

論文内容要旨

報告番号	甲 先 第 416 号	氏 名	峯 大典
学位論文題目	キャピラリー電気泳動/動的前端分析による酵素反応の速度論解析		
<p>内容要旨</p> <p>酵素とは触媒として働くタンパク質の総称であり、生物における物質代謝やエネルギー代謝を円滑に進めるために必要不可欠である。酵素の速度論解析は薬物代謝速度の予測、薬物の相互作用による副作用の予測、酵素反応の反応機構の解明などに重要な役割を果たす。キャピラリー電気泳動法(CE)は成分イオンの電荷とサイズによって分離を行う分離分析法である。非常に少ないサンプル消費量、高分離能、短い分析時間、自動化が可能という特徴を有しており、酵素活性に関する研究に広く用いられている。これまでに開発されたCEに基づく速度論解析法はほとんどバッチ反応であり、反応の進行とともに生成物による阻害が発生する。バッチ反応において短い反応時間での測定は定常状態による解析とは言えず、また長い反応時間での測定は生成物阻害が懸念される。したがって、バッチ反応に基づく分析において適切な反応時間の設定は精確な測定を行う上で重要であるが、ほとんどの研究では考慮されていないという課題がある。そこで本研究では生成物阻害を取り除いた分析法の開発を目的とし、補正を必要としない典型的なMichaelis-Menten解析式に基づく速度論解析を行った。本稿では電気泳動による動的な酵素反応をキャピラリー内で観測する手法として、キャピラリー電気泳動/動的前端分析(CE/DFA)を提案する。CE/DFAは動的な酵素反応による生成物が、生成と同時に反応場である基質ゾーンから分離されることから、生成物阻害が生じずに酵素反応が進行するという利点を有する。また、定常状態での解析が可能なることから、補正を必要とせず、典型的なMichaelis-Menten式を用いることができる。</p> <p>本稿ではまず、アルカリフォスファターゼによる加水分解反応について速度論解析を行い、CE/DFAの特性評価を行った。続いて阻害反応、β-D-ガラクトシダーゼによる基質競合反応、クレアチンキナーゼによるリン酸基転移反応、チロシナーゼによるチロシン酸化反応など複雑な酵素反応に適用した。これらの速度論解析は成功し、またバッチ反応と比較した結果、有用性も認められた。さらに、圧力支援モードを実装しCE/DFAを改良することで、反応が緩やかに進行するカルボキシルエステラーゼの解析も可能とした。本研究で用いたこれらの酵素反応は数ある中でも代表的なものであり、本法は今後様々な酵素反応に適用できる可能性を有している。酵素反応解析は今後も重要性を増しており、本稿で提案したCE/DFAは医薬品開発における基礎研究に大きく貢献できると考えている。</p>			