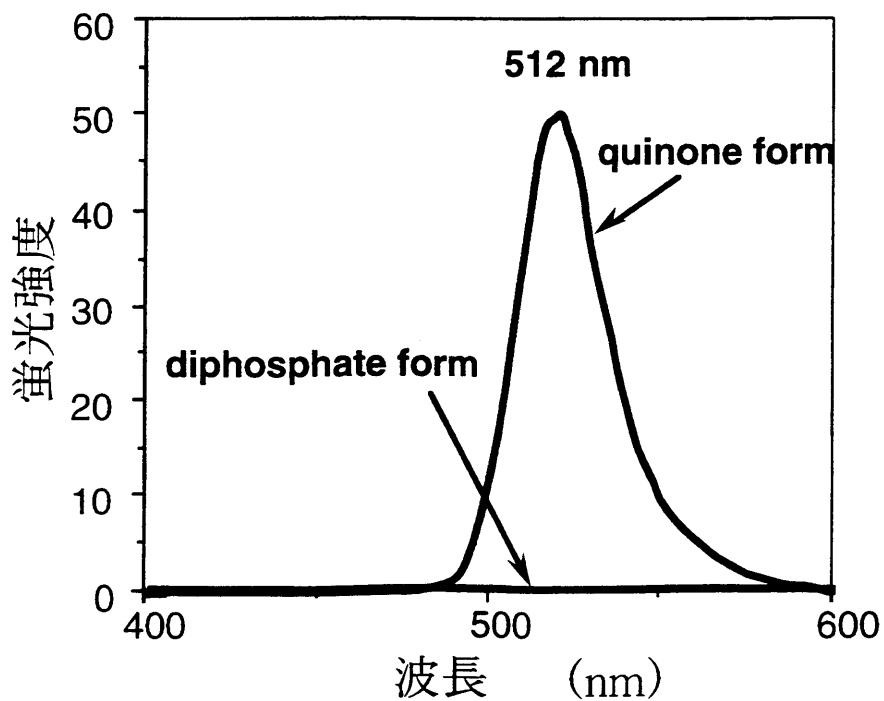


図 2-3 b

どちらの励起波長で照射しても最大蛍光波長は512nmであった。一方、誘導体2-16から変換したジリン酸エステルは、ほとんど蛍光を示さなかった。表2-1に示した全てのフルオレセイン誘導体とそれぞれに対応するジリン酸エステルで、ほぼ同じ特性が得られた。フルオレセイン誘導体とアルカリホスファターゼを用いれば、ジリン酸エステルで示さなかった蛍光が、アルカリホスファターゼによって加水分解されると強い蛍光を発することになり、DNAの高感度検出に必要な蛍光のON-OFFに適した化合物といえる。そこで、酵素免疫測定法を利用した、N-置換フルオレセイン誘導体のジリン酸エステルを用いたナイロンメンブレン上のDNAの蛍光検出方法について、次に検討した。

図2-4に酵素免疫測定法を利用し、N-置換フルオレセイン誘導体のジリン酸エステルを用いたナイロンメンブレン上のDNAの蛍光検出方法のシステム図を示す。

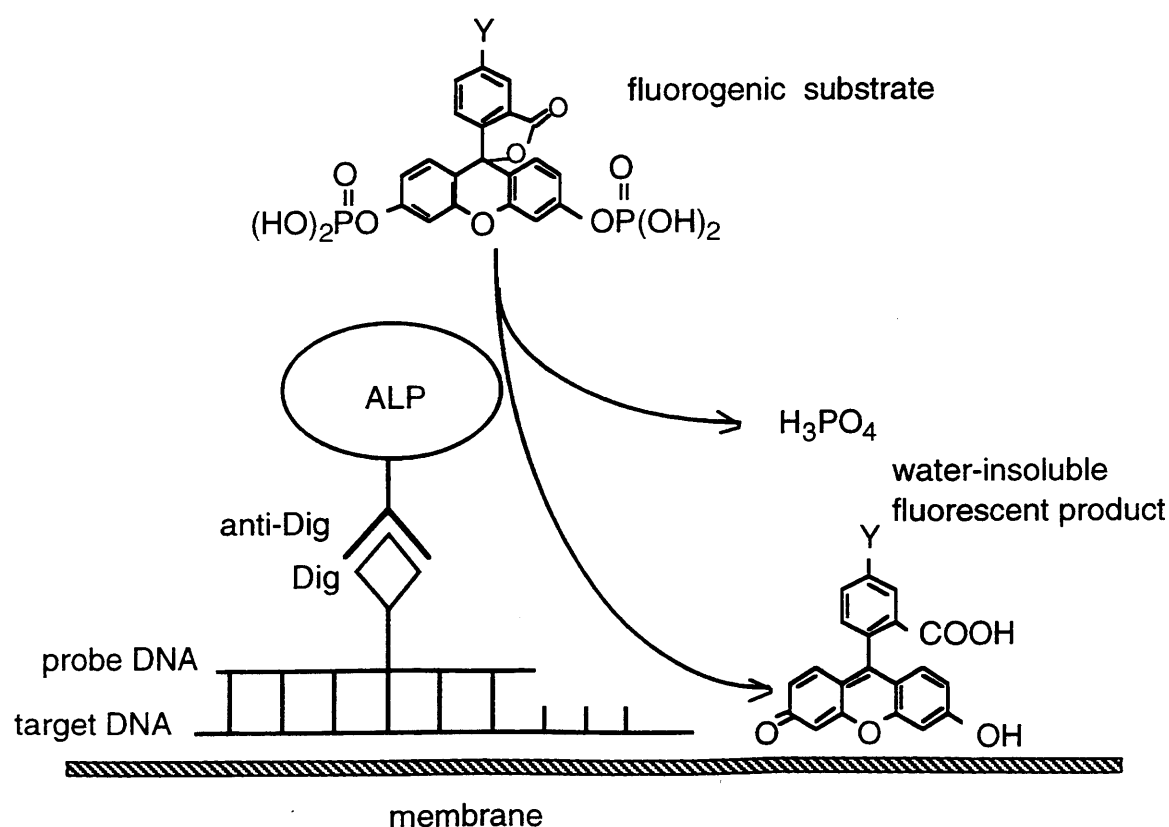


図2-4

ナイロンメンブレン上に固定したターゲットDNAに、ディゴキシゲニン標識したプローブDNAを相補的に結合させる。緩衝液を用いて結合しなかった非特異的DNAを洗浄し、次いで、アルカリホスファターゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体の複合体をカップリングさせる。緩衝液を用いて結合しなかった非特異的複合体を洗浄し、次いで、その蛍光基質である水溶性のN-置換フルオレセイン誘導体のジリン酸エステルを反応させる。酵素によって加水分解されたフルオレセイン誘導体は、水不溶性となりナイロンメンブレン上のその場所に沈着し、ナイロンメンブレンに吸着する。次いで、この蛍光色素に励起光を照射し、発せられる蛍光をデジタルカメラに取り込みビデオプリンターで画像化する。

2-4 N-置換フルオレセイン誘導体のジリン酸エステルを用いたスポットテスト法によるDNAの検出

N-置換フルオレセイン誘導体のジリン酸エステルを用いて、第1章1-1に示したスポットテスト法によりナイロンメンブレン上のDNAの検出感度を測定した結果を表2-2に示す。水溶液中での蛍光特性の測定で、強アルカリ側で蛍光強度が増感することが分かったので、酵素反応後ナイロンメンブレンを、pH=11の0.5% DMFを含んだ 3×10^{-7} M のリン酸緩衝液に3分間浸した後、蛍光検出を行った。その結果、誘導体 2-7、2-8、2-9、2-11、2-16、2-17 から変換したジリン酸エステルを用いたときは、2倍の検出感度の向上が観察された。N-(2-メチルフェニル)-5-チオウレイドフルオレセイン 2-7 と N-(4-メトキシフェニル)-5-チオウレイドフルオレセイン 2-9 は、蛍光強度がFITCより高く、検出感度は80 fgを示した。しかし、スポット上では、加水分解体の拡散とバックグランド蛍光が観察された。このバックグランド蛍光は、一方のリン酸基が酵素によって加水分解された蛍光性のモノリン酸エステルが、ナイロンメンブレンに沈着したことによると考えている。一方、誘導体 2-7 と 2-9 と同様にFITCより蛍光強度の高かった誘導体 2-3、2-10、2-12、2-14 のジリン酸エステルを用いた場合、検出感度は、400~800 fgと悪かった。これは、加水分解体の低い沈着性とならびに非特

異的吸着体による高いバックグランド蛍光の存在によりS/N比が下がったためである。又、誘導体 2-8 は、蛍光強度はFITCより低いが検出感度は80 fgであった。このように、蛍光強度が高いフルオレセイン誘導体が、常に高い検出感度を示すわけではない。高い検出感度には、高い蛍光強度だけでなく加水分解体の高い沈着性とならびに基質の低い非特異的吸着性が必要である。N-(3,5-ジメチルフェニル)-5-チオウレイドフルオレセイン 2-11、N-(2-ビフェニルカルボニル)-5-アミノフルオレセイン 2-16、N-(4-ビフェニルカルボニル)-5-アミノフルオレセイン 2-17、それぞれから変換したジリン酸エステルを用いたとき、最も高い20 fgのDNA検出感度を達成できた。誘導体 2-11 から変換したジリン酸エステルを用いた場合は、わずかなスポットの拡散とバックグランド蛍光が観察されたが、誘導体 2-16、2-17 から変換したジリン酸エステルを用いた場合は、ほとんどスポットの拡散は観察されなかった。このナイロンメンブレン上のスポットは、黄緑色蛍光体であった。しかし、わずかなバックグランド蛍光は観察されたままであった。これは、全てのジリン酸エステル体に共通することであるが、一方のリン酸基のみが加水分解されたモノリン酸エステルがメンブレンにわずかに吸着したためであると考えられる。図2-5に表2-2に示したフルオレセイン誘導体 2-3 ~ 2-18 の構造式を示す。

図2-5 フルオレセイン誘導体 2-3 ~ 2-18 の構造式

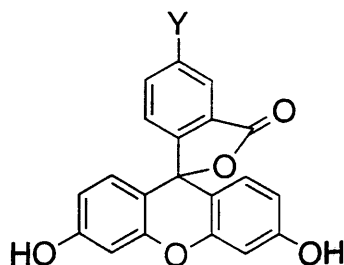
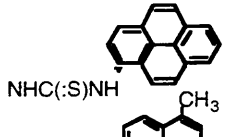
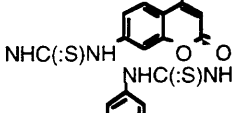
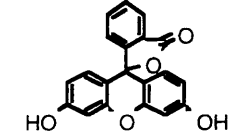


表 2-2 フルオレセイン誘導体ジリン酸エステルのDNA検出感度

compound	Y	DNA detection limit (fg)	fluorescent properties on membrane	
			substantivity	nonspecific adsorption ^b
2-3	NHC(:S)NHbutyl	400	± ^c	moderate
2-4	NHC(:S)NHcyclohexyl	400	±	low
2-5	NHC(:S)NH1-adamantyl	400	±	low
2-6	NHC(:S)NH-4-chlorophenyl	400	+	low
2-7	NHC(:S)NH-2-methylphenyl	80	+	moderate
2-8	NHC(:S)NH-4-methylphenyl	80	+	moderate
2-9	NHC(:S)NH-4-methoxyphenyl	80	+	moderate
2-10	NHC(:S)NH-2-biphenyl	400	+	high
2-11	NHC(:S)NH-3,5-dimethylphenyl	20	++	moderate
2-12	NHC(:S)NH-2,4-dimethoxyphenyl	400	+	high
2-13		800	±	high
2-14		800	±	high
2-15		800	±	high
2-16	NHCO-2-biphenyl	20	++	low
2-17	NHCO-4-biphenyl	20	++	low
2-18	NHCO-1-naphthyl	500	±	high

^b Background signals ^c (++), high substantivity: (+), moderate substantivity: (±), low substantivity.

次いで、化学発光基質の中でも最も高感度にメンブレン上のDNAを検出できると報告されているCSPD^{61, 62)}を用いてスポットテストを行い、N-(4-ビフェニルカルボニル)-5-アミノフルオレセイン 2-17 から変換したジリン酸エステルを用いて行ったスポットテストの検出結果と比較検討した。得られた写真を図2-6に示す。

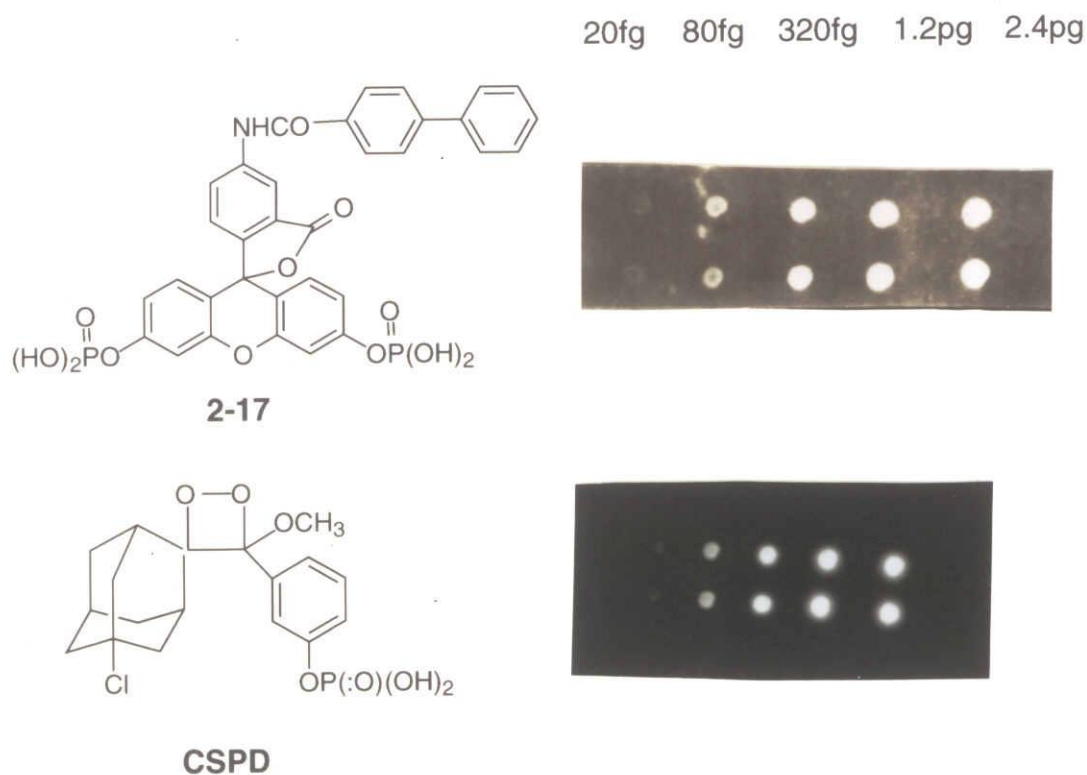


図2-6

その結果、どちらの基質を用いても20fgのDNAが検出できた。しかし、誘導体 2-17 を用いた場合の方が、CSPDの場合よりスポットが鮮明であった。

2-5 N-(4-ビフェニルカルボニル)-5-アミノフルオレセイン 2-17 ジリン酸エステルを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法によるDNA検出

次いで、 λ DNAを *Hind* IIIという制限酵素で消化したDNAを用いて第1章1-4に示したサザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて、誘導体 2-17 のジリン酸エステルと化学発光基質であるCSPDを用いてDNA検出感度の比較を行った。その結果を図2-7に示す。

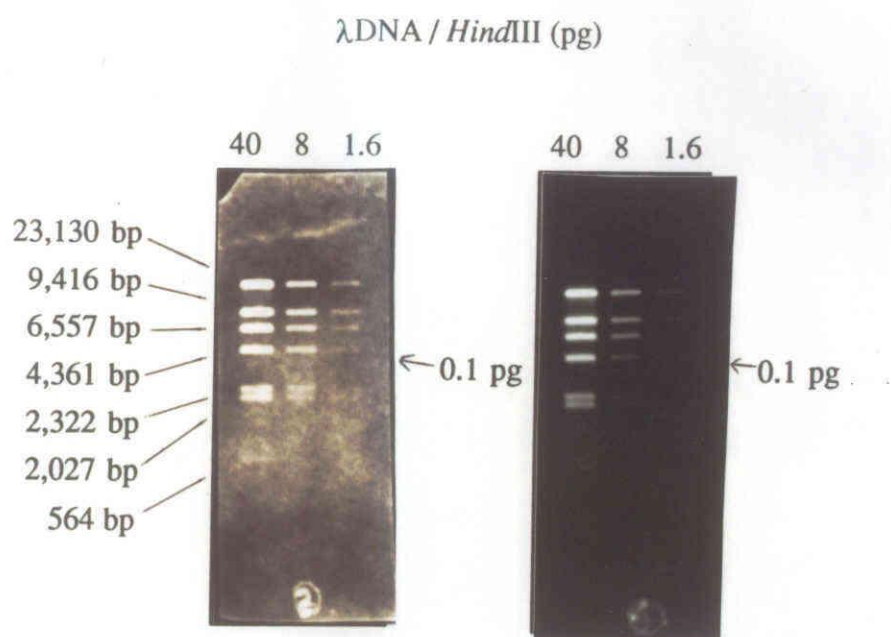


図2-7

フルオレセイン誘導体 2-17 のジリン酸エステルとCSPDを用いた場合、両方法とも、0.1 pg (3.6×10^{-20} mol)のDNAが検出できた。DNAバンドの解像度は、CSPDよりフルオレセイン誘導体 2-17 のジリン酸エステルを用いた方が、スポットテストの場合と同様高いことが示された。

メンブレン上のDNAを検出する方法において、化学発光法は、非放射性同位元素プローブ法の中では、最も古くから用いられている発色法より検出感度が高く⁶³⁾、放射性同位元素を使った方法と同等の高い検出感度を示す⁶⁴⁾ことが知られている。N-(4-ビフェニルカルボニル)-5-アミノフルオレセイン 2-17 のジリン酸エステルを用いた方法は、化学発光法と同等の検出感度を示し、化学発光法より高い解像度を与える方法である。よって、この蛍光検出法は、発色法よりDNA検出感度が高く、放射性同位元素法と同等の非常に優れた方法であるといえる。

さらに、この蛍光検出方法は、メンブレン上の蛍光シグナルを安価な落射式蛍光検出装置を用いて簡便に画像化でき、又、酵素反応の進行度も簡便に観察することができる。一方、化学発光法は、シグナルをX線フィルムに感光しなければならない。X線フィルムは、ダイナミックレンジが狭いため、強いシグナルと弱いシグナルを同時に感光できないため、複数回の感光が必要となり非常にわずらわしい方法である。最近では、化学発光シグナルを検出できる装置がバイオ・ラット社より発売されたが、数千万円以上する非常に高額な装置であり、汎用性は低い。この誘導体 2-17 のジリン酸エステルを用いる蛍光法の優位点は、DNAハイブリダイゼーション技術との連携によって新しく簡便なDNA検出が確立できることにある。この方法を用いることにより、ウエスタンブロットハイブリダイゼーションやノーザンブロットハイブリダイゼーション法で、蛋白質やRNAを高感度に検出することができると思われる。この方法が高い検出感度を示すのは、ジリン酸エステルがほとんど蛍光を発しないこと、加水分解体が水不溶性になり、ナイロンメンブレンとの吸着性が高いこと、加水分解体の蛍光強度が高いことに起因する。

2-6 まとめ

本章では、第1章に示した、HNPPとは違った蛍光色を持ち、さらに、サザンブロットハイブリダイゼーション法において、HNPPと同等のDNA検出感度を示す新しい蛍光基質の開発を目的として、新規なフルオレセイン誘導体を合成し、溶液中やナイロンメンブレン上の蛍光特性及びスポットテスト法やサザンブロット法を用い

てDNA検出感度を評価した。

その結果、新規に合成したフルオレセイン誘導体とフルオレセインを用いて、それぞれの誘導体の蛍光強度に対するpH依存性を評価したところ、0.5%DMFを含んだ 3×10^{-7} Mのリン酸緩衝液を用いて測定すると、pH 5.0～8.0の範囲で蛍光強度が増感し、pH8.0で最大蛍光強度となり、それ以上高いpH領域では、最大値とほぼ同じ強度値を示した。pH8.0での蛍光強度は、pH5.0での蛍光強度より50倍高くなることが分かった。この増感率は、従来のフルオレセインの蛍光強度の測定方法である10%エタノールを含んだ 3×10^{-7} Mのリン酸緩衝液を用いる方法より約2.5倍高いことが分かった。

次に、DNAの検出感度を評価した結果、HNPPと同様に、サザンブロット法において0.1 pgのDNAが検出できるN-(4-ビフェニルカルボニル)-5-アミノフルオレセイン 2-17 から変換したジリン酸エステルが開発できた。さらに、HNPPの加水分解体は、ナイロンメンブレン上に沈着し、青色蛍光を発するが、誘導体 2-17 のジリン酸エステルの加水分解体は、ナイロンメンブレン上に沈着し、黄緑色蛍光を発することが分かった。又、解像度は、HNPPと同様に化学発光基質であるCSPDより高いことが分かった。

第3章 新規なフルオレセイン誘導体モノリン酸エステル合成とDNAの高感度検出

序

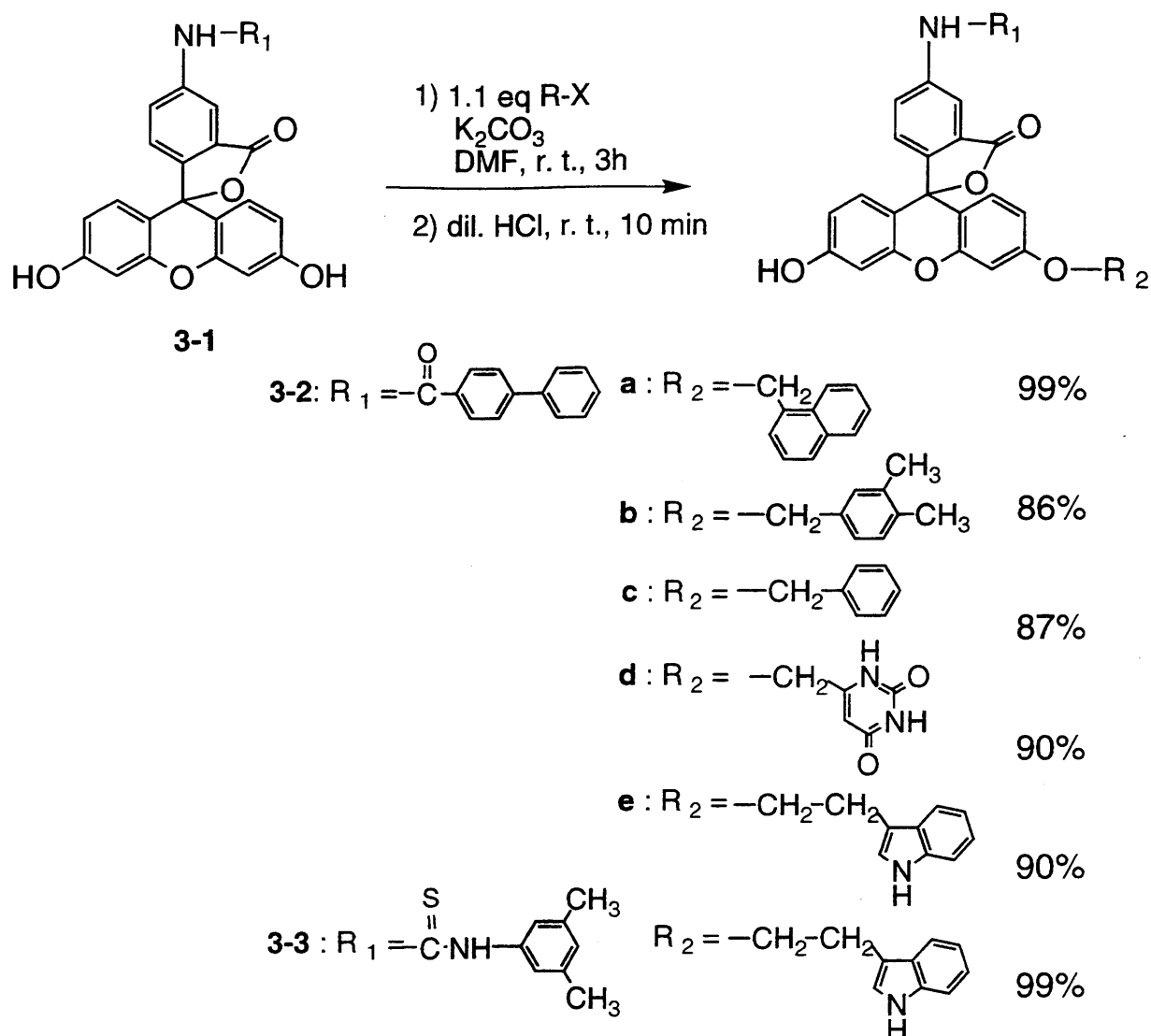
前章で述べたフルオレセイン誘導体は、ジリン酸エステルであったため、アルカリホスファターゼによって一方のリン酸基が加水分解されたモノリン酸エステルが存在する。このモノリン酸エステルが、ナイロンメンブレンに非特異的に沈着し、モノリン酸エステルが持っている蛍光がバックグラウンドとなり検出感度を悪くしていたと考えられた。そのため、最高検出感度が20 fgを越えることはなかった。そこで、この非特異的吸着体をなくすために、フェノール性の水酸基の一方にエーテル結合を介して種々のアラルキル基の導入を行った。

3-1 新規フルオレセイン誘導体モノエーテル体の合成

3'-O-アラルキルフルオレセイン誘導体を合成するためには、キサントン骨格に存在する2つのフェノール性のOHの内の一方のOH基のみを選択的にアラルキル化しなければならない。フルオレセインがH. Ghatakら⁶⁵⁾によって1929年に初めて合成されてからの長い研究の歴史の中で、3'-O-アラルキルフルオレセイン誘導体の合成は、C. D. Hurdら⁶⁶⁾によって報告された以外ほとんど研究されていなかった。そして、ごく最近、G. A. Krafftら⁶⁷⁾とJ. E. T. Corrieら⁶⁸⁾によって新しい合成方法が報告された。しかしこれらの方法は、過酷な条件下で、フルオレセインのO-アラルキル化を行うため、O-アラルキル体だけでなく、ラクトン環の開裂によってエステル体も同時に生成されてしまう。このため、彼らの方法では、目的化合物であるO-アラルキル体を高収率で得ることはできない。

そこで、塩基や溶媒を色々変えて、フルオレセイン誘導体の効率的アラルキル化を試みた。5-(4-ビフェニルカルボキサミド)フルオレセインをジメチルホルムアミド(DMF)中炭酸カリウム存在下で、塩化(1-ナフチル)メチルと反応させると、99%の収率で5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-(1-ナフチル)

メチルフルオレセインを得ることに成功した（式 3-1）。

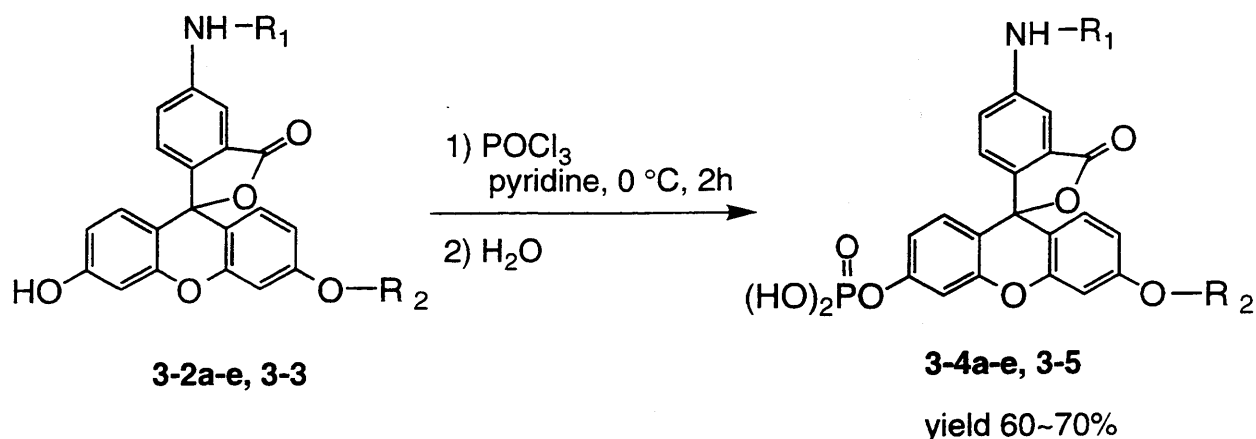


式 3-1

他の条件下、例えば、炭酸ナトリウム／DMF、炭酸水素ナトリウム／DMF、ピリジン、炭酸カリウム／アセトン、炭酸カリウム／メタノール、炭酸カリウム／アセトニトリル、炭酸カリウム／ジメチルスルホキシド、炭酸カリウム／ヘキサメチルホスホルアミドなどを用いて試した結果、目的の O-アルキル体を高収率で得ることはできなかった。炭酸カリウム／DMF というシンプルな方法は、種々のハロゲン化アルキルとの反応に適用することができた。フルオレセイン誘導体と種々のハロゲ

ン化アラルキルとの全ての反応において、非常に高収率で目的とするOーモノアラルキル誘導体を合成することができた。この場合、ジアラルキル体やラクトン環が開裂した事によるエステル体は、全く生成しなかった。

次いで、得られたフルオレセイン誘導体 3ー2a~3ー2e と 3ー3 のピリジン溶液中に、0℃でオキシ塩化リンを加え、そのまま4時間攪拌することにより対応するモノリン酸エステル 3ー4a~e、3ー5 を60~70%の収率で得た。(式3ー2)



式3ー2

3ー2 3'ーOーアラルキルフルオレセイン誘導体の蛍光特性

5ー(4ービフェニルカルボキサミド)ー3'ーOー(3,4ージメチルフェニル)メチルフルオレセイン 3ー2b とそのリン酸エステル 3ー4b の励起スペクトルと蛍光スペクトルを、0.5% DMFを含んだリン酸緩衝液 (pH=7.4) 中で測定した。(図3ー1a,b)

図3-1a フルオレセイン誘導体3-2bとリン酸エステル3-4bの励起スペクトル

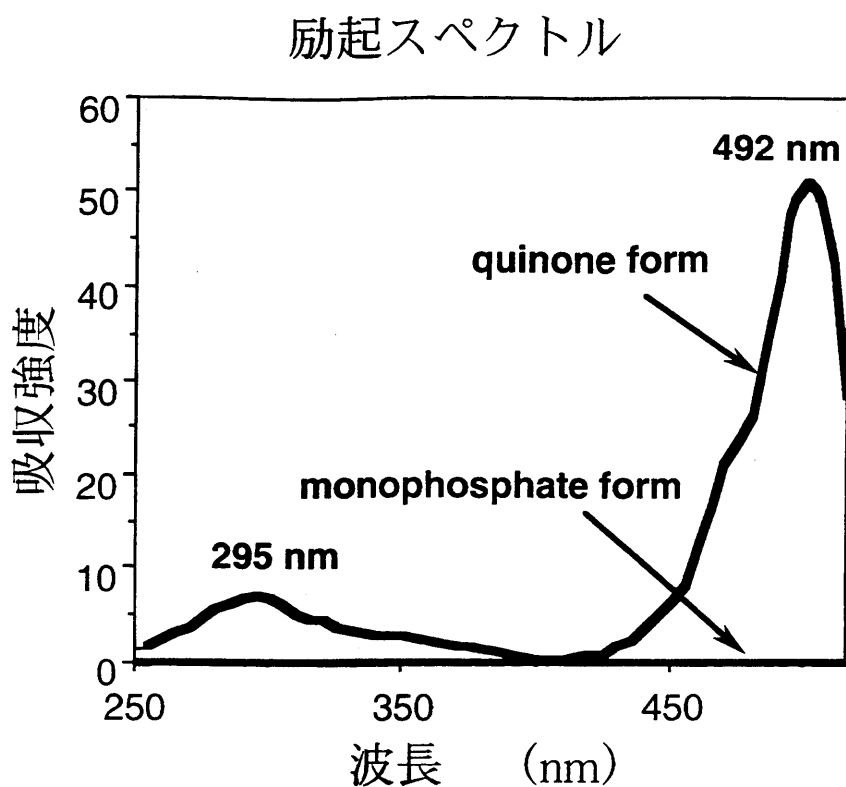
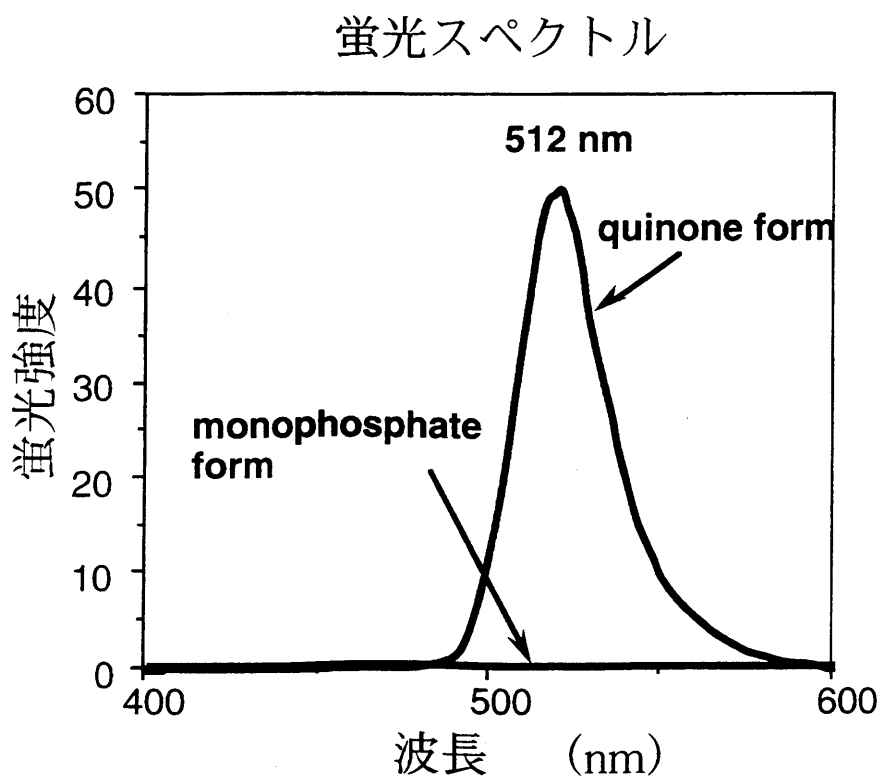


図3-1b フルオレセイン誘導体3-2bとリン酸エステル3-4bの蛍光スペクトル



化合物 3-2b は、295 nm と 492 nm に励起波長のピークがあり、492 nm が最大励起波長であった。そして、492 nm で照射すると、512 nm に非常に強い蛍光を示した。この波長は、フルオレセインとほぼ同じ波長であったので、フルオレセインの5位にアミド基の導入や3'-ヒドロキシル基への種々の置換基の導入は、励起スペクトルや蛍光スペクトルには影響しないことが分かる。一方、5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-(3,4-ジメチルフェニル)メチルフルオレセイン 3-2b から変換したモノリン酸エステル 3-4b は、全く蛍光を示さなかった。式 3-1 に示した全ての3'-O-アラルキルフルオレセイン誘導体とそれぞれに対応するモノリン酸エステルは、3-2b、3-4b とほぼ同じ蛍光特性が観察された。

3-3 3'-O-アラルキルフルオレセイン誘導体のモノリン酸エステルを用いたスポットテスト法によるDNAの検出

3'-O-アラルキルフルオレセイン誘導体のモノリン酸エステルを用いて、第1章1-1に示したスポットテスト法によりナイロンメンブレン上のDNAの検出感度の比較を行った。アルカリホスファターゼの基質として、表3-1に示した化合物 3-1 ~ 3-16 をピリジン中、オキシ塩化リンと反応させることにより合成したモノリン酸エステルを用いて、ナイロンメンブレン上のDNAの検出感度の測定を行った。表3-1に、ナイロンメンブレン上にスポットしたλDNAの検出限界と同時にアルカリホスファターゼの加水分解体であるフルオレセイン誘導体の沈着性と非特異的にナイロンメンブレンに吸着するモノリン酸エステルによるバックグラウンドの程度を示した。又、化合物 3-1 ~ 3-16 のFITCに対する相対蛍光強度の値も示した。表3-1に示した誘導体 3-1 ~ 3-16 の構造式を下図に示す。

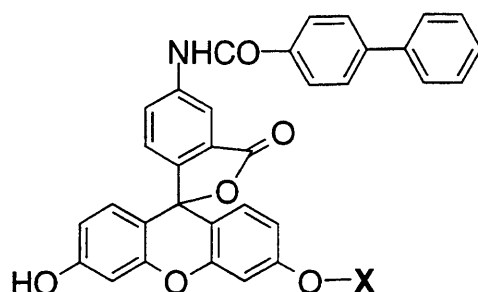


表 3-1 フルオレセイン誘導体のモノリン酸エステルのDNA検出感度

compound	X	fluorescent properties in solution			DNA detection limit	fluorescent properties on membrane	
		λ_{ex}	λ_{em}	relative fluorescence intensity ^a		substantivity	nonspecific adsorption ^b
3-1	metihyl	492	512	0.71	5	+	low ^c
3-2	acethyl	492	514	0.5	80	±	high
3-3	torifuruoroacethyl	492	512	0.58	10	+	moderate
3-4	phenylbenzyl	492	513	0.72	5	+	moderate
3-5	2-phenylbenzy	492	513	0.83	5	+	moderate
3-6	4-phenylbenzyl	492	513	0.83	5	+	moderate
3-7	4-methylbenzyl	492	512	0.95	5	+	moderate
3-8	2,5-dimethylbenzyl	492	514	1.1	5	+	moderate
3-9	2,4-dimethylbenzyl	492	513	1.1	5	+	moderate
3-10	3,4-dimethylbenzyl	492	513	1.2	5	++	low
3-11	2,4,6-trimethylbenzyl	492	514	0.31	5	+	moderate
3-12	3,5-dimethoxybenzyl	492	512	1.2	10	+	moderate
3-13	1-naphthylmethyl	492	513	1.2	5	++	low
3-14	2-biphenyl	492	514	1.1	5	+	moderate
3-15	3-indolyethyl	492	513	1.2	80	±	high
3-16	6-uracilmethyl	492	513	1.1	40	±	moderate

^a Measured for $5 \times 10^{-6} \text{M}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (pH 11.0) containing 0.5 % DMF. ^b Background signal

^c (++) , high substantivity: (+), moderate substantivity: (±), low substantivity.

