

長寿命発光プローブを活用した酵素阻害剤の探索

東京大学大学院 薬学系研究科 薬品代謝化学教室
寺井 琢也

【背景・目的】

NAD(P)H 依存性酵素は NAD(P)H と NAD(P)⁺ 間の変換反応との共役により基質の酸化還元を行う酵素群であり、がん等の代謝異常に起因する疾患の創薬ターゲットとして注目を集めている。従って、これらの酵素活性を正確かつハイスループットに定量できる一般的な方法の開発が求められている。現在、NAD(P)H の検出方法には NAD(P)H 自身が有する 340 nm の吸光度を測定する方法をはじめ様々な手法が存在するが、測定の信頼性と感度をともに満足する方法はいまだ開発されていない。そこで本研究では発光の長寿命成分を選択的に検出できる時間分解測定法により S/N の高いアッセイを可能とする発光性希土類錯体¹⁻³⁾に着目し、その特性を活かした高感度かつ高精度の新規 NAD(P)H 依存性酵素活性検出プローブを開発して阻害剤スクリーニングへと応用することを目指した。

【方法・結果】

1. 新規 NAD(P)H 依存性酵素活性の検出法

最近の研究⁴⁾において、特定の発光性希土類錯体はアスコルビン酸やカテコール類など還元力の高い分子の共存下において、発光寿命変化を伴う分子間消光(動的消光)を受けることが報告されている。本研究ではこの知見を基に、高い還元力を持つ NAD(P)H からは大きな消光を受けるのに対してその酸化体である NAD(P)⁺からは動的消光を受けない発光性希土類錯体の開発を行うことで、NAD(P)H 依存性酵素の活性検出が可能になると考えた(Figure 1)。

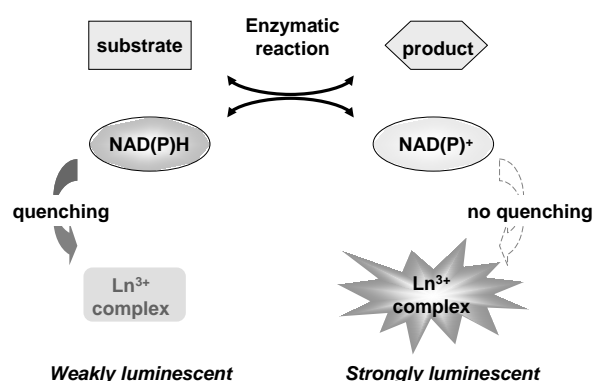
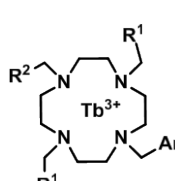
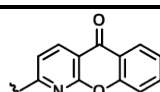
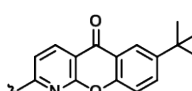
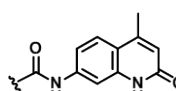


Figure 1. Schematic illustration of novel NAD(P)H-dependent enzyme assay.

2. プローブの合成・評価

発光性希土類錯体は一般に、Tb³⁺等の中心金属イオン、中心金属と安定な錯体を形成するキレーター部位、中心金属を間接励起する芳香環(アンテナ部位)の 3 つの部分から構成される。ここで我々は、錯体全体が正に帯電した化合物の方が、負電荷を有する NAD(P)H により消光を受け易いという作業仮説を立て、これを検証するために環状ポリアミン(cyclen)から伸長するカルボン酸およびアセトアミドの数を調整して 3 種類の総電荷を持つキレーター部位を用意し、それぞれに対して 3 種類の異なるアンテナ部位を導入することで合計 9 種類の Tb³⁺錯体を設計合成した。この化合物群に対して NAD(P)H を添加したところ、いずれの錯体においても NAD(P)H 添加量依存的に発光強度および発光寿命の低減がみられた。さらに二分子間消光定数 k_q によりその消光の受け易さを評価したところ、アンテナに依らず 0 価、+1 価、+3 価の順にその値が大きくなり、作業仮説を支持する結果となった(Table 1)。一方、酸化体である NAD(P)⁺を添加した場合には発光強度や寿命の減少はほとんど見られず、錯体の発光強度(または寿命)を用いて NAD(P)⁺と NAD(P)H との間の変換をモニターできる可能性が示された。

Table 1. Structure of Tb³⁺ complexes and intramolecular quenching constants (k_q) upon titration of NADH.

