

22PO-am222

あらかじめジスルフィド架橋で二量化したチロシンキナーゼ型レセプター・

Torso の大量調製

○中道 祥子¹, 上地 愛理¹, 山端 裕真¹, 石垣 悠里¹, 宮本 和英¹, 齋藤 一樹¹ (¹姫路獨協大薬)

【目的】医薬品開発の標的になっている細胞膜上のチロシンキナーゼ型レセプターは、EGF レセプターのように、リガンド刺激を受けると単量体が二量化してレセプターの活性化(自己リン酸化)を引き起こすことが知られている。しかし、最近になって、そのようなレセプターも、実際にはリガンド刺激を受ける前から「不活性な二量体」を形成し、リガンド刺激によって「活性な二量体」へと遷移しているという学説が提出されている。私たちは、カイコガの前胸線刺激ホルモン PTH のレセプター Torso が、リガンド刺激前から細胞膜貫通領域におけるジスルフィド架橋により二量体を形成していることを明らかにし、その学説のよいモデルになるのではないかと考えた。本研究では、Torso において二量体形成の鍵を握る膜貫通領域の鎖間ジスルフィド構造の決定を目指して、まずはカイコガ Torso の大量調製法の確立を試みた。

【方法】 His6 タグを付加したカイコガ Torso をショウジョウバエ S2 培養細胞に発現させ、8 種類の界面活性剤による可溶化効率を比較した。また、可溶化した Torso が、カラム精製に用いる Ni-NTA 樹脂に吸着するかどうかを確認した。

【結果と考察】 8 種類の界面活性剤のうち、NP-40、コール酸、デオキシコール酸の 3 種類が良好な可溶化効率を示した。また、これらを用いて可溶化した Torso の Ni-NTA 樹脂への吸着を樹脂との共沈殿によって確認した結果、コール酸で可溶化した Torso が最も強い吸着を示した。現在、His6 タグ付き Torso を発現させた S2 培養細胞を大量に冷凍ストックし、Ni-NTA カラムを用いた Torso の大量精製を試みている。今後、プロテアーゼ消化後に膜貫通領域の断片を回収し、質量分析などを用いて Torso の鎖間架橋の構造を明らかにする予定である。