

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

博士論文
2019年

広島大学大学院 医歯薬保健学研究科
博士課程後期 薬科学専攻
医薬分子機能科学教室

芝 晃生

目次

1. 要約	1
2. 序論	5
3. 実験項	8
4. 結果と考察	12
5. 結論	24
6. References	25
7. Supplementary materials	28
8. Appendixes	30

1. 要約

アルカリホスファターゼ(ALP)は様々な生物に存在し、リン酸基転移反応を介して多くの生体制御機構に関わる重要な化学修飾を担っている。また、ALPには臓器特異的な複数のアイソザイムが存在し、血清ALPが肝機能障害や癌など様々な疾患の臨床指標として利用されている。現在、ALP活性の分析手法には、クロマトグラフ分析、放射性同位体法などがあるが、特にクロモフォアで標識した人工基質を用いてpH9以上の条件で行う比色法が主流である。一方、ヌクレオチドやピロリン酸などの天然基質を使用し生理pHの水溶液中で行う分析手法はまだ数が少なく、ALPの阻害剤などの開発では生理的条件に適した分析法が求められる。

筆者が所属する研究室では、ALPの活性中心をモデル化した二核亜鉛錯体(Phos-tag; (1,3bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olato dizinc(II))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の分野で活用する研究を行っている。これまでに、蛍光標識したPhos-tag誘導体を用いて、リアルタイムALP活性分析や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、同一分子間で蛍光を消光するクエンチャーの性質を持つTAMRA(Tetramethylrhodamine)で標識したTAMRA誘導体(TAMRA-Phos-tag)を用いて、ALP活性のリアルタイム活性分析、ビスリン酸化タイプの天然基質(ピロリン酸)のALPによる加水分解反応の新規蛍光分析法を開発した(次頁図1)。

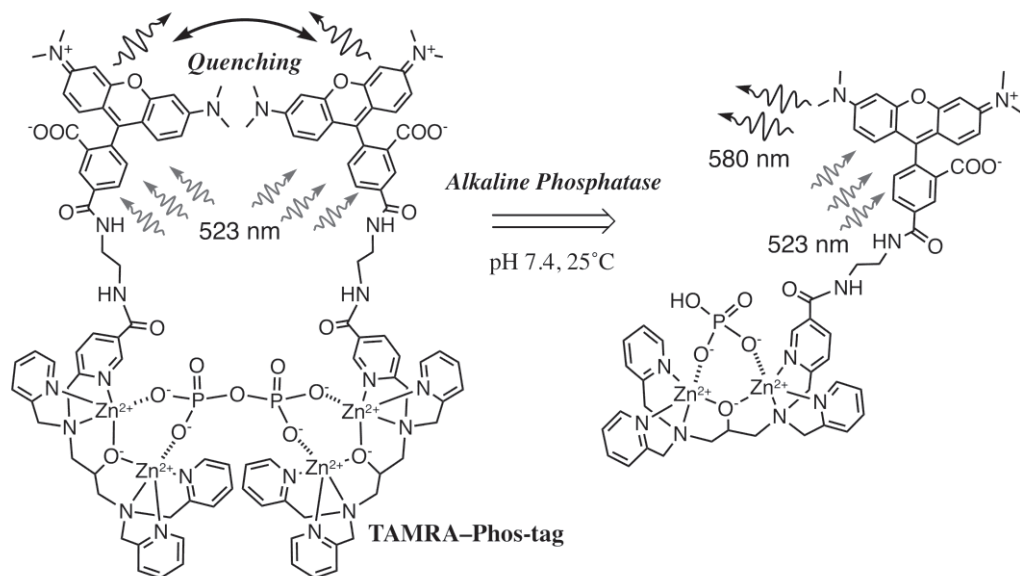


図 1 TAMRA-Phos-tag を用いた蛍光クエンチングシステム

本分析法の開発にあたって、TAMRA-Phos-tag と ALP の人工基質となる TAMRA-PEA もしくは天然基質となるピロリン酸を組み合わせた二種類の蛍光クエンチング(TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステム)により検証を行った。

まず、TAMRA の NHS エステル(5-TAMRA-NHS)と一級アミンを有する Phos-tag 配位子をクロロホルム中、室温中 12 時間反応させ TAMRA でラベル化した Phos-tag リガンド分子を合成した。塩基性アミノ化シリカゲルを担体とした分取クロマトグラフィーで精製後、水溶液中で 2~3 当量の塩化亜鉛を加えて二核亜鉛錯体(TAMRA-Phos-tag)を調製した。pH 7.4 の緩衝液(10 mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl)中での 5.0 μM TAMRA-Phos-tag の可視吸収スペクトルを測定した結果、吸収極大波長 557 nm ($\epsilon = 9.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)と、520 nm 付近に小さな吸収帯であるショルダーが観察された。また、蛍光スペクトル($\lambda_{\text{ex}} = 523 \text{ nm}$)を測定した結果、最大蛍光波長は 580 nm であった。続いて、TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングの効果を確認するための人工基質として、リン酸エタノールアミン(PEA; 2-aminoethyl dihydrogen phosphate)と 5-TAMRA-NHS を pH 8 の水溶液中で室温中 2 時間反応させ、TAMRA-PEA を合成した。ダイヤイオン HP-20 カラムと C₁₈ カラムを担体とする分取クロマトグラフィーで精製を行った。TAMRA-Phos-tag と同

様にして 5.0 μM TAMRA-PEA の可視吸収スペクトルと蛍光スペクトル($\lambda_{\text{ex}} = 523$ nm)を測定した結果, 吸収極大波長 551 nm ($\epsilon = 9.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)と 520 nm 付近に小さな吸収帯であるショルダーが存在し, 最大蛍光波長は 577 nm であった。これらの結果を基に, TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA による蛍光クエンチングを確認した。pH 7.4 の緩衝液中における 2.5 μM TAMRA-Phos-tag と 2.5 μM TAMRA-PEA の蛍光スペクトル($\lambda_{\text{ex}} = 523$ nm)を測定した結果, 580 nm における蛍光強度は 5.0 μM TAMRA-Phos-tag の蛍光強度と 5.0 μM TAMRA-PEA の蛍光強度の平均値の 32%であり消光率は 68%であった。

本分析法では, 生理 pH において TAMRA-Phos-tag が基質(TAMRA-PEA もしくはピロリン酸)と複合体を形成し, TAMRA 部位が接近することで生じる蛍光クエンチングを分析の原理としている。まず, TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA を用いた TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムが ALP 活性分析に適用できるかを検証した。2.5 μM TAMRA-Phos-tag と 2.5 μM TAMRA-PEA を混合した pH 7.4 の試料溶液 3mL(10 mM HEPES-NaOH, 0.10 mM MgCl_2 , 0.10 M NaCl)を蛍光光度計 (25.0 ± 0.1 °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($\lambda_{\text{ex}} = 523$ nm)の蛍光強度変化を 20 分間測定した。添加直後から蛍光強度は増加し始め, 50%脱リン酸化量に達するまではほぼ擬一次反応速度論に従って脱リン酸化反応が進行した。さらに, 初期分解速度は ALP の濃度に依存して比例的に増加した。これらの結果より, この TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムは, 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た。

次に, ピロリン酸を架橋分子とする TAMRA-Phos-tag 二量体による TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムが, ALP アイソザイムに対する阻害剤プロファイリングに適用できるかを検証した。5.0 μM TAMRA-Phos-tag, 2.5 μM ピロリン酸, 競合阻害剤(オルトバナジウム酸イオン; H_2VO_4^-)を混合した pH 7.4 の試料溶液 3mL(10 mM HEPES-NaOH, 0.10 mM MgCl_2 , 0.10 M NaCl)を蛍光光度計($25.0 \pm$

0.1 °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 0.050 units/mL)または大腸菌型 ALP(0.020 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。阻害剤を添加しない場合の初期分解速度を 100%として求めた ALP の残存活性率(%)を縦軸に阻害剤濃度の対数値を横軸にプロットし阻害曲線を作成した。ウシ小腸型 ALP と大腸菌型 ALP に対するオルトバナジン酸イオンの 50%阻害濃度(IC_{50})は、それぞれ $0.18 \pm 0.05 \mu\text{M}$, $2.0 \pm 0.5 \mu\text{M}$ と求まり、 IC_{50} 値は約 10 倍の差を示した。この結果は、オルトバナジン酸イオンの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。本分析法による TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムは ALP アイソザイムの阻害剤プロファイリング分析に有用である。

筆者は生理 pH で ALP 活性を評価できる二種類 TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムを開発した。TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA の 1:1 複合体を用いた ALP 濃度依存的なリアルタイム活性分析だけでなく、ピロリン酸を架橋分子とする 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にも適用できる。特に後者の場合は、天然基質であるピロリン酸と競合阻害剤の ALP 親和性を生理 pH で比較することができる。TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムを用いる利点として、TAMRA-Phos-tag は光安定性や化学的安定性が極めて高く溶液状態で半年以上の室温保存であってもほとんど分解しないこと、水溶液中の TAMRA の量子収率(30%)は pH5~9 の範囲で一定であるため高感度かつ安定した蛍光分析が可能であること、一般的な実験用の分光分析装置で短時間分析が可能であるといった長所もある。本分析法は、生理環境に近い条件で ALP 阻害剤のアイソザイム特異性などの研究に利用できると考えている。

2. 序論

細菌から哺乳類まで様々な生物種に存在していることが明らかとなっているアルカリホスファターゼは[1], リン酸化合物から他の分子へのリン酸基転移反応を促進する生体機能分子として機能している[2]。特に, 水分子へリン酸基を転移する反応を加水分解反応と呼んでいる。このアルカリホスファターゼには臓器(肝臓, 腎臓, 小腸, 骨など)に特異的なアイソザイムがあり, 主に Glycosylphosphatidylinositol(GPI)アンカーを介する膜結合型と細胞分泌型の二種類の存在が知られている。そのため, 疾患や障害により傷ついた組織から臓器特異的なアイソザイムが血中へ放出されることから, 血清アルカリホスファターゼは肝機能障害[3]や癌[4]など様々な疾患における臨床指標として幅広く使用されている(Appendixes の 8.4 を参照)。アルカリホスファターゼの分析法には, 二リン酸フルオレセインやクマリン誘導体であるリン酸 4-メチルウンベリフェリルを基質として用いる蛍光分析法, ラジオイムノアッセイによりアルカリホスファターゼを検出する放射性同位体法, カラムや電気泳動法を用いてアルカリホスファターゼアイソザイムを分析するクロマトグラフ法や電気化学的分析法などが知られている。現在, 最も汎用されているアルカリホスファターゼの活性分析法は, 加水分解を受けることで黄色に発色する *P*-ニトロフェニルリン酸を用いて, アルカリ性条件下でアルカリホスファターゼの加水分解活性を測定する比色法である(Appendixes の 8.5 を参照)。この手法は, アルカリホスファターゼによる *P*-ニトロフェニルリン酸の加水分解生成物である *P*-ニトロフェノールの特異的な可視吸収帯における吸光度を測定し, その生成速度からアルカリホスファターゼ活性を分析することができる。このように, アルカリホスファターゼの加水分解反応の至適 pH がアルカリ性であるため, 主流の *in vitro* 分析はクロモフォアで標識した人工基質を用いて pH 9 以上のアルカリ性条件下で行われる[5-7]。一方, ヌクレオチドやピロリン酸といった天然基質を用いて生理 pH 条件で行う簡便な分析法は未だ数が少なく[8-10], 生理的条件に適した簡便かつ精度良くアルカリホスファターゼ活性を解析できる分析法が求められている。

筆者が所属する研究室では、亜鉛酵素であるアルカリホスファターゼの活性中心である二核亜鉛錯体をモデル化した低分子がリン酸モノエステルイオン ($R-OPO_3^{2-}$)を優先的に捕捉することを発見し、この亜鉛酵素モデル化低分子を基に二核亜鉛錯体である Phos-tag 分子 (1,3bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olato dizinc(II))を開発している。中性条件下で Phos-tag の二つの亜鉛イオンとリン酸基の二つの酸素アニオンは強固な配位結合を形成するため、生理的条件下において Phos-tag はリン酸モノエステルイオンを優先的に捕捉することができる[11]。さらに、これまでに Phos-tag 誘導体を用いた数多くの独自の分析手法を開発し、これらの技術はリン酸化プロテオミクスの研究の進歩に貢献している[12-15]。2009年には、アミノクマリンで標識した Phos-tag 誘導体がフルオレセインで標識したリン酸化ペプチドを捕捉することを利用して、ウシ小腸型アルカリホスファターゼによる脱リン酸化の分析に適した FRET(Fluorescence resonance energy transfer)システムの開発に成功した[16]。この分析法は、アミノクマリン標識 Phos-tag がフルオレセイン標識リン酸化ペプチドを優先的に補足する一方で、Phos-tag と非リン酸化ペプチドとの親和性が極めて低いことを原理としている。アミノクマリン標識 Phos-tag はフルオレセイン標識リン酸化ペプチドと 1:1 の複合体を形成し、フルオレセインとアミノクマリンが接近することで FRET を生じる。FRET 効率はアミノ酸配列の種類によって異なり 47%~86%程である。その他には、特定のキナーゼによる蛍光標識ペプチドの可逆的リン酸化反応に関する研究にも同様の FRET システムを適用できた[17]。さらに、アルカリホスファターゼ阻害剤の新規スクリーニング法として、ダブシル(4-{[4(dimethylamino)phenyl]azo} benzoate)で標識した Phos-tag 誘導体とリボフラビン 5'-リン酸(蛍光標識天然基質)を用いる蛍光クエンチングシステムを開発している[18]。

その他にも、核酸やペプチドといった生体分子の定量的解析法として二種類の蛍光色素分子による蛍光クエンチングシステムを利用する定量的解析法が報告されている[19]。数ある蛍光クエンチングシステムの中でも、1 対の TAMRA (Tetramethylrhodamine)を標識剤とする分析法がプロテアーゼやレダクターゼの酵素活性分析に適用されている[20,21]。TAMRA は単分子では可視光領域に蛍光を

有する蛍光分子であるが、TAMRA 二分子が接近することで蛍光を消光するクエンチャーの性質も有するため、TAMRA 単分子と比較して蛍光が著しく減少する。この消光現象は、TAMRA 二分子が互いに接近することにより基底状態の TAMRA 複合体を形成し消光を示す静的消光と、分子間で励起エネルギーを交換し合う FRET などの動的消光を原理としている。TAMRA を分析に用いる利点として、TAMRA の量子収率は pH5~9 の範囲で一定であること、水溶液中での光安定性や化学的安定性が極めて高いこと、可視光により励起できるため安全性の高い分析に適用できることがあげられる。本研究では、この TAMRA で標識した新規 Phos-tag 分子「TAMRA-Phos-tag」を用いる、アルカリホスファターゼ分析における二種類の新規蛍光分析法について報告する。まず、TAMRA-Phos-tag とアルカリホスファターゼの人工基質である TAMRA-PEA を用いて、TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムが生理 pH におけるアルカリホスファターゼ活性のリアルタイム蛍光分析として有用であることを実証した。さらに、天然リン酸化基質であるピロリン酸を架橋分子とする TAMRA-Phos-tag 二量体による TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムでは、競合的阻害剤であるオルトバナジン酸イオンの二種類のアルカリホスファターゼアイソザイムに対する阻害特異性が異なることを見出し、天然基質と ALP の相互作用に基づく阻害剤プロファイリングに成功した。

3. 実験項

3.1 試薬

アミノペンダント基を有する Phos-tag リガンド分子, N-(2-aminoethyl)-6-
{{3[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]-2-hydroxypropyl}(pyridin-2-ylmethyl)amino]methyl}
nicotinamide, は株式会社ナード研究所(尼崎, 日本)より購入した。
5-Carboxy-N,N,N',N' tetramethylrhodamine succinimidyl ester (5-TAMRA-NHS)は
ChemPep Inc(Wellington, FL, USA)より購入した。3',6'-Bis(diethylamino)-3*H*-spiro
[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-3-one (Rhodamine B)は東京化成工業株式会社(東京, 日
本)より購入した。Disodium 2,2',2'',2'''-(1,2-ethanediyldiammonio)tetraacetate(disodium
EDTA) と 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl]ethane-1-sulfonic acid(Hepes) と
Cosmosil 140C₁₈-OPN はナカライテスク株式会社(京都, 日本)より購入した。一般
的なシリカゲルカラムクロマトグラフィーとしてアミノシリカゲル NH-DM 1020
を富士シリシア化学株式会社(春日井, 日本)より購入した。スチレン-ジビニルベ
ンゼン系合成吸着剤であるダイヤイオン HP-20 は三菱ケミカル株式会社(東京, 日
本)より購入した。Type VII-S ウシ腸粘膜のアルカリホスファターゼと大腸菌型ア
ルカリホスファターゼは Sigma-Aldrich より購入した。なお, pH 9.8, 37 °C の条
件下において, 1 分間に 1 μM の *P*-ニトロフェニルリン酸を加水分解する酵素量
を 1unit とする。薄層クロマトグラフィーにはシリカゲルを吸着剤とした TLC プ
レート(No. 5533, No. 5560; Merck, Darmstadt, Germany)を用いた。実験には最高級
品質の試薬と溶解剤のみを用い, 精製することなく実験に適用した。また, すべ
ての水溶液は蒸留水を用いて調製した。

