

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

2022 年 3 月

徳島大学大学院先端技術科学教育部

峯 大典

目次

第1章 概論：酵素反応の速度論解析について	1
1.1 背景.....	1
1.2 酵素反応速度論.....	1
1.3 Michaelis-Menten 速度論解析	1
1.4 キャピラリー電気泳動法	2
1.5 キャピラリー電気泳動法による酵素反応解析	2
第2章 装置と解析方法.....	4
2.1 装置.....	4
2.2 解析方法.....	5
2.2.1 キャピラリーゾーン電気泳動法による解析方法	5
2.2.2 キャピラリー電気泳動/動的前端分析(CE/DFA)による解析方法.....	6
2.2.3 Michaelis-Menten 速度論による解析方法.....	7
2.2.4 Lineweaver-Burk プロットによる解析方法	9
2.2.5 R プログラムに基づく非線形回帰による解析方法.....	9
第3章 アルカリフォスファターゼを用いた阻害反応の同時測定	10
3.1 緒言.....	10
3.1.1 アルカリフォスファターゼ	10
3.1.2 阻害反応解析.....	10
3.1.3 先行研究	10
3.1.4 本研究の目的.....	11
3.2 実験.....	12
3.2.1 試薬	12
3.2.2 実験原理	13
3.2.2.1 阻害反応同時測定の解析方法	13
3.2.2.2 阻害反応の解析方法.....	14
3.2.3 実験操作	14
3.2.3.1 CE/DFA による ALP の加水分解反応解析	14
3.2.3.2 阻害反応の同時測定.....	14
3.3 結果と考察.....	15
3.3.1 CE/DFA による ALP の加水分解反応解析.....	15
3.3.1.1 プラトースIGNALの検出と CE 前の既存生成物の分離.....	15
3.3.1.2 Michaelis-Menten 定数 K_M の決定	16
3.3.2 阻害反応の同時測定.....	18

3.3.2.1	注入条件の最適化	18
3.3.2.2	Michaelis-Menten 定数 K_M と阻害定数 K_I の同時決定	20
3.4	結言	22
第4章	β -D-ガラクトシダーゼを用いた基質競合解析	23
4.1	緒言	23
4.1.1	酵素反応における基質競合	23
4.1.2	β -D-ガラクトシダーゼ	23
4.1.3	先行研究	23
4.1.4	本研究の目的	24
4.2	実験	25
4.2.1	試薬	25
4.2.2	実験原理	26
4.2.2.1	CE/DFA による基質競合反応の解析方法	26
4.2.2.2	Lineweaver-Burk plot による基質競合反応の解析方法	27
4.2.3	実験操作	27
4.2.3.1	泳動液の pH 変化による生成物の分離	27
4.2.3.2	単一基質の酵素反応解析	28
4.2.3.3	CE/DFA による基質競合解析	28
4.3	結果と考察	29
4.3.1	泳動液の pH 変化による生成物の分離	29
4.3.2	単一基質の酵素反応解析	30
4.3.3	2つの酵素反応を反映したプラトーシグナルの検出	33
4.3.4	CE/DFA による基質競合解析	34
4.4	結言	37
第5章	カルボキシルエステラーゼを用いた酵素反応解析	38
5.1	緒言	38
5.1.1	カルボキシルエステラーゼ	38
5.1.2	圧力支援キャピラリー電気泳動法	38
5.1.3	先行研究	38
5.1.4	本研究の目的	39
5.2	実験	40
5.2.1	試薬	40
5.2.2	pCE/DFA による阻害反応の解析方法	41
5.2.3	実験操作	42
5.2.3.1	支援圧力変化における pCE/DFA	42
5.2.3.2	エタノール添加による影響の調査	42

5.2.3.3	pCE/DFA による速度論解析.....	42
5.3	結果と考察.....	43
5.3.1	圧力支援によるプラトースIGNALの検出と支援圧力変化.....	43
5.3.2	酵素反応解析におけるエタノール添加の影響.....	46
5.3.3	Michaelis-Menten 速度論解析.....	47
5.3.4	Bis-ニトロフェニルリン酸による阻害反応の解析.....	48
5.4	結言.....	50
第6章	クレアチンキナーゼを用いたリン酸基転移反応解析.....	51
6.1	緒言.....	51
6.1.1	リン酸基転移反応.....	51
6.1.2	クレアチンキナーゼ.....	51
6.1.3	先行研究.....	51
6.1.4	本研究の目的.....	52
6.2	実験.....	53
6.2.1	試薬.....	53
6.2.2	pCE/DFA によるリン酸基転移反応の解析方法.....	54
6.2.3	実験操作.....	55
6.2.3.1	プレキャピラリー反応によるリン酸基転移反応解析.....	55
6.2.3.2	逆反応における生成物 ATP の阻害測定.....	55
6.2.3.3	pCE/DFA によるリン酸基転移反応解析.....	55
6.3	結果と考察.....	56
6.3.1	プレキャピラリー反応によるリン酸基転移反応解析.....	56
6.3.2	逆反応における生成物 ATP の阻害.....	59
6.3.3	pCE/DFA による可逆反応の解析.....	60
6.4	結言.....	62
第7章	チロシナーゼを用いたチロシン酸化反応解析.....	63
7.1	緒言.....	63
7.1.1	チロシナーゼ.....	63
7.1.2	チロシン酸化反応.....	63
7.1.3	先行研究.....	63
7.1.4	本研究の目的.....	64
7.2	実験.....	65
7.2.1	試薬.....	65
7.2.2	CE/DFA によるチロシン酸化反応の解析方法.....	66
7.2.3	実験操作.....	67
7.2.3.1	異なる反応時間でのプレキャピラリー反応測定.....	67

7.2.3.2	CE/DFA によるチロシン酸化反応解析	67
7.3	結果と考察	68
7.3.1	異なる反応時間でのプレキャピラリー反応測定	68
7.3.2	CE/DFA によるチロシン酸化反応解析	72
7.3.2.1	Michaelis-Menten 定数 $K_{M, Do}$ の決定	72
7.3.2.2	[Do] vs. Dc プラトースIGNAL高さの検量線作成	73
7.3.2.3	Michaelis-Menten 定数 $K_{M, Ty}$ の決定	75
7.4	結言	76
第8章	結言	77
	参考文献	79
	謝辞	84

第1章 概論：酵素反応の速度論解析について

1.1 背景

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^[1]。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、薬物・毒物による活性阻害の解明に重要な役割を果たす。代表的な測定方法として紫外可視分光法(UV)^[2]、電位差滴定法^[3]、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)^[4]、キャピラリー電気泳動法(CE)^[5]が挙げられる。電位差滴定、UV は多量の試料が必要であり、高価である酵素の消費は望ましくない。HPLC は注入前にタンパク質を除去するために遠心分離による試料の前処理が必要であり、移動相として多量の有機溶媒を用いることから環境負荷が大きい。そのため CE が酵素活性に関する研究に広く用いられている^[6]。

1.2 酵素反応速度論

酵素反応速度論の目標の一つは酵素自身及びその基質、生成物複合体の化学構造・電子構造を明らかにし、その相互変換の様子と速度を決める機構を明らかにすることである^[7]。酵素反応自体はいくつかの素反応によって成り立っており、様々な要因がそれぞれの素反応に影響を与えることによって反応全体の速度に影響を及ぼす。ある要因が反応速度に与える影響の程度を解析して酵素反応の素過程を明らかにすることができ、この過程の反応速度定数を決定する手段が酵素反応速度論である^[1]。反応速度に影響を与える因子には、酵素の反応条件として容易に制御できる外的な要因と制御しにくい内的な要因がある。外的な要因としては酵素、基質、阻害剤などの濃度や、反応時の温度と圧力、用いる溶媒の誘電率、イオン強度、pH などがあげられる。内的な要因は酵素の化学修飾や遺伝子組み換えなどの方法によって変化させることができる^[1]。

1.3 Michaelis-Menten 速度論解析^[1]

酵素反応はまず酵素-基質複合体がつくられ、これが酵素-生成物複合体に転化して最後に生成物の遊離が起こる。Michaelis-Menten 速度論解析とは、この反応に基づき酵素濃度が一定であるときの反応速度の基質濃度依存性をモニタリングすることである。基質濃度が低い場合は1次反応、高い場合は0次反応の挙動を示し、酵素反応速度が最大反応速度 V_{\max} の半分の速度 $V_{\max}/2$ となるときの基質濃度を Michaelis-Menten 定数と呼び、 K_M で表す。 K_M の値が小さいほど基質と酵素の親和性が高いと評価でき、 V_{\max} および K_M は酵素の性質を記述するために重要な定数である。

1.4 キャピラリー電気泳動法

キャピラリー電気泳動法(CE)は水溶液一相系で分離分析を行うことができ、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^[8]。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、多種の化合物の同時測定が可能という特徴を持ち^[6,9]、測定により得られるシグナルは水中での物質量や濃度を反映したものになる。主に水溶液中においてイオン成分の分離分析に用いられ、分離・定量だけでなく酸解離定数^[10]や分配係数^[11]など化合物の物性評価にも応用が可能である。薬物分析において主成分の定量や不純物の推定、キラル物質の分離などの強力な分析法^[12]として使用されるだけでなく、反応の速度論研究に用いられている^[5,6]。

1.5 キャピラリー電気泳動法による酵素反応解析

CEに基づく酵素反応解析は大きくプレキャピラリー反応法とインキャピラリー反応法に分類される^[6]。プレキャピラリー反応法とはキャピラリーの外で酵素反応を進行させ、一定時間反応させた後、試料液としてキャピラリー内に導入しCE分離を行う分析法である。この手法はバッチ反応に基づいており、キャピラリー内を反応物の分離場としてのみ使用する分析法である。インキャピラリー反応法とはキャピラリー内を反応場かつ分離場として使用する手法であり、これまでに電気泳動媒介微量分析(EMMA)^[13-17]、圧力媒介微量分析(PMMA)^[18-20]、酵素固定化マイクロリアクター(IMER)^[21-25]、層流プロファイル横方向拡散(TDLFP)^[26-30]などの分析技術が開発されている。EMMAは基質と酵素を別々のプラグでキャピラリー内に注入しCEを行うplug-plugモードと、基質と酵素の一方を試料液、もう一方を泳動液に添加しCEを行う連続モードがある。EMMAに基づく分析のほとんどは生成物をピークとして検出するが、連続モードでは条件設定によって箱型のシグナルが検出される。IMERでは酵素の固定に使用される物質は陽イオン界面活性剤^[21]やポリドーパミン^[31]、金ナノ粒子^[32]など様々であるが、近年では熱応答性のあるリン脂質ナノゲルを酵素の固定に使用した分析法^[33-35]も開発された。しかし、EMMAの連続モードを除き、これまでに開発されたインキャピラリー反応法はCEが停止した状態で反応が進行するため、キャピラリー内でバッチ反応を実行したにすぎず、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。

1.6 本研究の目的

酵素反応の解析に関する以上の状況を踏まえて、本研究では生成物阻害を取り除いたインキャピラリー反応に基づく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/動的な前端分析 (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。第 2 章では本研究に共通する装置と解析方法について記述する。第 3 章では CE/DFA による阻害反応の解析法としてアルカリフォスファターゼを例として用い、Theophylline による阻害反応の同時測定を行った。第 4 章では CE/DFA の応用として、 β -D-ガラクトシダーゼと 2 種類の基質を用いて基質競合反応の解析を行った。第 5 章では CE/DFA に圧力支援モードを実装し、カルボキシルエステラーゼの酵素反応の解析や Bis-ニトロフェニルリン酸による阻害反応の解析、有機溶媒による酵素活性への影響の調査などを行った。第 6 章では可逆的な酵素反応の例として、クレアチンキナーゼによるリン酸基転移反応の解析を行った。不可逆的な加水分解反応とは異なり可逆的な反応であることから、正反応と逆反応に分けて分析を行い、プレキャピラリー反応による分析と CE/DFA の結果を比較した。第 7 章では多段階の酵素反応への応用として、チロシナーゼによるチロシン酸化反応の解析を行った。二段階の反応について個別に分析が可能な CE/DFA を提案する。第 8 章は本稿の総括となっている。

第2章 装置と解析方法

2.1 装置

本研究において使用した装置を Table 2.1 に示す。また、本研究で使用した水は全て Millipore 製, Milli-Q Gradient A10 (Millipore, Milford, MA, USA)で精製したものをを使用した。

Table 2.1 Apparatus.

Apparatus	Model	Manufacturer
^{3D} CE	G1600AX	Agilent Technologies
Capillary	—	GL Sciences
pH meter	HM-25G	TOA DKK

キャピラリー電気泳動装置はフォトダイオードアレイ吸光検出器を備えた Agilent Technologies 社製の ^{3D}CE を使用し、CE システムの制御、データ取得およびデータ解析には Agilent Technologies の Chem Station software (Ver. B04.02) を使用した。Fig. 2.1 に CE 装置の概略図を示す。溶融シリカキャピラリーは GL Sciences 社製の内径 75 μm 、外径 375 μm のものを使用し、全長および有効長は実験ごとに異なる長さのものを使用した。また、測定用のバイアルにはポリプロピレン製の 750 μL バイアルを使用した。キャピラリーはカセットカートリッジにセットされて CE 装置に取り付けられており、恒温空気を循環させることで温度が一定に保たれている。キャピラリーの内壁は 0.1 mM NaOH で 2 分間洗浄し、続いて精製水で 2 分間洗浄することで毎日リフレッシュした。

pH メーターは TOA DKK 社製の HM-25G を使用した。pH 4.01, pH 6.86, pH 9.18 の pH 標準液を用いて校正し、pH 測定に用いた。

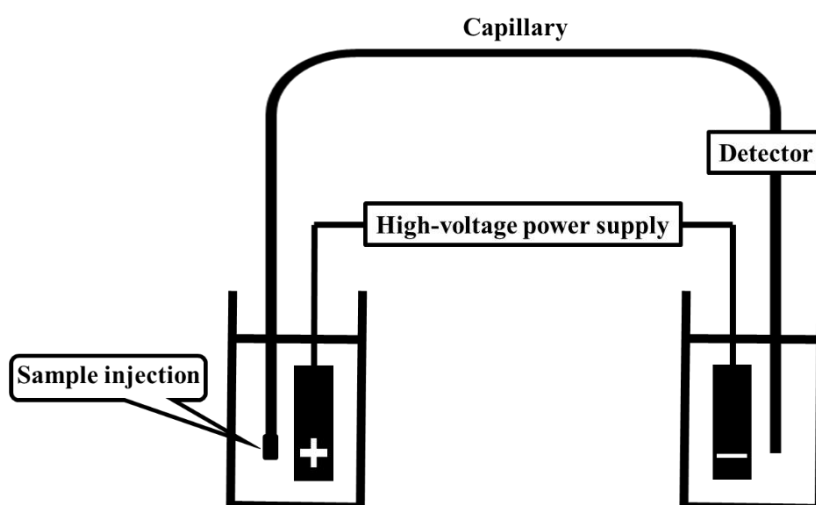


Fig. 2.1 Schematic diagram of capillary electrophoresis apparatus.

2.2 解析方法

2.2.1 キャピラリーゾーン電気泳動法による解析方法

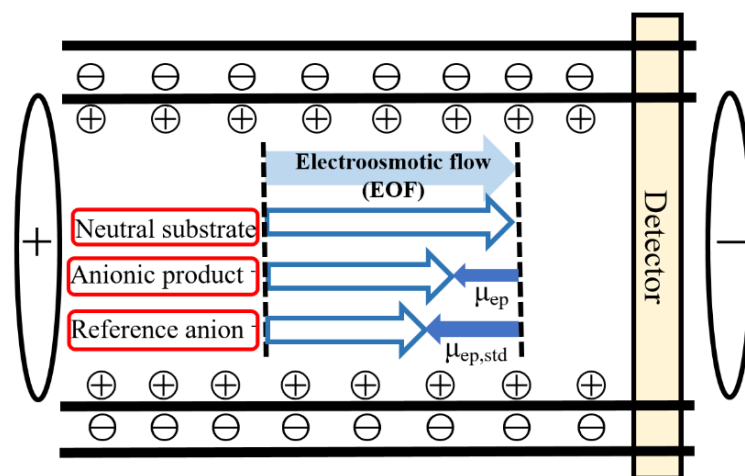


Fig. 2.2 Schematic diagram of interior of capillary tube.

電気泳動中のキャピラリー内の様子を Fig. 2.2 に示す。シリカ製キャピラリーの内表面はシラノール基が並んでおり、充填された緩衝液の pH に応じてシラノール基が酸解離して負電荷に帯電し、キャピラリー内表面およびこれと接する緩衝液との間に電気二重層を形成する。ここに電圧を印加すると、キャピラリー内の液体が陽極から陰極に向かって移動する。この流れを電気浸透流(EOF)という。キャピラリー内の陰イオン成分は陽極に向かって電気泳動するが、EOF の流れに乗って移動速度を増し、EOF よりも遅く陰極側へ移動する。陰極側にある検出器により検出時間・ピーク面積・ピーク高さが求められ、各成分の定量・定性が可能となる。Fig. 2.2 の様子を反映した電気泳動図を Fig. 2.3 に示す。Fig. 2.3 に示すように、見かけの泳動速度の順に検出される。本研究では対象物質のプラトーシグナルの高さから酵素反応に関する基質、生成物の追跡を行った。

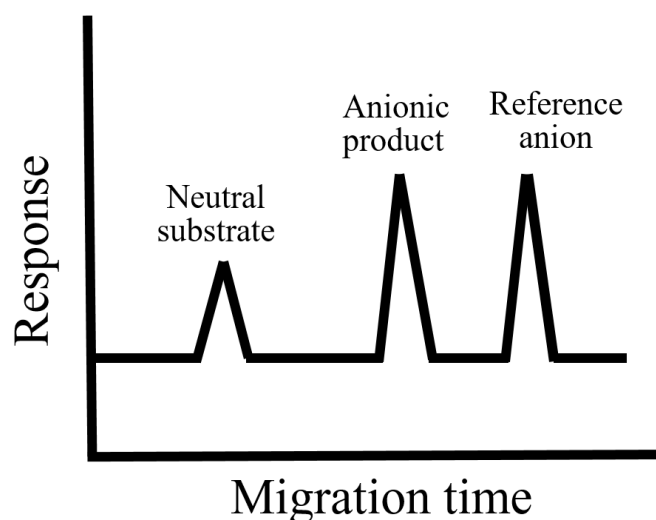


Fig. 2.3 Schematic electropherogram for model analytes shown in Fig. 2.2.

2.2.2 キャピラリー電気泳動/動的前端分析(CE/DFA)による解析方法^[36]

CE/DFA の概略図を Fig. 2.4 に示す。キャピラリー内に酵素(E)を含む溶液を満たし、基質(S)を含む溶液を試料液として注入し、電気泳動を開始することで酵素反応が開始される。電気泳動の間、試料液中の基質は常に酵素と反応しながらキャピラリー内を移動し、生成物(P)が連続的に生成される。また、生成物は試料ゾーンから直ちに電気泳動分離され、連続的に生成及び分離された生成物は Fig. 2.4(d)のような高さが一定のプラトーシグナルとして観測される。その高さは酵素反応の反応速度を表し、試料液の基質濃度と観測されたプラトーシグナルの高さから Michaelis-Menten 速度論解析による K_M の決定が可能となる。また、基質の減少によりプラトーシグナルの高さが低下する場合は最大反応速度を反映している最も高い位置にあるプラトーシグナルの高さを解析に用いる。

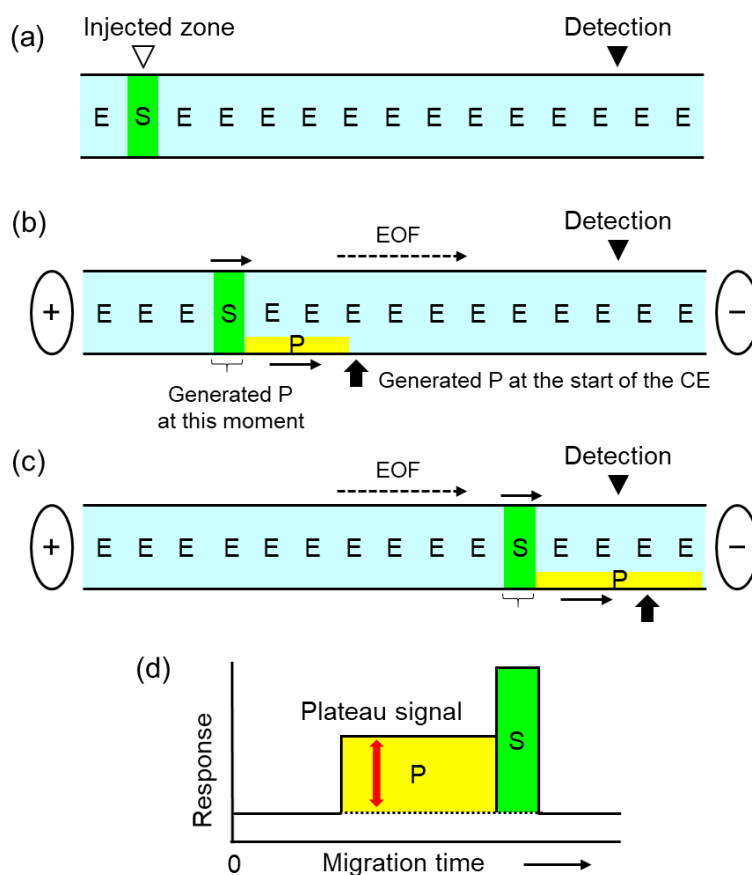


Fig. 2.4 Schematic diagram of enzymatic reaction during CE/DFA. (a) A sample plug containing a substrate (S) is injected into the capillary. (b) The substrate electrophoretically migrates in the enzyme solution under an applied DC voltage, where S is continuously hydrolyzed to form P. The reaction rate is constant, and the concentration of P is definite over the rectangle length. (c) Continuously generated P is detected, providing a plateau signal as shown in (d). Height of plateau signal reflects reaction rate of enzymatic reaction.

2.2.3 Michaelis-Menten 速度論による解析方法^[1]

酵素反応は次のような過程で進行する。



E: 酵素, S: 基質, ES: 酵素-基質複合体, P: 生成物, k_1, k_{-1}, k_{cat} : それぞれの反応の速度定数

反応速度 v は ES から E と P が生じる速度となる。したがって

$$v = k_{cat}[ES] \quad (2)$$

[ES]: 酵素-基質複合体の濃度

と表わされる。反応中に酵素の失活がないとすると、酵素の濃度は質量保存の法則より

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (3)$$

[E]₀: 酵素の全濃度, [E]: 基質が結合していない酵素の濃度

と表される。式(1)の左側は平衡反応であることから ES 複合体の解離定数 K_s は

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (4)$$

と定義される。式(3)を式(4)に代入すると

$$K_s = \frac{\{[E]_0 - [ES]\}[S]}{[ES]} \quad (5)$$

となる。これを [ES] について解くと

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_s + [S]} \quad (6)$$

となる。式(2),(6)より、反応速度は

$$v = k_{cat}[ES] = \frac{k_{cat}[E]_0[S]}{K_s + [S]} \quad (7)$$

で与えられる。酵素濃度が一定の場合、最大反応速度 V_{max} で反応が進行するのは、すべての酵素が基質で飽和されたときである。このとき、ES 複合体の濃度 [ES] は [E]₀ となることから、最大の反応速度は

$$V_{max} = k_{cat}[ES]_{max} = k_{cat}[E]_0 \quad (8)$$

となる。式(8)より式(7)は

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_s + [S]} \quad (9)$$

となる。

なお、平衡反応の速度定数から

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (10)$$

式(1)における各成分の濃度の増加速度は

$$\frac{d[E]}{dt} = k_{-1}[ES] - k_1[E][S] \quad (11)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{-1}[ES] - k_1[E][S] \quad (12)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_{cat})[ES] \quad (13)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{cat}[ES] \quad (14)$$

と表される。式(1)の反応が定常状態で進行すると仮定すると、ES 複合体の濃度は一定である。つまり、式(13)の左辺が 0 になり

$$k_1([E]_0 - [ES])[S] = (k_{-1} + k_{cat})[ES] \quad (15)$$

となる。これを[ES]について解くと

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_{-1} + k_{cat} + k_1[S]} \quad (16)$$

となる。したがって、式(2), (8)より

$$v = \frac{k_1 k_{cat} [E]_0 [S]}{k_{-1} + k_{cat} + k_1 [S]} = \frac{k_1 V_{max} [S]}{k_{-1} + k_{cat} + k_1 [S]} = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (17)$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \quad (18)$$

という式が得られる。 $k_{cat} \leq k_{-1}$ の場合のみ K_s と K_M は一致する。

式(17)は Michaelis-Menten の式と呼ばれ、基質濃度と反応速度のプロットから得られる曲線は Michaelis-Menten 曲線と呼ばれる。本研究で用いる酵素反応は全て $k_{cat} \leq k_{-1}$ の反応であるため $K_s = K_M$ と見なし、補正されていない典型的な Michaelis-Menten 式を用いて解析を行う。

2.2.4 Lineweaver-Burk プロットによる解析方法^[1]

式(17)の両辺の逆数をとると

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{V_{max}[S]} = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (19)$$

となる。式(19)から、 $1/v$ は $1/[S]$ に対する一次関数であることがわかる。

横軸を $1/[S]$ 、縦軸を $1/v$ として測定結果をプロットするとグラフの x 切片から $1/K_M$ 、 y 切片から $1/V_{max}$ が求められる。このプロット方法を **Lineweaver-Burk plot** という。

2.2.5 R プログラムに基づく非線形回帰による解析方法

R プログラム(Ver. 4.0.3)^[37]を用いた非線形最小二乗法により、**Michaelis-Menten** 曲線に対して非線形回帰曲線のフィッティングを行った。 K_M は基質濃度 $[S]$ と反応速度を反映したプラトーシグナルの高さのデータセットを使用して決定した。

第3章 アルカリフォスファターゼを用いた阻害反応の同時測定

3.1 緒言

3.1.1 アルカリフォスファターゼ

アルカリフォスファターゼ(ALP, EC 3.1.3.1)はリン酸モノエステルの加水分解を触媒し、リン酸及びアルコールを放出する酵素である。ALP は肝臓, 腎臓, 骨, 腸, 胎盤など様々な臓器に広く分布しており, 血清中の ALP は主に肝臓, 骨, 腎臓に由来する^[38]。鉍化促進剤である無機リン酸塩の局所濃度を上昇させ, 鉍物形成の阻害剤である細胞外ピロリン酸塩の濃度を低下させるために作用する^[39]。Mg²⁺および Zn²⁺イオンなどは, 濃度に応じて ALP を活性化または不活性化することができる^[40]。ALP 活性は骨粗鬆症や骨軟化症, アルツハイマー病などの疾患に関係しており^[38], ヒトの体内で非常に多くの重要な機能を果たしていることから, 活性のモニタリングや医薬物質に関する研究は非常に重要である^[41]。

3.1.2 阻害反応解析

酵素阻害とは酵素活性が低下することを示し, 生体内で主要なメカニズムの制御を担っている^[42]。ほとんどの小分子薬は特定の酵素を阻害することで機能し, 阻害反応の解析は酵素のメカニズムに関する様々な情報をもとに創薬研究に貢献する^[43]。阻害反応は可逆的または不可逆的かで分類され, 可逆的阻害はさらに競合的, 非競合的, 不競合的, 混合タイプのいずれかに分類される^[1]。速度論に関する研究では 50%阻害濃度(IC₅₀)や阻害定数(K_i)によって阻害能が評価される。

3.1.3 先行研究

ALP 活性は主に *p*-Nitrophenyl phosphate(NPP)が基質として使用され, *p*-Nitrophenol(NP)が生成物として UV 検出される^[21,40]。また蛍光基質を使用し, 蛍光検出を行う場合もある^[44,45]。CE を使用した場合, プレキャピラリー反応^[40], EMMA^[44,45], IMER^[21]などの分析法が ALP 活性の測定に使用されてきた。EMMA に基づく研究では泳動液に基質を添加し, 試料液に酵素を添加することで箱型の生成物シグナルを検出した。また IMER では陽イオン界面活性剤であるポリブレンをキャピラリー管内に修飾し, その上に ALP を固定することでインキャピラリー反応が行われた。Theophylline は ALP の阻害剤の一つであり, 阻害反応解析のモデル阻害剤としてよく使用されている^[44,46,47]。

3.1.4 本研究の目的

本研究では提案する CE/DFA という分析法の特性を評価にするため、NPP を基質とした ALP による加水分解反応をモデル反応として Michaelis-Menten 速度論解析を行った。Fig. 3.1 に ALP による加水分解反応の概略図と阻害剤 Theophylline の構造を示す。ALP を泳動液に添加し、NPP を試料液に添加し電気泳動を行うことで生成物 NP をプラトーシグナルとして観測した。また CE/DFA の阻害反応解析への応用として、キャピラリー内で阻害を受ける条件と受けない条件を同時に測定することを目的とし CE/DFA を改良した。阻害剤 Theophylline と基質 NPP の電気泳動移動度の差を利用することで阻害剤の存在下/非存在下における 2 条件の結果を 1 つのプラトーシグナルで得られた。2 段のプラトーシグナルの高さはそれぞれの酵素反応速度を反映していることから、Michaelis-Menten 速度論解析により阻害剤非存在下における K_M 値、阻害剤存在下における K_I 値の同時決定を可能とした。

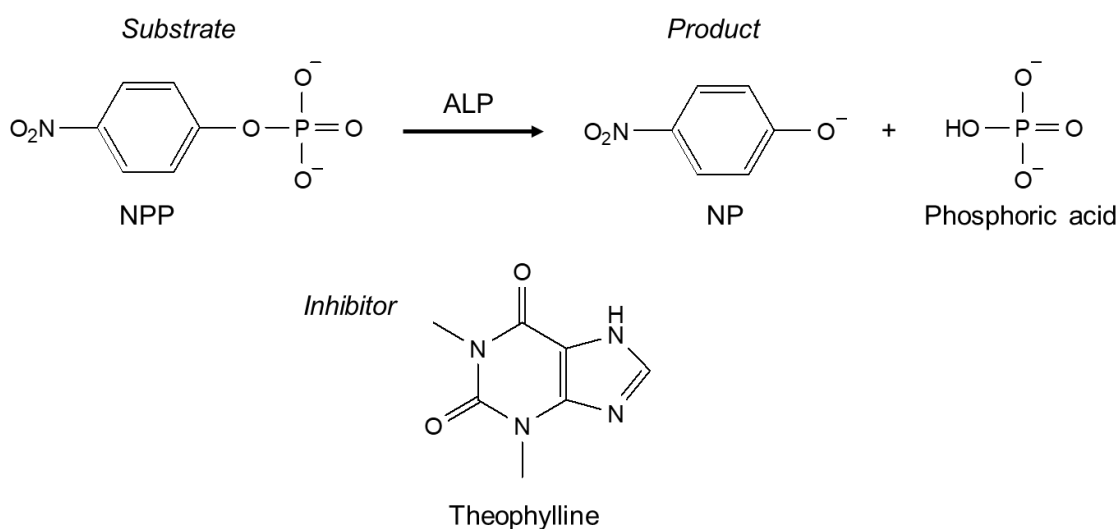


Fig. 3.1 Scheme of enzymatic hydrolysis reaction with alkaline phosphatase and structure of Theophylline.

