

## 論文の内容の要旨

論文題目      細胞内 GST 活性検出蛍光プローブの開発と生物応用

氏      名                      藤   川   雄   太

【序論】薬物代謝酵素として知られる Glutathione S-transferase (GST)は基質への Glutathione (GSH)抱合を促進することによって、薬物の無毒化や活性酸素種(ROS)によって傷害された内在性物質の除去などを行う酵素である。GSTにはいくつかのサブタイプが知られているが、Pi サブタイプとして知られる GSTP は多くのがんにおいて過剰発現していることが知られている。がんにおける GSTP の過剰発現は、抗がん剤耐性や発がん過程などへの寄与が強く示唆されている。またある種のがんでは通常細胞質に存在している GSTP が核に局在していることが知られ、核局在の割合とがん患者の悪性度には正の相関も知られている。これまでに、GST 活性を検出する方法がいくつも開発されてきたが、そのどれもが組織や細胞を破碎して作製した細胞質分画活性を評価するものであり、本来の細胞内での活性を評価していない。また破碎した場合、細胞内分布の情報は完全に失われる。このため生きた細胞の GST 活性を検出可能な蛍光プローブは、GST 過剰発現腫瘍の検出、また抗がん剤耐性機構を解明するツールになると考え、本研究に着手した。

## 【本論】

### 1. GST 特異基質の探索

酵素活性検出蛍光プローブの満たすべき要件として、(1)蛍光プローブが酵素の基質となること、(2)酵素反応によって蛍光特性の変化が起こること、の2つが挙げられる。GST をターゲットとした蛍光プローブの作製に向け、まず酵素の基質となる構造の探索に着手した。GST 活性を正しく見積もるためには、GSH のみとの反応速度に比べ、GST 存在下での反応速度が圧倒的に大きいことが必須である。これまで知られている基質は GST による反応に比べて GSH との自発的反応が比較的高速いため、新たな GST 特異的の反応を起こす基質を探索する必要がある。そこで下に示すいくつかの化合物の GST 非存在下および存在下にて反応初速度を比較したところ、3,4-Dinitrobenzanilide (NNBA) が非常に反応性の高い基質であることが分かった (Fig.1A, B)。プロトン NMR の結果および酵素反応終了後の溶液における亜硝酸イオン濃度の測定結果から、NNBA の反応機構としてグルタチオン化とそれに伴うニトロ基の脱離が起こっていることが確かめられた。

