

29【P1】I-146

リコール酸固定化アフィニティー担体を用いる機能性蛋白質の捕捉と構造解析

○伊藤 裕美¹, 松村 可奈子¹, 宮下 貴宏¹, 石渡 俊二¹, 藤井 規代¹, 多賀 淳¹, 本田 進¹, 前田 昌子², 池川 繁男¹(¹近畿大薬,²昭和薬)

【目的】近年、組織・細胞内の蛋白質の構造や機能を解明する“プロテオーム解析”が新世代創薬の主力戦略として多くの期待が寄せられている。そこで、リコール酸 (LCA) が liver receptor homologue-1, small heterodimer partner, farnesoid X receptor などの核内オーファン受容体のみならず、細胞膜表面型受容体のリガンド分子として重要な役割を果たしていることに着目し、LCA のステロイド核に親和性を示す機能性蛋白質の捕捉と構造解析に基礎的検討を加えた。

【実験・結果】まず、LCA の 24 位カルボキシル基にスパーサーとして 1,4-diaminobutane を導入し、活性エステル法にて N-スクシンイミジル修飾アガロースに固定した。引き続き、本アフィニティー担体にラット肝細胞の 30%ホモジネートを通導し、非結合タンパク質を 50 mM リン酸緩衝液で洗浄・除去した後、10%SDS で結合蛋白質を変性溶出させた。ついで、一次元電気泳動後のターゲットスポットをトリプシンでゲル内消化し、得られたペプチド混合物を MALDI-TOFMS によるマスマフィンガープリント法でデータベース (<http://prospector.ucsf.edu/>) 検索した。その結果、今回調製したアフィニティー担体が数十種のタンパク質に親和性を示し、MS によって特定した蛋白質が carbamoyl phosphate synthase 1 (CPS-1, Mr = 164579) であることが判った。因みに、表面プラズモン共鳴法によって求めたリガンド分子の抗 LCA モノクローナル抗体に対する親和定数は $2.35 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であった。

【考察】CPS-1 は、肝細胞内ミトコンドリア画分に局在するカルバモイルリン酸合成酵素であり、尿素回路におけるアンモニア代謝に重要な役割を果たしている。今回の結果は、LCA の 3α -ヒドロキシ- 5β -ステロイド核が LPS-1 に親和性を持つことを示したものと推測されるが、今後さらに検討を加えてゆく予定である。