

22R-am07

人工分子 ARF を用いるユビキチン結合酵素活性の検出

○宮本 和英¹, 中谷 有沙¹, 山下 歩美¹, 齋藤 一樹¹ (¹姫路獨協大薬)

[背景] 生体内のユビキチン化は、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)およびユビキチンリガーゼ(E3)の3つの酵素が関与している。ユビキチンがE1からE2に転移し、そしてE3を介して標的タンパク質に付加される。この反応が繰り返されることで複数のユビキチンが標的タンパク質に付加される。付加された複数のユビキチンを目印に、標的タンパク質の分解が行われる。このユビキチン化は、細胞の機能維持に重要な働きをしている他、乳がん、白血病などの疾患に関わることが報告されている。これら疾患に罹患するとE2酵素の発現量に変化する。しかし、血液・組織中のE2活性を測定すれば新たながんの指標となりうることは広く認識されながらも、ユビキチン化が複雑なカスケード反応であるという理由から、これまでE2活性を定量的に計測するのは困難でした。我々は、これまでに人工分子(ARF)を作製し、それを活用するE2活性の検出法を報告してきた[1]。本研究では、細胞中のE2活性を捉える新たな手法を検討した。

[方法・結果] ARFは、Wild-Type E3の活性部位のみを、38残基のペプチドに移植することによって作製できる。本研究では、ARFが有するE2認識部位の各種変異体を設計・合成し、特異的なE2活性検出の検討を行った。さらに、乳がん細胞(MCF7)におけるE2活性を捉えるために、ARFに細胞膜透過配列(TAT)を付加したコンストラクトTAT-ARFを作製した。TAT-ARFはMCF7細胞に添加することで、速やかに細胞内導入されることが明らかになったので、TAT-ARFを活用する細胞内E2活性の検出を実施した。

[1] K. Miyamoto, *Protein Science*, 27, 1354-1363(2018)