

28TG-am08

蛍光を用いた PKC リガンド結合評価法の開発

○大橋 南美¹, 野村 渉¹, 鳴海 哲夫¹, 奥田 善章^{1,2}, 伊倉 貞吉², 伊藤 暢聡², 吉田 清嗣², E Nancy LEWIN⁴, M Peter BLUMBERG⁴, 玉村 啓和^{1,2} (東京医歯大・生材研,²東京医歯大院・生命疾患研,³東京医歯大・難治研,⁴Laboratory of Cancer Biology and Genetics, Center for Cancer Research, NCI, NIH)

【目的】蛋白質を標的としたリガンド結合評価法において検出に蛍光を用いることにより、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。演者らは、がんやアルツハイマー型痴呆症に関与することから有望な創薬標的の1つであるプロテインキナーゼ C(PKC)を取り上げ、蛍光標識したリガンド結合ドメイン(δ C1b ドメイン)もしくは標準リガンド (DAG-lactone 誘導体) を用いる 2 種類のリガンド結合評価法の開発を行った。

【方法】蛋白質側からのアプローチでは、PKC δ アイソザイムの δ C1b ドメインに環境応答性蛍光団を導入した蛍光性 δ C1b を作製した。Fmoc 固相合成法および Native Chemical Ligation 法を用いて蛍光性 δ C1b を合成し、リガンドであるホルボールエステル (PDBu) の結合活性を評価した。その後、リガンド滴定実験で蛍光スペクトル変化の測定を行った。リガンド標識法からのアプローチでは、合成 PKC リガンドの1つである DAG-lactone の蛍光誘導体を合成した。合成した蛍光性 DAG-lactone の PKC に対する PDBu 結合阻害活性、蛍光特性、更にリガンド競合阻害実験を行った。

【結果および考察】蛍光性 δ C1b は野生型と同等のホルボールエステル結合を示した。リガンド滴定実験において蛍光スペクトル変化と極大波長のシフトが確認され、作製した蛍光性 δ C1b がリガンド結合評価に利用できた。環境応答性蛍光団を持つ DAG-lactone はホルボールエステルとの競合阻害が蛍光変化によって検出できた。また、リガンドの結合阻害実験で RI 実験との相関性が示された。これら 2 種類のオルソゴナルな蛍光を用いた評価系を利用することでより精度の高いリガンド評価系の構築が期待できる。

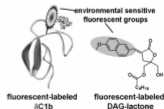


図. 蛍光標識された δ C1b と DAG-lactone