化合物3-1、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、3-11、3-13、3-14から変換したモノリン酸エステルを用いると5 fgのDNAを検出することに成功した。化合物3-1、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-11、3-14から誘導したモノリン酸エステルを用いた場合、加水分解体の蛍光スポットからわずかな拡散が観察された。しかし、化合物3-10、3-13から誘導したモノリン酸エステルを用いた場合は、スポットの拡散は全く観察されず、又非特異的吸着体によるバックグランド蛍光も非常に低かった。蛍光強度が、DNAの検出感度に常に関わっているとは限らない。例えば、化合物3-1、3-4、3-5、3-6、3-7、3-11はFITCより蛍光強度が低い、そのモノリン酸エステルを用いると5 fgという非常に高い検出感度でDNAを検出できる。それに対して化合物3-15は、蛍光強度は、FITCより高いが、そのモノリン酸エステルを用いた時の検出感度は、80 fgと低い。この検出感度低下は、加水分解体のナイロンメンブレンに対する沈着性が低いことと非特異的吸着体によるバックグランド蛍光が高いことによる。このように、ナイロンメンブレン上のDNAの検出感度において高い検出感度は、アルカリホスファターゼによって加水分解されることによって生成するフルオレセイン誘導体の蛍光強度が高いことだけではなく、そのフルオレセイン誘導体のナイロンメンブレンに対する吸着性が高くかつモノリン酸エステルのバックグランド蛍光が低いことが必要である。このことは、第2章で示したジリン酸エステルと比較しても明らかである。即ち、ジリン酸エステルを用いた場合、最高検出感度は、20 fgであった。しかし、その場合でも、バックグランド蛍光はモノリン酸エステルに比べて高く、またスポットの拡散もかなり観察された。

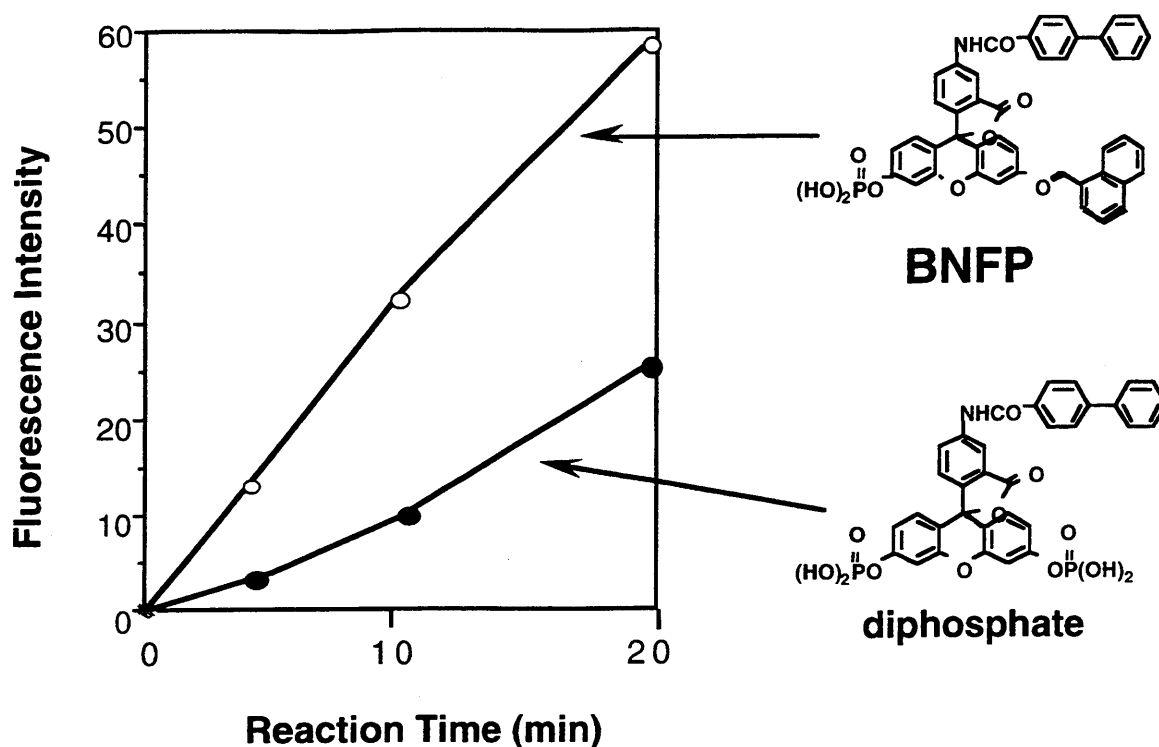
16種類のフルオレセイン誘導体のモノリン酸エステルを評価した結果、検出感度が5 fgと最も高く、沈着性が非常に高く、バックグランド蛍光が最も低くなった蛍光基質は、5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-(1-ナフチルメチル)フルオレセイン3-13のモノリン酸エステルであった。この基質を略してBNFPと呼ぶこととする。

全長が48502塩基対のλDNAを用いたスポットテストで、5 fgの検出感度は、 3.1×10^{22} mol に匹敵する。そして、ディゴキシゲニンは、最適標識化条件では、36塩基対に1分子ずつ導入されると報告されている³⁵⁾。よって、λDNAが5 fg検出された時は、 4.2×10^{19} mol のディゴキシゲニンが、検出されたことになる。又、ディゴキシゲニンとアルカリホスファターゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体は、1 : 3の比率でカップリングする³⁶⁾ ので、 1.3×10^{18} mol のアルカリホスファターゼが検出されたことになる。

3-4 フルオレセイン誘導体モノリン酸エステル (BNFP) とジリン酸エステルのアルカリホスファターゼの反応性とナイロンメンブレン上のDNAの定量性の比較

フルオレセイン誘導体モノリン酸エステル (BNFP) とフルオレセイン誘導体ジリン酸エステルで、アルカリホスファターゼによる加水分解速度の違いについて検討した。蛍光基質として、フルオレセインモノリン酸エステル体としてBNFPを用い、フルオレセインジリン酸エステルとして第2章の表2-2に示した誘導体2-17のジリン酸エステルを用いた。方法は、これら両基質を、pH 9.5のトリス緩衝液中でアルカリホスファターゼと室温で反応させた。蛍光強度の検出は、蛍光分光光度計を用いて行った。それぞれの蛍光基質のアルカリホスファターゼによる加水分解反応速度経過を図3-2に示す。

図 3-2 モノリン酸エステルとジリン酸エステルの酵素反応速度の比較

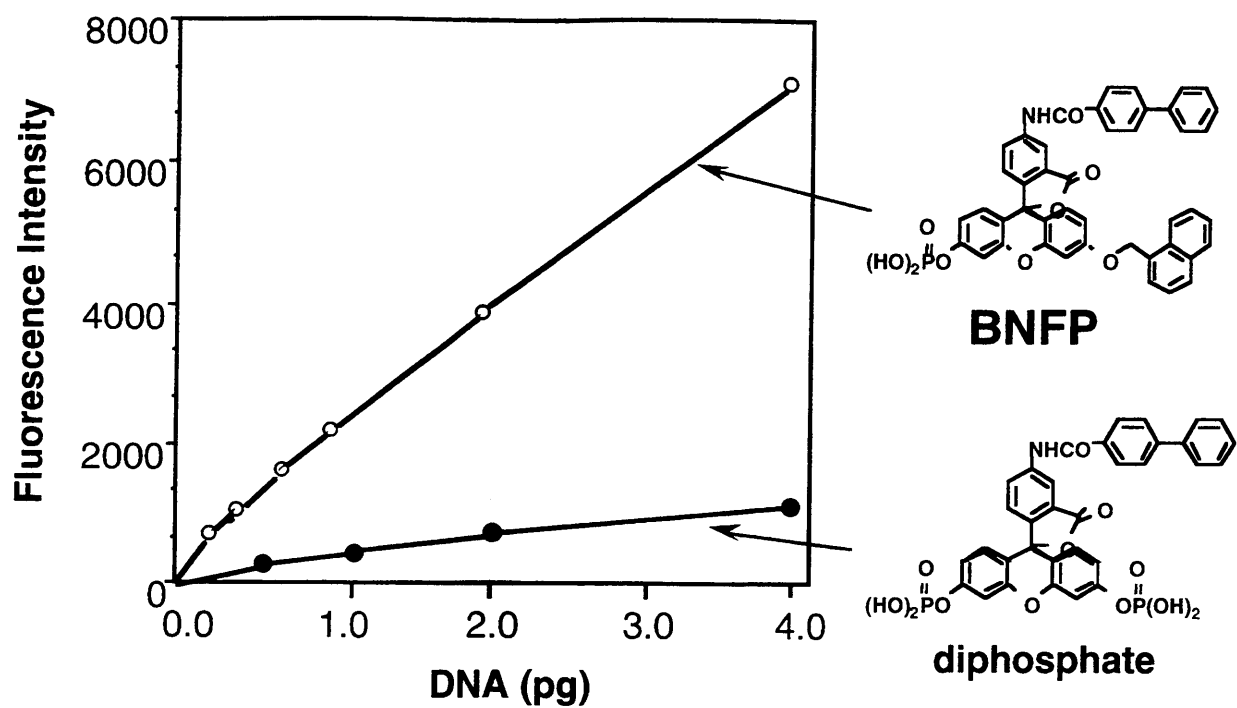


その結果、BNFP は、ジリン酸エステルより 3 倍以上の早さでアルカリホスファターゼの加水分解反応が完了することが分かった。

次に、この両基質を用いてナイロンメンブレン上の DNA の定量性を比較した。その結果を図 3-3 に示す。ディゴキシゲニン標識した λ DNA を一定希釈倍率で希釈し、その DNA 溶液を順にナイロンメンブレン上に 1 μ l づつスポットした。次いで、アルカリホスファターゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体をカップリングさせ、最後に BNFP とジリン酸エステルをそれぞれ反応させ、それぞれのスポットのナイロンメンブレン上の蛍光強度を落射式蛍光検出装置 (Epi-light-UV : (株) アイシン・コスモス研究所) で測定した。その結果、BNFP を用いた場合、DNA 量の少ないスポットから多いスポットまで正確な直線を示した。これは、非特異的吸着体であるモノリン酸エステルがほとんど存在しないため、バックグラウンド蛍光が観察されなく S/N 比が非常に高いことに起因する。この結果より、BNFP は、非常に定量性が良い基質であることを示している。一方、ジリン酸エステルの場合、DNA 量が 1 pg 以上と多くなると DNA 量に従った蛍光強度の増感が観察されなかった。ジリン酸エステルの場合、

非特異的吸着体によるバックグランド蛍光が、DNA量が増加するに従って増えるため S/N比が向上せず定量性が悪いと考えられる。

図 3-3 モノリン酸エステルとジリン酸エステルのナイロンメンブレン上の定量性の比較



3-5 BNFP を用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法におけるDNAの検出

*Hind*III という制限酵素で消化した λ DNAを用いてサザンブロットハイブリダイゼーションをBNFP と化学発光基質であるCSPD を用いて行った。その結果を図3-4に示す。それぞれのレーンに注入した λ DNAの量は、左側のレーンからそれぞれ40 pg、8 pg、1.6 pgである。

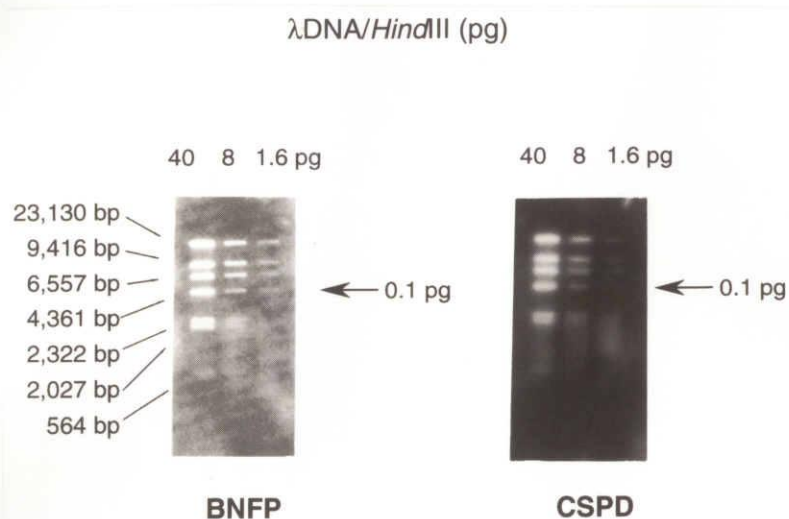


図3-4

BNFPを用いた場合、酵素反応は、37℃、1時間行い、CSPDは、37℃、30分間反応させた後、さらに反応温度を25℃にして30分行った。蛍光シグナルは、落射型蛍光検出装置で検出し、化学発光シグナルは、X線フィルムによって検出した。両基質とも、0.1 pg (4.2×10^{-19} mol) 以上のDNAを検出することに成功した。DNAバンドの解像度は、CSPDよりBNFPを用いた方が優れていることが分かった。

メンブレン上のDNAを検出する方法において、化学発光法は、発色法より検出感度が高く⁶³⁾、放射性同位元素を使った方法と同等の高い検出感度を示す⁶⁴⁾ことが報告されている。BNFPを用いた方法は、化学発光法と同等の検出感度を示し、化学発光法や第2章に示したフルオレセイン誘導体ジリン酸エステルより高い解像度を与える方法である。このBNFP法がジリン酸エステルより高い検出感度を示すのは、ジリン酸エステルのように酵素反応後、モノリン酸エステルが全く存在せず、完全に加水分解されたキノン構造を有するフルオレセイン誘導体のみが存在するため、加水分解体のナイロンメンブレンに対する吸着性が非常に高くなりDNAバンドやスポットの拡散が全く観察されないことに起因する。さらに、未反応のモノリン酸エステルがほとんど蛍光を発しないこと、加水分解体であるキノン構造となるフルオレセイン誘導体の蛍光強度が高いことに起因する。

3-6 まとめ

本章では、第2章で記述したジリン酸エステルより酵素反応時間を短くし、バックグラウンド蛍光をなくす目的でフルオレセイン誘導体モノリン酸エステルを合成し、溶液中やナイロンメンブレン上の蛍光特性及びスポットテスト法やサザンブロット法を用いてDNA検出感度を評価した。

その結果、従来、低収率でしか合成できなかった3'-O-アラルキルフルオレセイン誘導体を、非常に簡便・高収率で合成できる方法を見出した。この炭酸カリウム存在下DMF中での反応は、種々の3'-O-アラルキルフルオレセイン誘導体を90%以上の高収率で合成できることが分かった。

これらのフルオレセイン誘導体は、pH7.5のリン酸緩衝液中では、フルオレセインと同じ最大励起波長・最大蛍光波長を示すことが分かった。

フルオレセイン誘導体モノリン酸エステルは、フルオレセインジリン酸エステルよりアルカリホスファターゼによる加水分解時間が3倍早く、ナイロンメンブレン上のDNAの測定に対する定量性も非常に優れていることが分かった。

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-(1-ナフチルメチル)フルオレセインのモノリン酸エステル体(BNFP)を用いると、サザンブロットハイブリダイゼーション法において0.1 pgのDNAが検出できることがわかった。また、BNFPは、フルオレセイン誘導体ジリン酸エステルの時より非常にバックグラウンド蛍光が低く、さらに、化学発光基質であるCSPDとは、同等の検出感度であるが、CSPDより非常に解像度が優れていることが分かった。

第4章 異なった塩基配列を有する2種類のDNAの2段階法による同時検出

序

異なった塩基配列を持つDNAを同一担体上で同時に検出する技術は、染色体上のDNAを検出する方法、即ち、*in situ* hybridization (ISH) において最も必要とされる。ISHでは、従来、放射性同位元素で標識したプローブを用いる方法が主であったが、最近では蛍光標識によるfluorescent *in situ* hybridization (FISH) 法^{6,9)} や酵素標識法^{70, 71)} が良く用いられるようになった。FISH法によるハイブリダイゼーションシグナルの検出には、蛍光物質が直接ラベルされたヌクレオチド (FITC-12-dUTP など) でDNAプローブを標識する方法 (直接法) とディゴキシゲニン (DIG) 、あるいはビオチンを結合させたdUTP でDNAを標識し、ハイブリダイゼーション後に適当な蛍光物質を抱合させた抗DIG抗体やアビジンを反応させてシグナルを検出する方法 (間接法) がある。直接法ではプローブに標識された蛍光のみでシグナルを検出するため、ユニーク配列プローブのハイブリダイゼーションシグナルを通常の落射式蛍光顕微鏡で捉えることは難しい。一方、間接法では、抗原抗体反応やアビジン-ビオチン結合により、シグナルを物理的に増幅できることから、 λ ファージやコスミドベクターでクローン化された10～40 kbと比較的サイズの大きいプローブのシグナルは、通常の落射式蛍光顕微鏡で容易に検出することができる。このため、間接法でFISHを行うのが標準的である。FISH法の標準化により、大量のクローン化DNA断片のマッピングが可能となり、この数年間で幾つかのヒト染色体で高精度、高密度の細胞遺伝学的地図が作成されてきている。これらの地図を基盤に染色体転座切断点や遺伝性疾患原因遺伝子座のポジショナル・クローニングを進める場合、同一領域に既にマッピングされている数多くのクローンの配列を決定し、その中から目的遺伝子座に最も近いクローンを選択することが重要な作業になる。このクローンのオーダリングに、多色FISH (Two-color FISH, Three-color FISH) が使われている。

FISH法において間接法は、直接法に比べて蛍光物質 (最も一般的に使われているのがフルオレセインイソチオシアネートである) の増幅は起こるが、結合させうる蛍

光物質の分子数に限りがあるため、10 kb 以下の小さいサイズのプローブを検出することはできない。一方、酵素標識法においては、酵素反応によりシグナルの増幅ができるという特徴を有するが、通常使われているアルカリホスファターゼ (ALP) や西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) の基質は、発色性物質であるため検出感度が低い。近年、サザンブロットハイブリダイゼーションなどでは、ALP の基質として化学発光物質 (AMPPD, CSPD, CDPstar) などが最も高感度と言われているが、ISH においては解像度が著しく悪く利用できない。又、最近、アルカリホスファターゼの基質として用いることのできる蛍光物質^{72, 73, 74)} が市販されたが、シングルコピー遺伝子を染め出すほど解像度が高いものではない。

既に、第1章から第3章までに述べたようにナイロンメンブレン上のDNAを高感度に検出でき、さらに酵素による加水分解後、それぞれ異なった蛍光色を発する新規な蛍光基質を見出したので、ナイロンメンブレン上での異なった塩基配列を持つDNAの2段階法による検出を試みた。

4-1 同一メンブレン上での2種類の異なったターゲットDNAの検出

まず、サザンブロットハイブリダイゼーション法でのマルチカラーDNA検出を確立するために、既に第1章で述べたALPの蛍光基質であるHNPP (blue fluorescence) と第3章で述べたALPの基質であるBNFP (yellowish-green fluorescence) を用いて、同一メンブレン上での2種類の異なった塩基配列を持つターゲットDNAの検出を行った。その検出方法の概念図を図4-1に示す。

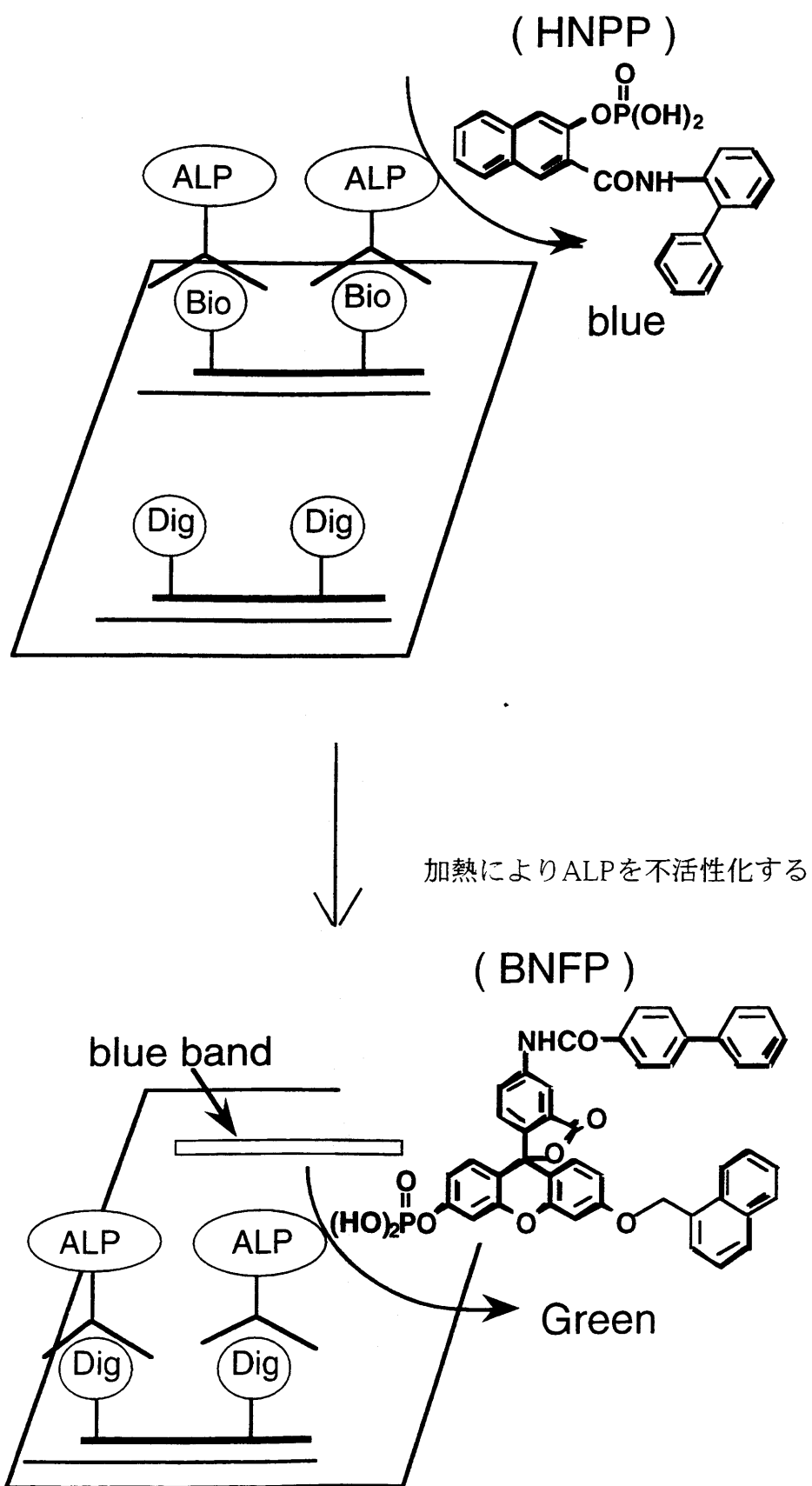


図 4 - 1

一つのターゲットDNAに対して相補的配列を持つプローブDNAにはビオチンを標識する。さらに、もう一つのターゲットDNAに対して相補的配列を持つプローブDNAには、DIG を標識する。次いで、2種類の異なった塩基配列を持つDNAを混ぜ合わせて、ゲル電気泳動を行う。次いで、ナイロンメンブレンに転写し、それぞれのプローブDNAを相補的結合させる。さらに、最初のターゲットDNAの検出のために、ALP標識抗ビオチン抗体をカップリングさせ、HNPPを反応させる。加水分解体のHNPPは、青色蛍光を発し、その場所に沈着する。次いで、加熱によりビオチンに結合したALPを失活させる。次いで、2番目のターゲットDNAを検出するために、ALP標識抗DIG抗体をカップリングさせ、BNFPを反応させる。加水分解体のBNFPは、その場所に沈着し、黄緑色蛍光を発する。この方法により2色検出を行った結果を図4-2に示す。

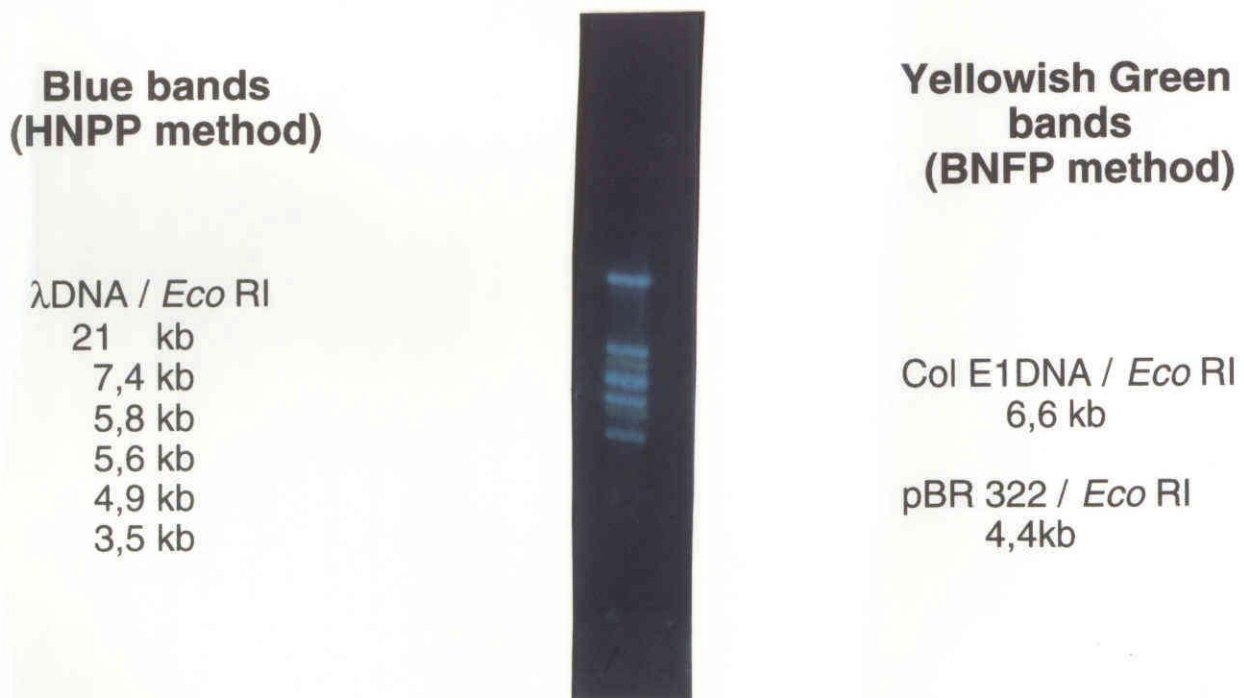


図4-2

最初のターゲットDNAは、21kb, 7.4kb, 5.8/5.6kb, 4.9kb, 3.5kbの5本の青色蛍光のバンドとして現れた。5.8kbと5.6kbのバンドは、バンドサイズにほとんど差がないために、写真はくっついているように見えるが、目視では、はっきりとしたバンドとして認識できた。2番目のターゲットDNAは、6.6kbと4.4kbの2つの黄緑色蛍光のバンドが現れた。このように2種類の異なったDNAを、HNPPとBNFPの2色の蛍光色素を用いて、2段階法によって同時検出することが出来た。しかし、このHNPPとBNFPの両基質を用いて2色FISHを行ったが、染色体に対する沈着性が不十分のため、検出できなかった。

第5章 ペルオキシダーゼ用新規蛍光基質の合成とDNAの高感度検出及び異なった塩基配列を有するDNAの同時検出

序

前章では、ビオチンとディゴキシゲニンという2種類のハプテンを用いてアルカリホスファターゼ（ALP）に対する2種類の蛍光基質HNPPとBNFPを2段階で反応させる検出法について述べた。この方法では、第一段階の蛍光色素沈着の後、ALPの失活操作が必要となる。本章では、2種類の酵素を用いた2色検出法について検討した。2種類の酵素としてALPと西洋わさび由来のペルオキシダーゼ（HRP）を用いて検討を行った。HRPは、抗体に標識できる酵素の中で、最も分子量が小さい酵素であるため、組織化学の分野の酵素を用いた核酸の検出において、これまでよく使われてきた酵素の一つである。図5-1にALPとHRPを用いた2色検出法の概念図を示す。

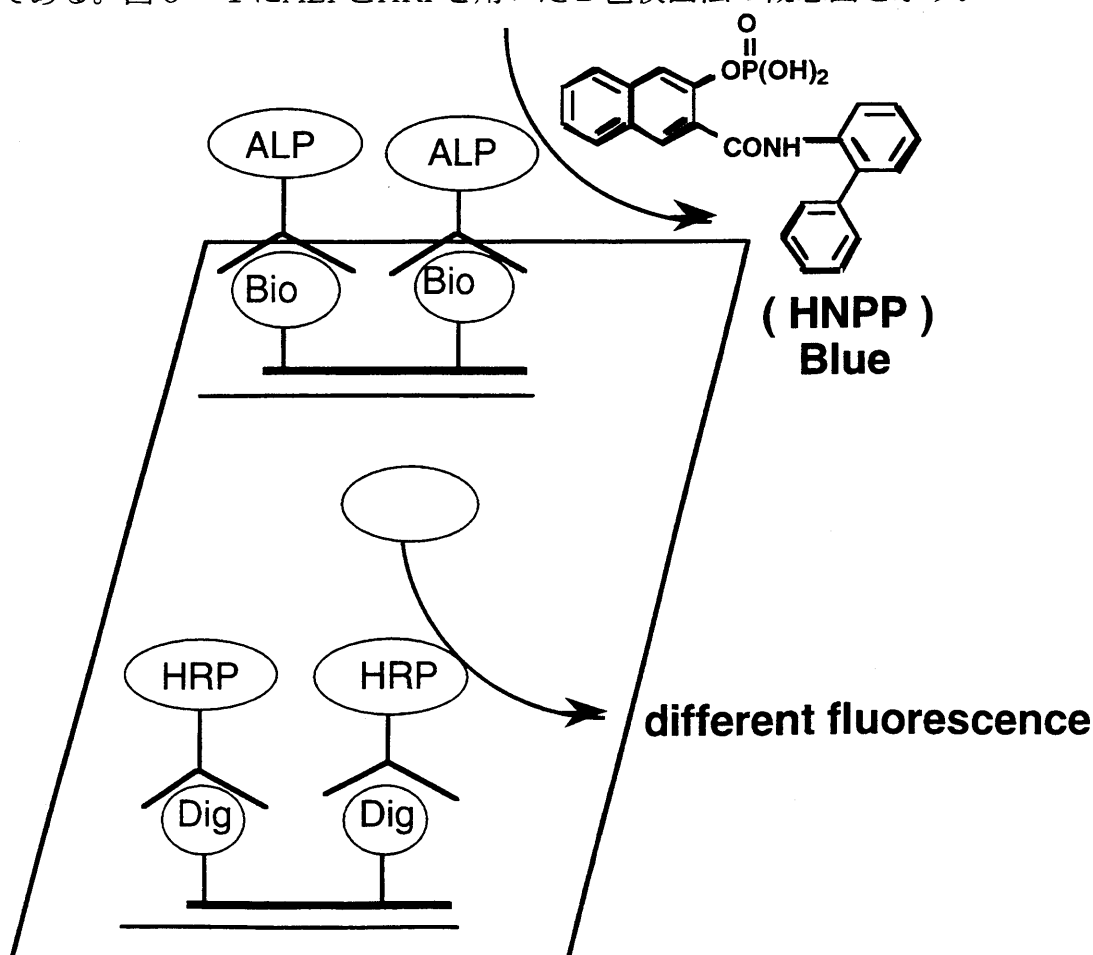


図5-1

一つのターゲットDNAに対して相補的配列を持つプローブDNAに例えば、ビオチンを標識する。さらにもう一つのターゲットDNAに対して相補的配列を持つプローブDNAには、ディゴキシゲニンを標識する。次いで、2種類の異なった塩基配列を持つDNAを混ぜ合わせてゲル電気泳動を行う。次いで、ナイロンメンブレンフィルターに転写し、それぞれのハプテンが標識された相補的なプローブDNAを結合させる。次いで、同時に、ALP標識された抗ビオチン抗体と西洋わさび由来のペルオキシダーゼ（HRP）標識された抗ディゴキシゲニン抗体をカップリングさせる。次いで、同時に、ALPの蛍光基質と西洋わさび由来のペルオキシダーゼ（HRP）の蛍光基質を反応させ、ナイロンメンブレン上のターゲットDNAのその場所に沈着した加水分解体に励起光を照射し、発する蛍光をCCDカメラに取り込み画像化する。

5-1 ペルオキシダーゼ用の新規蛍光基質の合成

ペルオキシダーゼの活性を調べることのできる基質は、2',7'-ジクロロフルオレセイン^{7,5)}が最もよく用いられている。またメンブレン上の核酸を検出する場合に今までによく使われているペルオキシダーゼの基質としては、発色基質である3,3'-ジアミノベンジジン^{7,6)}及びその類似体^{7,7)}、化学発光基質であるルミノール^{7,8,79,80,81)}がある。しかし、メンブレン上で核酸を検出するにはこれらの基質には問題点がある。まずこのフルオレセイン誘導体は、水溶性であるためメンブレンに沈着せず用いることができない。また発色や化学発光基質においては、感度が低いという問題点がある。そこで、メンブレンに沈着する新しい蛍光基質の開発に取り組んだ。新しい基質として、まず、フルオレセインを不溶性にしメンブレンへの沈着性を高めるため、5位の位置に芳香族置換基を導入し、さらに3'位のフェノール性のヒドロキシル基に種々のアラルキル基を導入することを試みた。合成は、第3章に示した方法を用いて行った。5-アミノフルオレセインを出発原料とし、それに、4-ビフェニルカルボニルクロライドを反応させ、精製後、炭酸カリウム存在下ジメチルホルムアミド中種々のハロゲン化アラルキル化合物と反応させ、5位にビフェニルカルボキサミド基を有するフルオレセインモノエーテル体を収率86～99%で得た。また、フルオレセインイソチオシアネート

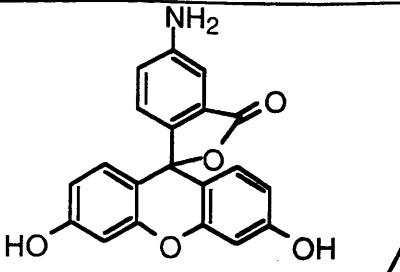
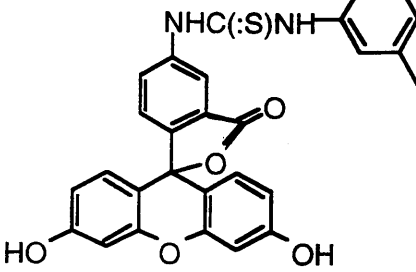
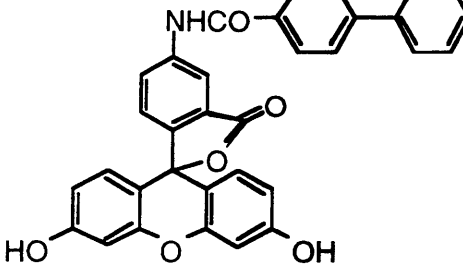
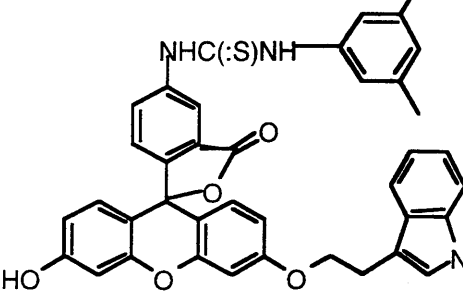
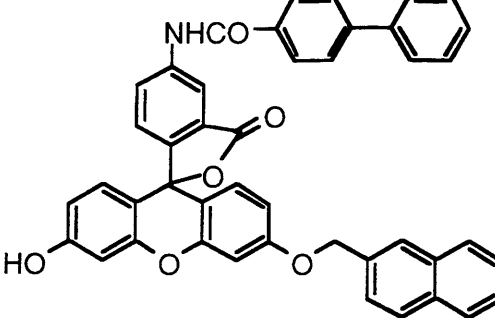
を出発原料とし、それに3,5-ジメチルアニリンを反応させ、精製後、先と同様の反応を行い、このフルオレセインモノエーテル体を収率91～99%で得た。次に新しい蛍光を持ったアニリン誘導体の合成を試みた。2,5-ジメチル-1,4-フェニレンジアミンを出発原料とし、それに種々の置換基を有する塩化ベンゾイルを反応させ、ベンズアミド基を有するフェニレンジアミン誘導体を合成した。

5-2 新規なフルオレセイン誘導体及び芳香族アミノ化合物を用いたペルオキシダーゼの検出

ペルオキシダーゼの検出は次のように行った。ペルオキシダーゼを、pH 7.5のバッファーで1 µgから0.01 µgまで1/10希釈し、その溶液を1 µl ずつニトロセルロースメンブレン及びナイロンメンブレンに順にスポットする。次いでそのメンブレンを風乾させ、ペルオキシダーゼを固定する。過酸化水素水を含んだpH 7.2 のリン酸緩衝液中で基質を室温で反応させた後、フルオレセイン誘導体を用いてペルオキシダーゼの検出を行った。その結果を表5-1に示す。

その結果、ナイロンメンブレンを用いた場合は、どの基質の場合も検出限界が1 µgで、検出時間が1時間という悪い結果となった。これは、基質がペルオキシダーゼと過酸化水素水との反応することによって得られる酸化された化合物とナイロンメンブレンとの親和性が低いため、スポットが拡散してしまい、バックグラウンド蛍光が高くなったことによると考えている。一方、ニトロセルロースメンブレンを用いた場合、5-アミノフルオレセイン 5-1 とN-(3,5-ジメチルフェニル)-5-チオウレイドフルオレセイン 5-2 が、0.01 µgという最も高い検出限界でペルオキシダーゼを検出することができた。中でも、5-アミノフルオレセインは、30分で0.01 µgまで検出できた。

表 5-1 フルオレセイン誘導体 5-1 ~ 5-5 を用いたペルオキシダーゼの検出

No.	酵素基質	ペルオキシダーゼ の検出限界 (反応時間)
5-1		Nc : 0.01 μ g (0.5 h) (low back) Ny : 1 μ g (17 h) (high back)
5-2		Nc : 0.01 μ g (0.5 h) (low back) Ny : 1 μ g (17 h) (high back)
5-3		Nc : 0.1 μ g (17 h) (low back) Ny : 1 μ g (17 h) (high back)
5-4		Nc : 0.1 μ g (17 h) (low back) Ny : 1 μ g (17 h) (high back)
5-5		Nc : 0.1 μ g (17 h) (low back) Ny : 1 μ g (17 h) (high back)

Nc : ニトロセルロースメンブレン、Ny : ナイロンメンブレン

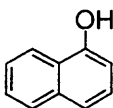
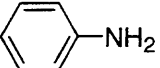
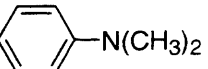

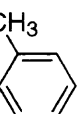
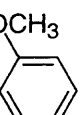
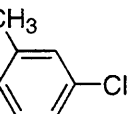
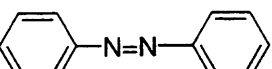
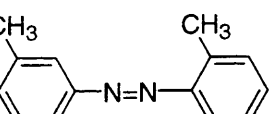
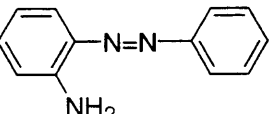
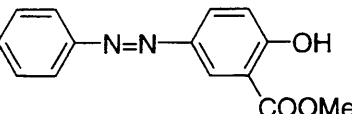
次に種々の芳香族アミノ化合物を用いてフルオレセイン誘導体と同様にメンブレン上のペルオキシダーゼの検出を行った。ペルオキシダーゼとの反応方法として、種々の芳香族アミノ化合物が反応してアゾダイマーを生成する方法^{7,6)}と芳香族アミノ化合物とナフトール化合物を用いたインドフェノールチクローム酸化反応^{8,2, 8,3, 8,4)}が知られている。そこで、種々の芳香族アミノ化合物のみをペルオキシダーゼと反応させた場合と種々の芳香族アミノ化合物とナフトール誘導体を混ぜ合わせた後、ペルオキシダーゼとの反応を行うという2種類の反応を行った。その結果を表5-2に示す。

芳香族アミノ誘導体は、酵素反応後、色となる基質が多いので、蛍光の存在の確認も行った。まず始めに、ニトロセルロースメンブレン上での評価を行った。その結果、0.01 μg という高い検出感度を示したのは、誘導体 5-6、5-7、5-9、5-10、5-11、5-14、5-15、5-17、5-18、5-19、5-20、5-21、5-22、5-23、5-24、5-25、5-26、5-27、5-28、5-37、5-38、5-41、5-47、5-48、5-51、5-57、5-58であった。その中でもニトロセルロースメンブレンに対して高い沈着性を示した基質は、5-9、5-25、5-26であった。この3種類の基質は、検出感度及び沈着性とも非常に優れていた。一方、ナイロンメンブレン上での評価を行った。0.01 μg という高い検出感度を示したのは、誘導体 5-6、5-11、5-17、5-18、5-21、5-27、5-28、5-37、5-47であった。その中でナイロンメンブレンに対してわずかな拡散は見られたが、高い沈着性を示した基質は5-11、5-17、5-18、5-21であった。しかし、ニトロセルロースメンブレンに対するように全く拡散が観察されない基質はなかった。このことよりアニリン誘導体及びアゾ基を有するアニリン誘導体は、ナイロンメンブレンよりニトロセルロースメンブレンの方が高い沈着性を示すことが分かった。また、酵素反応後、蛍光を発する基質はなかった。

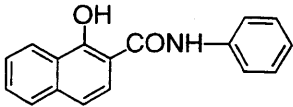
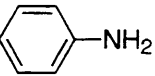
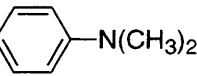

