

# GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブの開発とその応用

## Development of fluorogenic substrates selective for GSTP1 and its application

森 雅矢<sup>1)</sup>

指導教員 井上 英史<sup>1)</sup>, 研究協力者 藤川 雄太<sup>1)</sup>

1) 東京薬科大学 生命科学部 生命科学研究科 分子生物化学研究室

キーワード: GSTP1, がん細胞, 蛍光プローブ

### <背景・目的>

生体内における毒物などの有害分子の解毒や薬物の代謝を担う薬物代謝酵素の一つにグルタチオン S-転移酵素 (GST) がある。GST は親電子性の化合物に対して還元型グルタチオン (GSH) の抱合反応を触媒する酵素で、多くの分子種からなり、Alpha, Mu, Pi などのクラスに分類される。そのなかでも Pi クラスの GSTP1 は、ある種のがん細胞を除く様々ながん細胞において過剰発現しているため、腫瘍マーカーとして期待されている。そのため、細胞内 GSTP1 活性を捉える手法の開発は、迅速かつ高感度ながん細胞の検出に有用であることが期待される。しかしながら、現在までに報告されている GST 活性検出蛍光プローブは Pi クラスに対する選択性が不十分であった。そこで本研究では、生細胞に適用可能な GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブの開発を行った。

### <開発戦略>

これまでに藤川らが開発した GST 活性検出蛍光プローブ DNAT-Me は、蛍光団から蛍光制御団に電子が移動する消光機構 (d-PeT; donor-excited photoinduced electrontransfer) を作動原理としている。すなわち、グルタチオン抱合反応により DNAT-Me の蛍光制御団のニトロ基が脱離 (芳香族求核置換反応;  $S_NAr$ ) することで d-PeT が解除されて強い蛍光を発する [Fig. 1]。もし、このニトロ基の脱離反応を GSTP1 選択的に進行させることができれば、GSTP1 活性の選択的な検出が期待できる。そこで本研究では、GSTP1 選択的に脱ニトロ化反応を受ける芳香族ニトロ化合物を探索し、得

られた構造を蛍光制御団に組み込んだ蛍光プローブの合成・評価を行った。

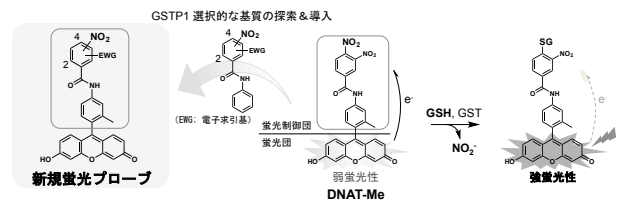


Fig.1 新規 GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブの分子設計

### <結果>

#### GSTP1 選択的基質の探索

ニトロ基を脱離基として  $S_NAr$  反応を起こすのに必要な電子求引基を有するベンズアニリドを 6 種類合成した。それらの化合物について、pH7.4 のリン酸ナトリウム緩衝液中、各 GST 分子種 (GSTA1, GSTM1, GSTP1) 選択性をグルタチオン抱合反応による吸収スペクトルの変化を指標に評価した。その結果、GSTP1 選択的にグルタチオン抱合反応を受けて吸収スペクトルが変化する基質として、5-メシル-2-ニトロベンズアニリドが得られた。そこで、この構造を組み込んだ蛍光プローブ Ps-TG をデザイン・合成した。

#### 分子設計・合成した蛍光プローブの評価

Ps-TG は、GSH/GSTP1 とのインキュベーションにより約 100 倍の蛍光強度上昇を示した。このことから、Ps-TG が分子設計通り GSTP1 活性を選択的に検出できることが示された [Fig. 2(B, C)]。さらに、細胞膜透過型蛍光プローブとして Ps-TG のアセチル化体である Ps-TAc を合成した。細胞内の GSTP1 活性を検出することができるか否かを評価するため、MCF7 細胞に対して赤色蛍光を発するタ

ンパク質 (DsRed) と FLAG タグを導入した各 GST 分子種を強制発現させるプラスミド (pIRES2-DsRed Express2/3xFLAG-GST) を導入し, Ps-TG または Ps-TAc を負荷した. その結果, Ps-TAc を用いたイメージングにより GSTP1 発現 MCF7 細胞から強い蛍光が検出された. この結果から, Ps-TAc を用いることにより細胞内 GSTP1 活性を選択的に検出できることが示された [Fig. 2 (E)].

