

東大院薬<sup>1</sup>、東大院薬 GCOE<sup>2</sup> ○平林 和久<sup>1</sup>、花岡 健二郎<sup>1</sup>、下西 学<sup>2</sup>、長野 哲雄<sup>1</sup>

## 【背景と目的】

タンパク質の選択的蛍光ラベル化技術は、標的タンパク質の細胞内での局在や挙動を直接可視化することを可能とし、それら機能の解明に大きく寄与することができる。一方、タンパク質の機能への影響が小さいとされるタンパク質の選択的蛍光ラベル化法として、アミノ酸 10 残基程度の長さのペプチド鎖と蛍光性小分子の選択的な相互作用を利用した手法が近年、注目されている。しかしながら、タンパク質のラベル化の前後で蛍光特性が変化する蛍光プローブの報告は殆どなく、わずかにある報告も、バックグラウンド蛍光が大きい、蛍光特性の変化が十分でない、紫外光励起が必要であるといった問題点があり、依然として改良の余地がある。そこで今回我々は、特定のペプチド鎖を選択的に認識して結合し、大きな蛍光上昇を示す可視光励起可能な蛍光プローブの開発を目的とした。

## 【方法と結果】

## 1. 蛍光プローブのデザイン

可視光励起可能な 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) を蛍光団として、ペプチド鎖との選択的な結合には His<sub>6</sub> 配列(His tag)と NTA (nitrilotriacetic acid)-Ni<sup>2+</sup> 錯体の選択的な相互作用を利用することとした。また、蛍光団からの光誘起電子移動 (d-PeT)により蛍光の消光が可能であり、Cys 残基の thiol 基との反応により脱離反応を生じる 2,4-dinitrophenyl ether 構造を用いることで、ペプチド鎖との結合に伴う蛍光上昇を期待した。また、この 2,4-dinitrophenyl ether 構造と thiol との反応は、His tag と NTA-Ni<sup>2+</sup> 錯体の結合に伴う近接効果によって加速することを期待した。以上より我々は蛍光プローブ NTA-DCFDNB-Ni<sup>2+</sup> のデザイン・合成を行った (Figure 1)。

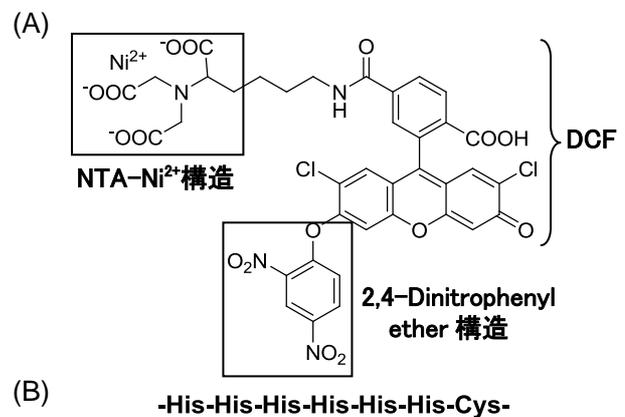


Figure 1. (A) The chemical structure of NTA-DCFDNB-Ni<sup>2+</sup> complex. (B) The amino acid sequence of designed peptide tag.

## 2. 2,4-Dinitrophenyl ether 構造と thiol との反応性

始めに、NTA 構造を持たず、thiol との反応部位が異なる 3 種類の化合物 **1-3** を合成した。これら化合物の水溶液に還元型 glutathione (GSH) (10 mM) を添加したところ、化合物 **1** のみが反応して強蛍光性の化合物 **4** になることが分かった (Figure 2)。