3.2 実験

3.2.1 試薬

本研究において使用した試薬を Table 3.1 に示す。四ホウ酸ナトリウム十水和物を純水に所定量溶解させ 100 mM の borax 緩衝液を調製し, 1 M NaOH で pH を調節することで 50 mM の borax+NaOH 緩衝液を調製した。泳動液として使用するときには酵素 ALP を所定量含む溶液で 5 倍に希釈し, 最終 pH を 9.8, 濃度を 10 mM に調節した。また, 阻害反応解析では Theophylline を所定量含む, 泳動液と同量の ALP と緩衝成分を含む溶液を阻害剤溶液として使用した。メチルオレンジ(MO)は内標準物質として使用し, エタノールは EOF マーカーとして使用した。複数の溶液を試料液または泳動液に添加する場合, バイアルに希釈前の溶液をそれぞれ注入し, マイクロピペットによる吸引と吐出を繰り返すことで混合した。

Table 3.1 Reagents used in Chapter 3.

Reagents	Grade	Manufacturer
Phosphatase, Alkaline from bovine intestinal mucosa	—	SIGMA-ALDRICH
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate	Special grade	Fujifilm Wako Pure Chemical
<i>p</i> -Nitrophenol	Special grade	Fujifilm Wako Pure Chemical
Theophylline	Special grade	Tokyo Chemical Industry
Methyl Orange	Special grade	Fujifilm Wako Pure Chemical
Ethanol	Special grade	Kishida
Sodium Tetraborate Decahydrate	Special grade	Kanto
NaOH	Special grade	Kanto

3.2.2 実験原理

3.2.2.1 阻害反応同時測定解析方法^[48]

CE/DFA による阻害反応の同時測定の概略図を Fig. 3.2 に示す。基質溶液(S)と阻害剤溶液(I)を、酵素を含む分離液で満たされたキャピラリー内にタンデムに導入する。電圧を印加すると基質と阻害剤の両方のゾーンが異なる速度で分離液内を電気泳動的に移動し、2つのゾーンが重なると阻害が生じる。連続的に生成される反応生成物(P)はプラトーシグナルとして検出され、阻害が生じた部分だけ生成物量が減少し、プラトーシグナルの高さが低下する。その結果、Fig. 3.2(e)に示すように2段階のプラトーシグナルが検出される。CE/DFA は 2.2.2 項で述べたように、プラトーシグナルの高さはその反応の反応速度を反映しており、生成物阻害を取り除いた解析が可能である。本法ではこの利点に加え、1回の CE 測定で阻害を受ける条件と阻害を受けなかった条件の両方を同時に測定できることが可能である。

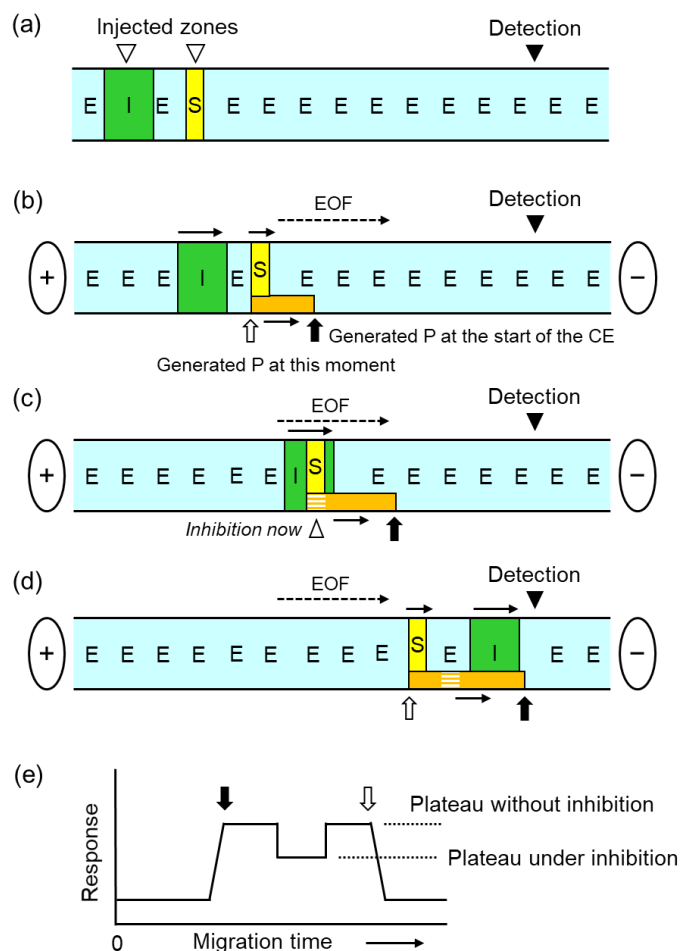


Fig. 3.2 Schematic diagram of the inhibition in CE/DFA by the tandem injections of a substrate and an inhibitor solution (a)–(d), and a typical electropherogram (e). The inhibition occurs when the zones of substrate (S) and inhibitor (I) overlap due to the electrophoretic migration. E: an enzyme contained in the separation buffer.

3.2.2.2 阻害反応の解析方法

阻害剤と酵素の阻害形式は Lineweaver-Burk plot の比較で識別することができる^[1]。阻害剤を添加せずに得られたプロットと阻害剤を添加した時のプロットを比較し、y 軸上に交点を持てば競合阻害、x 軸上に交点を持てば非競合阻害、交点を持たず平行になる場合は不競合阻害と識別できる^[1]。本研究で得られた Theophylline によるアルカリフォスファターゼの阻害形式は不競合阻害の挙動を示したことから本項では不競合阻害の解析式を式(20)に示す。[I]は阻害剤濃度、 K_I は阻害定数を示しており、阻害剤を添加せずに得られた K_M を式(20)に代入することで K_I を決定することができる。

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \quad (20)$$

3.2.3 実験操作

3.2.3.1 CE/DFA による ALP の加水分解反応解析

基質として 0.2–2.0 mM NPP, 内標準物質として 0.1 mM MO, EOF マーカーとして 4% (v/v) エタノール, 10 mM borax+NaOH 緩衝液を含む基質溶液を試料液とした。また、生成物阻害の影響を調査するため、0.1 mM NP をさらに添加して比較した。0.87 U mL⁻¹ ALP を添加した 10 mM borax+NaOH 緩衝液(pH 9.8)を泳動液として使用し、生成物 NP のプラトーシグナルの高さを測定した。印加電圧 25 kV, 試料注入体積 50 mbar×5 s, 測定温度 37 °C, 検出波長 400 nm で測定を行った。キャピラリーは全長 64.5 cm, 有効長 56.0 cm のものを使用した。

3.2.3.2 阻害反応の同時測定

0.4–3.0 mM NPP と 10 mM borax+NaOH 緩衝液を含む溶液を基質溶液とし、泳動液には 0.55 U mL⁻¹ ALP を添加した 10 mM borax+NaOH 緩衝液(pH 9.8)を使用した。また、泳動液と同様の成分に 0.5 mM または 1.0 mM の Theophylline を添加した溶液を阻害剤溶液として用いた。泳動液をキャピラリー内に満たした後、基質溶液、スパーサーとしての泳動液、阻害剤溶液の順でキャピラリー内に溶液を注入し、25 kV の電圧を印加することで電気泳動を行った。また、スパーサーとしての泳動液および阻害剤溶液の注入時間の最適条件を決定した後、速度論解析を行った。キャピラリーは 3.2.3.1 項と同様のものを使用し、キャピラリー内温度は 37 °C, 測定波長は 400 nm とした。得られた NP のプラトーシグナルのうち、阻害を受けていないプラトーシグナルの最も高い位置と阻害を受けたプラトーシグナルの最も低い位置の高さを測定し、Michaelis-Menten 速度論解析に基づき K_M および K_I を決定した。

3.3 結果と考察

3.3.1 CE/DFA による ALP の加水分解反応解析

3.3.1.1 プラトーシグナルの検出と CE 前の既存生成物の分離

2.2.2 項で述べたように, CE/DFA では泳動液中の酵素と試料液中の基質が電気泳動中に連続的に反応することでプラトーシグナルを得ることができる。ALP と NPP の反応について様々な条件で測定したときの電気泳動図を Fig. 3.3 に示す。Fig. 3.3(a)は泳動液に ALP を添加しない場合の従来の NPP の電気泳動の結果を示しており, NPP は酵素と反応することなく検出される。Fig. 3.3(b)は試料液に NPP と NP を添加した電気泳動の結果である。本研究で使用した泳動液の pH 条件では, NPP は-2 の電荷を有し, NP は-1 の電荷を有することから CE 分離が可能である。Fig. 3.3(c)では ALP を泳動液に添加することで, Fig. 2.4 の概略図に示すような典型的なプラトーシグナルを得た。Fig. 3.3(b),(c)の比較から, NP の検出から NPP の検出までの間プラトーシグナルが連続的に検出されていることが分かる。Fig. 3.3(d)は NPP に加え, NP を試料液に添加した時の CE/DFA の結果である。生成物である NP を予め添加した場合でも NPP と分離され, プラトーシグナルの先にピークとして検出された。また, 得られたプラトーシグナルの高さは NP を添加していない場合と比較しても変化がないことから, 蓄積された生成物は分離され, 阻害することなく反応が進行していることを示している。

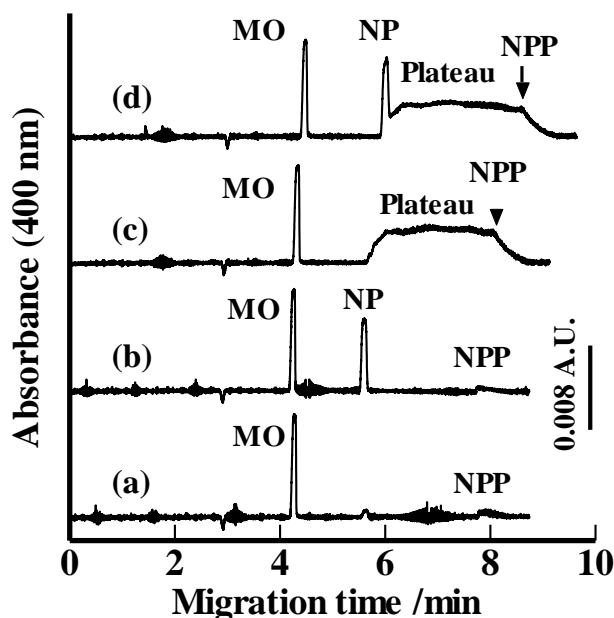


Fig. 3.3 Electropherograms of NPP, NP and MO under various conditions. (a), (b) without enzyme and (c), (d) 0.07 U mL^{-1} ALP added. (b), (d) 0.1 mM NP added. Separation buffer: 10 mM borax + NaOH (pH 9.8). CE conditions: 25 kV applied voltage, detection wavelength at 400 nm , sample injection at 50 mbar for 5 s , capillary temperature at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. MO: Methyl Orange as an internal standard.

3.3.1.2 Michaelis-Menten 定数 K_M の決定

泳動液に含まれる ALP 濃度を一定とし、試料液に含まれる各基質濃度に対して得られたプラトーシグナルの高さを測定することで速度論解析を行った。Fig. 3.4 に試料液に含まれる NPP 濃度を変化させたときの CE/DFA の結果を示す。基質濃度が高くなるほどプラトーシグナルの高さも上昇しており、基質濃度と反応速度の相関関係が測定できたことが分かる。Fig. 3.4(a)では試料液に含まれる基質濃度が低いことから、電気泳動中の反応により基質濃度が減少し、反応速度が下がったことでプラトーシグナルの高さが徐々に低下していることが分かる。この場合は最大反応速度を反映したプラトーシグナルの最も高い位置を測定した。一方 Fig. 3.4(c)では基質が十分に存在することから電気泳動の開始から NPP の検出までプラトーシグナルの高さが一定であることが分かる。これらの結果を元に作成した Michaelis-Menten 曲線及び Lineweaver-Burk plot を Fig. 3.5 に示す。得られた K_M 値は 0.57 mM となった。文献値は分光光度法で 0.2 mM^[49]、プレキャピラリー反応測定で 1.515 mM^[40]、インキャピラリー反応測定で 4.8 mM^[50]と報告されており、測定方法や pH 条件の違いによって K_M 値が広く分布しているが報告値の範囲内であった。

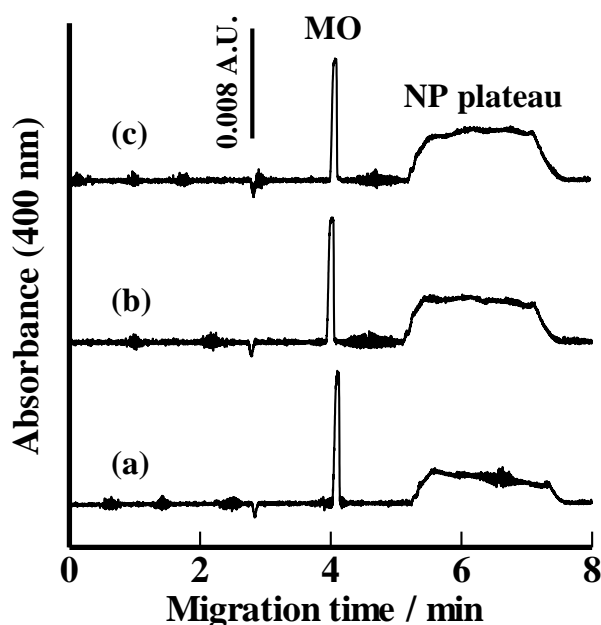


Fig. 3.4 Electropherograms of NPP for determination of K_M . (a) 0.4 mM, (b) 0.8 mM, (c) 1.2 mM NPP were added to sample solutions. Separation buffer: 10 mM borax+NaOH (pH 9.8) + 0.87 U mL⁻¹ ALP. CE conditions: 25 kV applied voltage, detection wavelength at 400 nm, sample injection at 50 mbar for 5 s, capillary temperature at 37 °C. MO: Methyl Orange as internal standard.

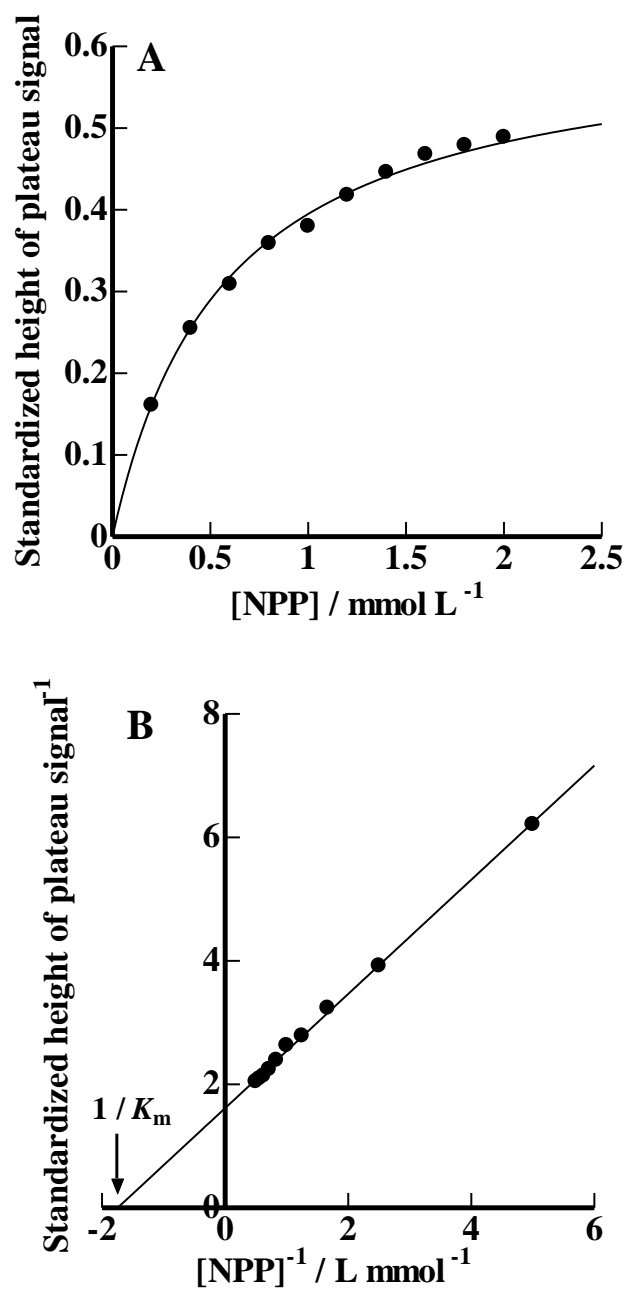


Fig. 3.5 (A) Michaelis-Menten curve and (B) Lineweaver-Burk plots for the analysis of the Michaelis-Menten constant. The CE conditions are the same as in Fig. 3.4.

3.3.2 阻害反応の同時測定

3.3.2.1 注入条件の最適化

Theophylline は ALP による酵素加水分解反応を阻害する物質として知られており、本研究でも ALP のモデル阻害剤として用いた。Theophylline は本研究で使用する pH 9.8 の泳動液中で-1 の電荷を持つ。Theophylline と NPP の電気泳動移動度の違いを利用することで、CE/DFA で得られるプラトーシグナルの一部で ALP 阻害を観測した。Fig. 3.2 の概略図に示したような Theophylline による ALP 阻害をプラトーシグナルに観測した電気泳動図を Fig. 3.6 に示す。阻害剤と基質が重なった部分で阻害反応が生じ、マーク(▼)で示したように高さが低下した。このようにして検出された一段低いプラトーシグナルの高さは阻害反応が生じた時の反応速度を反映している。また、阻害剤が基質ゾーンを通過した後は阻害が生じないため元の高さに戻った。

阻害を受けたプラトーシグナルの横幅は阻害剤溶液のゾーンの広さに依存しており、阻害剤溶液の注入時間を調節することで制御が可能である。注入圧力を 50 mbar とし、阻害剤溶液の注入時間を 10~40 s と変化させたときの電気泳動図を Fig. 3.7 に示す。Theophylline の注入時間を延長することで持続的に阻害効果を受けた生成物のプラトーシグナルを得た。プラトーシグナルの検出時間の違いは、阻害剤溶液の注入時間を延長することでキャピラリー内に先に注入された基質溶液のゾーンが検出器に近づくためである。30 s 以上の Theophylline の注入は電気泳動前に基質が泳動液との界面で反応することから適切ではなく、Fig. 3.7 に示すようにプラトーシグナルの検出開始時に高さが上昇した。また阻害反応の安定した観測が求められることから、20 s を Theophylline の注入時間の最適条件とした。

プラトーシグナル内の阻害位置は電気泳動中に阻害剤溶液が基質溶液に追いつく時間に依存しており、2 つの溶液のスペーサーとして注入する泳動液の注入時間を調節することで制御が可能である。注入圧力を 50 mbar とし、スペーサーの注入時間を 5~40 s に変更して得られた電気泳動図を Fig. 3.8 に示す。注入時間を延長し、CE 前の 2 つの溶液ゾーンを離すことで、プラトーシグナルの後方に阻害を観測した。5 s 未満の場合、電気泳動前に反応した NP ピークが阻害を反映したプラトーシグナルと重なる可能性があり、20 s 以上の注入は CE 前に反応が進み基質濃度を低下させる恐れがあった。したがってスペーサーである泳動液の注入時間は 10 s を最適条件とした。

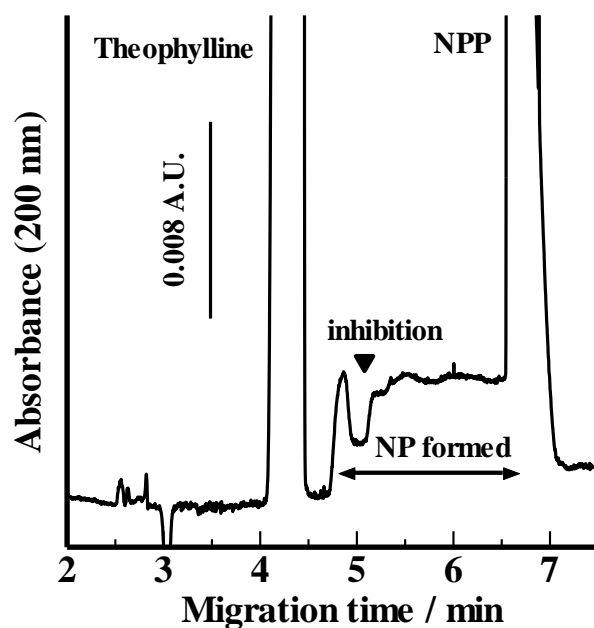


Fig. 3.6 Typical electropherogram in CE/DFA under inhibition. A substrate of NPP and an inhibitor of theophylline were tandemly injected into the capillary. A dipped plateau by the inhibition is detected in the plateau range of the formed NP. Concentration of NPP in the injected zone: 1.0 mM. Concentration of theophylline in the injected zone: 1.0 mM. Separation buffer: 10 mM borax+NaOH (pH 9.8) + 0.55 U mL⁻¹ ALP.

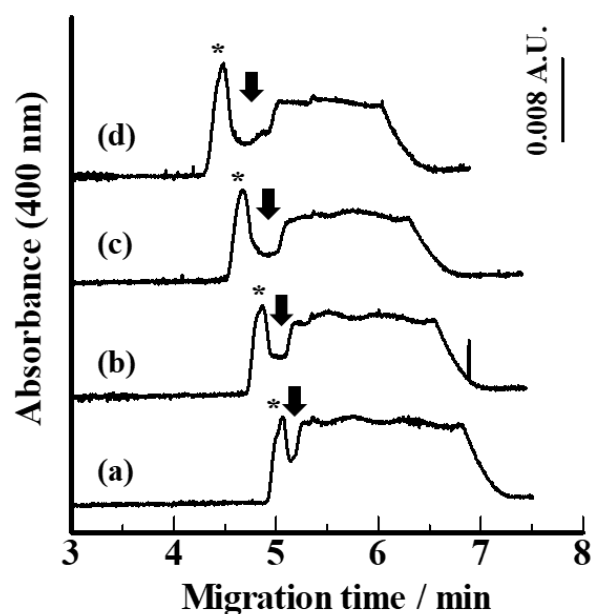


Fig. 3.7 CE/DFA electropherograms of NPP with ALP under tandem injections of NPP and Theophylline. The injection order of the solutions was: 2.0 mM NPP as a substrate for 5 s, the separation buffer for 10 s, and 1.0 mM Theophylline as an inhibitor. Injection period of Theophylline: (a) 10, (b) 20, (c) 30, and (d) 40 s. Black arrows indicate the inhibition with theophylline. *: NP generated in the NPP solution before the electrophoresis.

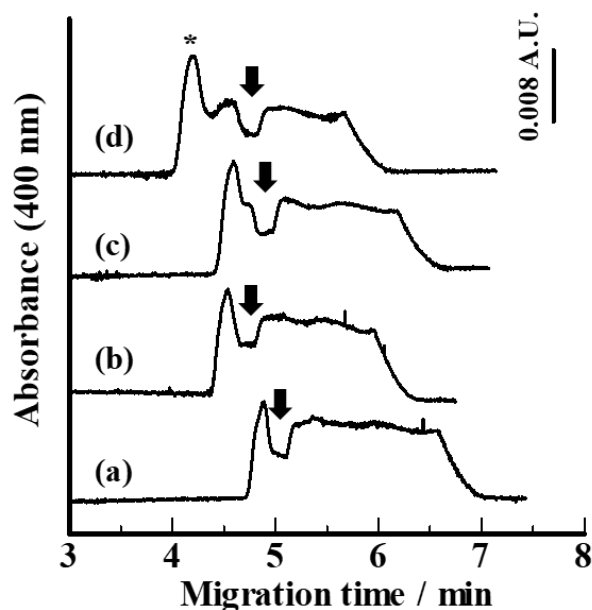


Fig. 3.8 CE/DFA electropherograms of NPP with ALP under tandem injections of NPP and Theophylline. The injection order of the solutions is: 2.0 mM NPP for 5 s, the separation buffer, and 1.0 mM Theophylline for 20 s. Injection period of the separation buffer: (a) 5, (b) 10, (c) 20, and (d) 40 s. Black arrows indicate the inhibition with theophylline. *: NP generated before the electrophoresis.

3.3.2.2 Michaelis-Menten 定数 K_M と阻害定数 K_I の同時決定

速度論解析では、阻害剤溶液に添加する阻害剤濃度を一定とし、試料液に添加する基質濃度を変化させることで K_M と K_I を同時に決定することが可能である。本研究では 0.4–3.0 mM の異なる NPP と 0.5 mM と 1.0 mM の Theophylline で解析を行った。前項の結果に基づき、阻害剤溶液の注入時間を 20 s、スペーサーの注入時間を 10 s に設定し、使用する高さは阻害を受けたプラトーシグナルの最も低い位置と阻害後のプラトーシグナルの最も高い位置を測定した。Theophylline 濃度が 1.0 mM の時に得られた電気泳動図を Fig. 3.9 に示す。基質濃度が高いほどプラトーシグナルの高さも上昇し、阻害効果も観測された。Fig. 3.4 でも見られたように、試料液に添加する基質濃度が低いと反応の進行とともに基質が減少しプラトーシグナルの高さも低下したが、最大反応速度を反映した最も高い位置を測定した。Michaelis-Menten 曲線と Lineweaver-Burk plot を Fig. 3.10 と Fig. 3.11 に示す。解析により $K_M = 1.59$ mM, $K_I = 0.72$ mM と計算された。また、阻害剤存在下で得られた直線と非存在下で得られた直線が平行であることから Theophylline による ALP 阻害の形式は不競合阻害と判別された。先行研究では $K_I = 0.69$ mM^[46] と報告されており、文献値と阻害形式は良好に一致した。以上のことから、本研究で提案した CE/DFA による K_M 及び K_I の同時測定は有用であることが示された。

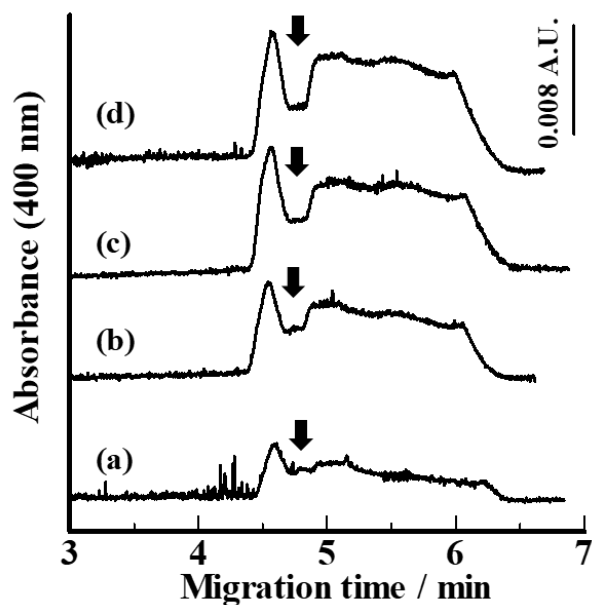


Fig. 3.9 CE/DFA electropherograms of NPP with ALP under tandem injections of NPP and theophylline at different concentrations of NPP. Concentrations of NPP: (a) 0.4, (b) 1.0, (c) 1.5, (d) 2.0 mmol L⁻¹. Concentrations of theophylline: 1.0 mmol L⁻¹. The injection sequence of the sample solutions is: substrate solutions for 5 s, separation buffer for 10 s, and inhibitor solutions for 20 s.