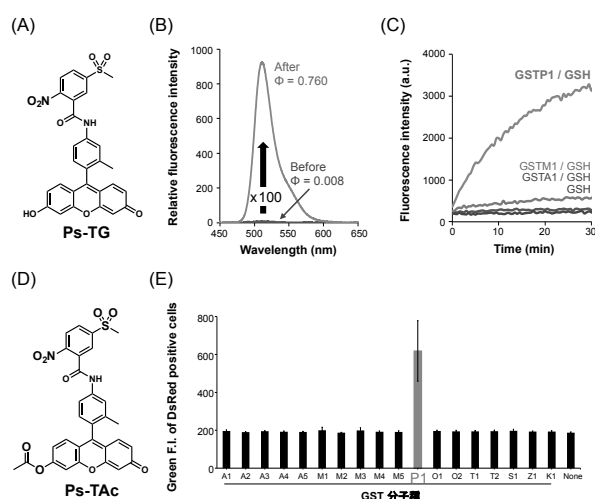


Fig.2 (A)Ps-TG の構造式, (B)Ps-TG の反応前後における蛍光スペクトル, (C)GSH, 各 GST 分子種存在下における Ps-TG の蛍光強度の経時変化, (D)Ps-TAc の構造式, (E)各 GST 分子種を発現させた MCF7 細胞に Ps-TAc を負荷し, DsRed 陽性細胞において検出された緑色蛍光の蛍光強度

### Ps-TAc を用いたライブセルイメージング

Ps-TAc によりがん細胞と正常細胞を識別することができるか検証するために, がん細胞 (HT1080) と予め蛍光色素で染色した正常細胞 (NHDF) を共培養し, Ps-TAc を負荷した. その結果, HT1080 からのみ, 強い緑色蛍光が検出された. すなわち, Ps-TAc を用いてがん細胞と正常細胞を識別できることが示された [Fig. 3(A, B)].

エピジェネティックな制御により GSTP1 発現が抑制されているある種のがん細胞は, エピゲノム薬を処理することで, その制御が解かれて GSTP1 を発現するようになる [Fig. 3(C)]. そのため, エピゲノム薬の効果の指標として GSTP1 発現の有無が有用であることが報告されている. そこで, エピゲノム薬の一つである 5-アザ-2'-デオキシシ

チジン (DAC) で MCF7 細胞を処理し, Ps-TAc を用いて GSTP1 発現 MCF 細胞を検出することができるか検証した. その結果, DAC 処理 2 日目および 4 日目ではほとんど蛍光は検出されなかったが, DAC 処理 6 日間において強い蛍光が検出された [Fig. 3(D)]. すなわち, Ps-TAc を用いて, DAC による効果を細胞レベルで可視化できることが示された.

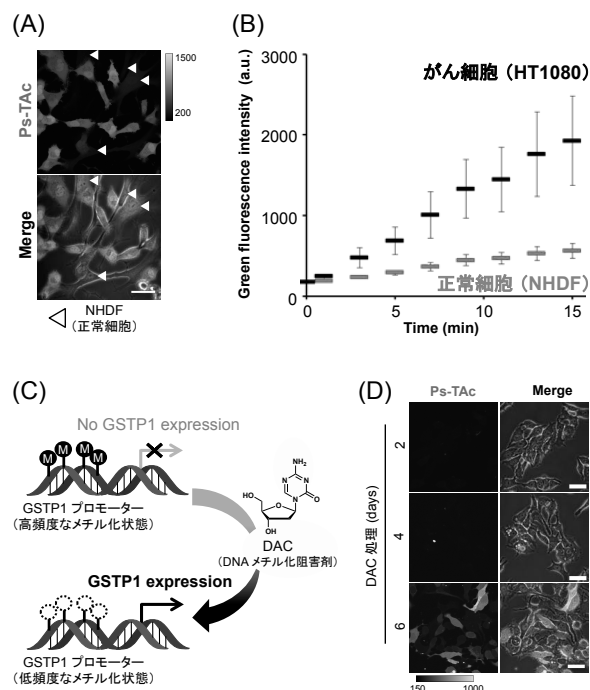


Fig.3 (A)Ps-TAc を用いた HT1080/NHDF 共培養系のイメージング画像, (B)HT1080 および NHDF から検出された蛍光強度の経時変化, (C) DAC により誘導されたエピジェネティックな変化により, GSTP1 発現の抑制が解かれる概略図, (D)Ps-TAc を用いた, DAC 処理した MCF7 細胞のイメージング画像

### <まとめ>

本研究では, GSTP1 選択的にグルタチオン抱合反応を受ける芳香族ニトロ化合物を見出し, その構造を蛍光制御団として組み込んだ蛍光プローブ Ps-TG を開発した. さらに, Ps-TG の細胞膜透過型誘導体である Ps-TAc を用いて, がん細胞と正常細胞を識別できること, DAC による効果を細胞レベルで可視化できること, が示された. これらの結果より, Ps-TAc が細胞内 GSTP1 活性を選択的に検出することのできる有用な蛍光プローブであることが示された.