general structure	Ar (antenna)	R ¹ , R ² (ligands)	probe	net charge	k_q (mM ⁻¹ ms ⁻¹)
		CONH ₂ , CONH ₂	A1Tb	+3	124
		COO ⁻ , CONH ₂	A2Tb	+1	21
		COO ⁻ , COO ⁻	A3Tb	0	9
		CONH ₂ , CONH ₂	B1Tb	+3	206
		COO ⁻ , CONH ₂	B2Tb	+1	21
		COO ⁻ , COO ⁻	B3Tb	0	9
		CONH ₂ , CONH ₂	C1Tb	+3	53
		COO ⁻ , CONH ₂	C2Tb	+1	12
		COO ⁻ , COO ⁻	C3Tb	0	6

3. プロープを利用した NADH 依存性酵素アッセイ

続いて、これらの錯体が実際の酵素反応を検出できるかについて検討した。標的酵素としては、代表的な NADH 依存性酵素である乳酸脱水素酵素 (LDH) を用いた。NADH から大きな消光を受ける錯体である **A1Tb** (Table 1) は、キュベット中の測定において LDH によるピルビン酸の還元反応に伴い発光強度および発光寿命が上昇した (Figure 2A, B)。また、プレートリーダー上での測定において 1 mU/mL までの LDH 活性を検出することができた (Figure 2C)。既存の方法である NADH 吸光測定を同一の条件で行った場合、検出可能な LDH 活性は 10 mU/mL までであったため、希土類錯体プローブを用いることでより高感度な測定が行えることが示された。また、実際のスクリーニングを模した 384 穴プレートを用いた実験も行い、Z' 値により本プローブが十分な信頼性を持っていることを確認した。

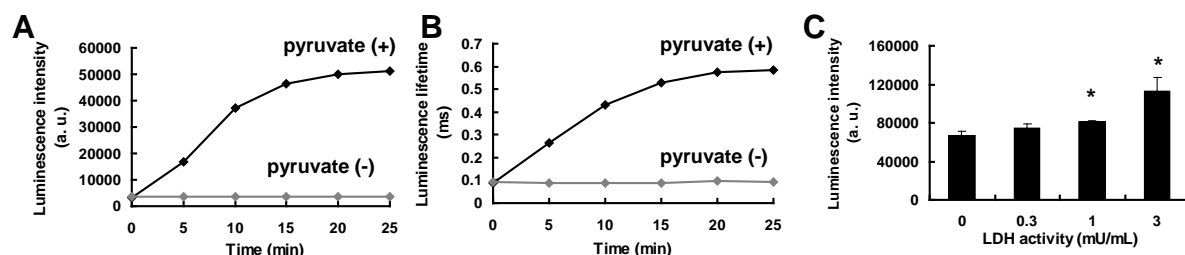


Figure 2. Time-dependent changes of luminescence intensity (A) and lifetime (B) of 4 μ M A1Tb in the presence of 50 mU/mL LDH, 100 μ M NADH, and 125 μ g/mL sodium pyruvate (pyruvate (+)). Sodium pyruvate was excluded from pyruvate (-). (C) Luminescence intensity of 1 μ M A1Tb in the presence of LDH, 100 μ M NADH, and 125 μ g/mL sodium pyruvate after incubation for 25 minutes. Error bars indicate S.D. ($n = 3$). * $p < 0.05$ vs 0 mU/mL LDH. Student's t -test.

4. 寿命変化を利用したレシオ測定の実用

一般的な時間分解測定においては単一の発光観測時間における強度を測定しているが、もし二つの異なる発光観測時間を設定して測定を行えば、寿命変化を引き起こす化合物に依存して二つの測定値の比が変動する一方、発光寿命に影響しない夾雑物の存在下ではその比が変化しない、信頼性の高い測定 (レシオ測定) が可能になると考えられる。そこで、プローブの発光強度のみを低減させることが研究の過程で明らかとなった ATP を夾雑物の例とし、ATP と NADH を **A1Tb** に対して添加して上述のレシオ測定を行ったところ NADH のみ濃度依存的な測定値の変化が認められ、このレシオ測定が夾雑物の影響を相殺するのに有用であることが確認された (Figure 3A)。プローブの発光寿命そのものを測定する方法は従来からよく知られていたが、高い信頼性の反面、装置の複雑さやスループットの低さが問題となっていた。本研究が提唱する「時間軸を用いたレシオ測定」は、寿命自体の測定と比較すると比較的簡便であり、大規模スクリーニングにも適している。

