

P-5 非変性電気泳動に基づく高感度酵素アッセイ法の開発とバイオマーカー探索への応用

◎小松 徹^{1,4)}、吉岡健太郎¹⁾、花岡健二郎¹⁾、長野哲雄³⁾、浦野泰照^{1,2)}

1) 東大院薬、2) 東大院医、3) 東京大学創薬オープンイノベーションセンター、4) JST さきがけ

演者らは、生体サンプル中の酵素活性によって代謝され、これを光学特性の変化によって高感度に検出する有機小分子蛍光プローブを開発し、生体内の種々の酵素の機能を明らかにすることを目指した研究を進めてきた。

本研究では、このような有機小分子蛍光プローブを利用することにより、二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析において、特定の酵素活性を示すタンパク質のみを、活性に応じた形で網羅的に解析、探索することを可能とする研究手法の開発をおこなった (*J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6002-6005). 特定の酵素活性を有するタンパク質をプロテオーム中から見出すことを可能とする実験系として、非変性条件下の電気泳動によりタンパク質を分画し、電気泳動ゲル内の酵素アッセイによって活性を有するスポットを呈色するザイモグラフィ法が知られているが、従来の吸光度の変化を利用した酵素活性の検出においては、その検出感度の低さと検出精度の悪さが実用面での制約を与えていた。これを、高感度測定を可能にする蛍光プローブを

用いた酵素アッセイに適したものに発展させることを目指し、細分した電気泳動ゲルを 384 ウェルのマルチウェルプレートに分注し、ウェル内で蛍光アッセイをおこなう仕組みを新たに考案することにより、酵素反応のターンオーバーによるシグナルの増幅を活かし、高感度かつ高分解能をもって電気泳動ゲル内のタンパク質の活性を検出するアッセイ系を確立した。種々の酵素活性を有するモデルタンパク質について、本手法を用いた活性の評価を試みた結果、0.1 ng 以下の微量のタンパク質についても、これが含まれるウェルを選択的に検出し、質量分析法による解析によって活性本体のタンパク質を同定することが可能であることが確かめられた。

この手法に基づき、生体内の新たな酵素活性を有するタンパク質を見出すことを目的とし、50 種類以上の異なる反応点を有する蛍光プローブを用いて生体サンプル中の酵素活性の評価をおこない、その中から、外来性の細胞遊走因子の代謝反応を可視化する蛍光プローブについて、その代謝に関わる標的タンパク質を明らかにすることに成功したので、この結果についても報告をおこなう。