

30P2-pm063

ジメチルアミノクマリン誘導体をリガンドとした新規発蛍光型 PYP タグプローブの開発と無洗浄生細胞イメージング

○堀 雄一郎¹, 則信 智哉¹, 菊地 和也^{1,2} (¹阪大院工, ²阪大免疫学フロンティア研セ)

【目的】蛍光プローブによる蛋白質の標識は、化学をベースにした新しい蛍光イメージング技術であり、蛋白質の局在や機能の詳細な時空間解析を可能にすると期待されている。これまでに、蛋白質特異的標識法として、タグとなる蛋白質（タグ蛋白質）とその特異的蛍光プローブを利用した方法が開発されてきた。一方、既存のタグ蛋白質は、サイズが大きいことや標識・未標識プローブの蛍光の区別がつかないことなどが問題として指摘されてきた。このため、演者らは、これらの問題を解決すべく Photoactive Yellow Protein (PYP) と呼ばれる新しいタグ蛋白質を利用した蛋白質標識法の開発を行ってきた。PYP タグは、桂皮酸/クマリン誘導体をリガンドとして特異的に結合する 125 アミノ酸からなる小蛋白質である。以前の研究で、PYP タグを特異的に標識するプローブの開発に成功していたが、その反応完了には 24 時間以上を要することが問題となっていた。そこで、本研究では、反応速度を向上させた発蛍光型プローブを設計し、遊離プローブを洗浄除去することなく生細胞で標識蛋白質を選択的にイメージングする手法の開発を行った。

【方法・結果】リガンドをジメチルアミノクマリンのチオエステル誘導体とした新規プローブの設計・合成を行った。プローブ単独では非蛍光性であるが、PYP と反応させたところ、蛍光強度の上昇が確認された。速度論解析を行ったところ、以前のプローブに比べ大幅な反応速度の向上が示された。また、生細胞イメージングを洗浄により遊離のプローブを除かずに行ったところ、PYP 発現細胞のみから蛍光が観測された。以上の結果より、本手法は、迅速な蛋白質イメージング法であることが示され、蛋白質の局在・動態解析ツールとしての応用が期待される。