

26PB-am002

ラットグランザイム3の基質アミノ酸配列の検索

○平田 幸代¹, 稲垣 弘文¹ (¹日本医大)

【目的】 グランザイム3(Gr3)は細胞障害性Tリンパ球の顆粒中に存在するトリプシン様セリンプロテアーゼで、腫瘍細胞やウイルス感染細胞などの標的細胞の殺傷に関与している。ラット Gr3 の基質特異性や生化学的な性質に関する報告はほとんどなく、前回我々は fluorescence resonance energy transfer substrate (FRETs)ライブラリを用いて、大腸菌で発現したラット Gr3 の基質特異性を明らかにした。このライブラリでは P2、P3 は限定的にしか決定できない。従って今回は、FRETs をベースとした合成基質を用いて、ラット Gr3 の基質特異性 (P2、P3) を詳細に検討した。

【方法】 ラット Gr3 は大腸菌に発現させ、精製した。FRETs ライブラリを用いた結果 (Phe-Tyr-Arg↓ (P3-P2-P1↓)) より、P2 を決定するための基質として、P1 を Arg、P3 を Phe に固定し、P2 に Cys を除く 19 種類のアミノ酸を導入したもの (FRETs-F19R) を作製した。FRETs-F19R の結果より、同様に、P3 の決定には、P1 を Arg、P2 を Phe に固定し、P3 に Cys を除く 19 種類のアミノ酸を導入したもの (FRETs-19FR) を作製した。ラット Gr3 と FRETs-F19R を反応させた後、HPLC で分離し、N 末端側の分解物をヒト Gr3 による分解物と比較した。

【結果】 ラット Gr3 と FRETs-F19R を反応させた場合、分解物のピークの蛍光強度は Phe-Phe-Arg↓ が最も高かった。FRETs-19FR を反応させた場合、分解物のピークの蛍光強度は Phe-Phe-Arg↓ が最も高かった。

【考察】 ラット Gr3 は、P2 および P3 共に Phe が最適であり、最適な基質配列は Phe-Phe-Arg↓ であった。ヒト Gr3 で得られた結果 (Tyr-Phe-Arg↓) と異なるものであった。