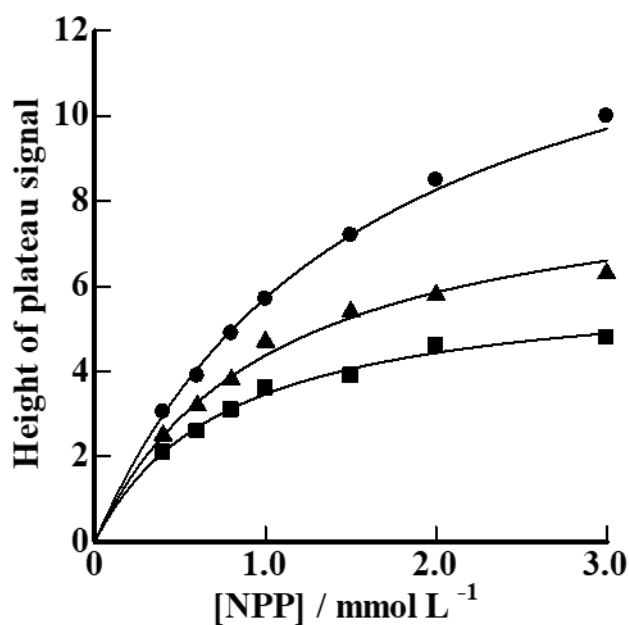


Fig. 3.10 Michaelis-Menten curve for the enzymatic hydrolysis of NPP with ALP by the inhibition with theophylline. Theophylline concentrations: ●, none (higher plateau); ▲, 0.5 mM; ■, 1.0 mM. The injection sequence, the separation buffer, and the CE conditions are the same as in Fig. 3.9.

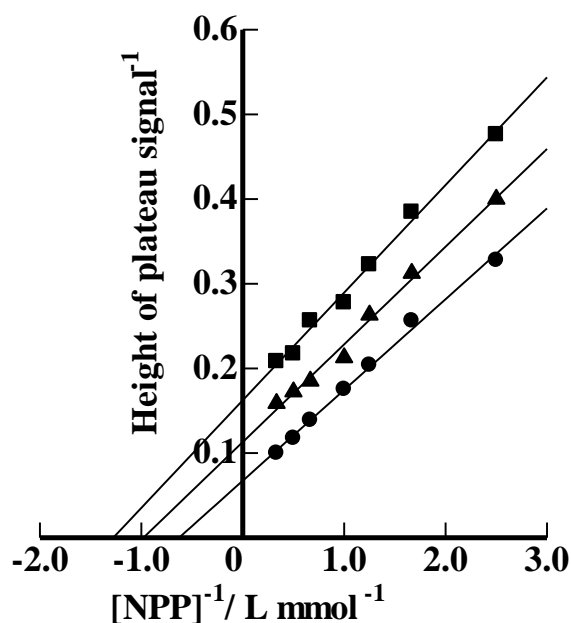


Fig. 3.11 Lineweaver-Burk plots for the enzymatic hydrolysis of NPP with ALP by the inhibition with theophylline. Theophylline concentrations: ●, none (higher plateau); ▲, 0.5 mM; ■, 1.0 mM. The injection sequence, the separation buffer, and the CE conditions are the same as in Fig. 3.9.

3.4 結言

本研究では NPP を基質とした ALP による加水分解反応をモデル反応として、CE/DFA の特性評価を行った。CE 前に分解済みの NP はインキャピラリー反応の前に分離され、プラトーシグナルの前に検出された。またプラトーシグナルの高さに影響を与えなかったことから CE/DFA では生成物障害を取り除いた測定が可能であると示された。速度論解析では $K_M = 0.57 \text{ mM}$ が得られ、文献値と良好に一致した。また CE/DFA を用いて K_M と K_I を同時に測定する新しい分析法を提案した。基質溶液、スペーサーとしての泳動液、阻害剤溶液の順に注入し、電気泳動を行うことでプラトーシグナルの一部に阻害効果を観測した。改良した CE/DFA では Theophylline の注入時間を延長することで、持続的に阻害効果を受けた生成物プラトーシグナルを検出した。またスペーサーとしての泳動液の注入時間を延長することで、電気泳動中に Theophylline が NPP に到達する時間を変えることができ、阻害効果がプラトーシグナルに現れる位置を制御することができた。速度論解析より $K_M = 1.59 \text{ mM}$, $K_I = 0.72 \text{ mM}$ が得られ、阻害形式は不競合阻害と決定された。得られた K_M は改良前の CE/DFA の結果と異なるが、使用した ALP が異なったことと CE 条件が異なったことなどが原因と考えられる。精確な K_M の決定のため、測定条件のさらなる検討は必要であるが、提案した CE/DFA は酵素の至適 pH 条件において阻害剤、基質、生成物の電荷が異なれば適用が可能であり、2 条件の同時測定は試料消費の低減や分析時間の短縮に貢献することから今後も様々な酵素において適用可能と考えられる。

第4章 β -D-ガラクトシダーゼを用いた基質競合解析

4.1 緒言

4.1.1 酵素反応における基質競合

1つの酵素が2つの基質と反応する場合、または2つの酵素が1つの基質と反応する場合、基質競合によって単一基質の反応とは異なる酵素活性を示す^[51]。基質競合はシグナルの伝達^[52-54]や代謝経路^[55,56]など様々な生物学的プロセスで見られるほか、生分解性プラスチックの分解過程^[57]でも見られる。基質競合下での酵素反応をモニタリングすることで、酵素の速度論的特性を評価でき、医薬品開発に役立てられる。酵素加水分解反応のような不可逆反応の場合、基質の競合は酵素阻害に当てはまり、異なる基質は互いの反応の阻害剤と見なすことができる^[51]。

4.1.2 β -D-ガラクトシダーゼ

β -D-ガラクトシダーゼ(EC 3.2.1.23)はグリコシド結合を加水分解する酵素であり、様々な微生物、植物、動物の細胞内に存在する^[58]。食品分野では主に乳製品製造に用いられており^[59]、甘さ、溶解性、風味などを改善するために使用されることから加水分解は重要な工程の1つとなっている^[60]。また、乳製品中の乳糖の分解は乳糖不耐症の人々の症状を緩和するためにも役立てられている^[60]。医療分野においては、 β -ガラクトシダーゼの不規則な酵素活性は癌の発症と関係していることから、初期段階における癌診断と治療の有効性の監視のためにも、酵素活性の測定は非常に重要である^[61]。

4.1.3 先行研究

β -D-ガラクトシダーゼによる加水分解反応は分析法開発におけるモデル反応としてしばしば用いられる。これまでにキャピラリー電気泳動法に基づく分析法では、プレキャピラリー反応測定^[18,62-64]、EMMA 及び PMMA^[18]、連続フロー分析^[65,66]などによる様々な速度論解析が報告されている。連続フロー分析とは酵素一分子を蛍光基質で満たしたキャピラリー内に注入し、反応した生成物の蛍光検出を連続的に行う分析法であり、酵素一分子ごとの活性の違いに着目した研究や二重インキュベーション^[67]による速度論解析などで使用された。また、キャピラリー内に熱応答性ナノゲルを用いて β -D-ガラクトシダーゼを固定して糖鎖解析を行う研究なども報告されている^[68]。キャピラリー電気泳動法を用いた速度論研究はこれまでに複数報告されているが、基質競合解析に適用された研究は未だ報告されていない。

4.1.4 本研究の目的

CE/DFA を β -D-ガラクトシダーゼによる酵素加水分解反応に適用し、さらに反応場に1種類の酵素と2種類の基質が存在する条件下での基質競合解析に応用した。基質として *o*-Nitrophenyl β -D-Galactopyranoside(ONPG)と *p*-Nitrophenyl β -D-Galactopyranoside(PNPG)を用い、生成物である *o*-Nitrophenol(ONP)と *p*-Nitrophenol(PNP)をプラトースIGNALとして観測した。Fig. 4.1 に各基質の酵素反応の概略図を示す。ONPG 及び PNPG はどちらも β -D-ガラクトシダーゼに関する速度論解析で一般的に用いられる基質であり、4.1.1 項で述べたようにお互いが阻害剤になると考えられる。まず CE/DFA による速度論解析に基づき、ONPG と PNPG の Michaelis-Menten 定数(K_M , ONPG, K_M , PNPG)をそれぞれ決定し、その後基質競合解析を行った。基質競合解析では ONPG を基質、PNPG を阻害剤と見なした解析と PNPG を基質、ONPG を阻害剤と見なした解析を行うことで、各基質のもう一方の基質に対する阻害定数(K_I , ONPG, K_I , PNPG)を決定した。

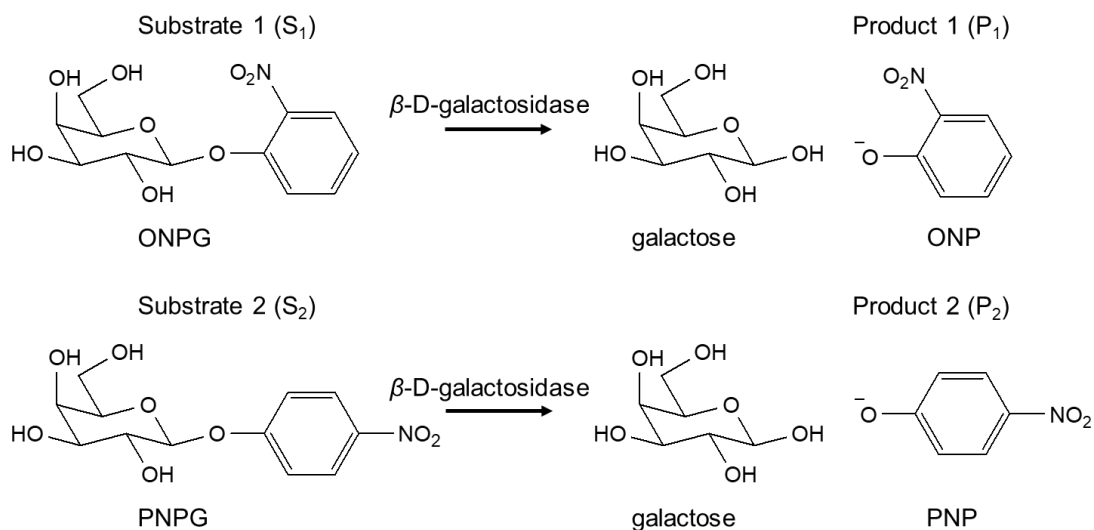


Fig. 4.1 Schematic of enzymatic hydrolysis reaction with β -D-galactosidase.

4.2 実験

4.2.1 試薬

本研究において使用した試薬を Table 4.1 に示す。リン酸二水素ナトリウム及びリン酸水素二ナトリウムの割合を変えて純水に所定量溶解させ、pH の異なる 50 mM リン酸緩衝液を複数調製した。泳動液として使用するときは5倍に希釈し、0.01 mM の時に最終 pH が 6.8–7.4 になるように調製された。また基質である ONPG 及び PNPg はそれぞれ 5 mM の溶液をストック溶液として調製し、速度論解析では緩衝液と純水で所定濃度に希釈した溶液を試料液として使用した。

Table 4.1 Reagents used in Chapter 4.

Reagents	Grade	Manufacturer
β -D-Galactosidase from <i>Escherichia coli</i>	–	Fujifilm Wako Pure Chemical
2-Nitrophenyl β -D-Galactopyranoside	Special grade	Fujifilm Wako Pure Chemical
4-Nitrophenyl β -D-Galactopyranoside	Special grade	Tokyo Chemical Industry
Sodium dihydrogenphosphate, anhydrous	Special grade	Kanto
Disodium Hydrogenphosphate	Special grade	Fujifilm Wako Pure Chemical

4.2.2 実験原理

4.2.2.1 CE/DFA による基質競合反応の解析方法^[69]

2 種類の基質のうち、一方の基質濃度(S_1)を一定とし、もう一方の基質濃度(S_2)のみ異なる溶液をそれぞれ試料液とする。CE/DFA に 2 種類の基質を試料として用いた測定におけるキャピラリー内の模式図を Fig. 4.2 に示す。試料ゾーンがキャピラリー内を移動することで、各基質が酵素(E)と反応し、2 種類の生成物(P_1 , P_2)が生成される。その結果、プラトーシグナルは 2 つの生成物を反映したシグナルとして観測される。また、2 種類の生成物は電気泳動移動度の差により分離され、Fig. 4.2(d)で表したような 2 段のプラトーシグナルとして観測される。1 種類の生成物のみ反映されたプラトーシグナルの高さはベースラインからの高さをそのまま使い、2 種類の生成物を反映したプラトーシグナルの高さから一種類のみのプラトーシグナルの高さを引いてもう一方の高さを決定した。CE/DFA による単一基質の酵素反応解析により得られた K_M を使い、基質競合反応は Lineweaver-Burk plot による解析から阻害形式と K_I を決定した。

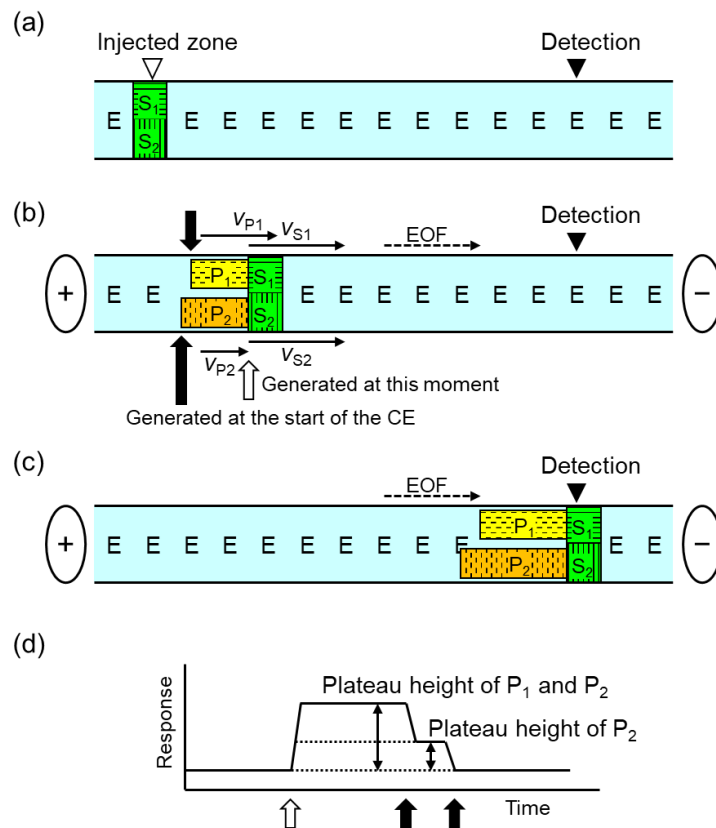


Fig. 4.2 Schematic migration diagram of two-substrates competitive reaction in CE/DFA (a)–(c) formed from two substrates of S_1 and S_2 ; an electropherogram (d) is expected by the competitive reaction. Two products of P_1 and P_2 are detected as two-steps plateau signals by the enzymatic reaction.

4.2.2.2 Lineweaver-Burk plot による基質競合反応の解析方法

2種類の基質による基質競合が生じる場合、式(21)と式(22)で表した2つの酵素反応が同時に進行する。



S_1 : 基質 1, S_2 : 基質 2, P_1 : 生成物 1, P_2 : 生成物 2

基質競合反応では、基質同士は酵素の結合部位を取り合う競争関係であることから、互いの競合阻害剤と見なすことができ、競合阻害形式の解析式(23)を用いることで S_1 に対する S_2 の阻害定数 ($K_{I,S1}^{S2}$) を決定することができる。

$$K_M' = K_M \left(1 + \frac{[S_2]}{K_{I,S1}^{S2}} \right) \quad (23)$$

K_M' : 見かけの Michaelis-Menten 定数, $[S_2]$: 基質 2 の濃度

4.2.3 実験操作

キャピラリーは全長 48.5 cm, 有効長 40 cm のものを使用し、検出波長は 200 nm と 400nm の2波長を設定した。

4.2.3.1 泳動液の pH 変化による生成物の分離

酵素反応の生成物である ONP と PNP は異なる pK_a を有するが、酵素活性の至適 pH 7.4 の泳動液で CE を行うとピーク同士が近接していることから、ONP と PNP の分離を改善する必要があった。至適 pH から大きく異なると反応性に影響を与えることから、pH 6.8, 7.0, 7.2 の異なる pH の 10 mM リン酸緩衝液をそれぞれ泳動液として使用し、ONP と PNP が最も分離される pH を決定した。試料バイアル中で 0.1 mM の ONPG と PNPG を酵素と十分に反応させ、生成された ONP と PNP の CE 分離を行った。印加電圧 20 kV, 試料注入量 50 mbar×3 s, キャピラリー内温度 37 °C, 検出波長 200 nm で測定を行った。

4.2.3.2 単一基質の酵素反応解析

0.5–3.0 mM の ONPG または PNP と 10 mM リン酸緩衝液(pH 6.78)を含んだ基質濃度が異なる 7 つの試料液を調製した。1.22 U mL⁻¹ β -D-ガラクトシダーゼを添加した 10 mM リン酸緩衝液(pH 6.78)を泳動液として使用し、各試料液から得られた生成物プラトーシグナルの高さを測定した。印加電圧 15 kV, 試料注入量 50 mbar \times 2 s, キャピラリー内温度 37 °C, 検出波長は 200 nm, 400 nm で測定を行った。

4.2.3.3 CE/DFA による基質競合解析

ONPG を基質, PNP を阻害剤と見なした解析と, PNP を基質, ONPG を阻害剤と見なした解析をそれぞれ行った。Michaelis-Menten 速度論解析を行う基質の濃度は 0.5–3.0 mM とし、阻害剤として添加する物質の濃度は 0.5 mM または 1.0 mM の 2 つの一定濃度で行った。1.22 U mL⁻¹ β -D-ガラクトシダーゼを添加した 10 mM リン酸緩衝液(pH 6.78)を泳動液として使用し、各試料液から得られた生成物プラトーシグナルの高さを測定した。4.2.2.1 項で述べたように、PNP はベースラインからの高さをそのまま用い、ONP の高さは ONP と PNP を反映したプラトーシグナルの高さから PNP のプラトーシグナルの高さを引いて決定した。印加電圧 15 kV, 試料注入量 50 mbar \times 2 s, キャピラリー内温度 37 °C, 検出波長 200, 400 nm で測定を行った。

4.3 結果と考察

4.3.1 泳動液の pH 変化による生成物の分離

ONP と PNP の酸解離定数(pK_a)はそれぞれ 7.23^[70]と 7.15^[70]であり, 使用する泳動液の pH を調節することで CE 分離が可能となる。ONP の pK_a の方が PNP よりも高いことから, pH 7.0 付近では PNP と比較しイオンの負電荷が小さく, 常に PNP よりも先に検出された。本項では泳動液の pH を変化させることで ONP と PNP のピーク分離を改善した。0.1 mM の ONPG と PNPG が酵素と十分に反応した反応液を試料液とし, pH 6.8–7.2 のリン酸緩衝液を泳動液として得られた結果を Fig. 4.3 に示す。pH 7.2 では近接していたが, pH 6.8 では十分に分離されており, さらなる低 pH での測定は酵素の反応性を低下させることから, 速度論解析では pH 6.8 の緩衝液を選択し単一基質の酵素反応解析及び基質競合解析を行った。

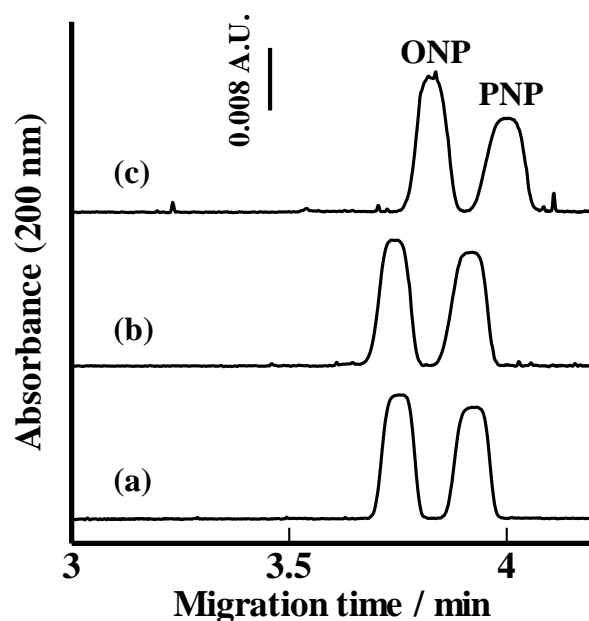


Fig. 4.3 Electropherograms of ONP and PNP. The electropherograms were obtained from a solution in which 0.1 mM ONPG and 0.1 mM PNPG were fully reacted with the enzyme. Separation buffer was 10 mM phosphate buffer at pH (a) 6.8, (b) 7.0, (c) 7.2. Capillary temperature was 37°C, injection volume was 50 mbar×3 s, applied voltage was 20 kV. Measurement wavelength was 200 nm.

4.3.2 単一基質の酵素反応解析

試料液に ONPG または PNPNG を異なる濃度で添加し, CE/DFA に基づく速度論解析を行った。ONPG を試料液に添加して得られた電気泳動図と, PNPNG を試料液に添加して得られた電気泳動図を Fig. 4.4 に示す。本研究で用いた基質 ONPG, PNPNG は共に電氣的に中性な物質であり, -1 の負電荷を有する生成物 ONP, PNP はプラトーシグナルとして基質の検出直後に連続的に検出された。試料液に添加した基質濃度が高いほど反応速度が上昇し, 高いプラトーシグナルが得られた。Fig. 3.4 に示した ALP と NPP の典型的な CE/DFA の電気泳動図でも見られたように, 添加した基質濃度が低い場合プラトーシグナルが徐々に低下した。Fig. 3.4 では CE 開始時の反応生成物はプラトーシグナルの前方に反映されるが, 本研究のような電荷がない基質から負電荷を有する生成物が生じる反応ではプラトーシグナルの後方に CE 開始時の反応生成物が反映された。本研究においても, 最大反応速度を反映したプラトーシグナルの最も高い位置を測定した。これらの結果から得られた Michaelis-Menten 曲線及び Lineweaver-Burk plot を Fig. 4.5 に示す。速度論解析の結果, $K_M, \text{ONPG} = 0.31 \text{ mM}$, $K_M, \text{PNPNG} = 0.27 \text{ mM}$ が得られた。PNPNG の方が ONPG よりも低い K_M を示したことから, 酵素との親和性が高い基質であるといえる。先行研究では K_M, ONPG は $0.12 \text{ mM}^{[71]}$, $0.14 \text{ mM}^{[72]}$, $0.60 \text{ mM}^{[73]}$, と報告されており, また K_M, PNPNG は $0.033 \text{ mM}^{[71]}$, $0.059 \text{ mM}^{[72]}$, $0.33 \text{ mM}^{[74]}$ と報告されている。測定方法の違いや pH 条件の違いにより, 文献は広く分布しているが, 本研究で得られた値は文献値と良好に一致した。また ONPG と PNPNG の 2 つの基質を用いた研究では, PNPNG の方が ONPG よりも低い K_M が報告されており^[71,72], 本研究で PNPNG の方が高い親和性を示したという結果からも整合性があるといえる。

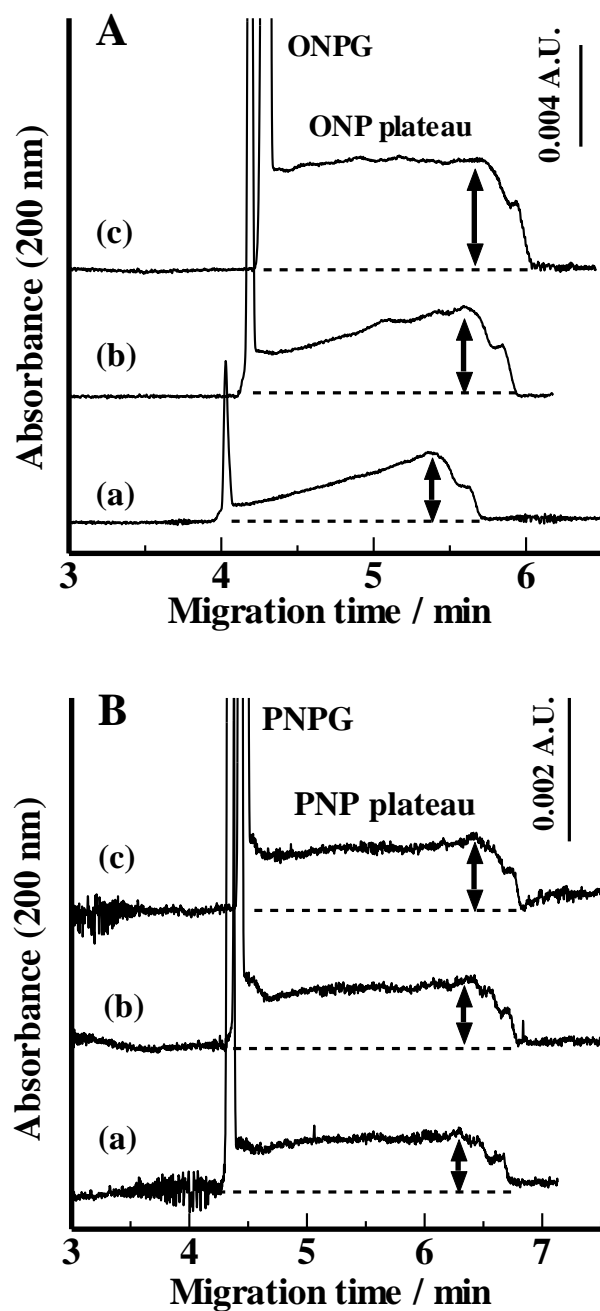


Fig. 4.4 Electropherograms of (A) ONPG and (B) PNP under CE/DFA. Separation buffer: 10 mM phosphate buffer (pH 6.78) with 1.22 U mL^{-1} β -D-galactosidase. Concentrations of the substrate in the sample solution: (a) 0.5 mM, (b) 1.0 mM, (c) 3.0 mM.