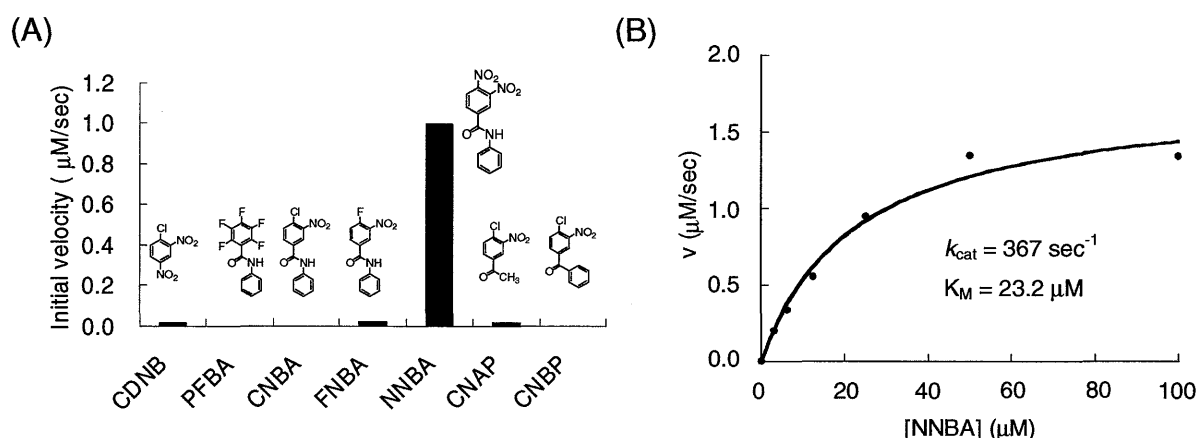
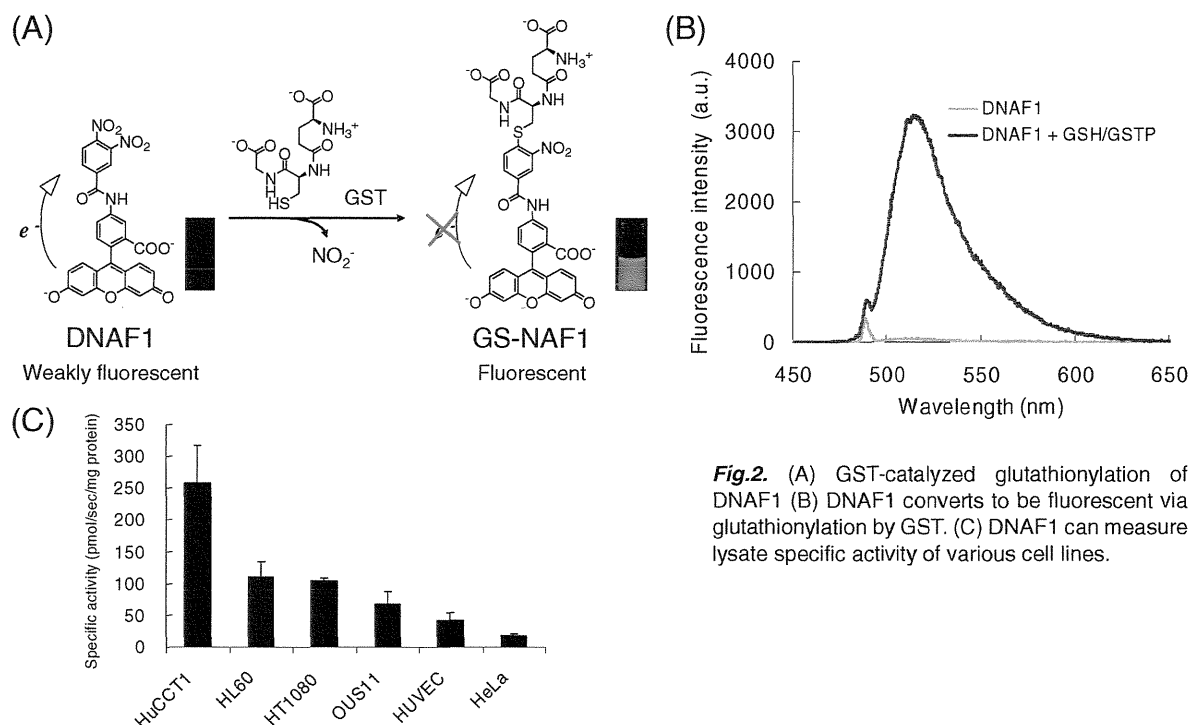


Fig.1. (A) Screening of specific compound for GSH/GSTP. (B) MM-plot of high specific substrate, NNBA, for GSTP.