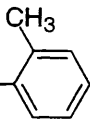
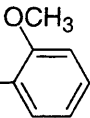
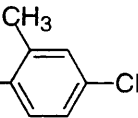
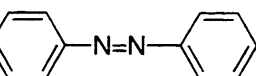
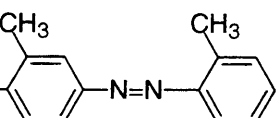
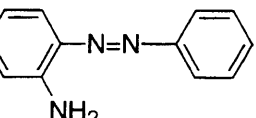
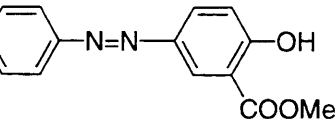
表 5-2 芳香族アミノ化合物 5-6 ~ 5-6.6 を用いたペルオキシダーゼの検出

No.	NH ₂ -X	Nc. membrane		Ny membrane		color / fluorescence
		detection limit	substantivity	detection limit	substantivity	
5-6		0.01 µg	—	0.01 µg	—	brown / none
5-7		0.01 µg	—	0.1 µg	—	purple / none
5-8		ND	—	ND	—	ND
5-9		0.01 µg	+	1 µg	+	brown / none
5-10		0.01 µg	±	1 µg	±	brown / none
5-11		0.01 µg	±	0.01 µg	±	brown / none
5-12		0.1 µg	+	1 µg	+	brown / none
5-13		0.1 µg	+	1 µg	+	brown / none
5-14		0.01 µg	±	1 µg	±	brown / none
5-15		0.01 µg	±	1 µg	±	brown / none
5-16		1 µg	—	1 µg	—	brown / none

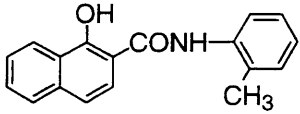

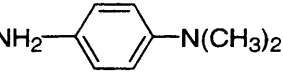
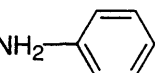
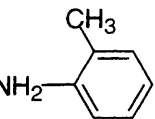
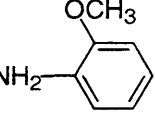
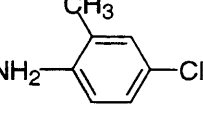
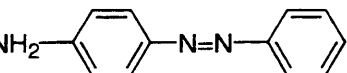
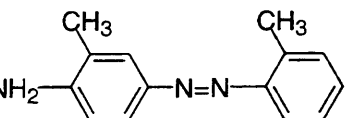
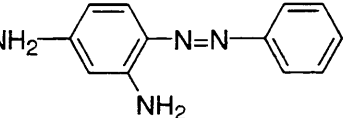
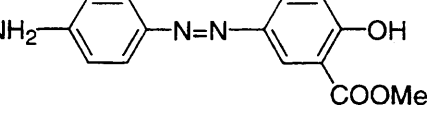
Nc. : nitrocellulose membrane, Ny.: nylon membrane, + : high, ± : moderate, - : low

No.	NH ₂ -X + 	Nc. membrane		Ny membrane		color / fluorescence
		detection limit	substantivity	detection limit	substantivity	
5-17	NH ₂ - 	0.01 µg	±	0.01 µg	±	purple / none
5-18	NH ₂ - 	0.01 µg	±	0.01 µg	±	blue / none
5-19	NH ₂ - 	0.01 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-20	NH ₂ - 	0.01 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-21	NH ₂ - 	0.01 µg	±	0.01 µg	±	purple / none
5-22	NH ₂ - 	0.01 µg	±	1 µg	+	purple / none
5-23	NH ₂ - 	0.01 µg	±	1 µg	+	purple / none
5-24	NH ₂ - 	0.01 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-25	NH ₂ - 	0.01 µg	+	1 µg	+	purple / none
5-26	NH ₂ - 	0.01 µg	+	1 µg	+	purple / none

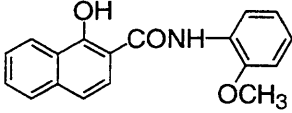
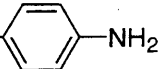
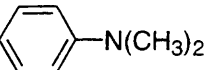

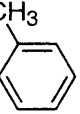
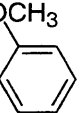
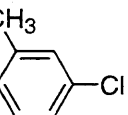
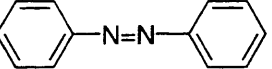
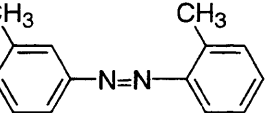
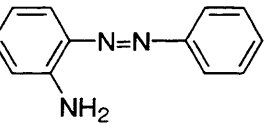
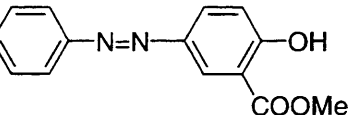
Nc. : nitrocellulose membrane, Ny.: nylon membrane, + : high, ± : moderate, - : low

No. $\text{NH}_2\text{-X} + $ 	Nc. membrane		Ny membrane		color / fluorescence
	detection limit	substantivity	detection limit	substantivity	
5-27 NH_2 - 	0.01 μg	\pm	0.01 μg	\pm	blue / none
5-28 NH_2 - 	0.01 μg	\pm	0.01 μg	\pm	blue / none
5-29 NH_2 - 	0.1 μg	\pm	1 μg	\pm	purple / none
5-30 NH_2 - 	0.1 μg	\pm	1 μg	\pm	purple / none
5-31 NH_2 - 	0.1 μg	\pm	1 μg	\pm	purple / none
5-32 NH_2 - 	0.1 μg	\pm	1 μg	\pm	purple / none
5-33 NH_2 - 	0.1 μg	\pm	1 μg	\pm	purple / none
5-34 NH_2 - 	0.1 μg	\pm	1 μg	\pm	purple / none
5-35 NH_2 - 	0.1 μg	\pm	1 μg	\pm	purple / none
5-36 NH_2 - 	0.1 μg	\pm	1 μg	\pm	purple / none

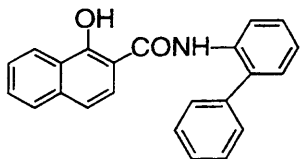

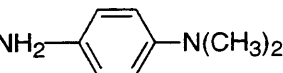
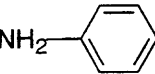
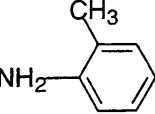
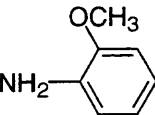
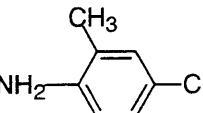
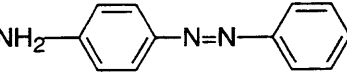
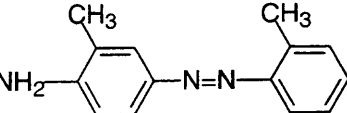
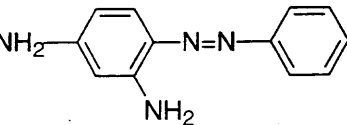
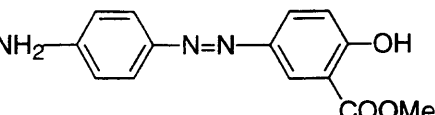
Nc. : nitrocellulose membrane, Ny.: nylon membrane, + : high, \pm : moderate, - : low

No.	NH ₂ -X + 	Nc. membrane		Ny membrane		color / fluorescence
		detection limit	substantivity	detection limit	substantivity	
5-37		0.01 µg	±	0.01 µg	±	blue / none
5-38		0.01 µg	±	0.01 µg	±	blue / none
5-39		0.1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-40		0.1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-41		0.01 µg	±	0.1 µg	±	purple / none
5-42		0.1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-43		0.1 µg	±	0.1 µg	±	purple / none
5-44		0.1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-45		0.1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-46		0.1 µg	±	1 µg	±	purple / none

Nc. : nitrocellulose membrane, Ny.: nylon membrane, + : high, ± : moderate, - : low

No.	NH ₂ -X + 	Nc. membrane		Ny membrane		color / fluorescence
		detection limit	substantivity	detection limit	substantivity	
5-47	NH ₂ - 	0.01 µg	±	0.01 µg	±	blue / none
5-48	NH ₂ - 	0.01 µg	±	0.1 µg	±	blue / none
5-49	NH ₂ - 	0.1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-50	NH ₂ - 	0.1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-51	NH ₂ - 	0.01 µg	±	0.1 µg	±	purple / none
5-52	NH ₂ - 	0.1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-53	NH ₂ - 	0.1 µg	+	1 µg	±	purple / none
5-54	NH ₂ - 	0.1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-55	NH ₂ - 	0.1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-56	NH ₂ - 	0.1 µg	±	1 µg	±	purple / none

Nc. : nitrocellulose membrane, Ny.: nylon membrane, + : high, ± : moderate, - : low

No.	NH ₂ -X + 	Nc. membrane		Ny membrane		color / fluorescence
		detection limit	substantivity	detection limit	substantivity	
5-57		0.01 µg	±	0.1 µg	±	blue / none
5-58		0.01 µg	±	0.1 µg	±	blue / none
5-59		1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-60		1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-61		0.1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-62		1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-63		1 µg	+	1 µg	±	purple / none
5-64		1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-65		1 µg	±	1 µg	±	purple / none
5-66		1 µg	±	1 µg	±	purple / none

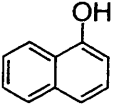
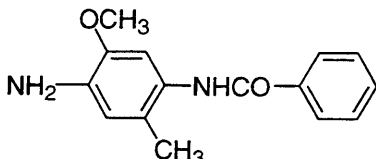
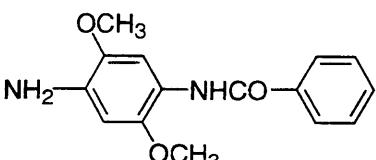
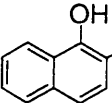
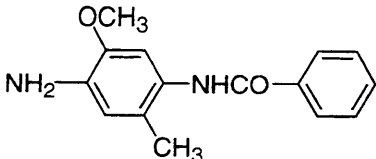
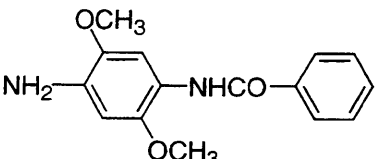
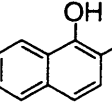
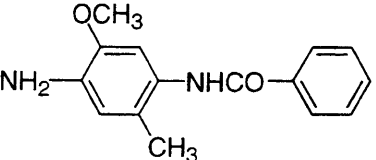
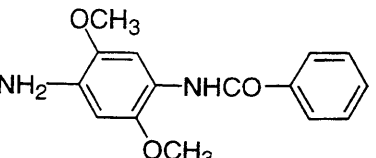
Nc. : nitrocellulose membrane, Ny.: nylon membrane, + : high, ± : moderate, - : low

次に4-アミノフェニルベンズアミド誘導体 5-67 ~ 5-81 を用いてペルオキシダーゼの検出感度を検討した。その結果を表5-3に示す。

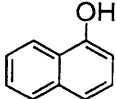
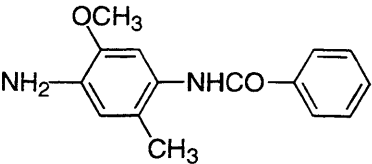
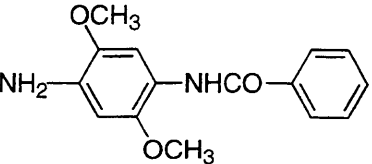
表5-3 4-アミノフェニルベンズアミド誘導体 5-67 ~ 5-81 を用いたペルオキシダーゼの検出感度

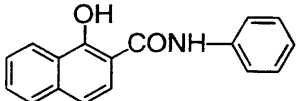
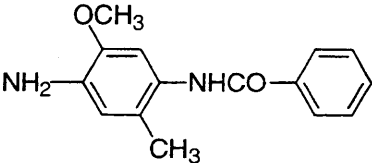
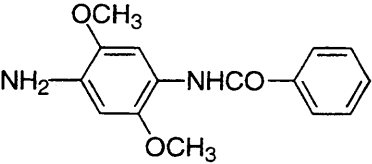
No.	NH ₂ -X	Nc. membrane		Ny membrane		color / fluorescence
		detection limit	substantivity	detection limit	substantivity	
5-67		0.01 µg	++	0.1 µg	++	purple / none
5-68		0.01 µg	+	0.1 µg	+	purple / none
5-69		0.01 µg	++	0.01 µg	++	yellow / fluorescence
5-70		0.01 µg	+	0.1 µg	+	yellow / fluorescence
5-71		0.01 µg	+	0.1 µg	+	yellow / fluorescence

Nc. : nitrocellulose membrane, Ny. : nylon membrane,
 ++ : very high substantivity, + : high substantivity, ± : moderate substantivity, - : low substantivity

No.	$\text{NH}_2\text{-X} + $ 	Nc. membrane		Ny membrane		color / fluorescence
		detection limit	substantivity	detection limit	substantivity	
5-72		0.01 μg	+	0.1 μg	\pm	purple / none
5-73		0.01 μg	+	0.1 μg	\pm	purple / none
No.	$\text{NH}_2\text{-X} + $ 	Nc. membrane		Ny membrane		color / fluorescence
		detection limit	substantivity	detection limit	substantivity	
5-74		0.1 μg	\pm	0.1 μg	\pm	purple / none
5-75		0.1 μg	\pm	0.1 μg	\pm	purple / none
No.	$\text{NH}_2\text{-X} + $ 	Nc. membrane		Ny membrane		color / fluorescence
		detection limit	substantivity	detection limit	substantivity	
5-76		0.01 μg	\pm	1 μg	\pm	purple / none
5-77		0.01 μg	\pm	0.1 μg	\pm	purple / none

Nc. : nitrocellulose membrane, Ny. : nylon membrane,
 ++ : very high substantivity, + : high substantivity, \pm : moderate substantivity, - : low substantivity

No.	$\text{NH}_2\text{-X} + $ 	Nc. membrane		Ny membrane		color / fluorescence
		detection limit	substantivity	detection limit	substantivity	
5-78		0.1 μg	\pm	1 μg	\pm	purple / none
5-79		0.1 μg	\pm	0.1 μg	\pm	purple / none

No.	$\text{NH}_2\text{-X} + $ 	Nc. membrane		Ny membrane		color / fluorescence
		detection limit	substantivity	detection limit	substantivity	
5-80		1 μg	\pm	1 μg	\pm	purple / none
5-81		0.1 μg	\pm	0.1 μg	\pm	purple / none

++ : very high substantivity, + : high substantivity, \pm : moderate substantivity, - : low substantivity
 Nc. : nitrocellulose membrane, Ny : nylon membrane

まず始めに、ニトロセルロースメンブレン上での評価を行った。その結果、0.01 μg という高い検出感度を示したのは、誘導体 5-67、5-68、5-69、5-70、5-71、5-72、5-73、5-76、5-77、であった。その中でもニトロセルロースメンブレンに対して非常に高い沈着性を示した基質は、5-67、5-69であった。また、わずかな拡散は見られた基質は、5-72、5-73、5-76、5-77であった。次いで、ナイロンメンブレン上での評価を行った。0.01 μg という高い検出感度を示したのは、誘導体 5-69 だけであった。この基質は、ナイロンメンブレンに対して非常に高い沈着性を示すことが分かった。誘導体 5-69・5-70・

5-71は、非常に興味深いことにペルオキシダーゼとの反応後、強い黄色蛍光を発することが分かった。ペルオキシダーゼとの反応後、蛍光を発する基質として唯一2',7'-ジクロロフルオレセインが知られていた。今年になって、同仁化学よりペルオキシダーゼの新しい基質として4-アセトアミドフェノールが報告された⁸⁵⁾。この蛍光基質は、水溶液中の検出系で、ペルオキシダーゼ活性を測定する基質である。誘導体5-69、5-70、5-71のようなナイロンメンブレンに沈着し、その場所で、蛍光を発するという特長を持った基質は初めての報告例である。もとより、5-69、5-70、5-71自身は蛍光を示さない。ペルオキシダーゼとの反応後に蛍光を発する物質に変わる。そこで、ペルオキシダーゼとの反応生成物を確認するために、誘導体5-69とペルオキシダーゼとの反応を行った。96 mg (0.375 mmol) の誘導体5-69をDMF 2 mlに溶解し、pH 7.2の1/15 Mのリン酸緩衝液を加え、不溶物を0.45 μ mのセルロースアセテートフィルターに通して除く。次いで、30%過酸化水素水を20 μ l加え、次いで、10mg/mlの濃度のペルオキシダーゼを100 μ l加え、室温で5分間反応させる。反応後、凍結乾燥器にて、水を除き、残った沈殿体をカラムクロマトグラフィーにより精製した。得られた化合物は、驚くべきことに、式5-1に示すアゾ二量体5-69 azoであった。この化合物のスペクトルデータを表5-4に示す。アニリン誘導体が、ペルオキシダーゼと反応してアゾ二量体を与えることは知られているが⁷⁶⁾、通常アゾ化合物は、色を示し蛍光は示さない。本結果で得られた蛍光を示すアゾ化合物は、極めて珍しい。アゾ二量体5-69 azoは、DMF中では、最大励起波長は312nmで、最大蛍光波長は440nmであった。

式 5-1 誘導体 5-69 とペルオキシダーゼとの反応

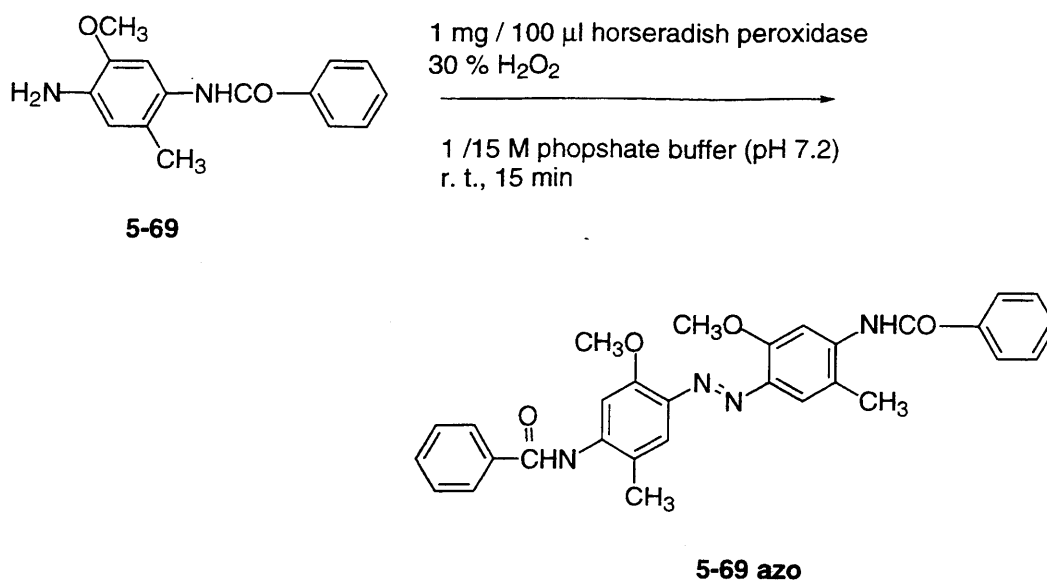


表 5-4 5-69azoの解析データ

1H-NMR (200 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm), J (Hz)
2.24 (s, 6H, Ar-CH ₃), 3.72 (s, 6H, Ar-OCH ₃), 7.51-7.89 (m, 14H)
IR (KBr)
1650 (-NHCO-), 1300-1250 (-N=N-, trans form)
MS (SIMS)
509 (M+1) ⁺ , 495, 336, 288, 258, 235, 224

5-3 新規なフルオレセイン誘導体及び4-アミノフェニルベンズアミド誘導体を用いたメンブレン上のDNAの検出

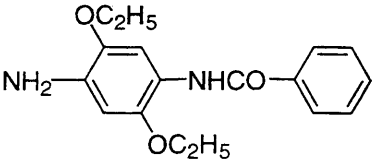
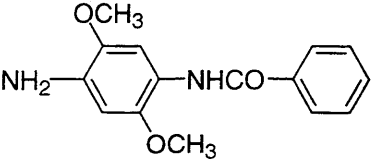
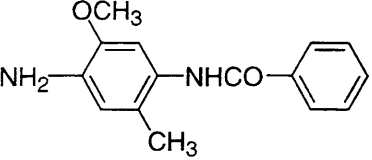
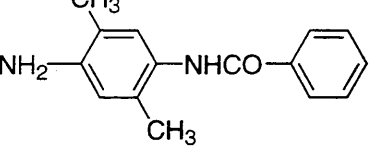
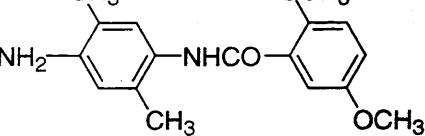
フルオレセイン誘導体と4-アミノフェニルベンズアミド誘導体を用いて、スポットテスト法により、ナイロンメンブレン上のDNAの検出を試みた。検出方法としては、第1章1-1に記載と同様の方法を用いて、ナイロンメンブレンにある希釈倍率で、ディ

ゴキシゲニン標識したDNAを1 μ l づつスポットし、次いで、ペルオキシダーゼ 標識した抗ディゴキシゲニン抗体をカップリングさせ、次いで、0.003% 過酸化水素水を加え、酵素反応を行った。

その結果、表 5-1 に示した全てのフルオレセイン誘導体は、DNAに抗体を介して結合したペルオキシダーゼとの反応性が非常に低いためよい結果が得られなかった。表 5-5 に幾つかの4-アミノフェニルベンズアミド誘導体のDNA検出結果を示す。検討した4-アミノフェニルベンズアミド誘導体の内、誘導体 5-67 と 5-69 によりDNAを検出できることが分かった。それ以外の基質は全くDNAを検出できなかった。特にN-(4-アミノ-5-メトキシ-2-メチルフェニル) ベンズアミド 5-69 は、400 fg という高い検出感度でメンブレン上のDNAを検出できた。また、5-69 は、バックグラウンドは非常に低く、ナイロンメンブレンに非常に高い沈着性を持つことが分かった。誘導体 5-69 を略してAMMB とする。誘導体 5-67 は、検出感度が50 pg と低く、沈着性も低かった。

AMMB をナイロンメンブレンにスポットしたDNAに抗体を介して結合しているペルオキシダーゼと反応させ、ナイロンメンブレン上の蛍光を測定した。その結果、最大励起波長が418 nm で、最大蛍光波長が530 nm であった。このAMMBは、ナイロンメンブレン上の蛍光は、DMF中の蛍光波長より90 nm 長波長シフトしていることが分かった。又最大励起波長は、約100 nm 長波長シフトしていた。AMMB は、298 nmの励起波長でも、最大励起波長(418 nm) とほぼ同じ強度を示し、298 nmで照射しても最大蛍光波長は、530 nmであることが分かったので、通常のUVランプで検出することができた。

表 5-5 4-アミノフェニルベンズアミド誘導体の 5-67 ~ 5-71 の DNA 検出
結果

No.	NH ₂ -X	detection limit	substantivity	background
5-67		50 pg	+	low
5-68		ND	ND	ND
5-69		0.4	++	low
5-70		ND	ND	ND
5-71		ND	ND	ND

++ : high substantivity, + : moderate substantivity, ± : low substantivity

5-4 AMMB を用いたサザンブロットハイブリダイゼーション

サザンブロットハイブリダイゼーションは、第2章2-5記載の方法で行った。即ち、 λ DNAをHind IIIで消化し、ゲル電気泳動する。次いで、ナイロンメンブレンに転写し、ディゴキシゲニン標識されたHind IIIで消化した λ DNAをハイブリダイズさせる。次いで、ペルオキシダーゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体をカップリングさせ、AMMB 反応させる。サザンブロットの結果の写真を図5-2示す。

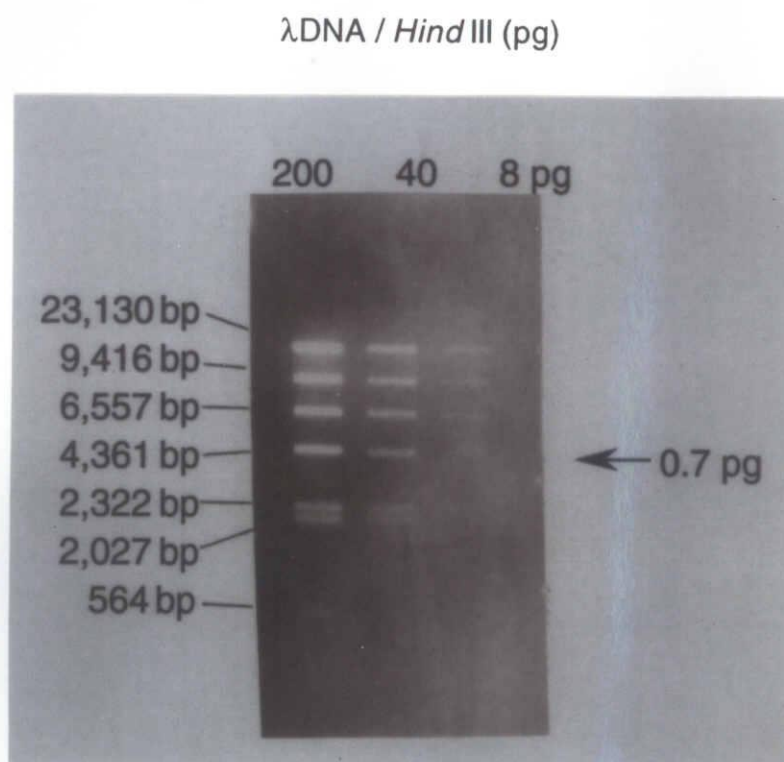


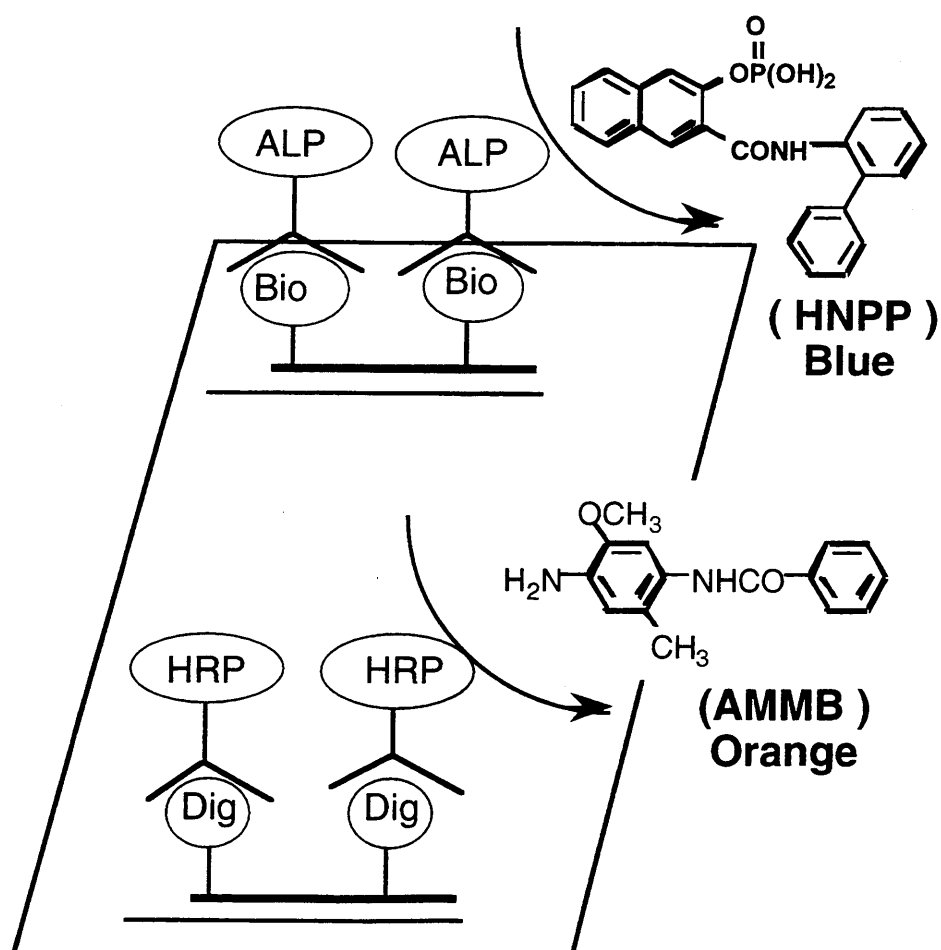
図5-2

図5-2で分かるように、ペルオキシダーゼとAMMBの組み合わせにより0.7 pgのDNAを検出することが出来ることが分かった。この検出感度は、従来用いられている発色基質や化学発光基質の約10倍の検出感度である。このことにより、メンブレン上の異なった塩基配列を持つDNAを、同一メンブレン上で同時に検出できる新しい多色プローブシステムの構築の可能性が示されたので、次に検討した。

5-5 同一メンブレン上での2種類の異なったターゲットDNAの1段階検出法

サザンブロットハイブリダイゼーション法でのマルチカラーDNA検出を確立するために、既に第1章で報告したALPの蛍光基質であるHNPP(青色蛍光)とAMMB(橙色蛍光)を用いて、同一メンブレン上での2種類の異なった塩基配列を持つターゲットDNAの1段階検出を行った。その検出方法の概念図を図5-3に示す。

図5-3 1段階法による2色検出法



その方法を具体的に述べると、まず始めに、*Eco*RIで消化した λ DNAと*Eco*RIで消化したCol EI DNAと*Eco*RIで消化したpBR 322 DNAの混合したものをゲル電気泳導し、次いで、ナイロンメンブレンに転写する。次いで、ディゴキシゲニン標識した*Eco*RIで消化した λ DNAプローブとビオチン標識したCol EI DNAプローブと*Eco*RIで消化したpBR 322 DNAプローブを相補的結合させる。次いで、HRP標識した抗ディゴキシゲニン抗体とALP標識抗ビオチン抗体をそれぞれのハプテンに同時にカップリングさせ、次いで、AMMBとHNPPを反応させる。加水分解体のHNPは、青色蛍光を発し、AMMBの酵素反応後のアゾ二量体は、オレンジ蛍光を発し、両化合物ともその場所に沈着する。次いで、この蛍光シグナルをCCDカメラに取り込み画像化した。その結果を図5-4に示す。



図5-4

*Eco*RIで消化したλDNAは、AMMBで発色し、21kb, 7.4kb, 5.8/5.6kb, 4.9kb, 3.5kbの5本のオレンジ蛍光のDNAバンドとして現れた。5.8kbと5.6kbのDNAバンドは、DNAの長さにほとんど差がないために、写真はくっついて見えるように見えるが、目視では、はっきりとした2本のDNAバンドとして認識できた。*Eco*RIで消化したCol EI DNAと*Eco*RIで消化したpBR 322 DNAは、HNPPで発色し、6.6kbと4.4kbの2つの青色蛍光のバンドが現れた。このように2種類の異なったDNAの1段階法による同時検出である2色検出 検出に成功した。

5-6 まとめ

本章では、異なった塩基配列を持つDNAの同時検出を行う目的で、2種類の酵素を用いた1段階法による2色検出について検討した。2種類の酵素として、アルカリホスファターゼと西洋わさび由来のペルオキシダーゼを用いて検討した。そこで、ペルオキシダーゼの新規蛍光色素として種々のフルオレセイン誘導体・芳香族アミノ誘導体・4-アミノフェニルベンズアミド誘導体を合成し、溶液中とナイロンメンブレン上の蛍光特性及びスポットテスト法やサザンブロットハイブリダイゼーション法によるDNAの検出感度の評価を行った。

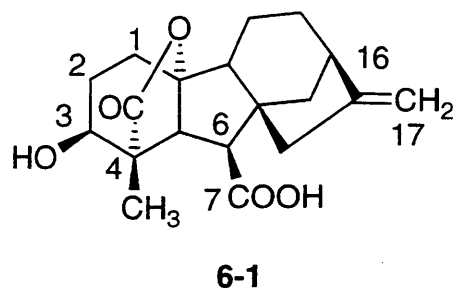
その結果、N-(4-アミノ-5-メトキシ-2-メチルフェニル)ベンズアミド(AMMB)を用いるとサザンブロットハイブリダイゼーション法において0.7pgのDNAが検出できることが分かった。AMMBは、従来から用いられているペルオキシダーゼの蛍光基質や発色基質よりサザンブロットハイブリダイゼーション法において10倍高い検出感度を持つことが分かった。また、AMMBは、ペルオキシダーゼとの反応後、DMF中では、最大励起波長は312 nmで、最大蛍光波長は、440nmであるが、ナイロンメンブレン上では、最大励起波長が、298 nmと418nmで、最大蛍光波長は、530nmまで長波長シフトすることが分かった。また、AMMBは、ペルオキシダーゼとの反応後アゾ2量体になることが分かった。さらに、アルカリホスファターゼとHNPPの組み合わせ及びペルオキシダーゼとAMMBの組み合わせを用いて、異なった塩基配列を持つDNAの1段階法による同時2色検出を行うことが出来た。

第6章 酵素標識用新規ラベリング試薬の開発

序

DNA 検出技術は、分子生物学、組織化学、DNA 診断分野等で、最も有効手段として広く用いられている。従来より DNA の検出は、非常に高感度な方法として RI プローブ法が用いられてきたが、最近では、蛍光色素、化学発光化合物を用いた非 RI プローブ法に置き換わりつつある。非 RI プローブ法の中で、現在最も高感度であるのは、酵素反応による増幅を利用する、酵素標識法 (酵素法) である。酵素法には、様々な方式があるが、ハプテンをニックトランスレーション^{8 6)}や、ランダムプライマー伸長法^{8 7)}、^{8 8)}で DNA プローブに導入し、抗体を介して酵素を結合させる方式、または、同様にビオチンを DNA プローブに導入し、ストレプトアビジンを介して酵素を結合させる方式が最も感度が高いものとして知られている。酵素としては、仔ウシ小腸アルカリホスファターゼ、西洋わさび由来のペルオキシダーゼ、そして β -ガラクトシダーゼの三種類がよく使われているが、中でもアルカリホスファターゼを用いる方法が、最も高感度である。ハプテンとしては、古くからビオチンが用いられているが、最近では、ディゴキシゲニンを用いる方法も C.Kessler 等により報告されている。しかし、この方法でも RI プローブ法を凌駕するに至っていない。アルカリホスファターゼ標識法をさらに高感度にするために、新規なラベリング試薬の開発が重要である。ジベレリンは、1926 年黒沢栄一氏により *Gibberella fujikuroi* (Saw) Wollenweber (稲馬鹿苗菌) から発見され^{8 9)}、1939 年薮田貞治郎により初めて化学的に単離された^{9 0)}植物中の成長促進作用のあるホルモンの一種で、ジベレリン骨格を持つ誘導体は、現在までに 79 種類が知られている^{9 1)}。この中で、一部のものは、特異的な認識を示し、モノクローナル抗体として使用できることが知られている^{9 2)}。1990 年、Michael H.Beale は、タンパク用のハプテンとして、その 17 位の炭素をカルボメトキシル化したジベレリン A₄ (GA₄) の誘導体を合成し、種々のジベレリン誘導体の抗体化を評価した結果、最も抗体化が高い誘導体はジベレリン A₄ であると報告されている^{9 3)}。図 6-1 にジベレリン A₄ の構造式を示す。

図 6-1 ジベレリンA4の構造式

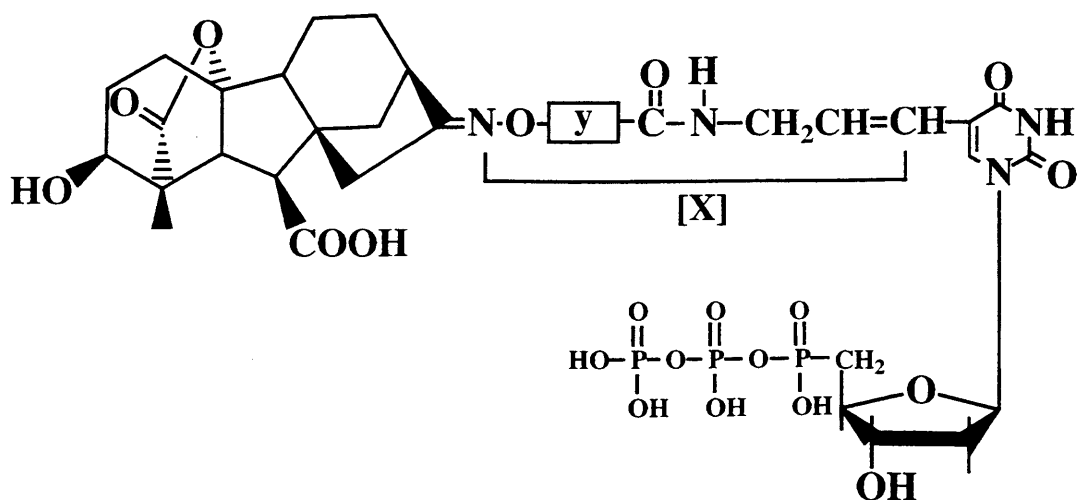


そこで、ジベレリンA4をDNA検出用のハプテンとして利用するために種々のジベレリンA4誘導体の合成を行い、それらを用いてDNA検出感を検討した。

6-1 GA₄ 標識dUTPを用いたプローブ DNA

本研究では、より高感度な酵素標識用新規ラベリング試薬を開発することを目的とし、リンカーの長さの異なる数種類の ジベレリンA₄ (GA₄) 標識ハプテンを合成することにした。GA₄ の 16 位に dUTP (deoxyribourizine triphosphate) との接合部を持つ GA₄ 標識 dUTP (GA₄-[X]-dUTP) をデザインした (図 6-2)。

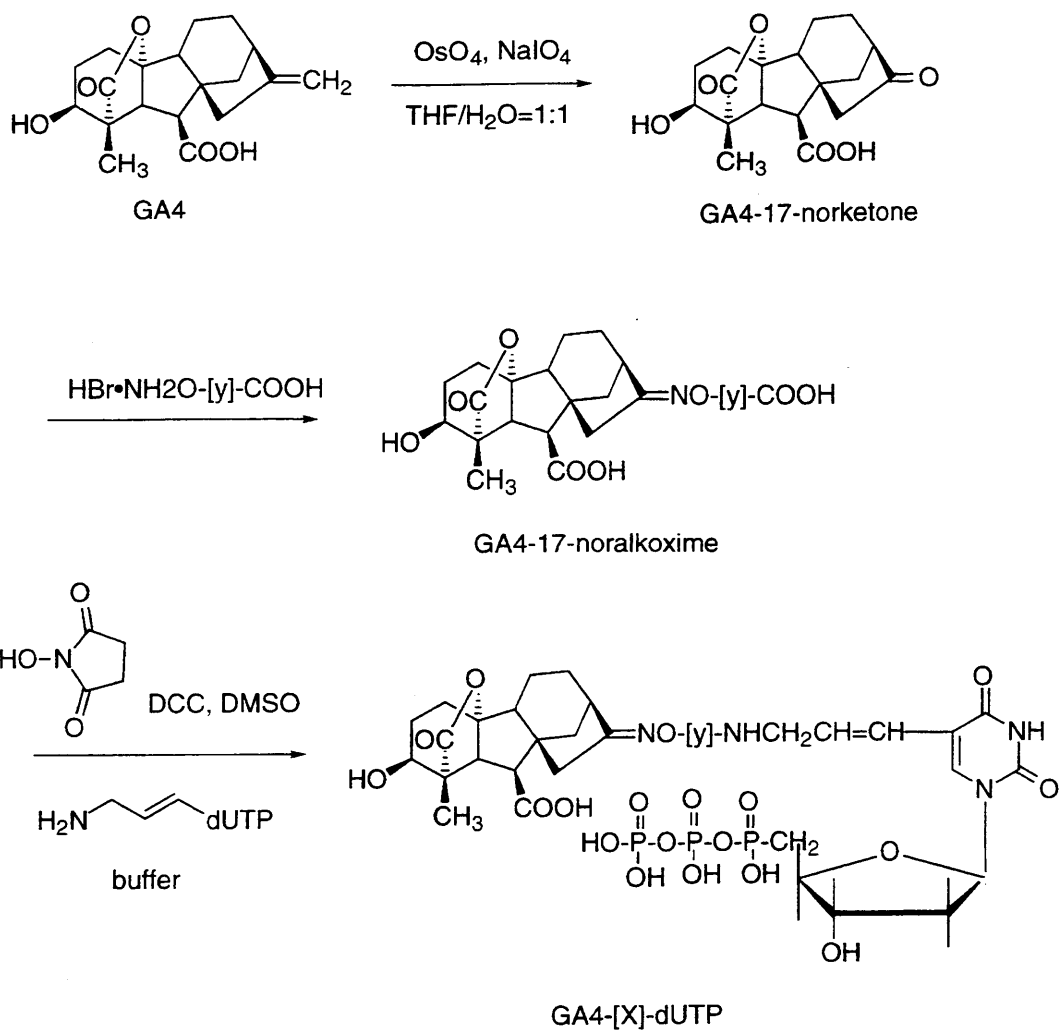
図 6-2 GA₄ 標識 dUTP (GA₄-[X]-dUTP) の構造式



先ず GA_4 -16-カルボメトキシムを用いて C.Kessler 等と同様にカルボキシ基をジシクロヘキシルカルボジイミドと N-ヒドロキシスクシンイミドにより活性化させ、次いでアミノ酸を反応させる方法で、 GA_4 -標識 dUTP の合成を試みたが、効率よく反応は進行しなかった。それは、 GA_4 -16-カルボメトキシムには、16 位の末端に加え、7 位にもカルボキシ基があるためだと考えられる。そこでリンカー部分を先に合成し、最後に GA_4 -17-ノルケトンとカップリングさせる方法で合成を試みた。