さらに我々はこのレシオ測定が、ATP を利用してグルコースのリン酸化を行うヘキソキナーゼの活性を、その反応生成物を NADPH 依存性酵素で連続的に代謝することにより検出するカップリングアッセイにも適用

可能であり、測定値のばらつきを抑えることで信頼性が付与されることを明らかにした(Figure 3B)。本手法がカップリングアッセイにも適用可能であることは、我々の方法が NAD(P)H 依存性酵素以外の幅広い酵素アッセイに対しても適用可能であることを示すデータであり極めて重要である。

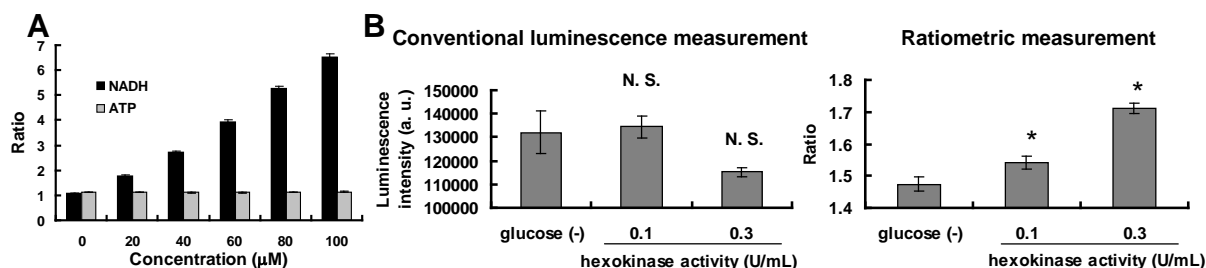


Figure 3. (A) Ratio of luminescence intensities of 1 μM A1Tb measured at two different delay times (50 μs and 200 μs) upon titration of various concentrations of NADH or ATP. (B) Luminescence intensity of 1 μM A1Tb (left) or ratio of luminescence intensities measured at two different time domains (right) in the presence of 100 μM ATP, 1 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 130 μM NADP⁺, 10 mM glucose, and indicated activities of hexokinase after incubation for 25 min. Glucose was excluded from glucose(-). Error bars indicate S.D. (n = 5). * $p < 0.01$ vs glucose (-). Student's *t*-test. N. S. = not significant.

【まとめ】

化合物の総電荷に着目した独自の分子設計を基に、NAD(P)H から消光を受け易い Tb³⁺錯体を開発し、これを用いてNAD(P)H 依存性酵素の活性検出が出来ることを初めて示した。さらには発光寿命変化を利用することで夾雑物が混在する系において信頼性の高い測定が可能であることを示した。残念ながら、研究期間内には阻害剤スクリーニングの実施ができなかったが、今後は測定系を最適化すると共に有用な標的酵素を選択して実際の化合物評価に応用したい。

【参考文献】

1. "Salicylic Acid Derivatives as Antennae for Ratiometric Luminescent Probes Based on Lanthanide Complexes" Takuya Terai, Hiroki Ito, Kazuya Kikuchi, and Tetsuo Nagano, *Chem. Eur. J.*, **13**, 7377-7381 (2012).
2. "A Long-Lived Luminescent Probe to Sensitively Detect Arylamine *N*-Acetyltransferase (NAT) Activity of Cells" Takuya Terai, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Hirotatsu Kojima and Tetsuo Nagano, *Chem. Commun.*, **48**, 2234-2236 (2012).
3. "A Time-Resolved Fluorescence Probe for Dipeptidyl Peptidase 4 and its Application for Inhibitor Screening" Mitsuyasu Kawaguchi, Takayoshi Okabe, Takuya Terai, Kenjiro Hanaoka, Hirotatsu Kojima, Izumi Minegishi and Tetsuo Nagano, *Chem. Eur. J.*, **16**, 13479-13486 (2010).
4. "A mechanistic study of the dynamic quenching of the excited state of europium(III) and terbium(III) macrocyclic complexes by charge- or electron transfer" Filip Kielar, Craig P. Montgomery, Elizabeth J. New, David Parker, Robert A. Poole, Siobhan L. Richardson and Philip A. Stenson, *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 2975-2982 (2007).