3.2 実験機器

可視吸収スペクトルの測定には、温度制御可能なセルホルダーを接続した V-630(日本分光株式会社; 東京, 日本)を用い、 25.0 ± 0.1 °C の条件下で測定を行った。蛍光スペクトルの測定には、温度調節可能なペルチェセルホルダーを接続した FP-8300(日本分光株式会社; 東京, 日本)を用い、 25.0 ± 0.1 °C の条件下で測定を行った。赤外吸収スペクトルの測定には FT/IR-4600(日本分光株式会社; 東京, 日本)を用い、室温条件下で測定を行った。¹H-NMR スペクトル(500 MHz)と ¹³C-NMR スペクトル(125 MHz)の測定には LA500 (日本電子株式会社; 東京, 日本)を用いた。なお、内標準物質として、TAMRA ラベル化 Phos-tag リガンド分子の NMR 測定には重クロロホルム(CDCl₃)を含むテトラメチルシラン(TMS), TAMRA-PEA の NMR 測定には DMSO-d₆ を含む ¹H-DMSO ($\delta = 2.5$ ppm)を用いた。pH 測定は、マイクロ pH 電極(9618-10)を接続した LAQUA F-72 pH メーター(株式会社堀場製作所; 京都, 日本)を用いて測定を行った。なお、pH メーターの校正は 25 °C の条件下で標準液(pH 4.01, 6.86)を用いて行った。質量分析(ポジティブモード)は高分解能質量分析計である LTQ Orbitrap XL(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社; 横浜, 日本)を用いて測定を行った。

3.3 TAMRA ラベル化 Phos-tag リガンド分子の合成

クロロホルムに溶解した 5-TAMRA-NHS(96 mg, 0.18 mmol)溶液 5.0 mL と、クロロホルムに溶解したアミノペンダント基含有 Phos-tag リガンド分子(100 mg, 0.18 mmol)溶液 5.0 mL を混合し、攪拌しながら室温中 12 時間反応させた。次に、エバポレーターにて溶媒を留去した後、アミノシリカゲル(NH-DM 1020, 溶出液; CHCl₃/CH₃OH = 50:1)により残存物の精製を行うことで TAMRA ラベル化 Phos-tag リガンド分子を黒紫色の粉末(123 mg, 0.13 mmol, 収率 72%)として得ることができた(Fig. 1)。

以下に生成物の確認データを示す。

TLC [silica gel plate (No. 5533), CHCl₃-MeOH (10:1)]: R_f = 0.50 (one magenta-colored spot).

IR (KCl): 3264 (br), 2918, 1750 (COO), 1649 (CON), 1613 (CON), 1594, 1534, 1488, 1433, 1407, 1347, 1305, 1253, 1227, 1188, 1122, 929, 822, 768, 665 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, in CDCl₃): δ = 2.55 (2H, dd, J = 8 and 13 Hz, NCCCHN), 2.61 (2H, dd, J = 4 and 13 Hz, NCCCHN), 3.03 (12H, s, CH₃), 3.51 (2H, br s, NCCH₂N), 3.58 (2H, br s, NCCH₂N), 3.72–3.85 (8H, m, PyCH₂), 3.94 (1H, tt, J = 4 and 8 Hz, NCCHCN), 6.43 (2H, d, J = 3 Hz, ArH), 6.46–6.49 (2H, m, ArH), 6.86 (2H, dd, J = 3 and 9 Hz, ArH), 7.05–7.09 (3H, m, PyH), 7.12 (1H, d, J = 8 Hz, ArH), 7.21 (1H, d, J = 8 Hz, PyH), 7.30 (3H, dd, J = 8 and 14 Hz, PyH), 7.50–7.57 (3H, m, PyH), 8.03 (1H, dd, J = 2 and 8 Hz, PyH), 8.15 (1H, dd, J = 2 and 8 Hz, ArH), 8.43–8.46 (3H, m, PyH), 8.81 (2H, br s, NHCO and ArH), 8.95 (1H, d, J = 2 Hz, PyH), 9.22 (1H, br s, NHCO).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 40.2, 40.5 (CH₃), 40.8, 59.0, 59.1, 60.8, 67.4, 97.5, 109.5, 110.8, 122.1, 122.4, 123.2, 126.0, 126.2, 128.3, 130.2, 132.1, 134.0, 135.8, 136.2, 136.5, 146.0, 148.4, 149.0, 154.2, 154.8, 159.3, 159.4, 162.0, 165.8 (CO), 167.5 (CO), 170.2 (CO). HRMS (electrospray, MeOH): m/z [M + H]⁺ calcd for C₅₅H₅₇N₁₀O₆: 953.4457; found: 953.4442.

3.4 TAMRA ラベル化エタノールアミンリン酸(TAMRA-PEA)の合成

O-リン酸エタノールアミン(PEA; 2-aminoethyl dihydrogen phosphate)と水酸化ナトリウムを含む pH 8.0 の水溶液 5.0 mL に, 5-TAMRA-NHS(96 mg, 0.18 mmol)の溶液を加え攪拌しながら室温中2時間反応させた。反応溶液に 1.0 M の酢酸を 2.0 mL 加え酸性溶液とし, ダイヤイオン HP-20 のカラム(内径: 25 mm, カラム長さ: 150 mm)に通した。まず, 余剰の PEA や酢酸ナトリウムといった親水性化合物を除去するために蒸留水(300 mL)にてカラムの洗浄を行った。TAMRA-PEA や TAMRA カルボン酸などの TAMRA 誘導体はカラムに保持されるため, メタノール(100

mL)にて溶出を行った。回収された有機層を濃縮した後、C₁₈ カラム(Cosmosil 140C₁₈-OPN, 溶出液; CHCl₃/CH₃OH = 50:1)により精製を行うことで TAMRA-PEA({2-[6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9yl]-5-({[2-(phosphonoxy)ethyl]amino}carbonyl)benzoate})を黒紫色の粉末(65 mg, 0.12 mmol, 収率 65%)として得ることができた。

以下に生成物の確認データを示す。

TLC [No. 5560 silica-gel plate; MeOH-H₂O (1:1)]: R_f = 0.40 (single magenta-colored spot).

IR (KBr): 3419 (br), 2930, 1715 (COO), 1647 (CON), 1603 (CON), 1560, 1535, 1512, 1495, 1410, 1366, 1352, 1191, 1080, 929, 815, 701, 505 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.02 (12H, s, CH₃), 3.47–3.52 (2H, br s, CH₂), 3.68 (2H, br s, HO in a DHO signal), 3.92–3.97 (2H, br s, CH₂), 6.63 (2H, s, ArH), 6.68 (4H, s, ArH), 7.33 (1H, d, J = 8 Hz, ArH), 8.25 (1H, d, J = 8 Hz, ArH), 8.48 (1H, s, ArH), 9.25 (1H, br s, NHCO). HRMS (electrospray, MeOH): m/z [M + H]⁺ calcd. for C₂₇H₂₉N₃O₈P⁺: 554.1687; found. 554.1688.

3.5 蛍光分析

すべての蛍光分析の測定に用いる試料溶液には 10 mM Hepes-NaOH (pH 7.4)と 0.10 M NaCl が含まれており、測定は 3 回以上繰り返し行った。まず、試料溶液(3 mL)をプラスチック製 1-cm 角キュベット(10 × 10 × 45 mm)に入れ分光装置にセットし、25.0 ± 0.1 °C の条件下で 3 mm 大のスターラーバーで攪拌し続けた。また、分光分析装置の設定について、励起光(523 nm) と蛍光(580 nm)のバンド幅はともに 2.5 nm とした。アルカリホスファターゼの分析におけるリアルタイム蛍光分析では、アルカリホスファターゼによる加水分解反応の測定時間は 20 分間とし、1 秒間隔で励起光を照射しその際のデータを取得した。

4. 結果と考察

4.1 TAMRA ラベル化誘導体の調製および特徴

TAMRA ラベル化 Phos-tag リガンド分子は、アミノペンダント基をもつ Phos-tag リガンド分子[11]と、アミン反応性化学基である N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)が結合した 5-TAMRA 誘導体である 5-TAMRA-NHS とのカップリング反応により収率 72%で得ることができた(実験項を参照)。二核亜鉛錯体である TAMRA-Phos-tag(60 μ M)のストック溶液について、pH 7.4 の 10 mM HEPES-NaOH 緩衝液(0.1 M NaCl を含む)中に、TAMRA ラベル化 Phos-tag リガンド分子 60 μ M と塩化亜鉛 2.5 当量(Zn^{2+} として 150 μ M)となるように調製した。pH 7.4 の緩衝液中の TAMRA-Phos-tag は安定であり、冷暗所(4 $^{\circ}C$)に 6 カ月保存しても吸収スペクトルに変化は見られなかった。Phos-tag 誘導体に関する以前の研究報告[10,17]を参照に、二核亜鉛錯体の類似構造である TAMRA-Phos-tag について Fig. 1 に示す。

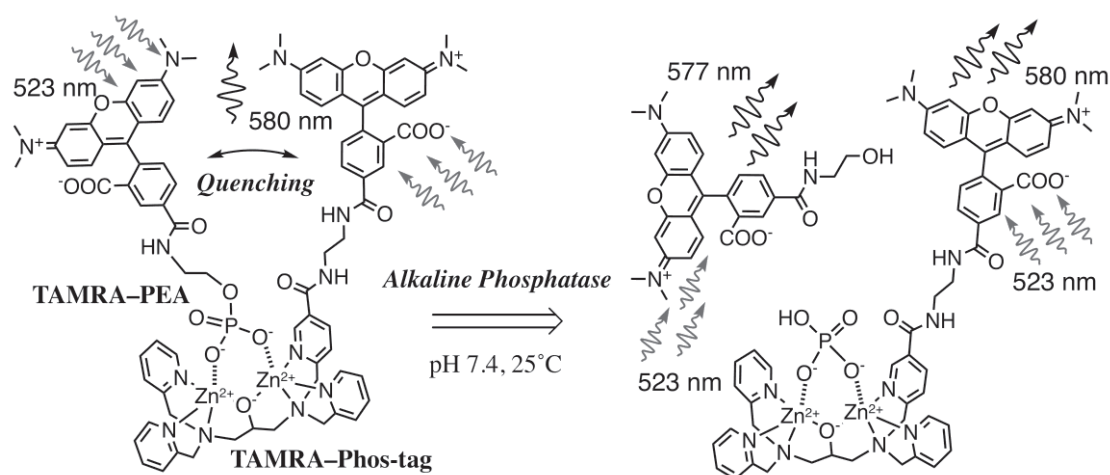


Figure. 1

Structure of the TAMRA-Phos-tag complex with TAMRA-PEA and the dephosphorylation of TAMRA-PEA to reduce the fluorescence quenching effect at pH 7.4 in aqueous solution.

TAMRA-Phos-tag を溶解した緩衝液は、pH 5 から pH 11 の間で明るい赤紫色を呈し、また TAMRA-Phos-tag の溶解性は室温の緩衝液中にて約 80 μM であった。この溶解性により、1-cm 角キュベットを用いた標準的な実験機器による分子分光分析に問題なく適用できた。pH 7.4 の緩衝液(10 mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl)中の 5.0 μM TAMRA-Phos-tag について、25 $^{\circ}\text{C}$ の条件下で測定した可視吸収スペクトルの結果を Fig. 2a に示す。吸収極大波長(λ_{max})である 557 nm ($\epsilon = 9.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)と、520 nm 付近に小さな吸収帯であるショルダーが観察された。可視吸収スペクトルの測定に用いた同一の試料溶液について、25 $^{\circ}\text{C}$ の条件下で測定した蛍光スペクトル($\lambda_{\text{ex}} = 523\text{nm}$)の結果を Fig. 3a に示す。得られた蛍光スペクトルより最大蛍光波長(λ_{em})は 580 nm であり、一般的なアミン結合型 5-TAMRA 誘導体の最大蛍光波長(λ_{em})が 580 nm 付近である事実[22]と同様の結果となった。

TAMRA ラベル化エタノールアミンリン酸(TAMRA-PEA; Fig. 1)は、pH 8.0 の水溶液中にて 5-TAMRA-NHS と過剰量の PEA をカップリング反応することにより得ることができた(実験項を参照)。TAMRA-PEA の分光スペクトルの特徴について、TAMRA-Phos-tag と同様のバッファー条件(pH 7.4)を用いて検証を行った。Fig. 2b と Fig. 3b は 5.0 μM TAMRA-PEA の可視吸収スペクトルと蛍光スペクトルの結果を示しており、TAMRA-PEA と TAMRA-Phos-tag のスペクトルは類似していることが分かる。吸収極大波長(λ_{max})である 551 nm ($\epsilon = 9.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)と、520 nm 付近に小さな吸収帯であるショルダーが観察された。pH 7.4 の緩衝液中の TAMRA-PEA もまた安定であり、冷暗所(4 $^{\circ}\text{C}$)に 6 カ月保存しても吸収スペクトルに変化は見られず、リン酸エステルの加水分解も生じていなかった。蛍光スペクトル($\lambda_{\text{ex}} = 523 \text{ nm}$)より最大蛍光波長(λ_{em})は 577 nm であった。なお、励起光 523 nm における TAMRA-PEA(Fig. 3b)の蛍光強度は TAMRA-Phos-tag(Fig. 3a)の蛍光強度より大きいことが、これは TAMRA-PEA の方が 523 nm における吸光度が大きいことによるものであると考えられる(Fig. 2b)。

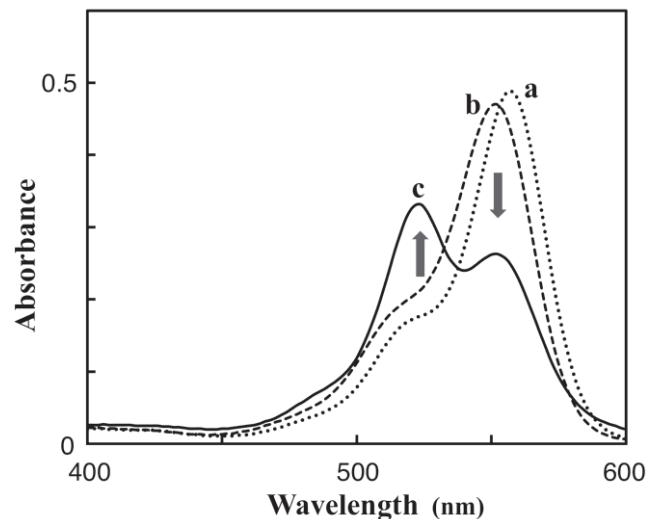


Figure. 2

Visible absorption spectra at pH 7.4 (10 mM Hepes–NaOH, 0.10 M NaCl) and 25 °C: (a) 5.0 μM TAMRA–Phos-tag (dotted curve), $\lambda_{\text{max}} = 557 \text{ nm}$ ($\epsilon = 9.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); (b) 5.0 μM TAMRA–PEA (broken curve), $\lambda_{\text{max}} = 551 \text{ nm}$ ($\epsilon = 9.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); (c) 1:1 mixture of 2.5 μM TAMRA–Phos-tag and 2.5 μM TAMRA–PEA (solid curve), $\lambda_{\text{max}} = 523 \text{ nm}$ (Absorbance = 0.33)

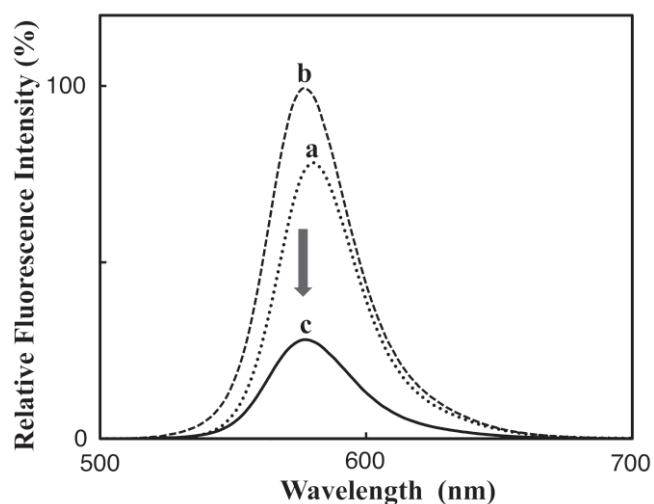


Figure. 3

Fluorescence emission spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 523 \text{ nm}$) at pH 7.4 (10 mM Hepes–NaOH, 0.10 M NaCl) and 25 °C: (a) 5.0 μM TAMRA–Phos-tag (dotted curve), $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$; (b) 5.0 μM TAMRA–PEA (broken curve), $\lambda_{\text{em}} = 577 \text{ nm}$; (c) 1:1 mixture of 2.5 μM TAMRA–Phos-tag and 2.5 μM TAMRA–PEA (solid curve), $\lambda_{\text{em}} = 577 \text{ nm}$

