

28S-pm03

ビオチン化阻害剤を利用するプロテアーゼ活性の新規検出法

○日高 興士¹, 木曾 良明², 津田 裕子¹ (¹神戸学院大薬, ²長浜バイオ大)

【目的】タンパク質アフィニティー精製法の一つとしてアビジン-ビオチンキャッチ原理は用いられるが、プロテアーゼの溶出後の酵素活性を調べる際、溶出液に用いる変性剤の除去やリフォールディングの操作が必要となる。阻害剤を用いて溶出した場合は活性体として得られるが、酵素活性中心は塞がれているために阻害剤を除去する精製に手間がかかる。そこで、アフィニティー精製プロテアーゼの酵素活性を容易に測定するために、独自に開発したビオチン結合型の HIV プロテアーゼおよびマラリア原虫プラスメプシンの選択的阻害剤を用いて、新規手法によるプロテアーゼ酵素活性の検出を検討した。

【方法】アミノ基を有する阻害剤にアミノカプロン酸を伸長してビオチンを結合した誘導体の結果より、スペーサー部分が長いほど酵素阻害活性およびアフィニティー精製のタンパク回収率において優れるが、一方で、短いスペーサーの誘導体ではストレプトアビジン存在下において阻害活性が顕著に低下した。この結果をもとに、スペーサーのないビオチン直接結合型阻害剤を合成した。磁気ビーズにアフィニティー結合させたプロテアーゼについて合成阻害剤による溶出を行い、ストレプトアビジンを添加した後に蛍光基質の切断を測定した。

【結果】ビオチン直接結合型阻害剤はリコンビナント HIV-1 プロテアーゼを nM レベルで強く阻害するが、ストレプトアビジンを添加すると阻害活性は消失し、酵素活性がほぼ回復した。我々はアビジン-ビオチンの強力な結合による阻害剤の剥離 (ISAC) が起こったと考え、次に、ヒト血清中の HIV プロテアーゼについて磁気ビーズに結合し後、ISAC により蛍光基質の切断を確認した。ISAC を利用する本手法は簡便であり、様々な生物学的サンプルの酵素活性の解析に応用できる。