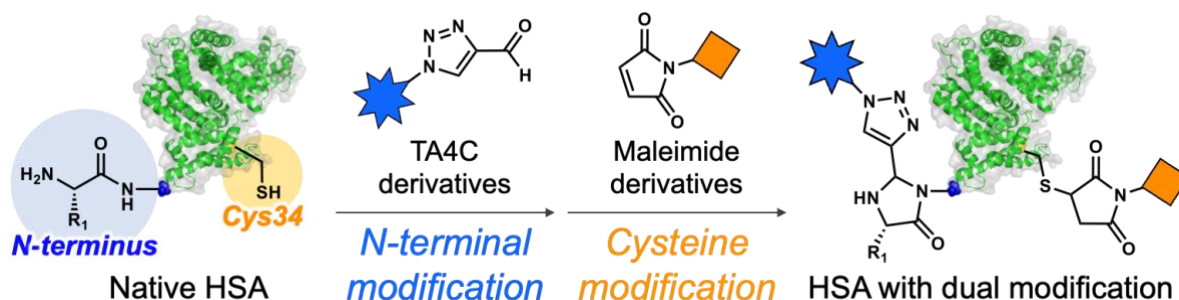


## システイン修飾とトリアゾールカルボアルデヒドによる N 末端修飾を用いて蛍光色素を位置特異的に二重修飾したアルブミンの調製と分子内 FRET 測定

○前田侑也<sup>1</sup>・小野田晃<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>北大環境科学院、<sup>2</sup>北大地球環境学院)

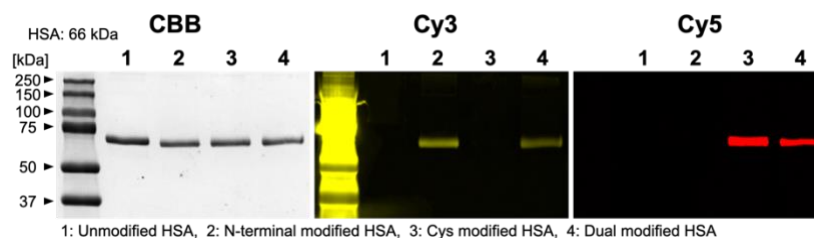
**Preparation and Intramolecular FRET Analysis of Albumin with Site-Specific Dual Modification Using Triazolecarbaldehyde as an N-Terminus Modification Reagent** (Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University<sup>1</sup>, Faculty of Environmental Earth Science, Hokkaido University<sup>2</sup>) MAEDA, Yuya<sup>1</sup>; ONODA, Akira<sup>1,2</sup>

タンパク質を標的とした二重標識は、FRET などの応用技術に用いられており、これまでに多種多様な二重標識法が開発されてきた。一方で、修飾部位のレパートリー拡大に加えて、高収率かつ簡便に修飾体を調製する手法の開拓は、引き続き重要といえる。当研究室は、1*H*-1,2,3-トリアゾール-4-カルボアルデヒド (TA4C) 誘導体がタンパク質 N 末端の  $\alpha$ -アミノ基に対して特異的に反応し、4-イミダゾリジノン環の形成を経て化学修飾できることを報告している<sup>1)</sup>。本発表では、TA4C 誘導体と既存の修飾分子を併用することで、HSA の N 末端とシステイン残基を標的としたワンポットでの位置特異的二重修飾の詳細を報告する (Figure 1)。



**Figure 1.** The scheme for dual modification of HSA using two different modification reagents.

HSA に TA4C 誘導体とマレイミド誘導体を同時にワンポットで加えた試料を調製し、質量分析により解析した。その結果、二種類の修飾分子が特異的にそれぞれ 1 分子ずつ反応していることが判明した。また、それぞれ単独で反応させた場合に N 末端修飾は約 61%、システイン修飾は約 99% の修飾率で進行したのに対し、二重修飾は約 60% の修飾率を示した。以上を踏まえて、蛍光色素 Cy3 を構造に持つ TA4C 誘導体と Cy5 を構造に持つマレイミド誘導体を用いてワンポットで二重修飾した試料を SDS-PAGE で分離した後に蛍光スキャナーによる解析を行った。二重修飾を施した HSA のバンドでのみ二種類の蛍光が見られ、二重修飾反応の進行が明らかとなった (Figure 2)。



**Figure 2.** Dual modification of HSA analyzed by coomassie staining and fluorescence visualization in the SDS-PAGE gel.

1) A. Onoda, N. Inoue, E. Sumiyoshi, T. Hayashi, ChemBioChem, 2020, 21, 1274.