4.2 Phos-tag を応用した蛍光のクエンチングシステムの特徴

pH 7.4 の緩衝液(10 mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl)中に TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA を混合した試料溶液について、25 °C の条件下で分子分光分析を行った。なお、試料溶液(3 mL)中は TAMRA 分子としてのモル濃度の和を 5.0 μ M で一定とした。TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA の混合物における TAMRA-Phos-tag のモル分率(MF = [TAMRA-Phos-tag]/[TAMRA-Phos-tag] + [TAMRA-PEA])を 0 もしくは 1 から 0.5 へ近づけた結果、557 nm における TAMRA-Phos-tag の可視吸光度(Fig. 2a)と 551nm における TAMRA-PEA の可視吸光度(Fig. 2b)はともに減少し、一方で 520 nm 付近の吸収帯であるショルダーの強度が増した。また、MF = 0.5(TAMRA-Phos-tag = 2.5 μ M, TAMRA-PEA = 2.5 μ M)で最も大きなスペクトル変化を示した。その時の可視吸収スペクトルを Fig. 2c に示す。Fig. 2c の結果から、523 nm の吸収ピークは保持されている一方で、TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA の吸収極大波長における吸光度が 0.33 に減少したこと、また TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA のスペクトルが明らかにブルーシフト(浅色効果)したことが示された。これらのスペクトルの顕著な変化は、Fig. 1 に示される TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA が 1:1 で複合体を形成することに合致しており、一般的な分子モデルより複合体における TAMRA 二分子間の距離は 2 nm 以下であると推定される。なお、二分子の TAMRA を含むペプチドやジスルフィド結合を持つ誘導体に関して類似した可視吸収スペクトルの変化が報告されており[20,21]、互いの TAMRA 部位が十分に接近し分子内で基底状態にある複合体を形成することで、TAMRA の蛍光の効率的な静的消光を引き起こす。

次に、TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA の複合体における、二分子の TAMRA による蛍光クエンチングの効率について検証した。可視吸収スペクトルの結果と同様に、最適な励起光 523 nm の照射による 580 nm の蛍光強度は MF = 0.5 の時に最も大きな変化を示した(Fig. 3)。また、TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA の等量混合試料における蛍光強度(Fig. 3c; TAMRA-Phos-tag = 2.5 μ M, TAMRA-PEA = 2.5 μ M)は、5.0 μ M TAMRA-Phos-tag の蛍光強度(Fig. 3a)と 5.0 μ M TAMRA-PEA の

蛍光強度(Fig. 3b)の平均値の32%であった。580 nmにおける蛍光の消光率68%は、554 nmにおける可視吸光度の変化率45%(Fig. 2)と比較して大きな差がある。参照実験として、25 °Cの条件下で、1.0 mM EDTA(亜鉛イオンに対する強力なキレート試薬)をTAMRA-Phos-tagとTAMRA-PEAの1:1複合体(TAMRA-Phos-tag = 2.5 μ M, TAMRA-PEA = 2.5 μ M)に混合することで、Zn²⁺を複合体から取り除いた。励起光を523 nmとし、EDTA添加後ただちに試料溶液の蛍光は徐々に増大し始め、1時間室温放置(25 °C)した後の蛍光強度は一定値に達した。最終的な580 nmにおける蛍光強度は5.0 μ M TAMRA-Phos-tagと5.0 TAMRA-PEAの蛍光強度の平均値にほぼ等しくなった。この結果は、本実験条件下においてTAMRA-Phos-tagとTAMRA-PEAのリガンド分子間における相互作用はなく、それゆえ蛍光クエンチングの作用にはPhos-tag分子中のZn²⁺に対するリン酸の配位が必須であることが示された。

4.3 TAMRA-PEA 脱リン酸化のリアルタイム分析

近年私は、蛍光のクエンチャーであるダブシル基をもつ Phos-tag 誘導体とアルカリホスファターゼの基質となるフラビンモノヌクレオチドを用いて、ウシ小腸型のアルカリホスファターゼ活性の測定に適用できる FRET に基づく蛍光クエンチング法を報告した[18]。同様の Phos-tag の原理を利用し、Phos-tag 技術を応用した TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムを適用することで TAMRA-PEA を脱リン酸化するアルカリホスファターゼの活性分析を行った(Fig. 1)。O-リン酸エタノールアミン(PEA)はヒトアルカリホスファターゼの非蛍光性天然基質である[23]。TAMRA-PEA 脱リン酸化についてのリアルタイム分析は、1-cm 角キュベットを用い、 25.0 ± 0.1 °C の条件下で攪拌しながら行った。試料溶液(3 mL)の組成は、 $2.5 \mu\text{M}$ TAMRA-PEA, $2.5 \mu\text{M}$ TAMRA-Phos-tag, 0.10 mM MgCl_2 , 0.10 M NaCl, 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)とした。脱リン酸化反応は適正量のウシ小腸型アルカリホスファターゼを試料溶液に注入することで開始した。アルカリホスファターゼ添加による試料溶液の体積変化は 0.5%未満であった。アルカリホスファターゼ注入直後から 580 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 523 \text{ nm}$)における蛍光強度が時間依存的に増大し、続けて 20 分超の間測定を行った。また、アルカリホスファターゼの濃度に依存して脱リン酸化の割合も増大した。1 分間隔で測定した蛍光強度のプロット図を Fig. 4 に示す。プロット図より、50%脱リン酸化量に達するまではほぼ擬一次反応速度論に従って脱リン酸化反応が進行したことが分かる。TAMRA-PEA からリン酸基が解離することにより蛍光強度は 2.9 倍に増大し、また TAMRA-PEA 脱リン酸化の初期分解速度はアルカリホスファターゼの量(0, 0.11, 0.33, 1.0, 3.0 units/mL)にほぼ比例していた。なお参照実験により以下のことを確認した。まず、 $5.0 \mu\text{M}$ TAMRA-PEA を 6.0 units/mL のアルカリホスファターゼで脱リン酸化した試料溶液を実験条件下にて 1 時間保存し、保存溶液の蛍光スペクトルを測定した。蛍光スペクトルは TAMRA-PEA と同様に最大蛍光波長(λ_{em}) 577 nm を示し、その蛍光強度は $5.0 \mu\text{M}$ TAMRA-PEA の約 95%であった。さらに、アルカリホスファターゼ非存在下の $5.0 \mu\text{M}$ TAMRA-PEA を実験条件下で 1 時間保存した保存溶液でも

蛍光は増大しないこと、また 4 °C で保存し始めてから 1 週間後のアルカリホスファターゼストック溶液を用いて分析を行った場合でも 95%以上の活性が保持されていることを確認した。それゆえ、観察された蛍光変化は時間依存的な TAMRA-PEA の脱リン酸化によるものであり、その結果 TAMRA-Phos-tag 分子に捕捉された無機リン酸が化学量論量生じている (Fig. 1)。TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA の等量混合溶液もまた安定であり、6 カ月冷蔵保存しても可視吸収スペクトルと蛍光スペクトルに変化は見られなかった。それゆえ、この TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムは、生理的条件下における *in vitro* アルカリホスファターゼ分析として簡便かつ信頼性を有した分析法であると言える。

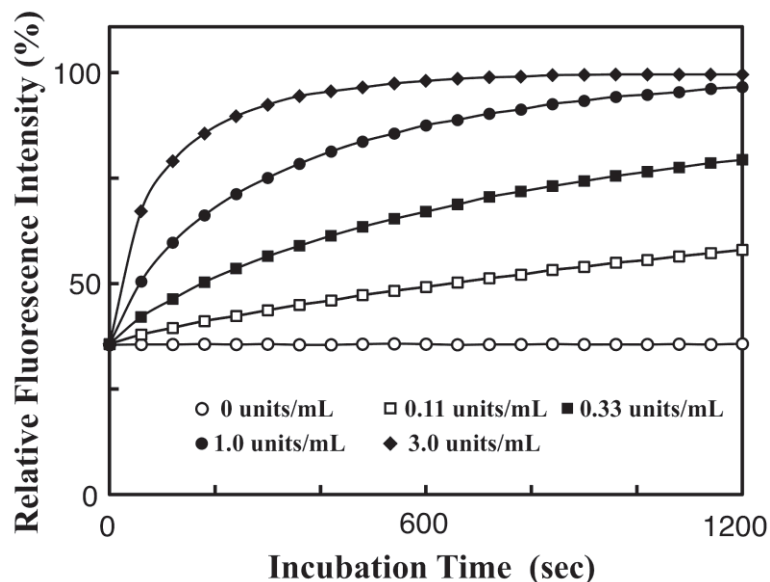


Figure. 4

Time course change of the 580-nm fluorescence intensity ($\lambda_{\text{ex}} = 523 \text{ nm}$) of an aqueous solution (pH 7.4, 3.0 mL) containing 2.5 μM TAMRA-Phos-tag and 2.5 μM TAMRA-PEA, 0.10 mM MgCl_2 , 0.10 M NaCl, and 10 mM Hepes-NaOH at 25 °C in the absence or presence of bovine intestinal mucosa alkaline phosphatase: 0 units/mL (open circles), 0.11 units/mL (open squares), 0.33 units/mL (closed squares), 1.0 units/mL (closed circles), 3.0 units/mL (closed diamonds). The typical data are plotted with a time interval of 60s.

4.4 TAMRA-Phos-tag を用いたピロリン酸の蛍光分析

私は既存の分析手法の代替分析法として、TAMRA-Phos-tag のみで可能なホスファターゼ活性分析法を開発した。概略図について Fig. 5 に示す。本分析法における TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムは、ピロリン酸アニオンにより二分子の TAMRA-Phos-tag が架橋され二量体を形成することを原理としている。なお、ピロリン酸はアルカリホスファターゼの天然基質である[23]。TAMRA-PEA と TAMRA-Phos-tag による分析法と同様に、25 °C の条件下において、pH 7.4 の緩衝液(10 mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl)中でピロリン酸の濃度の増加に伴い 5.0 μM TAMRA-Phos-tag ($\epsilon = 9.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)の 557 nm の吸光度の強度が減少した (5.0 μM TAMRA-Phos-tag + 10 μM ピロリン酸, $\epsilon = 7.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, Supplemental Fig. S1)。なお参照実験により以下のことを確認した。20 μM オルトリン酸アニオン(HPO_4^{2-})を用いた場合は可視吸収スペクトルに変化は見られなかった。さらに、1.0 mM EDTA 存在下の 5.0 μM TAMRA-Phos-tag に対し 10 μM ピロリン酸を加えた場合も可視吸収スペクトルに変化は見られなかった。これらの結果は、ピロリン酸が架橋配位子として機能することで TAMRA-Phos-tag 二量体を形成していることを示している (Fig. 5)。同一の試料溶液 (5.0 μM TAMRA-Phos-tag)を用いて蛍光スペクトルを測定したところ、10 μM ピロリン酸を加えることにより 580 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 523 \text{ nm}$)における蛍光強度は著しく低下した (Supplemental Fig. S1)。蛍光強度の消光率は 51%であり、557 nm における可視吸光度の変化率 22%と比較して大きな差があった。また、5.0 μM TAMRA-Phos-tag の吸収極大波長 (λ_{max})である 557 nm もしくは 523 nm を励起光として 5.0 μM TAMRA-Phos-tag の蛍光強度を測定すると、励起光 557 nm で測定した場合の蛍光強度 ($\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$)の方が二倍ほど大きい。しかし、5.0 μM TAMRA-Phos-tag に対し 10 μM ピロリン酸を加えた場合の 580 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 557 \text{ nm}$)の蛍光強度の消光率は約 25%であり励起光 523 nm で測定した場合の消光率(51%)と大きな差があった。5.0 μM TAMRA-Phos-tag に対しピロリン酸の濃度(0–10 μM)を加えた時の蛍光強度について典型的な関係性をプロットしたグラフを Fig. 6A に示す。Fig. 6A の減

衰曲線における二本の接線の交点からピロリン酸の値として 2.5 μM が得られた。用量依存的な蛍光クエンチングは、ピロリン酸と TAMRA-Phos-tag が 1:2 の比率でピロリン酸の架橋による TAMRA-Phos-tag 二量体を形成していることを示しており、また実験条件下において TAMRA-Phos-tag 二量体はピロリン酸が結合した TAMRA-Phos-tag 単量体よりも安定であることが確認できた (Fig. 6A)。TAMRA-Phos-tag 二量体の優れた安定性は TAMRA 部位が接近し集まることで基底状態にある複合体を形成することを示している。これは、可視吸収スペクトルの変化に示す通りである。一方、過剰量のピロリン酸(50-500 μM)を添加することにより蛍光強度は増強した (Fig. 6B)。ピロリン酸の濃度の増加に伴い、TAMRA-Phos-tag における 557 nm の可視吸光度は増強し、520 nm 付近に吸収帯であるショルダーは減少した。ピロリン酸の用量依存的な蛍光強度や吸光度の変化は、Fig. 6B の平衡に示してあるようにピロリン酸と TAMRA-Phos-tag の部分的な 1:1 複合体が形成することに起因しているのであろうと考えられる。過剰量のピロリン酸を添加することによる蛍光強度の漸増は、TAMRA-Phos-tag 単量体より TAMRA-Phos-tag 二量体の方がより安定であることをさらに裏付けている。それゆえ、低濃度ピロリン酸の条件下におけるピロリン酸の用量依存的な蛍光変化は、天然基質と TAMRA-Phos-tag による高感度なアルカリホスファターゼ分析に用いることができる。

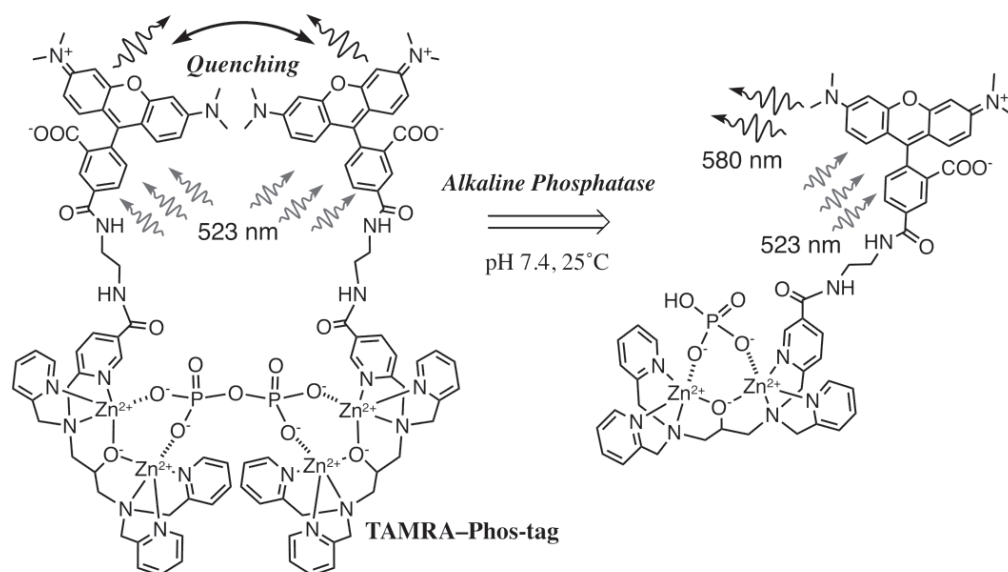


Figure. 5

Structure of the dimeric TAMRA–Phos-tag complex linked with pyrophosphate, and the hydrolysis of pyrophosphate to reduce the fluorescence quenching effect at pH 7.4 in aqueous solution.