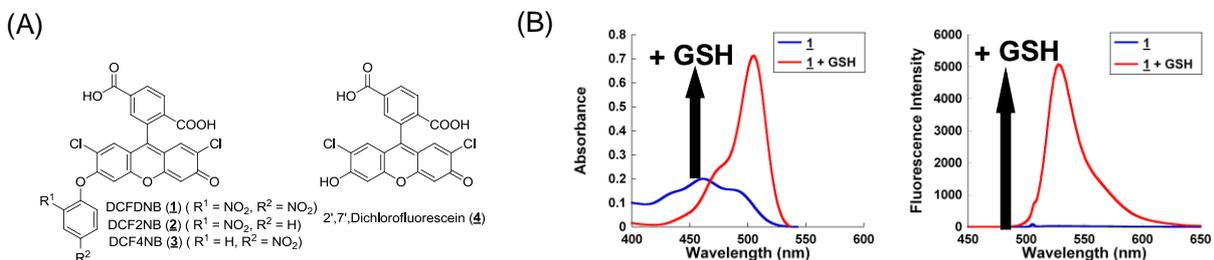
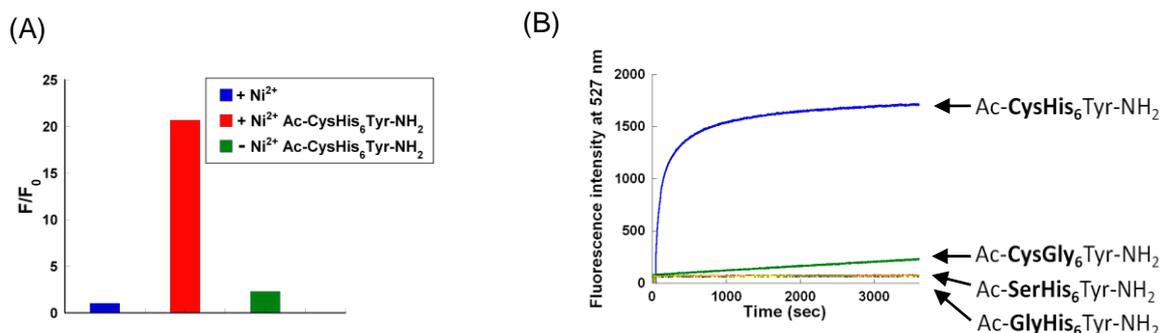


Figure 2. (A) The chemical structures of **1-4**. (B) Absorption and emission spectra of **1** (10 μM) before and after 6 hr of addition of reduced glutathione (10 mM) in 0.1 M HEPES buffer (pH 7.4) containing 0.1% DMSO as a cosolvent ( $\lambda_{\text{ex}} = 505 \text{ nm}$ ).

次に、NTA-DCFDNB に Ni<sup>2+</sup> 存在下および非存在下においてペプチド鎖 Ac-CysHis<sub>6</sub>Tyr-NH<sub>2</sub> の添加を行った。その結果、Ni<sup>2+</sup> 存在下においてのみ速い蛍光上昇を示し、約 20 倍の大きな蛍光上昇を示した (Figure 3A)。さらに Ni<sup>2+</sup> 存在下、様々なペプチド鎖を添加した結果、His tag と Cys を共に持つペプチド鎖に選択的に応答し、

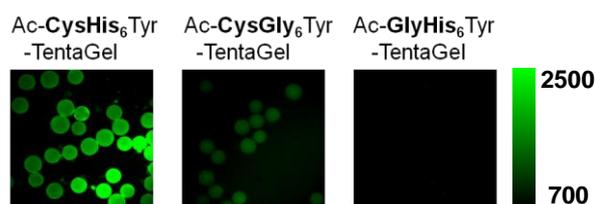
速い大きな蛍光上昇を示した (Figure 3B)。



**Figure 3.** (A) Activations of fluorescence intensity of NTA-DCFDNB (10 μM) at 20 min after addition of Ac-CysHis<sub>6</sub>Tyr-NH<sub>2</sub> (10 μM) (λ<sub>ex</sub> = 507 nm). (B) The change of fluorescence intensity of NTA-DCFDNB (10 μM) with Ni<sup>2+</sup> (10 μM) after addition of peptide Ac-CysHis<sub>6</sub>Tyr-NH<sub>2</sub>, Ac-CysGly<sub>6</sub>Tyr-NH<sub>2</sub>, Ac-SerHis<sub>6</sub>Tyr-NH<sub>2</sub> or Ac-GlyHis<sub>6</sub>Tyr-NH<sub>2</sub> (10 μM).

