

27PE-am273

新規芳香族アミド誘導体のホタルルシフェラーゼ阻害作用

○中込 まどか¹, 藤巻 信子¹, 首藤 紘一¹(¹財)乙卯研)

【要旨】現在、遺伝子の転写や制御を調べるレポータータンパクをはじめ、科学的データの指標として広く用いられているホタルルシフェラーゼ(以下、Luc)は、Mg²⁺存在下、ATP と共役し、ルシフェリンを酸化、発光させる。今回我々は、転写翻訳調節物質を探索中に、新規合成化合物の中から、Luc の酵素活性を特異的に、数 nM レベルで阻害する構造特異性の高い芳香族アミド誘導体、IT-F-02053(以下、F-53)を見つけ、その作用について明らかにした。

【方法】F-53 の酵素活性阻害作用は、Luc 生成のいずれの段階で生ずるのかを検討した。転写への影響あるいは酵素活性は、Hela 細胞を用い、各種レポーターアッセイ系で調べた。mRNA やタンパク発現量は RT-PCR とウエスタンブロットで確認した。直接的な酵素阻害については、酵素標準品を用いた。さらに、リン酸化の関与を調べる為、各種キナーゼ阻害剤とλ-フォスファターゼを用いた。

【結果と考察】F-53 処理後の Luc の mRNA やタンパクの発現量に減少傾向は見られず、F-53 の阻害作用は、転写や翻訳への影響ではなかった。また、一般的な他のレポーター酵素、ウミシイタケルシフェラーゼ、β-Gal、CAT には全く影響を及ぼさなかった。一方、酵素標準品や酵素発現細胞溶解液を用いたところ、酵素阻害は確認されなかったことから、細胞内作用と考えられた。SDS-PAGE の結果では、Luc の分子量に変化は無いが、Native-PAGE では移動度の違いが見られたことから、翻訳後修飾が示唆された。また、MAP キナーゼ阻害剤である PD98059 により、F-53 作用が抑えられたため、リン酸化の関与が考えられた。現在、F-53 処理後の Luc タンパクのマスペクトルを確認中である。