

28PB-am004

部位特異的光架橋基導入ヒトガレクチン-1を用いたガレクチンリガンド探索の試み

○篠山 範幸¹, 小林 優¹, 田村 真由美¹, 武内 智春¹, 荒田 洋一郎¹ (¹城西大薬)

【目的】ガレクチンは β -ガラクトシド構造を認識する動物レクチンの一種で、がん、免疫、分化など多彩な生命現象に関与する。しかし詳細な分子メカニズムが解明されていない場合も多い。理由の一つとして、ガレクチンとそのリガンドの結合力が比較的弱く、一般的な方法ではリガンドの同定が困難なことが挙げられる。このため我々は、人工アミノ酸 *p*-benzoyl-L-phenylalanine (*p*Bpa) を組み込んだタンパク質を細胞に発現させる光クロスリンク法 (N. Hino, *et al. Nature Methods*, 2005) により、ガレクチンとそのリガンドを架橋する手法の確立を目指した。*p*Bpa は UV 照射により近傍の分子と共有結合する光架橋基をもつ。本研究では HeLa 細胞に *p*Bpa 導入ヒトガレクチン-1 (hGal-1) を発現させ、UV 照射をすることで hGal-1 とそのリガンドを架橋し、検出することを試みた。

【方法】本研究では hGal-1 の Lys²⁸ に *p*Bpa を導入するため、Lys²⁸ のコドン(AAG) を終止コドン(TAG)に置換した hGal-1(Am28) DNA を調製した。調製した hGal-1(Am28) DNA を、*p*Bpa を認識するチロシル tRNA 合成酵素とこれにより特異的にアミノアシル化されるアンバーサプレッサー-tRNA を発現する DNA を含むプラスミド(独立行政法人 理化学研究所 構造プロテオミクス研究推進本部より供与された)に挿入した。これを HeLa 細胞にトランスフェクションし、*p*Bpa 導入 hGal-1 タンパク質(hGal-1(*p*Bpa28))の発現を行った。

【結果・考察】上記プラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクション後、hGal-1(*p*Bpa28)の発現が確認された。本方法により、比較的相互作用が弱い hGal-1 リガンドも新たに単離・同定が可能になると考えられる。