### 3. マイクロビーズを用いた蛍光イメージング

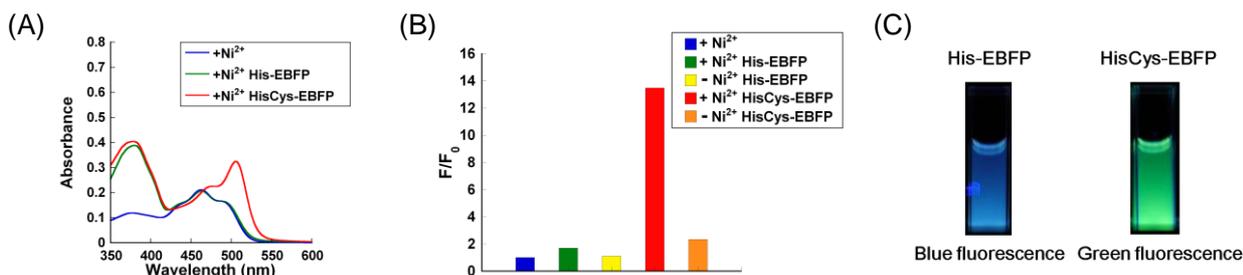
NTA-DCFDNB-Ni<sup>2+</sup>を用いて、ペプチド鎖を結合させたマイクロビーズ (TentaGel) のイメージングを行った。その結果、余剰なプローブの洗浄操作を行うことなく、His tag と Cys 残基を共に持つペプチド鎖が結合したマイクロビーズ選択的にビーズ表面の蛍光上昇を観察することに成功した。



**Figure 4.** Fluorescence microscopic images of Tenta-Gel with peptides incubated with NTA-DCFDNB-Ni<sup>2+</sup> complex. Images were captured at 30 min after probe was added.

### 4. ペプチドタグ融合タンパク質の検出

EBFP (enhanced blue fluorescent protein) の N 末端に His<sub>6</sub>Cys 配列または His<sub>6</sub> 配列を融合させた HisCys-EBFP、His-EBFP の 2 種類のタンパク質を発現・精製し、NTA-DCFDNB 溶液への添加を行った。Ni<sup>2+</sup>存在下、HisCys-EBFP 添加時には 2,4-dinitrophenyl 基が脱離し 507 nm の吸収が上昇し、約 13 倍の蛍光増大を示した (Figure 5A,B)。またこれら水溶液を 365 nm で励起すると、His-EBFP 添加時には青色蛍光が、HisCys-EBFP 添加時には緑色蛍光が肉眼で判別可能であった (Figure 5C)。



**Figure 5.** (A) Absorption spectra of NTA-DCFDNB (10 μM) with Ni<sup>2+</sup> (10 μM) at 60 min after addition of His-EBFP or HisCys-EBFP (10 μM) in 0.1 M HEPES buffer (pH 7.4) containing 0.1% DMSO as a cosolvent at 25 °C (λ<sub>ex</sub> = 507 nm). (B) Activations of fluorescence intensity at 60 min after addition of His-EBFP or HisCys-EBFP (10 μM) (λ<sub>ex</sub> = 507 nm). (C) The photograph shows fluorescence of NTA-DCFDNB (10 μM) with Ni<sup>2+</sup> (10 μM) at 60 min after addition of His-EBFP or HisCys-EBFP (10 μM) (λ<sub>ex</sub> = 365 nm).

### 【総括と今後の展望】

本研究において私は、His<sub>6</sub>Cys 配列を選択的に認識して結合し、大きな蛍光上昇を示す蛍光プローブ NTA-DCFDNB-Ni<sup>2+</sup>を論理的な分子設計によって開発することに成功した。また本プローブを用いることで、ペプチド鎖が結合したマイクロビーズ表面の蛍光上昇を余剰なプローブを洗浄することなしに観察することに成功した。さらに、His<sub>6</sub>Cys 配列融合タンパク質の選択的検出にも成功した。今後は、細胞膜表面に発現させたタンパク質のラベル化へと応用していく。