

## 論文の内容の要旨

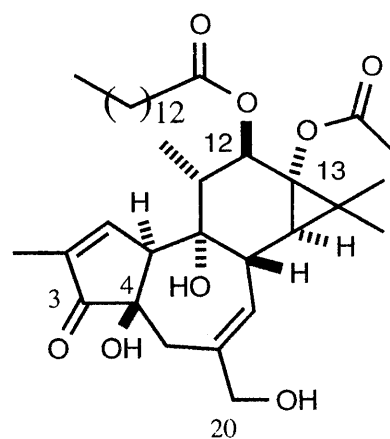
論文題目 プロテインキナーゼ C の光アフィニティーラベリング

氏名 魚津 公一郎

ホルボールエステルは動物実験における強力な発癌プロモーター活性が知られており、また細胞レベルにおいては、プロテインキナーゼ C (PKC) に結合し活性化することが知られている。ホルボールエステルと PKC の相互作用を明らかにすることは、発癌プロモーションメカニズムの解明、細胞内情報伝達メカニズムの解明につながると考えられる。そこで筆者は光アフィニティーラベリングを主な手法として用いることにより、ホルボールエステルと PKC の相互作用の解明を行うことを計画した。

### 1. ホルボールエステルの構造活性相関と光アフィニティープローブのデザイン

PKC 活性化剤の構造活性相関に関するモデルがいくつか提唱されており、PKC との結合において、岸らはホルボールの 3、9、20 位の酸素官能基、板井・首藤らは 3、4、20 位の酸素官能基が重要であると指摘している。また本研究に着手した後、Zhang らは、PKC のホルボールエステル結合部位とホルボール 13-アセートの複合体の X 線結晶構造解析に成功しているが、その結晶構造ではホルボールの 3、4、20 位の酸素官能基が PKC と水素結合をしている。これによりホルボールエステルの構造活性相関については明らかになったと思われたが、この結晶構造に関してはいくつかの点で疑問がもたれた。すなわち、この結晶構造は高



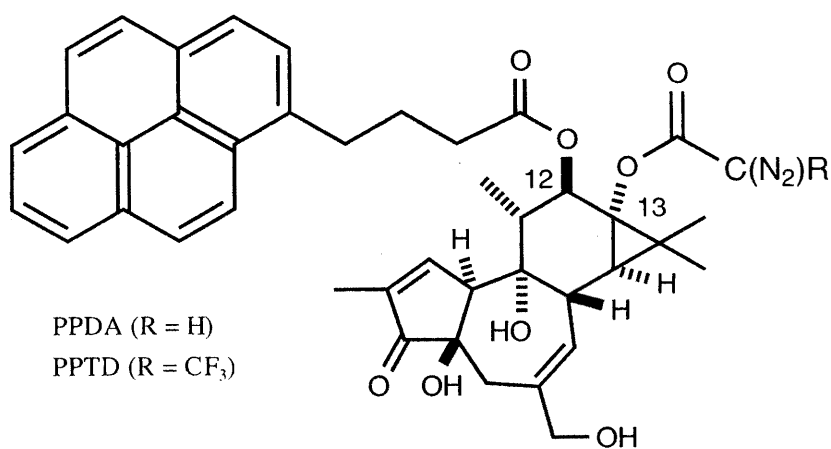
PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)

親和性結合に必要なホスファチジルセリンを含むリン脂質膜を欠いており、またホルボールエステルも 12 位の疎水性基を持たない結合親和性の低いホルボール 13-アセテートが用いられていることである。

柴崎・杉田らは、11-デメチル-13-デオキシホルボールエステルアナログを設計・合成しており、合成した化合物について PKC への結合親和性と PKC 活性化能を検討したところ 13-デオキシホルボール誘導体の結合親和性は PMA の 10 分の 1 程度であり、PKC 活性化能についてはほとんど見られていないことを報告している。この結果はホルボール 13 位アセトキシル基がホルボールエステル-PKC 相互作用において重要である可能性をはじめて指摘している。

ティーラベリングを試みた例が知られているが、光反応性基を 12 位疎水基上に有していたため、複合体において光反応性基は脂質膜に埋もれてしまい PKC から離れた場所に位置していたために、光照射によりリン脂質をラベルするのみで蛋白成分のラベルに成功した例は知られていない。蛋白質成分である PKC を効率良くラベルするためには、光反応性基が脂質膜ではなく PKC の近傍に位置するようにデザインする必要がある。上に記した 13-デオキシホルボール誘導体の活性評価の結果から、ホルボールエステルの 13 位アシル基が PKC と水素結合による相互作用をしている可能性が高いと考えた。したがって、その 13 位に光反応性基を導入すれば光照射により生成したカルベンは脂質ではなく PKC の近傍に位置し、ホルボールエステルと PKC の間に共有結合が効率良く形成される可能性が高いと考えた。そこで 13 位に光反応性基としてジアゾアセチル基またはトリフルオロジアゾプロピオニル基を導入し、12 位には蛍光ラベルとしてピレン基を導入した化合物をデザインし、合成を行った。