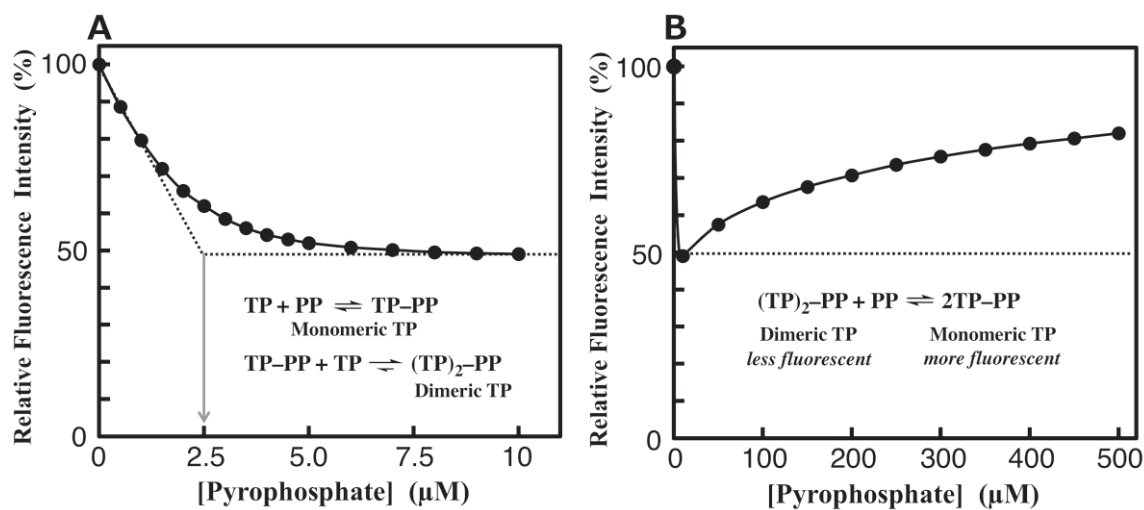


Figure. 6

Fluorescence emission response (at 580 nm) of 5.0 μM TAMRA–Phos-tag (TP) to increasing level of pyrophosphate (PP) at pH 7.4 (10 mM HEPES–NaOH, 0.10 M NaCl) and 25 $^\circ\text{C}$. The concentration ranges of pyrophosphate are 0–10 μM for A and 0–500 μM for B.

4.5 TAMRA-Phos-tag とピロリン酸を用いたアルカリホスファターゼアイソザイムの阻害剤プロファイリング

Phos-tag を応用した蛍光クエンチングシステムにおける酵素分析法としての実用性についてさらなる検証を行うため、私はウシ小腸型のアルカリホスファターゼによるピロリン酸の加水分解についてのリアルタイム分析を行った[24]。TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA による蛍光クエンチングシステムと同様に、適量のアルカリホスファターゼを加えることによりピロリン酸の加水分解反応を開始することができた。初速度法によりアルカリホスファターゼの用量依存的な酵素活性について検証を行った。試料溶液(3 mL)の組成は、5 μM TAMRA-Phos-tag, 2.5 μM ピロリン酸, 0.10 mM MgCl_2 , 0.10 M NaCl, 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) とした。ピロリン酸の 10%が加水分解されるまでの 580 nm($\lambda_{\text{ex}} = 523\text{nm}$)における蛍光強度の変化を経時的に観察した。0.025, 0.050, 0.075, 0.10 units/mL のアルカリホスファターゼによる加水分解実験を独立して 3 回繰り返した結果より算出した擬一次速度定数は、それぞれ 3.6×10^{-4} , 7.1×10^{-4} , 1.1×10^{-3} , $1.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ であった。これらの擬一次速度定数は $\pm 10\%$ の範囲で再現性があり、またウシ小腸型アルカリホスファターゼの用量とほぼ比例関係にあった。続いて、競合的阻害剤であるオルトバナジン酸イオン(H_2VO_4^-)のウシ小腸型アルカリホスファターゼ(0.050 units/mL)に対する阻害作用について、これまでと同一の実験条件で検証を行った。なお、蛍光分析における測定時間は 10 分とかからなかった。阻害剤存在下にて、ピロリン酸加水分解反応の初期分解速度から残存活性率(%)を算出し、オルトバナジン酸イオンの用量に依存して加水分解率は減少した。また、阻害剤濃度の対数値に対するアルカリホスファターゼの残存活性率をプロットすることにより活性阻害曲線を得た(Fig. 7; closed squares)。シグモイドカーブを描いた活性阻害曲線の結果から、25 $^\circ\text{C}$, pH 7.4 の条件下における 50%阻害濃度(IC_{50})は $0.18 \pm 0.05 \mu\text{M}$ と算出された。なお、私たちの以前の研究において、dabcyl-Phos-tag と リボフラビン 5'-リン酸による蛍光クエンチングシステムを用いた場合の同一のアルカリホスファターゼに対する IC_{50} 値を $0.10 \mu\text{M}$ と報告している[18]。さらに、

この TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムを用いて求めた大腸菌型アルカリホスファターゼ[1]における活性阻害曲線のプロット(Fig. 7; closed circles)より、 IC_{50} 値は $2.0 \pm 0.5 \mu\text{M}$ と算出された。大腸菌型アルカリホスファターゼの IC_{50} 値はウシ小腸型アルカリホスファターゼの IC_{50} 値と比較し約 10 倍の差がある。それゆえ、TAMRA-Phos-tag と無機ピロリン酸イオン(アルカリホスファターゼの天然基質)による TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムを用いた阻害剤プロファイリングにより、pH 7.4 の条件下におけるアルカリホスファターゼアイソザイムに特異的な阻害剤の同定やその活性分析に有用である可能性がある。

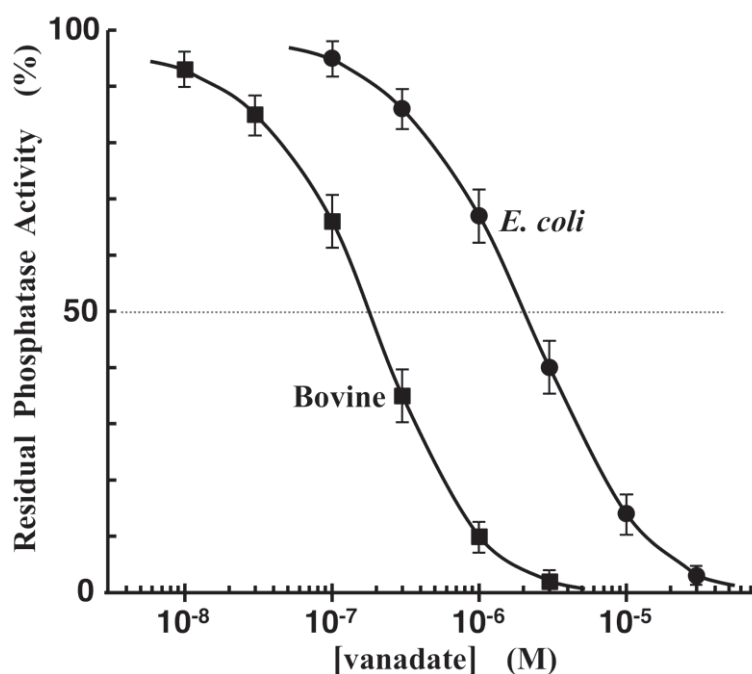


Figure. 7

Inhibition curves of the AP reactions in the presence of dihydrogen orthovanadate ion (H_2VO_4^-) at 25 °C. The ordinate represents the residual phosphatase activity ratio (%). The reaction mixture contained 5.0 μM TAMRA-Phos-tag, 2.5 μM pyrophosphate, 0.10 mM MgCl_2 , 0.10 M NaCl, and 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4). The amounts of bovine intestinal AP (closed squares) and *E. coli* AP (closed circles) were 0.05 units/mL and 0.02 units/mL, respectively.

5. 結論

筆者は、新規 Phos-tag 分子「TAMRA-Phos-tag」を用いて、蛍光クエンチングシステムによるアルカリホスファターゼ分析における新規蛍光分析法を開発した。本手法では、人工基質である TAMRA-PEA もしくは天然基質であるピロリン酸に対するアルカリホスファターゼ活性を生理的条件下で分析できる。本分析法を開発するにあたって、二核亜鉛錯体(Phos-tag)に TAMRA 分子を結合させた蛍光性 Phos-tag 誘導体を新規に合成した。Phos-tag 誘導体は TAMRA-PEA もしくはピロリン酸のリン酸基を優先的に捕捉し、その結果二つの TAMRA 部位の間で効率的な蛍光の消光を生じた。この TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムはアルカリホスファターゼ反応の連続的モニタリングに適用できた。さらに、ピロリン酸により架橋された TAMRA-Phos-tag 二量体を用いるアプリケーションとして、二種類のアルカリホスファターゼアイソザイムに対するオルトバナジン酸イオンの IC_{50} 値を評価できる阻害剤プロファイリング分析法を開発した。ピロリン酸を用いる本分析法は、TAMRA-Phos-tag とピロリン酸の 2:1 混合液と阻害剤とアルカリホスファターゼの 3 種類の水溶液を用い、比較的簡便な手順で行うことができる。ピロリン酸加水分解のリアルタイム分析では複数回のサンプリングは不要であり、またアルカリホスファターゼ活性を分析するための初速度法に必要なインキュベーション時間は 1 サンプルにつき 10 分もかからない。そのため、この TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムの基本的性質は、アルカリホスファターゼに対する阻害剤や活性化剤の識別や活性分析を行うための簡便かつ信頼性を有したアルカリホスファターゼ分析に適用することができる。本分析法の特徴として、ピロリン酸を基質として用いることでアルカリホスファターゼの本質的な活性を生理的条件下で簡便に分析できる。また、TAMRA-Phos-tag の光安定性や化学的安定性は極めて高く半年以上溶液状態での冷蔵保存が可能であること、TAMRA の量子収率が pH に依存しない、一般的な実験用の分光分析装置で行うことができるといった長所もある。

6. References

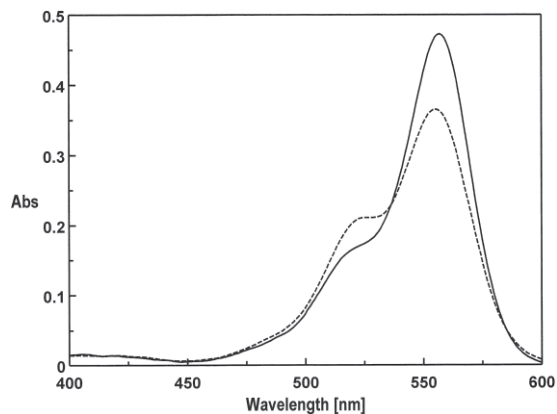
- [1] Coleman, J.E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct* 1972, 21, 441-483.
- [2] Millán, J.L. Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signalling* 2006, 2, 335–341.
- [3] Giannini, E.G.; Testa, R.; Savarino, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Can. Med. Assoc. J* 2005, 172, 367–379.
- [4] Stinghen, S.T.; Moura, J.F.; Zancanella, P.; Rodrigues, G.A.; Pianovski, M.A.; Lalli, E.; Arnold, D.L.; Minozzo, J.C.; Calfe, L.G.; Ribeiro, R.C.; Figueiredo, B.C. Specific Immunoassays for Placental Alkaline Phosphatase as a Tumor Marker. *J. Biomed. Biotechnol* 2006, Article ID 56087, 1-8.
- [5] Fernley, H.N.; Walker, P.G. Kinetic behaviour of calf-intestinal alkaline phosphatase with 4-methylumbelliferyl phosphate. *Biochem. J* 1965, 97, 95–103.
- [6] Gu, X.; Zhang, G.; Wang, Z.; Liu, W.; Xiao, L.; Zhang, D. A new fluorometric turn-on assay for alkaline phosphatase and inhibitor screening based on aggregation and deaggregation of tetraphenylethylene molecules. *Analyst* 2013, 138, 2427–2431.
- [7] Levine, M.N.; Raines, R.T. Sensitive fluorogenic substrate for alkaline phosphatase. *Anal. Biochem* 2011, 418, 247–252.
- [8] Harbron, S.; Eggelte, H.J.; Fisher, M.; Rabin, B.R. Amplified assay of alkaline phosphatase using flavin-adenine dinucleotide phosphate as substrate. *Anal. Biochem* 1992, 206, 119–124. R. Seethala, R. Menzel, A fluorescence polarization competition immunoassay for tyrosine kinases, *Anal. Biochem.* 255 (1998) 257–262.
- [9] Liu, Y.; Schanze, K.S. Conjugated polyelectrolyte-based real-time fluorescence assay for alkaline phosphatase with pyrophosphate as substrate. *Anal. Chem* 2008, 80, 8605–8612.

- [10] Wang, F.; Li, Y.; Li, W.; Zhang, Q.; Chen, J.; Zhou, H.; Yu, C. A facile method for detection of alkaline phosphatase activity based on the turn-on fluorescence of resorufin. *Anal. Methods* 2014, 6, 6105–6109.
- [11] Kinoshita, E.; Takahashi, M.; Takeda, H.; Shiro, M.; Koike, T. Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) complex. *Dalton Trans* 2004, 1189–1193.
- [12] Kinoshita, E.; Yamada, A.; Takeda, H.; Kinoshita-Kikuta, E.; Koike, T. Novel immobilized zinc(II) affinity chromatography for phosphopeptides and phosphorylated proteins. *J. Sep. Sci* 2005, 28, 155–162.
- [13] Kinoshita, E.; Kinoshita-Kikuta, E.; Takiyama, K.; Koike, T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 2006, 5, 749–757.
- [14] Kinoshita-Kikuta, E.; Aoki, Y.; Kinoshita, E.; Koike, T. Label-free kinase profiling using phosphate affinity polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol. Cell. Proteomics* 2007, 6, 356–366.
- [15] Tsunehiro, M.; Meki, Y.; Matsuoka, K.; Kinoshita-Kikuta, E.; Kinoshita, E.; Koike, T. A Phos-tag-based magnetic-bead method for rapid and selective separation of phosphorylated biomolecules. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci* 2013, 925, 86–94.
- [16] Takiyama, K.; Kinoshita, E.; Kinoshita-Kikuta, E.; Fujioka, Y.; Kubo, Y.; Koike, T. A Phos-tag-based fluorescence resonance energy transfer system for the analysis of the dephosphorylation of phosphopeptides. *Anal. Biochem* 2009, 388, 235–241.
- [17] Somura, M.; Takiyama, K.; Kinoshita-Kikuta, E.; Kinoshita, E.; Koike, T. A Phos-tag-based fluorescence resonance energy transfer system for the analysis of the kinase reaction of a substrate peptide. *Anal. Methods* 2011, 3, 1303–1309.
- [18] Kinoshita-Kikuta, E.; Kurosaki, H.; Kunisada, N.; Kinoshita, E.; Koike, T. A Phos-Tag-Based Fluorescence Quenching System for Activity Assay and Inhibitor Screening for Alkaline Phosphatase. *Am. J. Anal. Chem* 2014, 5, 796–804.

- [19] Sapsford, K.E.; Berti, L.; Medintz, I.L. Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: beyond traditional donor-acceptor combinations. *Angew. Chem. Int. Ed* 2006, 45, 4562–4588.
- [20] Blackman, M.J.; Corrie, J.E.T.; Croney, J.C.; Kelly, G.; Eccleston, J.F.; Jameson, D.M. Structural and biochemical characterization of a fluorogenic rhodamine-labeled malarial protease substrate. *Biochemistry* 2002, 41, 12244–12252.
- [21] Christie, R.J.; Tadiello, C.J.; Chamberlain, L.M.; Grainger, D.W. Optical properties and application of a reactive and bio-reducible thiol-containing tetramethylrhodamine dimer. *Bioconjugate Chem* 2009, 20, 476–480.
- [22] Vaasa, A.; Viil, I.; Enkvist, E.; Viht, K.; Raidaru, G.; Lavogina, D.; Uri, A. High-affinity bisubstrate probe for fluorescence anisotropy binding/displacement assays with protein kinases PKA and ROCK. *Biochem* 2009, 385, 85–93.
- [23] Whyte, M.P.; Landt, M.; Ryan, L.M.; Mulivor, R.A.; Henthorn, P.S.; Fedde, K.N.; Mahuren, J.D.; Coburn, S.P. Alkaline phosphatase: placental and tissue-nonspecific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5'-phosphate. Substrate accumulation in carriers of hypophosphatasia corrects during pregnancy. *J. Clin. Invest* 1995, 95, 1440–1445.
- [24] Fosset, M.; Chappellet-Tordo, D.; Lazdunski, M. Intestinal alkaline phosphatase. Physical properties and quaternary structure. *Biochemistry* 1974, 13, 1783–1788.

7. Supplementary materials

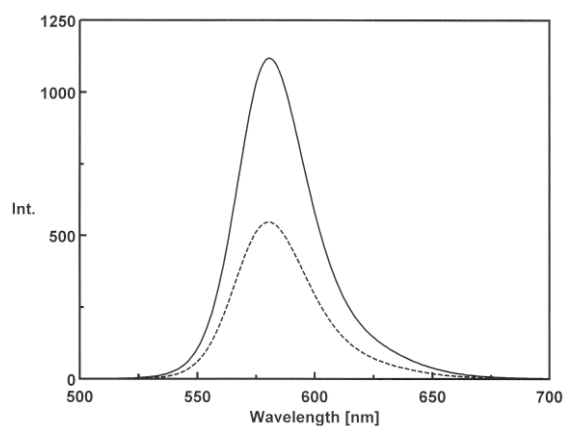
Supplemental Figure S1.



