

30K-am10

有機小分子蛍光プローブを用いたホルミル化ペプチド代謝酵素の探索と機能評価
○小松 徹¹, 川口 充康¹, 長野 哲雄¹(¹東大院薬)

【背景・目的】 特定の酵素反応における基質となり、光学特性の変化によってその活性を検出する有機小分子蛍光プローブは、その標的酵素のはたらきを活性の可視化という直接的な形で解析することができる有用な研究ツールとして、生化学研究や分子イメージングに用いられている。

申請者は、これらの蛍光プローブの標的となるタンパク質をプロテオーム中で統合的に解析し、これを同定することを可能にする研究手法を開発し、生体内で炎症応答を引き起こすホルミル化ペプチドの代謝に関わる酵素を探索する蛍光プローブを用い、その標的タンパク質の同定と機能の評価をおこなった。

【方法・結果】 プロテオーム中で蛍光プローブの代謝に関わる酵素を同定するための研究手法として、申請者は、非変性条件下の二次元電気泳動によりタンパク質を分画し、これを細分してマルチウェルプレートに分注した後、ウェル内で蛍光アッセイをおこなうことで活性を有するタンパク質を含むウェルを同定する仕組みを考案した。この手法では、酵素反応のターンオーバーによるシグナルの増幅を活かし、高感度かつ高分解能をもって電気泳動ゲル内のタンパク質の活性を検出し、ペプチドマスフィンガープリンティング法によって標的タンパク質の同定をおこなうことが可能である。本手法に基づき、ここでは、原核生物によって産生されるホルミル化ペプチドの構造に基づき、その加水分解を蛍光強度の変化によって検出する蛍光プローブを設計し、合成した。その標的となるタンパク質を、マウス肝臓抽出液中から探索したところ、acylamino acid releasing enzyme (APEH) が標的となっていることが確かめられた。この知見に基づき、開発した蛍光プローブ、阻害剤を用い、生体内での酵素の機能の評価をおこなった。