### 2. 蛍光制御原理に基づいた新規 GST 活性検出蛍光プローブ DNAF1 の開発

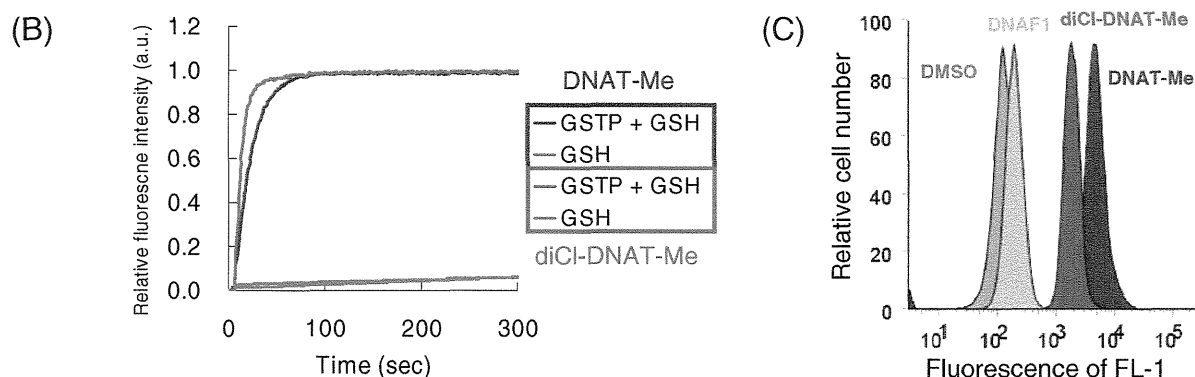
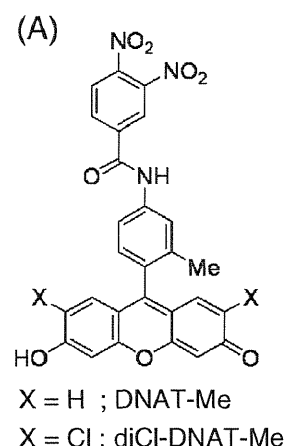
NNBA そのものとグルタチオン化後のモデル化合物の還元電位をそれぞれ測定したところ、両者には約 0.4V の比較的大きな違いが生じることが分かった。そこでこの反応前後の電子密度変化を当研究室で確立されてきた Donor excited photo-induced electron transfer (d-PeT) のメカニズムを利用して蛍光強度変化へとつなげ GST 蛍光プローブの開発を試みた。d-PeT とは、励起蛍光団の近傍に電子受容能の高い部位が存在する場合、励起された蛍光団からその部位へと電子が移動し励起状態の解消が起こった結果、蛍光が消光される現象である。そこで蛍光団であるキサンテンを NNBA と直結させた DNAF1 をデザイン、合成した。DNAF1 を GSH およびリコンビナント GSTP 共存下キュベット中にて反応を行ったところ、大きな蛍光強度上昇を示し、デザイン通り機能することが明らかとなった (Fig.2A, B)。また HPLC および LCMS の結果から DNAF1 の反応生成物は確かにグルタチオン化された化合物であることも確認された。さらに DNAF1 を用いて各種細胞の Lysate 総 GST 活性を評価できることも確かめられた (Fig.2C)。



**Fig.2.** (A) GST-catalyzed glutathionylation of DNAS1 (B) DNAS1 converts to be fluorescent via glutathionylation by GST. (C) DNAS1 can measure lysate specific activity of various cell lines.

### 3. 細胞膜透過型 GST 活性検出蛍光プローブ DNAT-Me の開発

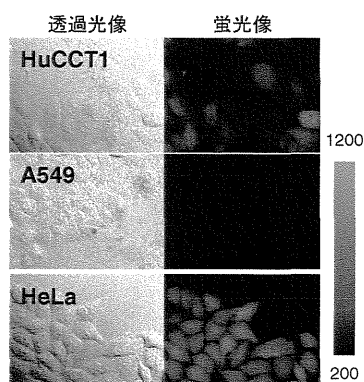
DNAS1 は GST によるグルタチオン化により顕著な蛍光強度上昇を示すが、そのまま生細胞へ適用しても細胞膜を通過しない。この原因として DNAS1 の分子内にカルボン酸が存在することが考えられた。この理由により DNAS1 を細胞内に導入するには、カルボン酸をより脂溶性の高い置換基に変換することが必要であると考え、次頁に示す DNAT-Me および中性 pH 領域での pH 感受性を持たない diCl-DNAT-Me をデザイン・合成した(Fig.3A)。蛍光光度計および Flow cytometry の検討から DNAT-Me は細胞膜透過可能な GST 活性検出蛍光プローブであることが確かめられた(Fig.3B, C)。また HPLC による検討から DNAT-Me は細胞内でも in vitro 同様、グルタチオン化されることが明らかとなった。



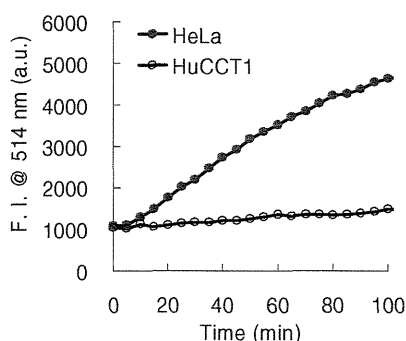
**Fig.3.** (A) Molecular structure of DNAT-Me/diCl-DNAT-Me, membrane permeable fluorescence probe for GST. (B) DNAT-Me converts to be strongly fluorescent via glutathionylation by GSTP. (C) Flow cytometric analysis reveals that DNAT-Me has higher permeability than DNAS1.

