

30-0074 W97-3

光反応性脂質の合成とペルオキシソーム膜タンパク質の光アフィニティーラベル
鈴木 美幸¹, 成田 琴美¹, 柏山 恭範¹, ○友廣 岳則¹, 今中 常雄¹, 畑中 保丸¹
(¹富山医薬大薬)

【目的】ペルオキシソームは長鎖ならびに極長鎖脂肪酸の β 酸化等に関与している。この脂質代謝に関与するATP結合カセット(ABC)タンパク質などのトランスポーターや脂肪酸代謝酵素群の構造と機能を明らかにするとともに、新規タンパク質の同定を目的として光反応性脂質の合成を行った。

【実験】光アフィニティーラベル化反応に汎用されるジアジリン基を長鎖脂肪酸(パルミチン酸、リグノセリン酸)に導入して光反応性脂質を作製した。この脂質プローブをラット肝臓から調製したペルオキシソーム画分とインキュベートした後、光照射(360nm付近)した。反応物をSDS-PAGEにより分離しPVDF膜にブロッティングした後、ラベルされたタンパク質を化学発光法により検出した。

【結果及び考察】光反応性脂質はリガンド(長鎖アルキル)、光反応性基(ジアジリン基)の他に検出及び精製用タグとしてのビオチン部位から成る。まず、Coreyらの不斉合成法を用いてパラ位にトリフルオロジアジリン基を持つフェニルアラニン誘導体を作製した。そのアミノ基に脂肪酸を縮合させ、さらにオルト位に親水性スパーサーを介してビオチンを導入して、目的とする光反応性脂質を作製した。この脂質プローブはBSAとの複合体を作製した後、反応系に加えた。光照射後、ペルオキシソームを遠心により分離した。アビジン-HRPを用いた化学発光検出を行ったところ、上静からはラベルされたBSAのみが検出されたが、ペルオキシソーム画分からは照射時間に依存してラベル化量が増加するいくつかのタンパク質が確認された。