

# 30D-am09

タンパク質の特異的蛍光ラベル化を目指した新規蛍光プローブの開発

○平林 和久<sup>1,2</sup>, 花岡 健二郎<sup>1,2</sup>, 下西 学<sup>3</sup>, 長野 哲雄<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>東大院薬, <sup>2</sup>JST CREST, <sup>3</sup>東大院薬 GCOE)

【目的】タンパク質を特異的に蛍光標識しその局在や挙動を可視化する技術は、タンパク質の機能解明において非常に重要である。標的タンパク質の機能への影響が少ない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技術が開発されてきた。しかしながら、ペプチドタグとの結合の前後で蛍光強度の変化を示すものはほとんど報告されておらず、わずかに報告されている off/on 型のプローブ (FIAsh など) もいまだ改良の余地がある。そこで、本研究では特定のペプチドタグを認識して大きな蛍光上昇を示す蛍光プローブの開発と、タンパク質の特異的蛍光ラベル化への応用を目的とする。

【方法】ペプチドタグと蛍光性小分子との相互作用に、連続する His 配列からなる His tag と、Ni<sup>2+</sup>-NTA (ニトリロ三酢酸) 錯体との選択的な相互作用を用いた。また、蛍光の off/on スイッチ機構として光誘起電子移動 (PeT) を利用した。具体的には Cys との反応性があり、反応後に PeT が解除されることが期待される分子構造を反応部位に用いた。

【結果】実際に Fluorescein を母核として設計・合成した新たな蛍光プローブはほぼ無蛍光性であり、His tag と Cys を持つペプチド Ac-CysHis<sub>6</sub>Tyr-NH<sub>2</sub> の添加によって、大きな蛍光上昇を示した。また、コントロールペプチドである Ac-CysGly<sub>6</sub>Tyr-NH<sub>2</sub> 添加時との比較から、His tag を介した結合によって Cys との反応が促進されることが明らかとなった。さらに、組み換えタンパク質を用いた実験においても、開発した蛍光プローブが N 末端にタグ配列 His<sub>6</sub>Cys を結合して発現させたタンパク質を認識して大きな蛍光上昇を示すことが確かめられた。今後は細胞膜表面に発現させたタンパク質の蛍光ラベル化へと応用する予定である。