これらの化合物が光アフィニティープローブとして有効であるためには、PKC への高い結合親和性を持つことが必須である。そこで結合親和性を調べたところトリフルオロメチル基を有する PPTD は PMA と同程度、PPDA は PMA の 1/10 程度とどちらも十分に高い親和性を持つことが示された。また PKC の活性化能については PPTD が PMA の 1/10、PPTD が PMA の 1/100 程度であった。



## 2. PKC の光アフィニティーラベリング

そこでこれらのプローブを用いて PKC の光アフィニティーラベリング実験を行うこととした。蛋白質試料としてはラット脳より部分精製した粗精製物を用いた。必要なコファクター存在下 $[^3\text{H}]\text{PPDA}$  をインキュベートしたのち UV ランプで照射し、蛋白成分を未反応のプローブと分離し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。ゲルを切り取り、各フラクションに含まれる放射活性を測定した。その結果、PKC を含むフラクションに放射活性が認められ PKC とホルボールエステルの間に共有結合が形成されたことを示した。同様の実験を過剰量の PMA 存在下に行うと、このフラクションのラベルは抑えられ、このラベルが特異的であることを示している。

次に、単一の PKC アイソザイムを用いた光アフィニティーラベリングを行った。PKC としてヒトリコンピナント PKC $\beta$ 1、プローブとして $[^3\text{H}]\text{PPTD}$  を用いている。その結果、PKC を含むフラクションの放射活性は、過剰量の PMA により抑制され、特異的なクロスリンクが生成していることを確認した。

次に、その他の PKC アイソザイムについても光アフィニティーラベリング実験を行った。PKC $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$  をもちたいずれの場合にも、特異的なクロスリンクの形成が認められ、過剰量の PMA 存在下ではそのクロスリンクが抑制され、特異的なクロスリンクであると判断できた。PPDA、PPTD どちらを用いた場合もほぼ同等のクロスリンク収率を与えている。この実験はホスファチジルセリンから調製した脂質膜を用いているが、用いる膜成分により光アフィニティーラベリングの効率に変化する可能性がある。そこで、PKC アッセイに用いられている人工的な膜系であるトリトン X-100-ホスファチジルセリンミックスミセル系を用いた実験を行った。

この系では、ミセル表面と PKC との非特異的な相互作用が弱く、非特異的なクロスリンクが抑えられる可能性があると考えた。結果として、非特異的なクロスリンクは完全には抑えられなかったものの、PPTD を用いた場合には、ホスファチジルセリン膜を用いた場合よりも特異性の高いクロスリンクを与えた。これに対して、PPDA を用いた場合は、ミックスミセルを用いた系では、非常に低いクロスリンク収率を与えるのみであった。この結果はそれぞれのプローブの生成するカルベン種の反応性の違いによると考えられ、光反応性プローブのデザインにおいて興味深いものである。

## 3. ホスファチジルセリンへの特異的なクロスリンクの生成

以上のように PKC とホルボールエステルの相互作用には脂質膜が重要な役割を果たしていることが示唆されるが、本系のような光アフィニティーラベリングの系においては、プローブと脂質膜との間のクロスリン

クの形成も考えられる。そこで、光アフィニティープローブとホスファチジルセリンとの間にクロスリンクが形成される可能性について検討した。光アフィニティープローブをホスファチジルセリン、カルシウムイオン存在下、PKC とインキュベートし、254nm の光で照射した。得られた混合物にアセトンを加え沈殿物を生成させ、得られた沈殿に含まれる放射活性を測定した。沈殿中に含まれる放射活性は競合剤として過剰量の PDBu 存在下行うと抑制されること、および同様の実験を PKC 非存在下行うとこの放射活性がほとんど認められないことから、特異的なものと判断される。この沈殿物をシリカゲル薄層クロマトグラフィーで分離を行い、得られた TLC をオートラジオグラフィーで解析した。その結果、ホスファチジルセリンとほぼ同じ Rf に放射活性を持ったスポットが検出された。このスポットは Rf 値からホスファチジルセリンと光アフィニティープローブとのクロスリンク体であると考えられる。同様の実験を競合剤として過剰量の PDBu 存在下行うと、このスポットの生成は抑制されることから、このクロスリンクは特異的なクロスリンクであることが示された。この結果から、ホルボールエステル 13 位アセトキシル基周辺は PKC の近傍に位置しているのみでなく、ホスファチジルセリンの疎水基部分の近傍にも位置していることが示され、ホルボールエステル 13 位アシル基周辺、すなわちホルボールエステル C 環  $\alpha$  面、は疎水性領域として PKC およびホスファチジルセリンと相互作用をしている可能性があると考えた。

以上まとめると筆者は 11-デメチル-13-デオキシホルボールエステルの生物活性評価の結果から光アフィニティープローブを設計、合成し、PKC の光アフィニティーラベリング実験を行った。その結果 PKC の光アフィニティーラベリングを行うことに初めて成功し、ホルボール 13 位アシル基の重要性を示した。また、PKC とのクロスリンクが生成するとともに、光アフィニティープローブとホスファチジルセリンとの間にも特異的なクロスリンクが形成することを明らかにした。これらの結果は、ホルボールエステル 13 位アシル基周辺の構造活性相関を考えるうえで有用な知見を与えるものと考えられる。