

26PB-am003

酵素法ヘモグロビン A1c 測定に用いる新規プロテアーゼの探索研究

○日置 善雄¹, 塚本 賢¹, 多々納 俊雄¹ (¹ユーエムエー)

【目的】ヘモグロビンのβ鎖N末端のパリン残基に血中のグルコースが結合した糖化ヘモグロビン (HbA1c) は糖尿病の診断において重要な指標である。従来、HPLC 法もしくはラテックスを用いた免疫法によって測定されてきたが、近年β鎖N末端の糖化ジペプチドをプロテアーゼで切り出し測定する酵素法が新たに開発された。今回、酵素法 HbA1c 測定に使用可能なプロテアーゼを新たに見出すことを目的とする探索研究を行った。

【方法】複数のプロテアーゼ候補品を HbA1c 標品(UMA)と反応させ、β鎖N末端の糖化ジペプチド (F-val-His) を切り出す酵素があるか探索スクリーニングを行った。糖化ジペプチドの測定は、F-val-His と F-val に基質特異性を有するフルクトシルペプチドオキシダーゼ (FPOX-CET) (Kikkoman)を作用させ、生成した過酸化水素をペルオキシダーゼ (POD) 存在下で発色剤を発色させ吸光度を測定した。発色剤はスクリーニングでは Toos (吸光度 555nm) を、活性の評価ではより感度の高い DA-64 (吸光度 727nm)を使用した。

【結果】プロテアーゼ候補品を約 20 種選び、弱酸性側 (pH5.5)と弱アルカリ側 (pH8.0)でスクリーニングを行った結果、pH5.5 では活性を示すものは得られなかった。一方で、pH8.0 では UMA-108(*Aspergillus oryzae* 由来)が有意に高い活性を示した。UMA-108 の至適 pH は 9.5 でアルカリプロテアーゼであった。また、SDS 等の界面活性剤は HbA1c のアッセイ感度を顕著に高めた。

【考察】HbA1c 酵素法のキット製品としては中性プロテアーゼを用いた報告がある。今回の探索研究の結果、アルカリプロテアーゼである UMA-108 も候補として期待できることがわかった。