

Diced Electrophoresis Gel (DEG) アッセイ法を用いた酸化損傷タンパク質代謝酵素の探索

吉岡 健太郎¹, ○小松 徹^{1,4}, 長野 哲雄², 花岡 健二郎¹, 浦野 泰照^{1,3} (¹東大院薬, ²東大創薬オープンイノベーションセンター, ³東大院医, ⁴JST さきがけ)

【背景・目的】 私たちは、生体内の特定の酵素活性を有する有機小分子蛍光プローブを用いて、タンパク質の総体（プロテオーム）中から目的の代謝活性を有する酵素を探索する実験系の開発を進めてきた (*J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6002-6005). これは、非変性の二次元電気泳動によってプロテオームを分画した後、目的の酵素活性を検出する蛍光プローブを用いた酵素アッセイをおこない、ゲル上の活性本体タンパク質の位置を検出し、これに含まれるタンパク質を質量分析法によって解析することで同定をおこなうものである。本研究では、この Diced Electrophoresis Gel (DEG) アッセイ法を用いて、生体内において活性酸素種 (ROS) により酸化修飾を受け、変性・凝集の引き金となる酸化損傷タンパク質の代謝を担う酵素を同定することを目的とした実験をおこなった。

【方法・結果】 タンパク質に生じる異常酸化修飾構造の一種であるピルビン酸アミド構造に対する加水分解活性を有する酵素を探索標的とし、基質となるピルビン酸構造を蛍光物質に結合させ、酵素により加水分解されることにより蛍光を発する 2 種類の有機小分子蛍光プローブを設計・合成した。DEG アッセイ法を用いてマウス肝臓ライセート中の活性タンパク質の探索をおこなった結果、それぞれの蛍光プローブの代謝を異なる酵素が担っていることが示唆されたため、これらに含まれるタンパク質を質量分析法により解析し、活性本体の候補タンパク質のリストを得たのち、遺伝学的手法を用いた絞り込みをおこない、蛍光プローブの代謝活性を有する酵素の同定に成功した。見出された酵素活性は新規のものであり、今後、これらの酵素の機能についてより詳細な理解を進めることによって、酸化損傷タンパク質の代謝経路の解明に繋がることが期待される。