その合成法の概略を次に述べる(式 6-1)。先ず始めに GA_4 の 16 位を四酸化オスミウムと過ヨウ素酸ナトリウムで酸化し、 GA_4 -17-ノルケトンにする。次に、 GA_4 -17-ノルケトンと市販、若しくは別に合成したアミノ酸の塩をピリジン中でカップリングさせ、 GA_4 -17-ノルアルコキシムにする。次いで、dUTP のアリルアミン体とカップリングさせ、ハプテン標識された dUTP を合成する。こうして合成した数種類の GA_4 -[X]-dUTP を用いて、ランダムプライマー伸長法(この方法については、6-2 で詳しく述べる)によりプローブ DNA を合成し、アルカリホスファターゼを用いる酵素法により、DNA の検出感度を調べた。次節では、 GA_4 -[X]-dUTP について詳述する。

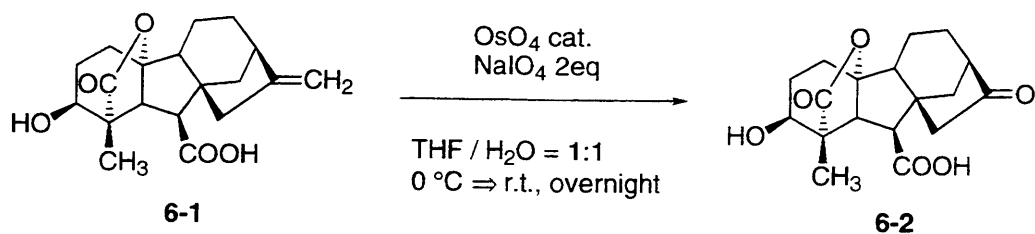
式 6-1 GA4-[X]-dUTPの合成方法の概略図



6-2 GA₄ 標識dUTP及びGA₄標識プローブDNAの合成

四酸化オスミウム/過ヨウ素酸ナトリウムで酸化することにより、GA₄からGA₄-17-ノルケトン⁹¹⁾を合成した。この反応は、古くからジベレリン誘導体の化学的合成によく用いられている⁹¹⁾。

GA₄をTHF/H₂O (1/1) 混合溶媒に溶かし、氷浴で0°Cに冷却し、触媒量の四酸化オスミウムを加える。このとき、溶液の色が、無色透明から徐々に黄色っぽくなり、時間と共に濃くなり茶褐色になる。続いて、2当量の過ヨウ素酸ナトリウムを30分かけて加え、氷浴から出し、そのまま室温で一晩攪拌する。溶液の色は、薄い黄色になり、白色沈殿が析出してくる。TLC (展開溶媒; 酢酸エチル/クロロホルム/酢酸 = 20/12/1) でR_f 値 0.52 の青紫色 (発色液; 氷酢酸/濃硫酸/p-アニスアルデヒド = 10/0.2/0.1) のGA₄のスポットが消失したことを確認し、不溶解物を濾別し、濾液のpHを6Nの濃硫酸で1.5に調整し、酢酸エチルで抽出を行う。硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより単離する。収率62%で目的物であるGA₄-17-ノルケトンを得た (式6-2)。

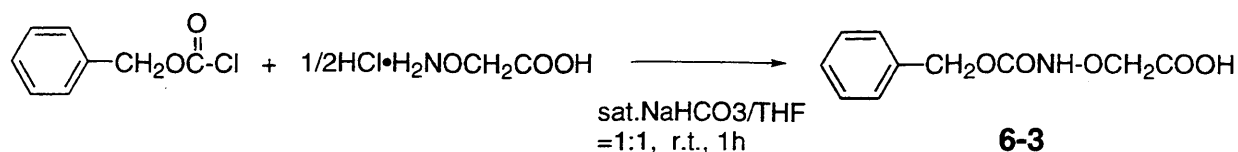


式6-2

¹H-NMR でジベレリンに観測される 17 位のメチリデンプロトン δ 4.85 (1H, brs, =CH₂) および δ 4.96 (1H, brs, =CH₂) の消失、そして融点 125 ~ 143.5°C (122 ~ 135°C⁹³⁾、120 ~ 140°C⁹⁵⁾) により、生成物をGA₄-17-ノルケトンと決定した。

リンカーの合成は、カルボキシメトキシルアミンのアミノ基の保護から始めた。アミノ保護基は、t-ブトキシカルボニル (Boc)、ベンジルオキシカルボニル (Cbz)、9

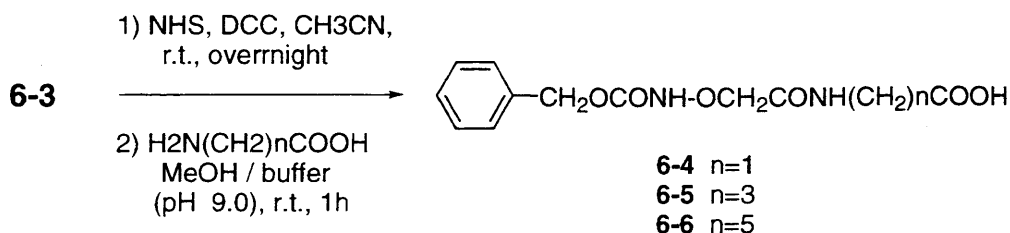
-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) など、数多く知られているが、下記に示した構造の化合物において、脱保護反応が最も効率よく進むことを考えた結果、Cbzを用いることにした(式6-3)。



式6-3

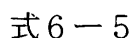
この反応は、飽和炭酸水素ナトリウム/テトラヒドロフラン (THF) (1/1) 混合液に、アミノキシ酢酸 1/2 塩酸塩を溶かし、10 分間攪拌後、ベンジルオキシカルボニルクロライドを 30 分かけて、3 回に分けて加え、その後、1 時間攪拌するという方法で行った。反応後、THF を留去し、0.1 N HCl を加え酸性にし、塩化メチレンで抽出を行う。無水硫酸ナトリウムで脱水後溶媒を留去し、真空乾燥することにより、N-ベンジルオキシカルボニルアミノキシ酢酸 6-3 を収率 95 % で得た。生成物の確認は、¹H-NMRにより行った。

続いてこの 6-3 に 3 種類の異なるアミノ酸 (グリシン、アミノブタン酸、アミノカプロン酸) を反応させ、アミノ基の保護されたリンカーを合成した (6-4; n = 1, 6-5; n = 3, 6-6; n = 5) (式6-4)。

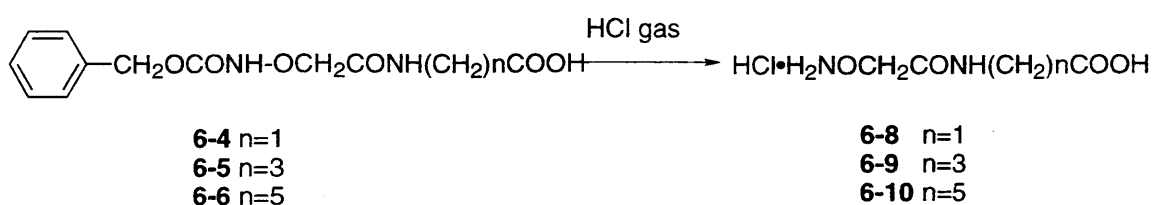


式6-4

さらに長いリンカーを合成するために、アミノデカン酸を用いて上記の反応を試みた。しかし、アミノデカン酸が、アセトニトリル、メタノールなどの有機溶媒、そして、水やバッファーにも全く溶けないため、反応は進行しなかった。そこで、6-6を用いて活性化、続くカップリング反応を繰り返すことで、もう一段階長いリンカー 6-7 を合成した (式 6-5)。



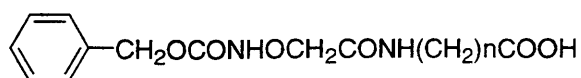
次にベンジルオキシカルボニル基の脱保護反応を行った。まず、メタノール中、10% Pd - C 存在下、水素ガスで圧力をかける方法を試した。生成物の ¹H-NMR を見ると、フェニル、及び、ベンジルプロトンのピークはなくなっており、メチレン鎖のプロトンのピークは4.3ppmに鋭いシングレットとして表れ積分比も一致していた。そこで、このリンカーを用いて GA₄ - 17 - ノルケトンとのカップリング反応を行ってみたが、全く反応は進行しなかった。この条件では、脱保護と同時に末端のアミノ基とカルボキシル基が分子内で環化してしまうので、続くカップリング反応が進行しないと考え、脱保護と同時にアミノキシ酢酸 塩酸塩のような塩酸塩にするような条件を検討した (式6-6)。



式6-6

保護したリンカーをジオキサンに溶解し、容器内の空気をアルゴンガスで置換して攪拌しながら塩酸ガスを吹き込むことで脱保護をし、同時に塩酸塩にする方法を試した。反応開始10分後にTLCで目的物である塩酸塩のスポットは現れていたが、その後、3日間攪拌しても原料のスポットは完全には消失しなかった。反応をそこで止め、後処理後 GA₄ - 17 - ノルケトンとのカップリング反応を行ってみたところ、目的物である GA₄ - 17 - ノルアルコキシムを10%の収率で得ることができた。しかし、この条件では反応時間が長いこと、収率が低いこと、そして、再現性がないことなど問題点があるので、さらに条件の検討を行うことにした。先ず始めに溶媒の検討を行った。ジオキサンに換えジエチルエーテル、クロロホルムを用い、同じ条件で反応を行った。しかし、全く同様な結果で問題点の解決には至らなかった。次に、脱保護に用いる酸をトリフルオロ酢酸、臭化水素酸に変えて行った。トリフルオロ酢酸を用いる方法では、溶媒に乾燥塩化メチレンを用い、アルゴン雰囲気化、0℃でトリフルオロ酢酸を加え室温に自然昇温し、そのまま3日間室温で攪拌した。しかし、反応は全く進行しなかった。臭化水素

酸を用いる方法では溶媒として酢酸を用い室温で一晩攪拌したところ、TLC 上では、原料のスポットは完全に消失しており、原点にでる目的物である塩のスポットのみになっていた。確認のため、後処理後 GA₄-17-ノルケトンとのカップリング反応を行ってみたところ、目的物である GA₄-17-ノルアルコキシムを 80 % の収率で得ることができた。この結果より、本研究における脱保護の方法は、臭化水素酸を用いる方法が適していると考えられるので、反応時間、試薬の当量数など、より細かい条件の検討をおこなった。その結果、最適な条件を以下に記す (式 6-7)。



6-4 n=1

6-5 n=3

6-6 n=5

HBr(1.5eq)

AcOH, r.t.,
overnight



6-11 n=1

6-12 n=3

6-13 n=5



6-7

HBr(1.5), AcOH,
r.t., overnight

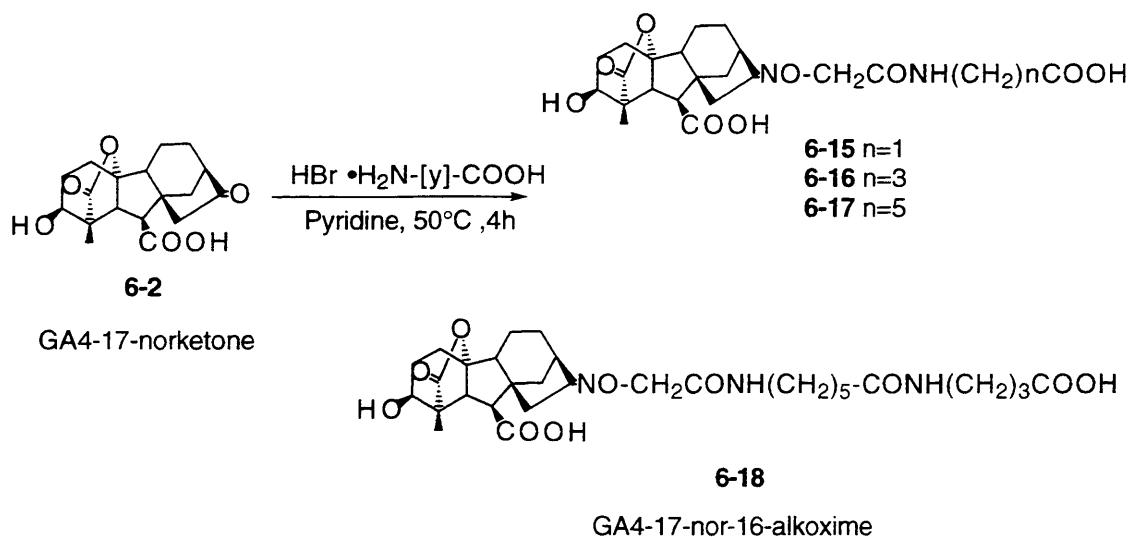


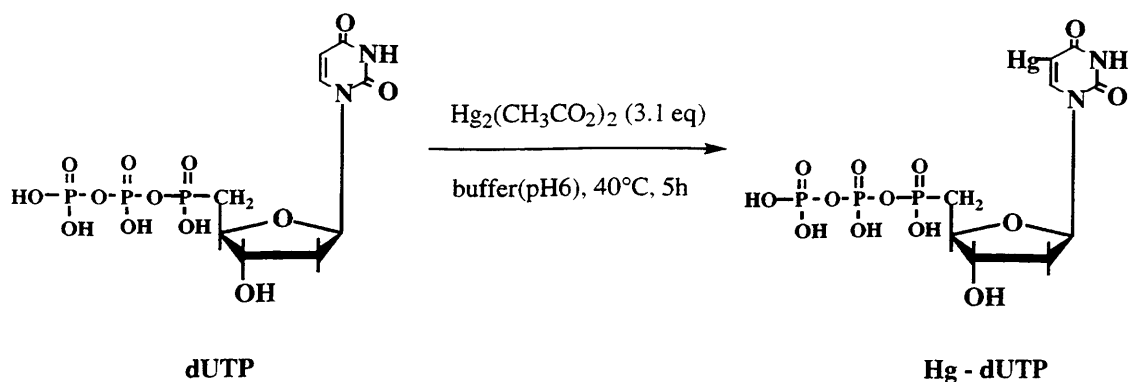
6-14

式 6-7

反応容器に N - Cbz 保護したリンカーをとり酢酸を加え、溶解させる。この時の濃度は 0.3 mol/l。そこに、1.5 当量の臭化水素酸を加え室温で一晩撹拌する。TLC (展開溶媒；酢酸 / 酢酸エチル / クロロホルム = 1 / 20 / 12) で原料の消失を確認し、エバポレーターにて溶媒を除去する。原料がまだ残っている場合は 50 °C まで加熱し、完全に反応が進むまで撹拌する。この操作によりリンカーの臭化水素酸塩 6-11 ~ 6-14 を得る。これらの塩は非常に吸湿性が高いため、このまま直ちに GA₄-17-ノルケトンとのカップリング反応に用いた。

合成した GA₄-17-ノルケトンとリンカーの臭化水素酸塩 6-11 ~ 6-14 を反応させることにより、GA₄-17-ノルー16-アルコキシムの合成を行った。両者をピリジン中、50~60 °C で4時間攪拌し、TLC でGA₄-17-ノルケトンの消失を確認後反応液を0.5 % HCl aq に注ぎ、濃塩酸を加えpH 3.5 に調製する。酢酸エチルで抽出後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を留去した。そして、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製を行った。この段階ではまだ Rf 値が同じである不純物が少量含まれていて粘性の高い液体の状態である。この方法は、共同研究を行っている (株) 豊田中央研究所で以前、GA₄-16-カルボメトキシムを、アミノキシ酢酸 1/2 塩酸塩と GA₄-17-ノルケトンから合成した方法であるが、本研究では、この粘性の高い液体を少量のアセトンに加熱しながら溶解し、ヘキサンを加え結晶を析出させ、より高純度の GA₄-17-ノルー16-アルコキシム 6-15 ~ 6-18 の白色結晶を得た。構造の確認は、¹H-NMR で行った。ジベレリン骨格のプロトンに加えリンカーのメチレンプロトンの存在を確認し、GA₄-17-ノルー16アルコキシム 6-15 ~ 6-18 と決定した (式6-8)。

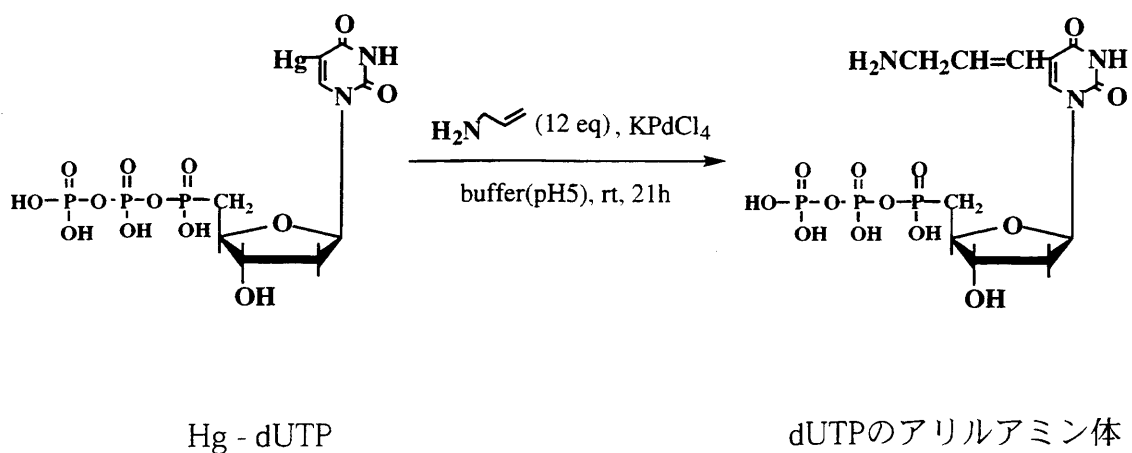




式 6-9

その後、氷冷しながら塩化リチウムを加え酢酸エチルで洗浄後濃縮し、冷エタノールを加え、 -20°C で1時間放置した。析出してくる白色沈殿を遠心分離器で分離しエタノールで洗浄した。乾燥後、得られた結晶を0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 6) に溶解し、これを Hg - dUTP 溶液とした。

Hg - dUTP溶液に0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 5) を加え、20 mM 溶液とし、2 M アリルアミン / 3.5 M 酢酸溶液、Pottasium tetrachloro palladata (II) 水溶液を加え室温で21時間攪拌した (式 6-10)。



式 6-10

15分間遠心しその上澄み液に、0.1 M トリエチルアミン - 酢酸緩衝液 (pH 8) を加えた。これを、0.1 M トリエチルアミン - 酢酸緩衝液 (pH 8) で調整した EDTA - セファセル (2.5 × 15 cm) に加え、0.1 mM トリエチルアミン - 酢酸緩衝液 (pH 8) で洗浄後、0.1 M ~ 0.6 M の直線濃度勾配の トリエチルアミン - 酢酸緩衝液 (pH 8) で溶出し、その溶出液を分取した。分取した溶出液を陰イオン交換クロマトグラフィーにかけ、280 nm の吸光度によりモニターした。フラクション 50 付近のピークが原料の Hg - dUTP、フラクション 80 付近のメインピークが目的物である dUTP のアリルアミン体、そして、フラクション 120 以降のブロードピークが dUTP であると考えた。フラクション 71 ~ 111 までを回収してエバポレーターで トリエチルアミン、酢酸を留去すると同時に濃縮し、エタノール、ヘキサンを加え 15 分間遠心し、その結晶を水に溶解した。冷エタノールを加え - 80 °C で 1 時間放置し 15 分間遠心後の沈殿を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) に溶解した。これを dUTP のアリルアミン体粗精製溶液とした。

10倍希釈の dUTP のアリルアミン体粗精製溶液 150 ml に、0.1 M Na₂B₄O₇ / 0.1 M NaOH 250 ml、0.11 M トリニトロベンゼンスルホン酸 100 ml を加え 5 分間室温で攪拌し、1.5 mM Na₂SO₄ / 98.5 mM NaH₂PO₄ 1 ml を加え 420 nm の吸光度を測定した。結果を表 6-1 に示す。

表 6-1. アミノ基の定量 1

	塩基濃度 (mM)	アミノ基濃度 (mM)
dUTP のアリルアミン体粗精製溶液	2.87	0.546

定量により得られたアミノ基の濃度と 260nm の吸光度より算出した塩基濃度との比は、1 : 5 (理論値 1 : 1) であった。従って、さらに精製が必要であるため、次に HPLC による精製を行った。

dUTP のアリルアミン体粗精製溶液を TSK gel DEAE - 2 SW (東ソー、4.6 × 250 mm) を接続した HPLC で測定した。溶出の初期条件は 0.1M NaCl / 10mM リン酸ナト

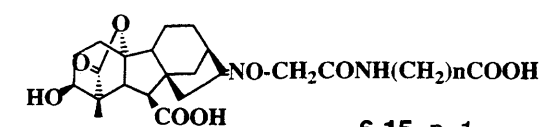
リウム緩衝液 (pH 7) とし、その後、NaCl の直線濃度勾配 (0.1 M ~ 0.2 M) により流速 0.8 ml/min にて行った。流出挙動は 260 nm の吸光度でモニターし、そこに現れた 2 本のピークをそれぞれ分取した。分取したピークを含むフラクションをそれぞれ集め、先程と同様な操作でアミノ基の定量を行った (表 6-2)。

表 6-2 アミノ基の定量 2

	塩基濃度 (mM)	アミノ基濃度 (mM)
HPLC ピーク1	0.056	0.071
HPLC ピーク2	0.085	0.159

ピーク 1、ピーク 2 とともに、アミノ基濃度、塩基濃度がほぼ一致しており、精製された様であるが、どちらが目的物であるかこれだけでは判別がつかないので、UV スペクトルを測定し、判断することにした。二つの HPLC 画分と、dUTP のアリルアミン体の 200 nm ~ 300 nm 吸光度を、DU-68 (ベックマン) 分光光度計を用いて測定を行った。その結果、この 3 つのスペクトルを比較すると、ピーク 2 のスペクトルと一致していることが分かった。従って、ピーク 2 を目的物である dUTP のアリルアミン体と判断し、次の反応に用いることにした。

合成した GA₄-17-ノルアルコキシムと dUTP のアリルアミン体を次にカップリングさせることにより、GA₄ 標識 dUTP の合成を行った。GA₄-17-ノルアルコキシム 6-15 ~ 6-18 を、ジメチルスルホキシド (DMSO) 25 ml に溶かし、N-ヒドロキシスクシンイミドの DMSO 溶液、ジシクロヘキシルカルボジイミドの DMSO 溶液をそれぞれ加え、室温で 4 時間攪拌した (式 6-11)。

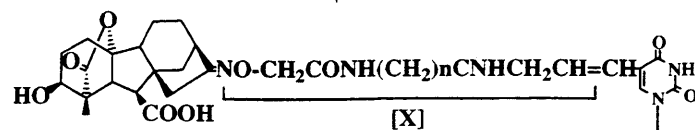


6-15 $n=1$

6-16 $n=3$

6-17 $n=5$

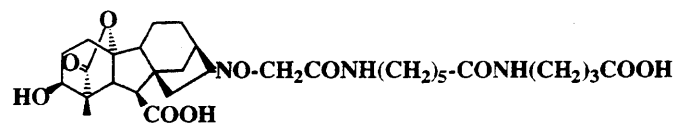
- 1) , DCC, DMSO, rt., 4h
- 2) $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}=\text{CH}-\text{dUTP}$, 0.1 M borata buffer, rt., 20 min



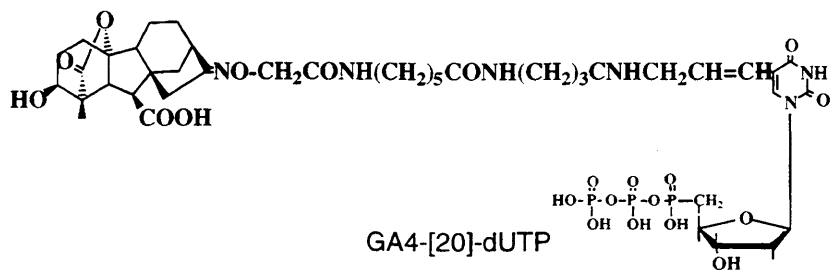
GA4-[11]-dUTP ($n=1$)

GA4-[13]-dUTP ($n=3$)

GA4-[15]-dUTP ($n=5$)



- 1) , DCC, DMSO, rt., 4h
- 2) $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}=\text{CH}-\text{dUTP}$, 0.1 M borata buffer, rt., 20 min



式 6-11

遠心分離した上澄みにDMSOを加え、0.1 M ホウ酸緩衝液と共に分取した dUTP のアリルアミン体溶液に加える。20 分間室温で攪拌し、反応液を遠心分離し、その上澄みを取り、HPLC により精製を行った。カラムは、TSK gel DEAE - 2 SW (東ソー、4.6 × 250 mm) を使用し、溶出の初期条件は 0.1 M NaCl / 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) とし、その NaCl の直線濃度勾配 (0.1 M ~ 0.3 M) により流速 0.8 ml / min にて行った。溶出挙動は、260 nm の吸光度でモニターし、順次溶出される 260 nm のピークごとに分画を行った。主なピークは原料の dUTP のアリルアミン体のもの (RT = 12.025) を含め 4 本であった。このうちメインピークであるピーク 2 (RT = 14.100) を分取して GA₄ 標識 dUTP とした。

この手順により合成した GA₄ 標識 dUTP (GA₄ - [15] - dUTP) と、GA₄ - 16 - カルボメトキム を dUTP に標識した GA₄ - [8] - dUTP を用い、ランダムプライマー伸長法により、ハプテン標識されたプローブを合成した。

ランダムプライマー伸長法とは、熱変性した 1 本鎖 DNA に、ランダムなプライマーを相補的にランダムに結合させ、DNA ポリメラーゼ (Klenow フラグメント) を加えてハプテン標識ヌクレオチド存在下で合成させる方法である。この方法は、complementally DNA や 2 本鎖 DNA の標識に適している。従来は、6 mer のプライマーを用いて、pH 6.6 の条件下で反応を行っていたが、最近になって、14mer のプライマーで、pH 7.6 の条件下で行う方法が開発された。この方法で行うと、これまで反応時間が 3 時間だったところが、30 ~ 60 分間で済み、10⁹ dpm / μg 以上の DNA を得ることが出来るようになった。そこで、この新規な方法を用いて GA₄ 標識プローブ DNA の合成を行った (図 6-3)。

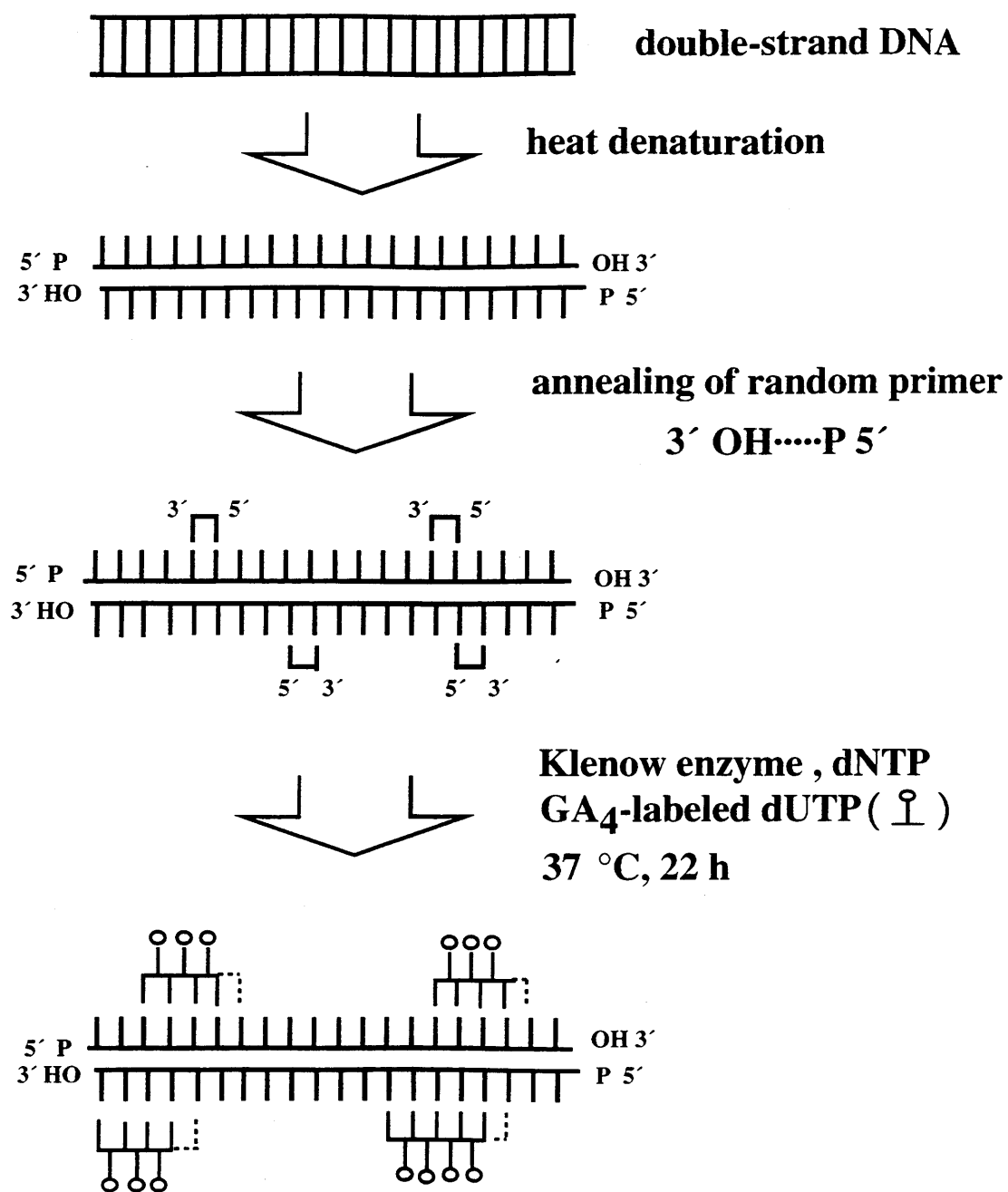


図6-3 ランダムプライマー伸長法によるGA4標識プローブDNAの合成

合成方法の詳細を示す。、無菌のエッペンドルフチューブに DNA テンプレート (DNA テンプレートは、使用直前に、熱水中で 10 分間熱変性し、ドライアイス / エタノールで 30 分間急冷したものを用いる。) 500 ng、混合ヘキサヌクレオチド 2 ml、dNTP (deoxynucleoside triphosphate)、ハプテン標識 dUTP 混合液 2 ml、水 19 ml、そして、Klenow 酵素 1 ml をとり、37 ° C で 60 分間インキュベーションする。2 ml の EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) を加え反応を止め、4 M LiCl 2 ml と、50 ~ 60 ml の冷エタノールを加え、-70 ° C で 30 分間攪拌し、標識された DNA を析出させる。その後、4 ° C で 15 分間遠心分離し、上澄み液を取り除き、70 % の冷エタノール 100 ml 加え、もう一度 4 ° C で 5 分間で遠心分離する。上澄み液を取り除き、乾燥させたペレットを 50 ml の TE バッファー (10 mM Tris - HCl / 1 mM EDTA 混合液、pH 8) に再度懸濁させ、ハプテン標識 DNA 溶液とする。

6-3 DNA 検出感度の比較

合成した GA4-[8]-dUTP、GA4-[11]-dUTP、GA4-[13]-dUTP、GA4-[15]-dUTP、GA4-[20]-dUTP を用いてランダムプライマー伸張法により合成したプローブ DNA を用いて、スポットテスト法により DNA の検出感度を評価したところ、GA4-[11]-dUTP、GA4-[13]-dUTP、GA4-[20]-dUTP は、全く DNA スポットが現れず検出できなかった。しかし、GA4-[8]-dUTP、GA4-[15]-dUTP は、DNA スポットが現れたため、GA4-[8]-dUTP、GA4-[15]-dUTP と従来法の Biotin-[16]-dUTP、DIG-[11]-dUTP を用いてスポットテスト法により DNA の検出感度の比較を行った。図 6-4-1 に GA4-[8]-dUTP、GA4-[15]-dUTP、図 6-4-2 に Biotin-[16]-dUTP、DIG-[11]-dUTP それぞれの構造式を示す。

図 6-4-1 GA4-[8]-dUTP と GA4-[15]-dUTP の構造式

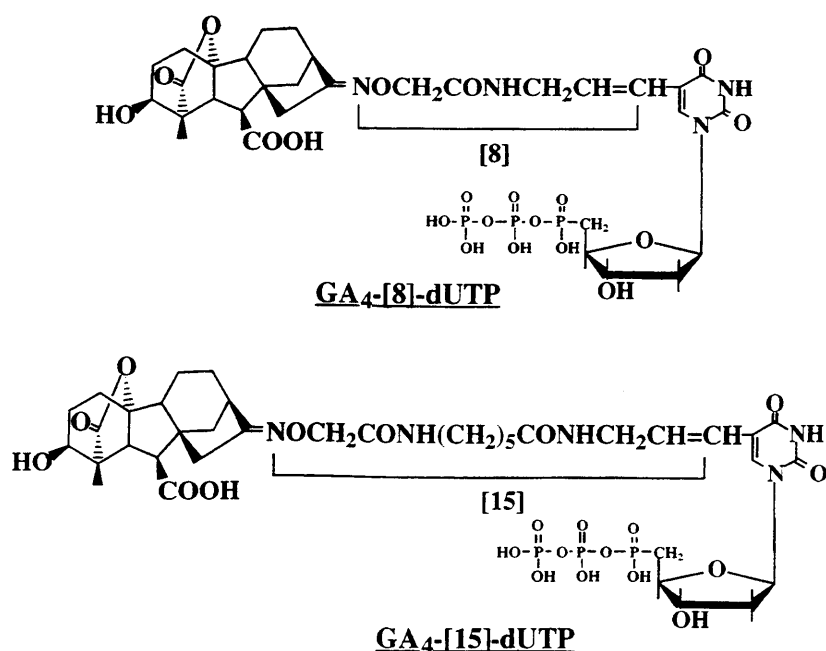
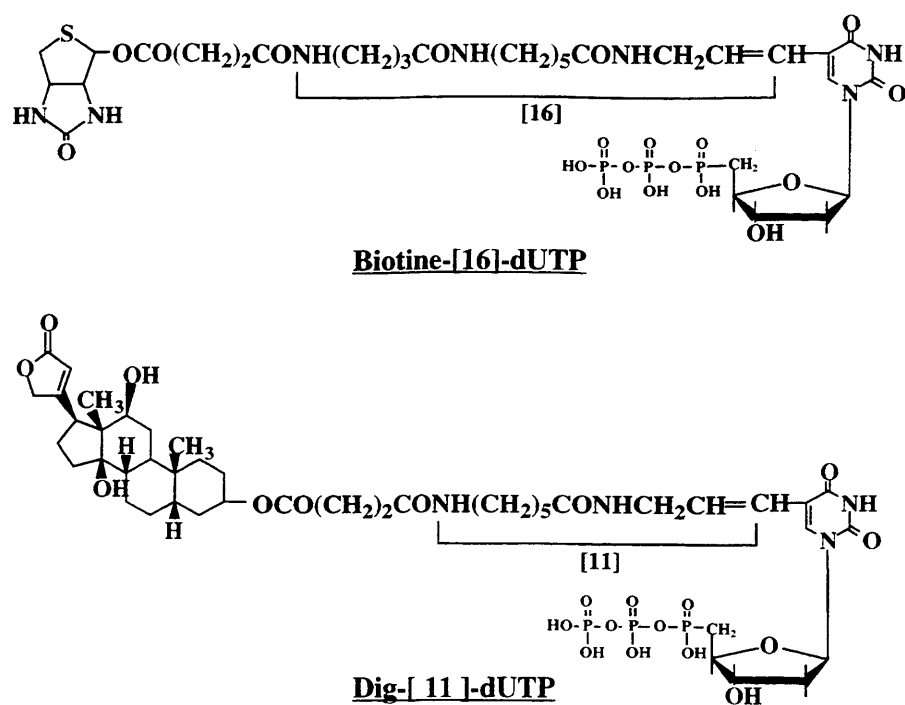


図 6-4-2 Biotin-[16]-dUTP、DIG-[11]-dUTPの構造式



GA4-[15]-dUTP、GA4-[8]-dUTP、Biotin-[16]-dUTP、DIG-[11]-dUTPから6-2記載のランダムプライマー伸長法によりそれぞれのハプテン標識DNAを合成した。まず始めに、GA₄-[15]-dUTP (a～c)、GA₄-[8]-dUTP (d～f)、Biotin-[16]-dUTP (g)で標識したプローブDNAを用い、スポットテストでDNA検出感度の比較を行った。このスポットテストに用いたサンプルは、表6-3に示す組成で調整した。

	sample						
	a	b	c	d	e	f	g
λ Hind III (505 ng / μ l)	1	1	1	1	1	1	1
dA,dC,dG (0.5mM)	3	3	3	3	3	3	
dNTP mix (Biotin)							1
GA ₄ -[15]-dUTP(1 mM)	1	2	4				
GA ₄ -[8]-dUTP(1 mM)				4	4	8	
hexanucleotide mix	2	2	2	2	2	2	2
H ₂ O	13	12	10	10	10	6	16

表 6－3

第1章1－1に記載したスポットテスト法によるDNA検出感度の結果を表6－4に示す。に示す。検出は、第1章に示したHNPPを用いて行った。

	DNA検出感度(fg)
Bio-[16]-dUTP	5
GA ₄ -[8]-dUTP	1.2~10
GA ₄ -[15]-dUTP	0.6~2.5

表 6－4

その結果、Biotin－[16]－dUTPよりもGA₄標識dUTPを用いた方が約5から10倍検出感度が高かった。

次に、GA₄-[15]-dUTP (A～D)、GA₄-[8]-dUTP (E～G)、Dig-[11]-dUTP (H、I)で標識したプローブDNAを用い、同様にスポットテスト法で、DNA検出感度の測定を行った。このスポットテストに用いたサンプルは、表6－5に示す組成

で調整した。

	sample							
	A	B	C	D	E	F	G	H
λ Hind III (505 ng / μ l)	1	1	1	1	1	1	1	1
dA,dC,dG (0.5mM)	3	3	3	3	3	3	3	
dNTP mix (Dig)								2
GA ₄ -[15]-dUTP(1 mM)	1							
GA ₄ -[15]-dUTP(4 mM)		4	2	1				
GA ₄ -[8]-dUTP(1 mM)					4	2	1	
hexanucleotide mix	2	2	2	2	2	2	2	2
H ₂ O	12	9	11	12	9	11	12	14

表 6－5

スポットテスト法によるDNA検出感度の結果を表 6－6 に示す。検出は第 1 章に示したHNPPを用いて行った。

	DNA 検出感度(fg)
Dig-[11]-dUTP	10~20
GA ₄ -[8]-dUTP	20
GA ₄ -[15]-dUTP	5~10

表 6－6

その結果、GA₄標識dUTPはDig 標識 dUTP と比べて 2 ～ 4 倍高い DNA 検出感度を示した。しかし、スポットテストという方法は、最も簡単な測定法の一つであるが、同時に測定したサンプルの検出感度を比較する場合にのみ用いられ、DNAの検出限界を判断する方法ではない。そこで、正確にこれらのハプテンを用いた時のDNA量の検出限界を測定できるサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。サザンブロットハ

