

28V-am02S

蛍光クエンチングを用いるアルカリホスファターゼ分析の新規蛍光分析法の開発
○芝 晃生¹, 木下 恵美子¹, 木下 英司¹, 小池 透¹ (¹広島大院医歯薬保)

【目的】アルカリホスファターゼ (ALP) は、リン酸化合物の加水分解反応やリン酸基転移反応を促進する生体内機能性分子であり、血清中のヒト ALP は肝機能障害や癌など疾患の臨床指標として分析される。一般的に、クロモフォアで標識した人工基質を用いてアルカリ性条件下で定量分析を行うが、ピロリン酸などの天然基質を用いて生理的 pH で行う簡便な分析手法は数少ない。本研究では、同一分子間で消光するクエンチャーの性質を有するテトラメチルローダミン (TAMRA) を用いた、生理的 pH に適した ALP 活性の新規蛍光分析法を開発した。

【方法】TAMRA に、リン酸基を優先的に捕捉する Phos-tag を結合した TAMRA-Phos-tag とエタノールアミンリン酸 (PEA) を結合した TAMRA-PEA (人工基質) を合成し、ALP 活性のリアルタイム分析について検証した。さらに、TAMRA-Phos-tag とピロリン酸 (天然基質) を用いて、競合阻害剤存在下における 2 種類の ALP アイソザイムに対する活性阻害について評価した。

【結果と考察】ALP 活性のリアルタイム分析では、初期蛍光強度変化より ALP の濃度に依存した加水分解速度の増加を確認できた。また、ALP アイソザイム分析では、阻害曲線より ALP アイソザイムに対する 50%阻害濃度を比較すると約 10 倍の差があった。よって、本新規蛍光分析法が ALP 活性のリアルタイム分析だけでなく、活性阻害評価による ALP アイソザイムの特異性の分析にも有用であることを明らかにした。本分析法では天然基質であるピロリン酸を基質とすることで ALP の本質的な活性を生理的条件下で簡便に分析できる。また、TAMRA-Phos-tag の化学的安定性は極めて高く半年以上溶液状態での冷蔵保存が可能であること、TAMRA の量子収率は pH に依存しないなどの長所もある。