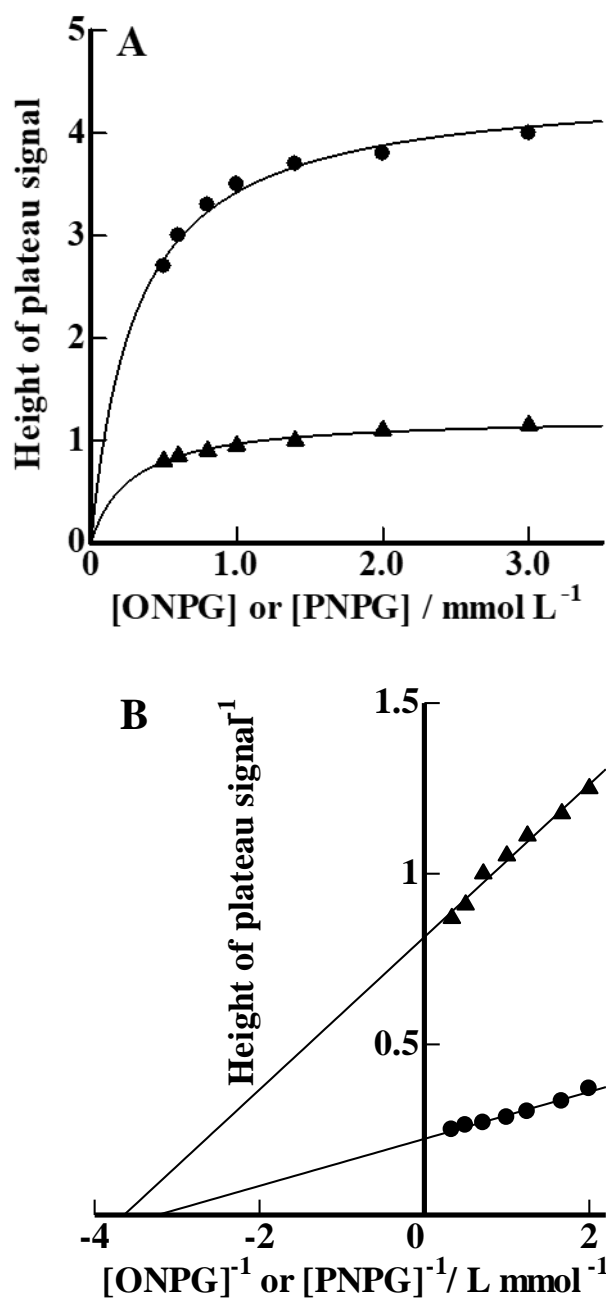


Fig. 4.5 (A) Michaelis-Menten curve and (B) Lineweaver-Burk plots of enzymatic reactions of ONPG (●) and PNPG (▲). The separation buffer, the sample solution, and the CE conditions are the same as in Fig. 4.3.

4.3.3 2つの酵素反応を反映したプラトーシグナルの検出

1.0 mM ONPG, 1.0 mM PNPG を添加した試料液を用いて得られた電気泳動図を Fig. 4.6 に示す。4.3.1 項で述べたように ONP と PNP の酸解離定数(pK_a)はそれぞれ 7.23^[70]と 7.15^[70]であり、特定の pH 条件で異なる電気泳動移動度を有している。4.3.1 項では泳動液を pH 6.8 に設定すると、近接していた ONP と PNP のピークを明確に分離できることが分かった。Fig. 4.6(a)は検出波長 400 nm, Fig. 4.6(b)は検出波長 200 nm で得られた電気泳動図であり、矢印(x), (y)で示した高さが PNP のみ含まれるプラトーシグナルの高さ、矢印(z)が ONP のみのプラトーシグナルの高さである。PNP は 400 nm で最大吸収を示すが、ONP はこの波長でほとんど吸収を示さないことから、2 波長でプラトーシグナルを比較することで 2 つの生成物の境界を明確にすることができた。速度論解析で使用する値は検出波長 200 nm で得られたプラトーシグナルの高さとし、ONP のプラトーシグナルの高さは ONP と PNP を含むプラトーシグナルから PNP のプラトーシグナルの高さを引いた値を用いた。

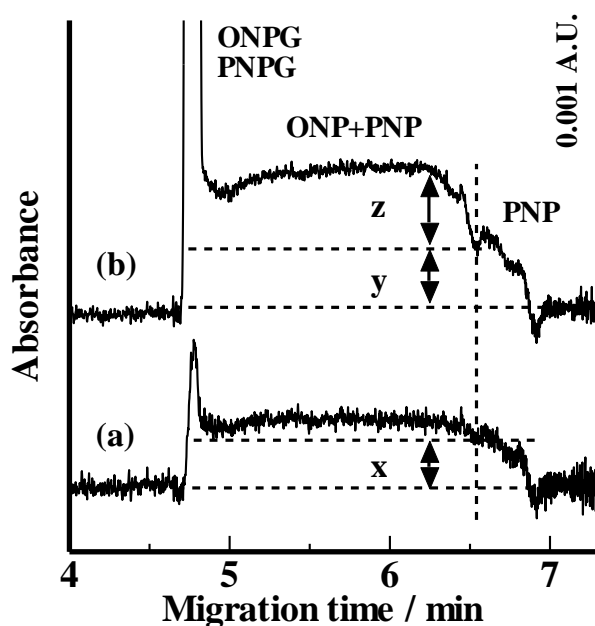


Fig. 4.6 An electropherograms of two-substrate competitive reaction by CE/DFA detected at two wavelengths of (a) 400 nm and (b) 200 nm. Double-headed arrows x and y correspond to the height of plateau signal of PNP and that of z corresponds to the height of plateau signal of ONP. Separation buffer: 10 mM phosphate buffer (pH 6.78) with 1.22 U mL⁻¹ β -D-galactosidase. Both concentrations of ONPG and PNPG in the sample solution were 1.0 mM.

4.3.4 CE/DFA による基質競合解析

ONPG を基質, PNPG を阻害剤と見なした基質競合解析の結果を Fig. 4.7 に示す。一定濃度の PNPG を試料液に添加し, 異なる濃度の ONPG を試料液に添加した。電気泳動図から, 試料液に占める ONPG の割合が大きくなるほど ONP のプラトーシグナルが上昇し, PNP のプラトーシグナルは低下していく様子が分かる。これは ONPG の濃度が高くなるほど, 酵素と優先的に ONPG が反応し, PNPG との反応性が低下したことによると考えられる。

PNPG を添加していない Lineweaver-Burk plot は 4.3.2 項の単一基質の酵素反応解析の結果を使用した。0.5 mM または 1.0 mM の PNPG を添加した場合, Lineweaver-Burk plot の傾きは変化したが生線は全て y 軸上で交わった。この結果より, PNPG の阻害形式は競合阻害と見なすことができる¹⁴⁾。競合阻害とは酵素の結合部位を基質と阻害物質が取り合う阻害形式であり, 今回使用した PNPG 及び ONPG はどちらも本来基質であることから, 競合阻害形式を示したことは基質競合解析の結果として整合性があるといえる。

続いて, PNPG を基質, ONPG を阻害剤と見なした基質競合解析の結果を Fig. 4.8 に示す。一定濃度の ONPG を試料液に添加し, 異なる濃度の PNPG を試料液に添加した。Fig. 4.7 でも見られたように, 試料液に占める PNPG 濃度が高くなるほど, PNP のプラトーシグナルが上昇し, ONP のプラトーシグナルは低下していった。3 本の Lineweaver-Burk plot は ONPG を基質とした場合同様, 全て y 軸上で交わったことから ONPG の阻害形式は競合阻害と見なすことができ, 基質競合の阻害形式として整合性を確認できた。

本研究で得られた K_M 及び K_I を文献値とあわせて Table 4.2 にまとめた。式(23)から得られた K_I は PNPG の方が低く, K_I が低いほど酵素との親和性が高いと言えることから本研究で得られた K_M と K_I には相補的な関係が認められた。

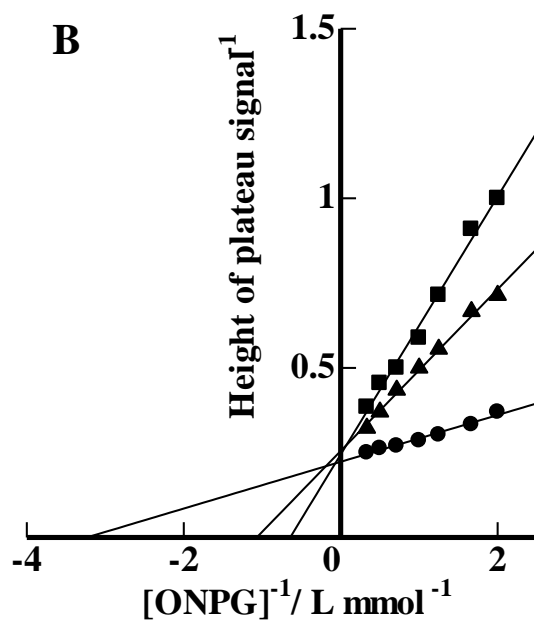
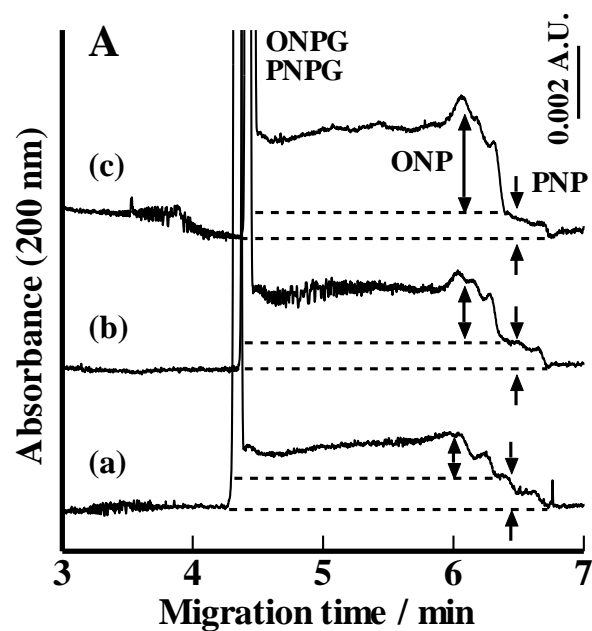


Fig. 4.7 Electropherograms (A) and Lineweaver-Burk plots (B) of ONPG under inhibition by PNP. (A) Concentration of an inhibitor PNP: 0.5 mM. Concentration of a substrate ONPG: (a), 0.5 mM; (b), 1.0 mM; (c), 3.0 mM. (B) Concentration of an inhibitor PNP: (●), none; (▲), 0.5 mM; (■), 1.0 mM. Separation buffer: 10 mM phosphate buffer (pH 6.78) with 1.22 U mL⁻¹ β -D-galactosidase.

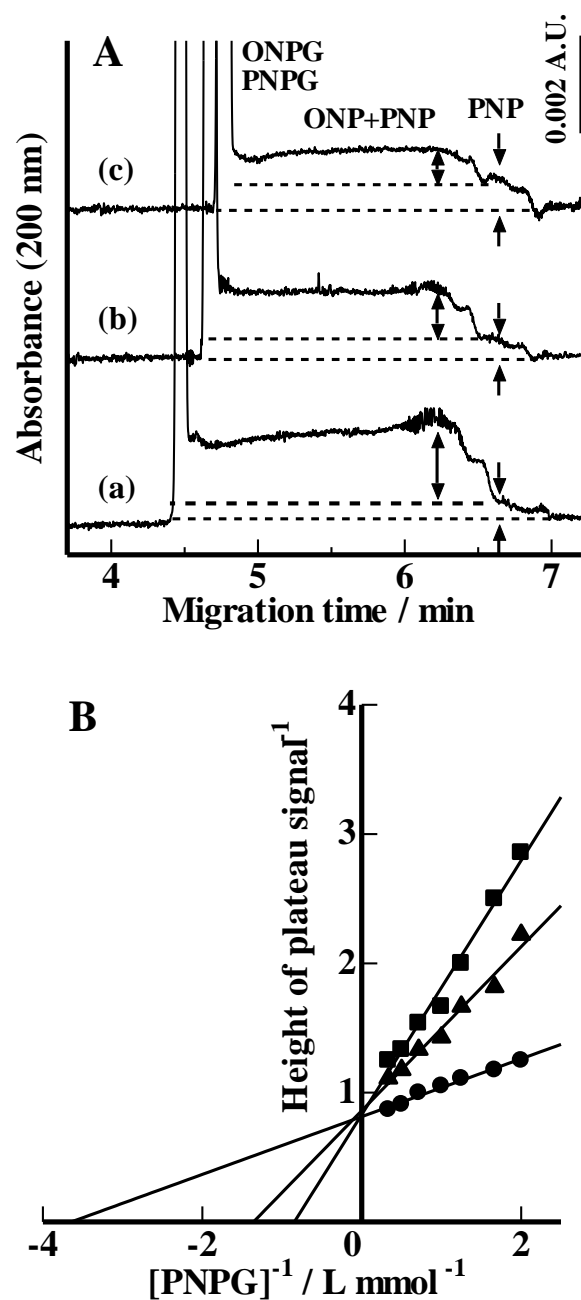


Fig. 4.8 Electropherograms (A) and Lineweaver-Burk plots (B) of PNP-Gal under inhibition by ONPG. (A) Concentration of an inhibitor ONPG: 0.5 mM. Concentration of a substrate PNP-Gal: (a), 0.5 mM; (b), 1.0 mM; (c), 3.0 mM. (B) Concentration of an inhibitor ONPG: (●), none; (▲), 0.5 mM; (■), 1.0 mM. Separation buffer: 10 mM phosphate buffer (pH 6.78) with 1.22 U mL⁻¹ β -D-galactosidase.

Table 4.2 Micahelis-Menten constants and inhibition constants of ONPG and PNPG determined by CE/DFA.

Substrate	K_M / mM	K_M / mM [Ref.]	K_I^* / mM
ONPG	0.31	0.12 ^[71]	0.30
		0.14 ^[72]	
		0.60 ^[73]	
PNPG	0.27	0.033 ^[71]	0.25
		0.059 ^[72]	
		0.33 ^[74]	

*: Average at the substrate concentrations of 0.5 and 1.0 mmol L⁻¹.

4.4 結言

本研究では CE/DFA に基づく基質競合解析法を提案した。CE/DFA を β -D-ガラクトシダーゼによる加水分解反応に適用し、1 種類の酵素と 2 種類の基質が存在する条件下での基質競合解析に応用した。モデル基質として *o*-Nitrophenyl β -D-Galactopyranoside(ONPG)と *p*-Nitrophenyl β -D-Galactopyranoside(PNPG)を用い、生成物である *o*-Nitrophenol(ONP)と *p*-Nitrophenol(PNP)をプラトーシグナルとして観測した。2つの基質を含む試料液を CE/DFA に用いることで2段のプラトーシグナルが得られ、各ステップの高さから ONP 及び PNP のプラトーシグナルの高さを得ることができた。本研究で用いた基質 ONPG, PNPG は共に電気的中性物質であるため、電荷-1 を有する生成物 ONP 及び PNP は基質の検出直後に連続的に検出された。単一基質反応の解析の結果 $K_{M, ONPG} = 0.31$ mM, $K_{M, PNPG} = 0.27$ mM が得られ、文献値と良好に一致した。また得られた K_I は K_M と相補的な関係が認められ、ONPG よりも PNPG の方が酵素との親和性が高いという結果も先行研究での報告と一致した。ONPG または PNPG のどちらかを基質、阻害剤とした場合でも Lineweaver-Burk plot の結果では競合阻害形式を示しており、基質競合解析において整合性のある結果が得られた。以上のことから、CE/DFA による基質競合解析は実証できたと言え、また競合阻害の阻害形式を示す阻害反応解析にも有用であると言える。従来の基質競合解析では Michaelis-Menten 式の補正が必要とされてきたが^[75]、提案した CE/DFA による基質競合解析では生成物阻害を取り除き、定常状態での測定が可能なることから補正を必要としない。生成物の電気泳動移動度が異なれば多基質反応や β -D-ガラクトシダーゼ以外の酵素にも適用が可能であり、本法は CE に基づく酵素反応解析の可能性をさらに広げると考えている。

第5章 カルボキシルエステラーゼを用いた酵素反応解析

5.1 緒言

5.1.1 カルボキシルエステラーゼ

哺乳動物カルボキシルエステラーゼ(EC.3.1.1.1)は多重遺伝子族を含み、小胞体の内腔内に局在するセリンヒドロラーゼの一種である^[76,77]。5つの遺伝子ファミリーに分類され、主要なCES1は肝臓、CES2は腸内、CES3は脳、肝臓、結腸で発現される。CES5及びCES7は猫の尿中タンパク質で、わずかに人体にも存在する。また、脳内でCES6の存在が予想されている^[78]。CESはエステル、チオエステル、アミド、カルバメート結合を生体内で加水分解し様々な構造を持つ数多くの薬物の加水分解反応に関与する^[79,80]ことから、生体内において重要な役割を果たしている。生体異物代謝に関する研究ではCES1とCES2が広く使われており、CESは今後もプロドラッグやソフトドラッグで、ドラッグデザインの基礎としてますます使用される^[81]ようになることから、CES活性の分析法開発は重要である。

5.1.2 圧力支援キャピラリー電気泳動法

圧力支援キャピラリー電気泳動法(pCE)とは電気泳動中に一定の圧力を印加することで測定物質の検出を早める分析法である。pCEはこれまでにヘパリン解重合二糖類の質量分析^[82]、多価陰イオンの分析^[83]、メタボローム解析^[84]、創薬研究^[85]、酸解離定数の決定^[86]、キャピラリー電気泳動/前端分析(CE/FA)^[87,88]、ハロ酢酸のオンライン濃縮^[89]などで使用されており、有効性が認められている。また酵素反応解析においてもPMMAやTDLFPなどの分析法では、圧力支援を介した基質と酵素の混合によりインキャピラリー反応を行っている。

5.1.3 先行研究

CEに基づくCES活性測定の先行研究として、プレキャピラリー反応による阻害スクリーニング^[90,91]や生体サンプル中のCESの定量^[92]などの研究がこれまでに報告されており、CES活性の測定に対してCEは有用である^[93]。Bis(*p*-nitrophenyl) phosphate(BNPP)はCESの特異的阻害剤として報告されており、阻害反応解析のモデル阻害剤としてしばしば用いられている^[91,92]。しかし、インキャピラリー反応に基づくCESの速度論解析は未だ報告されていない。

5.1.4 本研究の目的

CESによる加水分解反応の概略図と阻害剤BNPPの構造をFig. 5.1に示す。CESによる加水分解反応のモデル基質として

-ニトロフェニル酢酸(NPA)を選択し、生成物

-Nitrophenolをプラトーシグナルとして検出した。CESは本稿の3,4章で使用したALPやβ-D-ガラクトシダーゼと比較し、緩やかに反応が進行するという特徴があった。プレキャピラリー反応測定では、反応で蓄積された生成物が1つのピークで検出されるのに対し、CE/DFAでは生成物が蓄積されることなく連続的に検出されるため、解析に十分な高さの生成物プラトーシグナルを得るためには高濃度の酵素を泳動液に添加する必要がある。しかし、泳動液に高濃度の酵素を添加する場合、キャピラリー管壁へ酵素が吸着し、ショットシグナルの増加やプラトーシグナルの応答が不安定という問題が生じ、従来のCE/DFAをCESの反応に応用する場合改良が必要であった。

以上の背景を踏まえて、本研究では圧力支援システムをCE/DFAに適用した圧力支援キャピラリー電気泳動/動的前端分析(pCE/DFA)を提案する。1.5項で挙げた従来法のうち、EMMAでは電気泳動のみを酵素反応の媒介とし、PMMA及びTDLFPでは圧力のみを酵素反応の媒介としているのに対し、pCE/DFAでは電気泳動と圧力の両方を媒介としてインキャピラリー反応を行っている。圧力印加によりプラトーシグナルの迅速な検出を可能とし、またキャピラリー内が層流状態になることで溶液ゾーンの拡散が起こり、高さが均一化されたプラトーシグナルを得られた。また、泳動液に阻害剤BNPPを添加し、阻害反応解析により50%阻害濃度(IC₅₀)を決定し、試料調製時に添加したエタノールが測定に及ぼす影響をプレキャピラリー反応およびCE/DFAで検証した。

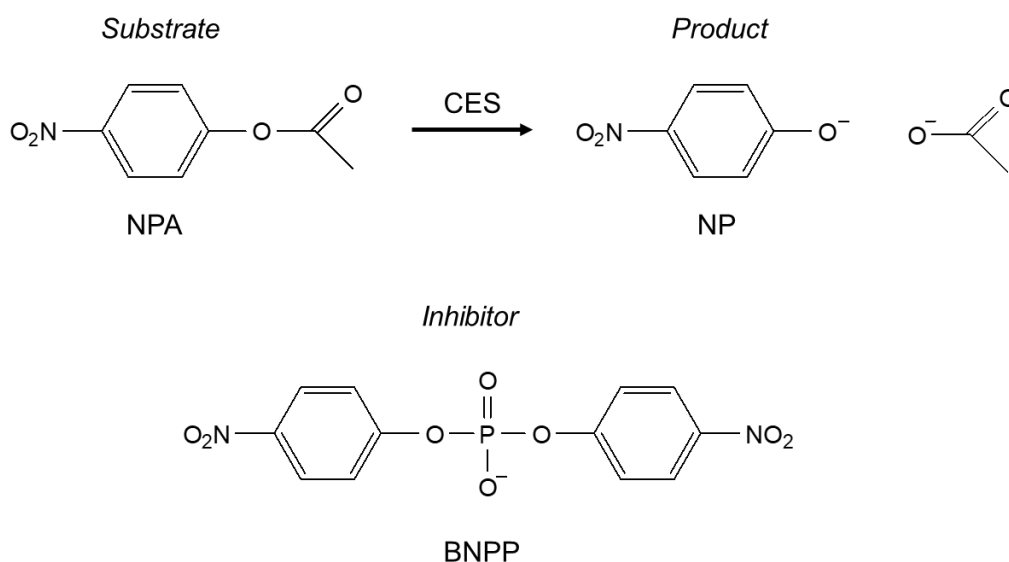


Fig. 5.1 Schematic of enzymatic hydrolysis reaction with CES and structure of BNPP.

5.2 実験

5.2.1 試薬

本研究において使用した試薬を Table 5.1 に示す。リン酸二水素ナトリウム及びリン酸水素二ナトリウムをそれぞれ純水に所定量溶解させ、混合することで pH 7.4 の 10 mM リン酸緩衝液を調製した。基質 NPA は水に難溶であるため、3%(v/v)エタノールを添加し 5.0 mM NPA の溶液を得た。この基質溶液を純水及び泳動液と同じ量の緩衝液で希釈することで各基質濃度の試料液を調製した。

Table 5.1 Reagents used in Chapter 5.

Reagents	Grade	Manufacturer
Carboxylesterase 1 isoform b human recombinant	–	SIGMA-ALDRICH
<i>p</i> -Nitrophenyl Acetate	Special grade	Tokyo Chemical Industry
<i>p</i> -Nitrophenol	Special grade	Fujifilm Wako Pure Chemical
Bis(<i>p</i> -nitrophenyl) phosphate	Special grade	SIGMA-ALDRICH
Sodium dihydrogenphosphate, anhydrous	Special grade	Kanto
Disodium Hydrogenphosphate	Special grade	Fujifilm Wako Pure Chemical
Ethanol	Special grade	Kishida

5.2.2 pCE/DFA による阻害反応の解析方法^[94]

pCE/DFA による酵素反応の様子を Fig. 5.2 に示す。まず酵素が添加された泳動液をキャピラリー内に満たし、基質溶液を試料液として注入する。電気泳動を開始することで基質ゾーンと泳動液の接触により酵素反応が開始され、電気泳動移動度の違いから生成物は基質ゾーンから分離される。電気浸透流(EOF)に加え、圧力支援によって基質ゾーン及び生成物ゾーンは検出部方向に向かって押し進められ、層流状態になり、拡散が生じることで不均一であった生成物量が均一化される。圧力支援を行わない場合, Fig. 5.2(d)中の点線で示したようなプラトーシグナルが検出され、高さの最大値(H_{\max})と最小値(H_{\min})に大きな差が見られる。一方, pCE/DFA ではプラトーシグナルの検出が短縮され、実線で示した平均化された高さ(H_{ave})を持つプラトーシグナルを得ることができる。

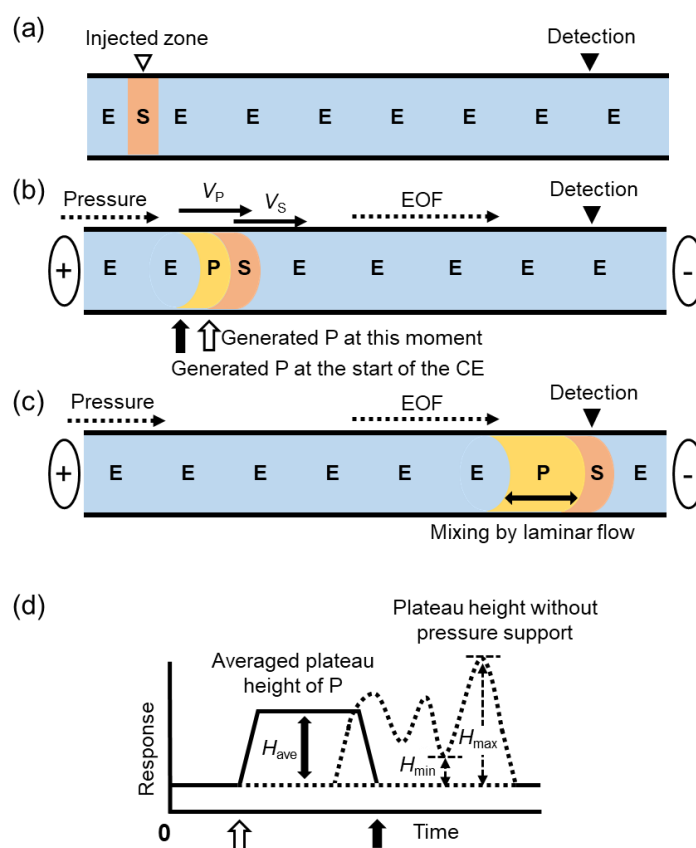


Fig. 5.2 Schematic diagram of an enzymatic hydrolysis of NPA with CES by pCE/DFA. (a)–(c) show the migration of the substrate (S) and the product (P) in a laminar flow profile in a capillary, where an enzyme (E) is contained in the separation buffer. A box-shaped plateau signal would be detected by the pCE/DFA as in solid line in (d) based on the diffusion by the laminar flow, while the fluctuated signal (dotted line) might be detected without pressure assist. H_{\max} , H_{\min} and H_{ave} denote the maximum, minimum, and average heights of the plateau signal.

