

酵素反応による硫酸ステロイド化合物DHEA-S検出法の開発

— 酵素サイクリング反応によるDHEA標準物質の測定試験 —

バイオスタッフ 室伏敬太* 太田俊也*
SEIRYU Bio株式会社 山口 司

An Enzymatic method for the determination of dehydroepiandrosterone-sulfate

Keita Murofushi, Toshiya Ohta and Osamu Yamaguchi

1. 目的

ストレスは過度に受けると免疫力の低下や種々の疾患を引き起こすことが知られており、ストレスを科学的に評価して管理することの意義は大きい。しかし、ストレスには複雑な要因があることや、同じ環境条件でもストレスの度合いには個人差があるために現状のストレス評価は本人の主観的な判断に委ねられることが多い。近年では唾液・血液・尿などの生体試料中に存在するストレス関連物質（ストレスマーカー）の濃度を測定することでストレスを評価する手法が提案されているが、ストレスマーカーは極めて微量にしか存在しない物質であるため、その測定には大がかりな装置や高額な試薬を必要とすることがほとんどである。そこで、本研究では酵素反応を利用した安価かつ簡便なストレスマーカー測定法の開発を試みた。研究対象のストレスマーカーとして dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S) に着目した。DHEA-S はヒトの副腎皮質より分泌される種々のホルモン物質の前駆体であり、血液や尿中にも存在する化合物である。DHEA-S は、副腎癌の指標とされているが、近年ではストレスマーカー候補物質としての研究も行われている物質である。

2. 方法

2種類の酵素反応を組み合わせたDHEA-S測定法の開発を計画した。具体的には、ステロイドスルファターゼによる加水分解反応でDHEA-Sの硫酸基を取り除き、反応によって生じたDHEAをThio-NAD-NADH酵素サイクリング反応で高感度に検

出することで元のDHEA-Sを定量する（図1）。

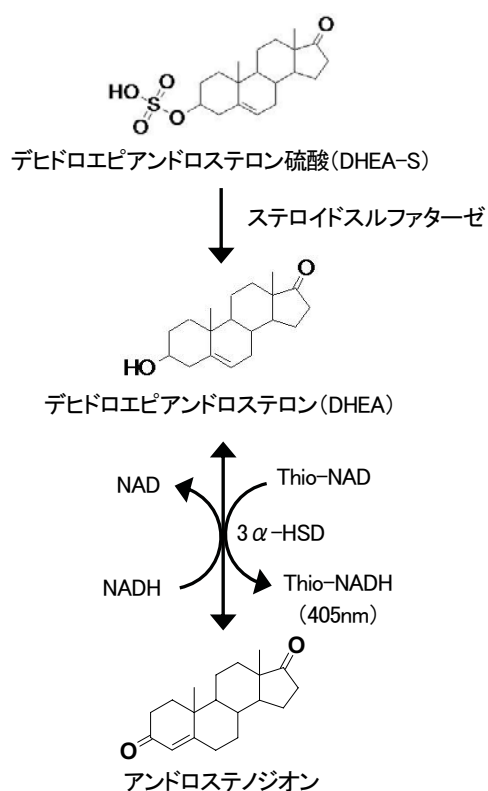


図1 2種類の酵素反応を組み合わせたDHEA-S測定法

2. 1 ステロイドスルファターゼによる加水分解

DHEA-Sの硫酸基を加水分解させるステロイドスルファターゼは、当センターで保有する *Flavobacterium* sp MS-3株より精製した、STS1を用いた^{1, 2)}。MS-3株が生産するステロイドスルファターゼとDHEA-Sを混合して、DHEA-Sの硫酸基が完全に加水分解されるまで反応させた。

*) 現 微生物抗体開発プロジェクトスタッフ

【ノート】

2. 2 DHEAの酵素サイクリング反応による定量

ステロイドスルファターゼによる加水分解で得られた DHEA は、 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD)によりアンドロステノジオンに脱水素されることが知られているが、 3β -HSDはサイクリング反応が困難な酵素である。そこで、サイクリング反応に適した 3α -HSDを用いてサイクリング反応を試みた。

試薬 1 (0.2M Tris-Hcl, 40U/ml 3α -HSD, 3mMNADH) 100 μ l、試薬 2 (5mM Thio-NAD) 80 μ l およびDHEA溶液 (1mMおよび0.1mM) 20 μ lを混合して、37°Cの条件下における405nmの吸光度の経時変化をマイクロプレートリーダー (TECAN社InfiniteM200) を用いて測定した。

3. 結果および考察

標準物質DHEAに対する 3α -HSDを用いた酵素サイクリング反応の結果を図2に示す。基質が存在しないコントロールでは吸光度に変化がないが、DHEAが存在するとその濃度に応じて単位時間当たりの発色の増加量が大きくなっていることが確認され、DHEAの測定が可能であることが示された。

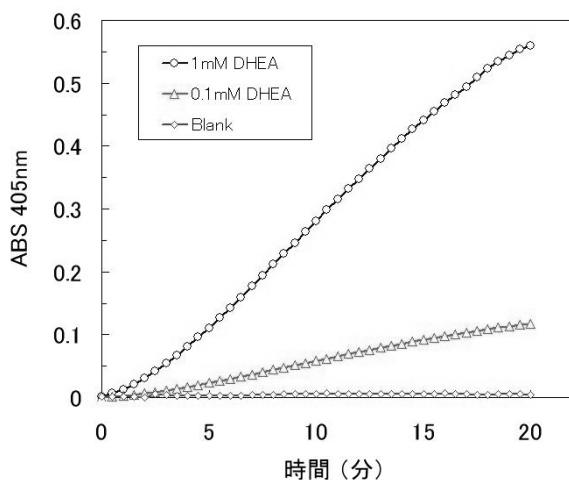


図2 DHEA標準物質を基質としたサイクリング反応結果

今回の結果では回転率が約0.5回転/分、DHEA標準物質の検出限界は0.01mMであった。Thio-NAD-NADH酵素サイクリング反応については、胆汁酸の測定で検出限界0.22 μ Mを達成した報告例もある

ので³⁾、DHEAの測定に関しても条件検討を重ねることで検出感度の向上が期待できる。

なお、DHEA-Sについても、MS-3株由来のステロイドスルファターゼによる加水分解を経て、酵素サイクリング反応で検出できることを確認した (データ非公開)。

今後は酵素サイクリング反応の条件検討による検出感度の向上と、反応に必要なステロイドスルファターゼの大量調製のために、微生物を宿主とするMS-3株由来ステロイドスルファターゼの大量発現系の構築を進める計画である。

4. まとめ

Thio-NAD-NADH酵素サイクリング系で汎用される 3α -HSDが、 3β -hydroxysteroid化合物であるDHEAにも作用することが示された。さらに、沼津工業技術支援センターが保有するFlavobacterium sp. MS-3株由来のステロイドスルファターゼを用いた加水分解反応と組み合わせることで、DHEA-Sの測定が可能であることが確認された。

参考文献

- 1) 山岸政昭ら：海洋性細菌の生産するスルファターゼの探索，静岡県沼津工業技術センター研究報告，No.4, 15-18 (1996).
- 2) 室伏敬太、山岸政昭：微生物の生産する生体関連酵素を用いた食品・医薬品の開発研究，静岡県沼津工業技術センター研究報告，No.14, 17-18 (2006).
- 3) Zhang GH, Cong AR, Xu GB, Li CB, Yang RF, and Xia TA: An enzymatic cycling method for the determination of serum total bile acids with recombinant 3α -hydroxysteroid dehydrogenase, Biochem Biophys Res Commun, 326, 87-92 (2005).