

29【P1】 I -142

Cleavable affinity gel を用いる低分子-蛋白質相互作用解析法に関する検討

○佐藤 光市¹, 眞野 成康¹, 後藤 順一^{1,2} (¹東北大院薬, ²東北大病院薬)

【目的】低分子生理活性物質と機能性蛋白質との相互作用を解析することは、蛋白質相互作用ネットワークを解明する上で重要である。この目的を達成するには、複雑な生体内マトリックス中から、低分子化合物に直接結合する蛋白質並びにその関連蛋白質群を、緩やかな条件下で変性させることなく特異的に抽出する方法が不可欠となる。そこで今回、モデル低分子化合物として胆汁酸を例に取り上げ、Cleavable affinity gel を調製するとともに、その性能について評価した。

【方法】胆汁酸を p-ニトロフェニルエステルに誘導後、分子内にジスルフィド結合を有するシスタミンと縮合させて胆汁酸のシスタミン抱合体を調製した。次いで、活性化アガロースゲルであるアフィゲル-10 と弱塩基性条件下にて混合し、シスタミンの末端一級アミノ基を利用してアガロースゲルに固定化した。得られた Cleavable affinity gel にジチオスレイトール (DTT) を加えてジスルフィド結合を還元的に切断し、上清中に遊離する胆汁酸の 2-メルカプトエチルアミン抱合体量を HPLC により測定した。

【結果および考察】アガロースゲルに対する胆汁酸シスタミン抱合体の固定化量は、3.34 $\mu\text{mol/mL}$ ゲルであった。0.1 %の DTT を用いて 60 分間反応させたところ、ゲル上のほぼ全てのジスルフィド結合が切断され、対応する胆汁酸の 2-メルカプトエチルアミン抱合体が上清中に回収されることが判明した。現在、デオキシコロール酸シスタミン抱合体を固定化したゲルを調製し、これを用いて腹水中の抗 DCA モノクローナル抗体精製への適用を試みている。