

低分子生理活性化合物の新規な標的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 穴吹 友亮

1. はじめに

生理活性化合物の標的タンパク質の同定に用いられている有用な手法として光アフィニティーラベル化法が挙げられる。この手法は生理活性化合物と標的タンパク質の物理的な相互作用を検出する手法であるが、生理活性化合物への光反応基の導入により標的タンパク質との相互作用が損なわれる場合がある。この問題を克服するため、当研究室の塚原らは、従来の手法における光反応基の役割をアミノ基と特異的に反応するタンパク質架橋剤に代替させた新規な標的タンパク質同定法を開発した。アレンオキシドシンターゼ (AOS) と AOS 阻害剤の既知の相互作用を対象としたモデル実験により、本手法の有効性は確認されている。本研究では、アブシジン酸 (ABA) とその受容体 PYL2 の相互作用を対象としたモデル実験を行い、本手法の汎用性の高さを確認することを目的とした。また、本手法の検出感度を評価するため、従来の標的タンパク質同定法と同様に光反応基を用いる手法を開発し、クロスリンクの方法が異なる2つの手法について検出感度の比較を行った。

2. 方法および結果

1) ABA-PYL2 相互作用の検出 ABA (1) にアジド基を導入した化合物であるアジドプローブ (2), さらにビオチン、アルキンおよびアミノ基を有するリンカー (3) を合成した。次に、組換え AtPYL2 を過剰発現させた大腸菌由来の粗タンパク質抽出液とアジドプローブを相互作用させた。その後、リンカーを添加し、CuI 存在下でクリック反応により結合させた。最後に、タンパク質架橋剤 Bis(sulfosuccinimidyl)suberate, disodium salt (BS3) を添加し、ウェスタンブロッティングによりタンパク質の検出を試みた。その結果、AtPYL2 に由来するバンドが特異的に検出されたため、タンパク質架橋剤を用いる新規な標的タンパク質同定法の汎用性の高さが示された。

2) クロスリンクの方法が異なる2つの標的タンパク質同定法の検出感度の比較 ビオチン、アルキンおよびベンゾフェノン有するリンカー (4) を合成した。クロスリンクの方法が異なる2つの標的タンパク質同定法の検出感度を比較するため、AtPYL2 と反応させるアジドプローブおよびリンカーの濃度を同一にし、ウェスタンブロッティングによる検出を行った。AtPYL2 に由来するバンドのシグナル強度を比較したところ、タンパク質架橋剤を用いる手法を用いた場合の方がシグナル強度は有意に大きかったため、タンパク質架橋剤を用いる新手法が高感度であることが示された。

3. まとめ

タンパク質架橋剤を用いる新規な標的タンパク質同定法の汎用性および検出感度の高さが示された。従って、未知の標的タンパク質検出に本手法が適用されることが大いに期待される。

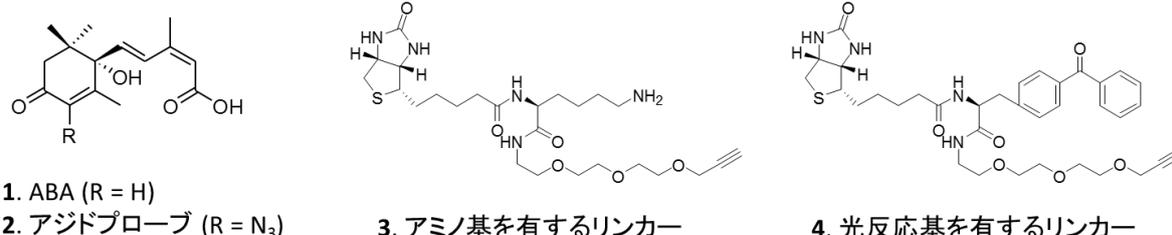


図1. アジドプローブおよび各リンカーの構造.