Visible absorption spectra at pH 7.4 (10 mM Hepes–NaOH, 0.10 M NaCl) and 25 °C.

Solid curve: 5.0 μM TAMRA–Phos-tag, $\lambda_{\text{max}} = 557 \text{ nm}$ ($\epsilon = 9.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Broken curve: 5.0 μM TAMRA–Phos-tag + 10 μM pyrophosphate, $\lambda_{\text{max}} = 557 \text{ nm}$
($\epsilon = 7.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)



Fluorescence emission spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 523 \text{ nm}$) at pH 7.4 (10 mM Hepes–NaOH, 0.10 M NaCl) and 25 °C.

Solid curve: 5.0 μM TAMRA–Phos-tag (dotted curve), $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$ (relative intensity = 100%)

Broken curve: 5.0 μM TAMRA–Phos-tag + 10 μM pyrophosphate, $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$
(relative intensity = 49%)

pH 7.4 の緩衝液(10 mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl)中における, 5.0 μ M TAMRA-Phos-tag もしくは 5.0 μ M TAMRA-Phos-tag と 2.5 μ M ピロリン酸を混合した試料溶液について, 25 $^{\circ}$ C の条件下で分子分光分析を行った。Supplemental Figure S1 の上グラフは可視吸収スペクトル, 下グラフは蛍光スペクトル($\lambda_{em} = 580$ nm)の結果を示している。まず可視吸収スペクトルより, TAMRA-Phos-tag とピロリン酸を混合することで TAMRA-Phos-tag の 557 nm における可視吸光度は減少し, 一方で 520 nm 付近の吸収帯であるショルダーの強度が増した。これらのスペクトルの顕著な変化は, Fig. 2 に示される TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA が 1:1 で複合体を形成する際のスペクトル変化と合致していた。次に, TAMRA-Phos-tag とピロリン酸による TAMRA-Phos-tag 二量体形成における, 二分子の TAMRA による蛍光クエンチングについて検証した。可視吸収スペクトルの結果より 523 nm を励起光とし蛍光スペクトルを測定した結果, TAMRA-Phos-tag とピロリン酸を混合することで 580 nm の蛍光強度は顕著に減少した。このスペクトルの顕著な変化は, Fig. 3 に示される TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA の等量混合試料におけるスペクトル変化と合致していた。

Appendixes

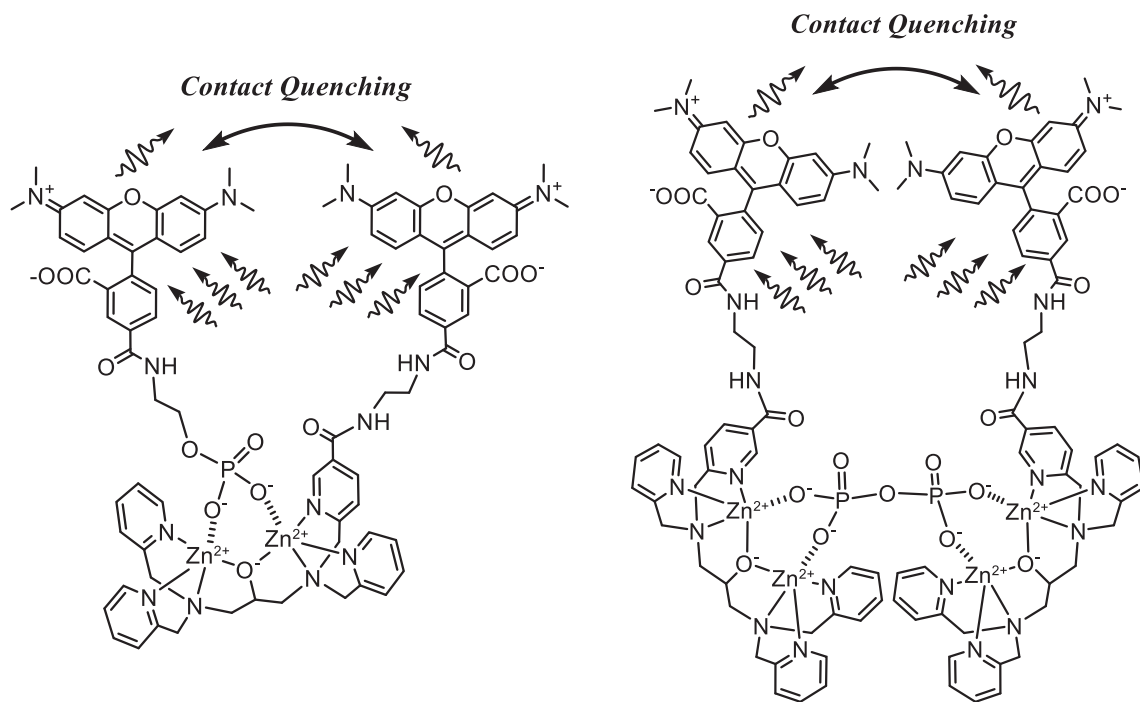
8.1	TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステム	31
8.2	新規 Phos-tag 誘導体の合成について	33
8.2.1	TAMRA-Phos-tag の合成	33
8.2.2	TAMRA-PEA の合成	35
8.3	TAMRA-Phos-tag の基礎分析データ	37
8.3.1	^1H NMR	37
8.3.2	^{13}C NMR	38
8.3.3	IR スペクトル	39
8.3.4	MS スペクトル	40
8.3.5	TAMRA-Phos-tag の蛍光量子収率の測定	41
8.4	アルカリホスファターゼ分析の臨床的意義	44
8.5	アルカリホスファターゼの活性分析について	45
8.5.1	主流なアルカリホスファターゼ分析法	45
8.5.2	アルカリホスファターゼアイソザイムの分析法	46
8.5.3	アルカリホスファターゼ分析における課題点	47
8.6	アルカリホスファターゼ活性のリアルタイム蛍光分析	49
8.6.1	測定溶液の調製	49
8.6.2	アルカリホスファターゼ活性についての蛍光測定	49
8.6.3	アルカリホスファターゼ活性の評価	50
8.7	阻害剤プロファイリングの検証	52
8.7.1	測定溶液の調製	53
8.7.2	アルカリホスファターゼ活性についての蛍光分析	53
8.7.3	阻害剤を含む測定溶液の調製	54
8.7.4	アルカリホスファターゼ活性についての蛍光測定	55
8.7.5	阻害剤プロファイリングの評価	55

8.1 TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステム

本研究におけるアルカリホスファターゼ活性分析は、蛍光を消光する性質を有する分子(クエンチャー分子)である TAMRA 二分子による分子間蛍光クエンチングを原理としている。この現象は静的消光(Static Quenching)と動的消光(Dynamic Quenching)により成立する。静的消光とは、蛍光分子と消光分子が極めて近い距離(おおよそ 1 nm 以下)に接近することで非蛍光性の基底状態複合体を形成し消光を示す。この基底状態複合体には、電荷移動相互作用による電荷移動錯体や π - π 相互作用によるスタッキングの形成が関与している。一方 FRET(Fluorescence resonance energy transfer)現象などの動的消光では、蛍光分子と消光分子がやや離れた距離(おおよそ 10 nm 以下)に存在し互いの励起エネルギーを交換し合うことで消光を示す。そもそも TAMRA は蛍光色素分子であり、励起された単分子の TAMRA は基底状態に戻る際に生じる余分なエネルギーの一部を蛍光や熱エネルギーなどの形に変換して分子外へ放出する。しかし、クエンチャー分子でもある TAMRA の特徴として TAMRA 二分子が近接している場合においては、TAMRA の芳香族部位でスタッキングを生じ基底状態複合体を形成することによる静的消光もしくは TAMRA 二分子の分子間で励起エネルギーを交換する動的消光により、蛍光を消光することができる。

本研究では、二種類の蛍光消光システム(TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステム; 次頁図)を開発した。一つは、TAMRA 誘導体である TAMRA-Phos-tag とアルカリホスファターゼの人工基質である TAMRA-PEA を用い、モノリン酸と Phos-tag による複合体を利用する方法である。この場合、TAMRA 二分子が接近し動的消光より静的消光の方が優位に働く。もう一つは、TAMRA-Phos-tag とアルカリホスファターゼの天然基質であるピロリン酸を用いる、ビスリン酸を架橋分子とする TAMRA-Phos-tag 二量体を利用する方法である。この場合、複合体形成に伴う立体的要因により静的消光より動的消光の方が優位に働く。どちらの分析法も Phos-tag がリン酸モノエステルイオンを捕捉するし基質複合体を形成することにより、TAMRA 二分子が接近し TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングを生じ

る。なお、分子モデルより推定される本研究での TAMRA 二分子の距離はおおよそ 2 nm 以下である。



TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA の複合体形成による蛍光クエンチング(左図)
ピロリン酸を架橋分子とする TAMRA-Phos-tag 二量体による蛍光クエンチング
(右図)

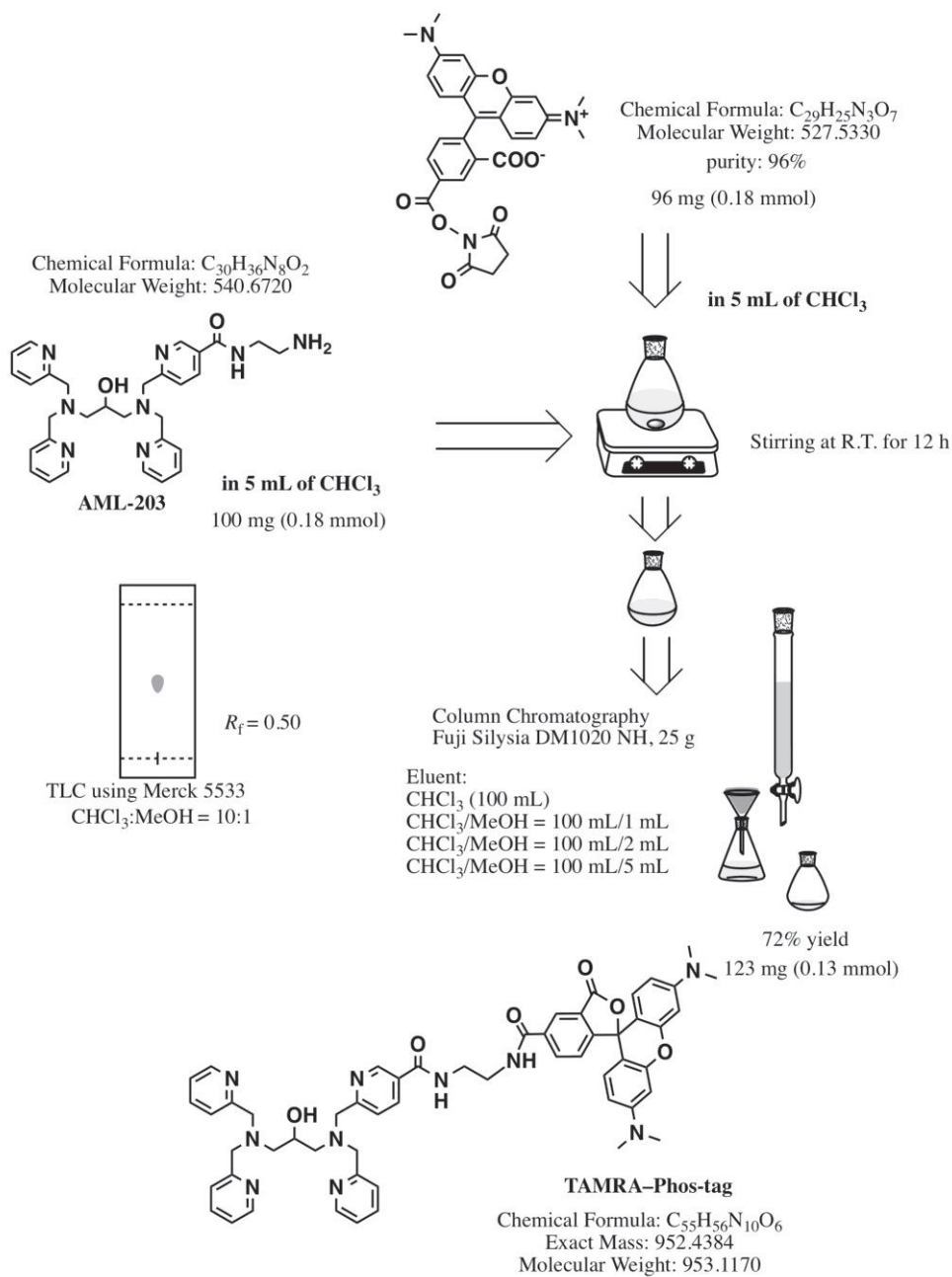
8.2 TAMRA ラベル化誘導体の合成について

本研究では、TAMRA 誘導体である TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA を 5-TAMRA-NHS と一級アミン誘導体を用いて以下の通り合成を行った。

8.2.1 TAMRA-Phos-tag の合成

まず、5-TAMRA-NHS 96 mg (0.18 mmol)を溶解したクロロホルム 5 mL の溶液と、アミノペンダント基含有 Phos-tag リガンド分子 100 mg (0.18 mmol)を溶解したクロロホルム 5 mL を調製した。両溶液をナスフラスコへ加え、室温中 12 時間、スターラーで攪拌させながら反応させた。エバポレーターにより溶媒を留去した後の残存溶液をアミノシリカゲル NH-DM 1020 に通し、溶離液(CHCl₃ = 100 mL, CHCl₃/CH₃OH = 100 mL/1 mL, CHCl₃/CH₃OH = 100 mL/2 mL, CHCl₃/CH₃OH = 100 mL/5 mL)を用いて溶出を行った。アミノシリカゲル NH-DM 1020 はカラム表面のシラノール基にアミノプロピル基を結合させたカラムであり、順相クロマトグラフィーを原理とする。そのため、反応生成物である TAMRA カルボン酸、*N*-ヒドロキシスクシイミド、アミノペンダント基含有 Phos-tag リガンド分子を捕捉し、TAMRA ラベル化 Phos-tag リガンド分子を分離することができる。エバポレーターにより得られた溶出液から溶離液を留去することで、黒紫色の粉末 123 mg(TAMRA-Phos-tag として 0.13 mmol)を得ることができた。なお、収率は 72%であった。粉末の適量を CHCl₃/CH₃OH = 10:1 に溶解し TLC を用いて確認を行った結果、R_f = 0.50 のワンスポットとなり TAMRA-Phos-tag が精製されていることが確認できた。次頁に TAMRA-Phos-tag の合成 scheme を示す。