5.2.3 実験操作

キャピラリーは全長 48.5 cm, 有効長 40 cm のものを使用し, 基質 NPA は 270 nm で検出し, 生成物 NP は 400 nm で検出した。キャピラリー内及び CE システムのバイアルトレー内は 37°C に保たれていた。

5.2.3.1 支援圧力変化における pCE/DFA

3.0 mM NPA を含む試料液と, 2.0 U mL⁻¹ CES と 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)を含む泳動液を使用し, 支援圧力変化による生成物プラトースIGNALの影響について調査した。印加電圧 3 kV, 試料注入量 50 mbar×3 s, 支援圧力を 0–20 mbar と変化させ測定を行った。

5.2.3.2 エタノール添加による影響の調査

プレキャピラリー反応測定と CE/DFA 測定の 2 つの方法でエタノールの添加による酵素の失活が測定に及ぼす影響を調べた。プレキャピラリー反応測定では NP ピーク面積を, CE/DFA ではプラトースIGNAL高さをエタノール含有量ごとに比較した。2 mM NPA を含む基質溶液の調製には 2% (v/v)のエタノールを使用しており, この基質溶液の結果を基準とし, エタノールの追加による生成物の減少を 20% (v/v)まで測定した。2.0 mM の NPA と所定量のエタノール, 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)を含む溶液を試料液とし, 10 mM リン酸緩衝液と 2.0 U mL⁻¹ CES を含む溶液を泳動液とした。反応時間 6 分, 試料注入量 50 mbar×3 s, 印加電圧 25 kV とした。

5.2.3.3 pCE/DFA による速度論解析

加水分解反応の速度論解析では, 0.5–4.0 mM NPA と 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)を含む溶液を試料液とし, 10 mM リン酸緩衝液と 2.0 U mL⁻¹ CES を含む溶液を泳動液とした。NP のプラトースIGNALの高さをを用いて K_M を決定した。測定条件は印加電圧 3 kV, 試料注入量 50 mbar×3 s, 支援圧力 15 mbar とした。

BNPP による阻害反応の解析では, 2.0 mM の NPA と 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)を含む溶液を試料液とし, 10 mM リン酸緩衝液と 2.0 U mL⁻¹ CES を含む溶液を泳動液とした。泳動液に阻害剤 BNPP を 0.01–10 μM の濃度範囲で添加し, プラトースIGNALの減少を観測した。印加電圧 3 kV, 試料注入量 50 mbar×3 s, 支援圧力 15 mbar で測定を行った。50%阻害濃度 (IC₅₀)は, 阻害度を縦軸, log [BNPP]を横軸としてプロットし, 非線形最小二乗法によるカーブフィッティングから決定した。

5.3 結果と考察

5.3.1 圧力支援によるプラトーシグナルの検出と支援圧力変化

本研究で用いた基質 NPA は電氣的に中性であり、生成物 NP は-1 の負電荷を持っている。したがって Fig. 5.2 の概略図に示すように NPA が最初に検出され、連続的に生成された NP がプラトーシグナルとして検出された。従来の CE/DFA で得られた電気泳動図を Fig. 5.3 に示す。印加電圧 15 kV だと CES による加水分解反応が緩やかであることから、プラトーシグナルの感度が小さく、ショットシグナルも多かった。また、印加電圧 3 kV で測定した場合プラトーシグナルの感度は得られたが高さが変動しており、プラトーシグナルの検出に非常に長い時間がかかった。

一方、支援圧力を印加すると Fig. 5.4 のように高さの安定したプラトーシグナルを迅速に検出することができた。これは EOF に加えて圧力により泳動液が検出器に向かって速く移動することに起因している。NPA は 270 nm で検出されるが、NP の応答が小さいことから、400 nm の結果を使用する。支援圧力を 5-20 mbar と変化させた場合の結果を Fig. 5.5 に示す。支援圧力を大きくするほど測定時間は大幅に短縮され、プラトーシグナルの横幅も短くなった。一方、プラトーシグナルの高さはほとんど変化がなかった。この結果は、基質ゾーンが圧力印加によって希釈されず、pCE/DFA の間一定に保たれていることを表している。しかし、20 mbar 以上の圧力支援は pCE 前に分解された NP と重なったため適切ではなく、以降の実験では測定時間が短く、プラトーシグナルの幅が十分にある 15 mbar を測定条件とした。

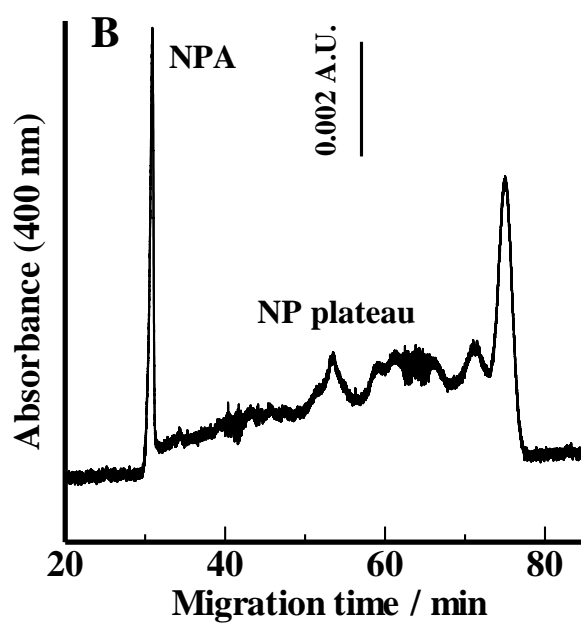
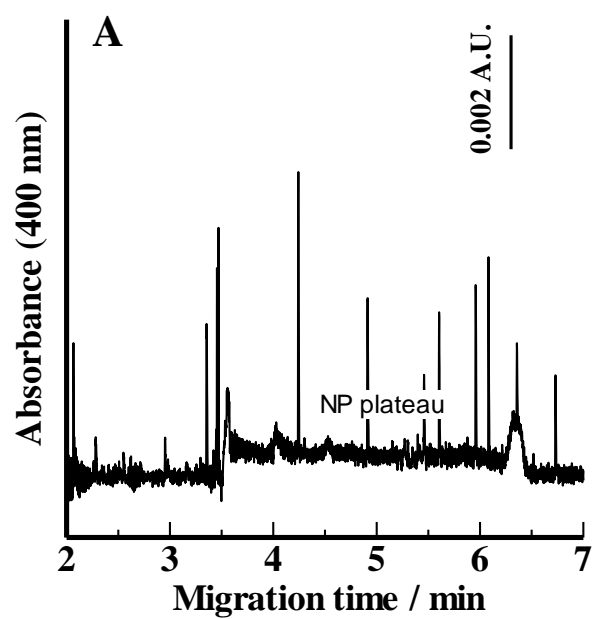


Fig. 5.3 CE/DFA electropherograms of NPA at (A) 15 kV and (B) 3 kV applied voltage. Separation buffer: 10 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.4) with 2.0 U mL⁻¹ CES. The sample solution contained 3.0 mmol L⁻¹ NPA and the phosphate buffer.

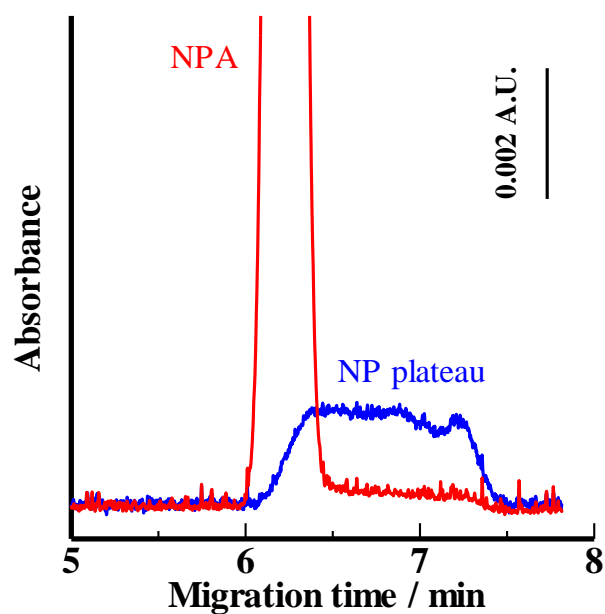


Fig. 5.4 Typical electropherograms of pCE/DFA at 270 nm (red line) and 400 nm (blue line). Separation buffer: 10 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.4) with 2.0 U mL⁻¹ CES. Sample solution contained 3.0 mmol L⁻¹ NPA and the phosphate buffer. CE conditions: assist pressure was 15 mbar, applied voltage was 3 kV.

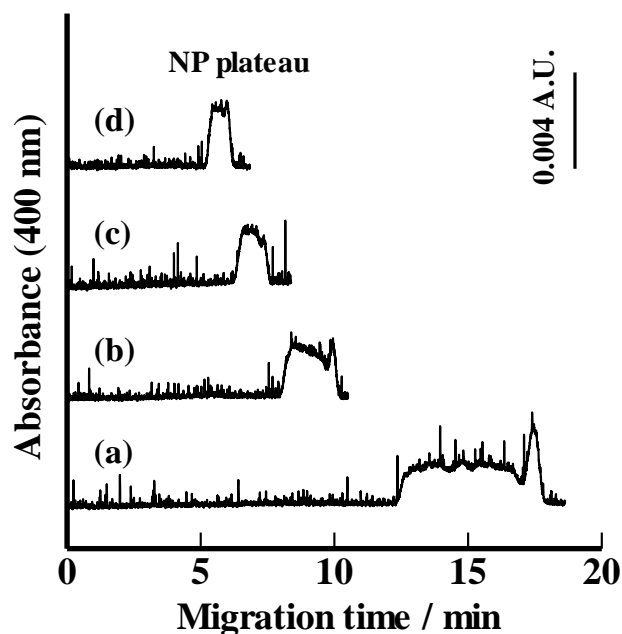


Fig. 5.5 Effect of the assist pressure on pCE/DFA. The assist pressure was: (a) 5 mbar, (b) 10 mbar, (c) 15 mbar, (d) 20 mbar. Separation buffer: 10 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.4) with 2.0 U mL⁻¹ CES. The sample solution contained 3.0 mmol L⁻¹ NPA and the phosphate buffer.

5.3.2 酵素反応解析におけるエタノール添加の影響

エタノールはタンパク質の構造を変異させることから、不可逆的阻害剤として酵素を失活させる。本研究では 5 mM NPA の基質溶液を調製する時に 5 % (v/v) のエタノールを使用しており、試料液として 2 mM NPA に希釈した場合 2 % (v/v) のエタノールが含まれていることから測定への影響が考えられる。プレキャピラリー反応測定では NP ピーク面積を、CE/DFA ではプラトースIGNALの高さをエタノール含有量ごとに比較した。2 % (v/v) のエタノールが含まれた 2 mM NPA の結果を活性 100 % とし、エタノールの追加による生成物量の減少を酵素活性の低下としてプロットしたグラフを Fig. 5.6 に示す。プレキャピラリー反応では 1 % (v/v) 添加しただけで活性が 15 % 以上低下した。また時間の経過とともに分解済みの NP ピークとも重なることから、失活は測定値より大きいと考える。したがって、調製時に添加されている 2 % (v/v) のエタノールも測定へ大きく影響していると考えられる。一方、CE/DFA では 4 % (v/v) まで高さに影響がないことが分かる。プレキャピラリー反応では、基質は反応器内に含まれる酵素分子とのみ反応し、エタノールにより不可逆的に失活した酵素とは反応できないが、CE/DFA では基質がキャピラリー内を移動する間、次々と新たな酵素分子と反応して移動するため失活の影響がないといえる。6 % (v/v) 以降はエタノールの増加により EOF の負のピークが大きくなり、重なることでプラトースIGNALが低下したと考えられる。以上の結果より、CE/DFA は調製時のエタノールの添加に影響されず、精確な測定が可能であるといえる。

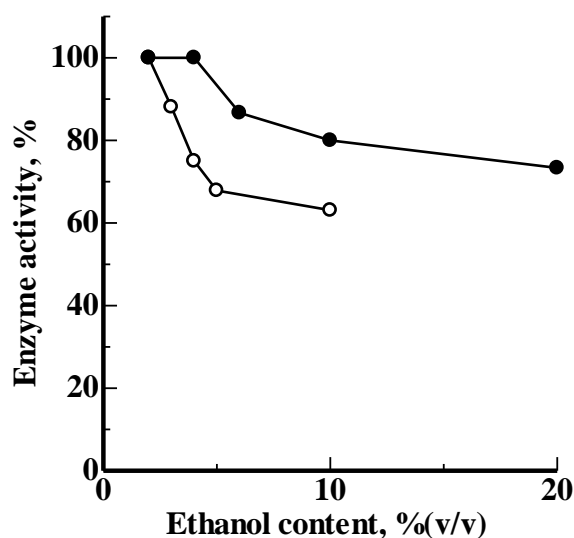


Fig. 5.6 Relationship between the ethanol content in the sample solution and the enzyme activity. ●, pCE/DFA; ○, pre-capillary reaction. Conditions for the pre-capillary reaction: 2.0 mM NPA and 2.0 U mL⁻¹ CES in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4). Incubation time: 6 min. CE conditions for the pre-capillary reaction: 25 kV applied voltage, 50 mbar × 3 s sample injection, detection wavelength at 400 nm, and 37 °C capillary temperature. The separation buffer was 10 mM phosphate buffer (pH 7.4)

5.3.3 Michaelis-Menten 速度論解析

試料液に含まれる NPA 濃度を 0.5–3.0 mM と変化させ、NP プラトーシグナルの高さを測定することで Michaelis-Menten 速度論解析を行った。0.5 mM または 3.0 mM の NPA が含まれる試料液にはそれぞれ 0.5 % (v/v) と 3.0 % (v/v) のエタノールが含まれているが、5.3.2 項で 4 % (v/v) 以内のエタノールは pCE/DFA 測定に影響しないことが分かったため、エタノールの含有量を合わせる必要がなかった。異なる基質濃度で得られた電気泳動図を Fig. 5.7 に示す。プラトーシグナルの右端は分解済みの NP が重なって検出され、また試料ゾーンが完全に酵素と接触するまでに時間差があるため緩やかに高さが上昇した。左端は NPA が高濃度になるほどわずかに検出されることから、本研究では定常状態の反応速度を現したプラトーシグナルの中間点の高さを測定し解析に用いた。得られた Lineweaver-Burk plot を Fig. 5.8 に示す。支援圧力 15 mbar では $K_M = 0.83$ mM が得られ、文献値 0.822 mM^[95] と良好に一致した。また支援圧力の大きさが K_M に与える影響を調査するため 5 mbar, 10 mbar でも同様の測定を行ったところ、 ± 0.02 mM 以内でほとんど同じ K_M 値が得られたことから妥当な値といえる。

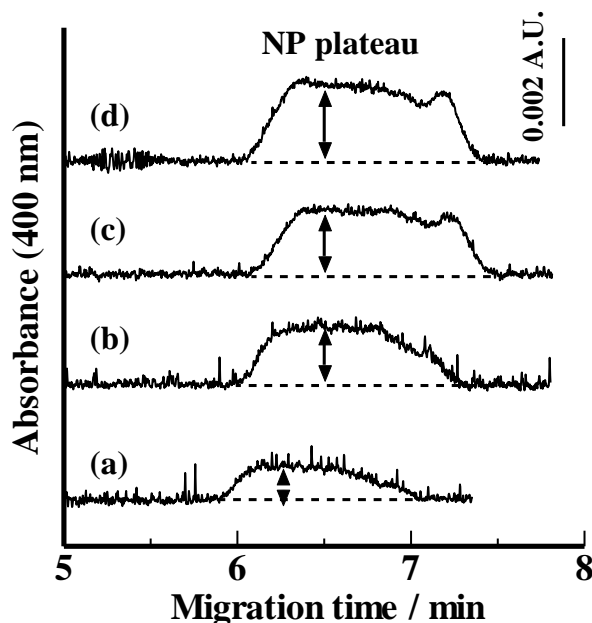


Fig. 5.7 Typical electropherograms of NPA in pCE/DFA. Separation buffer: 10 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.4) with 2.0 U mL⁻¹ CES. Sample solutions contained (a) 0.5 mmol L⁻¹, (b) 1.0 mmol L⁻¹, (c) 2.0 mmol L⁻¹, (d) 3.0 mmol L⁻¹ NPA and the phosphate buffer. CE conditions are the same as in Fig. 5.5(c).

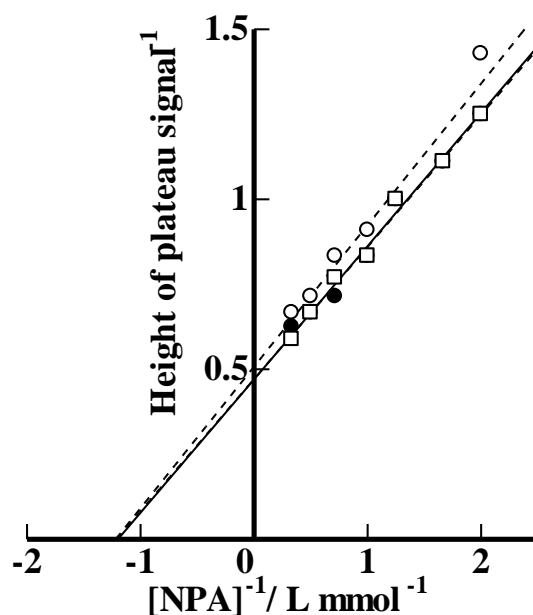


Fig. 5.8 Lineweaver-Burk plots of NPA in pCE/DFA. Separation buffer: 10 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.4) with 2.0 U mL⁻¹ CES. The assist pressure in (B) was ○ 5 mbar, ● 10 mbar, and □ 15 mbar. CE conditions are the same as in Fig. 5.7.

5.3.4 Bis-ニトロフェニルリン酸による阻害反応の解析

Bis-ニトロフェニルリン酸(BNPP)はCESの不可逆的阻害剤として報告されており^[90], CESのモデル阻害剤としてしばしば用いられる。CESが含まれる泳動液にBNPPを添加し, pCE/DFAで得られたプラトーシグナルの高さの低下を酵素活性の減少として測定した。BNPP阻害下で得られた電気泳動図及びBNPP濃度と酵素活性の阻害曲線をFig. 5.9に示す。泳動液に含まれるBNPP濃度が大きくなるほど酵素反応が阻害され, プラトーシグナルの高さが低下した。得られた阻害曲線から $IC_{50} = 0.50 \mu\text{M}$ と決定された。文献では $IC_{50} = 0.6 \mu\text{M}$ ^[96]と報告されており, 良好に一致した。以上のことから, pCE/DFAは阻害反応解析においても有用であるといえる。

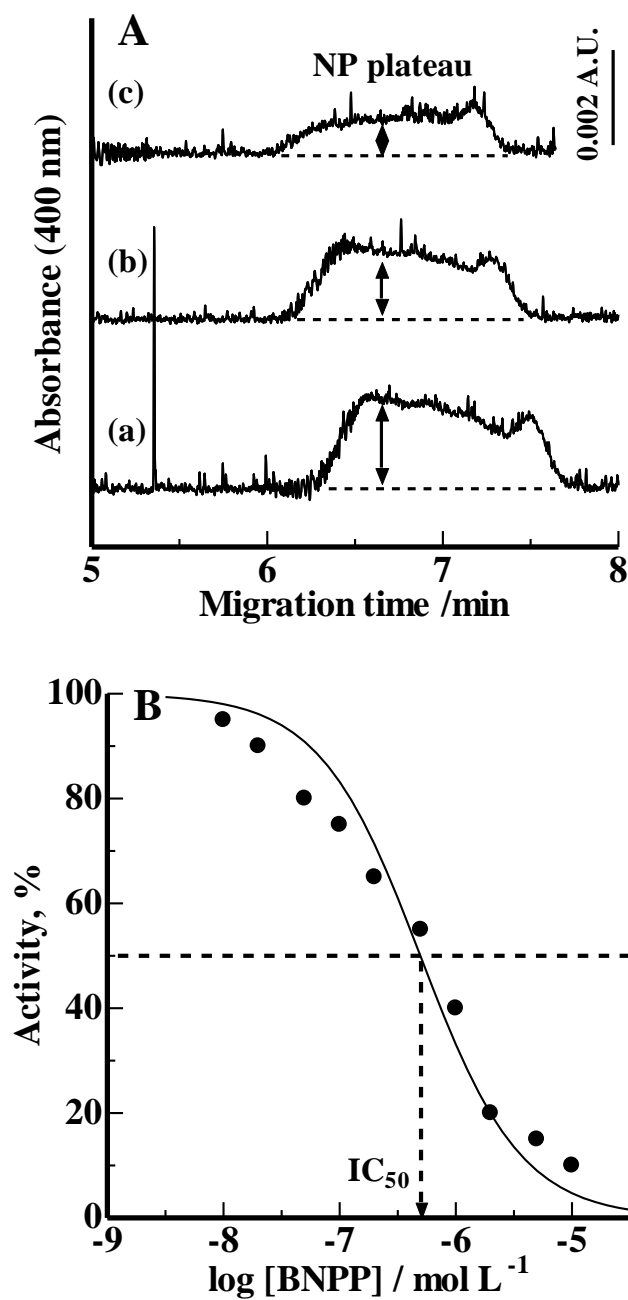


Fig. 5.9 Typical pCE/DFA electropherograms (A) and inhibition plots (B) of NPA under BNPP inhibition. Separation buffer: 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) + 2.0 U mL⁻¹ CES + BNPP. Concentrations of BNPP: (a) 0.01 μM, (b) 0.1 μM, (c) 1.0 μM. Sample solutions contained 2.0 mM NPA and the phosphate buffer components. A curve in (B) is drawn with $100/(1+[BNPP]/IC_{50})$.

5.4 結言

本研究は圧力支援を CE/DFA に適用した pCE/DFA を提案した。pCE/DFA では電気泳動と圧力の両方を介してインキャピラリー反応が進行する。CES による加水分解反応のモデル基質として NPA を選択し、生成物 NP をプラトーシグナルとして検出した。NPA は電氣的に中性な物質であり、NP は-1 の負電荷を有するため NPA の検出直後に連続的にプラトーシグナルが検出された。圧力印加によりプラトーシグナルの迅速な検出を可能とし、またキャピラリー内が層流状態になることで溶液ゾーンの拡散が起こり、高さが均一化されたプラトーシグナルを得られた。支援圧力を大きくするほど測定時間は大幅に短縮され、プラトーシグナルの横幅も短くなった。一方、プラトーシグナルの高さはほとんど変化がなく、基質ゾーンが圧力印加によって希釈されず pCE/DFA の間一定に保たれていることを表している。試料調製時に添加したエタノールが測定に及ぼす影響をプレキャピラリー反応および CE/DFA で検証した結果、プレキャピラリー反応では 1 % (v/v) の添加で著しく酵素活性が低下したが、pCE/DFA では 4 % (v/v) まで反応速度に変化がなく、本研究で使用した基質濃度の範囲では影響を受けないことが分かった。速度論解析の結果、 $K_M = 0.83 \text{ mM}$ が得られ、文献値と良好に一致した。また、阻害剤として BNPP を使用し pCE/DFA による阻害反応解析にも適用した。BNPP を泳動液に添加することでプラトーシグナルの低下をモニタリングし、阻害曲線から $IC_{50} = 0.50 \text{ }\mu\text{M}$ が得られた。得られた IC_{50} 値も文献と良好に一致したことから、加水分解反応だけでなく阻害反応解析にも本法の有用性が示された。本研究により、提案した pCE/DFA は生成物阻害及び試料調製時のエタノールによる酵素の失活を回避した酵素反応解析が可能であることが示され、今後さらに他の酵素反応やゼロ次反応速度論への応用が期待できる。

第6章 クレアチンキナーゼを用いたリン酸基転移反応解析

6.1 緒言

6.1.1 リン酸基転移反応

酵素による転移反応は一方の基質から選択的に置換基を切断しもう一方の基質に付与する反応である^[97]。生体内における一般的な転移反応はキナーゼ(ホスホトランスフェラーゼ)によるリン酸基の転移反応であり、アデノシン二リン酸(ADP)またはアデノシン三リン酸(ATP)を基質として、特異的に反応する基質のリン酸基を切断または付与する二基質反応である。キナーゼによるリン酸基転移反応において ADP および ATP はアデノシンキナーゼ^[98]、ヘキソキナーゼ^[99]、チロシンキナーゼ^[100]、クレアチンキナーゼ^[101]、プロテインキナーゼ^[102-105]など様々なキナーゼの共通の基質となっている。転移反応は酵素加水分解反応と異なり、可逆的な反応であることから生成物が増加するとともに逆反応が生じ、平衡状態になると正反応は阻害される。

6.1.2 クレアチンキナーゼ

クレアチンキナーゼ(CK, EC 2.7.3.2)は、クレアチンホスホキナーゼとも呼ばれ、全身の筋肉組織や脳にも広く見られる酵素である^[106,107]。CK は ATP からクレアチン(Cr)への高エネルギーリン酸基の可逆的転移を触媒し、クレアチンリン酸(CrP)と ADP を生成することにより、細胞エネルギー代謝に関与する。また ATP が糖類の代謝によって減少したときに CrP からリン酸基を ADP に転移させ ATP を供給するなどエネルギー保存の役割を担っている^[108]。臨床検査においては、CK 数値の上昇は筋肉の損傷を診断する重要な指標であり、血中の CK の測定は筋肉疾患の可能性をスクリーニングするための診断テストとして使用されている^[109]。

6.1.3 先行研究

CK 活性を CE で測定した研究ではプレキャピラリー反応^[110,111]やインキャピラリー反応^[111]が用いられてきた。しかし、これらの従来法は全てバッチ反応に基づくものであり、生成物が反応場から取り除かれられないため生成物は正反応の進行と共に増加する。加水分解反応とは異なり、転移反応は可逆反応であるため、生成物が増加すると逆反応が生じ、正反応を阻害する。以上の理由から、CK によるリン酸基転移反応を正反応または逆反応について個別に解析することは困難だったため、先行研究では Michaelis-Menten 速度論解析は行われていない。

6.1.4 本研究の目的

CK によるリン酸基転移反応の概略図を Fig. 6.1 に示す。本研究では Fig. 6.1 中の式(a)で示した Cr と ATP を基質として CrP と ADP を生成する反応を正反応, 式(b)で示した CrP と ADP を基質として Cr と ATP を生成する反応を逆反応とする。まず, CK によるリン酸転移反応を正反応と逆反応でそれぞれ CE/DFA 測定を行い, Michaelis-Menten 速度論解析により $K_{M,ADP}$ および $K_{M,ATP}$ を決定した。CE/DFA では生成物が反応場である基質ゾーンから CE 分離されることから, 逆反応が生じない。そのため, 正反応の定常状態を反映した解析が可能となる。生成物 ADP 及び ATP のプラトースIGNALを迅速に検出するため, 圧力支援システムを CE/DFA に適用した。pCE/DFA の結果をプレキャピラリー反応で得られた結果と比較し, また逆反応における生成物 ATP による反応阻害も調査した。

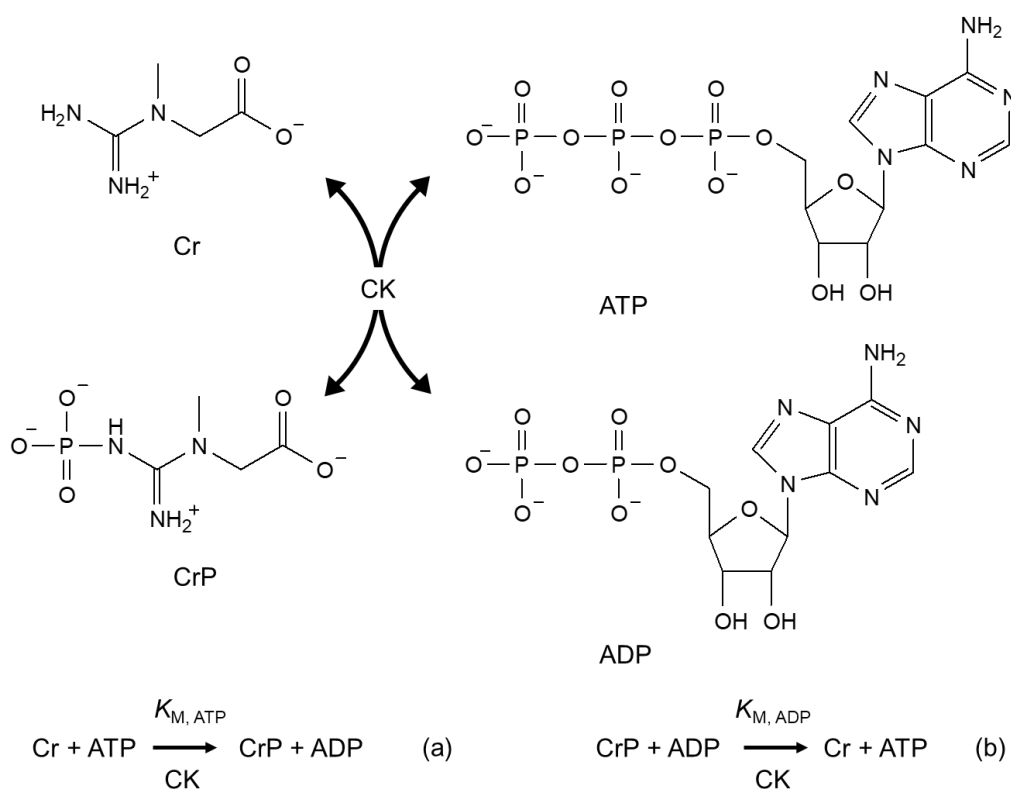


Fig. 6.1 Schematic of transphosphorylation with CK.

6.2 実験

6.2.1 試薬

本研究において使用した試薬を Table 6.1 に示す。リン酸二水素ナトリウム及びリン酸水素二ナトリウムをそれぞれ純水に所定量溶解させ、混合することで pH 7.4 の 50 mM リン酸緩衝液を調製した。プレキャピラリー反応及び pCE/DFA で使用する際は 5 倍に希釈して使用した。プレキャピラリー反応では、酵素溶液と基質溶液が混合した時間から反応液が CE 分離されるまでの時間を反応時間とし、溶液の混合はマイクロピペットによる吸引と吐出を繰り返すことで行った。

Table 6.1 Reagents used in Chapter 6.

