

26R-am05S

オクタアルギニン-ユビキチンコンジュゲートを利用した R8 の細胞内在化量の定量

○川口 祥正¹, Cherine BECHARA², Hao-Hsin YU¹, 中瀬 生彦¹, 今西 未来¹, 武内 敏秀¹, Fabienne BURLINA², Sandrine SAGAN², 二木 史朗¹ (¹京大化研, ²パリ第 6 大)

細胞膜透過性ペプチド (CPP) の一種であるオクタアルギニン (R8) は、その細胞内移行性から小分子、タンパク質や核酸のような機能性分子と結合させることで、それらの分子を効率的に細胞内に送達することに利用されている。これらの分子が所望の機能を発揮するには細胞質への移行が必要であるが、細胞質に移行した CPP を特異的に定量した報告はない。一方、Burlina らは、細胞に取り込まれた CPP を MALDI-TOF MS により直接定量する方法を開発している[1]。この方法は、(i) ビオチン化されたテトラグリシン配列を有する CPP を細胞内に導入し、ストレプトアビジンビーズを用いて細胞溶解液中の CPP を回収する。(ii) この際、グリシンの代わりに重水素化グリシンを用いた濃度既知のペプチド(D-CPP)を内部標準として溶解液に添加する。(iii) CPP と D-CPP のシグナル強度を MALDI-TOF MS で比較し、細胞内に取り込まれた未分解の CPP を定量するものである。

今回、我々は、ユビキチンの C 末端に導入した R8 が、細胞質に存在する脱ユビキチン化酵素で選択的に切断されることを利用し、上記の質量分析により細胞質に移行した R8-ユビキチン融合タンパク質の濃度を定量する方法を考案した。リシン側鎖をビオチン化したテトラグリシン含有 R8 ペプチド CK(bio)G4R8-amide とユビキチンとの融合タンパク質 Ub-CK(bio)G4R8-amide をネイティブケミカルライゲーション法により調製した。融合タンパク質を細胞培養液に添加後、遊離する CK(bio)G4R8-amide を指標に、細胞質に移行した融合タンパク質の定量を行った。

本発表では、このアプローチを用いた R8 の細胞内在化量の定量と細胞内移行性の評価に関して報告する。

[1] Burlina et al., *Nat. Protoc.* **1**, 200-205 (2006)