イブリダイゼーションは、第1章1-4記載の方法により行った。検出限界の測定として、スポットテストで最も高い検出感度を示したGA₄-[15]-dUTP と従来使用されているハプテンの中で最も高感度であるDig-[11]-dUTP を用いてサザンブロット法での比較を行った。

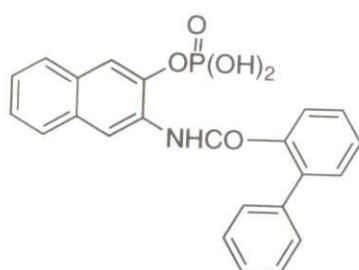
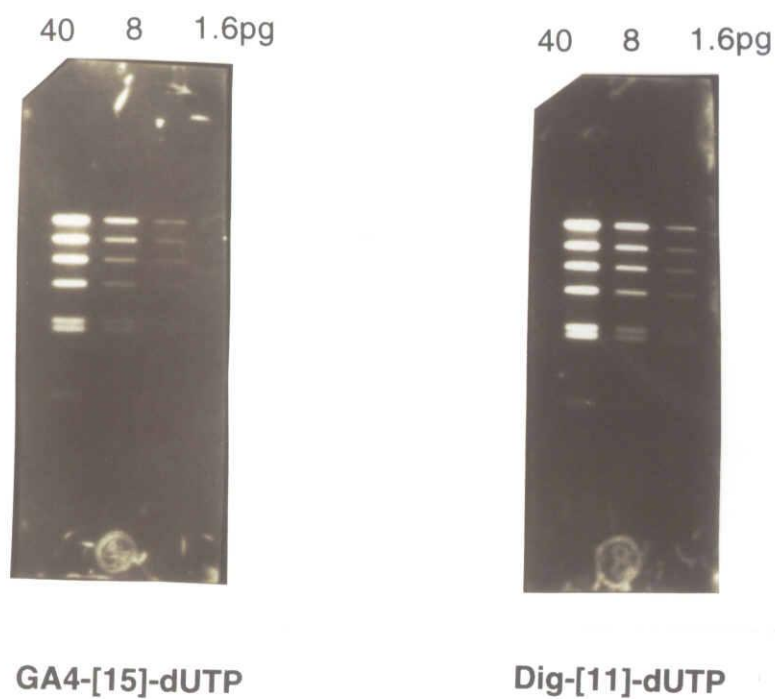
サザンブロット法でのテストに用いたサンプルは、表6-7 に示す組成で調製した。

	sample							
	A	B	C	D	E	F	G	H
λ Hind III (505 ng / μl)	1	1	1	1	1	1	1	1
dA,dC,dG (0.5mM)	3	3	3	3	3	3	3	3
TTP		1	3	4		1	3	4
GA ₄ -[15]-dUTP(0.1 mM)	5	4	2	1				
Dig-[11]-dUTP(0.1 mM)					5	4	2	1
hexanucleotide mix	2	2	2	2	2	2	2	2
H ₂ O	8	8	8	8	8	8	8	8

表6-7

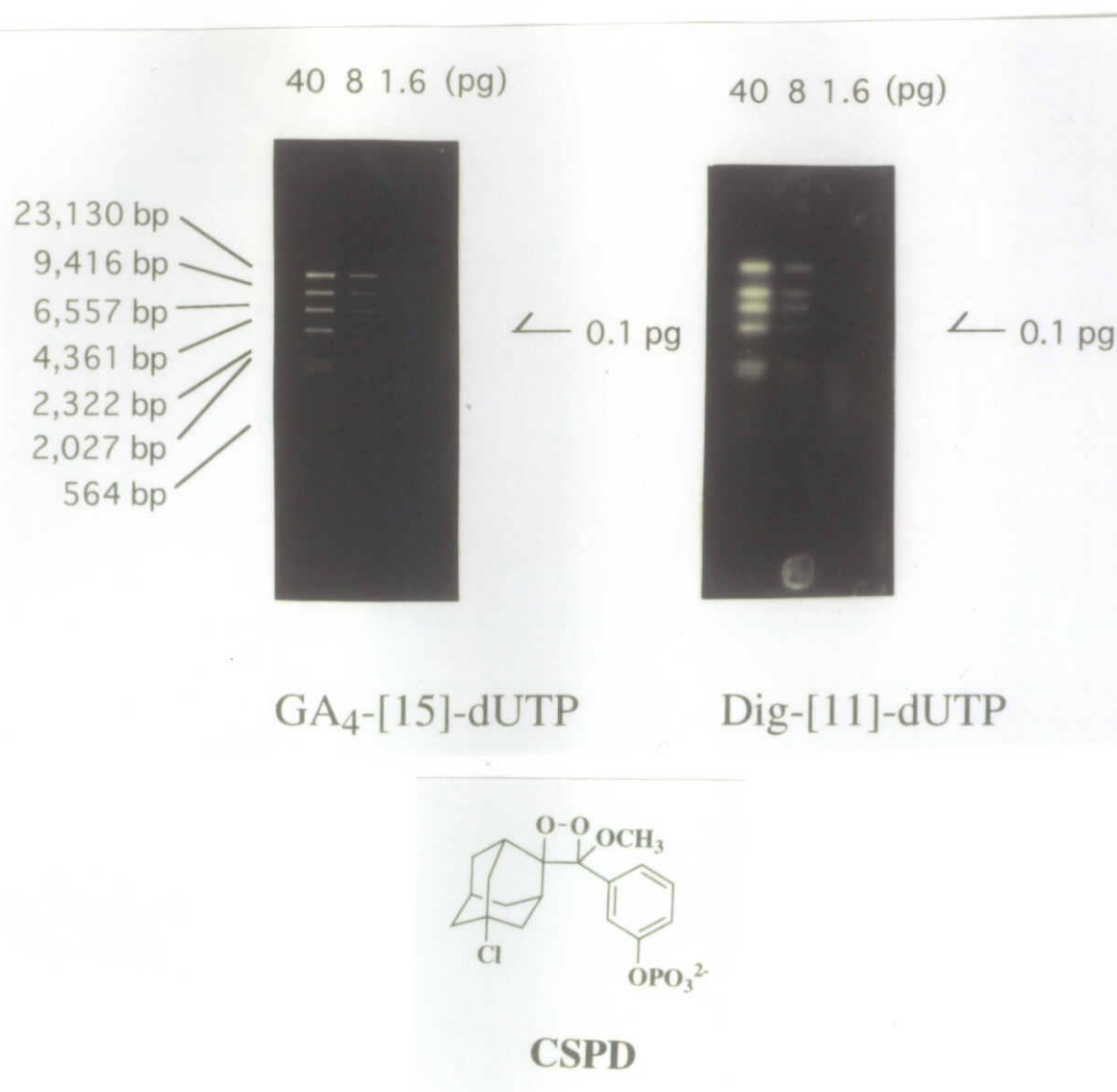
サザンブロットハイブリダイゼーションの検出は、第1章に示したHNPPと化学発光基質であるCSPDの両基質を用いた。その結果の写真を図6-5-1、2に示す。

図6-5-1 HNPPを用いたGA₄-[15]-dUTP とDig-[11]-dUTPの比較



HNPP

図6-5-2 CSPDを用いたGA₄-[15]-dUTP とDig-[11]-dUTPの比較



その結果、検出感度はHNPP法とCSPD法どちらの場合でも両ハプテンは、0.1 pgであった。しかし、化学発光基質であるCSPD法の時のみGA₄-[15]-dUTPの方がDig-[11]-dUTPより非常に高い解像度を示した。CSPD法の検出メカニズムを図6-6に示す。

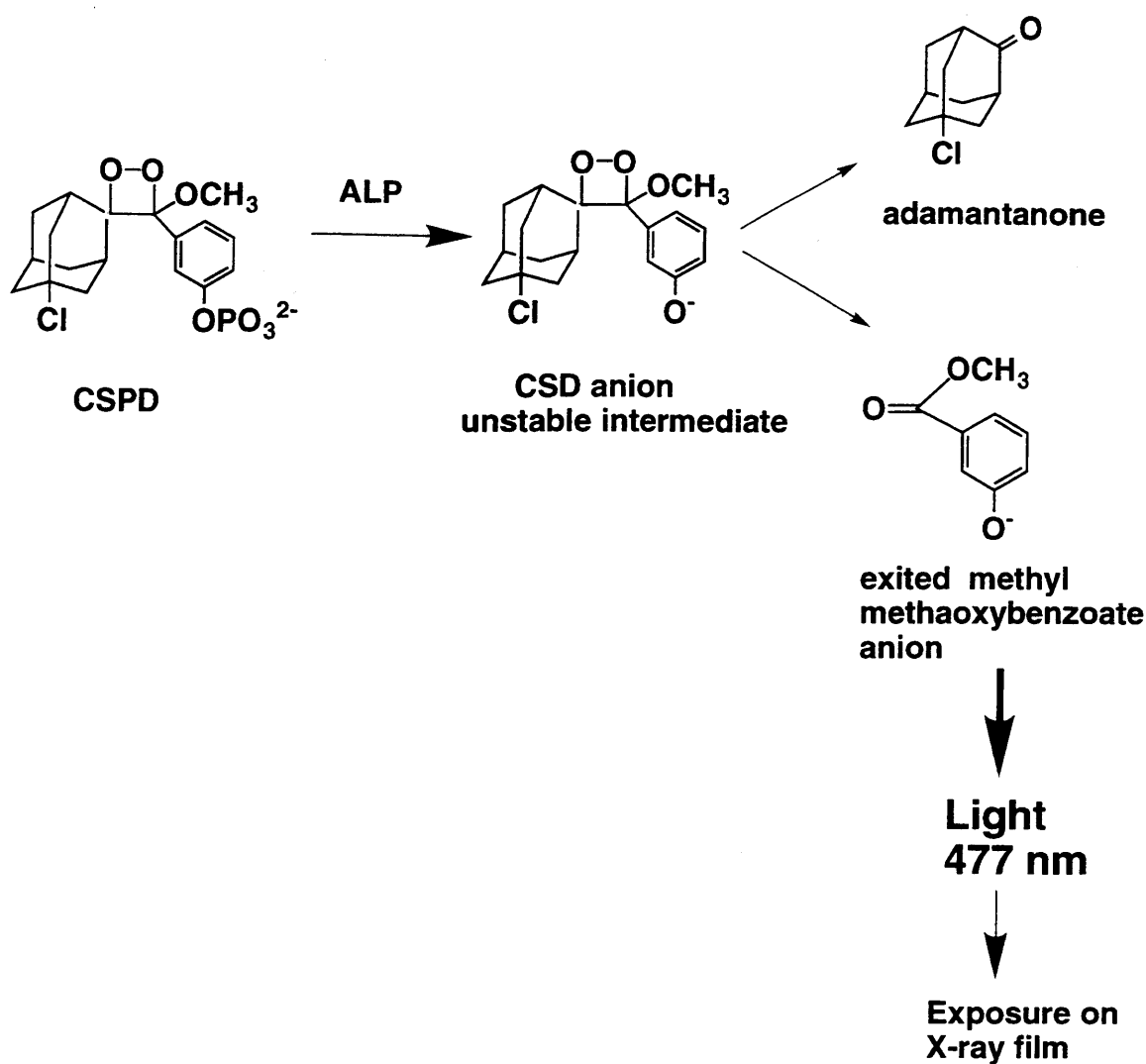


図 6-6

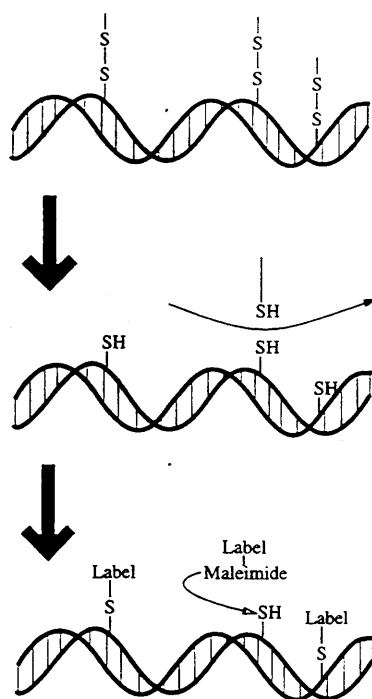
サザンブロットハイブリダイゼーションでのCSPD法は、CSPDがアルカリホスファターゼによって加水分解されると瞬時に、477nmの光を発し、それをX線フィルムに感光することによりDNAバントとして確認する方法である。即ち、本論文で記載した蛍光基質とは違って、CSPDの加水分解体は、ナイロンメンブレンに沈着するわけではなく、反応緩衝液中に浮遊している。そこで、CSPD法において、GA₄-[15]-dUTPの方がDig-[11]-dUTPより非常に高い解像度を示した理由として、GA₄を介してプローブDNAに標識されたアルカリホスファターゼの立体構造が、CSPDの加水分解反応に対し

より適した構造になったために加水分解反応が促進され、X線フィルムへの感光時間を非常に短縮することが出来たためではないかと考えている。また、DNA検出感度が GA_4 -[15]-dUTP と Dig-[11]-dUTP で同等であったことより、 GA_4 -[15]-dUTP の DNA への標識化効率は、ディゴキシゲンと同様に 36 塩基対に 1 分子ずつ導入されていると考えている。

6-4 Fast Tag System 用GA₄ マレイミド体の合成

6-1～6-3で示したGA₄標識dUTP法は、従来から用いられてきた酵素を用いてDNAにハプテンを標識する方法である。この標識方法だと酵素を用いるため、標識時間が長い、酵素の失活によって最適な長さのプロープが合成できないなどの問題がある危険性がある。最近、Vector 社より光反応を利用した新しいハプテン標識方法が報告された^{9,6)}。この方法は、“Fast Tag System”と呼ばれている、その方法を簡単に説明すると、まず、“Fast Tag”というジスルフィドを含む試薬を、ハロゲンランプによってプロープDNAの塩基に結合させる。この場合、熱による方法でも良いとされている。次に、そのジスルフィドを遊離なチオールに還元し、ハプテンで標識されたマレイミド誘導体を反応させ、次いで、酵素標識抗ハプテン抗体を反応させる。最後に基質を反応させて、それによって発せられるシグナルによりDNAを検出する方法である。図6-7にその模式図を示す。

図6-7 Fast Tag System の模式図



そこで、Fast Tag SystemにGA₄ 誘導体を用いたハプテンを利用するため、GA₄ の16位末端にマレイミドを導入した GA₄-[z]-マレイミド体 (図6-8) を合成した。

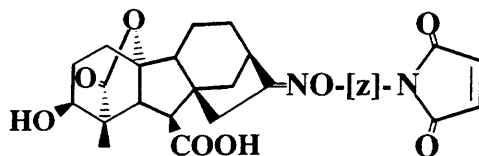
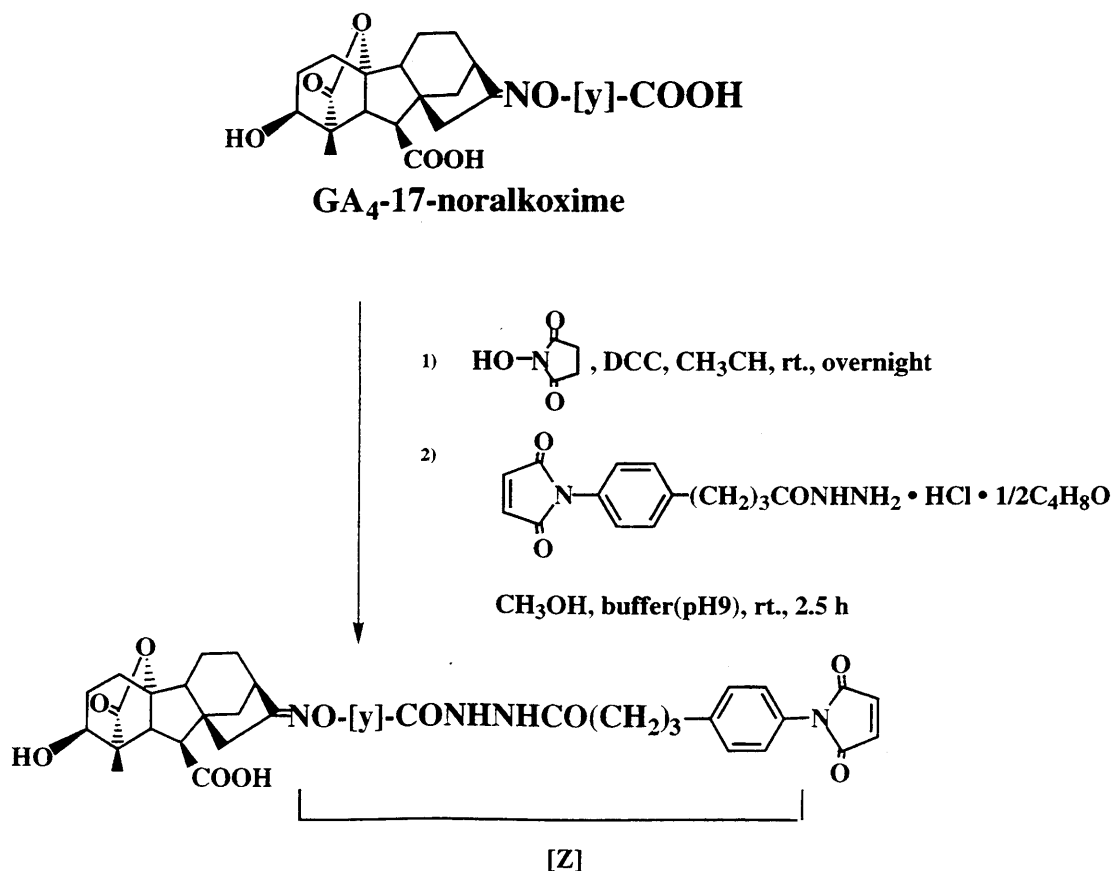


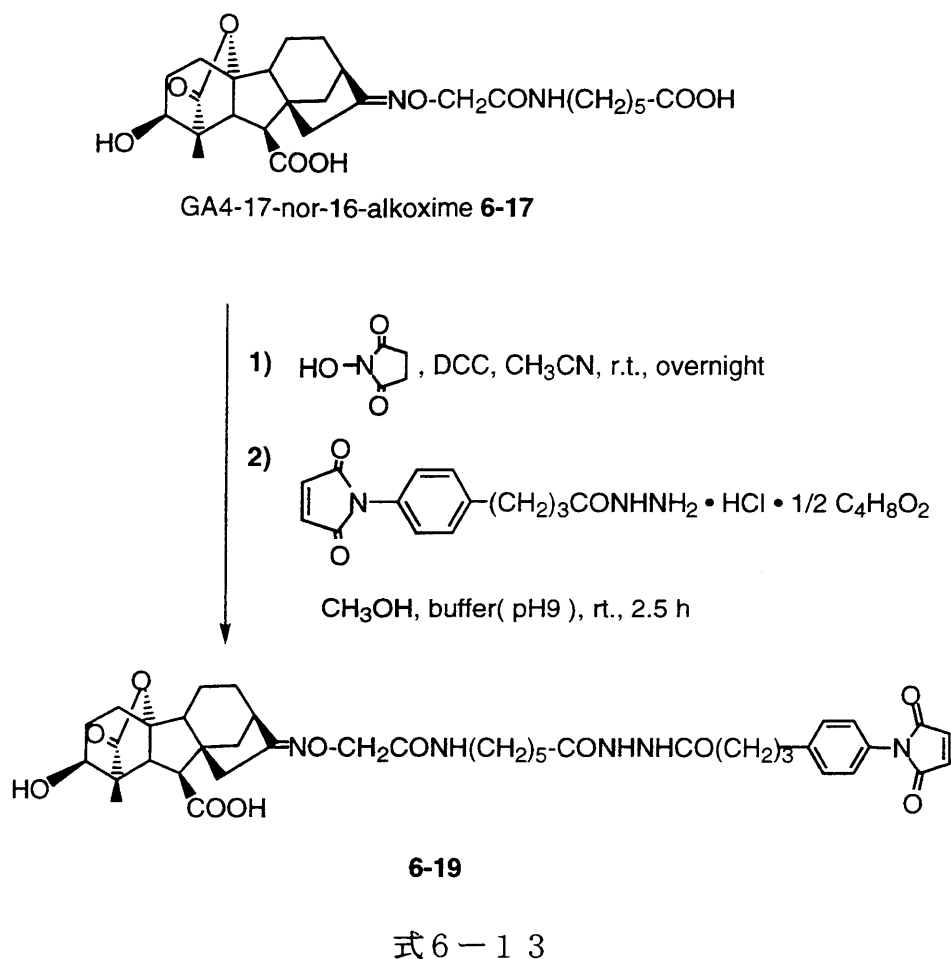
図6-8

一種類目のGA₄-[Z]-マレイミド体として、GA₄-17-ノルアルコキシム を乾燥アセトニトリルに溶解し、HO-Sc、DCCにより活性化させ、メタノール/緩衝液 (pH 9) 混合液に溶かした4(4-N-マレイミドフェニル) ブタノヒドラジド・1/2 ジオキサン (MBPH) を反応させることにより GA₄-マレイミド体を合成した (式6-12)。



式6-12 GA₄-[Z]-マレイミド体

合成した化合物の詳細を示す。GA₄-17-ノルアルコキシムを、乾燥アセトニトリル中で DCC、N-ヒドロキシスクシンイミド によりカルボキシル基を活性化させ、メタノール/緩衝液 (pH 9) 混合液に溶かした MBPH を加え目的物の GA₄マレイミド体を収率 56% で合成した (式 6-13)。



生成物の確認は、¹H-NMR により行った。GA₄-17-ノルケトンのピークに加え、MBPH の Ph プロトン、オレフィンのプロトンの存在により、マレイミド体と決定した。次いで、上記 GA₄ マレイミド体のマレイミド基の定量を行った。

DMSO により 10 倍希釈した GA₄ マレイミド体を、0.1M リン酸緩衝液 (pH 6) で 100 nmol/ml に調製する。この溶液を 0 μl、10 μl、20 μl の 3 通り調製し、それぞれに 50 nmol/ml メルカプトエチルアミン と 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6) とで混合しトータル 200 μl とし、30 °C で 20 分間攪拌した。これらをマレイミド 0 nmol/ml、25 nmol/ml、50 nmol/ml 溶液とし、5 mM 4,4'-ジチオジピリジン を加え 30 °C で 10 分間攪拌し、324

nm の吸光度を測定した。そのときの吸光度の結果を表 6－8 に示す。

表 6－8

濃度	吸光度
0 nmol / ml	0.047
25 nmol / ml	0.081
50 nmol / ml	0.100

このデータを基に検量線 (図 6－9) を作成した。

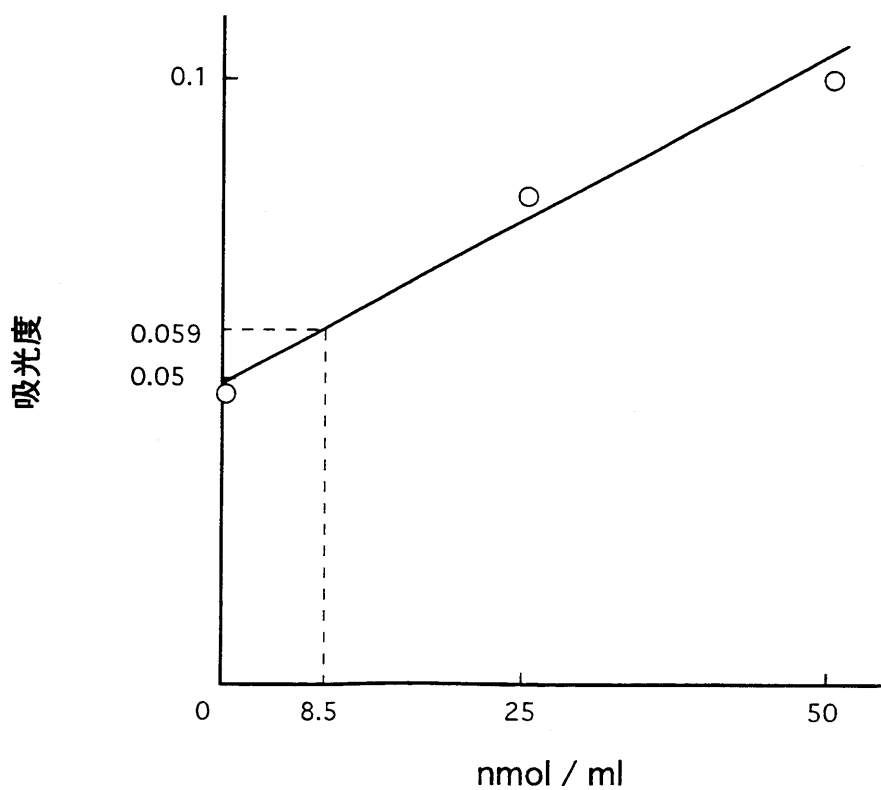


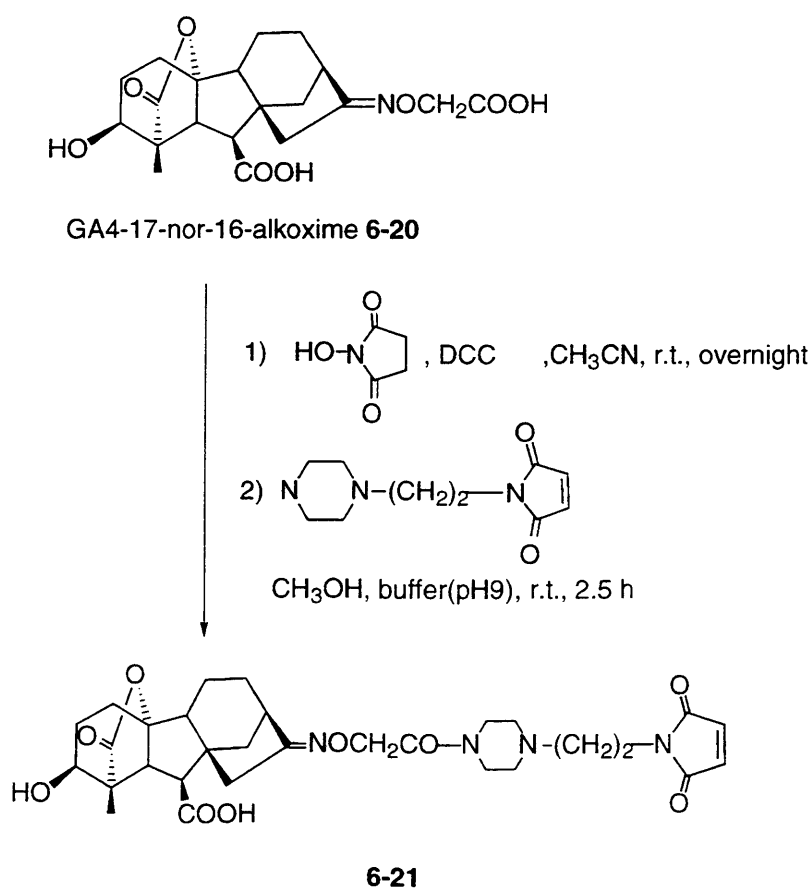
図 6－9

サンプル中のマレイミド基は、次に示す式により算出した。

$$\text{マレイミド基 (nmol/ml)} = (50 - \text{測定値}) / \text{希釈率}$$

この測定により得られた結果は吸光度 0.59、検量線より測定値 8.5 を得、この値から計算したマレイミド基の濃度は 83 nmol/ml と理論値 100 nmol/ml とほぼ一致した。この結果と $^1\text{H-NMR}$ の解析結果から、これを GA_4 -マレイミド体と判断した。

二種類目の GA_4 -[Z]-マレイミド体として、 GA_4 -17-nor-16-alkoxime を乾燥アセトニトリルに溶解し、N-ヒドロキシスクシンイミド、DCC により活性化させ、メタノール/緩衝液 (pH 9) 混合液に溶かしたピペラジニルエチルマレイミド (PEM) を反応させることにより GA_4 -マレイミド体を収率 80% で合成した (式 6-14)。



式 6-14

6-5 DNA検出感度の比較

合成した 2 種類のGA₄-マレイミド誘導体 6-19 と 6-21 を用いて Fast Tag System法でのDNA検出感度を検討した。まず、GA₄-マレイミド誘導体 6-19 の最適濃度を決定するために、スポットテスト法を用いて検討した。マレイミドの濃度として1mM, 0.5mM, 0.1mM, 0.05mM, 0.01mM を調べた。その結果を表 6-8 にまとめた。

GA ₄ -マレイミド体 <u>6-19</u> の反応時の 濃度(mM)	標識されたλDNAのスポット テストでの検出感度
1	2pg
0.5	2pg
0.1	0.4pg
0.05	0.4pg
0.01	10pg

表 6-8 GA₄-マレイミド誘導体 6-19 の標識反応の最適濃度の検討

Fast Tag Systemで用いられているフルオレセイン-マレイミドの場合は、λDNA のスポットテストでの検出感度は 0.4 pg であった。表 6-8 の結果と比較してみると、GA₄-マレイミド誘導体 6-19 の濃度が 0.1 mM、及び 0.05 mM の時と同等の感度である。しかし、0.1 mM の時の方が、0.05 mM の時と比べ、バックグラウンドが低い事が分かったので、GA₄-マレイミド誘導体 6-19 を用いたときの標識反応の最適濃度は 0.1 mM とした。

次いで、GA₄-マレイミド誘導体 6-21 の最適濃度を決定するために、同様にスポットテスト法を用いて検討した。マレイミドの濃度として1mM, 0.5mM, 0.1mM, 0.05mM, 0.01mM を調べた。その結果を表 6-9 にまとめた。

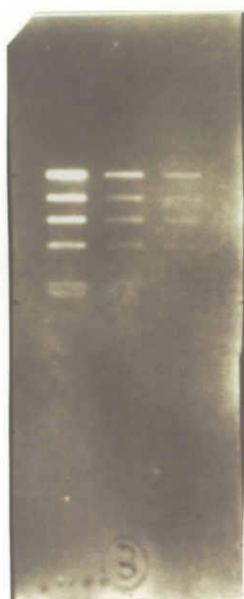
GA ₄ -マレイミド体 6-21の反応時の 濃度(mM)	標識されたλDNAのスポット テストでの検出感度
1	0.4pg
0.5	0.4pg
0.1	0.4pg
0.05	0.4pg
0.01	10pg

表6-9 GA₄-マレイミド誘導体6-21の標識反応の最適濃度の検討

Fast Tag Systemで用いられているフルオレセイン-マレイミドの場合は、λDNAのスポットテストでの検出感度は0.4 pgであるので、表6-9の結果と比較してみると、GA₄-マレイミド誘導体6-21の場合、濃度が1mM, 0.5mM, 0.1 mM, 0.05 mMの時が同等の感度であった。しかし、1mMと0.5mMの時の方が0.1 mMや0.05 mMの時と比べ、バックグラウンドが低い事が分かったので、GA₄-マレイミド誘導体6-21を用いたときの標識反応の最適濃度は、1mM, 0.5 mMとした。

スポットテスト法は、相対比較であり、DNAの検出感度としては、正確ではないので、正確なDNA検出感度を測定できるサザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて、両GA₄-マレイミド誘導体6-19と6-21のDNA検出感度を測定した。比較として、Fast Tag Systemに用いられているフルオレセインマレイミドと6-3で示したGA₄-[15]-dUTP法も同時にサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。サザンブロットハイブリダイゼーションの写真を図6-9に示し、そしてその結果を表6-10にまとめた。

200 40 8pg



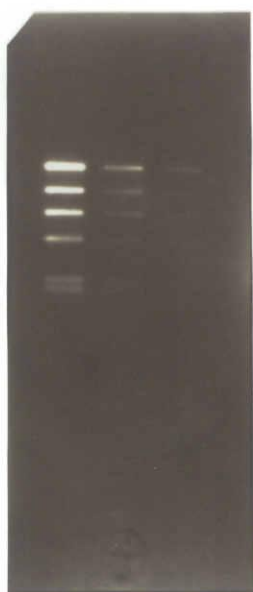
GA₄-マレイミド 6-19

40 8 1.6pg



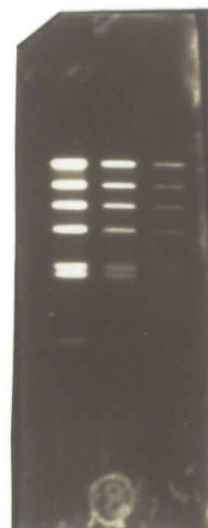
GA₄-マレイミド 6-21

40 8 1.6pg



フルオレセインマレイミド

40 8 1.6pg



GA₄-[15]-dUTP

図 6-9

標識物質		サザンブロットハイブリダイゼーションにおけるDNA検出感度
GA4-マレイミド6-19 0.1 mM		0.7 pg
GA4-マレイミド6-21	1 mM	0.1 pg
	0.5 mM	0.3 pg
フルオレセインマレイミド		0.1 pg
GA4-[15]-dUTP		0.1 pg

表 6-11 サザンブロットでの DNA 検出感度

GA₄-マレイミド6-19は、DNAの検出感度が0.7pgと悪かった。これは、GA4と塩基の間のリンカー内にフェニル基が存在しているため、不溶性が増してしまうため、ハイブリダイゼーションに悪い影響を与えているためと考えている。なぜならば、スポットテスト法では、それ以外と同等の高い検出感度を示していたからである。一方、GA4-マレイミド6-21は、フルオレセイン-マレイミド及びGA4-[15]-dUTPと同等の0.1pgという非常に高い検出感度を示した。これは、リンカー部分のフェニル基をなくし、水溶性を増したため、ハイブリダイゼーションへの影響が無くなったためと考えている。また、GA4-マレイミド6-21とFast Tag Systemの組み合わせとGA4-[15]-dUTP法では、検出感度は同じであるが、前者の方がバックグラウンドが低かった。

6-6 まとめ

本章では、植物中のホルモンであるジベレリン誘導体、その中でもジベレリンA4が最も抗体価が高いことが分かっていたので、そのジベレリンA4を用いて、新規な酵素標識用ラベリング試薬の合成とその評価を行った。まず、dUTPに結合させてDNAに標識する方法として、ジベレリンA4-[8]-dUTP、ジベレリンA4-[11]-dUTP、ジベレリンA4-[13]-dUTP、ジベレリンA4-[15]-dUTP、ジベレリンA4-[20]-dUTPを合成し、ランダムプライマー伸張法によりこれらのジベレリン標識dUTPを組み込んだプローブDNAを合成し、スポットテスト法及びサザンブロットハイブリダイゼーション法によりDNAの検出感度を評価した。さらに、Fast Tag System 法を用いてDNAに標識する方法として、ジベレリンA4マレイミド誘導体 6-19、6-21 を合成し、Fast Tag System 法を用いてプローブDNAに標識した遊離のチオール基にこれらのジベレリンA4マレイミド誘導体 6-19、6-21 を反応させジベレリン標識プローブDNAを合成し、スポットテスト法及びサザンブロットハイブリダイゼーション法によりDNAの検出感度を評価した。

まず、dUTP法を利用する方法では、ジベレリンA4-[15]-dUTP が、サザンブロットハイブリダイゼーション法において、蛍光基質である第1章に示したHNPPを用いて検出したところ、従来使われているハプテンの中で最も高感度にDNAを検出できるディゴキシゲニン (Dig - [11] - dUTP) と同等の0.1pg という非常に高い検出感度を示すことを見出した。また、化学発光基質を用いたときは、ジベレリンA4-[15]-dUTP 法は、Dig-[11]-dUTP法より解像度が非常に良くなることが分かった。

一方、Fast Tag Systemを利用する方法では、ジベレリンA4マレイミド誘導体 6-21 が、サザンブロットハイブリダイゼーション法において、ジベレリンA4-[15]-dUTP や Dig - [11] - dUTP と同等の0.1pg という非常に高い検出感度を示すことが分かった。

また、Fast Tag SystemとGA4マレイミド誘導体 6-21 の組み合わせは、ジベレリンA4-[15]-dUTPやDig - [11] - dUTP法よりバックグラウンドが低くなることが分かった。

第7章 総括

本論文は、新規蛍光化合物の合成とその応用研究に関して述べたものである。

第1章では、酵素として最も活性が高いアルカリホスファターゼ（ALP）の基質として種々のナフタレン誘導体及びアントラセン誘導体を合成し、DNA検出感度を評価した。その結果、*Hind* IIIで消化した λ DNAを用いたサザンブロットハイブリダイゼーションにおいて、0.07 pg (2.5×10^{-20} mol)という高い検出感度を示すN-（2-ビフェニル）-3-ヒドロキシ-2-ナフタレンカルボキサミドリン酸エステル（HNPP）を見出した。HNPPは、検出感度が化学発光基質であるAMPPDより高く、またメンブレン上の解像度が優れていることが分かった。また、解像度が非常に高いことにより、DNAの塩基配列決定法に適用することが出来た。HNPPの加水分解体は、青色蛍光を発する。

第2章では、ALPの基質で、HNPPの加水分解体とは異なった蛍光色を発する新規な蛍光基質を開発するため、黄緑色蛍光を発する種々のフルオレセイン誘導体を合成し、さらにジリン酸エステルに変換し、DNA検出感度を評価した。その結果、*Hind* IIIで消化した λ DNAを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法において高い検出感度を示す5-（4-ビフェニルカルボキサミド）フルオレセインジリン酸エステルを見出した。

第3章では、第2章で見出したフルオレセイン誘導体を基に、さらに酵素反応時間を短縮し、ナイロンメンブレンへの沈着性を高めることのできる種々の新しいフルオレセイン誘導体を合成し、DNA検出感度を評価した。その結果、*Hind* IIIで消化した λ DNAを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法において、化学発光法であるCSPDと同等の0.1 pg (3.6×10^{-20} mol)という高い検出感度を示す5-（4-ビフェニルカルボキサミド）-3'-O-（1-ナフチル）メチルフルオレセインリン酸エステル（BNFP）を見出した。さらに、BNFPは、CSPD法よりメンブレン上の解像度が非常に優れていることが分かった。

第4章では、第1章及び第3章で創製した異なる蛍光色を有する2種類の蛍光基質HNPPとBNFPを用いて異なった2種類の塩基配列を持つDNAを同一メンブレン上で検出する技術2段階での2色検出法を検討した。その結果、鮮明な青色と黄緑色の2種

類の蛍光色で、異なった2種類の塩基配列を持つDNAの検出に成功した。

第5章では、酵素としてALPと西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼを用いる2色検出法について検討した。種々の化合物を合成して評価した結果、ペルオキシダーゼの新規な蛍光基質として、*Hind* IIIで消化した λ DNAを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法において橙色の蛍光バンドを示し、0.7 pg (2.5×10^{-19} mol)という高い検出限界を示すN-(4-アミノ-5-メトキシ-2-メチルフェニル)ベンズアミド (AMMB)を見出した。AMMBは無蛍光であるが、ペルオキシダーゼと反応すると強い蛍光を発するアゾ二量体となることを明らかにした。HNPPとAMMB、ALPとペルオキシダーゼを用い、DNAの2色検出を行った結果、鮮明な橙色と青色の2種類の蛍光色で、異なった2種類の塩基配列を持つDNAの同時検出に成功した。

第6章では、ジベレリンをハプテンとするプローブDNAに酵素を標識するための新しい標識試薬の合成とDNA検出感度の検討を行った。その結果、DNA検出感度はジベレリンA4とdUTPとのリンカーの長さに影響され、ジベレリンA4-[15]-dUTPは従来用いられている標識試薬の中で最も高感度にDNAを検出できるディゴキシゲニン-[11]-dUTPと同等の非常に高いDNA検出感度を有することが分かった。マレイミド基を有するジベレリンA4も優れた酵素標識試薬となることが分かった。

以上のように、本論文では、ナイロンメンブレン上のDNAを高感度に検出できるアルカリホスファターゼやペルオキシダーゼの新しい蛍光基質を見出した。これらの蛍光化合物は、酵素反応前は無蛍光であり、反応後メンブレン上で強い蛍光を発するという特性を有しており、この特長によりDNAの高感度検出を実現することが出来た。さらに、これらの蛍光基質を組み合わせることによって、RI法や化学発光法では実現されていない新しい多色プローブ法も見出した。また、ナイロンメンブレン上のDNAを高感度に検出できる新規な酵素標識用試薬を見出し、酵素法によるDNA高感度検出の新規なシステムの構築に成功した。

