

蛍光で簡便に検出できる 酵素活性評価システム

研究技術

- ・ 酵素及び酵素阻害剤の活性を簡便に蛍光で評価することができます。
- ・ ポリアルギニンなどの膜透過性ポリマーが蛍光色素を内封したリポソームの分子膜を透過すると蛍光を発光します。この膜透過を抑制する分子を基質とする酵素反応が進行すると、蛍光発光の回復が見られ、この現象を利用すれば様々な酵素及び酵素阻害剤の活性を蛍光により評価することができます。

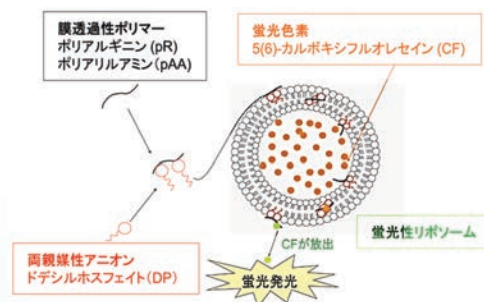
リポソーム分子膜（リン脂質膜）に対するポリマーの透過現象

膜透過性ポリマーは、両親媒性のアニオンであるドデシルフォスフェイト（DP：界面活性剤）と錯形成をすることでリポソームの脂質二分子膜を容易に透過します。この現象は、カルボキシルオレsein（CF：蛍光試薬）を内包したリポソームを用いることで、蛍光発光として観測されます。

酵素活性評価への応用（キナーゼ反応を例に）

酵素活性評価への応用

膜透過性ポリマーは、ATP や ADP などのアニオン種と錯形成をすると、両親媒性アニオンとの錯形成が阻害され、膜透過が抑制されます。この時、ATP は ADP よりも強く膜透過性ポリマーと錯形成するため、膜透過をより強く抑制します。このことを利用してキナーゼ反応を蛍光発光で検出することができます。

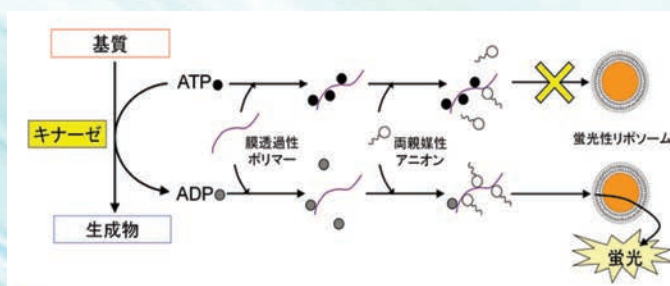


蛍光強度の測定

蛍光性リポソームに膜透過性ポリマー (pAA) と両親媒性アニオン (DP) を加えると直ちに蛍光発光が起こります。

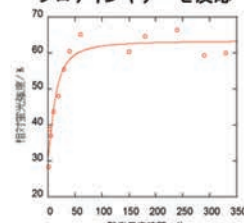
酵素反応の評価方法

サンプリング (10~20 μL 程度)

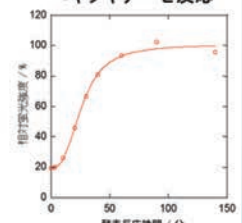


反応例

プロテインキナーゼ反応



ヘキソキナーゼ反応

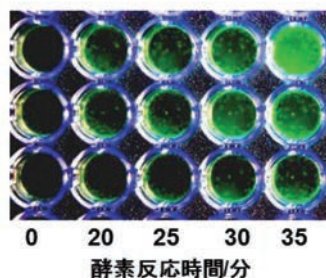


酵素阻害剤の評価の例

・ヘキソキナーゼ阻害剤

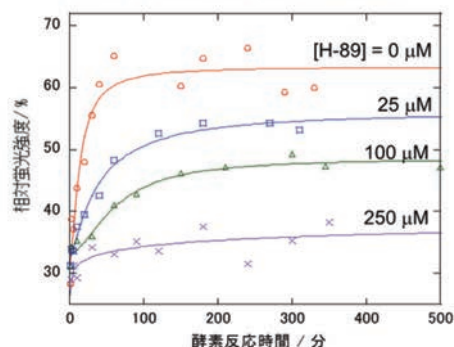
紫外線照射下での目視による評価

- ・ (ヘキソキナーゼ)
- ・ (ヘキソキナーゼ)
+ (D-グルコサミン)
- ・ (ヘキソキナーゼ)
+ (N-アセチル-D-グルコサミン)



・プロテインキナーゼ阻害剤(H-89)

酵素反応時間と蛍光強度の評価



技術の特徴

- ・ 従来技術では汎用性に乏しい問題点がありましたが、本技術では一つのシステムで様々な酵素の活性を評価することに成功しました。
- ・ 本技術はラベルフリーな酵素活性評価が可能で、従来技術よりも簡便に酵素活性の評価が行えます
- ・ 本技術では酵素反応液に、試薬類を混ぜ合わせるだけで、速やかに蛍光発光による検出が可能であり、迅速な酵素活性の検査が行えます。
- ・ 本技術では、市販の安価な試薬類を用いているため、酵素検査キットのコストを低減できることが期待されます。

技術の可能性

- ・ 多品種の検体を迅速に検査でき、酵素あるいは酵素阻害剤のスクリーニングに有効。医薬品開発などで、薬理活性をもつ物質の探索などに利用できます。
- ・ 使用する試薬類は溶液の状態での長期保存が可能であることから、それらを組み合わせた酵素活性評価キットとしての利用が可能。
- ・ 本技術は酵素活性を簡便に蛍光で検出できることから、特定の物質を酵素で認識し、蛍光発光する蛍光酵素センサーとしての応用も可能。

特許関係、参考資料

- ・ 特許「酵素反応の阻害剤活性分析方法、および、分析キット」(特開 2013 - 212103)
- ・ 関連文献
- ① “A Cost-Effective Method for the Optical Transduction of Chemical Reactions. Application to Hyaluronidase Inhibitor Screening with Polyarginine-Counteranion Complexes in Lipid Bilayers” ; Tomohiro Miyatake, Masamichi Nishihara, and Stefan Matile, J. AM. CHEM. SOC. 2006, 128, 12420-12421
- ② 「リポソームを使った味覚成分の光センシング」; 宮武智弘, 化学と工業, Vol.61-9, September 2008, 876-877
- ③ 「ポリペプチドの膜透過現象を応用した酵素反応の光センシングシステム」; 宮武智弘, 光化学 Vol38, No.2,

研究者

龍谷大学
理工学部 物質化学科

教授 宮武 智弘

有機化学、超分子化学

研究テーマ

生体機能分子の自己組織化

問い合わせ先

龍谷大学 龍谷エクステンションセンター(REC)
〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷1番5
代表TEL:077-544-7299 FAX:077-543-7771 Email:rec@ad.ryukoku.ac.jp