

29P1-am079

タンパク質変性・凝集過程のFRET蛍光モニタリング

○吉武 誠^{1,2}, 高田 誠¹, 加藤 綾¹, 轟木 堅一郎¹, 吉田 秀幸¹, 能田 均¹,
山口 政俊¹(¹福岡大薬, ²祐徳薬品工業)

【目的】現在我々は、タンパク質の変性・凝集過程をより鮮明に、かつリアルタイムでモニタリングする方法論の開発に取り組んでいる。本方法論では、タンパク質中の Trp 残基と溶液中に共存させた蛍光プローブとの間に生じる蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象を観測することで、Trp 残基の周辺環境の微小な変化を蛍光スペクトル変化として増幅してモニターする。今回、Bovine Serum Albumin (BSA), Ovalbumin (OVA), Lysozyme をモデルとして、凝集による FRET 蛍光変化をモニタリングし、本法の原理確認を行った。

【実験】タンパク質及び凝集タンパク質溶液は各種緩衝液で調製した。タンパク質の凝集は加熱凝集法により行い、その凝集は HPLC 分析及び Thioflavin T assay により確認した。蛍光プローブには市販の Dansyl acid (DNS-acid), DNS-amino acids, 8,1-Anilino-naphthalene sulfonic acid (8,1-ANS) を使用した。タンパク質及び凝集タンパク質溶液 (15 μM) に蛍光プローブ溶液 (0, 20-200 μM) を添加したときの励起波長 260 nm における蛍光スペクトル変化を観測した。

【結果と考察】BSA 溶液は、加熱凝集により自然蛍光強度が僅かに減少した。この溶液に親水性基蛍光プローブである DNS-acid を添加すると、凝集による FRET 蛍光強度の減少度は自然蛍光測定時の 6 倍にまで増幅された。一方、OVA や Lysozyme の凝集体では、DNS-Phe や 8,1-ANS などの疎水性基蛍光プローブを添加することで凝集による FRET 蛍光の増大が認められた。Lysozyme の凝集体では Thioflavin T assay による蛍光強度増加が認められなかった。以上の結果から、3 種のタンパク質は、凝集時の構造及び FRET 発現メカニズムに違いがあることが分かった。講演ではこの違いについても考察を行う。