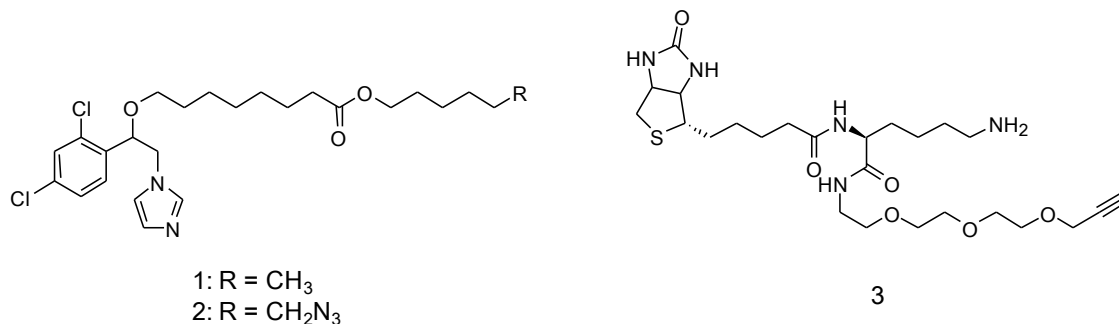


新規な低分子化合物結合タンパク質同定法の開発

バイオマス転換学講座 化学生物学分野
塚原美宙

【背景・目的】低分子生理活性化合物の標的タンパク質の同定には光アフィニティーラベル法が有効であり、これまで多くの研究がなされている。しかし、低分子生理活性化合物を光アフィニティーラベル化しようとする場合、嵩高い光反応活性化基を構造中に導入しなければならず、元来の化合物に比べ標的タンパク質との親和性が減少するといった問題点があった。この問題点を克服するため、本研究では、標的タンパク質と共有結合する光反応活性化基の役割をタンパク質架橋剤に代替させた新たなタンパク質の同定法の開発を試みた。

【方法・結果】植物ホルモンのジャスモン酸合成酵素の一種であるアレンオキシドシンターゼ(AOS)の阻害剤 **1** をもとにアジド基を導入した阻害剤 **2** を合成した。1)ヒメツリガネゴケアレンオキシドシンターゼ(PpAOS1)は、大腸菌に過剰発現させ作成した。阻害剤 **1** および **2** の酵素阻害活性(IC₅₀)、は $9.28 \pm 0.76 \mu\text{M}$ および $2.59 \pm 1.45 \mu\text{M}$ でアジド基を導入した阻害剤 **2** の阻害活性が高かった。この結果から、阻害剤 **2** はタンパク質同定のためのアフィニティープローブとして使用できると判断した。阻害剤 **2** を PpAOS1 とインキュベートさせた後、末端にビオチンおよび中央部にリジン残基を有するリンカー**3** を添加しクリック反応を行い、阻害剤 **2** とリンカー**3** を結合させた。タンパク質架橋剤 bis[sulfosuccinimidyl]suberate (BS³)を用いてリジンのアミノ基と PpAOS1 を架橋し SDS-PAGE に供した後、ウェスタンブロッティング法により PpAOS1 の検出を試みた。その結果、PpAOS1 に由来するバンドが確認された。以上の結果から、本方法によりアジド基を有する化合物をプローブとし、タンパク質架橋剤を用いた標的タンパク質の同定が可能であることが示された。



1) Oh K, Murofushi N, Bioorg Med Chem., 10, 3707-3711 (2002).