

27PB-am256

酵素カップリング法を用いた糖転移酵素の高感度蛍光 HTS アッセイ系の開発
○熊谷 和夫^{1,2}, 小島 宏建¹, 岡部 隆義¹, 長野 哲雄¹ (¹東大創薬オープンイノベーションセンター,²神戸大院工)

【目的】糖転移酵素はヒトで 9 タイプ 200 種類以上の分子種が知られ、タンパク質など生体分子の糖鎖修飾に関わっている。近年は糖鎖合成異常と疾患との関連も解明されつつあり、糖転移酵素は創薬標的の 1 つと言える。しかしながら糖転移酵素はこれまで、high-throughput screening (HTS) に適した簡便なアッセイ法はなかった。我々は酵素カップリング法を用いて、糖転移酵素反応で生じるヌクレオチドを感度よく迅速かつ低コストで蛍光定量する HTS 系の構築を行った。

【方法】ヒトの糖転移酵素では糖ドナー基質として 3 種類のヌクレオチド (GDP、UDP、CMP) の何れかが結合した糖ヌクレオチドが使われる。糖転移反応が進行するとこの 3 種類のヌクレオチドの何れかが遊離生成する。即ちこれらヌクレオチドを効率よく定量することで糖転移酵素の活性が定量できる。そこで、この 3 種類のヌクレオチドを酵素カップリングにより ADP を経由してレゾルフィンの蛍光へと定量的に反応させるアッセイ系を構築した。

【結果および考察】384 穴プレートを用い、GDP、UDP、CMP それぞれについて蛍光定量するアッセイ系を構築した。系の最適化により、5 μ l/well の糖転移酵素反応液中の 1 μ M のヌクレオチド生成を定量できる微量で高感度の系を構築できた。操作としては糖転移酵素反応液に反応検出液を加えインキュベーションし蛍光プレートリーダーで測定するだけでよく、384 穴プレート 20 枚のアッセイが 3 時間で終了した。この方法で市販生理活性化合物ライブラリーからヒトガラクトース転移酵素 hB4GALT1 に対する阻害剤を同定した。本方法での阻害活性と HPLC を用いて測定した阻害活性とが一致することを確認した。本方法を用いることで、全てのタイプの糖転移酵素の HTS が可能である。