

審査の結果の要旨

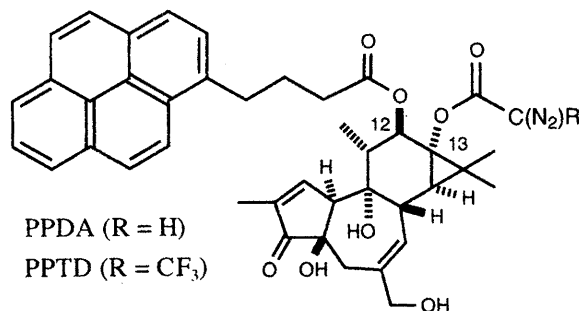
氏名 魚津 公一郎

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。そこで魚津公一郎は光アフィニティ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-アセテートの複合体の 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も持たれた。すなわち、この結晶構造は高親和性結合に必須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。

魚津公一郎は柴崎・杉田らの 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、PPDA 及び PPTD の合成を行った。



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いずれの化合物も十分に高い親和性を持つことが示された。

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を計画した。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^[3H]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 β 1、プローブとして^[3H]PPTD を用いた。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 α 、 γ 、 ϵ を用い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。

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、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 値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 α 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、魚津公一郎はプロテインキナーゼCの光アフィニティーラベリングを行い細胞内シグナル伝達の解明において有用な知見を得た。今後の医薬化学に貢献できうる可能性があり、博士(薬学)に相当する業績と判断した。