

29P2-am094

遺伝子組換えリジロキシダーゼを用いた活性型への変換調節

○輪千 浩史¹, 島田 朋弥¹, 里 史明¹, 尾之上 聡², 瀬山 義幸¹ (¹星薬科大学, ²(株)コーセー開発研究所)

【目的】コラーゲンやエラスチンの架橋形成に重要な役割を果たすリジロキシダーゼ(LOX)活性の測定法とその活性化機序を明らかにするため、遺伝子組換えLOXを用いて検討した。【方法】ヒトLOX cDNAをRT-PCRにより増幅し、哺乳細胞遺伝子発現ベクターであるpcDNA3.1-V5/Hisベクターに組換え遺伝子を構築した。この組換え遺伝子をHEK293細胞に遺伝子導入して得たLOXについて、細胞内外での前駆体から活性体への変換を検討した。またLOX活性については、組換えトロポエラスチン、I型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖の前駆体および1,5-Pentanediamineの各基質を用いて、反応過程で生成される H_2O_2 とペルオキシダーゼの作用により、Amplex redがResorufinに化学変化し、このResorfinの蛍光強度を指標として非放射性LOX活性を求めた。【結果】HEK293から分泌された組換えLOは分子量約55kDaの前駆体LOXと分子量約30kDaの活性型とて検出された。活性体への変換は、TGF β 1や血清の存在で促進され、この条件下で組換えLOXを含む培養上清の濃縮液と各基質を用いて測定したところ、I型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖の前駆体を基質として用いた場合、高い蛍光値として測定できた。【考察】LOXの活性化条件を明らかにすると共に、I型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖の前駆体を基質として用いた非放射性LOX活性測定法を確立した。本研究結果は、今後のLOXのマトリックス代謝調節機構の解明に役立つと考えられる。