

5. 新規蛍光イメージングツールの創出:クロスリンク型 ZIP タグ-プローブペアの開発

Development of Crosslink-Type ZIP Tag-Probe Pairs as Novel Fluorescent Imaging Tools

野村 渉<sup>1)</sup>、○大橋南美<sup>1)</sup>、蓑 友明<sup>1,2)</sup>、森あつみ<sup>1)</sup>、鳴海哲夫<sup>1)</sup>、増田朱美<sup>1,2)</sup>、堤 浩<sup>1)</sup>、  
玉村啓和<sup>1,2)</sup>

Wataru Nomura<sup>1)</sup>, Nami Ohashi<sup>1)</sup>, Tomoaki Mino<sup>1,2)</sup>, Atsumi Mori<sup>1)</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1)</sup>, Akemi Masuda<sup>1,2)</sup>,  
Hiroshi Tsutsumi<sup>1)</sup>, Hirokazu Tamamura<sup>1,2)</sup>,

<sup>1)</sup>東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、<sup>2)</sup> 東京医科歯科大学 疾患生命科学研究所

<sup>1)</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,

<sup>2)</sup> Graduate School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University

日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.

細胞内におけるタンパク質の機能(発現状態や細胞内局在など)を調べるためには、タンパク質の挙動を経時的に追跡する必要がある。本研究室では、3本鎖ロイシンジッパー構造を基に設計したZIPタグ-プローブペアの開発に取り組んでいる。これまでにタグとプローブの特異的会合に伴って蛍光波長・強度が大きく変化するプローブ分子を開発し、これを用いて生細胞でのタンパク質イメージングに成功している。タグとプローブの会合は非共有結合によるものであるが、分子間に共有結合を形成させて安定化することで、生細胞中のタンパク質に対してパルスチェイス実験などの時間分解解析が行えると考えられる。本研究では共有結合によりタグとプローブを結合させるクロスリンク型 ZIP タグ-プローブペアの開発に取り組んだ。

まず、タグ-プローブ間でクロスリンク反応を行うために、システイン残基をもつタグペプチドと N 末端にクロロアセチル基をもつペプチドをそれぞれ Fmoc 固相合成法により合成した (Figure 1)。クロスリンク反応は反応点の距離が反応速度に影響すると考えられるため、クロロアセチル基との間にグリシン(Gly)0-2 個からなるリンカーを持つプローブを合成した。これらを用いてクロスリンク反応による共有結合の形成を確認し、それらの反応速度について検討した。またクロスリンク型タグ-プローブペアについて CD スペクトル測定および蛍光滴定実験により安定性を試験した。その結果、Gly1 個からなるリンカーをもつプローブが最も迅速な結合形成を示した。また、非共有結合型タグ-プローブペアと比較して、TM 値、蛍光応答能、および解離定数においてクロスリンク型タグ-プローブペアの安定性の向上が確認できた。以上のことから、タグ-プローブ間の会合に共有結合を導入することで安定性が向上したクロスリンク型 ZIP タグ-プローブペアを構築可能であり、細胞内での安定性についても今後検討する予定である。

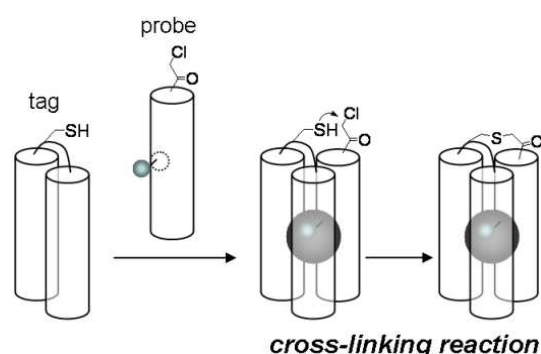


Figure 1. Crosslink-type tag-probe pair system.