

27PB-am255

酵素カップリング法によるキナーゼの新しい高感度蛍光 HTS アッセイ系の開発
○成瀬 健¹, 熊谷 和夫^{2,3}, 今村 理世², 小島 宏建², 岡部 隆義², 長野 哲雄², 定村 佳房¹
(¹和光純薬工業, ²東大創薬オープンイノベーションセンター, ³神戸大院工)

【目的】キナーゼは癌をはじめ種々の疾患の創薬の重要な標的の一つであり、そのアッセイ法としてこれまで、リン酸化された生成物を定量する方法、ATP の減少を測定する方法、ATP から生成する ADP を定量する方法など、多くの方法が開発されている。中でも ADP を定量する方法は、キナーゼの種類を問わず用いることができ、キットも市販されているためキナーゼアッセイによく用いられるが、多数の化合物のスクリーニングを行うにはアッセイコストが課題となる。今回、我々は酵素カップリングと蛍光検出を利用して、より簡便に低コストで ADP を定量するキナーゼの新しい HTS アッセイ系の開発を行った。

【方法】3 種類の酵素を用いたカップリング反応により、ADP をレゾルフィンの高感度蛍光として定量するアッセイ系を構築した。DTT 等の還元剤の影響を消去するためには SH 試薬を用いた。

【結果および考察】酵素カップリング反応条件及び SH 試薬の使用条件を最適化することで、DTT の影響を受けない高感度な HTS アッセイ系を構築した。アッセイは、キナーゼ反応液にカップリング試薬混合液を加えてインキュベーションするだけの簡単な方法である。ADP 濃度 0.05~30 μM において直線性を示し、Z'-factor は 0.8~0.9 と優れた精度を示した。また、生成したレゾルフィンの蛍光は 7 時間は安定して持続することが示された。さらに、東大 OCDD ライブラリー約 21 万化合物を用いた検証で、系自体を阻害する偽陽性が少ないことも確認された。本アッセイ系は発光法に匹敵する感度を有する一方、アッセイコストは従来法の数分の 1 で済み、キナーゼ以外に ATPase などにも適用可能であることから、ADP を産生する酵素全般の HTS に最適なアッセイ系であると考えられる。