

Title	プロテインキナーゼ活性をイメージングするための蛍光性センサーペプチド
Author(s)	井上, 磨
Citation	
Issue Date	2003-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/3017
Rights	
Description	Supervisor:横山 憲二, 材料科学研究科, 修士

プロテインキナーゼ活性をイメージングするための蛍光性センサーペプチド

井上 磨 (横山研究室)

【目的】

細胞内タンパク質のリン酸化はプロテインキナーゼによって行なわれており、細胞内シグナル伝達系の素反応としてきわめて重要である。そのなかでもプロテインキナーゼ A (PKA) は脳内の海馬における記憶の形成などに深く関与していることが次第に明らかになってきており、cAMP から PKA に至るシグナル伝達系の細胞内における動的解析及び可視化するための特異的プローブの開発が望まれている。そこで本研究では PKA 活性をイメージングできる蛍光センサーペプチドを合成し、その特性評価を行なうことを目的とする。

【実験方法】

センサーペプチドの合成及び蛍光スペクトル測定

PKA の研究で一般的に用いられている kemptide 配列 (LRRASLG) の C 末端側に、蛍光色素 EDANS を有するグルタミン酸誘導体を組み込んだ EDANS ペプチドを、通常の Fmoc 法により固相合成した。次に、この EDANS ペプチドの脱保護、レジンからの切断を行った後、N 末端アミノ基に、クエンチャーとしてスクシンイミジルエステル基を有した dabcyI を修飾し、高速液体クロマトグラフィーを使用して精製した。Ser をリン酸化したペプチドも同じ手法で合成した。HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 中で、この 2 種類のセンサーペプチドに EDANS の励起光である 340 nm を照射して、蛍光スペクトルを測定した。

センサーペプチドのリン酸化

HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 中、PKA を用いて、非リン酸化センサーペプチドをリン酸化し、リン酸化前後における蛍光スペクトルの測定を行った。リン酸化の確認は、HPLC (EDANS の蛍光 ex 340 nm, em 470nm) を用いて行った。

【結果及び考察】

ESI-TOF-MS により、EDANS と dabcyI を修飾したセンサーペプチドの合成を確認した。蛍光スペクトル測定から、このペプチドは非リン酸化型よりリン酸化型の方が大きな蛍光強度を示した。これは、センサーペプチドがリン酸化することによって、親水性が高くなり、ペプチドが伸びたような構造をとるために、蛍光色素間の距離が離れ、エネルギー転移が起こりにくくなったためであると考えられる。また、EDANS と dabcyI を修飾したペプチドは、PKA によってリン酸化されることがわかった。従って、センサーペプチドとして利用できることがわかった。

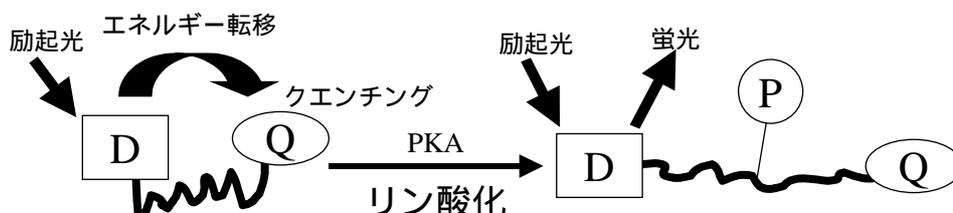


Fig. 1 センサーペプチドの原理

[D:ドナー (EDANS), Q:クエンチャー (dabcyI), P:リン酸基]

Keyword: センサーペプチド, キナーゼ活性, リン酸化, クエンチング, 細胞内シグナル伝達