Reagents	Grade	Manufacturer
Creatine kinase from rabbit muscle	—	SIGMA-ALDRICH
Adenosine 5'-triphosphate	Special grade	SIGMA-ALDRICH
Adenosine 5'-diphosphate	Special grade	Fujifilm Wako Pure Chemical
Creatine	Special grade	Fujifilm Wako Pure Chemical
Creatine phosphate	Special grade	Fujifilm Wako Pure Chemical
Disodium Hydrogenphosphate	Special grade	Fujifilm Wako Pure Chemical
Sodium dihydrogenphosphate, anhydrous	Special grade	Kanto

6.2.2 pCE/DFA によるリン酸基転移反応の解析方法^[112]

pCE/DFA による酵素反応の様子を Fig. 6.2 に示す。Fig. 6.1 に示す(a)を正反応, (b)を逆反応とする。酵素および Cr(CrP)が添加された泳動液(E)をキャピラリー内に満たし, ATP(ADP)溶液を試料液(S)として注入する(F1, B1)。電気泳動を開始することで泳動液との接触により酵素反応が開始され, 基質と電荷の異なる生成物は基質ゾーンから分離される(F2, B2)。電気浸透流 EOF に加え圧力支援によって基質ゾーン及び生成物ゾーンは検出部方向に向かって推し進められ層流状態になる。ATP は ADP よりも負電荷が大きいことから移動速度が遅く, ATP を試料とする場合 ATP ピークの検出直前まで ADP がプラトーシグナルとして検出され, ADP を試料とする場合 ADP ピークの直後から ATP がプラトーシグナルとして検出される(F3, B3)。

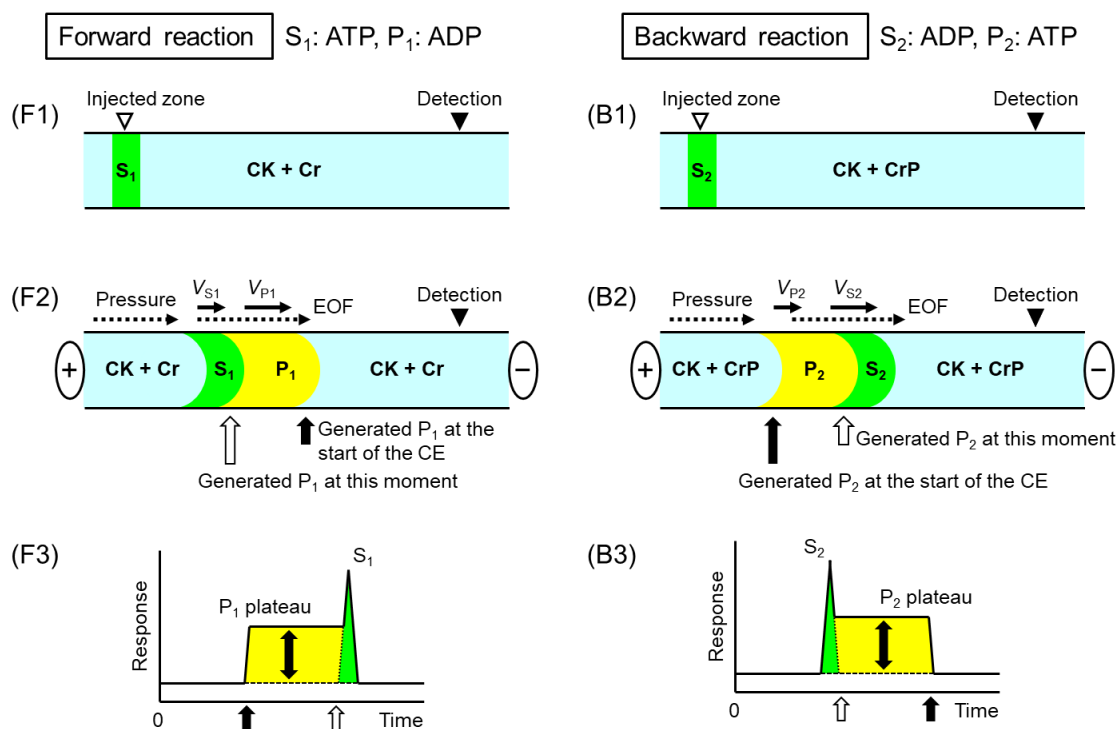


Fig. 6.2 Schematic illustration of the forward and the backward reactions with creatine kinase in pCE/DFA and expected electropherograms.

6.2.3 実験操作

6.2.3.1 プレキャピラリー反応によるリン酸基転移反応解析

Cr と ATP から CrP と ADP を形成する正反応の解析では, 0.3–2.0 mM ATP, 8.0 mM Cr, 4.0 U mL⁻¹ CK, 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)を含む全量 750 μL の溶液をバイアル内で調製し反応溶液とした。泳動液には酵素を含まない 10 mM リン酸緩衝液を使用した。30 °C に保たれている CE システムのバイアルトレー内で 8 分間反応させた。試料注入量 50 mbar×3 s, 印加電圧 20 kV, 圧力支援 20 mbar, 検出波長 200–260 nm で測定を行った。

CrP と ADP から Cr と ATP を形成する逆反応の解析では, 0.5–3.0 mM ADP, 2.0 mM CrP, 4.0 U mL⁻¹ CK, 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)を含む 750 μL の溶液をバイアル内で調製し, 反応液とした。泳動液には酵素を含まない 10 mM リン酸緩衝液を使用した。30 °C のバイアルトレー内で 5 分間反応させ, 試料注入量 50 mbar×3 s でキャピラリー内に注入した。Cr は EOF のみで迅速に検出されるため圧力支援は行わず, 印加電圧 20 kV, 検出波長 200–260 nm で測定を行った。再現性の検証のため全ての測定は 3 回行った。

6.2.3.2 逆反応における生成物 ATP の阻害測定

本研究で使用した CK は主に逆反応が進行するという性質を有しており, 逆反応における生成物 ATP による阻害の影響を調査した。1.0 mM ADP, 2.0 mM CrP, 4.0 U mL⁻¹ CK, 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)を含み, さらに 0.05–1.0 mM の ATP を添加した溶液を試料液として測定した。泳動液には酵素を含まない 10 mM リン酸緩衝液を使用した。反応時間 5 分, 反応温度 30 °C でプレキャピラリー反応を行い, 試料注入量 50 mbar×3 s, 印加電圧 20 kV, 検出波長 200–260 nm を測定条件とした。阻害度を縦軸, log [ATP]を横軸としてプロットした阻害曲線から IC₅₀ を決定した。再現性の検証のため全ての測定は 3 回行った。

6.2.3.3 pCE/DFA によるリン酸基転移反応解析

pCE/DFA による酵素反応解析において正反応として扱う Cr と ATP から CrP と ADP が生成する反応では, 0.3–2.0 mM ATP, 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)を含む溶液を試料液とした。泳動液には 4.0 U mL⁻¹ CK, 16 mM Cr を添加した。逆反応となる ADP から ATP が生成する反応では 0.5–3.0 mM ATP, 10 mM リン酸緩衝液を含む溶液を試料液とし, 泳動液には 2.0 U mL⁻¹ CK および 8.0 mM CrP を添加した。測定条件はどちらの反応も試料注入量 50 mbar×3 s, 印加電圧 20 kV, 支援圧力 20 mbar, 検出波長 200–260 nm とし, キャピラリー内は 30 °C に保たれていた。再現性の検証のため全ての測定は 3 回行った。

6.3 結果と考察

6.3.1 プレキャピラリー反応によるリン酸基転移反応解析

プレキャピラリー反応測定で得られた電気泳度図を Fig. 6.3 に示す。正反応では CK によるリン酸基転移反応によって、Cr と ATP から CrP と ADP が生成された。ADP, ATP, CrP は大きな負電荷を有しており、従来の CE では検出に時間がかかることから圧力支援システムを使用した。Fig. 6.3(A)より、Cr と ATP から ADP と CrP が形成され、分離にも成功していることが分かる。近接している ADP, ATP 及び CrP のピークは、260 nm の波長において ADP, ATP は検出され CrP は検出されないことに基づき各ピークの帰属を行った。CrP はピークの拡がりが見られたため、ADP のピーク面積を Michaelis-Menten 速度論解析に使用した。

逆反応では CrP と ADP から Cr と ATP が生成された。Cr の酸解離定数は $pK_{a1} = 2.63$ (モノカチオンから双性イオン) および $pK_{a2} = 14.30$ (双性イオンからモノアニオン)^[113] であるため、Cr の電荷は本研究の pH 条件でほぼ 0 である。したがって、生成物の 1 つである Cr は EOF の移動時に検出されるため、圧力支援を必要としなかった。速度論解析では Cr のピーク面積を使用したことから、Fig. 6.3(B) のように Cr が検出されると分析効率の点から CE を中断した。

正反応では基質 ATP の濃度に対する ADP のピーク面積、逆反応では基質 ADP に対する Cr のピーク面積から Michaelis-Menten 曲線を作成し、R プログラム (Ver 4.0.3)^[37] による非線形最小二乗法から K_M を決定した。Fig. 6.4 にカーブフィッティングを描画した 2 つの Michaelis-Menten 曲線を示す。正反応の解析から $K_{M, ATP} = 0.58 \pm 0.03$ mM, 逆反応の解析から $K_{M, ADP} = 1.91 \pm 0.16$ mM が得られた。先行研究では円二色性測定^[114-116] やイオン交換クロマトグラフィー^[117] などの分析法が用いられており、本研究で得られた K_M はこれらの報告値に近い値であった。文献値は pCE/DFA の結果と併せて Table 6.2 に示す。

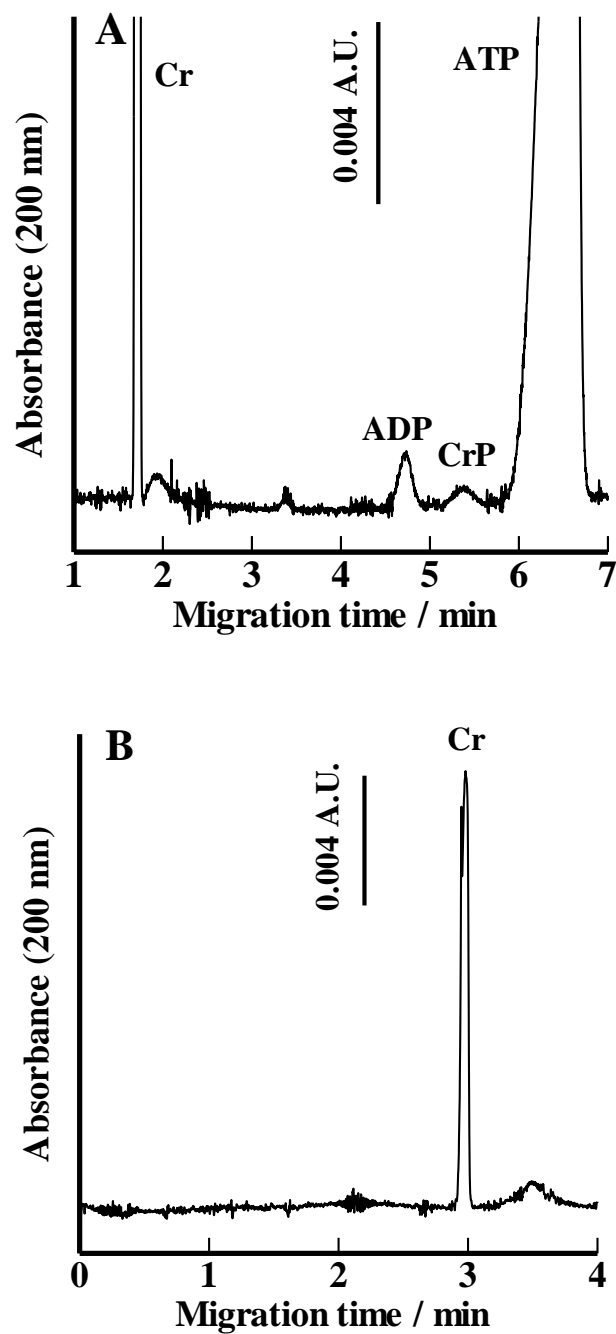


Fig. 6.3 Typical electropherograms for the forward (A) and the backward (B) reactions with CK by the pre-capillary reaction. A: Formation of CrP from Cr. Initial concentrations of Cr and ATP are 8.0 mmol L^{-1} and 1.0 mmol L^{-1} , respectively. Pressure assist was used for the detections of all the substrates and the products. The pCE conditions are written in the text. B: Formation of Cr from CrP. Initial concentrations of CrP and ADP are 2.0 mmol L^{-1} and 1.0 mmol L^{-1} , respectively. Pressure assist was not used for the single detection of the product of Cr.

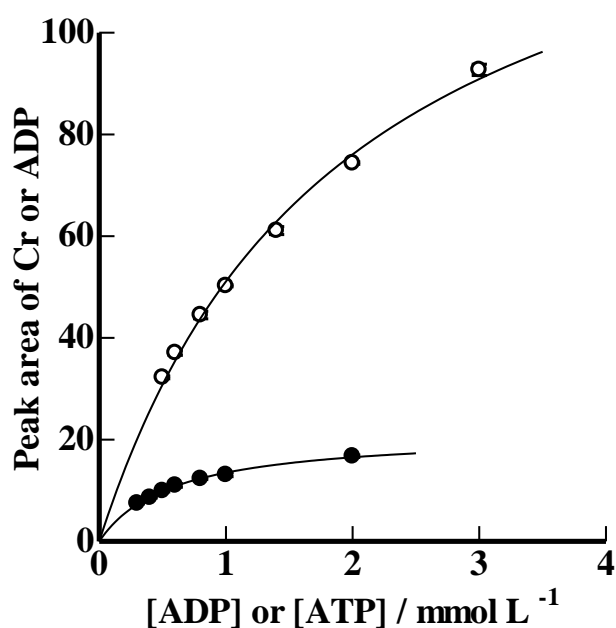


Fig. 6.4 Non-linear Least-squares analyses for the forward reaction (●) monitored with ADP and for the backward reaction (○) monitored with Cr by the pre-capillary reaction.

Table 6.2 Michaelis-Menten constants determined by pCE/DFA or pre-capillary reaction.

Method	Michaelis-Menten constant / mM		Reference
	$K_{M, ATP}$	$K_{M, ADP}$	
Pre-capillary reaction *	0.58±0.03	1.91±0.16	This study
pCE/DFA *	0.39±0.03	1.08±0.10	This study
Circular dichroism	0.40		[114]
Circular dichroism	0.45		[115]
Circular dichroism		1.0–1.5	[116]
Ion exchange chromatography		1.18	[117]

* Error: standard error.

6.3.2 逆反応における生成物 ATP の阻害

プレキャピラリー反応測定において生成物 ATP が逆反応に及ぼす阻害の影響を調べた。ATP を阻害剤として試料液に添加し、CE で得られた Cr のピーク面積の減少を測定した。ATP を添加していない試料液から得られた Cr のピーク面積を酵素活性が 100 % の時の結果とし、添加する ATP 濃度を変化させた。ATP 濃度と酵素活性の阻害曲線を Fig. 6.5 に示す。IC₅₀ = 0.70 mM が得られた。基質 ADP の濃度が 1.0 mM のとき、0.2 mM ATP の添加でおよそ 15 % の触媒作用が停止した。従来の酵素加水分解反応と異なり、可逆的な反応であることから生成物の増加により平衡化されると反応の進行が遅くなる。本実験では Cr をモニタリングするため ATP のみを生成物として添加したが、反応中 Cr も ATP と同じ物質で増加することから、Cr を補足的に添加するとさらに生成物阻害は大きいと考えられる。

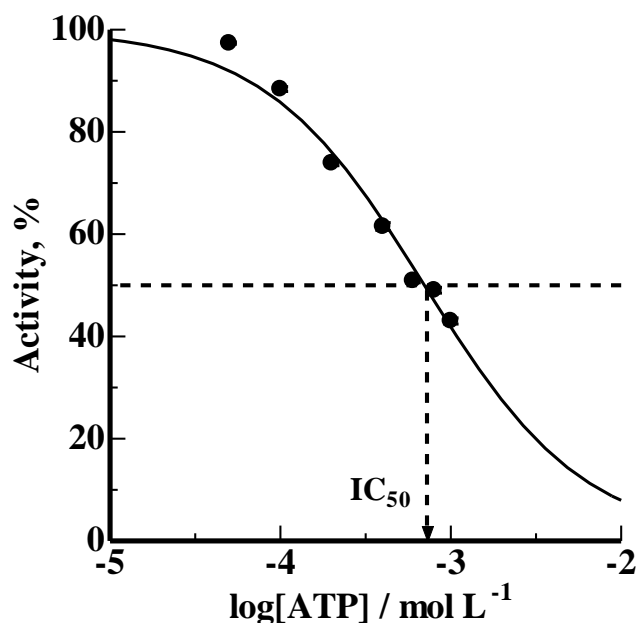


Fig. 6.5 Activity decrease of the backward reaction with increasing concentrations of ATP. The curve is drawn with an equation, activity = 100/(1+[ATP]/IC₅₀).

6.3.3 pCE/DFA による可逆反応の解析

Fig. 6.2 の概略図に示すように、順方向及び逆方向の酵素反応を pCE/DFA で調査した。正反応では試料液に ATP, 泳動液に Cr 及び CK を添加し, 逆反応では試料液に ADP, 泳動液に CrP 及び CK を添加し測定を行った。Fig. 6.6(A)に正反応で得られた電気泳動図を示す。ATP を試料液とすることで ADP のプラトーシグナルが検出された。プラトーシグナルの高さが一定であることは, リン酸基転移反応が一定の反応速度で進行し, 定常状態で反応が進行したことを示している。これは生成物 ADP が ATP ゾーンから連続的に分離され, 生成物による阻害または逆反応が取り除かれたためであり, CE/DFA の利点がリン酸基転移反応で機能したことを示している。

Fig. 6.6(B)に逆反応で得られた電気泳動図を示す。0.5 mM ADP で得られた ATP のプラトーシグナルは泳動時間と共に徐々に増加しているが, これは基質濃度が不十分であることに起因するため高濃度の ADP の測定では解消された。プラトーシグナルの低下がみられる場合は, 初期の反応速度を反映したプラトーシグナルの最高点を速度論解析に用いた。Fig. 6.7 に得られた Michaelis-Menten 曲線を示す。非線形最小二乗法により $K_{M,ATP} = 0.39 \pm 0.03$ mM, $K_{M,ADP} = 1.08 \pm 0.10$ mM が得られた。どちらもプレキャピラリー反応で行った測定結果よりも小さい値となり, また Table 6.2 にまとめている文献値^[114-117]とも良好に一致した。

K_M は酵素-基質複合体 ES の解離定数として定義されており, 2.2.3 項の式(1)で示したように生成物が反応場から取り除かれることで ES の形成が促進されるといえる。6.3.2 項で可逆反応における生成物阻害の大きさが示されたが, プレキャピラリー反応による速度論解析ではこれらの影響を著しく受けたため, ES の形成が阻害され高い K_M 値が得られたと考えられる。一方 pCE/DFA では低い K_M 値が得られたことから, 生成物阻害が排除されたことで ES の形成が促進されたといえる。従来の分析法では主に均一なバッチ溶液で行われ, 生成物が増加する前の反応初速度を測定することにより生成物阻害が回避されてきた。しかしこれらの手法では順方向または逆方向の反応の定常状態が反映されておらず, 準定常状態での解析といえる。pCE/DFA は生成物阻害を取り除き, 定常状態での反応速度を測定できる分析法として従来法にはない利点を有しており, 転移反応などの可逆反応の有力な分析法であることが示された。

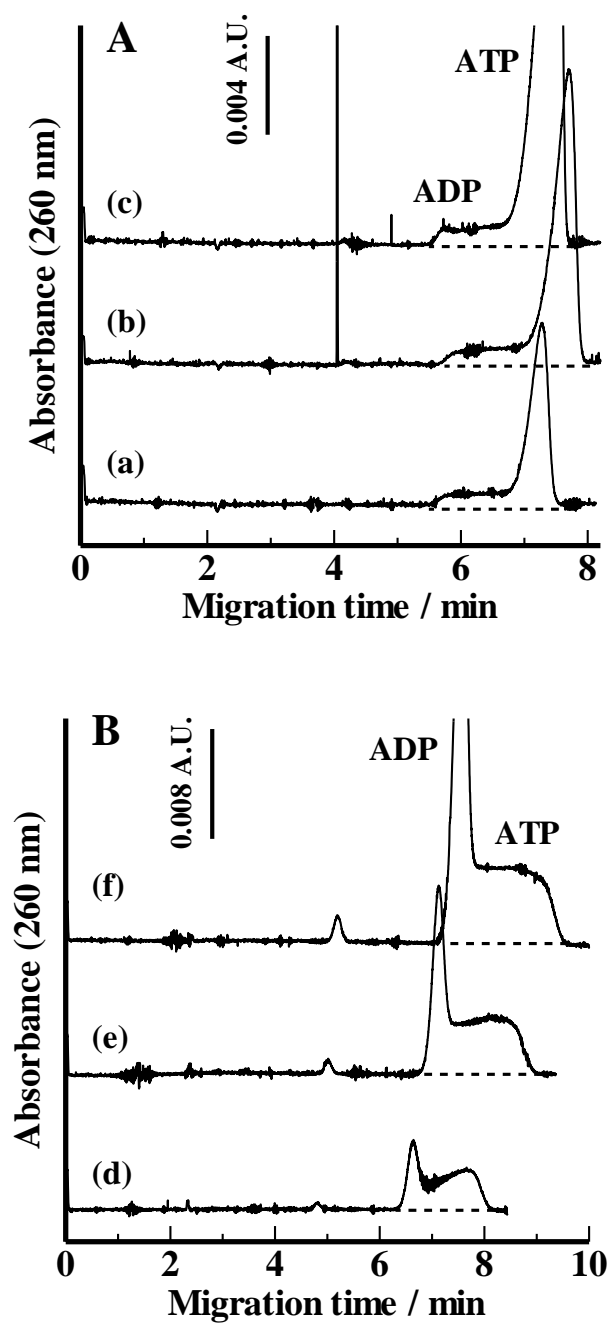


Fig. 6.6 Typical electropherograms of the forward (A) and backward (B) reactions by the pCE/DFA. A, Concentration of ATP: (a) 0.3 mM, (b) 0.5 mM, (c) 1.0 mM. B, Concentration of ADP: (d) 0.5 mM, (e) 1.0 mM, (f) 2.0 mM.

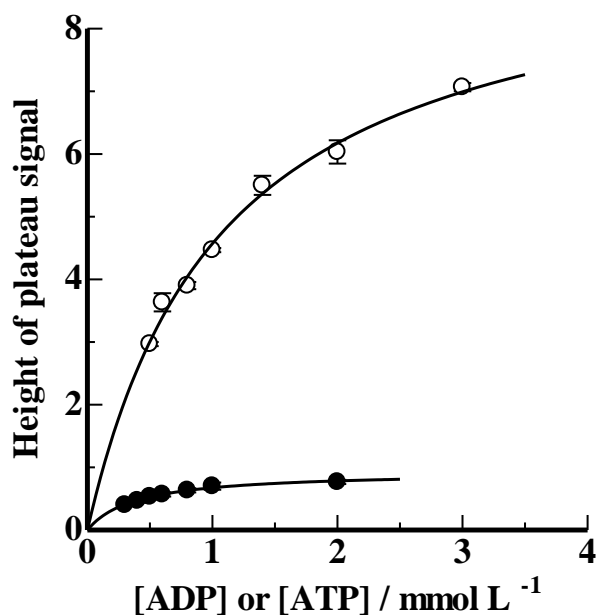


Fig. 6.7 Non-linear Least-squares analyses for the forward reaction (●) monitored with ADP and for the backward reaction (○) monitored with ATP by the pCE/DFA. The error bars represent the standard deviations.

6.4 結言

本研究は pCE/DFA を用いて CK によるリン酸基転移反応を正反応と逆反応に分けて解析を行い、プレキャピラリー反応の結果と比較した。また、プレキャピラリー反応で逆反応における生成物 ATP の阻害の影響を調査した。使用した物質はそれぞれ電荷が異なることから CE 分離され、圧力支援により迅速な検出にも成功した。ATP による阻害を調査した結果、可逆的な反応をバッチ反応で測定する場合、生成物が増加すると逆反応が発生し正反応の触媒作用を停止させることが分かった。pCE/DFA では ATP を試料液とした場合 ADP のプラトーシグナルが検出され、ADP を試料液とした場合 ATP のプラトーシグナルが検出された。速度論解析の結果、pCE/DFA で得られた $K_{M,ATP}$ 及び $K_{M,ADP}$ はどちらもプレキャピラリー反応で得られた値よりも低くなった。この結果は、生成物阻害が回避されたことで酵素-基質複合体の形成が促進され、反応全体が進行したためだと考えられる。バッチ反応に基づく従来の分析法では、反応初速度を用いることで生成物阻害が回避されており、定常状態での速度論解析が困難であった。pCE/DFA は可逆的な転移反応を不可逆的な正反応、逆反応に区別して測定することができ、生成物阻害を回避した定常状態での酵素反応解析ができる有力な手法であることが示された。

第7章 チロシナーゼを用いたチロシン酸化反応解析

7.1 緒言

7.1.1 チロシナーゼ

チロシナーゼ(TRS; EC1.14.18.1)は、モノフェノールの *o*-ヒドロキシ化(モノフェノラーゼ活性)及び *o*-ジフェノールの *o*-キノンへの酸化(ジフェノラーゼ活性)を触媒する酵素で、動物や植物の組織だけでなく微生物にも広く存在している^[118]。メラニン^[118]は動物や植物の組織に広く存在している色素であり、TRS の触媒作用によって L-チロシン(Ty)から L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(L-DOPA, Do)とドーパキノン(Dq)を介して生成される^[119]。TRS はメラニン生合成、果物や野菜の褐変、生物の昆虫の発育などに関係する重要な酵素である^[120,121]。哺乳類にとってメラニン色素沈着の程度と分布は、皮膚と髪の色に最も関係する要素であり、メラニンは紫外線を吸収し活性酸素種を除去することで紫外線による損傷から肌を保護する役割を担っている。一方、メラニンによる酵素的な褐変は果物、野菜、シーフード食品にとって食品業界の主要な問題の 1 つであり^[122]、様々な皮膚疾患でも表皮への過剰な色素沈着が見られる^[123]。

7.1.2 チロシン酸化反応

TRS は Ty から Do の反応および Do から Dq への反応を触媒する。生成された Dq は不安定な中間体であり、瞬時にドーパクロム(Dc)に変換される^[124]。TRS の反応に関する研究では Do を基質とした場合、Dc を生成物として測定されており^[125,126]、本研究でも Do から生成された Dq は全て Dc に変換されたとして解析を行っている。また、Ty から Do への酸化は Do から Dq への酸化と比較し非常に遅く進行することが報告されている^[124]。

7.1.3 先行研究

TRS によるチロシン酸化反応はこれまでにプレキャピラリー反応^[127,128]、EMMA^[129]、PMMA^[20]、IMER^[24,130]など様々な分析法で調査されてきた。プレキャピラリー反応を用いた先行研究では、 $K_{M, Ty}$ の解析には成功しているが、Ty の減少量で反応を追跡しており、生成物は特定されていないため 2 段階の反応は区別されていない。EMMA 及び PMMA を用いた先行研究では Do のみを基質として用いており、Do から Dq(Dc)が生成される 1 段階の反応のみを追跡した速度論解析であった。IMER を用いた先行研究では、3-アミノプロピルトリエトキシシランや臭化ヘキサジメトリンをキャピラリー内壁に修飾する方法が提案され、速度論解析にも成功しているがどちらも 1 段階の反応に解析が限定されていた。

7.1.4 本研究の目的

TRS によるチロシン酸化反応の概略図を Fig. 7.1 に示す。本研究では Ty を基質とした反応と Do を基質とした反応の 2 段階の反応についてプレキャピラリー反応及び CE/DFA を用いて速度論解析を行った。Dq は瞬時に Dc に変換されるという報告に基づき、本研究においても Do から生成された Dq は全て Dc に変換されるとして Dc を追跡した。6 章ではプレキャピラリー反応では生成物阻害により高い K_M 値が得られるということが分かった。本研究においても、プレキャピラリー反応での生成物阻害の影響を調査するため、3 つの異なる反応時間で Michaelis-Menten 速度論解析を行い K_M の変化を調査した。Ty を基質とした場合、Do または Dc のピーク面積からそれぞれ $K_{M, Ty}$ を決定し、Do を基質とした場合 Dc のピーク面積から $K_{M, Do}$ を決定した。また、CE/DFA では Ty または Do を試料液に添加し、得られたプラトースIGNALの高さから速度論解析を行った。得られたプレキャピラリー反応及び CE/DFA の結果を元に、各反応における生成物阻害の大きさを評価した。

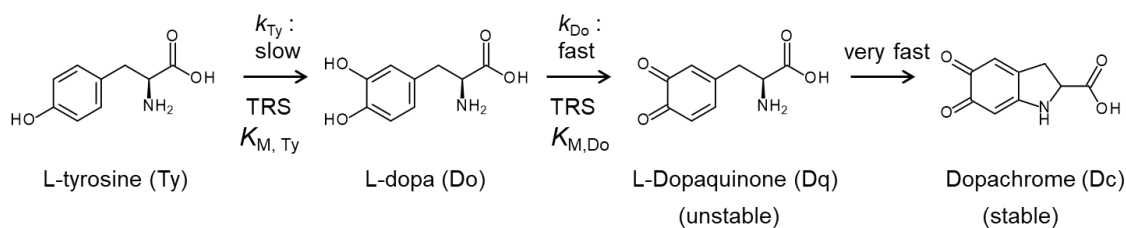


Fig. 7.1 Reaction diagram of tyrosine oxidation with tyrosinase (TRS).