実験の部

融点は柳本微量融点測定装置YANAKOMP-50545によって測定した。赤外吸収(IR)スペクトルは日本分光 JASCO FT/IR-200 分光光度計を用いて測定した。核磁気共鳴(NMR)スペクトルはVarian Gemini-200分光光度計を用いて測定した。¹H NMR スペクトルはテトラメチルシラン(TMS)を内部標準物質としてppm単位で示した。質量スペクトル(MS)は、日立M-2000 (70eV)を用いて測定した。元素分析はPerkin-Elmer 240 Bを用いて測定した。

すべての反応は、特記しない限りアルゴン気流下で行った。反応溶液に用いたキシレンは、五酸化ニリンにより減圧蒸留し、モレキュラーシーブス(Merk 0.4 nm)上で保存したものを用いた。ジメチルホルムアミドは、五酸化ニリンで一夜脱水した後、モレキュラーシーブスにより減圧蒸留し、モレキュラーシーブス上で保存したものを用いた。アセトニトリルは、水素化カルシウムにより蒸留し、モレキュラーシーブス上で保存したものを用いた。

フルオレseinイソチオシアナートはアルドリッチ社、5-アミノフルオレseinは東京化成、ジベレリンA4は協和醗酵社から購入し、それ以外の試薬は、すべてアルドリッチ社及びナカライ・テスク社から購入した。

第1章 新規なナフタレン誘導体又はアントラセン誘導体の合成とDNAの高感度検出

N-置換-3-ヒドロキシー-2-ナフタレンカルボキサミド^{3,4)}の合成

3-ヒドロキシー-2-ナフトエ酸(0.053 mol)のキシレン溶液に、アニリン誘導体(0.0048 mol)を加え、80°Cで10分間攪拌した。その溶液に、三塩化リン(0.018 mol)を加え、2時間加熱環流した。反応溶液を室温まで冷却した後、4°Cで一夜放置すると目的物の結晶が析出してきた。結晶を濾過して取りだし、熱水で3回洗浄した。減圧乾燥後、ジメチルホルムアミド：メタノール=1：1の溶媒により再結晶精製した。

N-置換-3-ヒドロキシ-2-ナフタレンカルボキサミドのリン酸エステル体の合成

N-置換-3-ヒドロキシ-2-ナフタレンカルボキサミド (3g) のジオキサン溶液 (120ml) に 5 モル等量の五塩化リンを加え、50°Cで1時間攪拌する。反応溶液を300mlの冷水に注ぎ、5分間攪拌した。得られた結晶を濾過して取り出し、減圧乾燥した。その結晶を4mlのジメチルホルムアミドで溶解し、その溶液を、0.1 Nの炭酸ナトリウム水溶液 (300ml) に注ぎ、0°Cで2時間攪拌した。出てきた沈殿を0.2 μmのナイロンメンブレンフィルターを通して取り除き、その濾液に30%塩酸水溶液を加えると目的物のリン酸エステル体の結晶を得た。その結晶を濾過して取り出し、希塩酸水溶液で洗浄し、減圧乾燥すると白色沈殿体であるリン酸エステル体を収率60~70%で得た。

3-ヒドロキシ-N-2'-ビフェニル-2-ナフタレンカルボキサミド (1-11) の合成

3-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸 (5g, 26.6 mmol) のキシレン溶液 (30ml) に2-アミノビフェニル (4.05g, 23.9mmol) を加え、80°Cで10分間攪拌した。その溶液に、三塩化リン (890 μl, 8.9 mmol) を加え、2時間加熱環流した。反応溶液を室温まで冷却した後、4°Cで一夜放置すると目的物の3-ヒドロキシ-N-2'-ビフェニル-2-ナフタレンカルボキサミド (1-11) の結晶が析出してきた。結晶を濾過して取りだし、熱水で3回洗浄した。減圧乾燥後、ジメチルホルムアミド：メタノール=1：1の溶媒により再結晶精製し、収率78%で得た。

IR (KBr) 3020, 1640, 1520, 1450, 1360, 1300, 1220, 1200, 1150, 1050, 850, 750, 700
cm⁻¹

3-ヒドロキシ-N-2'-ビフェニル-2-ナフタレンカルボキサミド (1-11) のリン酸エステル体合成

3-ヒドロキシ-N-2'-ビフェニル-2-ナフタレンカルボキサミド (1-11) (3g) のジオキサン溶液 (120ml) に 5 モル等量の五塩化リンを加え、50°Cで

1時間攪拌する。反応溶液を300mlの冷水に注ぎ、5分間攪拌した。得られた結晶を濾過して取り出し、減圧乾燥した。その結晶を4mlのジメチルホルムアミドで溶解し、その溶液を、0.1Nの炭酸ナトリウム水溶液(300ml)に注ぎ、0°Cで2時間攪拌した。出てきた沈殿を0.2µmのナイロンメンブレンフィルターを通して取り除き、その濾液に30%塩酸水溶液を加えると目的物のリン酸エステル体の結晶を得た。その結晶を濾過して取り出し、希塩酸水溶液で洗浄し、減圧乾燥すると白色沈殿体である3-ヒドロキシ-N-を収率60%で得た。

2'-ビフェニル-2-ナフタレンカルボキサミド(1-11)リン酸エステル体を用いたスポットテスト法によるλDNAの検出

滅菌したエッペンドルフチューブに、ディゴキシゲニン-[11]-dUTP (1mmol, 1µl), dATP (0.5mM, 1µl), dGTP (0.5 mM, 1µl), dCTP (0.5mM, 1µl), 滅菌蒸留水 (11µl)、95°Cで10分間熱変性し氷水中で5分間冷却し1本鎖にしたλDNA (500 ng/µl, 2µl)を加え、1分間ボルテックスを用いて強く攪拌した。反応液にKlenow酵素を1µl加え、37°Cで1時間反応させた。次いで、0.2MのEDTAを2µl加え、反応を停止した。次いで、反応液に60µlのエタノール/酢酸ナトリウム混合液を加え、-80°Cで15分間放置した。その溶液を、15000回転で4°Cで15分間遠心した。上清をピペットで吸い取り、70%エタノールで洗浄した後乾燥させた。このディゴキシゲニン標識したλDNAを10ng/µlの濃度で、ニシン精子DNAを加えたTE緩衝液(pH 8.0)に溶かした。得られたディゴキシゲニン標識したλDNAをニシン精子DNAを加えたTE緩衝液(pH 8.0)で希釈して、0 fg/µl, 5 fg/µl, 10 fg/µl, 20 fg/µl, 40 fg/µl, 80 fg/µl, 160 fg/µl, 320 fg/µl, 1 pg/µlの濃度のディゴキシゲニン標識したλDNAを調整した。これらのディゴキシゲニン標識したλDNA溶液を1µlずつナイロンメンブレンにスポットした。ナイロンメンブレン上のディゴキシゲニン標識したλDNAを固定化するために、ナイロンメンブレンを真空オーブン中で、80°Cで30分間加熱した。ナイロンメンブレンを0.1%カゼイン溶液に30分間浸した。ナイロンメンブレンに、アルカリホスファターゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体を含む緩衝液をのせ、パラフィルムを被せ、30分間静置した。次いで、ナイロンメンブレンを0.15 M 塩化ナトリウムを含んだトリス緩衝液(pH 7.5)で、10分間

づつ3回洗浄して、未結合の抗ディゴキシゲニン抗体を除去した。10 mM塩化ナトリウムと50mM塩化マグネシウムを含んだ100 mMのトリス緩衝液 (pH 8.0) で調整した100 μ gの2'-ビフェニル-2-ナフタレンカルボキサミド (1:1) リン酸エステル体溶液を、ナイロンメンブレンの全表面が覆うように滴下し、パラフィルムを被せ、37°Cで1時間暗室で放置した。パラフィルムを取り除き、ナイロンメンブレンに、0.5 N水酸化ナトリウム溶液を滴下し反応を終了した。ナイロンメンブレンに紫外光 (302 nm, 2mW/cm²) を照射して、アルカリホスファターゼによる加水分解体を励起させ、発する蛍光をCCDカメラ (ソニー、XC-57) に取り込み、ビデオプリンター (精工舎、VP-1500) でプリントアウトした。目視で見えるスポットを検出可能とすると、5 fgの λ DNAを検出した。+

2'-ビフェニル-2-ナフタレンカルボキサミド (1:1) リン酸エステル体を用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法によるHind IIIで消化させた λ DNAの検出

(1) ディゴキシゲニン標識したHind IIIで消化させた λ プローブDNAの作製

滅菌したエッペンドルフチューブに、ディゴキシゲニン-[11]-dUTP (1mmol, 1 μ l), dATP (0.5mM, 1 μ l), dGTP (0.5 mM, 1 μ l), dCTP (0.5mM, 1 μ l), 滅菌蒸留水 (1:1 μ l)、95°Cで10分間熱変性し氷水中で5分間冷却し1本鎖にしたHind IIIで消化させた λ DNA (500 ng/ μ l, 2 μ l) を加え、1分間ボルテックスを用いて強く攪拌した。反応液にKlenow酵素を1 μ l加え、37°Cで1時間反応させた。次いで、0.2MのEDTAを2 μ l加え、反応を停止した。次いで、反応液に60 μ lのエタノール/酢酸ナトリウム混合液を加え、-80°Cで15分間放置した。その溶液を、15000回転で4°Cで15分間遠心した。上清をピペットで吸い取り、70%エタノールで洗浄した後乾燥させた。このディゴキシゲニン標識したHind IIIで消化させた λ プローブDNAを10ng/ μ lの濃度で、ニシン精子DNAを加えたTE緩衝液 (pH 8.0) に溶かした。

(2) ディゴキシゲニン標識したHind IIIで消化させた λ プローブDNAの変性

このディゴキシゲニン標識したHind IIIで消化させた λ プローブDNAを95°Cで1

0 分間熱変性し、即座に氷冷し、5 分間放置した。次いで、ハイブリダイブリダイゼーション溶液を加えた。

(3) サザンブロットハイブリダイゼーション

5 cm サイドの端に $0.5 \times 0.1 \times 0.5$ cm サイズの穴を 3 カ所開けた $5 \times 6 \times 0.6$ cm のサイズの 0.8% アガロースゲルを作製した。そのアガロースゲルをトリス・アセテート緩衝液が入った電気泳導槽に置き、アガロースゲルの 3 カ所の穴に、*Hind* III で消化させた λ DNA を 20 μ l、4 μ l、0.8 μ l ずつそれぞれの穴に注入した。電気泳導を行い、をサイズ分離した。次いで、そのアガロースゲルを 0.25N 塩酸水溶液に浸し 10 分間ゆっくり振とうし（核酸のプリン環を開裂させ、短い断片にし、ナイロンメンブレンに転写しやすくするための操作）、蒸留水で、アガロースゲルを洗った。次いで、0.5N 水酸化ナトリウム / 1.5M 塩化ナトリウム溶液にアガロースゲルを浸し、15 分間ゆっくり振とうした（ターゲットの *Hind* III で消化させた λ DNA を 1 本鎖にする操作）。次いで、アガロースゲルにナイロンメンブレンを密着させ、吸引させながらアガロースゲル上の *Hind* III で消化させた λ DNA をナイロンメンブレンに転写した。そのナイロンメンブレンに紫外光を照射し、DNA を固定した。次いで、5% 脱脂粉乳と 0.1% ラウロイル N-メチルグリシン ナトリウム塩と 0.02% ドデシル硫酸ナトリウムと 50% ホルムアミドを含んだ 150mM 塩化ナトリウムと 150mM クエン酸ナトリウムで調整した緩衝液 (pH 7.0) にナイロンメンブレンを浸した。次いで、(1) ~ (2) で調整したディゴキシゲニン標識した *Hind* III で消化させた λ プローブ DNA を加え、42°C で 16 時間反応した（プローブ DNA とターゲット DNA を相補的結合させた）。次いで、室温で、0.05% ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ 150mM 塩化ナトリウムと 150mM クエン酸ナトリウムで調整した緩衝液 (pH 7.0) に、ナイロンメンブレンを浸し、5 分間振とうした。この操作を 2 回行った。次いで、55°C で同様の処理を行った。次いで、アルカリホスファターゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体の Fab' フラグメントとのカップリング反応を行った。次いで、0.05% ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ 150mM 塩化ナトリウムと 150mM クエン酸ナトリウムで調整した緩衝液 (pH 8.5) で 100 μ g/ml に調整した 2'-ビフェニルー 2'-ナフタレンカルボキサミド (1-11) リン酸エステル体溶液をそのナイロンメンブレン上に

のせ、パラフィルムで被い、室温で2時間反応した。蒸留水にナイロンメンブレンを10分間浸し振とうし、酵素反応を終了した。ナイロンメンブレンに紫外光 (302 nm, 2mW/cm²) を照射して、アルカリホスファターゼによる加水分解体を励起させ、発する蛍光をCCDカメラ (ソニー、XC-57) に取り込み、ビデオプリンター (精工舎、VP-1500) でプリントアウトした。目視で見えるスポットを検出可能とすると、0.1pgのλDNAを検出した。

第2章 新規なフルオレセイン誘導体ジリン酸エステル体の合成とDNAの高感度検出

N-*n*-ブチル-5-チオウレイドフルオレセイン (2-3) の合成

フルオレセインイソチオシアナート (45mg, 0.116mmol) のエタノール (1ml) 溶液に *n*-ブチルアミン (12.6μl, 0.127mmol) を加え、室温で3時間反応した。溶媒を留去した後、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム : エタノール = 9 : 5) により精製して、(2-3) を 38mg (収率 71%) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 0.93 (3H, t, J=5.9), 1.33-1.37 (4H, m), 1.53 (2H, t, J=6.9), 6.5-6.7 (6H, m), 7.05 (1H, d, J=5.0), 7.15 (1H, d, J=7.9), 8.21 (2H, d, J=1.1)

m.p. 300°C以上

N-シクロヘキシル-5-チオウレイドフルオレセイン (2-4) の合成

フルオレセインイソチオシアナート (100mg, 0.26mmol) のエタノール (1ml) 溶液にシクロヘキシルアミン (32.3μl, 0.28mmol) を加え、室温で12時間反応した。溶媒を留去した後、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム : エタノール = 9 : 5) により精製して、(2-4) を 104mg (収率 83%) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 1.0-2.0 (11H, m), 6.5-6.7 (6H, m), 7.14 (1H, d, J=8.9), 7.74 (1H, d, J=8.9), 8.31 (1H, d, J=1.1), 9.73 (1H, br), 10.18 (1H, br)

m.p. 300°C以上

N-1-アダマンチル-5-チオウレイドフルオレセイン (2-5) の合成

フルオレセインイソチオシアナート (100mg, 0.26mmol) のエタノール (1ml) 溶液に 1-アミノアダマンチル (42.7mg, 0.28mmol) を加え、室温で 1 2 時間反応した。溶媒を留去した後、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム : エタノール = 9 5 : 5) により精製して、(2-5) を 9 7 mg (収率 7 0 %) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 1.15-2.0 (16H, m), 6.5-6.7 (6H, m), 7.14 (1H, d, J=8.9), 7.74 (1H, d, J=8.9), 8.31 (1H, d, J=1.1), 9.73 (1H, br), 10.18 (1H, br)
m.p. 300°C以上

N-4-クロロフェニル-5-チオウレイドフルオレセイン (2-6) の合成

フルオレセインイソチオシアナート (22.4mg, 0.06mmol) のエタノール (1ml) 溶液に 4-クロロアニリン (23mg, 0.18mmol) を加え、室温で 1 2 時間反応した。溶媒を留去した後、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム : エタノール = 9 5 : 5) により精製して、(2-6) を 2 9 mg (収率 9 5 %) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 6.5-6.7 (6H, m), 7.2-7.36 (4H, m), 7.49 (1H, d, J=12.0), 7.80 (1H, d, J=9.9), 8.18 (1H, d, J=0.9), 10.1 (1H, s), 10.2 (1H, s)
m.p. 300°C以上

N-2-メチルフェニル-5-チオウレイドフルオレセイン (2-7) の合成

フルオレセインイソチオシアネート (54.5mg, 0.14mmol) のエタノール (1ml) 溶液に O-トルイジン (15.7μl, 0.15mmol) を加え、室温で 1 2 時間反応した。溶媒を留去した後、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム : エタノール = 9 5 : 5) により精製して、(2-7) を 64.6mg (収率 9 3 %) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 2.27 (3H, s), 6.56-6.67 (6H, m), 7.16-7.27 (5H, m), 7.80 (1H, d, J=12.5), 8.18 (1H, d, J=1.1), 9.65 (1H, s), 10.07 (1H, s), 10.12 (1H, s)
m.p. 300°C以上

N-4-メチルフェニル-5-チオウレイドフルオレセイン (2-8) の合成

フルオレセインイソチオシアナート (54.5mg, 0.14mmol) のエタノール (1ml) 溶液にP-トルイジン (15.7 μ l, 0.15mmol) を加え、室温で12時間反応した。溶媒を留去した後、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム：エタノール=95：5) により精製して、(2-8) を61mg (収率88%) で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 2.3 (3H, s), 6.5-6.7 (6H, m), 7.16 (2H, d, $J=7.5$), 7.17 (1H, d, $J=8.0$), 7.36 (1H, d, $J=8.0$), 7.82 (1H, d, $J=10.0$), 8.18 (2H, d, $J=1.5$), 10.05 (3H, br)

m.p. 300°C以上

N-4-メトキシフェニル-5-チオウレイドフルオレセイン (2-9) の合成

フルオレセインイソチオシアナート (20mg, 0.05mmol) のエタノール (1ml) 溶液にP-アニシジン (19mg, 0.15mmol) を加え、室温で15時間反応した。溶媒を留去した後、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム：エタノール=95：5) により精製して、(2-9) を20.5mg (収率78%) で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 3.75 (3H, s), 6.5-6.7 (6H, m), 6.95 (2H, d, $J=7.9$), 7.18 (1H, d, $J=8.0$), 7.3 (2H, d, $J=7.9$), 7.9 (2H, d, $J=8.0$), 8.18 (1H, d, $J=1.1$), 10.01 (1H, s), 10.05 (2H, s)

m.p. 300°C以上

N-2-ビフェニル-5-チオウレイドフルオレセイン (2-10) の合成

フルオレセインイソチオシアナート (206mg, 0.53mmol) のエタノール (1ml) 溶液にO-アミノビフェニル (98.5mg, 0.58mmol) を加え、室温で15時間反応した。溶媒を留去した後、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム：エタノール=95：5) により精製して、(2-10) を275mg (収率93%) で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 6.57-6.68 (6H, m), 7.12 (1H, d, $J=12.5$), 7.38-7.47

(9H, m), 7.60 (1H, d, J=10.5), 8.04 (1H, d, J=0.9), 9.58 (1H, s), 9.90 (2H, s)

m.p. 300°C以上

N-3, 5-ジメチルフェニル-5-チオウレイドフルオレセイン (2-11)

の合成

フルオレセインイソチオシアナート (100mg, 0.26mmol) のエタノール (1ml) 溶液に 3, 5-キシリジン (32.3 μ l, 0.26mmol) を加え、室温で 15 時間反応した。溶媒を留去した後、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム : エタノール = 95 : 5) により精製して、(2-11) を 119.2mg (収率 91%) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 2.25 (6H, s), 6.58-6.67 (6H, m), 6.81 (1H, s), 7.04 (2H, s), 7.17 (1H, d, J=10.5), 7.79 (1H, d, J=12.5), 8.12 (1H, d, J=1.1), 9.99 (1H, s), 10.11 (2H, s)

m.p. 300°C以上

N-2, 4-ジメトキシフェニル-5-チオウレイドフルオレセイン (2-12)

の合成

フルオレセインイソチオシアナート (20mg, 0.05mmol) のエタノール (1ml) 溶液に 2, 4-ジメトキシアニリン (23.6mg, 0.15mmol) を加え、室温で 15 時間反応した。溶媒を留去した後、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム : エタノール = 95 : 5) により精製して、(2-12) を 20mg (収率 73%) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 3.8 (6H, s), 6.5-6.7 (6H, m), 6.85 (1H, s), 7.18 (1H, d, J=7.8), 7.25 (2H, d, J=8.0), 7.9 (2H, d, J=7.8), 8.20 (1H, d, J=1.1), 9.95 (1H, s), 10.02 (2H, s)

m.p. 300°C以上

N-1-ピレニル-5-チオウレイドフルオレセイン (2-13) の合成

フルオレセインイソチオシアナート (20mg, 0.05mmol) のエタノール (1ml) 溶液に 1-アミノピレン (26mg, 0.15mmol) を加え、室温で 15 時間反応した。溶媒を留去

した後、カラムクロマトグラフィー（シリカゲル、クロロホルム：エタノール＝95：5）により精製して、（2-13）を34.6mg（収率74％）で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 6.5-6.7 (6H, m), 7.18 (1H, d, J=12.0), 7.88 (1H, d, J=9.9), 8.12 (1H, d, J=9.9), 8.22 (9H, m), 10.09 (2H, s), 10.20 (1H, s)

m.p. 300°C以上

N-7-(4-メチル)-クマリニル-5-チオウレイドフルオレセイン（2-14）の合成

フルオレセインイソチシアナート（20mg, 0.05mmol）のエタノール（1ml）溶液に7-アミノ-4-メチルクマリン（9.3mg, 0.05mmol）を加え、室温で15時間反応した。溶媒を留去した後、カラムクロマトグラフィー（シリカゲル、クロロホルム：エタノール＝95：5）により精製して、（2-14）を19mg（収率73％）で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 2.22 (3H, s), 6.31 (1H, d, J=1.1), 6.5-6.7 (6H, m), 7.22 (1H, d, J=8.4), 7.5 (1H, dd, J=2.1), 7.72 (1H, d, J=1.1), 7.77 (1H, s), 7.85 (1H, dd, J=4.2), 8.20 (1H, d, J=1.9), 10.1 (2H, s), 10.46 (1H, s)

m.p. 300°C以上

N-5-フルオレセニル-5-チオウレイドフルオレセイン（2-15）の合成

フルオレセインイソチシアナート（31mg, 0.08mmol）のエタノール（1ml）溶液に5-アミノフルオレセイン（30.4mg, 0.09mmol）を加え、室温で15時間反応した。溶媒を留去した後、カラムクロマトグラフィー（シリカゲル、クロロホルム：エタノール＝95：5）により精製して、（2-15）を45mg（収率77％）で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 6.5-6.7 (12H, m), 7.20 (2H, d, J=8.1), 7.80 (2H, d, J=7.9), 8.22 (2H, s), 7.77 (1H, s), 10.02 (3H, br)

m.p. 300°C以上

N-2-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (2-16) の合成

5-カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (50mg, 0.1mmol) のジメチルスルホキシド (1ml) 溶液にO-ビフェニルアミン (17.8mg, 0.1mmol) のジメチルスルホキシド溶液 (0.1ml) を加え、次いで、N、N-ジシクロヘキシルカルボジイミド (21.8mg, 0.1mmol) を加え室温で15時間反応した。逆相カラムクロマトグラフィー (コスモシール75C₁₈-PREP、蒸留水：メタノール=30：70) により精製して、(2-16) を47mg (収率78%) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 6.57-6.69 (6H, m), 7.42-7.53 (3H, m), 7.76-7.91 (4H, m), 7.27 (1H, d, J=12.5), 8.09-8.19 (3H, m), 8.53 (1H, d, J=0.9), 10.05 (1H, s), 10.75 (1H, s)

m.p. 221-222°C

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (2-17) の合成

P-ビフェニルカルボニルクロリド (262.4mg, 1.21mmol) のアセトニトリル (2.5ml) 溶液に5-アミノフルオレセイン (420.5mg, 1.21mmol) を加え室温で15時間反応した。逆相カラムクロマトグラフィー (コスモシール75C₁₈-PREP、蒸留水：メタノール=30：70) により精製して、(2-17) を620.3mg (収率98%) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 6.57-6.69 (6H, m), 7.42-7.53 (3H, m), 7.76-7.91 (4H, m), 7.27 (1H, d, J=12.5), 8.09-8.19 (3H, m), 8.53 (1H, d, J=0.9), 10.05 (1H, s), 10.75 (1H, s)

m.p. 226-227°C

N-1-ナフチル-5-アミノフルオレセイン (2-18) の合成

2-ナフトエ酸 (100mg, 0.58mmol) のジクロロエタン溶液 (1ml) に塩化ベンジルトリエチルアンモニウムを (0.2mg, 0.000842mmol) 加え、10分間攪拌した。反応溶液に、塩化チオニル (46μl, 0.639mmol) を加え、100°Cで3時間加熱還流し、溶媒を減圧留去した。2-ナフタレンカルボニルクロライド (10mg, 0.052mmol) のアセトン

溶液 (0.4ml) に 5-アミノフルオレセイン (9mg, 0.026mmol) を加え室温で、1 時間攪拌した。カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム：エタノール＝95：5) により精製して、(2-18) を 8.8mg (収率 78%) で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 6.5-6.7 (6H, m), 7.28 (1H, d, $J=12.1$), 7.6-7.7 (2H, m), 8.0-8.1 (4H, m), 8.15 (1H, s), 8.20 (1H, d, $J=2.1$), 8.57 (1H, d, $J=1.6$), 8.58 (1H, d, $J=1.1$)

m.p. 241-242°C

N-置換-5-アミノフルオレセインジリン酸体の合成

N-置換-5-アミノフルオレセイン (0.18mmol) のピリジン溶液 (200 μl) に、オキシ塩化リン (0.37mmol) を 0°C で加え、そのまま 1 時間攪拌した。反応液を冷水 (2ml) に注ぎ反応を終了させ、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (コスモシール 75 C₁₈-PREP、蒸留水：メタノール＝30：70) により精製して、N-置換-5-アミノフルオレセインジリン酸体を収率 43～56% で得た。

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (2-17) ジリン酸エステル体を用いたスポットテスト法による λ DNAの検出

滅菌したエッペンドルフチューブに、ディゴキシゲニン-[11]-dUTP (1mmol, 1 μl), dATP (0.5mM, 1 μl), dGTP (0.5mM, 1 μl), dCTP (0.5mM, 1 μl), 滅菌蒸留水 (11 μl)、95°C で 10 分間熱変性し氷水中で 5 分間冷却し 1 本鎖にした λ DNA (500 ng/ μl , 2 μl) を加え、1 分間ボルテックスを用いて強く攪拌した。反応液に Klenow 酵素を 1 μl 加え、37°C で 1 時間反応させた。次いで、0.2M の EDTA を 2 μl 加え、反応を停止した。次いで、反応液に 60 μl のエタノール／酢酸ナトリウム混合液を加え、-80°C で 15 分間放置した。その溶液を、15000 回転で 4°C で 15 分間遠心した。上清をピペットで吸い取り、70% エタノールで洗浄した後乾燥させた。このディゴキシゲニン標識した λ DNA を 10ng/ μl の濃度で、ニシン精子 DNA を加えた TE 緩衝液 (pH 8.0) に溶かした。得られたディゴキシゲニン標識した λ DNA をニシン精子 DNA を加えた TE

緩衝液 (pH 8.0) で希釈して、0 fg/μl, 5 fg/μl, 10 fg/μl, 20 fg/μl, 40 fg/μl, 80 fg/μl, 160 fg/μl, 320 fg/μl, 1 pg/μl の濃度のディゴキシゲニン標識したλDNAを調整した。これらのディゴキシゲニン標識したλDNA溶液を1 μlずつナイロンメンブレンにスポットした。ナイロンメンブレン上のディゴキシゲニン標識したλDNAを固定化するために、ナイロンメンブレンを真空オーブン中で、80°Cで30分間加熱した。ナイロンメンブレンを0.1%カゼイン溶液に30分間浸した。ナイロンメンブレンに、アルカリホスファターゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体を含む緩衝液をのせ、パラフィルムを被せ、30分間静置した。次いで、ナイロンメンブレンを0.15 M 塩化ナトリウムを含んだトリス緩衝液 (pH 7.5) で、10分間ずつ3回洗浄して、未結合の抗ディゴキシゲニン抗体を除去した。10 mM塩化ナトリウムと50mM塩化マグネシウムを含んだ100 mMのトリス緩衝液 (pH 8.0) で調整した100μgの N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (2-17) ジリン酸エステル体溶液を、ナイロンメンブレンの全表面が覆うように滴下し、パラフィルムを被せ、37°Cで1時間暗室で放置した。パラフィルムを取り除き、ナイロンメンブレンに、0.5 N水酸化ナトリウム溶液を滴下し反応を終了した。ナイロンメンブレンに紫外光 (302 nm, 2mW/cm²) を照射して、アルカリホスファターゼによる加水分解体を励起させ、発する蛍光をCCDカメラ (ソニー、XC-57) に取り込み、ビデオプリンター (精工舎、VP-1500) でプリントアウトした。目視で見えるスポットを検出可能とすると、20 fgのλDNAを検出した。

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (2-17) ジリン酸エステル体を用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法によるHind IIIで消化させたλDNAの検出

(1) ディゴキシゲニン標識したHind IIIで消化させたλプローブDNAの作製

滅菌したエッペンドルフチューブに、ディゴキシゲニン-[11]-dUTP (1mmol, 1μl), dATP (0.5mM, 1μl), dGTP (0.5 mM, 1μl), dCTP (0.5mM, 1μl), 滅菌蒸留水 (11 μl) 、95°Cで10分間熱変性し氷水中で5分間冷却し1本鎖にしたHind IIIで消化させたλDNA (500 ng/μl, 2 μl) を加え、1分間ボルテックスを用いて強く攪拌した。反応液にKlenow酵素を1 μl加え、37°Cで1時間反応させた。次いで、0.2MのEDTAを

2 μ l 加え、反応を停止した。次いで、反応液に 60 μ l のエタノール／酢酸ナトリウム混合液を加え、-80 $^{\circ}$ C で 15 分間放置した。その溶液を、15000 回転で 4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。上清をピペットで吸い取り、70 % エタノールで洗浄した後乾燥させた。このディゴキシゲニン標識した *Hind* III で消化させた λ プローブ DNA を 10 ng/ μ l の濃度で、ニシン精子 DNA を加えた TE 緩衝液 (pH 8.0) に溶かした。

(2) ディゴキシゲニン標識した *Hind* III で消化させた λ プローブ DNA の変性

このディゴキシゲニン標識した *Hind* III で消化させた λ プローブ DNA を 95 $^{\circ}$ C で 10 分間熱変性し、即座に氷冷し、5 分間放置した。次いで、ハイブリダイゼーション溶液を加えた。

(3) サザンブロットハイブリダイゼーション

5 cm サイドの端に 0.5 \times 0.1 \times 0.5 cm サイズの穴を 3 カ所開けた 5 \times 6 \times 0.6 cm のサイズの 0.8% アガロースゲルを作製した。そのアガロースゲルをトリス・アセテート緩衝液が入った電気泳動槽に置き、アガロースゲルの 3 カ所の穴に、*Hind* III で消化させた λ DNA を 20 μ l、4 μ l、0.8 μ l ずつそれぞれの穴に注入した。電気泳動を行い、サイズ分離した。次いで、そのアガロースゲルを 0.25N 塩酸水溶液に浸し 10 分間ゆっくり振とうし (核酸のプリン環を開裂させ、短い断片にし、ナイロンメンブレンに転写しやすくするための操作)、蒸留水で、アガロースゲルを洗った。次いで、0.5N 水酸化ナトリウム／1.5M 塩化ナトリウム溶液にアガロースゲルを浸し、15 分間ゆっくり振とうした (ターゲットの *Hind* III で消化させた λ DNA を 1 本鎖にする操作)。次いで、アガロースゲルにナイロンメンブレンを密着させ、吸引させながらアガロースゲル上の *Hind* III で消化させた λ DNA をナイロンメンブレンに転写した。そのナイロンメンブレンに紫外光を照射し、DNA を固定した。次いで、5 % 脱脂粉乳と 0.1 % ラウロイル N-メチルグリシン ナトリウム塩と 0.02 % ドデシル硫酸ナトリウムと 50 % ホルムアミドを含んだ 150 mM 塩化ナトリウムと 150 mM クエン酸ナトリウムで調整した緩衝液 (pH 7.0) にナイロンメンブレンを浸した。次いで、(1) ~ (2) で調整したディゴキシゲニン標識した *Hind* III で消化させた λ プローブ DNA を加え、42 $^{\circ}$ C で 1

6時間反応した（プローブDNAとターゲットDNAを相補的結合させた）。次いで、室温で、0.05%ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液（pH 7.0）に、ナイロンメンブレンを浸し、5分間振とうした。この操作を2回行った。次いで、55°Cで同様の処理を行った。次いで、アルカリホスファターゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体のFab'フラグメントとのカップリング反応を行った。次いで、0.05%ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液（pH 8.5）で100μg/mlに調整したN-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン（2-17）ジリン酸エステル体溶液をそのナイロンメンブレン上にのせ、パラフィルムで被い、室温で2時間反応した。蒸留水にナイロンメンブレンを10分間浸し振とうし、酵素反応を終了した。ナイロンメンブレンに紫外光（302 nm, 2mW/cm²）を照射して、アルカリホスファターゼによる加水分解体を励起させ、発する蛍光をCCDカメラ（ソニー、XC-57）に取り込み、ビデオプリンター（精工舎、VP-1500）でプリントアウトした。目視で見えるスポットを検出可能とすると、0.1pgのλDNAを検出した。

第3章 新規なフルオレセイン誘導体モノリン酸エステル体の合成とDNAの高感度検出

5-（4-ビフェニルカルボキサミド）-3'-O-メチルフルオレセイン

（3-1）の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン（100mg, 0.19mmol）のアセトン溶液（1ml）に無水炭酸カリウム（26.4mg, 0.19mmol）を加え、さらにヨードメタン（11.9μl, 0.19mmol）を加え加熱還流6時間行った。溶媒を減圧留去後、カラムクロマト（シリカゲル、クロロホルム：メタノール＝95：5）精製し、（3-1）を99mg（収率88%）で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 3.35 (3H, s), 6.54-6.70 (6H, m), 7.28 (1H, d, J=12.5), 7.42-7.58 (3H, m), 7.75-7.91 (4H, m), 8.09-8.18 (3H, m), 8.52 (1H, d, J=0.5), 10.75 (1H, s)

m.p. 300 °C以上

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-アセチルフルオレセイン

(3-2) の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (70mg, 0.13mmol) のアセトン溶液 (0.3ml) に、0 °Cで、無水酢酸 (12.5 μ l, 0.13mmol) と硫酸 1 滴を加えそのまま 2 時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、カラムクロマト (シリカゲル、クロロホルム：メタノール=95：5) 精製し、(3-2) を68.2mg (収率90%) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 3.35 (3H, s), 6.58-6.69 (6H, m), 7.27 (1H, d, J=12.5), 7.43-7.56 (3H, m), 7.75-7.90 (4H, m), 8.09-8.16 (3H, m), 8.53 (1H, d, J=2.5), 10.75 (1H, s)

m.p. 300 °C以上

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-トリフルオロアセチルフルオレセイン (3-3) の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (100mg, 0.19mmol) のアセトン溶液 (0.5ml) に、0 °Cで、無水トリフルオロ酢酸 (26.7 μ l, 0.19mmol) と硫酸 1 滴を加えそのまま 2 時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、カラムクロマト (シリカゲル、クロロホルム：メタノール=95：5) 精製し、(3-3) を105.5mg (収率89%) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 6.58-6.69 (6H, m), 7.27 (1H, d, J=12.5), 7.43-7.56 (3H, m), 7.75-7.90 (4H, m), 8.09-8.16 (3H, m), 8.53 (1H, d, J=2.5), 10.75 (1H, s)

m.p. 300 °C以上

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-ベンジルフルオレセイン

(3-4) の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (70mg, 0.13mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (0.25ml) に、無水炭酸カリウム (18.4mg, 0.13mmol) と塩化ベン

ジル (15.3 μ l, 0.13mmol) を加え、室温で 5 時間反応した。6 N 塩酸 (10ml) に反応溶液を加え、室温で、10 分撹拌した。得られた結晶を吸引ろ過で取り出し、減圧乾燥し、(3-4) を 71.4mg (収率 87%) で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 5.53 (2H, s), 6.53-6.68 (6H, m), 7.26 (1H, d, $J=12.5$), 7.47-7.53 (5H, m), 7.76-7.90 (5H, m), 8.09-8.18 (4H, m), 8.52 (1H, d, $J=0.5$), 10.70 (1H, s)

MS m/z (rel intensity) 617 (M^+ , 66), 526 (100), 338 (38)

HRMS Calcd for $C_{40}H_{27}NO_6$: M 617.1838

Found: m/z 617.1221

m.p. 300 $^{\circ}\text{C}$ 以上

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-2-フェニルベンジルフルオレセイン (3-5) の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (73.6mg, 0.14mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (0.25ml) に、2-(ブロモメチル) ビフェニル (26.0 μ l, 0.14mmol) を加え、室温で 6 時間反応した。逆相カラムクロマトグラフィー (コスモシール 75 C_{18} -PREP、蒸留水:メタノール=30:70) により精製し、(3-5) を 43.7mg (収率 45%) で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 5.53 (2H, s), 6.53-6.68 (6H, m), 7.26 (1H, d, $J=12.5$), 7.47-7.53 (4H, m), 7.76-7.90 (5H, m), 8.09-8.18 (4H, m), 8.52 (1H, d, $J=0.5$), 10.05 (1H, s), 10.75 (1H, s)

m.p. 300 $^{\circ}\text{C}$ 以上

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-4-フェニルベンジルフルオレセイン (3-6) の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (63.6mg, 0.12mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (0.25ml) に、4-(クロロメチル) ビフェニル (29.3mg, 0.14mmol) を加え、室温で 6 時間反応した。逆相カラムクロマトグラフィー (コスモ

シール 75 C₁₈-PREP、蒸留水：メタノール=30：70）により精製し、（3-6）を58.7mg（収率70％）で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 5.53 (2H, s), 6.53-6.68 (6H, m), 7.26 (1H, d, J=12.5), 7.47-7.53 (4H, m), 7.76-7.90 (5H, m), 8.09-8.18 (4H, m), 8.52 (1H, d, J=0.5), 10.05 (1H, s), 10.75 (1H, s)

m.p. 300 °C以上

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-4-メチルベンジルフル オレセイン（3-7）の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン（100mg, 0.19mmol）のジメチルホルムアミド溶液（0.3ml）に、α-ブロモ-p-キシレン（35.1mg, 0.19mmol）を加え、室温で5時間反応した。逆相カラムクロマトグラフィー（コスモシール 75 C₁₈-PREP、蒸留水：メタノール=30：70）により精製し、（3-7）を44.9mg（収率38％）で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 2.08 (2H, s), 3.16 (3H, s), 6.53-6.68 (6H, m), 7.26 (1H, d, J=12.5), 7.47-7.53 (4H, m), 7.76-7.90 (5H, m), 8.09-8.18 (4H, m), 8.52 (1H, d, J=0.5)

m.p. 300 °C以上

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-2, 5-ジメチルベンジ ルフルオレセイン（3-8）の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン（100mg, 0.19mmol）のジメチルホルムアミド溶液（0.3ml）に、塩化2, 5-ジメチルベンジル（27.9μl, 0.19mmol）を加え、室温で6時間反応した。逆相カラムクロマトグラフィー（コスモシール 75 C₁₈-PREP、蒸留水：メタノール=30：70）により精製し、（3-8）を55.1mg（収率45％）で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 2.31 (3H, s), 2.35 (3H, s), 5.62 (2H, s), 6.52-6.69 (6H, m), 7.13-7.29 (4H, m), 7.47-7.53 (3H, m), 7.76-7.90 (4H, m), 8.09-8.17

