JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	蛍光性センサーペプチドの設計・合成と機能評価
Author(s)	松本，正幸
Citation	
Issue Date	2000-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/2668
Rights	
Description	Supervisor:横山 憲二，材料科学研究科，修士

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

B21p6

松本　正幸（横山研究室）

【目的】

これまでバイオセンサーの生体識別素子として、タンパク質等の生体分子が用いられてきた。しかし、生体分子は熱、酸、アルカリ、有機溶剤にさらすことにより容易に機能を失ってしまうという欠点があった。そこで、新たな生体識別素子として合成ペプチドに注目した。ペプチドがある特定の物質と複合体を形成する場合、立体構造変化が起こると考えられる。この構造変化を高感度に測定できれば、ペプチドはその物質に対するセンサー分子となる。そこでペプチドに蛍光物質を修飾し、蛍光分子間の相互作用である蛍光共鳴エネルギー転移を利用すれば蛍光強度変化によりペプチドの構造変化を検出できると考えた。本研究では蛍光性ペプチドを合成し、構造変化を蛍光特性の変化として検出しやすい条件を検討した。また、既に当研究室ではファージ提示系を用いて、7 残基のペプチドに対して親和性を持つ 12 残基のペプチドのスクリーニングを行っている。この得られた配列を利用して 7 残基ペプチド G-S-Y-E-A-D-R に蛍光物質を修飾したセンサーペプチドを合成し、親和性のあるペプチドを加えたときの蛍光特性の変化を調べた。

【実験】

1. α-ヘリックス構造をとりやすい配列を含む、Ala-Tyr-(Lys-Ala-Ala-Ala-Ala)$_n$-Lys-Ala-Cys（n=1、2、3）と Ala-Tyr-Cys を自動ペプチド合成機によって合成した。N 末端アミノ基を脱保護後、固相でローダミン B スルホニルクロリドを修飾した。次にトリフルオロ酢酸を用いてクリベージ及び側鎖の脱保護を行った後、フルオレセインマレイミドをシステインのチオール基に修飾した。合成したペプチドの蛍光特性と CD をそれぞれ、緩衝液、緩衝液+15 %トリフルオロエタノール（TFE）溶液、緩衝液+3 M グアニジン塩酸塩（GuHCl）溶液中で測定した。

2. 7 残基ペプチドの配列を含む、ペプチド G-S-Y-E-A-D-R-G-G-C を自動ペプチド合成機によって合成した。実験 1 と同様の方法で蛍光物質を修飾し、センサーペプチドを合成した。別に合成した 12 残基のペプチドをセンサーペプチド溶液に加えていったときの蛍光特性の変化を調べた。

【結果と考察】

1. 溶媒を変化させたとき、10、15、20 残基の蛍光性ペプチドで明らかな蛍光特性の変化が見られた。CD 測定を行うと、溶媒によって二次構造が変化していることが分かった。以上のことから 10～20 残基のペプチドにおいて、構造変化を蛍光特性変化として検出可能だと考えられる。

2. センサーペプチド溶液に親和性を持つペプチドを添加したところ、ペプチドの濃度を高くしていくにつれてフルオレセインからローダミンへのエネルギー転移の割合が小さくなった。センサーペプチド単独で存在するときは比較的かさが低い構造をしているが、親和性を持つペプチドと複合体を形成する場合は比較的伸びた構造になったためであると考えられる。また、親和性がないペプチドを加えた場合は大きな蛍光特性の変化が観察されなかったので、センサーペプチドは特定の相互作用を持つペプチドだけをセンシングすることができると考えられる。

Keyword:　合成ペプチド・蛍光・エネルギー転移・フルオレセイン・ローダミン