7.2 実験

7.2.1 試薬

本研究において使用した試薬を Table 7.1 に示す。リン酸二水素ナトリウム及びリン酸水素二ナトリウムをそれぞれ純水に所定量溶解させ、混合することで pH 7.0 の 50 mM リン酸緩衝液を調製した。プレキャピラリー反応及び CE/DFA で使用する際は 5 倍に希釈して使用した。プレキャピラリー反応では、酵素溶液と基質溶液が混合した時間から反応液が CE 分離されるまでの時間を反応時間とし、溶液の混合はマイクロピペットによる吸引と吐出を繰り返すことで行った。

Table 7.1 Reagents used in Chapter 7.

Reagents	Grade	Manufacturer
Tyrosinase from mushroom	—	SIGMA-ALDRICH
L-tyrosine	Special grade	Tokyo Chemical Industry
3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine	Special grade	Tokyo Chemical Industry
Disodium Hydrogenphosphate	Special grade	Fujifilm Wako Pure Chemical
Sodium dihydrogenphosphate, anhydrous	Special grade	Kanto

7.2.2 CE/DFA によるチロシン酸化反応の解析方法

CE/DFA によるチロシン酸化の概略図を Fig. 7.2 に示す。Ty を基質とする場合, Ty と Do は pH 7.0 の条件では分離することができない。しかし, 反応が進み Dq が生成すると瞬時に Dc に変換され, Dc は Ty 及び Do と分離される。この結果, Dc がプラトーシグナルとして検出される。また, Do を基質とする場合も同様に, 生成した Dq は瞬時に Dc に変換されプラトーシグナルとして検出される。このように, 生成物として検出するのは Ty と Do のいずれかを基質とした場合も Dc である。Ty から Do への酸化は Do から Dq への酸化と比較し, 非常に遅い反応であり^[124], 生成された Do は過剰な酵素存在下では素早く Dq, そして Dc に変換される。したがって, Dc のプラトーシグナルはチロシン酸化反応の律速段階を反映しており, CE/DFA では Ty から Do への反応, Do から Dq への反応を別々に測定することができる。

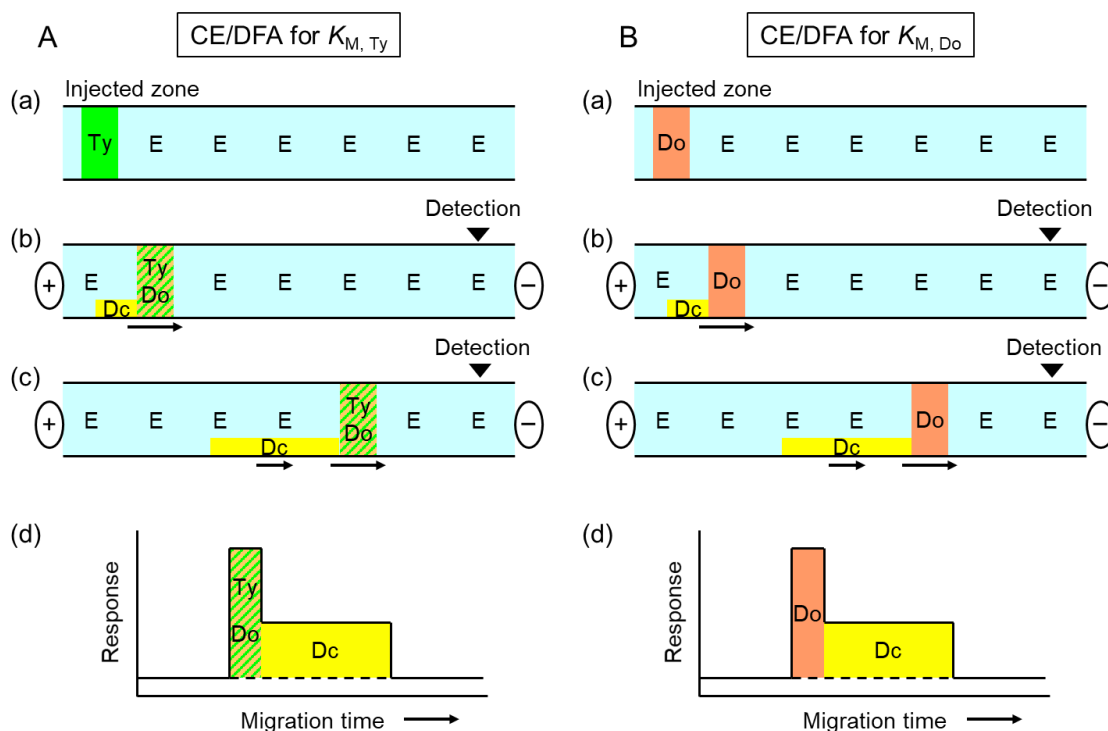


Fig. 7.2 Schematic migration diagram on the analyses of tyrosinase oxidation by CE/DFA. An enzyme (E) is contained in the separation buffer. The substrate is: A, Ty and B, Do. (a) - (c) show the electrophoretic migration of the substrate and the product(s) under the enzymatic oxidation(s); final product Dc is continuously generated from the substrate zone, and it electrophoretically migrate toward the anodic end. Continuously generated Dc would be detected as a plateau signal in the electropherogram (d).

7.2.3 実験操作

7.2.3.1 異なる反応時間でのプレキャピラリー反応測定

Ty を基質とした測定は、0.02–0.4 mM Ty, 0.02 mg mL⁻¹ TRS, 10 mM リン酸緩衝液(pH7.0) を含む全量 750 µL の溶液をバイアル内で調製し反応液とした。泳動液には酵素を含まない 10 mM リン酸緩衝液を使用した。30 °C に保たれている CE システムのバイアルトレー内で異なる反応時間 5, 10, 15 分で反応させた。試料注入量 50 mbar×3 s, 印加電圧 25 kV, 検出波長 214 nm で測定を行い, 得られた Do または Dc のピーク面積から $K_{M, Ty}$ を決定した。

Do を基質とした測定は、0.1–3.8 mM Do, 0.008 mg mL⁻¹ TRS, 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.0) を含む全量 750 µL の溶液を反応液とした。泳動液には酵素を含まない 10 mM リン酸緩衝液を使用した。30 °C に保たれている CE システムのバイアルトレー内で反応時間 5, 10, 15 分で反応させた。試料注入量 50 mbar×3 s, 印加電圧 25 kV, 検出波長 214 nm で測定を行い, 得られた Dc のピーク面積から $K_{M, Do}$ を決定した。プレキャピラリー反応の CE 測定では全長 48.5 cm, 有効長 40.0 cm のキャピラリーを使用した。再現性の検証のため全ての測定は 3 回行った。

7.2.3.2 CE/DFA によるチロシン酸化反応解析

Do を基質とした測定は、0.1–1.0 mM Do, 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)を含む溶液を試料液とし, 10 mM リン酸緩衝液に 0.02 mg mL⁻¹ TRS を添加した溶液を泳動液とした。試料注入量 50 mbar×3 s, 印加電圧 20 kV, 検出波長 214 nm で測定を行い, Dc のプラトーシグナルの高さを用いて $K_{M, Do}$ を決定した。

基質 Ty と生成物 Do は pH 7.0 の条件で電氣的に中性であり, CE 分離されない。したがって, Ty から Dc が生成する反応における中間体 Do の定量が速度論解析に必要である。Ty が酸化される酵素条件は Do にとって過剰量の酵素が存在していることになり, 生成された Do は瞬時に Dc に変換されることから, 得られた Dc のプラトーシグナルから中間体 Do の定量が可能である。0.01–0.05 mM の濃度範囲の Do を試料液に添加し, 泳動液には 0.08 mg mL⁻¹ の TRS を添加した。得られたドーパクロムのプラトーシグナル高さをを用いて検量線を作成した。試料注入量 50 mbar×3 s, 印加電圧 12 kV, 検出波長 214 nm で測定を行った。

Ty を基質とした測定は、0.02–0.4 mM Ty, 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)を含む溶液を試料液とし, 10 mM リン酸緩衝液に 0.08 mg mL⁻¹ TRS を添加した溶液を泳動液とした。試料注入量 50 mbar×3 s, 印加電圧 12 kV, 検出波長 214 nm で測定を行い, 得られた Dc のプラトーシグナルの高さと検量線を用いて $K_{M, Ty}$ を決定した。CE/DFA 測定では全長 32.5 cm, 有効長 24.0 cm のキャピラリーを使用し, キャピラリー内は 30 °C に保たれていた。再現性の検証のため全ての測定は 3 回行った。

7.3 結果と考察

7.3.1 異なる反応時間でのプレキャピラリー反応測定

まず初めにプレキャピラリー反応に基づいた Michaelis-Menten 速度論解析を行った。Ty を基質とした測定では 0.02–0.4 mM の濃度範囲の Ty を使用し、生成物の蓄積が K_M に及ぼす影響を調査するため、5, 10, 15 分の 3 つの反応時間で解析を行った。プレキャピラリー反応で得られた典型的な電気泳動図を Fig. 7.3 に示す。基質 Ty に加え、Do 及び Dc が生成物として検出された。Dq は瞬時に環化し、Dc に変換されることから検出されなかった。Ty は 2.30, 9.28, 10.28 の 3 つの pK_a 値、Do は 2.31, 8.71, 9.74, 13.4 の 4 つの pK_a 値、Dc は 0.8, 3.1, 9.1 の 3 つの pK_a を有していることが報告されている^[124]。泳動液の pH 条件(pH = 7.0)を考慮すると、負電荷の大きさは $Ty < Do < Dc$ の順となり、各ピークの検出順序は負電荷の大きさと一致した。反応時間が 5 分から 15 分に長くなるほど、Do 及び Dc のピーク面積は増加した。Do または Dc のピーク面積を使用した Michaelis-Menten 曲線を Fig. 7.4 に示す。また、非線形最小二乗法により得られた $K_{M, Ty}$ 値を Table 7.2 にまとめる。Do または Dc のピーク面積のどちらを用いた場合も $K_{M, Ty}$ は反応時間が長いほど増加していることが分かり、生成物が反応器内に蓄積されるほど生成物阻害が深刻になることを示した。CE による分析で報告された $K_{M, Ty}$ 値は 0.05334 mM^[130], 0.374 mM^[127], 0.636 mM^[128] と広く分布しており、本研究の結果は報告された値の範囲内である。 $K_{M, Ty}$ 値の広い分布は、生成物量の影響に対する考慮が少なく、生成物阻害に起因すると考えられる。

Do を基質とした測定では 0.1–3.8 mM の濃度範囲の Do を使用し、Michaelis-Menten 速度論解析を行った。得られた典型的な電気泳動図を Fig. 7.5(A) に示す。基質 Do と生成物 Dc のピークが検出された。Dc のピーク面積を使用した Michaelis-Menten 曲線を Fig. 7.5(B) に示す。また、非線形最小二乗法により得られた $K_{M, Do}$ 値を Table 7.3 にまとめる。本研究で得られた結果は、報告されている 0.502 mM^[129], 1.347 mM^[20], 1.78 mM^[24] の値の範囲内である。 $K_{M, Do}$ 値は $K_{M, Ty}$ 値と比較して、反応時間によってあまり分散しなかったことから、酵素反応に対する生成物阻害の影響がかなり小さいことを示している。

Table 7.2 $K_{M, Ty}$ value determined by a pre-capillary reaction in this study.

Reaction time	$K_{M, Ty} / \text{mM}$	
	From Do	From Dc
5 min	0.083 ± 0.008	0.034 ± 0.006
10 min	0.30 ± 0.02	0.066 ± 0.005
15 min	1.01 ± 0.4	0.092 ± 0.004

Table 7.3 $K_{M, Do}$ value determined by pre-capillary reaction in this study.

Reaction time	$K_{M, Do} / \text{mM}$
5 min	0.40 ± 0.08
10 min	0.50 ± 0.08
15 min	0.65 ± 0.10

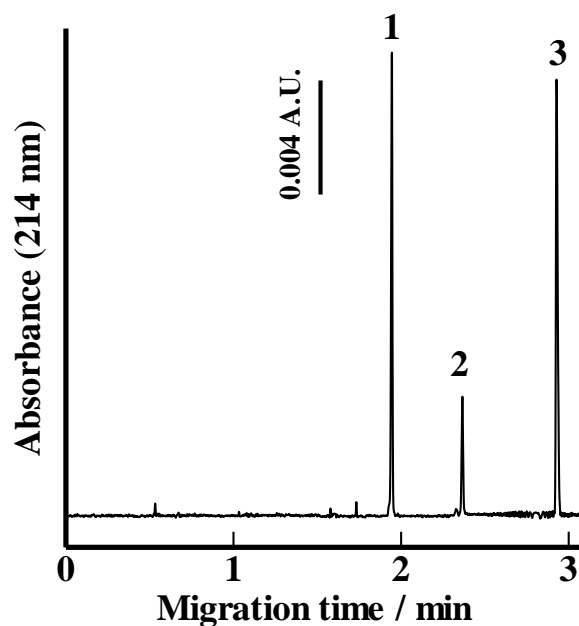


Fig. 7.3 A typical electropherogram for L-tyrosine by a pre-capillary reaction. The reaction solution contained 0.1 mmol L^{-1} tyrosine, 0.02 mg mL^{-1} TRS, and 10 mmol L^{-1} phosphate buffer (pH 7.0). The solution was incubated at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min in a vial. The separation buffer contained 10 mmol L^{-1} borax (pH 9.2). CE conditions: $50 \text{ mbar} \times 3 \text{ s}$ sample injection, 25 kV applied voltage, 214 nm detection wavelength, and $30 \text{ }^\circ\text{C}$ capillary temperature. Peak identifications: 1, L-tyrosine; 2, L-dopa; 3, dopachrome.

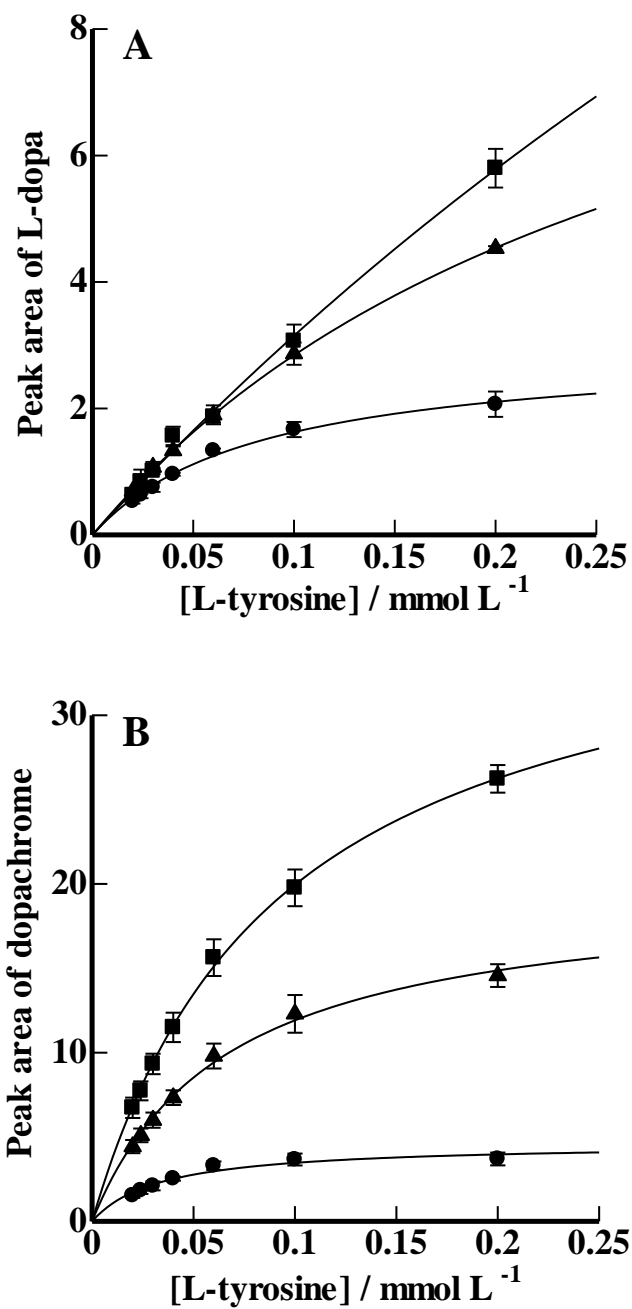


Fig. 7.4 Michaelis-Menten curves for L-tyrosine. A, peak area of L-dopa was used for the analysis; B, peak area of dopachrome was used for the analysis. Incubation time was: ●, 5 min; ▲, 10 min; ■ 15 min.

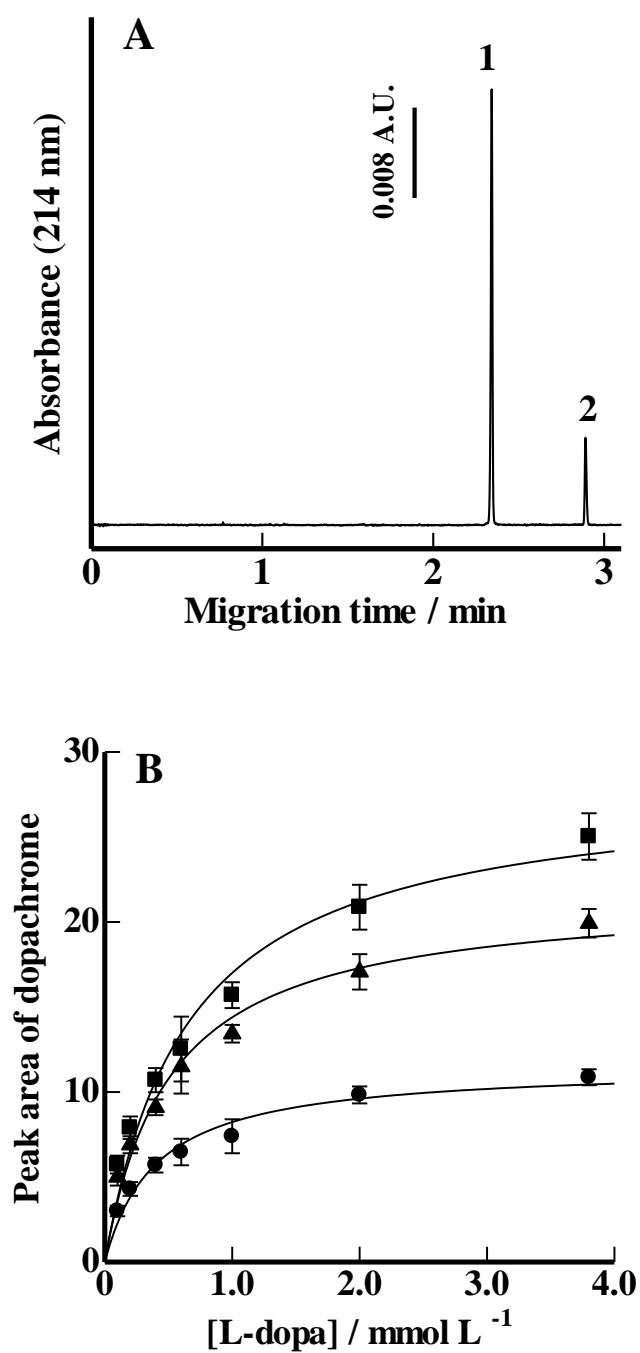


Fig. 7.5 A typical electropherogram for L-dopa (A) and Michaelis-Menten curves (B) by a pre-capillary reaction. The reaction solution contained 0.1 mmol L⁻¹ dopa, 0.004 mg mL⁻¹ TRS, and 10 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.0). Reaction conditions, the separation buffer, and CE conditions are the same as in Fig. 7.3. Peak identifications: 1, L-dopa; 2, dopachrome. Incubation time was: ●, 5 min; ▲, 10 min; ■ 15 min.

7.3.2 CE/DFA によるチロシン酸化反応解析

7.3.2.1 Michaelis-Menten 定数 $K_{M, Do}$ の決定

始めに Do から Dq への反応を CE/DFA によって調査した。生成された Dq は瞬時に Dc に変換されることから、 Do を試料液として CE/DFA を行うと Do ピークの検出直後に Dc のプラトーシグナルが連続的に検出された。Fig. 7.6 に CE/DFA によって得られた電気泳動図を示す。 Dc のプラトーシグナルの高さは基質濃度の増加と共に上昇した。プラトーシグナルが徐々に低下している様子が見られるが、これはインキャピラリー反応が進行することで基質濃度が減少し、反応速度が低下したためだと考えられる。基質濃度の低下によるプラトーシグナルの低下は 3-6 章の CE/DFA でしばしば観測されており、本研究においても最大反応速度を反映したプラトーシグナルの最高点を速度論解析に用いた。Fig. 7.7 に Michaelis-Menten 曲線を示す。非線形最小二乗法により $K_{M, Do} = 0.45 \pm 0.03$ mM が得られた。この値はプレキャピラリー反応の結果と近い値である。

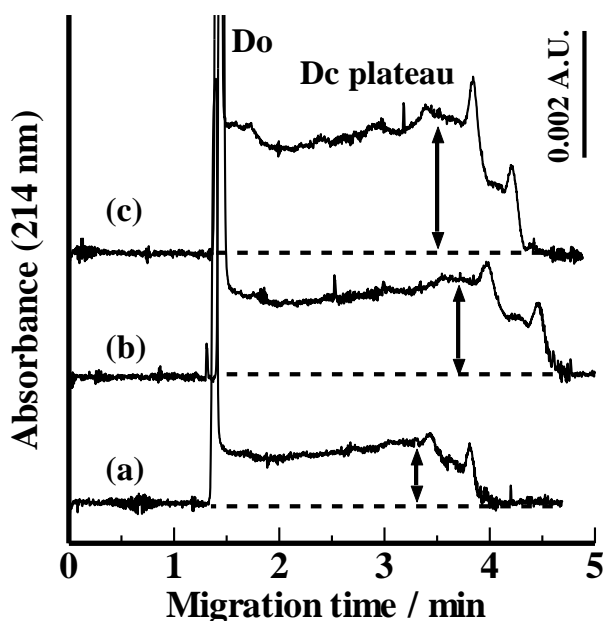


Fig. 7.6 Typical electropherograms for L-dopa under CE/DFA. Concentrations of L-dopa in the sample solution: (a) 0.2 mM, (b) 0.4 mM, (c) 0.6 mM. The separation buffer contained 10 mM phosphate buffer (pH 7.0) and 0.02 mg mL⁻¹ TRS. CE conditions: 50 mbar × 3 s sample injection, 20 kV applied voltage, 214 nm detection wavelength, and 30 °C capillary temperature.

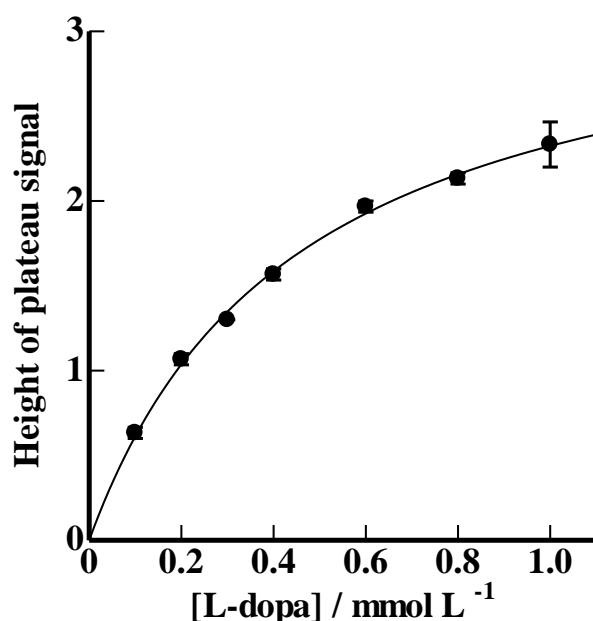


Fig. 7.7 Michaelis-Menten curve for $K_{M, Do}$. The CE conditions are the same as in Fig. 7.6.

7.3.2.2 [Do] vs. Dc プラトースIGNAL高さの検量線作成

Ty から Do への反応を CE/DFA で測定する場合 Ty と Do が分離される必要があるが、酵素反応に適した pH 7.0 では Ty 及び Do は電氣的に中性であり CE 分離されなかった。しかし Ty から Do への反応が進行する酵素条件は、Do から Dq への反応を大きく触媒することから、Ty から生成された Do は Dc まで瞬時に変換され Dc として CE 分離される。つまり、反応場である基質 Ty ゾーンから Do は取り除かれ、Dq を介した Dc のプラトースIGNALは Do が生成される反応速度を反映しているといえる。そこで、Ty から生成された中間体 Do を定量するため、Ty を基質とする測定に泳動液中の酵素量を合わせ、[Do] vs. Dc プラトースIGNAL高さの検量線を作成した。酵素 TRS の濃度は Do から Dq への反応の測定時の 4 倍に設定し、また Ty から生成される Do 濃度は低いことを考慮し、 $1.0\text{--}5.0 \times 10^{-5}$ M の Do 濃度で調査した。得られた電気泳動図及び作成した検量線を Fig. 7.8 に示す。使用した Do の濃度範囲は Michaelis-Menten 曲線において $K_{M, Do}$ よりもかなり低いため、検量線は濃度に比例して直線的であった。

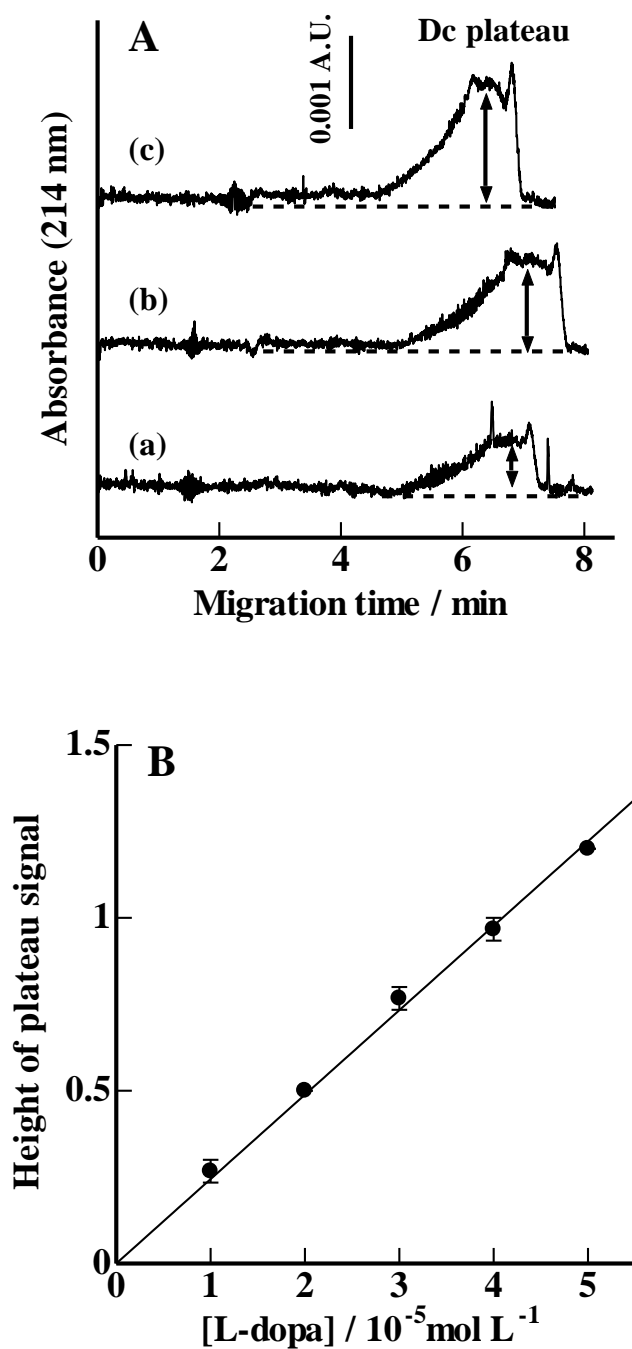


Fig. 7.8 Electropherograms for the calibration curve of L-dopa (A), and a calibration curve for L-dopa (B). Concentrations of L-dopa in the sample solution: (a) 0.02 mmol L⁻¹, (b) 0.04 mmol L⁻¹, (c) 0.05 mmol L⁻¹. The separation buffer contained 10 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.0) and 0.08 mg mL⁻¹ TRS. CE conditions: 50 mbar × 3 s sample injection, 12 kV applied voltage, 214 nm detection wavelength, and 30 °C capillary temperature.

