

26R-am08S

細胞内 Na^+ のレシオイメージングを目指したタンパク質ラベル化型蛍光プローブの開発

○田口 良¹, 寺井 琢也^{1,2}, 浦野 泰照^{1,2,3,4} (¹東大院薬, ²JST CREST, ³東大院医, ⁴JST 研究加速課題)

【目的】 Na^+ は細胞内で低濃度、細胞外で高濃度というイオン勾配を保つことで細胞の形態維持や浸透圧調整、筋肉の収縮等の多様な生命現象を担う分子種である。また Na^+ チャネルは強心剤の標的タンパク質であり、腎臓では高血圧とも結びつきが深いとされる。現在、 Na^+ 濃度変化を検出する方法としてパッチクランプ法等があるが、煩雑性や侵襲性を有する等の問題により、多くの細胞での同時検出は難しい。そこで蛍光プローブを用いた方法が期待されるが、既存の Na^+ 蛍光プローブは定量性や細胞内滞留性が悪い、蛍光量子収率が低い等の問題を抱えている。そこで我々は、細胞内タンパク質にプローブをラベルすることで滞留性を担保するとともに、ratio 測定も可能にする新たな Na^+ 蛍光プローブの開発を目指した。

【方法・結果】fluorescein を母核とし、光誘起電子移動 (PeT) による制御を利用した Na^+ 応答蛍光プローブを設計・合成した。ラベル化方法としては HaloTag technology を利用すべく、プローブには HaloTag ligand 構造を導入した。まず合成したプローブを、大腸菌を用いて発現、精製した HaloTag タンパク質にラベル化し、光学特性を検討した。その結果 200 mM の K^+ 存在下においても Na^+ の濃度変化に応じて蛍光強度が約 3 倍に増大し、高濃度の Na^+ 存在下では約 0.4 と高い蛍光量子収率で蛍光を発することが明らかとなった。現在、mCherry を融合させた HaloTag タンパク質を細胞質に発現させた細胞に対してプローブを添加することで、細胞中での Na^+ の ratio イメージングを試みており、これまでにプローブの導入や洗浄の条件検討を終えている。今後は刺激に応じた濃度変化の定量を試みると共に、必要に応じて S/N 比の増大を目指したプローブの構造展開を行っていく予定である。