

クリックケミストリーを用いた新たなタンパク質同定法の開発

共生基盤学専攻 バイオマス転換学講座 化学生物学 福田 洋介

【背景と目的】

低分子生理活性化合物の標的タンパク質同定には、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同定法の開発を行った。本手法では、アジド基を導入した生理活性化合物（アジドプローブ）を、末端にアルキンと検出基（ビオチン）を持ったリンカーとクリックケミストリーにより結合させることで、標的タンパク質の検出を試みた。

【方法と結果】

本研究では、植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) の活性本体、ジャスモン酸イソロイシン (JA-Ile) の受容体である COI1 を標的タンパク質として用いることとした。アフィニティープローブとして、JA-Ile と構造が類似している jasmonoyl-6-azido-L-norleucine を合成した。この化合物がプローブとして有用であることを確認するために、シロイヌナズナにおいて根の伸長阻害活性試験に供した。その結果、jasmonoyl-6-azido-L-norleucine は JA-Ile とほぼ同程度の活性が確認され、プローブとして利用可能であると判断された。Jasmonoyl-6-azido-L-norleucine をシロイヌナズナのタンパク質粗抽出液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を添加しクリック反応を行い、jasmonoyl-6-azido-L-norleucine とリンカーを結合させた。その後、デキストラン被膜活性炭を用いて反応系内に存在する遊離のリンカーを取り除き、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標的タンパク質を架橋した。そして、ウェスタンブロットング法により COI1 の検出を試みた。その結果、COI1 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、夾雑タンパク質の中から標的タンパク質の同定が可能であることが示された。

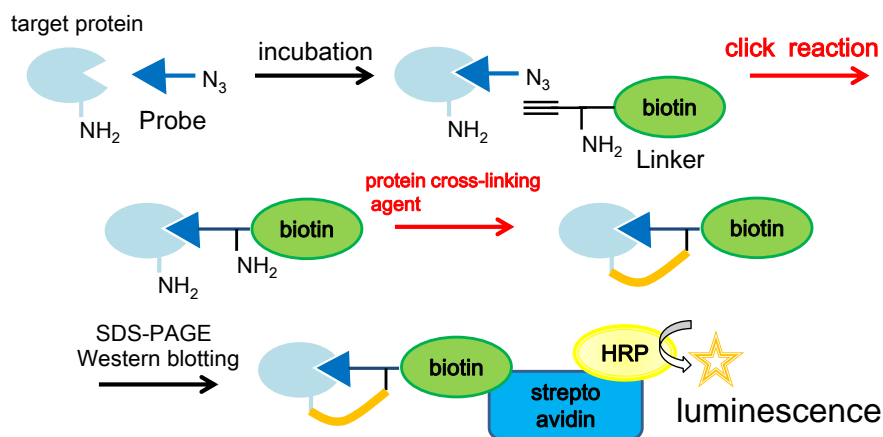


図1. 本研究におけるタンパク質同定法の概略.