

論文内容要旨

蛍光クエンチングを利用した脱リン酸化酵素活性の
新規蛍光分析法の開発

主指導教員：小池 透教授

(医歯薬保健学研究科 医薬分子機能科学)

副指導教員：木下 英司准教授

(医歯薬保健学研究科 医薬分子機能科学)

副指導教員：熊谷 孝則准教授

(医歯薬保健学研究科 微生物医薬品開発学)

芝 晃生

(医歯薬保健学研究科 薬科学専攻)

論文内容要旨

論文題目

蛍光クエンチングを利用した脱リン酸化酵素活性の新規蛍光分析法の開発

学位申請者 芝 晃生

【序論】亜鉛イオンを必須とするアルカリホスファターゼ (ALP) は、リン酸基転移反応を介して生体分子の機能制御を担う基質特異性の低い金属酵素である。ALP には臓器特異的なアイソフォーム (肝臓, 腎臓, 小腸, 骨など) があるため, 肝機能障害や癌など疾患の臨床マーカーとして利用されている。ALP 活性測定法には, 比色法, 質量分析法などがある。最も汎用されている手法には, クロモフォアで標識したリン酸エステル誘導体の加水分解反応を pH 9 付近で行い, 生成物の特異的な可視吸収帯を検出する比色法がある。一方, ビスリン酸などの天然基質を使用し, 生理 pH の水溶液中で ALP 活性を測定する方法は数少ない。

私が所属する研究室では, ALP の活性中心をモデル化した低分子二核亜鉛錯体 (Phos-tag) がリン酸モノエステルイオン ($R-OPO_3^{2-}$) を捕捉し, 化学的に安定な 1:1 複合体を形成することを見出している。この Phos-tag の特性を利用して, 様々な Phos-tag 誘導体をリン酸化プロテオミクス分野で活用する研究を行っている。Phos-tag は, 生理的 pH の水溶液中でマイクロモル濃度のリン酸モノエステルイオンを捕捉することができる。これまでに, 蛍光標識した Phos-tag とペプチド基質間の蛍光共鳴エネルギー移動を利用したリアルタイム ALP 活性分析法と, 天然基質であるリボフラビンリン酸とダブルシ基を有する Phos-tag 誘導体間の蛍光クエンチング現象を利用した ALP 阻害剤プロファイリング法を報告している。本研究では, 近接した状態で蛍光強度が小さくなるテトラメチルローダミンで標識した TAMRA 誘導体 (TAMRA-Phos-tag) を用いて, と ALP による天然基質の加水分解反応の新規蛍光分析法を開発した。

【実験方法】 TAMRA の NHS エステル (5-TAMRA-NHS) と一級アミノ基を有する Phos-tag 配位子をクロロホルム中, 室温 12 時間反応させ TAMRA ラベル化 Phos-tag リガンドを合成した。塩基性アミノ化シリカゲルを用いて精製後, 水溶液中で 2~3 当量の塩化亜鉛を加えて TAMRA-Phos-tag を調製した。TAMRA/TAMRA クエンチングの効果を確認するための人工基質として, リン酸化エタノールアミン (PEA) と 5-TAMRA-NHS を pH 8 の水溶液中で反応させ TAMRA-PEA を合成した。ダイヤイオン HP-20 と C₁₈ シリカゲルを用いて TAMRA-PEA の精製を行った。

2.5 μ M TAMRA-Phos-tag と 2.5 μ M TAMRA-PEA を溶解した pH 7.4 の試料溶液 3.0 mL (10 mM HEPES-NaOH, 0.10 mM MgCl₂, 0.10 M NaCl) を蛍光光度計 (25.0 \pm 0.1 $^{\circ}$ C) にセットしスターラーで攪拌する。試料溶液にウシ小腸型 ALP (最終濃度 0.11, 0.33, 1.0, または 3.0 units/mL) を添加した後, 580 nm (λ_{ex} = 523 nm) の蛍光強度変化を 20 分間測定した。ALP 添加による試料溶液の体積変化は 0.5% 未満である。

5.0 μM TAMRA-Phos-tag, 2.5 μM ピロリン酸, 競合阻害剤 (バナジン酸; H_2VO_4^-) を溶解した pH 7.4 の試料溶液 3.0 mL にウシ小腸型 ALP (最終濃度 0.05 units/mL) または大腸菌型 ALP (最終濃度 0.02 units/mL) を添加し, 580 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 523 \text{ nm}$) の蛍光強度変化を測定した。反応液の組成や測定条件は上記と同じである。阻害剤を添加しない場合の初速度 (単位時間当たりの蛍光強度変化量) を 100% として求めた残存活性率 (%) と阻害剤濃度の対数値をプロットして阻害曲線を作成した。

【結果と考察】 TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA の 1 : 1 混合物 (2.5 μM) の蛍光強度は, それらの単独の蛍光強度の和の 32% であり, 近接した TAMRA 間で顕著なクエンチング効果を示した。ウシ小腸型 ALP を試料溶液に添加すると, 初期時間では時間依存的な蛍光強度変化を示し, 初期加水分解反応速度と ALP 添加量はほぼ比例関係であった。この結果は, TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムが ALP 活性のリアルタイム蛍光分析に適用できることを示している。

ピロリン酸を架橋配位子とした TAMRA-Phos-tag 二量体システムの消光率は 51% であった。阻害曲線より求めた 50% 阻害濃度は, ウシ小腸型は 0.18 μM , 大腸菌型は 2.0 μM と両者で約 10 倍の差があり, 阻害剤効果がアイソザイム特異的であることを示している。よって, TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムは ALP アイソザイムに対する阻害剤プロファイリング法として使用できる。

私は, 生理 pH で ALP 活性を評価できる二種類の TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムを開発した。1) TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA の 1 : 1 複合体を用いた濃度依存的なリアルタイム ALP 活性分析法と, 2) ピロリン酸を架橋配位子とした TAMRA-Phos-tag 二量体を用いた ALP アイソザイムに対する阻害剤プロファイリング法である。後者の場合, 天然基質であるピロリン酸と競合的阻害剤の ALP 親和性を生理 pH 7.4 で比較できる。

TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムの長所は, 1) TAMRA-Phos-tag は光安定性や化学的安定性が極めて高いこと, 2) TAMRA-Phos-tag の量子収率は pH 5~9 の範囲で一定であり, 高感度で安定した可視光領域の蛍光分析が可能であること, 3) 汎用型の蛍光分析装置で短時間分析が可能であることである。以上の結果から, TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムは, ビスリン酸化タイプの天然基質の ALP 反応性や新規 ALP 阻害剤のアイソザイム特異性などの研究分野で利用可能であると考えている。