

## 29【P1】 I -145

ラット肝細胞内リトコール酸修飾蛋白質の捕捉と構造解析

○山本 哲志<sup>1</sup>, 伊藤 裕美<sup>1</sup>, 石渡 俊二<sup>1</sup>, 前田 昌子<sup>2</sup>, 後藤 順一<sup>3,4</sup>, 池川 繁男<sup>1</sup>(<sup>1</sup>近畿大薬,<sup>2</sup>昭和薬,<sup>3</sup>東北大院薬,<sup>4</sup>東北大病院薬)

【目的】先に我々は、各種肝疾患と関連して重要視されるリトコール酸(LCA)-蛋白質共有結合付加体の捕捉と構造解析を目的として、LCA のステロイド核に相補的な抗体を用いる免疫沈降と一次元電気泳動、さらには MALDI-TOFMS によって胆管結締ラット肝細胞内細胞質画分の LCA 修飾蛋白質を解析し、Rab7、Rab12、Rab15、及び M-Ras が LCA 修飾蛋白質である可能性を指摘した。今回さらに、免疫沈降後の蛋白質群を二次元電気泳動(2-DE)によるディファレンシャルディスプレイと MALDI-TOFMS によって精査した。

【実験・結果】まず、胆管結締ラットの肝臓から 30%ホモジネートを調製後、遠心分離により得られた細胞質画分を抗 LCA 抗体固定化ビーズで免疫沈降に付した。得られた蛋白質群は 2-DE で展開・分離し、銀染色後の 2-DE スポットを未処置のラット肝細胞における 2-DE パターンと比較してターゲット蛋白質を特定した。ついで、トリプシンを用いるゲル内消化後のペプチド混合物を MALDI-TOFMS 分析に付し、マスフィンガープリント法で蛋白質データベース(<http://prospector.ucsf.edu>)を検索した。その結果 Rab3、Rab12、Rab16、及び M-Ras に LCA が結合していることが推測された。

【考察】Ras 関連蛋白質は、GDP・GTP 結合能と GTPase 活性を有する G-結合型蛋白質の一種であり、これが LCA によって修飾されると、GTPase 活性が低下して肝細胞の機能が損なわれ種々の肝疾患を惹起するものと推測される。現在さらに、LCA の修飾部位を含めた精密構造を解析するとともに、毒性発現との関連に検討を加えている。