#### 4. DNAT-Me を用いた培養細胞系での検討

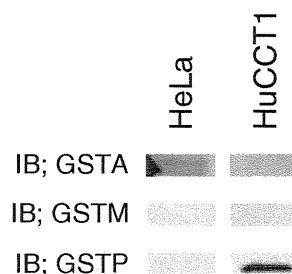
次に培養細胞の生細胞内 GST 活性を検出するために Lysate レベルにおいて活性の大きく異なる HeLa 細胞と HuCCT1 細胞および A549 細胞について活性イメージングを行ったところ、予想外にも Lysate 活性の高い HuCCT1 細胞や A549 細胞では蛍光強度が低いことが明らかとなった (Fig.4)。この結果の原因として、HuCCT1 細胞や A549 細胞の蛍光性生成物の排出能が高い可能性が疑われたため、マルチウェルプレートにて細胞外蛍光強度上昇を比較したところ、A549 細胞は HeLa 細胞と同程度の活性を有していることが明らかとなったが、HuCCT1 細胞は HeLa 細胞に比べてその蛍光強度上昇はほとんどゼロに近い値であった (Fig.5)。HuCCT1 および HeLa 細胞における主要なサブタイプの発現レベルをウエスタンブロットにより比較したところ、HuCCT1 細胞では GSTP が非常に多く存在することが明らかとなった (Fig.6)。このことから HuCCT1 細胞中に存在する GSTP は生細胞内においては活性が抑制されている可能性が高いことが示唆された。また GSTP 過剰発現細胞である A549 についても蛍光強度上昇が HeLa 細胞と同程度であったことから、細胞内 GST 活性は Lysate 活性ほどには高くない可能性がある。以上から、GSTP 過剰発現細胞における細胞内 GST 活性は抑制されている可能性があることが示唆された。



**Fig.4.** Fluorescence microscopic image of DNAT-Me loaded HuCCT1, A549 and HuCCT1 cells.

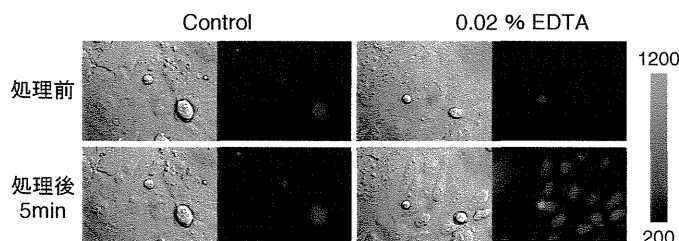


**Fig.5.** Fluorescence micro titer plate experiment of DNAT-Me loaded HeLa and HuCCT1 cells.



**Fig.6.** Western blot analysis of main GST subtypes in HeLa and HuCCT1 cells.

さらに diCl-DNAT-Me を用いた生細胞リアルタイムイメージング実験から、抑制されている GSTP 活性が EDTA 処理により、活性化するという現象を見いだした (Fig. 7)。この現象は HuCCT1, A549, HCT8 細胞と全く異なる 3 つの GSTP 過剰発現細胞種で共通に観察可能であった。すなわち GSTP の細胞内活性は何らかの内在性因子によって制御されている可能性が示唆された。



**Fig.7.** Realtime imaging of GSTP activity change upon EDTA treatment.

After 20 min incubation of 2  $\mu$ M diCl-DNAT-Me, 10% volume of HBSS (control) or 0.2 % EDTA were added..

【結論】本研究では医学的に重要な酵素である GST をターゲットとした新規 off/on 型 GST 活性検出蛍光プローブ DNAF1, DNAT-Me の開発に成功した。DNAT-Me を生細胞へ応用することにより、生細胞内での GST 活性は必ずしも Lysate 活性とは一致しないこと、および GSTP 過剰発現細胞では細胞内 GST 活性が強く抑制されていることが示唆される結果を得た。今後は細胞内 GSTP の活性制御メカニズムを明らかにすべく、更なる検討を行っていく。