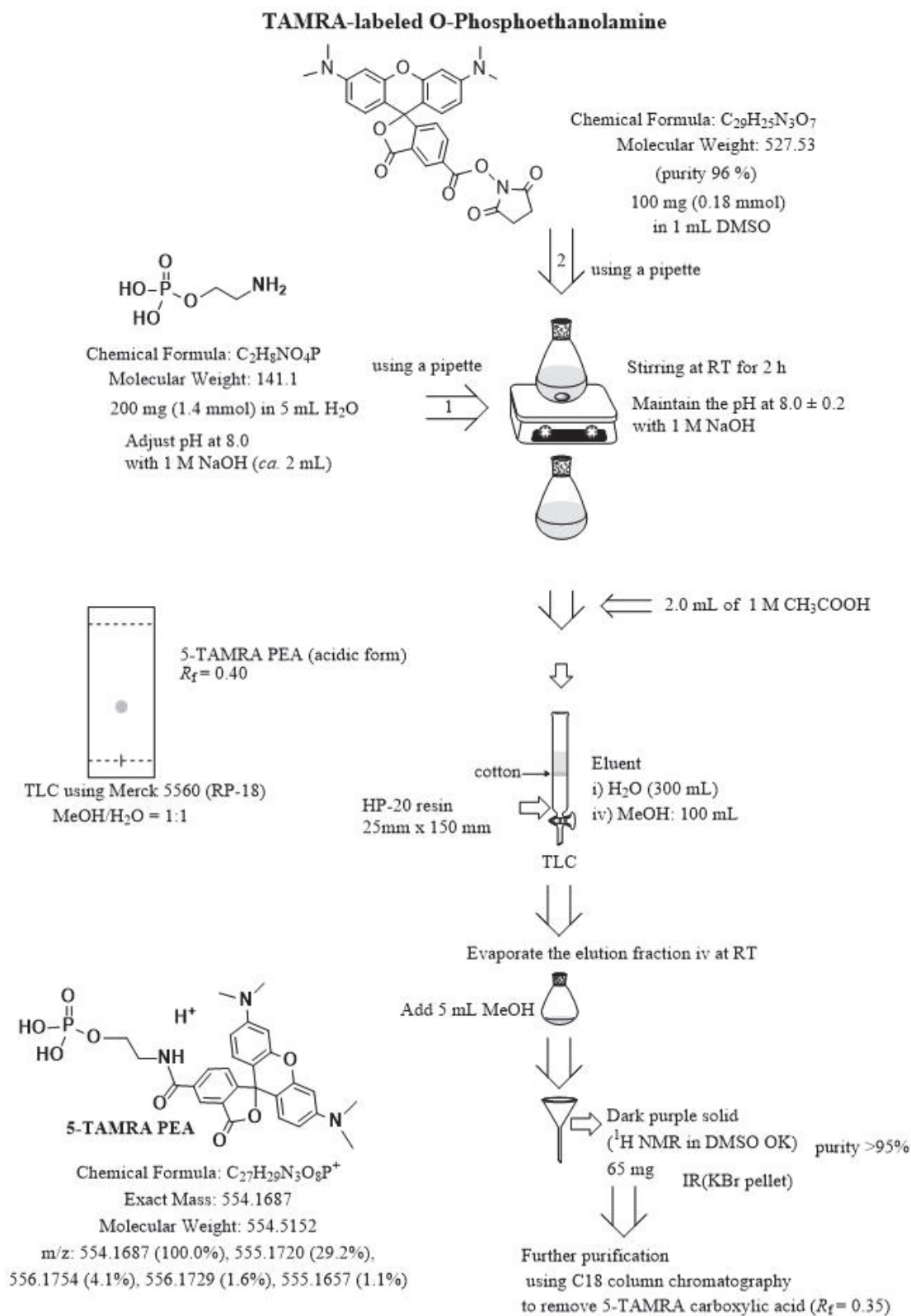
TAMRA-Phos-tag 合成 scheme



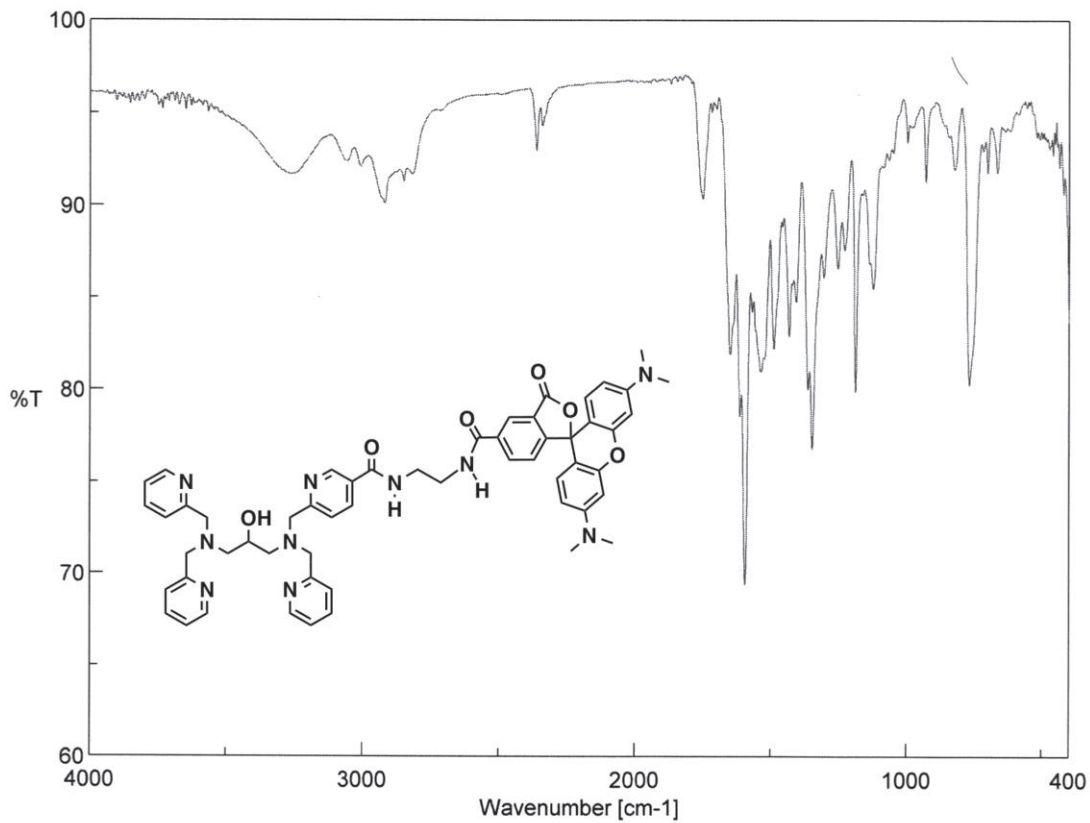
8.2.2 TAMRA-PEA の合成

まず、5-TAMRA-NHS 96 mg (0.18 mmol)を溶解した DMSO 1 mL の溶液と、*O*-リン酸エタノールアミン(PEA) 200 mg (1.4 mmol)を溶解し 1.0 M NaOH を用いて pH 8.0 とした水溶液 5.0 mL を調製した。両溶液をナスフラスコへ加え、室温中 2 時間、スターラーで攪拌させながら反応させた。なお、反応溶液は pH 8.0 ± 0.2 で保たれていた。反応溶液に 1.0 M の酢酸を 2.0 mL 加え酸性溶液とした後、ダイヤイオン HP-20 のカラム(内径; 25 mm, カラム長さ; 150 mm)に通した。ダイヤイオン HP-20 はスチレン-ジビニルベンゼン系合成吸着剤であり、合成された芳香族系化合物を容易に吸着することができる。最初に 300 mL の蒸留水をカラムに通すことで、余剰の PEA, 反応生成物である酢酸ナトリウムや *N*-ヒドロキシスクシイミドといった親水性化合物を除去した。合成化合物である TAMRA-PEA, 微量に残存する 5-TAMRA-NHS や TAMRA カルボン酸といった TAMRA 誘導体はカラムに保持されるため、メタノール(100 mL)にて溶出を行った。エバポレーターにより得られた溶出液から溶離液を留去して濃縮し、C₁₈ カラムコスモシール 140C₁₈-OPN(溶出液; CHCl₃/CH₃OH = 50:1)を用いて精製を行った。C₁₈ カラム 140C₁₈-OPNはカラム表面のシラノール基にオクタデシルシリル基(ODS 基)を結合させたカラムであり、逆相クロマトグラフィーを原理とする。そのため、5-TAMRA-NHS や TAMRA カルボン酸を捕捉し TAMRA-PEA を分離することができる。黒紫色の粉末 65 mg (TAMRA-PEA として 0.12 mmol)が得られ、収率は 65%であった。粉末の適量を CH₃OH /H₂O = 1:1 に溶解し TLC を用いて確認を行った結果、R_f = 0.40 のワンスポットとなり TAMRA-PEA が精製されていることが確認できた。次頁に TAMRA-PEA の合成 scheme を示す。

TAMRA-PEA 合成 scheme



8.3.3 IR スペクトル(with a KCl pellet)



[コメント情報]

試料名
コメント
測定者
所属
会社 HU

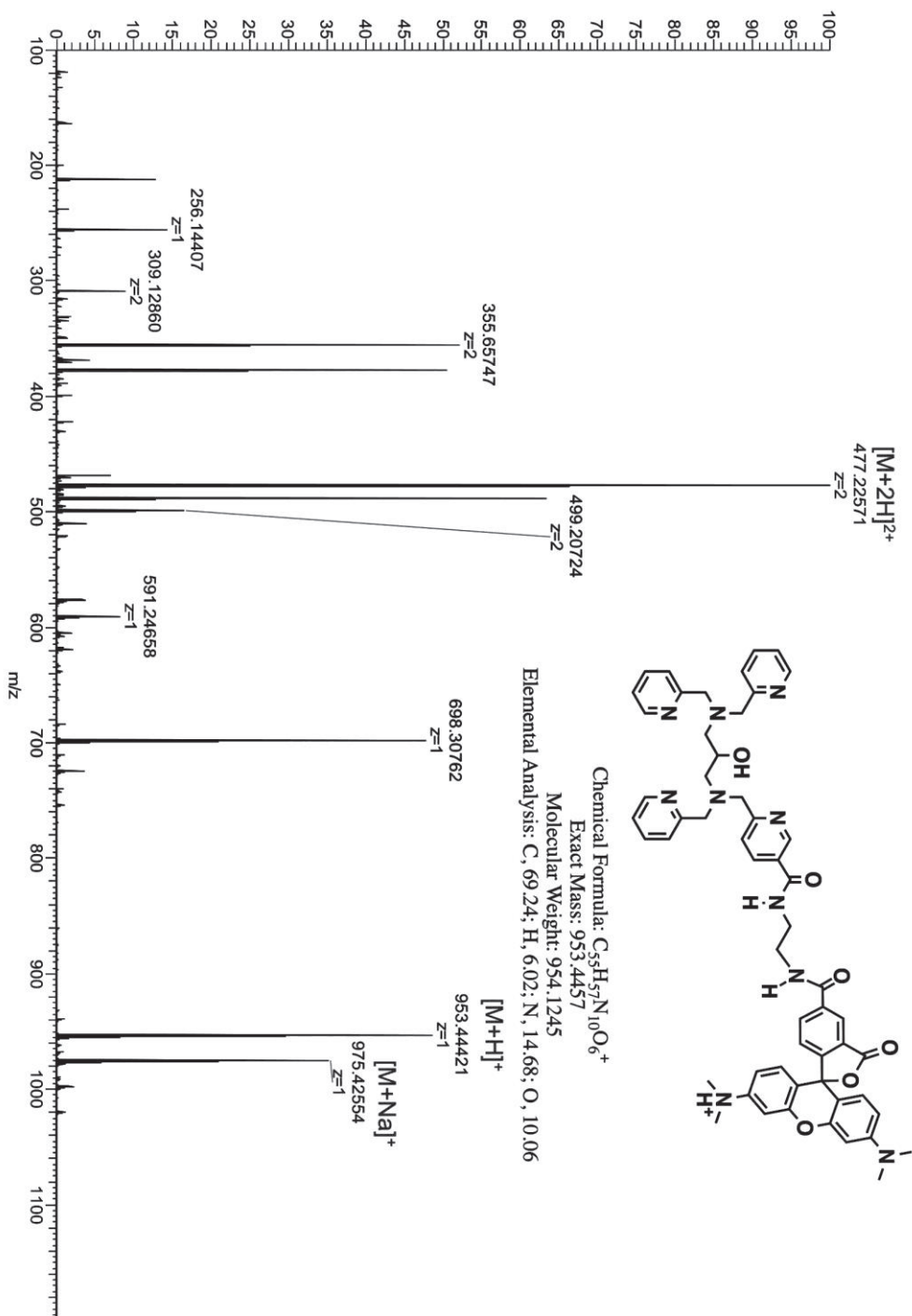
[測定情報]

機種名 FT/IR-4600typeA
シリアル番号 D015461786
測定日時 2016/12/26 10:19
光源 標準光源
検出器 TGS
積算回数 Auto (13)
分解 4 cm⁻¹
ゼロフィリング On
アポダイゼーション Cosine
ゲイン Auto (1)
アパーチャー Auto (7.1 mm)
スキャンスピード Auto (2 mm/sec)
フィルタ Auto (30000 Hz)

[データ情報]

作成日時 2016/12/26 10:24
データタイプ 等間隔データ
横軸 Wavenumber [cm⁻¹]
縦軸 %T
スタート 349.053 cm⁻¹
エンド 7800.65 cm⁻¹
データ間隔 0.964233 cm⁻¹
データ数 7729

8.3.4 MS スペクトル(High-resolution MS, in MeOH)



8.3.5 TAMRA–Phos-tag の相対蛍光量子収率の測定

蛍光分析で測定される蛍光強度は、励起光を吸収して励起した蛍光分子が基底状態に戻る際に放出する光量子数として検出される。そして、この蛍光強度に影響を与えるパラメーターの一つに蛍光分子の蛍光量子収率がある。蛍光量子収率は蛍光分子が吸収した光量子数と放出した光量子数の比率(<1.0)で示され、蛍光量子収率が大きいほど蛍光として発光する効率が良いことを意味する。

標準物質である Rhodamine B の補正された蛍光スペクトルを用いて、TAMRA–Phos-tag の相対蛍光量子収率を算出した。まず、励起光を 542 nm として、10 mM HEPES–NaOH (pH 7.4) を含むエタノール溶媒に溶解した 5 μ M Rhodamine B (全量 4.0 mL, 25 $^{\circ}$ C) を用いた結果、Rhodamine B の蛍光量子収率は 0.65 と推定された。同様に励起光を 542 nm として、同一の溶媒中における 5.0 μ M TAMRA–Phos-tag の吸光度と蛍光スペクトルのピーク面積を測定した。Rhodamine B の吸光度、蛍光ピーク面積、蛍光量子収率を用いると、TAMRA–Phos-tag の蛍光量子収率は 0.30 と算出された。計算には次式を用いた。

$$\Phi_x = \Phi_{st} \cdot A_{st} \cdot FA_x / A_x \cdot FA_{st}$$

Φ_x = 試料(TAMRA–Phos-tag)の蛍光量子収率

Φ_{st} = 標準物質(Rhodamine B)の蛍光量子収率

FA_x = 試料(TAMRA–Phos-tag)の蛍光ピーク面積

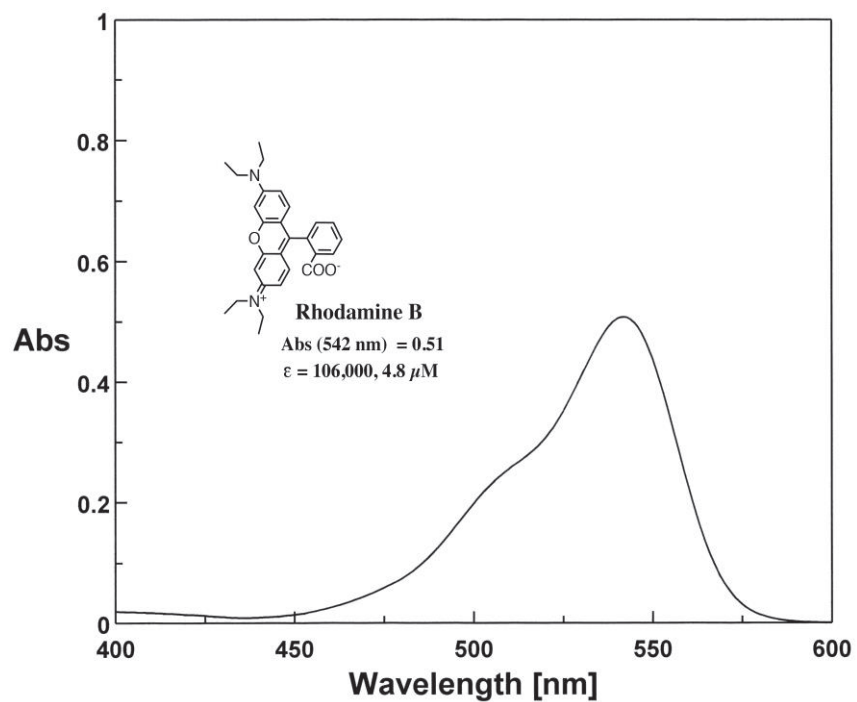
FA_{st} = 標準物質(Rhodamine B)の蛍光ピーク面積

A_x = 試料(TAMRA–Phos-tag)の吸光度

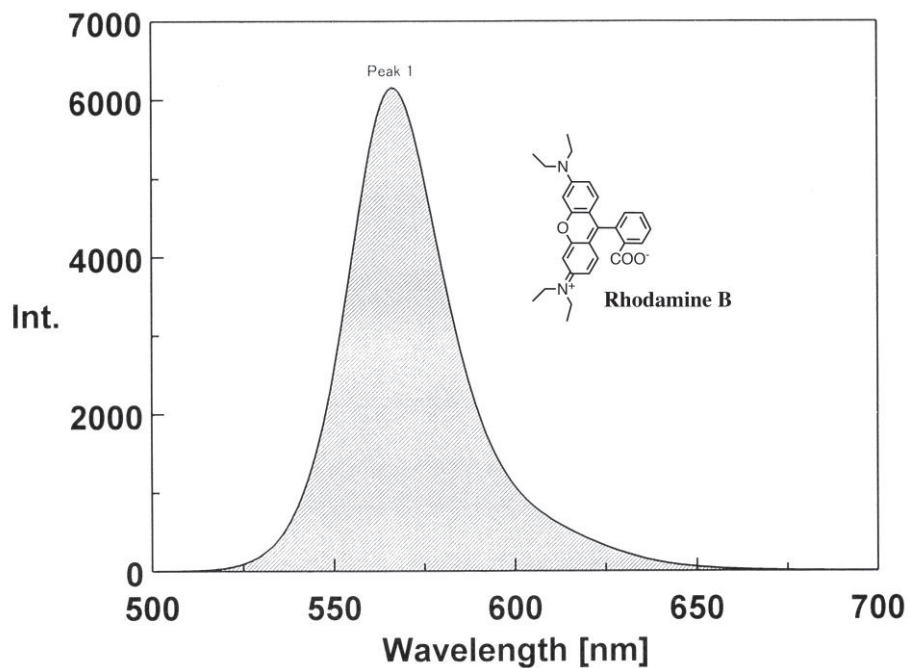
A_{st} = 標準物質(Rhodamine B)の吸光度

5 μ M Rhodamine B と 5.0 μ M TAMRA–Phos-tag の吸光度や蛍光ピーク面積の測定結果について、可視吸収スペクトルと蛍光スペクトルを次頁以降に示す。

