

28KB-pm06

HepG2細胞における3価ヒ素結合性タンパク質の同定

○水村 綾乃^{1,2}, 小林 弥生¹, 渡辺 喬之^{1,2}, 平野 靖史郎¹(¹国立環境研, ²千葉大院薬)

【目的】 昨年の本学会で、3価と5価のヒ素アフィニティー担体に対する肝細胞上清中タンパク質の結合性の違いについて発表した。今回は、3価のヒ素に結合するタンパク質を同定するとともに、肝細胞内環境を模擬したグルタチオン存在下での3価のヒ素に結合するタンパク質を調べたので報告する。

【方法】 phenylarsonic acid ($C_6H_5As^V O(OH)_2$) とグルタチオンを反応させ、反応溶液を LC/MS で経時的に測定し、ヒ素の5価から3価への還元条件を調べた。また、Sephacryl に p-arsanilic acid ($H_2N-C_6H_4-As^V O(OH)_2$) をカップリングさせ、上記反応条件において還元し、3価ヒ素アフィニティー担体を作製した。得られた担体をグルタチオン非存在下または存在下で洗浄後、HepG2 (ヒト肝癌細胞) の可溶性画分と反応させ、結合したタンパク質を SDS sample buffer で抽出した。グルタチオン非存在下で結合したタンパク質に関しては DTT でも抽出を行った。次に、SDS-PAGE で分離後、CBB で染色し、担体に結合しないタンパク質と比較した。

【結果および考察】 LC/MS による解析の結果、phenylarsonic acid にグルタチオンが抱合したものと考えられるシグナルが検出された。また、グルタチオン非存在下において、SDS sample buffer または DTT で抽出したタンパク質にはほとんど差が見られなかったため、DTT 溶出液を二次元電気泳動で解析し、3価のヒ素に結合する2種類のタンパク質を MALDI-MS/MS で同定したところ、protein disulfide isomerase-related protein 5, enhancer protein であることがわかった。さらに、グルタチオン非存在下および存在下の泳動結果の比較から、グルタチオン非存在下における3価のヒ素とグルタチオン抱合した3価のヒ素では、肝上清中において、ヒ素と結合するタンパク質が異なることと示唆された。