(3H, m), 8.52 (1H, d, J=0.8), 10.68 (1H, s)

m.p. 300 °C以上

5-（4-ビフェニルカルボキサミド）-3'-O-2、4-ジメチルベンジ
ルフルオレsein（3-9）の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレsein（59mg, 0.11mmol）のジメチルホルムアミド溶液（0.5ml）に、塩化2、4-ジメチルベンジル（21μl, 0.14mmol）を加え、室温で2時間反応した。逆相カラムクロマトグラフィー（コスモシール75 C₁₈-PREP、蒸留水：メタノール=30：70）により精製し、（3-9）を38.3mg（収率53%）で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 2.31 (3H, s), 2.35 (3H, s), 5.62 (2H, s), 6.52-6.69 (6H, m), 7.13-7.29 (4H, m), 7.47-7.53 (3H, m), 7.76-7.90 (4H, m), 8.09-8.17 (3H, m), 8.52 (1H, d, J=0.8), 10.68 (1H, s)

m.p. 300 °C以上

5-（4-ビフェニルカルボキサミド）-3'-O-3、4-ジメチルベンジ
ルフルオレsein（3-10）の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレsein（200mg, 0.38mmol）のジメチルホルムアミド溶液（1.4ml）に、無水炭酸カリウム（52.4mg, 0.38mmol）と塩化3、4-ジメチルベンジル（88.8μl, 0.46mmol）を加え、室温で4時間反応した。6N塩酸（10ml）に反応溶液を加え、室温で、10分攪拌した。得られた結晶を吸引ろ過で取り出し、減圧乾燥し、（3-10）を210mg（収率86%）で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 2.31 (3H, s), 2.35 (3H, s), 5.62 (2H, s), 6.52-6.69 (6H, m), 7.13-7.29 (4H, m), 7.47-7.53 (3H, m), 7.76-7.90 (4H, m), 8.09-8.17 (3H, m), 8.52 (1H, d, J=0.8), 10.68 (1H, s)

MS m/z (rel intensity) 645 (M⁺ 51), 527 (100), 511 (11), 374 (7)

HRMS Calcd for C₄₂H₃₁NO₆: M 645.2151

Found: m/z 645.861

m.p. 300 °C以上

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-2, 4, 6-トリメチル
ベンジルフルオレセイン (3-11) の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (63.8mg, 0.12mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (0.4ml) に、 α^2 -クロロイソデュレン (20.4mg, 0.12mmol) を加え、室温で6時間反応した。逆相カラムクロマトグラフィー (コスモシール75 C₁₈-PREP、蒸留水：メタノール=30：70) により精製し、(3-11) を48.8mg (収率63%) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 2.48 (9H, d, J=0.3), 3.16 (2H, s), 6.52-6.68 (6H, m), 7.28 (1H, d, J=12.5), 7.42-7.58 (3H, m), 7.78-7.90 (4H, m), 8.09-8.17 (3H, m), 8.53 (1H, d, J=0.5), 10.1 (1H, s), 10.78 (1H, s)

m.p. 300 °C以上

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-3, 5-ジメトキシベン
ジルフルオレセイン (3-12) の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (59mg, 0.11mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (0.5ml) に、塩化3, 5-ジメトキシベンジル (21 μ l, 0.14mmol) を加え、室温で2時間反応した。逆相カラムクロマトグラフィー (コスモシール75 C₁₈-PREP、蒸留水：メタノール=30：70) により精製し、(3-12) を44.7mg (収率60%) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 3.73 (6H, s), 5.62 (2H, s), 6.52-6.69 (6H, m), 7.13-7.29 (4H, m), 7.47-7.53 (3H, m), 7.76-7.90 (4H, m), 8.09-8.17 (3H, m), 8.52 (1H, d, J=0.8), 10.68 (1H, s)

m.p. 300 °C以上

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-(1-ナフチルメチル)
フルオレセイン (3-13) の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (500mg, 0.95mmol) のジメチ

ルホルムアミド溶液 (3ml) に、無水炭酸カリウム (131mg, 0.95mmol) と 1-(クロロメチル) ナフタレン (170 μ l, 1.14mmol) を加え、室温で 2 時間反応した。6 N 塩酸 (10ml) に反応溶液を加え、室温で、10 分撹拌した。得られた結晶を吸引ろ過で取り出し、減圧乾燥し、(3-13) を 687 mg (収率 99%) で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 5.26 (2H, s), 6.53-6.69 (6H, m), 7.29 (1H, d, $J=12.5$), 7.43-7.68 (7H, m), 7.76-8.0 (6H, m), 8.10-8.2 (4H, m), 8.52 (1H, d, $J=0.9$), 10.12 (1H, s)

MS m/z (rel intensity) 667 (M^+ 51), 527 (100), 511 (11), 374 (7)

HRMS Calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{29}\text{NO}_6$: M 667.1995

Found: m/z 667.1327

m.p. 300 $^\circ\text{C}$ 以上

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-(2-ビフェニル)フル オレセイン (3-14) の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (500mg, 0.95mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (1.5ml) に、2-ブロモビフェニル (163.4 μ l, 0.95mmol) とトリエチルアミン 4 滴を加え、室温で 12 時間反応した。逆相カラムクロマトグラフィー (コスモシール 75 C_{18} -PREP、蒸留水: メタノール = 30 : 70) により精製し、(3-14) を 490.2mg (収率 76%) で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 6.53-6.68 (6H, m), 7.27 (1H, d, $J=13.5$), 7.36-7.53 (9H, m), 7.72-7.91 (5H, m), 8.09-8.16 (3H, m), 8.53 (1H, d, $J=0.6$), 10.18 (2H, s), 10.78 (1H, s)

m.p. 300 $^\circ\text{C}$ 以上

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-(3-インドリルエチル) フルオレセイン (3-15) の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (200mg, 0.38mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (1.4ml) に、無水炭酸カリウム (52.4mg, 0.38mmol) と 3-(2-

ブロモエチル) インドール (102mg, 0.46mmol) を加え、室温で 4 時間反応した。6 N 塩酸 (10ml) に反応溶液を加え、室温で、10 分撹拌した。得られた結晶を吸引ろ過で取り出し、減圧乾燥し、(3-15) を 228.1mg (収率 90%) で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 3.34 (2H, t, $J=14.5$), 3.38 (2H, t, $J=14.5$), 6.53-6.68 (6H, m), 7.00-7.23 (3H, m), 7.47-7.58 (4H, m), 7.76-7.93 (3H, m), 8.09-8.16 (2H, m), 8.53 (1H, d, $J=0.5$), 10.68 (1H, s)

MS m/z (rel intensity) 671 (M^+ 11), 527 (100), 374 (11)

HRMS Calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6$: M 671.2026

Found: m/z 670.9864

m.p. 300 °C以上

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-(6-ウラシルメチル)

フルオレセイン (3-16) の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (200mg, 0.38mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (1.4ml) に、無水炭酸カリウム (52.4mg, 0.38mmol) と 6-クロロメチルウラシル (75.5mg, 0.47mmol) を加え、室温で 3 時間反応した。6 N 塩酸 (10ml) に反応溶液を加え、室温で、10 分撹拌した。得られた結晶を吸引ろ過で取り出し、減圧乾燥し、(3-16) を 223.9mg (収率 90%) で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 4.47 (2H, s), 5.35 (2H, s), 5.66 (1H, s), 6.53-6.68 (6H, m), 7.24 (1H, d, $J=13.0$), 7.43-7.53 (4H, m), 7.59-7.76 (4H, m), 8.09-8.16 (2H, m), 8.56 (1H, d, $J=0.6$), 10.75 (1H, s), 11.10 (1H, s)

MS m/z (rel intensity) 651 (M^+ 25), 527 (100), 374 (11)

HRMS Calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_8$: M 651.1641

Found: m/z 650.0944

m.p. 300 °C以上

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-置換-フルオレセインモノリン酸エステルの合成

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-置換-フルオレセイン (0.18mmol) のピリジン溶液 (200 μ l) に、オキシ塩化リン (0.37mmol) を 0 $^{\circ}$ C で加え、そのまま 1 時間攪拌した。反応液を冷水 (2ml) に注ぎ反応を終了させ、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (コスモシール 75 C₁₈-PREP、蒸留水：メタノール=30：70) により精製して、5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-O-置換-フルオレセインモノリン酸体を収率 43～56% で得た。

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-(1-ナフチルメチル)フルオレセイン(3-13)モノリン酸エステル体を用いたスポットテスト法による λ DNAの検出

滅菌したエッペンドルフチューブに、ディゴキシゲニン-[11]-dUTP (1mmol, 1 μ l), dATP (0.5mM, 1 μ l), dGTP (0.5mM, 1 μ l), dCTP (0.5mM, 1 μ l), 滅菌蒸留水 (1.1 μ l)、95 $^{\circ}$ C で 10 分間熱変性し氷水中で 5 分間冷却し 1 本鎖にした λ DNA (500 ng/ μ l, 2 μ l) を加え、1 分間ボルテックスを用いて強く攪拌した。反応液に Klenow 酵素を 1 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。次いで、0.2M の EDTA を 2 μ l 加え、反応を停止した。次いで、反応液に 60 μ l のエタノール／酢酸ナトリウム混合液を加え、-80 $^{\circ}$ C で 15 分間放置した。その溶液を、15000 回転で 4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。上清をピペットで吸い取り、70% エタノールで洗浄した後乾燥させた。このディゴキシゲニン標識した λ DNA を 10 ng/ μ l の濃度で、ニシン精子 DNA を加えた TE 緩衝液 (pH 8.0) に溶かした。得られたディゴキシゲニン標識した λ DNA をニシン精子 DNA を加えた TE 緩衝液 (pH 8.0) で希釈して、0 fg/ μ l, 5 fg/ μ l, 10 fg/ μ l, 20 fg/ μ l, 40 fg/ μ l, 80 fg/ μ l, 160 fg/ μ l, 320 fg/ μ l, 1 pg/ μ l の濃度のディゴキシゲニン標識した λ DNA を調整した。これらのディゴキシゲニン標識した λ DNA 溶液を 1 μ l ずつナイロンメンブレンにスポットした。ナイロンメンブレン上のディゴキシゲニン標識した λ DNA を固定化するために、ナイロンメンブレンを真空オーブン中で、80 $^{\circ}$ C で 30 分間加熱した。ナイロンメンブレンを 0.1% カゼイン溶液に 30 分間浸した。ナイロンメンブレンに、アルカリホス

ファクターゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体を含む緩衝液をのせ、パラフィルムを被せ、30分間静置した。次いで、ナイロンメンブレンを0.15 M 塩化ナトリウムを含んだトリス緩衝液 (pH 7.5) で、10分間づつ3回洗浄して、未結合の抗ディゴキシゲニン抗体を除去した。10 mM塩化ナトリウムと50mM塩化マグネシウムを含んだ100 mMのトリス緩衝液 (pH 8.0) で調整した100 μ gの 5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-(1-ナフチルメチル)フルオレセイン (13) モノリン酸エステル体溶液を、ナイロンメンブレンの全表面が覆うように滴下し、パラフィルムを被せ、37°Cで1時間暗室で放置した。パラフィルムを取り除き、ナイロンメンブレンに、0.5 N水酸化ナトリウム溶液を滴下し反応を終了した。ナイロンメンブレンに紫外光 (302 nm, 2mW/cm²) を照射して、アルカリホスファターゼによる加水分解体を励起させ、発する蛍光をCCDカメラ (ソニー、XC-57) に取り込み、ビデオプリンター (精工舎、VP-1500) でプリントアウトした。目視で見えるスポットを検出可能とすると、5 fgの λ DNAを検出した。

5-(4-ビフェニルカルボキサミド)-3'-(1-ナフチルメチル)フルオレセイン (3-13) モノリン酸エステル体を用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法によるHind IIIで消化させた λ DNAの検出

(1) ディゴキシゲニン標識したHind IIIで消化させた λ プローブDNAの作製

滅菌したエッペンドルフチューブに、ディゴキシゲニン-[11]-dUTP (1mmol, 1 μ l), dATP (0.5mM, 1 μ l), dGTP (0.5 mM, 1 μ l), dCTP (0.5mM, 1 μ l), 滅菌蒸留水 (11 μ l)、95°Cで10分間熱変性し氷水中で5分間冷却し1本鎖にしたHind IIIで消化させた λ DNA (500 ng/ μ l, 2 μ l) を加え、1分間ボルテックスを用いて強く攪拌した。反応液にKlenow酵素を1 μ l加え、37°Cで1時間反応させた。次いで、0.2MのEDTAを2 μ l加え、反応を停止した。次いで、反応液に60 μ lのエタノール/酢酸ナトリウム混合液を加え、-80°Cで15分間放置した。その溶液を、15000回転で4°Cで15分間遠心した。上清をピペットで吸い取り、70%エタノールで洗浄した後乾燥させた。このディゴキシゲニン標識したHind IIIで消化させた λ プローブDNAを10ng/ μ lの濃度で、ニシン精子DNAを加えたTE緩衝液 (pH 8.0) に溶かした。

(2) ディゴキシゲニン標識した*Hind* IIIで消化させたλプローブDNAの変性

このディゴキシゲニン標識した*Hind* IIIで消化させたλプローブDNAを 95°Cで 10 分間熱変性し、即座に氷冷し、5 分間放置した。次いで、ハイブリダイゼーション溶液を加えた。

(3) サザンブロットハイブリダイゼーション

5 cm サイドの端に 0.5 × 0.1 × 0.5 cm サイズの穴を 3 カ所開けた 5 × 6 × 0.6 cm のサイズの 0.8% アガロースゲルを作製した。そのアガロースゲルをトリス-アセテート緩衝液が入った電気泳導槽に置き、アガロースゲルの 3 カ所の穴に、*Hind* III で消化させた λDNA を 20 μl、4 μl、0.8 μl ずつそれぞれの穴に注入した。電気泳導を行い、をサイズ分離した。次いで、そのアガロースゲルを 0.25N 塩酸水溶液に浸し 10 分間ゆっくり振とうし（核酸のプリン環を開裂させ、短い断片にし、ナイロンメンブレンに転写しやすくするための操作）、蒸留水で、アガロースゲルを洗った。次いで、0.5N 水酸化ナトリウム/1.5M 塩化ナトリウム溶液にアガロースゲルを浸し、15 分間ゆっくり振とうした（ターゲットの *Hind* III で消化させた λDNA を 1 本鎖にする操作）。次いで、アガロースゲルにナイロンメンブレンを密着させ、吸引させながらアガロースゲル上の *Hind* III で消化させた λDNA をナイロンメンブレンに転写した。そのナイロンメンブレンに紫外光を照射し、DNA を固定した。次いで、5% 脱脂粉乳と 0.1% ラウロイル N-メチルグリシン ナトリウム塩と 0.02% ドデシル硫酸ナトリウムと 50% ホルムアミドを含んだ 150mM 塩化ナトリウムと 150mM クエン酸ナトリウムで調整した緩衝液 (pH 7.0) にナイロンメンブレンを浸した。次いで、(1) ~ (2) で調整したディゴキシゲニン標識した *Hind* III で消化させた λプローブDNA を加え、42°C で 16 時間反応した（プローブDNA とターゲットDNA を相補的結合させた）。次いで、室温で、0.05% ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ 150mM 塩化ナトリウムと 150mM クエン酸ナトリウムで調整した緩衝液 (pH 7.0) に、ナイロンメンブレンを浸し、5 分間振とうした。この操作を 2 回行った。次いで、55°C で同様の処理を行った。次いで、アルカリホスファターゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体の Fab' フラグメントとのカップリング反応を行った。次いで、0.05% ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ 150mM 塩化

ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液 (pH 8.5) で100 μ g/mlに調整した5'- (4-ビフェニルカルボキサミド) -3'- (1-ナフチルメチル) フルオレセイン (3-13) モノリン酸エステル体溶液をそのナイロンメンブレン上にのせ、パラフィルムで被い、室温で2時間反応した。蒸留水にナイロンメンブレンを10分間浸し振とうし、酵素反応を終了した。ナイロンメンブレンに紫外光 (302 nm, 2mW/cm²) を照射して、アルカリホスファターゼによる加水分解体を励起させ、発する蛍光をCCDカメラ (ソニー、XC-57) に取り込み、ビデオプリンター (精工舎、VP-1500) でプリントアウトした。目視で見えるスポットを検出可能とすると、0.1pgの λ DNAを検出した。

第4章 異なった塩基配列を有する2種類のDNAの2段階法による同時検出

λ DNA / *Eco*RIとCol E1DNA / *Eco*RI, pBR 322 / *Eco*RIの混合物のHNPPとBNFP法による2色検出

(1) ディゴキシゲニン標識した*Eco*RIで消化させた λ プローブDNAとビオチン標識した*Eco*RIで消化させたCol E1とpBR 322の混合プローブDNAの作製

滅菌したエッペンドルフチューブに、ディゴキシゲニン-[11]-dUTP (1mmol, 1 μ l), dATP (0.5mM, 1 μ l), dGTP (0.5mM, 1 μ l), dCTP (0.5mM, 1 μ l), 滅菌蒸留水 (11 μ l)、95°Cで10分間熱変性し氷水中で5分間冷却し1本鎖にした*Eco*RIで消化させた λ DNA (500 ng/ μ l, 2 μ l) を加え、1分間ボルテックスを用いて強く攪拌した。反応液にKlenow酵素を1 μ l加え、37°Cで1時間反応させた。次いで、0.2MのEDTAを2 μ l加え、反応を停止した。次いで、反応液に60 μ lのエタノール/酢酸ナトリウム混合液を加え、-80°Cで15分間放置した。その溶液を、15000回転で4°Cで15分間遠心した。上清をピペットで吸い取り、70%エタノールで洗浄した後乾燥させた。このディゴキシゲニン標識した*Eco*RIで消化させた λ プローブDNAを10ng/ μ lの濃度で、ニシン精子DNAを加えたTE緩衝液 (pH 8.0) に溶かした。次いで、滅菌したエッペンドルフチューブに、ビオチン-[16]-dUTP (1mmol, 1 μ l), dATP (0.5mM, 1 μ l), dGTP (0.5mM, 1 μ l), dCTP (0.5mM, 1 μ l), 滅菌蒸留水 (11 μ l)、95°Cで10分間熱

変性し氷水中で5分間冷却し1本鎖にした*Eco*RIで消化させたCol E1とpBR 322の混合DNA (500 ng/μl, 2 μl)を加え、1分間ボルテックスを用いて強く攪拌した。反応液にKlenow酵素を1 μl加え、37°Cで1時間反応させた。次いで、0.2MのEDTAを2 μl加え、反応を停止した。次いで、反応液に60 μlのエタノール/酢酸ナトリウム混合液を加え、-80°Cで15分間放置した。その溶液を、15000回転で4°Cで15分間遠心した。上清をピペットで吸い取り、70%エタノールで洗浄した後乾燥させた。このビオチン標識した*Eco*RIで消化させたCol E1とpBR 322の混合プローブDNAを10ng/μlの濃度で、ニシン精子DNAを加えたTE緩衝液 (pH 8.0) に溶かした。

(2) ディゴキシゲニン標識した*Eco*RIで消化させたλプローブDNAとビオチン標識した*Eco*RIで消化させたCol E1とpBR 322の混合プローブDNAの変性

ディゴキシゲニン標識した*Eco*RIで消化させたλプローブDNAとビオチン標識した*Eco*RIで消化させたCol E1とpBR 322の混合プローブDNAを95°Cで10分間熱変性し、即座に氷冷し、5分間放置した。次いで、ハイブリダイゼーション溶液を加えた。

(3) サザンブロットハイブリダイゼーションによる2色検出

5 cmサイドの端に0.5 × 0.1 × 0.5 cmサイズの穴を1カ所開けた5 × 6 × 0.6 cmのサイズの0.8%アガロースゲルを作製した。そのアガロースゲルをトリス-アセテート緩衝液が入った電気泳導槽に置き、アガロースゲルの1カ所の穴に、500 pgの*Eco*RIで消化させたλDNAと100 pgの*Eco*RIで消化させたCol E1とpBR 322の混合DNAを混ぜ合わせたものを穴に注入した。電気泳導を行い、サイズ分離した。次いで、そのアガロースゲルを0.25N塩酸水溶液に浸し10分間ゆっくり振とうし (核酸のプリン環を開裂させ、短い断片にし、ナイロンメンブレンに転写しやすくするための操作)、蒸留水で、アガロースゲルを洗った。次いで、0.5N水酸化ナトリウム/1.5M塩化ナトリウム溶液にアガロースゲルを浸し、15分間ゆっくり振とうした (ターゲットの*Hind* IIIで消化させたλDNAを1本鎖にする操作)。次いで、アガロースゲルにナイロンメンブレンを密着させ、吸引させながらアガロースゲル上の*Hind* IIIで消化させた

λDNAをナイロンメンブレンに転写した。そのナイロンメンブレンに紫外光を照射し、DNAを固定した。次いで、5%脱脂粉乳と0.1%ラウロイル N-メチルグリシンナトリウム塩と0.02%ドデシル硫酸ナトリウムと50%ホルムアミドを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液（pH 7.0）にナイロンメンブレンを浸した。次いで、（1）～（2）で調整したディゴキシゲニン標識した *Eco*RIで消化させたλプローブDNAとビオチン標識した *Eco*RIで消化させたCol E1とpBR 322の混合プローブDNAを加え、42°Cで16時間反応した（プローブDNAとターゲットDNAを相補的結合させた）。次いで、室温で、0.05%ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液（pH 7.0）に、ナイロンメンブレンを浸し、5分間振とうした。この操作を2回行った。次いで、55°Cで同様の処理を行った。次いで、ディゴキシゲニン標識した *Eco*RIで消化させたλプローブDNAに対してアルカリホスファターゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体のFab'フラグメントとのカップリング反応を行った。未反応のアルカリホスファターゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体のFab'フラグメントを洗浄し取り除いた後、0.05%ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液（pH 8.5）で100μg/mlに調整したN-（2-ビフェニル）-3-ヒドロキシー-2-ナフタレンカルボキサミドのリン酸エステル（HNPP）溶液をそのナイロンメンブレン上にのせ、パラフィルムで被い、室温で30分間反応した。次いで、アルカリホスファターゼを失活させるため0.05M EDTA溶液中で、85°Cで10分間加熱した。次いで、ビオチン標識した *Eco*RIで消化させたCol E1とpBR 322の混合プローブDNAに対して、アルカリホスファターゼ標識抗ビオチン抗体のFab'フラグメントとのカップリング反応を行った。未反応のアルカリホスファターゼ標識した抗ビオチン抗体のFab'フラグメントを洗浄し取り除いた後、0.05%ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液（pH 8.5）で100μg/mlに調整した5-（4-ビフェニルカルボキサミド）-3'-O-（1-ナフチル）メチルフルオレセインモノリン酸エステル（BNFP）溶液をそのナイロンメンブレン上にのせ、パラフィルムで被い、室温で30分間反応した。蒸留水にナイロンメンブレンを10分間浸し振とうし、酵素反応を終了した。ナイロンメン

ブレンに紫外光 (302 nm, 2mW/cm²) を照射して、アルカリホスファターゼによる加水分解体を励起させ、発する蛍光をCCDカメラ (ソニー、XC-57) に取り込み、ビデオプリンター (精工舎、VP-1500) でプリントアウトした。青色と黄緑色の2色の蛍光バンドを画像化した。

第5章 ペルオキシダーゼ用新規蛍光基質の合成とDNAの高感度検出および異なった塩基配列を有するDNAの同時検出

N-3, 5-ジメチルフェニル-5-チオウレイドフルオレセイン (5-2) の合成

フルオレセインイソチオシアナート (100mg, 0.26mmol) のエタノール (1ml) 溶液に 3, 5-キシリジン (32.3μl, 0.26mmol) を加え、室温で15時間反応した。溶媒を留去した後、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム：エタノール=95：5) により精製して、(5-2) を119.2mg (収率91%) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 2.25 (6H, s), 6.58-6.67 (6H, m), 6.81 (1H, s), 7.04 (2H, s), 7.17 (1H, d, J=10.5), 7.79 (1H, d, J=12.5), 8.12 (1H, d, J=1.1), 9.99 (1H, s), 10.11 (2H, s)

m.p. 300°C以上

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (5-3) の合成

P-ビフェニルカルボニルクロリド (262.4mg, 1.21mmol) のアセトニトリル (2.5ml) 溶液に 5-アミノフルオレセイン (420.5mg, 1.21mmol) を加え室温で15時間反応した。逆相カラムクロマトグラフィー (コスモシール75 C₁₈-PREP、蒸留水：メタノール=30：70) により精製して、(5-3) を620.3mg (収率98%) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 6.57-6.69 (6H, m), 7.42-7.53 (3H, m), 7.76-7.91 (4H, m), 7.27 (1H, d, J=12.5), 8.09-8.19 (3H, m), 8.53 (1H, d, J=0.9), 10.05 (1H, s), 10.75 (1H, s)

m.p. 226-227°C

3' -O- (3-インドリル) エチル-5- {N- (3,5-ジメチルフェニル) チオウレイド} フルオレセイン (5-4) の合成

N- (3,5-ジメチルフェニル) -5-チオウレイドフルオレセイン (200mg, 0.329mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (1ml) に、無水炭酸カリウム (54.1mg, 0.329mmol) と 3- (2-ブロモエチル) インドール (105.3mg, 0.47mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (0.2ml) を加え、室温で3時間攪拌した。6 N塩酸 (10ml) に反応溶液を加え、室温で、10分攪拌した。得られた結晶を吸引ろ過で取り出し、減圧乾燥し、(5-4) を 275 mg (収率 99%) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 2.42 (6H, s), 3.34 (2H, t, J=14.5), 3.83 (2H, t, J=14.5), 6.65-6.82 (6H, m), 6.94-6.99 (3H, m), 7.00-7.21 (6H, m), 7.41-7.52 (2H, m), 7.82-8.0 (2H, m), 10.7 (1H, s)

MS m/z (rel intensity) 653 (M⁺ 35), 510 (65), 389 (100)

HRMS Calcd for C₃₉H₃₁N₃O₅S : M 653.1985

Found: m/z 652.9959

m.p. 300 °C以上

5- (4-ビフェニルカルボキサミド) -3' - (1-ナフチルメチル) フルオレセイン (5-5) の合成

N-4-ビフェニル-5-アミノフルオレセイン (500mg, 0.95mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (3ml) に、無水炭酸カリウム (131mg, 0.95mmol) と 1- (クロロメチル) ナフタレン (170μl, 1.14mmol) を加え、室温で2時間反応した。6 N塩酸 (10ml) に反応溶液を加え、室温で、10分攪拌した。得られた結晶を吸引ろ過で取り出し、減圧乾燥し、(5-5) を 687 mg (収率 99%) で得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 5.26 (2H, s), 6.53-6.69 (6H, m), 7.29 (1H, d, J=12.5), 7.43-7.68 (7H, m), 7.76-8.0 (6H, m), 8.10-8.2 (4H, m), 8.52 (1H, d, J=0.9), 10.12 (1H, s)

MS m/z (rel intensity) 667 (M^+ 51), 527 (100), 511 (11), 374 (7)

HRMS Calcd for $C_{44}H_{29}NO_6$: M 667.1995

Found: m/z 667.1327

m.p. 300 °C以上

λ DNA / *Eco*RI と Col E1 DNA / *Eco*RI, pBR 322 / *Eco*RI の混合物の AMMB と HNPP

法による 2 色検出

(1) ディゴキシゲニン標識した *Eco* RI で消化させた λ プローブ DNA と ビオチン標識した *Eco* RI で消化させた Col E1 と pBR 322 の混合プローブ DNA の作製

滅菌したエッペンドルフチューブに、ディゴキシゲニン-[11]-dUTP (1mmol, 1 μ l), dATP (0.5mM, 1 μ l), dGTP (0.5 mM, 1 μ l), dCTP (0.5mM, 1 μ l), 滅菌蒸留水 (11 μ l)、95 °C で 10 分間熱変性し氷水中で 5 分間冷却し 1 本鎖にした *Eco* RI で消化させた λ DNA (500 ng/ μ l, 2 μ l) を加え、1 分間ボルテックスを用いて強く攪拌した。反応液に Klenow 酵素を 1 μ l 加え、37 °C で 1 時間反応させた。次いで、0.2M の EDTA を 2 μ l 加え、反応を停止した。次いで、反応液に 60 μ l のエタノール/酢酸ナトリウム混合液を加え、-80 °C で 15 分間放置した。その溶液を、15000 回転で 4 °C で 15 分間遠心した。上清をピペットで吸い取り、70 % エタノールで洗浄した後乾燥させた。このディゴキシゲニン標識した *Eco* RI で消化させた λ プローブ DNA を 10ng/ μ l の濃度で、ニシン精子 DNA を加えた TE 緩衝液 (pH 8.0) に溶かした。次いで、滅菌したエッペンドルフチューブに、ビオチン-[16]-dUTP (1mmol, 1 μ l), dATP (0.5mM, 1 μ l), dGTP (0.5 mM, 1 μ l), dCTP (0.5mM, 1 μ l), 滅菌蒸留水 (11 μ l)、95 °C で 10 分間熱変性し氷水中で 5 分間冷却し 1 本鎖にした *Eco* RI で消化させた Col E1 と pBR 322 の混合 DNA (500 ng/ μ l, 2 μ l) を加え、1 分間ボルテックスを用いて強く攪拌した。反応液に Klenow 酵素を 1 μ l 加え、37 °C で 1 時間反応させた。次いで、0.2M の EDTA を 2 μ l 加え、反応を停止した。次いで、反応液に 60 μ l のエタノール/酢酸ナトリウム混合液を加え、-80 °C で 15 分間放置した。その溶液を、15000 回転で 4 °C で 15 分間遠心した。上清をピペットで吸い取り、70 % エタノールで洗浄した後乾燥させた。このビオチン標識した *Eco* RI で消化させた Col E1 と pBR 322 の混合プローブ DNA

を10ng/μlの濃度で、ニシン精子DNAを加えたTE緩衝液（pH 8.0）に溶かした。

（2） ディゴキシゲニン標識した*Eco* RIで消化させたλプローブDNAとビオチン標識した*Eco* RIで消化させたCol E1とpBR 322の混合プローブDNAの変性

ディゴキシゲニン標識した*Eco* RIで消化させたλプローブDNAとビオチン標識した*Eco* RIで消化させたCol E1とpBR 322の混合プローブDNAを95℃で10分間熱変性し、即座に氷冷し、5分間放置した。次いで、ハイブリダイゼーション溶液を加えた。

（3） サザンブロットハイブリダイゼーションによる2色検出

5 cmサイドの端に0.5 × 0.1 × 0.5 cmサイズの穴を1カ所開けた5 × 6 × 0.6 cmのサイズの0.8%アガロースゲルを作製した。そのアガロースゲルをトリス-アセテート緩衝液が入った電気泳導槽に置き、アガロースゲルの1カ所の穴に、500 pgの*Eco* RIで消化させたλDNAと100 pgの*Eco* RIで消化させたCol E1とpBR 322の混合DNAを混ぜ合わせたものを穴に注入した。電気泳導を行い、サイズ分離した。次いで、そのアガロースゲルを0.25N塩酸水溶液に浸し10分間ゆっくり振とうし（核酸のプリン環を開裂させ、短い断片にし、ナイロンメンブレンに転写しやすくするための操作）、蒸留水で、アガロースゲルを洗った。次いで、0.5N水酸化ナトリウム/1.5M塩化ナトリウム溶液にアガロースゲルを浸し、15分間ゆっくり振とうした（ターゲットの*Hind* IIIで消化させたλDNAを1本鎖にする操作）。次いで、アガロースゲルにナイロンメンブレンを密着させ、吸引させながらアガロースゲル上の*Hind* IIIで消化させたλDNAをナイロンメンブレンに転写した。そのナイロンメンブレンに紫外光を照射し、DNAを固定した。次いで、5%脱脂粉乳と0.1%ラウロイル N-メチルグリシンナトリウム塩と0.02%ドデシル硫酸ナトリウムと50%ホルムアミドを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液（pH 7.0）にナイロンメンブレンを浸した。次いで、（1）～（2）で調整したディゴキシゲニン標識した*Eco* RIで消化させたλプローブDNAとビオチン標識した*Eco* RIで消化させたCol E1とpBR 322の混合プローブDNAを加え、42℃で16時間反応した（プローブDNAとター

ゲットDNAを相補的結合させた)。次いで、室温で、0.05%ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液 (pH 7.0) に、ナイロンメンブレンを浸し、5分間振とうした。この操作を2回行った。次いで、55°Cで同様の処理を行った。次いで、ディゴキシゲニン標識したEcoRIで消化させたλプローブDNAに対してペルオキシダーゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体のFab'フラグメントとのカップリング反応とビオチン標識したEcoRIで消化させたColE1とpBR 322の混合プローブDNAに対してアルカリホスファターゼ標識抗ビオチン抗体のFab'フラグメントとのカップリング反応を同時に行った。未反応のペルオキシダーゼ標識した抗ディゴキシゲニン抗体のFab'フラグメントとアルカリホスファターゼ標識抗ビオチン抗体のFab'フラグメントを洗浄し取り除いた後、0.05%ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液 (pH 8.5) で100μg/mlにそれぞれ調整したN-(4-アミノ-5-メトキシ-2-メチルフェニル) ベンズアミド (AMMB) とN-(2-ビフェニル)-3-ヒドロキシ-2-ナフタレンカルボキサミドのリン酸エステル体 (HNPP) の混合溶液をそのナイロンメンブレン上にのせ、パラフィルムで被い、室温で2時間反応した。次いで蒸留水にナイロンメンブレンを10分間浸し振とうし、酵素反応を終了した。ナイロンメンブレンに紫外光 (302 nm, 2mW/cm²) を照射して、アルカリホスファターゼによる加水分解体を励起させ、発する蛍光をCCDカメラ (ソニー、XC-57) に取り込み、ビデオプリンター (精工舎、VP-1500) でプリントアウトした。橙色と青色の2色の蛍光バンドを画像化した。

第6章 酵素標識用新規ラベリング試薬の開発

GA₄-17-ノルケトン (6-2) の合成

200mlナスフラスコに、ジベレリンA₄ (GA₄) を504 mg (1.52 mmol) 入れ、THF / H₂O (1 / 1) 混合溶液 50 ml を加え溶解した。氷浴を用いて 0°C に冷却し、触媒量の四酸化オスミウムを加え、10分間攪拌した。その後、2当量の過ヨウ素酸ナトリウムを30分かけて加え、氷浴から出し、室温まで自然昇温し、そのまま一晩攪拌した。TLC

(展開溶媒；酢酸エチル：クロロホルム：酢酸 = 20 : 12 : 1) で原料の消失を確認後、不溶解物を濾別し、エバポレーターで THF を留去した。6 N H₂SO₄ を加え、pH を 5 に調整し、酢酸エチル (50 ml × 3) で抽出した。得られた抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を留去し、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム / 酢酸エチル) により精製し、6-2 を白色固体として 314 mg 得た。(収率 61.8 %)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 1.18 (3H, s), 1.20-2.20 (13H, m), 2.57-2.68 (2H, m), 3.15 (1H, d, J=12), 3.75 (1H, s), 4.05 (1H, brs)

m.p. 125.0 -43.5 °C (lit. 122 -135 °C⁹²⁾, 120 -140 °C⁹⁴⁾)

リンカー (6-3) の合成 (アミノ基の保護)

10 ml ナスフラスコに、カルボメトキシルアミンヘミハイドロクロライドを 600 mg (3.15 mmol) 入れ、飽和炭酸水素ナトリウム / THF (2 / 1) 混合溶液 9 ml を加え溶解させ、10 分間撹拌した。その後、1.2 当量のベンジルオキシカルボニルクロライドを 3 回に分けて、30 分かけて加え、その後、1 時間撹拌した。エバポレーターで THF を留去し、0.1 N HCl を加え酸性にし、塩化メチレン (10 ml × 3) で抽出した。得られた抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を留去し、真空乾燥。粘性の高い無色透明の液体 (6-3) 808 mg を得た。(収率 95 %)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 4.48 (2H, s), 5.20 (2H, s), 7.25-7.50 (5H, m), 8.37-8.45 (1H, brs), 10.17-10.30 (1H, brs)

リンカー (6-4) の合成

Cbz 保護したカルボメトキシルアミン (6-3) 675 mg のアセトニトリル溶液 (2 ml) に、N-ヒドロキシスクシンイミドのアセトニトリル溶液 (346 mg / ml) 1 ml、DCC のアセトニトリル溶液 (413 mg / ml) 1.5 ml をそれぞれ加え、室温で一晩撹拌した。そこに、メタノール / バッファー (pH 9) 混合溶液に溶かしたグリシン 226 mg を加え、さらに 2 時間室温で撹拌した。DCC ウレアを濾別し、エバポレーターで濃縮する。析出してきた結晶を塩化メチレン (20 ml × 3) で抽出し、得られた抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を留去し、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、

クロロホルム/メタノール) により精製し、6-4 を無色透明の粘性の高い液体として 285 mg 得た。(収率 34 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 3.95 (2H, d, $J=4.8$), 4.35 (2H, s), 5.09 (2H, s), 7.00-7.21 (1H, brs), 7.25-7.35 (5H, m), 7.95-8.14 (1H, br), 8.95 (1H, s)

リンカー (6-5) の合成

Cbz 保護したカルボメトキシルアミン (6-3) 194 mg アセトニトリル溶液 (2 ml) に、HO-Sc の乾燥アセトニトリル溶液 (140 mg/ml) 0.5 ml、DCC の乾燥アセトニトリル溶液 (252 mg/ml) 0.5 ml をそれぞれ加え、室温で一晩攪拌した。そこに、メタノール/バッファー (pH 9) 混合溶液に溶かした 4-アミノ-n-ブタン酸 62 mg を加え、さらに 1 時間室温で攪拌した。DCC ウレアを濾別し、エバポレーターで濃縮する。析出してきた結晶を塩化メチレン (20ml \times 3) で抽出し、カラムクロマトグラフィーにより (シリカゲル、クロロホルム/メタノール) により精製し、6-5 を無色透明の粘性の高い液体として 168 mg 得た。(収率 95 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 1.23-1.75 (2H, m), 3.22-3.32 (2H, m), 3.34 (2H, t, $J=7.34$), 4.33 (2H, s), 5.18 (2H, s), 7.30-7.45 (5H, m), 7.76-7.98 (1H, brs), 8.18-8.27 (1H, br)

リンカー (6-6) の合成

Cbz 保護したカルボメトキシルアミン (6-3) 2.596 g のアセトニトリル溶液 (12 ml) に、HO-Sc の乾燥アセトニトリル溶液 (116 mg/ml) 8 ml、DCC の乾燥アセトニトリル溶液 (227 mg/ml) 8 ml をそれぞれ加え、室温で一晩攪拌した。そこに、メタノール/バッファー (pH 9) 混合溶液に溶かした 6-アミノカプロン酸 1.05 g を加え、さらに 1 時間室温で攪拌した。DCC ウレアを濾別し、エバポレーターで濃縮する。析出してきた結晶を塩化メチレン (100 ml \times 3) で抽出し、カラムクロマトグラフィーにより (シリカゲル、クロロホルム/メタノール) により精製し、6-6 を無色透明の粘性の高い液体として 2.425 g 得た。(収率 69 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 1.18-1.68 (6H, m), 2.30 (2H, t, $J=7.2$), 3.22 (2H, q,

J=6.0), 4.3 (2H, s), 5.15 (2H, s), 7.25-7.42 (5H, m), 7.90-8.12 (1H, brs),
8.65-8.95 (1H, br), 9.50-10.00 (1H, brs)

リンカー (6-7) の合成

リンカー (6-6) 792 g のアセトニトリル 溶液 (10 ml) に、HO-Sc の乾燥アセトニトリル溶液 (50 mg / ml) 5 ml、DCC の乾燥アセトニトリル溶液 (50 mg / ml) 9 ml をそれぞれ加え、室温で一晩攪拌した。そこに、メタノール / バッファー (pH9) 混合溶液に溶かした 4 - アミノ - n - ブタン酸 222.7 g を加え、さらに 1 時間室温で攪拌した。DCC ウレアを濾別し、エバポレーターで濃縮する。析出してきた結晶を塩化メチレン (50 ml × 3) で抽出し、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム / メタノール) により精製し、6-7 を無色透明の粘性の高い液体 として 466 g 得た。 (収率 51 %)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 0.98-2.01 (12H, m), 2.60 (2H, t, J=7.2), 3.13-3.35 (2H, m), 4.33 (2H, s), 5.19 (2H, s), 7.35-7.43 (5H, m), 7.63-7.79 (1H, brs), 8.09 (1H, s)