可視吸収スペクトル(5 μ M Rhodamine B)



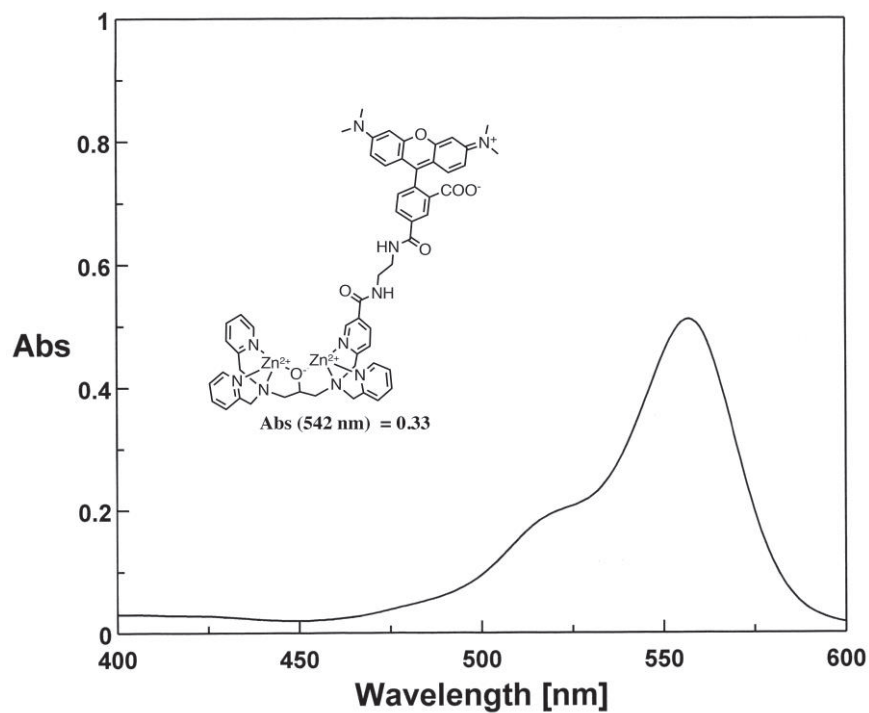
蛍光スペクトル(5 μ M Rhodamine B)



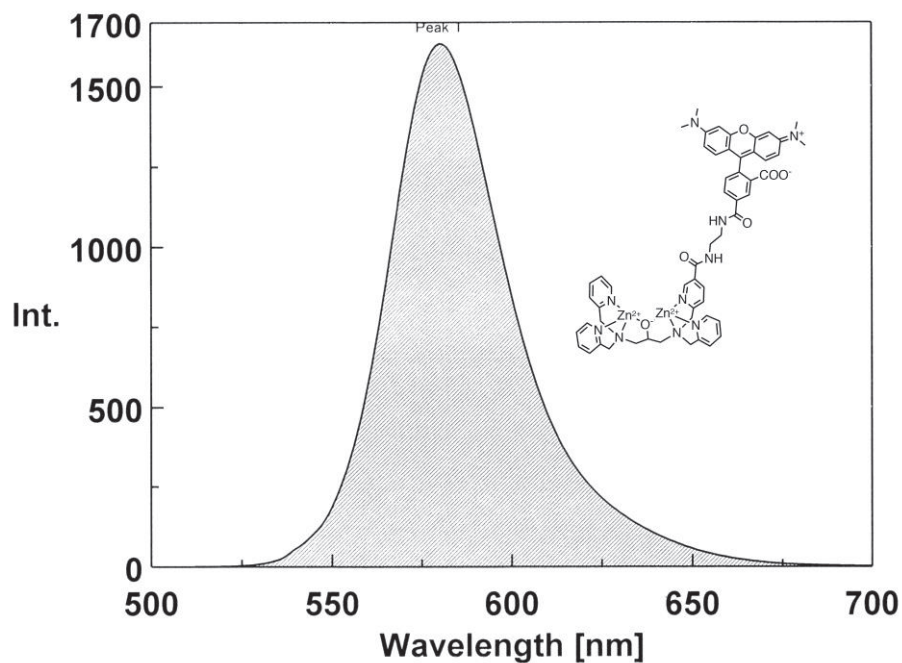
[ピーク面積計算結果]

ピーク	計算範囲	ベース範囲	面積
ピーク1	-----	514 698	232086

可視吸収スペクトル(5.0 μM TAMRA-Phos-tag)



蛍光スペクトル(5.0 μM TAMRA-Phos-tag)



[ピーク面積計算結果]

ピーク	計算範囲	ベース範囲	面積
ピーク 1	-----	514 698	70076.8

8.4 アルカリホスファターゼ分析の臨床的意義

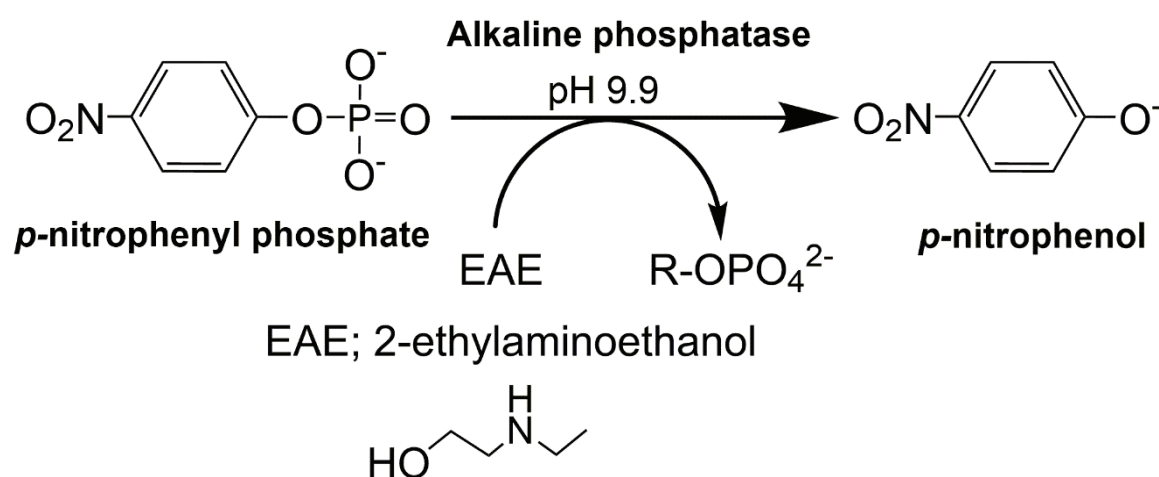
アルカリホスファターゼの中には臓器によって特異的なアイソザイム(酵素としての触媒活性はほぼ同一であるがタンパク質構造が異なる分子種)が存在し、アルカリホスファターゼアイソザイムの起源となる臓器として、胆道、肝臓、骨、小腸、胎盤がある。そのため、臨床現場では血清アルカリホスファターゼの活性評価や個々のアイソザイムの分析結果が疾患の診断における重要な手掛かりとなっている。例えば、血清アルカリホスファターゼを検査することで胆肝道系疾患、骨代謝の亢進異常、潰瘍性大腸炎、妊娠状態といった臨床評価を行うことができる。各アイソザイムと臨床的意義について下記表に示す。

血清アルカリホスファターゼ 主なアイソザイム	臓器由来	主な関連疾患
ALP ₁	肝臓 (高分子型)	閉塞性黄疸 限局性肝障害
ALP ₂	肝臓	肝疾患 胆道疾患
ALP ₃	骨	骨生成異常(小児に多い) 副甲状腺機能亢進症 前立腺癌などの骨転移
ALP ₄	胎盤	妊娠末期 卵巣癌、肺癌
ALP ₅	小腸	糖尿病 腎不全 肝硬変(血液型がBまたはO型)
ALP ₆	骨・肝臓	潰瘍性大腸炎

8.5 アルカリホスファターゼの活性分析について

8.5.1 主流なアルカリホスファターゼ分析法

古くからある分析法には基質にフェニルリン酸を用いる Kind-King 法があったが、現在では分析の自動化に伴い本法に代わる様々な分析法が提唱されている。現在勧告されている主流な分析法には、pH 9.9・30 °Cに調整した緩衝液 2-エチルアミノエタノール(EAE)を用いる JSCC 法(日本臨床化学会), pH 9.8・25 °Cに調整した緩衝液ジエタノールアミンを用いる GSCC 法(ドイツ臨床化学会), pH 10.4・30 °Cに調整した緩衝液 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール(AMP)を用いる IFCC 法(国際臨床化学連合)がある。特に日本の臨床分析では、EAE を用いる JSCC 法が汎用されているが、これは EAE が緩衝剤としての機能だけではなくリン酸基受容体基質としての機能を持つからである。EAE は骨・肝・小腸・胎盤など各アルカリホスファターゼアイソザイムに対する反応性が均一でありその結果、いずれのアルカリホスファターゼアイソザイムの活性も測定することができる。なお、この分析法の主な基質は人工基質である *p*-ニトロフェニルリン酸であり、アルカリ性条件におけるアルカリホスファターゼの加水分解活性を測定することを原理としている(下図)。



この加水分解反応は、まずアルカリホスファターゼの活性部位である二核亜鉛錯体が *P*-ニトロフェニルリン酸を捕捉することから始まる。続いて、アルカリホスファターゼのセリン水酸基がリン酸化されたホスホセリン中間体を生成し、そこへ EAE が主なリン酸基の受容体として働くことで加水分解反応が完了する。測定環境がアルカリ性条件(pH 9.9)であるのは、この EAE の加水分解反応が促進しやすい条件ということが主な理由である。その他にも、アルカリ性水溶液中では *P*-ニトロフェノールがイオン型で安定していること、アルカリ性条件とすることで酸性から中性に至適 pH を持つ酵素の活性を抑制しアルカリホスファターゼ活性をより検出しやすいことが考えられる。これらの理由から、アルカリホスファターゼの加水分解活性の至適 pH はアルカリ性であると言える。加水分解反応後は *P*-ニトロフェノールは 400 nm~410 nm に吸収極大波長を示すため、*P*-ニトロフェノールの生成による吸収極大波長における吸光度の増加速度を加水分解活性として測定し、その測定結果をアルカリホスファターゼの臨床検査値に反映している。

8.5.2 アルカリホスファターゼのアイソザイム分析法

血清アルカリホスファターゼ分析の結果、アルカリホスファターゼが基準値を超えた異常値を示す場合は、続いて電気泳動分析やアフィニティークロマトグラフィ分析によりアルカリホスファターゼアイソザイムの分析が行われる。アルカリホスファターゼアイソザイムは通常、各臓器において糖脂質である GPI を介して細胞膜表面にアンカー型として結合した膜結合型と、骨形成時など何らかの要因で細胞内から分泌される分泌型の二種類が存在する。また、肝臓由来の一部のアイソザイムではホスホリパーゼにより GPI アンカーが切断され小分子型として全身に広く存在している場合もある。これらは生体内で自然な状態であるが、疾患により臓器障害が起きた場合には、通常の血液検査では検出されない細胞膜から解離した GPI アンカー結合型のアルカリホスファターゼアイソザイムや、細胞障害により血中に漏れ出した分泌型アルカリホスファターゼアイソザイムが検出されやすくなる。そのため、アルカリホスファターゼの活性だけでなくアイソザイ

ムの分析を行うことは、各種疾患の解析や診断、さらには予後の経過観察を行う上で重要であり臨床検査にも応用されている。

現在、主流なアルカリホスファターゼのアイソザイムの分析法として、ポリアクリルアミドゲルやアガロースゲル/セルロースアセテート膜を用いる電気泳動法がある。アルカリホスファターゼアイソザイムは GPI アンカー結合型と非結合型に大別され、また臓器障害が起きた場合は血中に GPI アンカー結合型が増加する。この分子構造の違いを利用し、ポリアクリルアミドゲルの分子ふるい効果によりアルカリホスファターゼアイソザイムを分離測定することができる。アガロースゲルやセルロースアセテート膜を用いる方法ではアルカリホスファターゼアイソザイムにおける電荷の違いを利用することで分離測定を行う。アルカリホスファターゼアイソザイム間ではホモロジーを有することが多いが、スプライシングや糖付加といった修飾の過程でアミノ酸配列やタンパク構造に変化を生じるため、生理 pH におけるアルカリホスファターゼアイソザイム間の総電荷が異なることを利用した分析法である。また、染色法にはアルカリホスファターゼの基質となる、3-インドキシリン酸二ナトリウム塩や5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリリン酸-p-トルイジン塩を用いることで、酵素活性由来のバンドを検出する方法が有名である。

8.5.3 アルカリホスファターゼ分析における課題

現在の日本の臨床分析法は EAE を用いる JSCC 法である。この分析法が採用されている理由は、いずれのアルカリホスファターゼアイソザイムの活性も測定できることで、血清中のアイソザイムの上昇を感度良く検出できるからである。しかし、日本人においてはこの利点が臨床現場での診断を困難にしている場合がある。例えば、血液型が B・O 型の一部の人は疾患とは無関係に食事の後に小腸型アルカリホスファターゼ(ALP₅)が上昇し、異常がないにもかかわらず検査値が高値を示す要因となっている。一方日本以外の国では、AMP を用いる IFCC 法を採用していることが現状である。これは緩衝剤である AMP はリン酸基の受容体基質としての機能を持つが、EAE とは異なりアルカリホスファターゼアイソザイム

に対する反応性が均一ではないからである。つまり、小腸型アルカリホスファターゼ(ALP_5)の反応性を抑え、臨床的意義の高い肝・骨型アルカリホスファターゼ($ALP_1 \cdot ALP_2 \cdot ALP_3$)を優位に測定できるのである。このようにアルカリホスファターゼアイソザイムに対する阻害特異性が問題提起されており、臨床検査の分野においてもアイソザイムの特性を理解することに注目が集まっている。

前述の通り人には臓器部位に特異的なアルカリホスファターゼアイソザイムが存在し、生理環境下においてはアイソザイムの構造の違いから生まれる酵素の安定化や活性レベルの違いが生体制御に大きくかかわっていると考えられている。そのため、アルカリホスファターゼが臓器部位においてどれだけの活性があつてどのような生体制御を行っているのかを理解するうえでは、酵素活性の測定のみならずアイソザイム分析が重要な役割を担う。そのためには生理環境に近い条件で解析できなければならない。しかし、現時点では生理 pH にてアルカリホスファターゼと生体基質の親和性を利用する分析法は数少ないことが現状である。アイソザイム分析の重要性が高まっている中で、生理環境に近い条件で分析できる技術の開発は大きな課題である。

8.6 アルカリホスファターゼ活性のリアルタイム蛍光分析

TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA による TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムを用いて、ウシ小腸型アルカリホスファターゼによる TAMRA-PEA 加水分解活性のリアルタイム蛍光分析について検証を行った。2.5 μM TAMRA-Phos-tag と 2.5 μM TAMRA-PEA を含む測定溶液(pH 7.4)に対しアルカリホスファターゼを作用させることで、TAMRA-PEA が加水分解され複合体が解消することによる蛍光強度の回復を経時的に測定した(結果と考察の Fig. 1 を参照)。

