

イミノ二酢酸を用いた His tag 検出蛍光プローブ開発に向けた基礎的検討
○平林 和久^{1,2}, 花岡 健二郎^{1,2}, 長野 哲雄^{1,2} (1東大院薬, 2JST CREST)

【目的】タンパク質の蛍光標識技術は生細胞内でのタンパク質の局在や挙動の可視化を可能とし、それら機能の解明において強力なツールとなっている。標的タンパク質の機能への影響が少ないと考えられるタンパク質の蛍光標識法として、短いペプチドタグと蛍光性小分子の相互作用を利用した標識法が開発されてきた。そのような標識法の一つに連続するヒスチジン配列からなる His tag を用いた手法があるが、His tag との結合の前後で蛍光強度の変化がないために未反応のプローブの洗浄が必要なものがほとんどであり、わずかに報告されている off/on 型のプローブも十分に満足いくものではない。そこで、His tag との結合時にのみ蛍光を発する His tag 検出蛍光プローブを開発することを本研究の目的とした。

【方法】His tag は金属イオンを介して IDA(イミノ二酢酸)と結合することが知られている。また、Fluorescein 類縁体で2つの IDA 構造を持つ Calcein は Ni^{2+} や Co^{2+} の添加によってほぼ無蛍光性となるという報告がある。そこで我々は分子内に2つの IDA 構造を持つフルオレセインまたはローダミン類を母核とした3種類の化合物を合成し、off/on 型 His tag 検出蛍光プローブとしての利用の可能性を検討することとした。

【結果および考察】合成した3種類の化合物に Ni^{2+} 、 Co^{2+} を添加したところいずれもほぼ無蛍光性となった。これは金属イオンの重原子効果による消光のためと考えられる。次いでこれらの錯体に対して His tag ペプチドを添加したところ、大幅な蛍光増大を示す組み合わせが見つかり、His tag ペプチドが結合したビーズを洗浄なしで観察することに成功した。今後は詳細な蛍光変化機構等について検討を行っていく予定である。