脱保護反応

反応容器に N - Cbz - 保護したリンカーを入れ、酢酸をリンカーの濃度が 0.3mol / l となるように加えた。そこに、リンカーに対して 1.5 当量の臭化水素酸を加え、室温で一晩攪拌した。TLC (展開溶媒 ; 酢酸エチル : クロロホルム : 酢酸 = 20 : 12 : 1) で原料の消失を確認し、エバポレーターにより溶媒を留去する。原料がまだ残っている場合は、50 °C まで加熱し、完全に反応が進行するまで攪拌した。こうして得られたリンカーの臭化水素酸塩 (6-11、6-12、6-13、6-14) をこのまま次の反応に用いた。

GA₄-17-ノルオキシム (6-15) の合成

リンカーの臭化水素酸塩 (6-11) 0.55 mmol のピリジン溶液 (300 μ l) に、GA₄-17-ノルケトン 90 mg を加え、50 °C ~ 60 °C で4時間攪拌した。反応液を0.5 % HCl aq に注ぎ、濃塩酸で pH 3.5 に調整し、酢酸エチル (15 ml \times 3 回) で抽出し、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム/メタノール) により精製し、無色透明の粘性にの高い液体が得られた。これを少量のアセトンに溶かし、湯浴で加熱しながら、ヘキサンを白色沈殿がでなくなるまで加えた。この時、不純物は、液状のまま容器に付いているので、懸濁液をピペットで吸い出し、別の容器に移す。これから溶媒を留去し、真空乾燥させることで目的物である GA₄-17-ノルオキシム (6-15) を白色結晶として 61 mg 得た。(収率 50 %)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 1.18 (3H, s), 1.20-2.20 (13H, m), 2.57-2.68 (2H, m), 3.15 (1H, d, J=12), 3.60-3.80 (4H, m), 4.05 (1H, brs), 4.50 (2H, s), 7.10 (1H, t, J=5.0)

GA₄-17-ノルオキシム (6-16) の合成

リンカーの臭化水素酸塩 (6-12) 0.42 mmol のピリジン (300 μ l) 溶液に、GA₄-17-ノルケトン 90 mg を加え、50 °C ~ 60 °C で4時間攪拌した。反応溶液を0.5 % HCl aq に注ぎ、濃塩酸で pH 3.5 に調整した。酢酸エチル (15 ml \times 3 回) で抽出し、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム/メタノール) により精製し、無色透明の粘性にの高い液体が得た。これを少量のアセトンに溶かし、湯浴で加熱しながら、ヘキサンを白色沈殿がでなくなるまで加えた。この時、不純物は、液状のまま容器に付いているので、懸濁液をピペットで吸い出し、別の容器に移した。これから溶媒を留去し、真空乾燥させることで目的物である GA₄-17-ノルオキシム (6-16) を白色結晶として 60 mg 得た。(収率 30 %)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 1.18 (3H, s), 1.20-2.20 (13H, m), 1.55 (2H, t, J=8.0), 2.32 (2H, t, J=8), 2.57-2.68 (2H, m), 3.10 (1H, d, J=12), 3.50-3.70 (1H, br), 3.25-3.40 (2H, m), 3.75 (1H, s), 4.50 (2H, s), 6.95 (1H, t, J=5.0)

GA₄-17-ノルオキシム (6-17) の合成

リンカーの臭化水素酸塩 (6-13) 0.42 mmol のピリジン (300 μ l) 溶液に、GA₄-17-ノルケトン 66 mg を加え、50 °C ~ 60 °C で4 時間攪拌した。反応溶液を0.5 % HCl aq に注ぎ、濃塩酸で pH 3.5 に調整した。酢酸エチル (15ml \times 3回) で抽出しカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム/メタノール) により精製し、無色透明の粘性にの高い液体が得た。これを少量のアセトンに溶かし、湯浴で加熱しながら、ヘキサンを白色沈殿がでなくなるまで加えた。この時、不純物は、液状のまま容器に付いているので、懸濁液をピペットで吸い出し、別の容器に移した。これから溶媒を留去し、真空乾燥させることで目的物である GA₄-17-ノルオキシム (6-17) を白色結晶として 84 mg 得た。(収率 80 %)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 1.18 (3H, s), 1.30-1.70 (6H, m), 1.20-2.20 (13H, m), 2.32 (2H, t, J=6), 2.57-2.68 (2H, m), 3.10 (1H, d, J=12), 3.30 (2H, q, J=6), 3.75 (1H, s), 3.85-4.20 (1H, brs), 4.50 (2H, s), 6.30 (1H, t, J=5.0)

GA₄-17-ノルオキシム (6-18) の合成

リンカーの臭化水素酸塩 (6-14) 1.02 mmol のピリジン (500 μ l) 溶液に、GA₄-17-ノルケトン 100 mg を加え、50 °C ~ 60 °C で4 時間攪拌した。反応溶液を0.5 % HCl aq に注ぎ、濃塩酸で pH 3.5 に調整した。酢酸エチル (15 ml \times 3回) で抽出しカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム/メタノール) により精製し、無色透明の粘性にの高い液体が得た。これを少量のアセトンに溶かし、湯浴で加熱しながら、ヘキサンを白色沈殿がでなくなるまで加えた。この時、不純物は、液状のまま容器に付いているので、懸濁液をピペットで吸い出し、別の容器に移した。これから溶媒を留去し、真空乾燥させることで目的物である GA₄-17-ノルオキシム (6-18) を白色結晶として 345 mg 得た。(収率 74 %)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 1.18 (3H, s), 1.25-2.40 (13H, m), 1.5-1.70 (6H, m), 2.59-2.75 (2H, m), 3.15 (1H, m), 3.35~3.41 (4H, m, -NH-CH₂-, 15-H) δ 3.75 (2H, s, 13-H, -OH) δ 4.48 (2H, s, -O-CH₂-CO-) δ 6.47 ~ 6.58 (1H, br, -NH-CH₂-, 15-H)

Hg - dUTP (水銀化 - デオキシウリジン - 5' - 三リン酸) の合成

0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 6) 1ml に溶解した dUTP 53.5 mg (0.109 mmol) に、0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 6) 1ml に溶解した酢酸水銀 172.7 mg を加え、40 °C で 5 時間攪拌後、氷冷しながら塩化リチウム 1.5 mg を加えた。酢酸エチル (2 ml × 6回) で洗浄後、水層を 100 μ l まで溶媒を留去し、冷エタノール 300 μ l を加え、-20 °C で 1 時間放置する。15,000 rpm で 15 分間遠心後の沈殿を、エタノール 1 ml で洗浄し、さらに 15,000rpm で 15 分間遠心し、沈殿を乾燥させ、白色結晶 55 mg を得た。(収率 73 %) この白色結晶を 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 5) 2.5 ml に溶解し、Hg - dUTP 溶液とした。

dUTP のアリルアミン体の合成

Hg-dUTP 溶液 2.5ml に、0.1M ホウ酸緩衝液 (pH 5) を 1.5 ml 加え、20 mM 溶液とした後、2 M アリルアミン / 3.5 M 酢酸 0.48 ml (0.96 mmol)、Potassium tetrachloropalladate (II) 水溶液 26 mg / 0.6 ml を加え、室温で 21 時間攪拌した。15,000 rpm で 15 分間遠心後、上澄みに 0.1 M トリエチルアミン-酢酸緩衝液 (pH 8) 15 ml を加えた。これを 0.1 M トリエチルアミン-酢酸緩衝液 (pH 8) で調整した DEAE - セファセル (2.5 × 15cm) を通し、0.1 M トリエチルアミン-酢酸緩衝液 (pH 8) 5 ml で洗浄後、トリエチルアミン酢酸緩衝液 (pH 8) の濃度 0.1 M ~ 0.6 M の直線濃度勾配で溶出し、溶出液を 6ml / チューブで分取した。フラクション No. 77 ~ 111 を回収し、エバポレーターで濃縮及び、トリエチルアミン、酢酸を留去した。エタノール 50 ml とヘキサン 100 ml を加え、15,000 rpm で 15 分間遠心後、沈殿を水 100 μ l に溶解する。冷エタノール 400 μ l を加え、-80 °C で 1 時間放置し、15,000 rpm で 15 分間遠心後、結晶に 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) 0.5 ml を加え溶解し、dUTP のアリルアミン体粗精製溶液とする。この dUTP のアリルアミン体粗精製溶液を、TSK gel DEAE - 2 SW (東ソー、4.6 × 250 mm) を接続した HPLC で分取することで精製を行った。

GA₄ 標識 dUTP の合成

GA₄-17-ノルオキシム 5 mg をジメチルスルホキシド (DMSO) 25 μ l に溶解し、HO-Sc (5 mg / 25 μ l) 及び、DCC (6.5 mg / 25 μ l) と混合し、室温で 4 時間攪拌した。

遠心分離した上澄みに、DMSO 1.4 ml を加え、GA₄-17-ノルオキシム-NHS 溶液とし、その 100 μ l を 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 0.1 ml、DMSO 0.4 ml と共に、dUTP のアリルアミン体の HPLC 画分のピーク 2 0.2 ml に加えた。室温で 20 時間攪拌後、15,000 rpm で 15 分間遠心し、その上澄みを、TSK gel DEAE-2SW (東ソー、4.6 \times 250 mm) を接続した HPLC で GA₄ 標識 dUTP を分取した。

ジベレリン A4-[15]-dUTP と HNPP を用いた サザンブロット ハイブリダイゼーション法による *Hind* III で消化させた λ DNA の検出

(1) ジベレリン A4 標識した *Hind* III で消化させた λ プローブ DNA の作製

滅菌したエッペンドルフチューブに、ジベレリン A4-[15]-dUTP (1mmol, 1 μ l), dATP (0.5mM, 1 μ l) dGTP (0.5 mM, 1 μ l), dCTP (0.5mM, 1 μ l), 滅菌蒸留水 (1 1 μ l)、95 $^{\circ}$ C で 10 分間熱変性し氷水中で 5 分間冷却し 1 本鎖にした *Hind* III で消化させた λ DNA (500 ng/ μ l, 2 μ l) を加え、1 分間ボルテックスを用いて強く攪拌した。反応液に Klenow 酵素を 1 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。次いで、0.2M の EDTA を 2 μ l 加え、反応を停止した。次いで、反応液に 60 μ l のエタノール/酢酸ナトリウム混合液を加え、-80 $^{\circ}$ C で 15 分間放置した。その溶液を、15000 回転で 4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。上清をピペットで吸い取り、70% エタノールで洗浄した後乾燥させた。このジベレリン A4 標識した *Hind* III で消化させた λ プローブ DNA を 10ng/ μ l の濃度で、ニシン精子 DNA を加えた TE 緩衝液 (pH 8.0) に溶かした。

(2) ジベレリン A4 標識した *Hind* III で消化させた λ プローブ DNA の変性

このジベレリン A4 標識した *Hind* III で消化させた λ プローブ DNA を 95 $^{\circ}$ C で 10 分間熱変性し、即座に氷冷し、5 分間放置した。次いで、ハイブリダイブリダイゼーション溶液を加えた。

(3) サザンブロット ハイブリダイゼーション

5 cm サイドの端に 0.5 \times 0.1 \times 0.5 cm サイズの穴を 3 カ所開けた 5 \times 6 \times 0.6 cm のサイズの 0.8% アガロースゲルを作製した。そのアガロースゲルを トリス-アセテート

緩衝液が入った電気泳導槽に置き、アガロースゲルの3カ所の穴に、*Hind* IIIで消化させた λ DNAを20 μ l、4 μ l、0.8 μ lずつそれぞれの穴に注入した。電気泳導を行い、をサイズ分離した。次いで、そのアガロースゲルを0.25N塩酸水溶液に浸し10分間ゆっくり振とうし（核酸のプリン環を開裂させ、短い断片にし、ナイロンメンブレンに転写しやすくするための操作）、蒸留水で、アガロースゲルを洗った。次いで、0.5N水酸化ナトリウム/1.5M塩化ナトリウム溶液にアガロースゲルを浸し、15分間ゆっくり振とうした（ターゲットの*Hind* IIIで消化させた λ DNAを1本鎖にする操作）。次いで、アガロースゲルにナイロンメンブレンを密着させ、吸引させながらアガロースゲル上の*Hind* IIIで消化させた λ DNAをナイロンメンブレンに転写した。そのナイロンメンブレンに紫外光を照射し、DNAを固定した。次いで、5%脱脂粉乳と0.1%ラウロイル N-メチルグリシン ナトリウム塩と0.02%ドデシル硫酸ナトリウムと50%ホルムアミドを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液（pH 7.0）にナイロンメンブレンを浸した。次いで、（1）～（2）で調整したジベレリンA4標識した*Hind* IIIで消化させた λ プローブDNAを加え、42°Cで16時間反応した（プローブDNAとターゲットDNAを相補的結合させた）。次いで、室温で、0.05%ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液（pH 7.0）に、ナイロンメンブレンを浸し、5分間振とうした。この操作を2回行った。次いで、55°Cで同様の処理を行った。次いで、アルカリホスファターゼ標識した抗ジベレリンA4抗体のFab'フラグメントとのカップリング反応を行った。次いで、0.05%ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液（pH 8.5）で100 μ g/mlに調整したHNPP溶液をそのナイロンメンブレン上にのせ、パラフィルムで被い、室温で2時間反応した。蒸留水にナイロンメンブレンを10分間浸し振とうし、酵素反応を終了した。ナイロンメンブレンに紫外光（302 nm, 2mW/cm²）を照射して、アルカリホスファターゼによる加水分解体を励起させ、発する蛍光をCCDカメラ（ソニー、XC-57）に取り込み、ビデオプリンター（精工舎、VP-1500）でプリントアウトした。目視で見えるスポットを検出可能とすると、0.1pgの λ DNAを検出した。

GA₄-マレイミド体 (6-19) の合成

GA₄-17-ノル-16-オキシム (6-17) 20mg (0.0384 mmol) のアセトニトリル (100 μ l) 溶液に、HO-Sc の乾燥アセトニトリル溶液 (44 mg/ml) 100 μ l、DCC の乾燥アセトニトリル溶液 (40 mg/ml) 200 μ l をそれぞれ加え、室温で一晩攪拌した。そこに、メタノール/バッファー (pH 9) 混合溶液に溶かした MPBH 12 mg (0.0384 mmol) を加え、さらに 2.5 時間室温で攪拌した。DCC ウレアを濾別し、エバポレーターで濃縮する。析出してきた結晶を酢酸エチル (1 ml \times 3) で抽出し、得られた抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を留去し、アセトンで洗浄し、不純物を洗い流し、真空乾燥し、GA₄-マレイミド体 (6-19) を白色沈殿として 17 mg (収率 57%) を得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 1.19 (3H, s), 1.3-1.7 (6H, m), 1.2-2.2 (13H, m), 2.18 (2H, m), 2.21-2.38 (2H, m), 3.15-3.35 (2H, m), 3.8 (1H, s), 4.1-4.2 (2H, m), 4.5-4.68 (2H, m), 4.85-4.92 (1H, m), 6.88 (2H, s), 7.19-7.38 (4H, m), 8.70-8.74 (1H, br)

GA₄-17-ノル-16-アルコキシム (6-20) の合成

GA₄-17-ノルケトン (6-2) 33 mg のピリジン溶液 (100 μ l) に、アミノキシ酢酸 1/2 塩酸塩のピリジン溶液 (17 mg/300 μ l) を加えた。50 °C ~ 60 °C で 2 時間攪拌した。反応液を 0.5 % HCl aq に注ぎ、濃塩酸で pH 3.5 に調整し、酢酸エチル (15ml \times 3 回) で抽出し、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム/メタノール) により精製すると、無色透明の粘性にの高い液体が得られた。この液体を少量のアセトンに溶かし、湯浴で加熱しながら、ヘキサンを白色沈殿がでなくなるまで加えた。この時、不純物は、液状のまま容器に付いているので、懸濁液をピペットで吸い出し、別の容器に移した。これから溶媒を留去し、真空乾燥させることで目的物である GA₄-17-ノル-16-アルコキシム (6-20) を白色結晶として 39 mg 得た。(収率 96%)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 1.18 (3H, s), 1.20-2.30 (13H, m), 2.50-2.70 (2H, m), 3.15 (1H, d, J=12), 3.70-3.90 (2H, m), 4.50 (2H, s)

GA₄ - マレイミド体 (6-21) の合成

GA₄-17-ノル-16-アルコキシム (6-20) 84mg (0.206 mmol) のアセトニトリル (5ml) 溶液に、HO-Sc のアセトニトリル溶液 (23 mg/100 μ l)、DCC のアセトニトリル溶液 (50 mg/200 μ l) をそれぞれ加え、室温で一晩攪拌した。次いで、テトラヒドロフランに溶かした ピペラジニルエチルマレイミド (55 mg, 0.20 mmol) 溶液に、トリエチルアミン (54 μ l, 0.4mmol) を加え、この反応溶液に、GA₄-17-ノル-16-アルコキシム (24) スクシンイミジルエステル体のアセトニトリル溶液を加え、室温で一晩攪拌した。DCC ウレアを濾別し、エバポレーターで濃縮した。析出してきた結晶を塩化メチレンで溶解し、その溶液にゆっくりヘキサンを加えた。フラスコの底に粘性の茶色の液体が現れた。上清を傾斜法により除き、真空乾燥するとGA₄ - マレイミド体 (6-21) を茶色の結晶として55mg (収率80%) 得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 1.23 (3H, s), 1.50-2.20 (13H, m), 2.45-2.85 (14H, m), 3.40-3.80 (2H, brs), 4.66 (2H, s), 6.69 (2H, s)

Fast Tag kitとジベレリンA4-マレイミドとHNPPを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法によるHind IIIで消化させた λ DNAの検出

(1) ジスルフィド体標識したHind IIIで消化させた λ プローブDNAの作製

Hind IIIで消化させた λ DNA(505ng/ μ l)の緩衝液から8 μ l、蒸留水12 μ l、Fast Tag 20 μ lをエッペンドルフチューブ内で混ぜ合わせ、95°Cで10分間反応させ、すぐに氷水で急冷した。反応溶液に、蒸留水40 μ lと0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.5) を加え、さらに、2-ブタノール (160 μ l) を加え、強く攪拌した。遠心した後、上層の2-ブタノールを捨てて、さらに同じ操作を繰り返した。反応液を、65°Cで10分間反応させ、反応液を新しいエッペンドルフチューブに移し、蒸留水 (128 μ l) を加え、ジスルフィド標識したHind IIIで消化させた λ DNAを8ng/320 μ lの濃度で得た。同じ操作を2回行い2本作製した。

(2) ジベレリンA4標識した*Hind* IIIで消化させたλプローブDNAの作製

(1) で合成した2本のジスルフィド体標識した*Hind* IIIで消化させたλプローブDNA (1ng/40μl) にそれぞれ還元緩衝液 (5μl) を加え、さらに、還元剤 (5μl) を加え、室温で10分間反応した。1本目の反応溶液 (50μl) に、ジベレリンA4ーマレイミド体 (23) の5mMジメチルスルホキシド溶液 (10μl) と蒸留水 (30ml) と反応緩衝液 (10ml) を加え、65°Cで10分間反応させた。2本目の反応溶液 (50μl) に、ジベレリンA4ーマレイミド体 (25) の5mMジメチルスルホキシド溶液 (10μl) と蒸留水 (30ml) と反応緩衝液 (10ml) を加え、65°Cで10分間反応させた。それぞれの反応溶液 (100μl) に、10M酢酸アンモニウム (50μl) 、1M塩化マグネシウム、20mg/mlグリコーゲン (1μl) 、100%エタノール (625μl) を加え、-78°Cで15分間反応させた。次いで、12000回転で20分間遠心した。エッペンドルフチューブの底にDNAが沈殿し、上清の溶液を捨てた。80%エタノールを加え、攪拌後、12000回転で、10分間遠心し、エタノールを捨てた後、3分間真空乾燥した。TE緩衝液 (100μl) を加え、10分間攪拌すると0.5mMジベレリンA4標識した*Hind* IIIで消化させたλプローブDNAを得た。

(3) ジベレリンA4標識した*Hind* IIIで消化させたλプローブDNAの変性

このジベレリンA4標識した*Hind* IIIで消化させたλプローブDNAを95°Cで10分間熱変性し、即座に氷冷し、5分間放置した。次いで、ハイブリダイゼーション溶液を加えた。

(4) サザンブロットハイブリダイゼーション

5cmサイドの端に0.5×0.1×0.5cmサイズの穴を3カ所開けた5×6×0.6cmのサイズの0.8%アガロースゲルを作製した。そのアガロースゲルをトリスーアセテート緩衝液が入った電気泳動槽に置き、アガロースゲルの3カ所の穴に、*Hind* IIIで消化させたλDNAを20μl、4μl、0.8μlずつそれぞれの穴に注入した。電気泳動を行い、をサイズ分離した。次いで、そのアガロースゲルを0.25N塩酸水溶液に浸し10分間ゆっくり振とうし (核酸のプリン環を開裂させ、短い断片にし、ナイロンメンブレンに転

写しやすくするための操作)、蒸留水で、アガロースゲルを洗った。次いで、0.5N水酸化ナトリウム/1.5M塩化ナトリウム溶液にアガロースゲルを浸し、15分間ゆっくり振とうした(ターゲットのHind IIIで消化させたλDNAを1本鎖にする操作)。次いで、アガロースゲルにナイロンメンブレンを密着させ、吸引させながらアガロースゲル上のHind IIIで消化させたλDNAをナイロンメンブレンに転写した。そのナイロンメンブレンに紫外光を照射し、DNAを固定した。次いで、5%脱脂粉乳と0.1%ラウロイル N-メチルグリシン ナトリウム塩と0.02%ドデシル硫酸ナトリウムと50%ホルムアミドを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液(pH 7.0)にナイロンメンブレンを浸した。次いで、(1)~(2)で調整したジベレリンA4標識したHind IIIで消化させたλプローブDNAを加え、42°Cで16時間反応した(プローブDNAとターゲットDNAを相補的結合させた)。次いで、室温で、0.05%ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液(pH 7.0)に、ナイロンメンブレンを浸し、5分間振とうした。この操作を2回行った。次いで、55°Cで同様の処理を行った。次いで、アルカリホスファターゼ標識した抗ジベレリンA4抗体のFab'フラグメントとのカップリング反応を行った。次いで、0.05%ドデシル硫酸ナトリウムを含んだ150mM塩化ナトリウムと150mMクエン酸ナトリウムで調整した緩衝液(pH 8.5)で100μg/mlに調整したHNPP溶液をそのナイロンメンブレン上にのせ、パラフィルムで被い、室温で2時間反応した。蒸留水にナイロンメンブレンを10分間浸し振とうし、酵素反応を終了した。ナイロンメンブレンに紫外光(302 nm, 2mW/cm²)を照射して、アルカリホスファターゼによる加水分解体を励起させ、発する蛍光をCCDカメラ(ソニー、XC-57)に取り込み、ビデオプリンター(精工舎、VP-1500)でプリントアウトした。目視で見えるスポットを検出可能とすると、0.1pgのλDNAを検出した。

引用文献

- 1) J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. M. Maniatis, *Molecular Cloning, 2nd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- 2) a) ; S. Kobayashi, E. Tamiya, and I. Karube, the 4th TOYOTA Conference on Automation in Biotechnology, **10-12**, (1990). b) ; Su-C. Hung, J. J. Richard, A. Mathies, and A. N. Glazer, *Anal. Biochem.*, **238**, 165 (1996).
- 3) Jr. L. J. Arnold, P. W. Hammond, W. A. Wiese, and N. C. Nelson, *Clin. Chem.*, **35**, 1588 (1989).
- 4) J. A. Matthews, and L. J. Kricka, *Anal. Biochem.*, **169**, 1 (1988).
- 5) R. H. Singer, and D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7331 (1982).
- 6) P. Lichter, C. T. Chang, K. Call, G. Hermanson, G. A. Evans, D. Housman, D. Ward, *Science*, **247**, 64 (1990).
- 7) B. J. Trask, *TIG*, **7**, 149 (1991).
- 8) E. Viegas-Pequignot, B. Dutrillaux, H. Magdelenat, M. Coppey-Moisand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 582 (1989).
- 9) 堀 浩、鍵山直人、藤田 聡、生化学、66、1340 (1994)
- 10) a) ; N. Kagiya, K. Yoshida, T. Hamabata, N. Juni, S. Fujita, Y. Kondoh, M. C. Yoshida, and S. H. Hori, *Acta Histochem. Cytochem.*, **26**, 441 (1993). b) ; Y. Kondoh, T. Ono, N. Kagiya, S. Fujita, M. Momiyama, S. H. Hori, and M. C. Yoshida, *Cytogenet. Cell Genet.*, **71**, 96 (1995). c) ; N. Kagiya, S. Fujita, M. Momiyama, Y. Kondoh, M. Nishiyauchi, and S. H. Hori, *Acta Histochem. Cytochem.*, **28**, 581 (1995).
- 11) N. Yamaguchi, S. Inaoka, K. Tani, T. Kenzaki, and M. Nasu, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 275 (1996).
- 12) 黒川 顕、谷佳津治、那須正夫、日本細菌学雑誌、52、513 (1997)
- 13) DNA CHEMIPROBE, Applications Manual, Organics Ltd., (1987).
- 14) I. Sugawara, K. Uchino, T. Koji, J. Sukegawa, S. Mori, and P. K. Nakane, *Acta Histochem. Cytochem.*, **22**, 549 (1989).

- 15) a) ; R. Seibl, H. J. Höltke, R. Rüger, A. Meindl, H. G. Zachau, R. Raßhofer, M. Roggendorf, H. Wolf, N. Arnold, J. Miennberg, and C. Kessler, *Biol. Chem. Hoppr-Seyler*, **371**, 939 (1990). b) ; K. Mühlegger, E. Huber, Herbert von der Eltz, R. Rüger and C. Kessler, *Biol. Chem. Hoppr-Seyler*, **371**, 953 (1990).
- 16) a) ; L. Manuelidis, P. R. Langer-Safer, and D. C. Ward, *J. Cell. Biol.*, **95**, 619 (1982). b) ; D. J. Brigati, D. Myerson, J. J. Leary, B. Spalholz, S. Z. Travis, C. K. Y. Fong, G. D. Hsiung, and D. C. Ward, *Virology*, **126**, 32 (1983).
- 17) G. Gebeyehu, P. Y. Rao, P. SooChan, D. A. Simms, and L. Klevan, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 4513 (1987).
- 18) a) ; J. McGadey, *Histochemie*, **23**, 180 (1970). b) ; P. R. Langer, A. A. Waldrop, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6633 (1981). c) ; J. J. Leary, and D. J. Brigati, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4045 (1983).
- 19) U. M. Hsu, and E. Soban, *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 1079 (1982).
- 20) J. A. Garson, J. A. Berghe, and J. T. Kemshead, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 4761 (1987).
- 21) B. Bhatt, J. Burns, D. Flannery, and J. O'D. McGee, *Nucleic Acids Res.*, **16**, 3951 (1988).
- 22) J. A. Matthews, A. Batki, C. Hynds, and L. J. Kricka, *Anal. Biochem.*, **151**, 205 (1985).
- 23) M. J. O'Sullivan, J. W. Bridges, and V. Marks, *Ann. Clin. Biochem.*, **16**, 221 (1979).
- 24) E. Hawkins, and R. Cumming, *J. Histochem. Cytochem.*, **38**, 415 (1990).
- 25) A. P. Schaap, H. Akhavan, and L. J. Romano, *Clin. Chem.*, **35**, 1863 (1989).
- 26) G. An, G. Luo, R. W. Veltri, and S. M. O'Hara, *Biotechniques*, **20**, 342 (1996).
- 27) Boehringer Mannheim Gmbh, *SuperSignal ULTRA*, (1996).
- 28) J. J. Lanzillo, *Anal. Biochem.*, **194**, 45 (1991).
- 29) Boehringer Mannheim Gmbh, *The DIG System User's Guide for Filter Hybridization*, (1993).
- 30) I. Bronstein, and P. Mcgrath, *Nature*, **338**, 509 (1989).
- 31) C. Martin, L. Bresnick, R. -R. Juo, J. C. Voyta, and I. Bronstein, *Biotechniques*, **11**, 110 (1991).
- 32) P. M. Gillevet, *Nature*, **348**, 657 (1990).

- 33) R. Tizard, R. L. Cate, K. L. Ramachandran, M. Wisk, J. C. Voyta, O. J. Murphy, and I. Bronstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4514 (1990).
- 34) S. Kishimoto, T. Okushi, T. Hirashima, *Kagaku to Kogyo*, **61**, 84 (1987).
- 35) H. J. H ö ltke, R. Seibl, J. Burg, K. M ü hlegger, and C. Kessler, *Biol. Chem. Hoppr-Seyler*, **371**, 929 (1990).
- 36) E. Ishikawa, M. Iwanaga, S. Hashida, S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, and T. Ueno, *J. Immunoassay*, **4**, 209 (1983).
- 37) S. Beck, T. O'Keeffe, J. M. Coull, and H. Koster, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 5115 (1989).
- 38) I. Bronstein, J. C. Voyta, and B. Edwards, *Anal. Biochem.*, **180**, 95, (1989).
- 39) H. Sasamoto, M. Maeda, and A. Tsuji, *Anal. Chim. Acta*, **306**, 161 (1995).
- 40) H. Sasamoto, M. Maeda, A. Tsuji, and H. Manita *Anal. Chim. Acta*, **309**, 221 (1995).
- 41) E. P. Diamandis, and T. K. Christopoulos, Eds, Academic: San Diego, CA, 337 (1996).
- 42) A. M. Maxam, and W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 560 (1977).
- 43) A. M. Maxam, and W. Gilbert, *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, **65**, 499 (1980).
- 44) 木下一彦、御橋廣眞、蛍光測定—生物化学への応用、日本分光学会・測定法シリーズ3、161 (1983)
- 45) W. W. Bromer, S. K. Sheehan, A. W. Berns, and R. Arquilla, *Biochemistry*, **6**, 2378 (1967).
- 46) V. W. Burns, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 1008 (1969).
- 47) L. Cercek, and B. Cercek, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **21**, 445 (1972).
- 48) J. A. Thomas, R. N. Bushbaum, A. Zimniak, and E. Racker, *Biochemistry*, **18**, 2210 (1979).
- 49) S. C. Chen, H. Nakamura, and Z. Tamura, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 475 (1979).
- 50) R. E. Maurice, J. S. Thomas, and W. Zygmunt, *Photochem. Photobiol.*, **46**, 23 (1987).
- 51) S. S. Atik, and A. Singer, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 6759 (1979).
- 52) D. C. Dong, and M. A. Winnik, *Can. J. Chem.*, **62**, 2560 (1984).

- 53) M. E. C. D. R. Oliveria, J. A. Ferreira, S. M. Nascimento, H. D. Burrows, and M. da G. Miguel, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **91**, 3913 (1995).
- 54) J. K. Weltman, R. P. Szaro, A. Raymond, Jr., and R. M. Dowben, *J. Biol. Chem.*, **248**, 3173 (1973).
- 55) W. R. Sherman, *Anal. Chem.*, **40**, 803 (1968).
- 56) J. Bourson, M. N. Borrel, and B. Valeur, *Anal. Chim. Acta*, **257**, 189 (1992).
- 57) J. Bourson, J. Pouget, and B. Valeur, *J. Phys. Chem.*, **97**, 4552 (1993).
- 58) G. W. Gokel, D. M. Goli, C. Minganti, and L. Echegoyen, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 6786 (1983).
- 59) G. Jones, S. F. Griffin, C. -Y. Choi, and W. R. Bergmark, *J. Org. Chem.*, **49**, 2705 (1984).
- 60) M. Pitschke, A. Fels, B. Schmidt, L. Heiliger, E. Kuckert, and D. Riesner, *Colloid Polym. Sci.*, **273**, 740 (1995).
- 61) A. P. Schaap, R. S. Handley, and B. P. Giri, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 935 (1987).
- 62) P. E. Stanley, and L. J. Kricka, *Biolumi. & Chemilumi. Current Status*, JOHN WILEY & SONS, 73-82 (1990).
- 63) D. Pollard-Knight, C. A. Read, M. J. Downes, L. A. Howard, M. R. Leadbetter, S. A. Pheby, E. McNaughton, A. Syms, and M. A. W. Brady, *Anal. Biochem.*, **185**, 84 (1990).
- 64) D. Pollard-Knight, A. C. Simmonds, A. P. Schaap, H. Akhavan, and M. A. W. Brady, *Anal. Biochem.*, **185**, 353 (1990).
- 65) H. Ghatak, and S. Dutt, *J. Indian Chem. Soc.*, **6**, 465 (1929).
- 66) C. D. Hurd, and L. Schmerling, *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 112 (1937).
- 67) G. A. Krafft, W. R. Sutton, and R. T. Cummings, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 301 (1988).
- 68) J. E. T. Corrie, and D. R. Trentham, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 1993 (1995).
- 69) E. Viegas-Pequignot, B. Dutrillaux, H. Magdelenat, and M. Coppey-Moisan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 582 (1989).
- 70) P. R. Langer, A. A. Waldrop, and D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6633 (1981).

- 71) K. Muhlegger, H. G. Batz, S. Bohm, H. Eltz, H. J. Hölzke, and C. Kessler, *Nucleosides & Nucleotides*, **8**, 1161 (1989).
- 72) C. A. Ziomek, M. L. Lepire, and I. Torres, *J. Histochem. Cytochem.*, **38**, 437 (1990).
- 73) G. I. Murray, and S. W. Ewan, *J. Histochem. Cytochem.*, **40**, 1971 (1992).
- 74) E. J. M. Speel, B. Schutte, J. Wiegant, F. C. S. Ramaekers, *J. Histochem. Cytochem.*, **40**, 1299 (1992).
- 75) A. S. Ferrer, J. S. Santema, R. Hilhorst, and A. J. W. G. Visser, *Anal. Biochem.*, **187**, 129 (1990).
- 76) P. D. Josephy, T. E. Eling, and R. P. Mason, *J. Biol. Chem.*, **258**, 5561 (1983).
- 77) E. Sheldon, D. E. Kellog, C. Ievenson, W. Bloch, L. Aldwin, D. Brich, R. Goodson, P. Sheridan, G. Horn, R. Watson, and H. A. Erlich, *Clin. Chem.*, **33**, 1368 (1987).
- 78) G. H. G. Thrope, L. J. Kricka, S. B. Moseley, and T. P. Whitehead, *Clin. Chem.*, **31**, 1335 (1985).
- 79) G. H. G. Thrope, and L. J. Kricka, *Bioluminescence and Chemiluminescence: New Perspectives*, Wiley, Chichester, 199 (1987).
- 80) G. Ham. R. Belcher, L. J. Kricka, and T. J. N. Carter, *Anal. Lett.* **12**, 535 (1979).
- 81) M. Hodgson, and P. Jones, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **3**, 21 (1989).
- 82) D. Keilin, and E. F. Hartree, *Proc. Roy. Soc.*, **B125**, 171 (1938).
- 83) E. Stotz, A. E. Jr. Stowell, and T. R. Hogness, *J. Biol. Chem.*, **124**, 733 (1938).
- 84) W. Straus, *J. Biol. Chem.*, **207**, 733 (1954).
- 85) (株) 同仁化学研究所、特公平 7-108238 (1995)
- 86) P. W. Rigby, M. Diechmann, C. Rhodes, and P. Berg, *J. Mol. Biol.*, **113**, 237 (1977).
- 87) A. P. Feinberg, and B. Vogelstein, *Anal. Biochem.*, **132**, 6 (1983).
- 88) A. P. Feinberg, and B. Vogelstein, *Anal. Biochem.*, **137**, 266 (1984).
- 89) 黒沢英一、台湾博物学会報、16 213 (1926)
- 90) 藪田貞治郎、林武、日本農芸化学会誌、15、257 (1939)
- 91) L. Rivier, and A. Crozier, *The Principles and Practice of Plant Hormone Analysis*, Academic Press, London (1987).

- 92) S. Fucha, and Y. Fuchs, *Biochem. Biophys. Acta*, **192**, 528 (1969).
- 93) H. B. Michael, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 925 (1990).
- 94) D. C. Aldridge, J. R. Hanson, and T. P. C. Mulholland, *J. Chem. Soc.*, 3539 (1965).

論文リスト

1. Fluorescent Substrates for Potential Use in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Membrane-Bound Nucleic Acids.
S. Fujita, M. Momiyama, Y. Kondoh, N. Kagiya, S. H. Hori, and T. Toru
Anal. Chem., **66**, 1347 (1994).
2. Efficient Detection of Membrane-Bound Nucleic Acids Using New Fluorescein Derivative.
S. Fujita, N. Kagiya, M. Momiyama, and T. Toru
Chem. Lett., 1073 (1996).
3. Highly Sensitive Detection of Membrane-Bound DNA Using Fluorescein Derivatives.
S. Fujita, T. Toru, Y. Kitagawa, N. Kagiya, and M. Momiyama
Anal. Chim. Acta, **339**, 289 (1997).
4. A Novel Fluorogenic Substrate for the Use of Nucleic Acid Hybridization.
S. Fujita, T. Toru, Y. Kondoh, M. Momiyama, N. Kagiya, and S. H. Hori
Acta Histochem. Cytochem., **30**, 165 (1997).
5. A Novel Fluorogenic Substrate for Horseradish Peroxidase : Efficient Detection of Membrane-Bound Nucleic Acids and Simultaneous Detection of DNAs.
S. Fujita, T. Toru, Y. Kondoh, N. Kagiya, and M. Momiyama
Chem. Lett., 1075 (1997).
6. Convenient Preparation of Fluorescein Derivatives.
S. Fujita, S. Nakanishi, and T. Toru
Synth. Commun., 印刷中

参考論文リスト

1. A Novel Fluorescent Method for *In Situ* Hybridization.

N. Kagiya, K. Yoshida, T. Hamabata, N. Juni, T. Awasaki, **S. Fujita**, M. Momiyama,
Y. Kondoh, M. C. Yoshida, S. H. Hori
Acta Histochem. Cytochem., **26**, 441 (1993).

2. *In situ* ハイブリダイゼーションのための新しい蛍光基質

堀 浩、鍵山直人、藤田 聡
生化学、第66巻、1340、(1994)

3. A Novel Fluorogenic Substrate for Alkaline Phosphatase for the Use of Nucleic Acid Hybridization Histochemistry and Cytochemistry.

N. Kagiya, **S. Fujita**, M. Momiyama, Y. Kondoh, M. Nishiyauchi, and S. H. Hori
Acta Histochem. Cytochem., **28**, 581 (1995).

4. Simultaneous Visualization of Q-Bands and FISH Signals Using a Novel Fluorochrome.

Y. Kondoh, T. Ono, N. Kagiya, **S. Fujita**, M. Momiyama, S. H. Hori, and M. C. Yoshida
Cytogenet. Cell Genet., **71**, 96 (1995).

謝 辞

本研究は、名古屋工業大学大学院工学研究科博士後期課程において行ったものであり、研究を進めるにあたり終始懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました名古屋工業大学 融 健 教授に心から厚く御礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、数々のご教示を賜りました名古屋工業大学 植野禎夫 教授、ならびに川井正雄 教授に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、懇切丁寧なご教示、ご助言を賜りました名古屋工業大学 湯地昭夫 助教授に心から感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、懇切丁寧なご教示、ご助言を賜りました名古屋工業大学 助手 渡部良彦 博士に心から感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、数々のご教示を賜りました東京理科大学 堀 浩 教授に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、名古屋工業大学大学院博士後期課程で研究の機会を与え、数々のご教示を賜りました株式会社アイシン・コスモス研究所 社長 堀 孝信氏、取締役 今井宏司氏、主席研究員 山本均萬氏、副主席研究員 奥村幸司氏に深く感謝いたします。

また、共同研究者として本研究にご協力くださいました株式会社アイシン・コスモス研究所 主任研究員 Paidi Yella Reddy 博士、副主任研究員 鍵山直人博士、研究員 粕山政慶氏、研究員 近藤恭光氏、植野・融研究室 酒井敏勝氏、中西臣悟氏、伊藤雅幸氏、野村幸弘氏、ならびにいろいろ便宜をはかって頂きました森 千秋さんを始めとする植野・融研究室の皆様方に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたり終始温かい激励を贈ってくれました妻 藤田 縁さん、息子達、両親、姉に心から感謝いたします。