

センシングバイオロジーを志向した蛍光性 DAG-lactone 誘導体の合成と機能評価

(東医歯大¹生材研・²疾患生命研)

○ 奥田 善章^{1,2}・堤 浩¹・野村 渉¹・大橋 南美¹・芹澤 雄樹¹・玉村 啓和^{1,2}

Synthesis and Evaluation of Fluorescent DAG-lactone Derivatives toward Sensing Biology (¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University) OKUDA, Yoshiaki^{1,2}; TSUTSUMI, Hiroshi¹; NOMURA, Wataru¹; OHASHI, Nami¹; SERIZAWA, Yuki¹; TAMAMURA, Hirokazu^{1,2}

Protein kinase C (PKC)は11種類のアイソザイムからなるセリン・スレオニン特異的リン酸化酵素であり、生理的条件下ではdiacylglycerol (DAG)をセカンドメッセンジャーとして細胞増殖や分化、アポトーシスにおいて重要な作用を示す。代表的な腫瘍プロモーターである phorbol dibutyrate (PDBu)も PKC をターゲットとしており、PKC はがんの治療薬開発のターゲットとして注目されている。

当研究室では、天然のリガンドである DAG の誘導体を環化することにより、PKC との結合に必要な官能基を空間的に固定化し、結合活性を上昇させるという戦略に基づき、PDBu に匹敵する結合活性を持った DAG- γ -lactone 誘導体を合成している (Fig. 1)。これらの PKC への結合活性は、放射性同位体 (RI) でラベル化された $[20\text{-}^3\text{H}]$ PDBu をプローブとした競合阻害アッセイを用いて評価している。しかし RI を使用したアッセイには専用の設備などを必要とし被曝の危険性もあるため、より簡便なアッセイが必要である。そこで本研究では、この

DAG-lactone 誘導体の R_1 または R_2 に蛍光基を導入した蛍光性 DAG-lactone 誘導体を合成し、 $[20\text{-}^3\text{H}]$ PDBu に代わる競合プローブの開発を行った。この蛍光性 DAG-lactone 誘導体が PKC との結合に伴って蛍光変化を起こした場合、リガンドの競合的結合を蛍光変化として検出できるため、RI アッセイでは必要な洗浄操作が不要となり $[20\text{-}^3\text{H}]$ PDBu にかわる有用なスクリーニングプローブとして期待される。

まず蛍光性 DAG-lactone 誘導体が PKC のリガンド結合部位である C1b ドメインに対して、十分な結合活性を保持していることを $[20\text{-}^3\text{H}]$ PDBu との競合阻害実験により確認した。次に蛍光測定実験の結果、蛍光性 DAG-lactone 誘導体は C1b ドメインとの結合に伴い、蛍光波長は短波長シフトし (Fig. 2a)、かつ蛍光強度が顕著に増大することが明らかとなった。さらに PDBu との競合阻害実験を行ったところ、PDBu の濃度依存性な蛍光強度の減少と波長の長波長シフトが見られたことから (Fig. 2b)、リガンドの競合的結合を蛍光の変化として検出でき、蛍光性 DAG-lactone 誘導体をプローブとした競合アッセイが可能であることが示された。

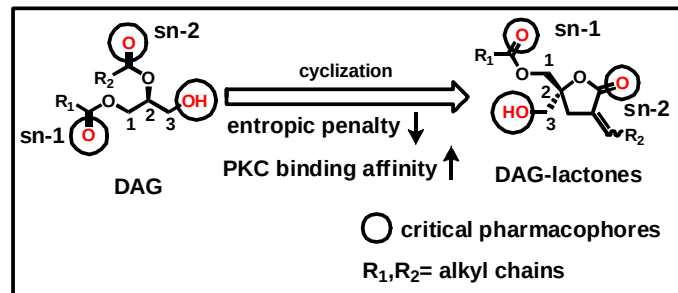


Fig. 1. DAG-lactonesへの展開

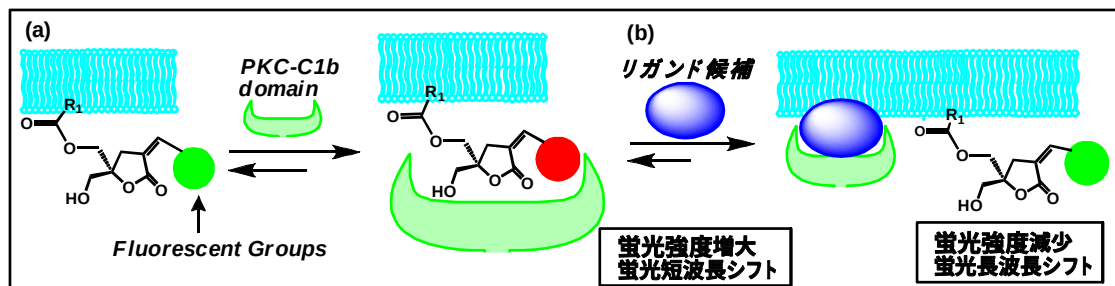


Fig. 2. (a) 蛍光性 DAG-lactone と PKC-C1b との結合
(b) 蛍光性 DAG-lactone をプローブとした PKC リガンドの競合結合アッセイ