

## DNA リンカーを介した発光タンパク/蛍光色素 BRET システムの開発

(関西大化学生命工) ○高野 史章・乾 俊輝・葛谷 明紀

Development of BRET system between luciferase and fluorescent dyes via DNA linker

(Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University)

○Fumiaki Takano, Toshiki Inui, Akinori Kuzuya

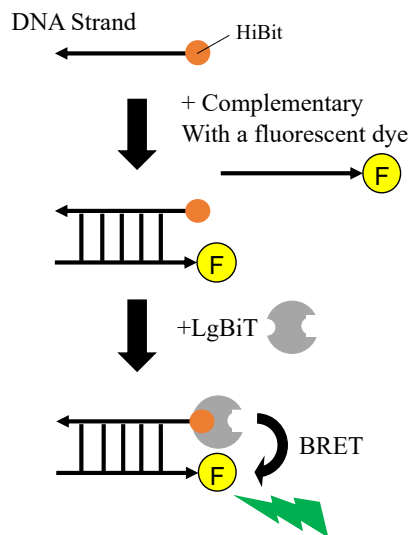
In fluorescence microscopy, bleaching and cytotoxicity of fluorescent dyes due to irradiation with strong excitation light are problems. Therefore, luciferase can be used to avoid these problems. However, the wavelength of the luminescence of luciferase is fixed depending on the substrate.

In this study, we developed bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system using DNA as a linker for energy transfer between luciferase and fluorescent dyes. First, small peptide fragment of split luciferase was conjugated to synthetic DNA via Cu-free click reaction. Then, by adding the large fragment to the solution, luciferase was reconstructed at the end of DNA chain. Another DNA strand was modified with fluorescent dyes, and hybridized to or near the luciferase modified strand. As a result, efficient BRET was realized. In addition, by changing the number and type of fluorescent dyes, multi-color BRET was realized

**Keywords :** DNA, Luciferase, Bioluminescence Resonance Energy Transfer

蛍光色素で標識を行う顕微鏡観察法では、強い励起光の照射に伴う蛍光色素の退色や細胞毒性が問題になる。発光タンパクを励起源として用いれば、これらの問題を回避することができる。しかし発光タンパクの発光は、基質に依存してその波長が固定されている。

本研究では、DNA をリンカーとして発光タンパクと蛍光色素間でエネルギー移動を行わせる BRET システムの開発をした。まず、発光タンパクを断片化した Split 体のうち、小断片側のペプチド鎖を銅フリークリック反応により化学合成 DNA と結合した<sup>1)</sup>。ついで大断片側を系中に加えることにより、発光タンパクが DNA 鎖の末端で再構築される。別の DNA に蛍光色素を結合しておき、様々な形態で DNA 鎖をハイブリダイゼーションさせることで、蛍光色素を発光タンパクの近傍に局在化させ、BRET を誘導することに成功した。また、蛍光色素の個数や種類を変えることにより、多色 BRET を実現した。



**Fig. 1** BRET over DNA duplex.

1) A. S. Dixon, *et al.*, *Anal. Chem.* **2016**, *11*, 400-408.