8.6.1 測定溶液の調製

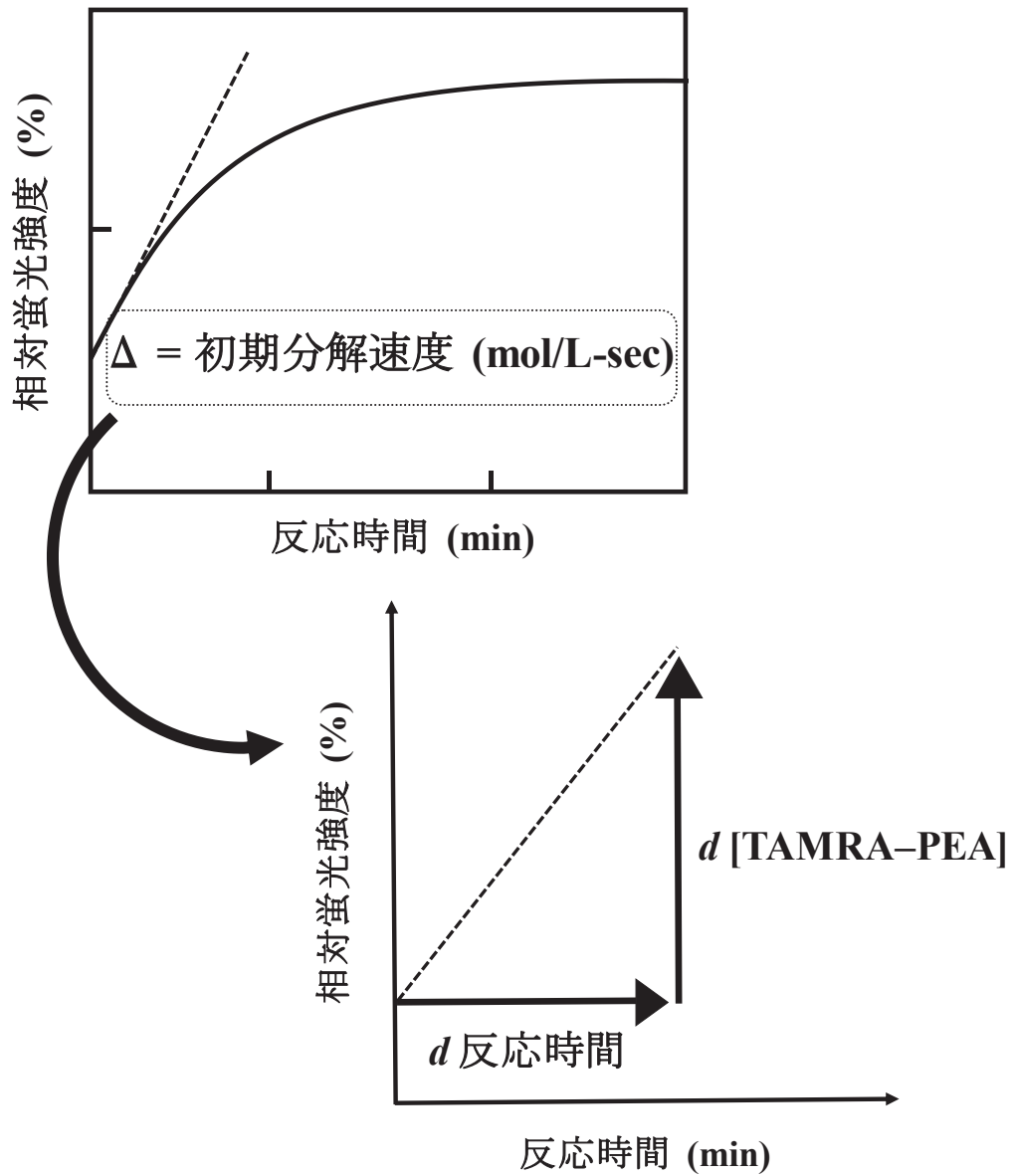
すべての測定溶液の作成について、おおよその比重を 1.0 として調製した試料溶液を用いた。電子天秤で測定しながら 1-cm 角キューベット(10 × 10 × 45 mm)に各試料溶液を加え、最終的に測定溶液の全量が 3.0 g (3.0 mL)となるように作成した。測定溶液の組成は、2.5 μM TAMRA-PEA, 2.5 μM TAMRA-Phos-tag, 0.10 mM MgCl_2 , 0.10 M NaCl, 10 mM HEPES-NaOH とし、生理 pH に近い pH 7.4 の溶液とした。

8.6.2 アルカリホスファターゼ活性についての蛍光測定

測定溶液の入った 1-cm 角キューベットを分光装置にセットし、測定溶液の温度を 25.0 ± 0.1 °C としてスターラーバーで攪拌し続けた。1 秒間隔で測定溶液に励起光を 523 nm を照射し蛍光 580 nm の蛍光強度を測定し始め、その直後にウシ小腸型アルカリホスファターゼ 15 μL を加え 20 分間かけて蛍光強度変化を測定し続けた。なお、ウシ小腸型アルカリホスファターゼの最終濃度は各測定溶液で 0.11, 0.33, 1.0, 3.0 units/mL となるようにした。

8.6.3 アルカリホスファターゼ活性の評価

蛍光強度の経時的変化のデータから 60 秒ごとの測定値を用いてプロット図を作成した(結果と考察の Fig. 4 を参照)。ウシ小腸型アルカリホスファターゼ 3.0 units/mL で加水分解した測定溶液のプラトーにおける蛍光強度を 100%とする各測定溶液の相対蛍光強度を縦軸, 反応時間を横軸とした。なお, TAMRA-Phos-tag と TAMRA-PEA の錯体生成の平衡の速度は極めて速く, この化学的安定性を利用することで本分析法に初速度法を適応することができた。初期時間では時間依存的な蛍光強度変化を示しているため, プロット図から各アルカリホスファターゼ濃度における初期時間の蛍光強度変化の割合(加水分解反応曲線の接線の傾き)を求め, TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムがアルカリホスファターゼの濃度依存的な活性分析に適用できることを評価した。なお, 接線の傾きは単位時間あたりの蛍光強度の変化, すなわち TAMRA-PEA に対するアルカリホスファターゼの初期加水分解速度を表している。詳細については次頁に示す。



アルカリホスファターゼが TAMRA-PEA を加水分解することで複合体が解離し、
 蛍光強度が回復する。そのため、単位時間当たりの蛍光強度変化は解離した複合
 体の割合を示すため、初速度法により加水分解速度を測定することができる。

8.7 阻害剤プロファイリングの検証

ピロリン酸を架橋分子とする TAMRA-Phos-tag 二量体による TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムを用いて、ウシ小腸型アルカリホスファターゼもしくは大腸菌型アルカリホスファターゼに対する競合的阻害剤(オルトバナジン酸イオン)の阻害剤プロファイリングについて検証を行った。まず事前検証として、本分析法がウシ小腸型アルカリホスファターゼによるピロリン酸の加水分解活性のリアルタイム蛍光分析に適用できることを確認した。

5.0 μM TAMRA-Phos-tag, 2.5 μM ピロリン酸を含む測定溶液(pH 7.4)に対しウシ小腸型アルカリホスファターゼもしくは大腸菌型アルカリホスファターゼを作用させ、ピロリン酸が加水分解されることによる蛍光強度の回復を経時的に測定した(結果と考察の Fig. 5 を参照)。蛍光強度変化を基に、初速度法を用いて測定した初期加水分解速度を 100%の活性とした。続いて、オルトバナジン酸イオンを加えた 5.0 μM TAMRA-Phos-tag, 2.5 μM ピロリン酸を含む測定溶液(pH 7.4)に対し、ウシ小腸型アルカリホスファターゼもしくは大腸菌型アルカリホスファターゼを作用させ蛍光強度変化を経時的に測定した。オルトバナジン酸イオンの濃度ごとに初速度法を用いて加水分解速度を求め、上記で求めたオルトバナジン酸イオンを含まない加水分解速度と比較したときの残存活性率を縦軸に、阻害剤濃度の対数値を横軸にプロットすることでシグモイド型の阻害曲線を作成した。また、阻害曲線よりそれぞれのアルカリホスファターゼアイソザイムに対する 50%阻害濃度(IC_{50})を求めた。

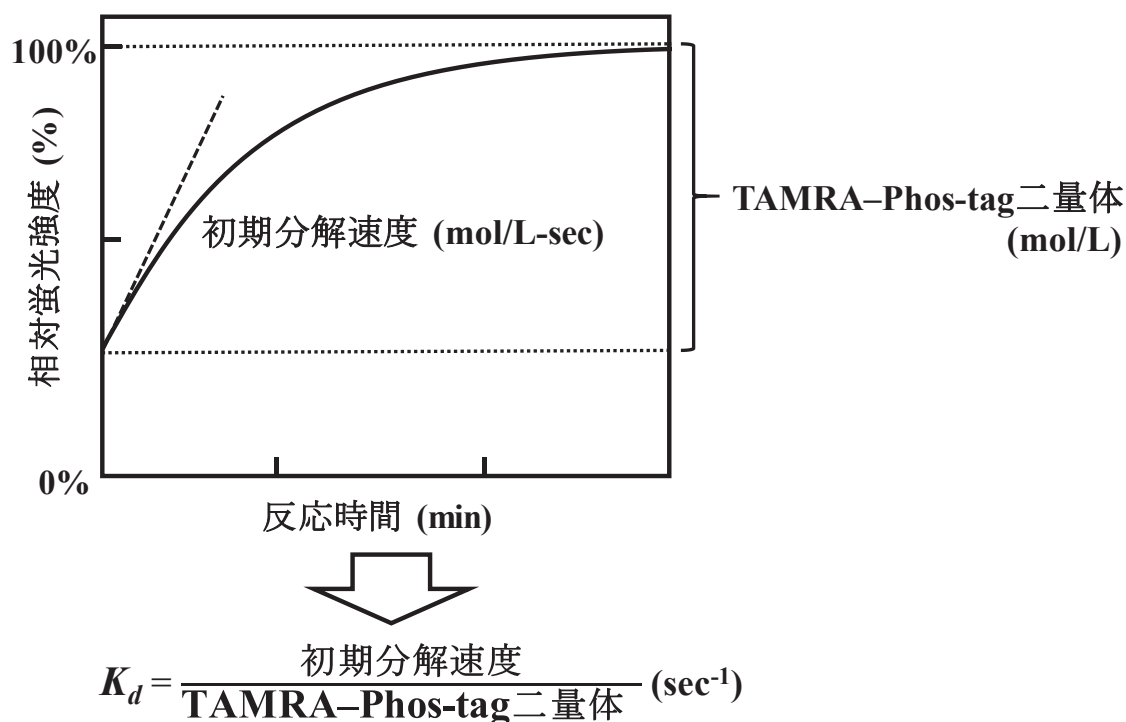
8.7.1 測定溶液の調製

すべての測定溶液の作成について、おおよその比重を 1.0 として調製した試料溶液を用いた。電子天秤で測定しながら 1-cm 角キュベット(10 × 10 × 45 mm)に各試料溶液を加え、最終的に測定溶液の全量が 3.0 g (3.0 mL)となるように作成した。測定溶液の組成は、2.5 μ M ピロリン酸, 5.0 μ M TAMRA-Phos-tag, 0.10 mM MgCl₂, 0.10 M NaCl, 10 mM HEPES-NaOH とし、生理 pH に近い pH 7.4 の溶液とした。

8.7.2 アルカリホスファターゼ活性についての蛍光分析

測定溶液の入った 1-cm 角キュベットを分光装置にセットし、測定溶液の温度を 25.0 ± 0.1 °C としてスターラーバーで攪拌し続けた。1 秒間隔で測定溶液に励起光を 523 nm を照射し蛍光 580 nm の蛍光強度を測定し始め、その直後にウシ小腸型アルカリホスファターゼを 15 μ L を加え 20 分間かけて蛍光強度変化を測定し続けた。なお、ウシ小腸型アルカリホスファターゼの最終濃度は各測定溶液で 0.025, 0.050, 0.075, 0.10 units/mL となるようにした。5.0 μ M TAMRA-Phos-tag を含む pH 7.4 の溶液の蛍光強度を 100%とする各測定溶液の相対蛍光強度を縦軸、反応時間を横軸とするプロット図を作成し、初期時間における蛍光強度変化より初期分解速度(加水分解反応曲線の接線の傾き)を求めた。さらに、初期分解速度を TAMRA-Phos-tag 二量体に該当するモル濃度をもって除することで、加水分解反応における擬一次速度定数を求めた。擬一次速度定数は単位時間あたりに加水分解されるピロリン酸の割合を示す(次頁図)。本分析法では生理 pH でのアルカリホスファターゼと天然基質であるピロリン酸の相互作用に基づく活性分析を行うことが重要であり、アルカリホスファターゼによる基質(TAMRA-PEA/ピロリン酸)の加水分解に伴う初期時間の蛍光強度変化から求められる初期加水分解速度もしくは擬一次速度定数をもって加水分解活性の評価を行った。なお、通常のアルカリホスファターゼの活性分析法ではアルカリホスファターゼと基質の速度論的指標として K_m 値を求めることが多い。しかし、本分析法は pH 7.4 の条件下で分析

を行っている一方、通常の活性分析法はアルカリ性条件下(pH 9 以上)で行われるため、双方の K_m 値を直接比較することはできない。



8.7.3 阻害剤を含む測定溶液の調製

すべての測定溶液の作成について、おおよその比重を 1.0 として調製した試料溶液を用いた。電子天秤で測定しながら 1-cm 角キューベット(10 × 10 × 45 mm)に各試料溶液を加え、最終的に測定溶液の全量が 3.0 g (3.0 mL)となるように作成した。測定溶液の組成は、2.5 μM ピロリン酸, 5.0 μM TAMRA-Phos-tag, 0.10 mM MgCl₂, 0.10 M NaCl, 10 mM HEPES-NaOH, オルトバナジン酸イオンとし、生理 pH に近い pH 7.4 の溶液とした。なお、測定溶液におけるオルトバナジン酸イオンの濃度は 0.010~30 μM となるようにした。

8.7.4 アルカリホスファターゼ活性についての蛍光測定

測定溶液の入った 1-cm 角キュベットを分光装置にセットし、測定溶液の温度を 25.0 ± 0.1 °C としてスターラーバーで攪拌し続けた。1 秒間隔で測定溶液に励起光を 523 nm を照射し蛍光 580 nm の蛍光強度を測定し始め、その直後にウシ小腸型アルカリホスファターゼもしくは大腸菌型アルカリホスファターゼ 15 μ L を加え約 10 分間かけて蛍光強度変化を測定し続けた。なお、ウシ小腸型アルカリホスファターゼの最終濃度は 0.05 units/mL、大腸菌型アルカリホスファターゼの最終濃度は 0.02 units/mL となるようにした。これらのアルカリホスファターゼ濃度については、蛍光測定中に初期分解速度が直線性を示す条件とした。

8.7.5 阻害剤プロファイリングの評価

8.7.2 と同様にして、各阻害剤濃度の測定溶液について、ウシ小腸型アルカリホスファターゼもしくは大腸菌型アルカリホスファターゼを用いた時の初期分解速度を求めた。なお、阻害剤を含まない測定溶液におけるウシ小腸型アルカリホスファターゼもしくは大腸菌型アルカリホスファターゼにおける加水分解速度を残存活性率 100%とする。阻害剤を含まない測定溶液における加水分解速度に対する各阻害剤濃度の測定溶液における加水分解速度の割合を計算することで残存活性率を算出し、求めた残存活性率を縦軸、阻害剤濃度の対数値を横軸とするシグモイド型の阻害曲線を作成した(結果と考察の Fig. 7 を参照)。阻害曲線から求められる各アルカリホスファターゼアイソザイムの 50%阻害濃度(IC_{50})を比較することで、ピロリン酸とアルカリホスファターゼアイソザイムの相互作用に基づく阻害剤プロファイリングにおける TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングシステムの適用性を評価した。

謝辞

終わりに臨み、本研究を実施する機会を頂き、また本研究を通して懇切丁寧な御指導また御鞭撻を受け賜りました主指導教員の小池透教授に、謹んで心より感謝の意を表します。初歩の段階から研究のアプローチを拝察し遂行するにあたり、先生の論理的思考と幅広い知識を受け賜わり、より良い研究成果につなげ学位論文に反映することができました。

実験データの分析・評価および学位論文の作成につきまして、細部にわたり貴重な御助言と御意見を賜りました副指導教員の木下英司准教授および木下恵美子助教授に、厚く感謝申し上げます。

貴重なお時間を学位論文の査読に割いていただき、多くの御助言と御激励を受け賜りました副指導教員の熊谷孝則准教授に、厚く感謝申し上げます。

本研究は学内外問わず多くの方々の御協力により成り立っております。高分解能質量分析データの御提供を受け賜りました、広島大学自然科学研究支援開発センターに御所属の網本智子様にも心より御礼申し上げます。

本論文を作成するにあたり、御迷惑をおかけしお世話になりました、同研究室の草本寛さん、河口真歩さんおよび同研究室卒業生の多幾山敬さん、宗村雅男さん、國貞 夏実さんに、感謝申し上げます。また、御協力および御支援いただきました医薬分子機能科学研究室に所属する全てのメンバーに対し感謝いたします。

最後に、広島大学大学院へ入学し医薬分子機能科学研究室に所属して以来、多くの方々に支えられ本学位論文を完成させるに至りました。本研究を含め学生生活では私に至らないところがあり御迷惑をおかけする事が多々ございましたが、そのような私に対し懇切丁寧にフォローし見守っていただいたことを大変幸せであったと実感しております。研究のみならず、研究室でのありとあらゆる経

験は私にとって大変貴重な財産です。今一度，本研究に御協力いただいた教職員の皆様，私の日々の研究室生活を温かく見守って下さいました家族および友人，お世話になりました皆様に心より感謝の意を表します。

2019年 芝 晃生