

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		非可逆的タンパク質標識を達成する機能性蛍光色素の創製			
研究テーマ (欧文) AZ		Development of Functional Fluorescent Dye for Irreversible Labeling of Proteins			
研究氏 代表 表名 者	カカナ CC	姓)ソウ	名)ノブアキ	研究期間 B	2008 ~ 2010 年
	漢字 CB	宗	伸明	報告年度 YR	2010 年
	ローマ字 CZ	Soh	Nobuaki	研究機関名	九州大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		宗 伸明 九州大学工学研究院・助教			
概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)					
<p>本研究においては、His-tag タンパク質を非可逆的に標識するための蛍光試薬の開発を目的とした。この蛍光試薬は、His-tag 認識のための NTA-Ni 錯体部位、光結合のための光感受性部位、及び蛍光シグナルを発生する蛍光基部位の 3 つの機能性部位により構成される。そこでまず、保護基を有する NTA アミノ酸誘導体を合成した。次に、この NTA アミノ酸誘導体と、蛍光基であるアクリドンを連結したアミノ酸誘導体を固相ペプチド合成用樹脂上でカップリングし、最後に、合成ペプチドの N 末端アミノ基を利用することで、光感受性部位であるジアリジンを連結させた。脱保護、脱樹脂操作の後に精製を行い、これをニッケル(II)と錯形成させることで、目的とした蛍光試薬を得た。</p> <p>まず、得られた蛍光試薬の光結合能について検討した。モデルタンパク質として選択した His-tag ユビキチンと蛍光試薬を混合し、紫外線照射後、過剰の EDTA を添加し、タンパク質ゲル電気泳動分析を行った。その結果、紫外線照射を行った時のみ、蛍光性のユビキチンのバンドが観測され、タンパク質-蛍光試薬間の強固な結合が確認できた。一方、光結合反応の最適時間に関する検討も行った。蛍光試薬を His-tag ユビキチンと混合後、照射時間を変えて紫外線を照射し、過剰の EDTA を添加した後、限外濾過を行った。蛍光プローブと His-tag ユビキチンの結合体が存在する高分子量成分を分取後、希釈して蛍光測定を行い、光結合反応の効率を評価した。その結果、本実験条件における最適な光照射時間が 20 分間であることが確認できた。なお、質量分析測定の結果、His-tag を有するユビキチンと有さないユビキチンに本蛍光試薬を適用した場合、前者のみで蛍光試薬の結合に起因する質量増加が観測された。これらの結果より、本蛍光試薬は His-tag タンパク質の非可逆的な標識に有用であると考えられる。</p>					
キーワード FA	タンパク質	蛍光	光結合		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA									
研究機関番号 AC					シート番号									

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	非可逆的な蛍光標識を達成する光結合型タンパク質プローブの開発							
	著者名 ^{GA}	宗伸明、今任稔彦ら	雑誌名 ^{GC}	第47回化学関連支部合同九州大会					
	ページ ^{GF}	244	発行年 ^{GE}	2	0	1	0	巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}	非可逆的な蛍光標識を達成する光結合型タンパク質プローブの開発							
	著者名 ^{GA}	宗伸明、今任稔彦ら	雑誌名 ^{GC}	第28回九州分析化学若手の会夏季セミナー講演予稿集					
	ページ ^{GF}	P40	発行年 ^{GE}	2	0	1	0	巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

In this study, we tried to develop a novel fluorescent reagent for labeling His-tagged proteins irreversibly. The fluorescent reagent is composed of a NTA-Ni moiety for recognizing His-tag, a photosensitive moiety for photobinding, and a fluorophore moiety for producing fluorescent signal. We synthesized a NTA-amino acid derivative bearing protecting groups, then, coupled the NTA derivative with an amino acid derivative having a fluorescent acridone on resin for solid phase peptide synthesis. Next, a photosensitive diazirine derivative was combined through the N-terminal site, and the fluorescent reagent was successfully obtained after the complexation with Ni (II).

When the fluorescent reagent was mixed with His-tagged ubiquitin, irradiated by UV light, and added to excess EDTA, a fluorescent band for ubiquitin was observed in SDS-PAGE. It was found that optimal irradiation time for binding between them under the condition was 20 minutes based on fluorescent measurements utilizing ultrafiltration. In addition, mass spectrometer study showed the increment of molecular weight of His-tagged ubiquitin after the irradiation of UV light in the presence of the fluorescent reagent. These results indicate that the fluorescent reagent we proposed is expected to be useful for irreversible labeling of His-tagged protein.

