

27H-pm10

PKC C1b ドメインの合成およびその蛍光性誘導体を用いた新規スクリーニング法の開発

○大橋 南美¹, 野村 渉¹, 加藤 舞^{1,2}, 堤 浩¹, 糸谷 恭子¹, 伊倉 貞吉², 伊藤 暢聡², 吉田 清嗣³, Nancy LEWIN⁴, Peter BLUMBERG⁴, 玉村 啓和^{1,2} (¹東医歯大生材研, ²東医歯大院疾患生命, ³東医歯大難治研, ⁴NCI, NIH)

【目的】 蛍光を用いた検出が容易な化合物評価法はハイスループットスクリーニングへの応用が期待できる。迅速かつ容易な化合物スクリーニングは、創薬を指向した化合物合成プロセスの効率化につながる。演者らは、がんプロモーターであるホルボールエステルを受容体である Protein Kinase C (PKC) に着目し、検出に蛍光を用いた PKC リガンド結合評価法の開発を行なった。

【方法】 約 50 アミノ酸からなる PKC リガンド結合領域 (C1b ドメイン) を効率的に合成するために、2 つの断片をそれぞれ Fmoc 固相合成法で作製後、Native Chemical Ligation (NCL) 反応によって全長とした。また、環境応答性蛍光基を導入した Fmoc-Lys-OH 誘導体を用いて、同様に蛍光ラベル体を合成した。合成した C1b ドメインの性質は、リガンドであるホルボールエステルに対する結合活性や CD スペクトル解析で調べた。また、リガンド結合による蛍光スペクトル変化を測定した。

【結果および考察】 Fmoc 固相合成法と NCL により、効率良く天然型 C1b ドメインと蛍光ラベル C1b ドメインを創製できた。これらの C1b ドメインはリコンビナント C1b ドメインと同様の CD スペクトルを示し、天然配列のものと同等のリガンド結合活性を有することが確認された。さらに、作製した蛍光性 C1b ドメインにリガンドを加えたところ顕著な蛍光スペクトル変化がみられ、リガンド結合活性を評価できることが明らかになった。よって、蛍光性 C1b ドメインのリガンドスクリーニングツールへの応用の可能性が示唆された。

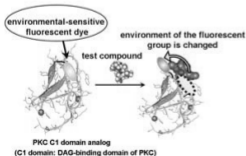


図. 蛍光基の周辺環境変化によるリガンド結合の検出