

Pictet-Spengler 反応を用いた抗 EGFR-VHH の N 末端特異的蛍光標識		
黒田研究室	学籍番号: 16251054	福谷 星

**[背景・目的]**

タンパク質の蛍光標識は機能解析及び活性測定において有用な実験法であり、ELISA 法やセルイメージングなどに用いられている。一般的な蛍光標識ではタンパク質中のリシンの側鎖を化学修飾するため、標識部位及び価数を制御することが難しく、不均一な修飾体が生成されるという課題がある。そこで本研究では、抗 EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) シングルドメイン抗体断片 (VHH ; 分子量 15kDa) 7D12 をモデルタンパク質に用いて、タンパク質の N 末端アミノ基を特異的に蛍光標識することを目指した。

**[手法]**

本研究では、水溶性が比較的高い EDANS (5-(2-アミノエチルアミノ)-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム(極大励起波長 336 nm, 極大発光波長 490 nm)) 蛍光色素を用いた。7D12 の蛍光標識体は以下の 4 ステップで作製した。1) N 末端にグリシンをもつ 7D12 変異体の作製, 2) ピリドキサル-5'-リン酸(PLP)を用いた N 末端グリシンのアルデヒド化, 3) トリプトファンと EDANS を結合した蛍光標識トリプトファンタグの作製, 4) 7D12 の N 末端アルデヒド基と蛍光標識トリプトファンタグの Pictet-Spengler 反応による結合。反応生成物は逆相 HPLC によって精製を行い、MALDI-MS 及び蛍光測定によって同定した。

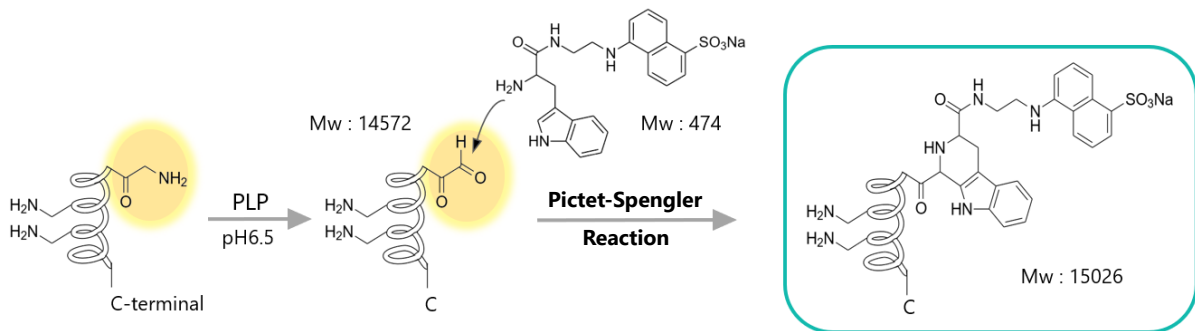


図 1) 7D12 蛍光標識体作製の反応機構

**[結果・考察]**

7D12 の安定性及び蛍光標識トリプトファンタグの溶解性を考慮して反応条件を検討した結果、7D12 終濃度 50 $\mu$ M, 蛍光標識トリプトファンタグ終濃度 3mM, pH5.5~6.5 が最適であった。

MALDI-MS 測定の結果、生成物に由来するイオンピークが観測された(図 2)。生成物の質量電荷比 (m/z 15006) は蛍光標識トリプトファンタグ一分子が結合したものに相当し、7D12 の一か所のみが蛍光標識されていることを確認した。蛍光測定の結果、EDANS の極大発光波長である 490nm 付近に発光を確認した。以上により、本手法でタンパク質を N 末端特異的に標識することが可能であることが示唆された。今後は本技術を、7D12 の機能解析及び EGFR の結合活性測定に応用することを試みる。

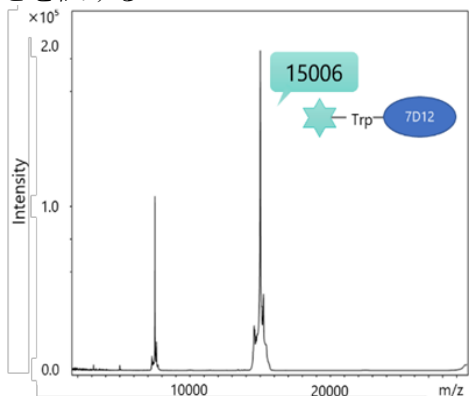


図 2) 反応生成物の MALDI マススペクトル

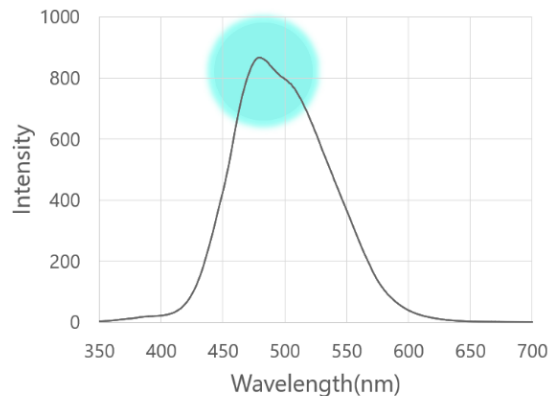


図 3) 反応生成物の蛍光スペクトル (励起波長 336 nm)