

## 活性酸素種発生タンパク質 miniSOG を利用した細胞内タンパク質導入法の開発

(東工大生命理工) ○渡辺 淳司・眞下 泰正・三重 正和・小畠 英理

Development of a method for introduction of protein into cells with miniSOG

(Sch. Life Sci. Tech., Tokyo Tech.) ○Junji Watanabe, Yasumasa Mashimo, Masayasu Mie, Eiry Kobatake

To deliver proteins into cells, protein transduction domain is fused to protein of interests. However, in this method, introduced proteins were trapped in endosome. It was reported that reactive oxygen species (ROS) enhance endosomal escape of trapped protein. One of the fluorescent proteins, miniSOG, is a ROS generator protein. In this study, we developed a method for introduction of protein into cells using miniSOG. In Here, we constructed the fusion protein, miniSOG with PTD, and evaluated its ROS generation and protein transduction abilities. Constructed proteins, His-TAT-miniSOG and His-miniSOG, were expressed in *E. coli* and purified from soluble fractions. When the fluorescence spectrum of the purified protein was measured at 460 nm of excitation light, a maximum peak was observed near 500 nm, similar to the literature value. In the future, we will evaluate the escape from endosomes by examining the intracellular localization of fluorescent proteins.

**Keywords :** *Endosomal escape; reactive oxygen species; protein transduction; Singlet Oxygen Generator*

細胞膜透過ドメイン (PTD) を利用した細胞内タンパク質の導入において、導入タンパク質がエンドソームに留まる問題がある。その問題を解決する手法として活性酸素種を用いたエンドソームの破壊が報告されている。一般にこういった手法における、活性酸素種の発生には光増感剤として蛍光分子などの低分子化合物が利用されているが、蛍光タンパク質の中にも活性酸素種を発生するものがある。そのような蛍光タンパク質の1つである miniSOG は、わずか 106 アミノ酸から構成される。本研究では、この活性酸素種を発生するタンパク質 miniSOG を用いたタンパク質導入法の開発を目的とする。ここでは細胞内へと導入された miniSOG が自身の作用により発生する活性酸素種の働きによりエンドソームから脱出可能であるかを検討する。PTD と miniSOG の融合タンパク質を遺伝子工学的手法により構築し、その機能評価を行った。大腸菌内で発現した2種類のタンパク質、His-TAT-miniSOG および His-miniSOG は、共に可溶画分より精製した。精製したタンパク質の励起光 460 nm における蛍光スペクトルを測定したところ、文献値と同様に 500 nm 付近に極大ピークが観測された。今後、蛍光タンパク質の細胞内局在を調べることにより、エンドソームからの脱出を評価する。