

30P2-am138

生体試料における poly(ADP-ribose) 測定系の検討

○工藤 祐子^{1,2}, 原田 博美¹, 藤森 浩彰¹, 渡邊 昌俊³, 益谷 美都子¹ (¹国立がん研セ研, ²横浜国大工, ³横浜国大工学研究院)

Poly(ADP-ribose)合成酵素(PARP)は DNA 修復応答に関わり PARP 阻害剤は BRCA 等の相同組み換え修復能が異常ながん細胞に対し合成致死を示し、乳がんや卵巣がんなどを対象に臨床試験が進んでいる。PARP 阻害剤の薬力学的マーカーとして用いられているのは末梢血単核球の粗抽出液において DNA 及び基質 NAD を添加し、poly(ADP-ribose) (PAR)合成を測定する系であり(Plummer, ER, Clin Cancer Res, 2005, 11:3402-9)、より高感度の内在性の PAR レベルの測定系が必要である。PAR レベルの測定系は生体内の PAR 代謝の変動の解析を可能にし、PAR 代謝の意義の研究にも有用である。今回、Plummer らが報告した dot blot 法などによる PAR レベルの測定系の改良を試みた。

大腸菌で発現させた PARP-1 を用いて調製した PAR を nitrocellulose 及び nylon membrane に dot/slot blot 法で転写した。UV 及びホルマリンによる crosslink を行う群と行わない群を作成し、抗 PAR 抗体 2 種を用いて化学発光法により PAR の検出を比較した。Nylon membrane では 0.2 pmol から検出可能であったが nitrocellulose では 10 pmol が検出限界であった。PAR 抗体として 10H 抗体を用いた群、また、UV crosslink を行った sample の方が crosslink なし及びホルマリンによる crosslink 群より検出感度が高く定量性も確認できた。

以上の結果から、dot/slot blot 法では nylon membrane 及び UV crosslink を行うことで PAR レベルの測定の高感度化が可能となった。本法は以前に報告した HPLC による PAR 測定法と同等の検出感度であり、生体試料の PAR レベルの変動を現在検討している。