

光切断性プローブによる多成分酵素活性同時解析手法の構築

(青山学院大理工) ○永野舜也・西原達哉・田邊一仁

Establishment of a methodology to evaluate multicomponent enzyme activities using photo-cleavable fluorescent probes (*College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University*)

○Shunya Nagano, Tatsuya Nishihara, Kazuhito Tanabe

Recently, an analysis of enzymatic activity has been paid attention for disease diagnosis. However, fluorescence probes have limitation in multicomponent analysis due to overlapping wavelengths. In this study, we designed molecular system using photocleavable fluorescent probes and thin-layer chromatography for the analysis of multiplex enzyme activities. We have employed coumarin-based photocleavable probe library. By corresponding the substrate structure and coumarin derivative, we can monitor the multicomponent enzymatic activity. To demonstrate the feasibility of this enzymatic activity analysis, we prepared esterase responsive probe based on the design strategy. In fact, we succeeded in the detection of esterase activity by using the TLC 2D development.

Keywords : *Fluorescent molecular probe, esterase activities, TLC*

近年、疾患関連酵素が多数見つかっており、これらの酵素活性評価に基づく、疾病診断に注目が集まっている。しかしながら、蛍光分子プローブは多成分の酵素活性評価を指向した場合、蛍光波長の重なりから制限を伴う。そこで本研究では、安価かつ簡便に多成分の酵素活性を同時評価可能にする方法論の確立を目指した。化合物を分離可能な薄層クロマトグラフィー (TLC) と光切断性の蛍光プローブを用いる方法論となる。標的酵素に対する基質構造と光照射後に得られるクマリン誘導体の構造を対応づけ、プローブライブラリーを構築する戦略となる (Figure 1)。具体的な解析手法としては、まず、プローブカクテルを検体に加え、TLC にて1次元展開することで粗く分離する。続いて、光照射を行うことにより、酵素に対応する蛍光色素誘導体を遊離させる。その後、2次元展開し、各 Rf 値に生じる蛍光スポットを解析することで多成分の酵素活性評価が実現する。本研究では、エステラーゼをモデル酵素として選択し、TLC を用いた酵素活性評価の実現可能性を評価した。エステラーゼプローブとして、基質部位にエチルエステル、光切断性蛍光色素として 7-(ジエチルアミノ)-4-(ヒドロキシメチル)クマリンを有する分子を設計し、2段階を経て合成した。次に、エステラーゼの活性評価を行った。その結果、TLC 上に基質、および、生成物に由来する蛍光スポットが酵素存在条件下で確かめられた。本発表では、蛍光分子プローブの合成、酵素反応評価の詳細について、発表する予定である。

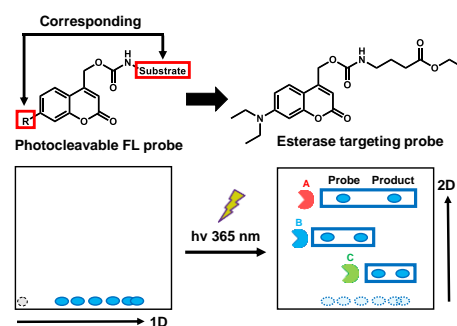


Figure 1 Molecular system using photocleavable fluorescent and TLC for detection of multiplex enzyme activity.