

Title	蛍光標識アミノ酸の導入によるタンパク質の構造変化解析
Author(s)	永田, 裕輔
Citation	
Issue Date	2006-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/3230
Rights	
Description	Supervisor:芳坂 貴弘, 材料科学研究科, 修士

蛍光標識アミノ酸の導入によるタンパク質の構造変化解析

永田 裕輔（芳坂研究室）

【緒言】

近年、タンパク質のコンフォメーション変化やフォールディング構造の変化が様々な生命現象と結びついていることが明らかになっており、タンパク質の立体構造変化を簡便かつリアルタイムに評価することが広く求められるようになった。蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いてタンパク質の構造状態を評価することは、様々な分子が存在する条件下においても測定が可能であることや、より少量のサンプルで検出可能であるなどの利点がある。FRET では、タンパク質の特定の位置をドナーとアクセプタとなる 2 種類の蛍光分子で標識することが必要となるが、化学修飾法では蛍光分子の標識部位や数の制御が困難であり、GFP 融合法では GFP の大きな分子量が障害になるなどの問題点があった。そこで本研究では、非天然アミノ酸導入技術を用いて、2 種類の 4 塩基コドンによりドナーとアクセプタとなる 2 種類の蛍光標識アミノ酸をタンパク質に部位特異的かつ定量的に導入することで、タンパク質の立体構造変化を FRET を用いて評価することを試みた。

【実験】

今回、ドナーとなる蛍光標識アミノ酸としてBODIPY FL-aminophenylalanine (BFLAF)、アクセプタとしてBODIPY 558-aminophenylalanine (B558AF)、及び BODIPY 576-aminophenylalanine (B576AF)を用いた。これらのアミノ酸を 4 塩基アンチコドンを持つtRNA^{CCCG}、tRNA^{ACCC}に化学的アミノアシル化によりそれぞれ結合させ、4 塩基コドンGGGU、CGGGを導入したmRNAとともに、大腸菌無細胞翻訳系へ加え、二重蛍光標識タンパク質を発現させた。その後C末端に付加したHis-tagにより精製し、変性・非変性状態での蛍光スペクトルを測定した。

【結果】

まず、抗リゾチーム抗体について二重蛍光標識タンパク質の発現を行ない(Fig.1)、SDS-PAGE の蛍光イメージによって確認した。続いて蛍光スペクトル測定を行ったところ、ネイティブ状態ではドナーの励起波長である 490nm で励起した場合にアクセプタの蛍光波長付近に強い蛍光が観察された。このことから、タンパク質に導入された蛍光基同士が近接し、FRET が起きていることが確認された。一方、尿素変性させた状態では、アクセプタの蛍光強度が減少し、BFL の蛍光強度が増加した。これは、変性状態では蛍光基同士が離れて FRET が起こらなくなったためだと考えられる。以上の結果から、タンパク質のフォールディング構造の変化を FRET により検出できることが示された。

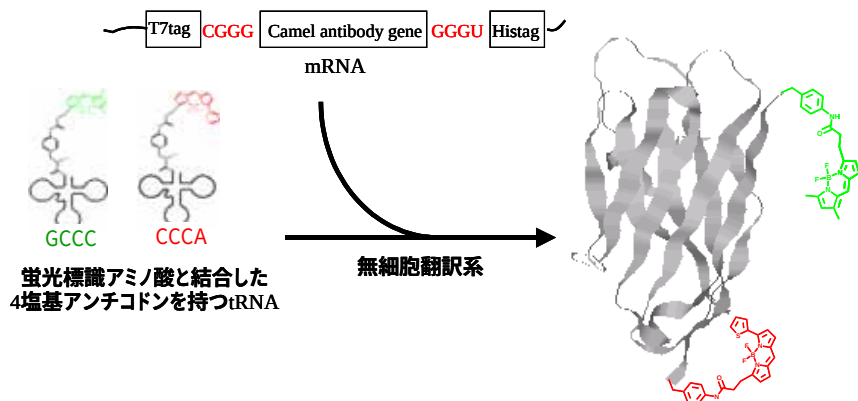


Fig.1

蛍光標識アミノ酸の導入によるラクダ由来 1 本鎖抗リゾチーム抗体の部位特異的二重蛍光標識

【Keywords】 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、4 塩基コドン、非天然アミノ酸、無細胞翻訳系