7.3.2.3 Michaelis-Menten 定数 $K_{M, Ty}$ の決定

Ty を基質とした CE/DFA から得られた電気泳動図を Fig. 7.9 に示す。Ty の Do への酸化は Do から Dq への酸化よりも非常に遅い反応であることから、CE/DFA で使用する酵素量は Do を基質とする測定よりも 4 倍高く設定した。この酵素量条件下では Do にとって酵素は過剰量であるため即座に Dq, Dc と変換され、Do を基質とした CE/DFA 同様 Ty ピークの検出直後から Dc のプラトーシグナルが連続的に検出された。プラトーシグナルの高さは基質 Ty の濃度の増加とともに上昇し、また得られたプラトーシグナルは高さがほぼ一定であることから、中間体 Do が一定の反応速度で連続的に生成されたことを示している。7.3.2.2 項で得られた検量線を用い、縦軸を [L-dopa] とした Michaelis-Menten 曲線を Fig. 7.10 に示す。非線形最小二乗法から $K_{M, Ty} = 0.061 \pm 0.009$ mM が得られた。CE/DFA で得られた $K_{M, Ty}$ 値は短い反応時間で行ったプレキャピラリー反応の結果と近い値であった。したがって、CE/DFA では生成物阻害が回避され、信頼性の高い K_M 値が決定されたといえる。以上の結果より、CE/DFA は Ty から Do への反応、Do から Dq への反応を個別に解析できる分析法だと示された。

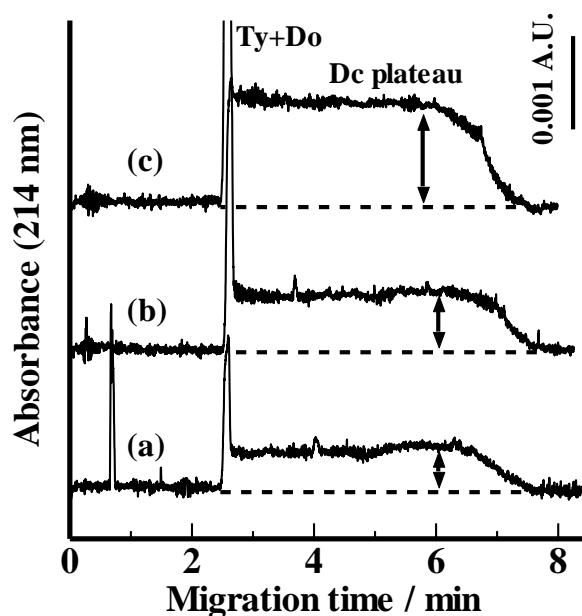


Fig. 7.9 Typical electropherograms for L-tyrosine under CE/DFA. Concentrations of L-tyrosine in the sample solution: (a) 0.06 mM, (b) 0.1 mM, (c) 0.2 mM.

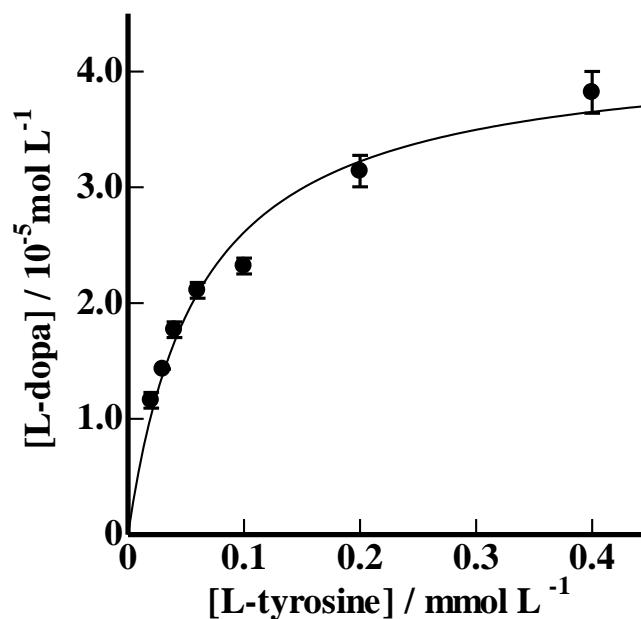


Fig. 7.10 Michaelis-Menten curve for $K_{M,Ty}$. The CE conditions are the same as in Fig. 7.9.

7.4 結言

本研究では TRS によるチロシンの 2 段階の酸化反応をプレキャピラリー反応および CE/DFA を用いて解析した。Ty から Do への反応と Do から Dq への反応に分けて測定し、2 段階のチロシン酸化を段階ごとに解析した。プレキャピラリー反応では生成物の蓄積が K_M に与える影響を調査するため、異なる 3 つの反応時間で調査を行った。得られた K_M は文献と良好に一致し、また Do から Dq への反応では反応時間によって K_M 値にあまり変化がみられなかったものの、Ty から Do への反応では生成物阻害の影響が顕著に現れた。CE/DFA 測定では Ty または Do を基質として使い、Dc をプラトースIGNALとして検出した。Ty 及び Do は CE/DFA では分離されなかったが、Ty から生成された Do は瞬時に Dc に変換されることを利用し、Dc のプラトースIGNALから中間体 Do の定量を可能とした。CE/DFA で得られた K_M 値はプレキャピラリー反応の結果よりも概ね低く、CE/DFA では生成物阻害を回避した解析が行われたといえる。以上のように、CE/DFA は多段階の反応を個別に解析することができ、生成物阻害を回避した K_M 値の決定を行うことが可能な分析法である。本研究で提案した CE/DFA は、今後 TRS のような多段階の酵素反応の速度論研究に役立てられることが期待できる。

第 8 章 結言

本稿では様々な酵素反応の速度論解析を通してキャピラリー電気泳動/動的前端分析(CE/DFA)の有用性を実証した。

第 3 章では一般的な加水分解反応の解析を通して CE/DFA の性能を評価し、生成物のプラトーシグナルの高さに基づく Michaelis-Menten 速度論解析を実証した。アルカリフォスターゼによる *p*-Nitrophenyl phosphate の加水分解反応をモデル反応として、*p*-Nitrophenol のプラトーシグナルから Michaelis-Menten 定数(K_M)を決定した。また、応用的な阻害反応解析として、プラトーシグナルの一部に反応阻害を観測し、1 つのプラトーシグナルで 2 条件の測定結果を得ることができる CE/DFA の手法を提案した。Theophylline を阻害剤として使用し、 K_M と阻害定数(K_I)の同時測定を可能とした。

第 4 章では CE/DFA を β -D-ガラクトシダーゼによる加水分解反応に適用し、さらに 1 種類の酵素と 2 種類の基質が存在する条件下での基質競合反応の解析を行った。電荷が共に中性な 2 種類の基質から生成された 2 つの生成物は、電気泳動移動度の違いにより 2 段のプラトーシグナルとして検出された。一方の基質に対する阻害形式はどちらも競合阻害を示す結果が得られ、CE/DFA による基質競合解析への有用性が示された。

第 5 章では圧力支援モードを CE/DFA に適用した圧力支援キャピラリー電気泳動/動的前端分析(pCE/DFA)を提案した。カルボキシルエステラーゼによる *p*-ニトロフェニル酢酸の加水分解反応をモデル反応として、*p*-ニトロフェノールをプラトーシグナルとして検出した。pCE/DFA では、均一化されたプラトーシグナルを検出し、分析時間の短縮を実現した。また *p*-ニトロフェニル酢酸を用いて得られた K_M 値や阻害剤 Bis-ニトロフェニルリン酸を用いて得られた K_I 値は文献値と良好に一致し、試料調製時のエタノールの添加による酵素活性の失活も回避できるという CE/DFA の利点も新たに示された。

第 6 章ではクレアチンキナーゼによるリン酸基転移反応を正反応と逆反応に分けて解析を行う pCE/DFA を提案した。プレキャピラリー反応では生成物阻害の影響は大きく、酵素が阻害されるほど K_M は大きくなることが生成物阻害の調査から明らかになった。pCE/DFA から得られた $K_{M,ATP}$ 及び $K_{M,ADP}$ はどちらもプレキャピラリー反応の結果よりも低い値となったことから、CE/DFA では生成物阻害が回避され、反応を促進したことが示された。

第 7 章ではチロシナーゼによるチロシン酸化反応の解析を行い、L-チロシンを基質とする反応と L-ドーパを基質とする反応に分けて測定し、2 段階のチロシン酸化を段階ごとに解析した。異なる反応時間でプレキャピラリー反応を行った結果、生成物が蓄積されるほど K_M が大きくなり、生成物阻害が深刻になるということが明らかになった。また、Ty から Do への反応は、Do から Dq への反応と比較し、生成物阻害の影響が顕著に現れるという結果が得られた。また、CE/DFA ではプレキャピラリー反応の K_M よりも概ね低い値が得られ、生成物阻害を取り除いた測定が行われたことを示した。

本研究で用いた酵素は数ある中でも代表的なものであり、本法は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。

参考文献

- [1] 虎谷哲夫, 北爪智哉, 吉村徹, 世良貴史, 蒲池利章, “酵素-科学と工学-”, 講談社 (2012).
- [2] S. G.-Tsodikova, I. A. Shkel, O. V. Tsodikov : *Anal. Biochem.*, **387**, 276–279 (2009).
- [3] S. S. M. Hassan, H. E. M. Sayour, A. H. Kamel : *Anal. Chim. Acta*, **640**, 75–81 (2009).
- [4] C. A. Klingaman, M. J. Wagner, J. R. Brown, J. B. Klecker, E. H. Pauley, C. J. Noldner, J. R. Mays : *Anal. Biochem.*, **516**, 37–47 (2017).
- [5] J. J. Bao, J. M. Fujima, N. D. Danielson : *J. Chromatogr. B*, **699**, 481–497 (1997).
- [6] Y. Fan, G. K. E. Scriba : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **53**, 1076–1090 (2010).
- [7] 中村隆雄, “酵素”, 学会出版センター (1981).
- [8] 寺部茂, 本田進, “キャピラリー電気泳動-基礎と実際-”, 講談社 (1995).
- [9] 北川文彦, 大塚浩二, “電気泳動分析”, 共立出版 (2010).
- [10] S. K. Poole, S. Patel, K. Dehring, H. Workman, C. F. Poole : *J. Chromatogr. A*, **1037**, 445–454 (2004).
- [11] J.-B. Kim, S. Terabe : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1625–1643 (2003).
- [12] S. B.-Bermejo, E. S.-López, M. C.-Puyana, M. L. Marina : *Trac. Trends Anal. Chem.*, **124**, 115807 (2020).
- [13] J. Bao, F. E. Regnier : *J. Chromatogr. A*, **608**, 217–224 (1992).
- [14] B. J. Harmon, D. H. Patterson, F. E. Regnier : *Anal. Chem.*, **65**, 2655–2662 (1993).
- [15] B. J. Harmon, D. H. Patterson, F. E. Regnier : *J. Chromatogr. A*, **657**, 429–434 (1993).
- [16] D. H. Patterson, B. J. Harmon, F. E. Regnier : *J. Chromatogr. A*, **662**, 389–395 (1994).
- [17] S. Nováková, S. V. Dyck, A. V. Schepdael, J. Hoogmartens, Z. Glatz : *J. Chromatogr. A*, **1032**, 173–184 (2004).
- [18] H. Nehme, R. Nehme, P. Lafite, S. Routier, P. Morin : *Anal. Chim. Acta*, **722**, 127–135 (2012).
- [19] X. Wang, Z. Dou, Y. Yuan, S. Man, K. Wolfs, E. Adams, A. V. Schepdael : *J. Chromatogr. B*, **930**, 48–53 (2013).
- [20] D.-M. Liu, J.-L. Yang, W. Ha, J. Chen, Y.-P. Shi : *Anal. Biochem.*, **525**, 54–59 (2017).
- [21] J. Iqbal : *Anal. Biochem.*, **414**, 226–231 (2011).
- [22] J. Iqbal, S. Iqbal, C. E. Müller : *Analyst*, **138**, 3104–3116 (2013).
- [23] M. A. Camara, M. Tian, L. Guo, L. Yang : *J. Chromatogr. B*, **990**, 174–180 (2015).
- [24] M. Cheng, Z. Chen : *Electrophoresis*, **38**, 486–493 (2017).
- [25] M. Cheng, Z. Chen : *J. Pharm. Anal.*, **8**, 226–233 (2018).
- [26] V. Okhonin, X. Liu, S. N. Krylov : *Anal. Chem.*, **77**, 5925–5929 (2005).
- [27] V. Okhonin, E. Wong, S. N. Krylov : *Anal. Chem.*, **80**, 7482–7486 (2008).
- [28] S. M. Krylova, V. Okhonin, S. N. Krylov : *J. Sep. Sci.*, **32**, 742–756 (2009).
- [29] H. Nehmé, R. Nehmé, P. Lafite, S. Routier, P. Morin : *J. Chromatogr. A*, **1314**, 298–305 (2013).

- [30] E. Farçaş, L. Pochet, M. Fillet : *Talanta*, **188**, 516–521 (2018).
- [31] M. Cheng, Z. Chen : *J. Sep. Sci.*, **40**, 3168–3174 (2017).
- [32] P. Lin, S. Zhao, X. Lu, F. Ye, H. Wang : *J. Sep. Sci.*, **36**, 2538–2543 (2013).
- [33] S. Gattu, C. L. Carihfield, L. A. Holland : *Anal. Chem.*, **89**, 929–936 (2017).
- [34] G. Lu, L. A. Holland : *Anal. Chem.*, **91**, 1375–1383 (2019).
- [35] L. Bwanali, C. L. Carihfield, E. O. Newton, V. R. Zeger, S. Gattu, L. A. Holland : *Anal. Chem.*, **92**, 1518–1524 (2020).
- [36] T. Takayanagi, M. Mine, H. Mizuguchi : *Anal. Sci.*, **36**, 829–834 (2020).
- [37] The R Project for Statistical Computing, available from <<https://www.r-project.org/>>, (accessed 2020-11-16).
- [38] H. Zhang, Q. Ju, S. Pang, N. Wei, Y. Zhang : *Dyes Pigm.*, **194**, 109569 (2021).
- [39] S. Vimalraj : *Gene*, **754**, 144855 (2020).
- [40] B. Grodner, M. Napiórkowska : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **143**, 285–290 (2017).
- [41] K. Wang, W. Wang, X.-Y. Zhang, A.-Q. Jiang, Y.-S. Yang, H.-L. Zhu : *TrAC Trends Anal. Chem.*, **136**, 116189 (2021).
- [42] N. V. Bhagavan, C.-E. Ha, Essentials of Medical Biochemistry with Clinical Cases, Academic Press, London, 2011, Chap. 6, p. 47–58.
- [43] L. Mazzei, S. Ciurli, B. Zambelli : *Method Enzymol.*, **567**, 215–236 (2016).
- [44] A. R. Whisnant, S. E. Johnston, S. D. Gilman : *Electrophoresis*, **21**, 1341–1348 (2000).
- [45] A. R. Whisnant, S. D. Gilman : *Anal. Biochem.*, **307**, 226–234 (2002).
- [46] M. Sánchez-Cabezudo, J. M. Fernández-Romero, M. D. L. de Castro : *Talanta*, **42**, 1103–1110 (1995).
- [47] A. Kozlenkov, M. H. Le Du, P. Cuniasse, T. Ny, M. F. Hoylaerts, J. L. Millán : *J. Bone Miner. Res.*, **19**, 1862–1872 (2004).
- [48] M. Mine, H. Mizuguchi, T. Takayanagi : *Chem. Lett.*, **49**, 681–684 (2020).
- [49] R. L. Dean : *Biochem. Mol. Biol. Edu.*, **30**, 401–407 (2002).
- [50] Y. Xu, X. Liu, M. P. C. Ip : *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **21**, 2781–2797 (1998).
- [51] S. Schäuble, A. K. Stavrum, P. Puntervoll, S. Schuster, I. Heiland : *FEBS Lett.*, **587**, 2818–2824 (2013).
- [52] Y. Kim, M. J. Andreu, B. Lim, K. Chung, M. Terayama, G. Jiménez, C. A. Berg, H. Lu, S. Y. Shvartsman : *Dev. Cell*, **20**, 880–887 (2011).
- [53] L. Jöres, R. Wagner : *J. Biol. Chem.*, **278**, 16834–16843 (2003).
- [54] Y. Kim, M. Coppey, R. Grossman, L. Ajuria, G. Jiménez, Z. Paroush, S. Y. Shvartsman : *Curr. Biol.*, **20**, 446–451 (2010).
- [55] X. Wang, G. Carvalho, M. A. M. Reis, A. Oehmen : *J. Biotechnol.*, **280**, 62–69 (2018).
- [56] M. C. McKenna : *Neurochem. Res.*, **37**, 2613–2626 (2012).

- [57] Ö. Kartal, S. Mahlow, A. Skupin, O. Ebenhöf : *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 542 (2011).
- [58] C. Vera, C. Guerrero, C. Aburto, A. Cordova, A. Illanes : *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1868**, 140271 (2021).
- [59] Z. Mlichova, M. Rosenberg : *J. Food Nutr. Res.*, **45**, 47–54 (2006).
- [60] L. Lu, L. Guo, K. Wang, Y. Liu, M. Xiao : *Biotechnol. Adv.*, **39**, 107465 (2020).
- [61] S. K. Sharma, S. P. Sharma, R. M. Leblanc : *Enzyme Microb. Technol.*, **150**, 109885 (2021).
- [62] D. Craig, E. A. Arriaga, P. Banks, Y. Zhang, A. Renborg, M. M. Palcic, N. J. Dovichi : *Anal. Biochem.*, **226**, 147–153 (1995).
- [63] G. K. Shoemaker, D. H. Juers, J. M. L. Coombs, B. W. Matthews, D. B. Craig : *Biochem.*, **42**, 1707–1710 (2003).
- [64] E. R. Nichols, J. M. A. Gavina, R. G. McLeod, D. B. Craig : *The Protein Journal*, **26**, 95–105 (2007).
- [65] D. B. Craig, E. R. Nichols : *Electrophoresis*, **29**, 4298–4303 (2008).
- [66] D. B. Craig, T. T. Morris, C. M. Q. Ong-Justiniano : *Anal. Chem.*, **84**, 4598–4602 (2012).
- [67] J. J. Crawford, J. W. Hollett, D. B. Craig : *Electrophoresis*, **37**, 2217–2225 (2016).
- [68] L. A. Holland, S. Gattu, C. L. Carihfield, L. Bwanali : *J. Chromatogr. A*, **1523**, 90–96 (2017).
- [69] M. Mine, H. Mizuguchi, T. Takayanagi : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **188**, 113390 (2020).
- [70] W. M. Haynes (Ed.), *CRC handbook of Chemistry and Physics* (91st ed.), CRC Press, Boca Raton, 2010, p. 8–45.
- [71] V. Nolan, P. D. Clop, M. I. Burgos, M. A. Perillo : *Biochem. Biophys. Commun.*, **515**, 190–195 (2019).
- [72] M. I. Burgos, M. I. Velasco, R. H. Acosta, M. A. Perillo : *Sci. Rep.*, **6**, 36593 (2016).
- [73] S. Iqbal, T.-H. Nguyen, H. A. Nguyen, T. T. Nguyen, T. Maischberger, R. Kittl, D. Haltrich : *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 3803–3811 (2011).
- [74] H. Matsuno, Y. Nagasaka, K. Kurita, T. Serizawa : *Chem. Mater.*, **19**, 2174–2179 (2007).
- [75] T. C. Chou, P. Talaly : *J. Biol. Chem.*, **252**, 6438–6442 (1977).
- [76] T. Satoh, M. Hosokawa : *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 257–288 (1998).
- [77] D. Wang, L. Zou, Q. Jin, J. Hou, G. Ge, L. Yang : *Acta Pharm. Sin. B*, **8**, 699–712 (2018).
- [78] R. S. Holmes, M. W. Wright, S. J. F. Laulederkind, L. A. Cox, M. Hosokawa, T. Imai, S. Ishibashi, R. Lehner, M. Miyazaki, E. J. Perkins, P. M. Potter, M. R. Redinbo, J. Robert, T. Satoh, T. Yamashita, B. Yan, T. Yokoi, R. Zechner, L. J. Maltais : *Mamm Genome*, **21**, 427–441 (2010).
- [79] D. Yang, R. E. Pearce, X. Wang, R. Gaedigk, Y.-J. Y. Wan, B. Yan : *Biochem. Pharmacol.*, **77**, 238–247 (2009).
- [80] L. D. Hicks, J. L. Hyatt, S. Stoddard, L. Tsurkan, C. C. Edwards, R. M. Wadkins, P. M. Potter : *J. Med. Chem.*, **52**, 3742–3752 (2009).
- [81] T. Imai : *Drug Metab., Pharmacokinet.*, **21**, 173–185 (2006).

- [82] V. Ruiz-Calero, E. Moyano, L. Puignou, M. T. Galceran : *J. Chromatogr. A*, **914**, 277–291 (2001).
- [83] T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, K. Matsuda, M. Tomita, T. Nishioka : *Anal. Chem.*, **74**, 6224–6229 (2002).
- [84] K. Harada, E. Fukusaki, A. Kobayashi : *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 403–409 (2006).
- [85] J. M. Miller, A. C. Blackburn, Y. Shi, A. J. Melzak, H. Y. Ando : *Electrophoresis*, **23**, 2833–2841 (2002).
- [86] Z. Szakacs, B. Noszal : *Electrophoresis*, **27**, 3399–3409 (2006).
- [87] L. Zhao, D. Chen : *Biomedical Chromatography*, **29**, 123–128 (2015).
- [88] C. Qian, S. Wang, H. Fu, R. F. B. Turner, H. Li, D. D. Y. Chen : *Electrophoresis*, **39**, 1786–1793 (2018).
- [89] H. Zhang, J. Zhu, R. Aranda-Rodriguez, Y.-L. Feng : *Anal. Chim. Acta*, **706**, 176–183 (2011).
- [90] S. Kehraus, S. Gorzalka, C. Hallmen, J. Iqbal, C. E. Müller, A. D. Wright, M. Wiese, G. M. König : *J. Med. Chem.*, **47**, 2243–2255 (2004).
- [91] A. L. Simplicio, A. S. Coroadinha, J. F. Gilmer, J. Lamego : *Methods Mol. Biol.*, **984**, 309–319 (2013).
- [92] J. Lamego, A. S. Coroadinha, A. L. Simplicio : *Anal. Chem.*, **83**, 881–887 (2011).
- [93] L. Lan, X. Ren, J. Yang, D. Liu, C. Zhan : *Bioorg. Chem.*, **94**, 103388 (2020).
- [94] M. Mine, N. Matsumoto, H. Mizuguchi, T. Takayanagi : *Anal. Methods*, **12**, 5846–5851 (2020).
- [95] M. J. Hatfield, L. Tsurkan, J. L. Hyatt, X. Yu, C. C. Edwards, L. D. Hicks, R. M. Wadkins, P. M. Potter : *Br. J. Pharmacol.*, **160**, 1916–1928 (2010).
- [96] J. Shi, X. Wang, J. Nguyen, A. H. Wu, B. E. Bleske, H.-J. Zhu : *Drug Metab. Dispos.*, **44**, 554–559 (2016).
- [97] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry* (5th ed.), Springer, Berlin, 2004, pp. 123–134.
- [98] K.-L. Min, J.-P. Steghens : *Biochimie.*, **83**, 523–528 (2001).
- [99] F. B. Rudolph, H. J. Fromm : *J. Biol. Chem.*, **245**, 4047–4052 (1970).
- [100] Y. Li, D. Liu, J. J. Bao : *J. Chromatogr. B*, **879**, 107–112 (2011).
- [101] L. Santacruz, A. J. L. Arciniegas, M. Darrabie, J. G. Mantilla, R. M. Baron, D. E. Bowles, R. Mishra, D. O. Jacobs : *Physiol. Rep.*, **5**, e13382 (2017).
- [102] C. V. Suresh Babu, S. G. Cho, Y. S. Yoo : *Electrophoresis*, **26**, 3765–3772 (2005).
- [103] M. Zhang, S. Liang, Y.-T. Lu : *Biochim. Biophys. Acta*, **1729**, 174–185 (2005).
- [104] F. Ni, A. Kung, Y. Duan, V. Shah, C. D. Amador, M. Guo, X. Fan, L. Chen, Y. Chen, C. E. McKenna, C. Zhang : *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 7701–7704 (2017).
- [105] K. Strätker, S. Haidar, Á. Amesty, E. El-Awaad, C. Götz, A. Estévez-Braun, J. Jose : *FEBS J.*, **287**, 3042–3064 (2020).

- [106] S.P. Bessman, C.L. Carpenter : *Annu. Rev. Biochem*, **54**, 831–862 (1985).
- [107] D.L. Friedman, M.B. Perryman : *J. Biol. Chem.*, **266**, 22404–22410 (1991).
- [108] T. Wallimann, M. Dolder, U. Schlattner, M. Eder, T. Hornemann, T. Kraft, M. Stolz : *Magn. Reson. Mater. Phys.*, **6**, 116–119 (1998).
- [109] L. Morandi, C. Angelini, A. Prella, A. Pini, B. Grassi, G. Bernardi, L. Politano, C. Bruno, D. De Grandis, P. Cudia, A. Citterio : *Neurol. Sci.*, **27**, 303–311 (2006).
- [110] J. Ma, X. Peng, K.-W. Cheng, F. Chen, D. Yang, B. Chen, M. Wang : *J. Sep. Sci.*, **31**, 2846–2851 (2008).
- [111] J. M. Fujima, N. D. Danielson : *Anal. Chim. Acta*, **375**, 233–241 (1998).
- [112] M. Mine, H. Mizuguchi, T. Takayanagi : *Anal. Bioanal. Chem.*, **413**, 1453–1460 (2021).
- [113] W. M. Haynes (Ed.), *CRC handbook of Chemistry and Physics* (91st ed.), CRC Press, Boca Raton, 2010, p. 7–2.
- [114] G. F. Bickerstaff, N. C. Price : *Biochem. Soc. T.*, **5**, 761–764 (1977).
- [115] T.-J. Zhao, S. Feng, Y.-L. Wang, Y. Liu, X.-C. Luo, H.-M. Zhou, Y.-B. Yan : *FEBS Lett.*, **580**, 3835–3840 (2006).
- [116] C.-L. Wu, Y.-H. Li, H.-C. Lin, Y.-H. Yeh, H.-Y. Yan, C.-D. Hsiao, C.-F. Hui, J.-L. Wu : *Comp. Biochem. Phys. B*, **158**, 189–198 (2011).
- [117] F. Savabi, P. J. Geiger, S. P. Bessman : *Am. J. Physiol.*, **247**, C424–432 (1984).
- [118] R. Saruno, F. Kato, T. Ikeno : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1337–1338 (1979).
- [119] J. N. Rodríguez-López, L. G. Fenoll, M. J. Peñalver, P. A. García-Ruiz, R. Varón, F. Martínez-Ortiz, F. García-Cánovas, J. Tudela : *Biochim. Biophys. Acta*, **1548**, 238–256 (2001).
- [120] Z.-Z. Pan, H.-L. Li, X.-J. Yu, Q.-X. Zuo, G.-X. Zheng, Y. Shi, X. Liu, Y.-M. Lin, G. Liang, Q. Wang, Q.-X. Chen : *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 6645–6649 (2011).
- [121] W.M. Chai, R. Wang, M.K. Wei, Z.R. Zou, R.G. Deng, W.S. Liu, Y.Y. Peng : *PLoS One*, **10**, e0145483 (2015).
- [122] M. R. Loizzo, R. Tundis, F. Menichini : *Compr. Rev. Food Sci. F.*, **11**, 378–398 (2012).
- [123] Y.-J. Kim, H. Uyama : *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 1707–1723 (2005).
- [124] G.M. Robinson, M.R. Smyth : *Analyst*, **122**, 797–802 (1997).
- [125] S. Fayad, P. Morin, R. Nehmé : *J. Chromatogr. A*, **1529**, 1–28 (2017).
- [126] H. Zhang, M. Lu, H. Jiang, Z.-Y. Wu, D.-D. Zhou, D.-Q. Li, F.-Q. Yang : *Colloids Surf. B*, **188**, 110800 (2020).
- [127] B.-B. Sun, L. Qi, X.-Y. Mu, J. Qiao, M.-L. Wang : *Talanta*, **116**, 1121–1125 (2013).
- [128] Y. Su, X. Mu, L. Qi : *RSC Adv.*, **4**, 55280–55285 (2014).
- [129] L. Tang, W. Zhang, H. Zhao, Z. Chen : *J. Sep. Sci.*, **38**, 2887–2892 (2015).
- [130] T.-F. Jiang, T.-T. Liang, Y.-H. Wang, W.-H. Zhang, Z.-H. Lv : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **84**, 36–40 (2013).

謝辞

本論文をまとめるにあたり、多大なご指導、ご鞭撻を賜りました指導教官の高柳俊夫教授、水口仁志准教授、並びに B-1 講座の皆様に厚くお礼申し上げます。