

細胞内では数千のタンパク質が働いており、その解析には目的に応じた様々な検出方法が用いられる。その場合、目的タンパク質をタグで標識することで、特異的かつ感度よく検出することが可能となる。タグとしては、FLAG タグなどの特定の抗体が結合するペプチド配列であるエピトープタグが広く用いられるが、近年発光による直接検出が可能な HiBIT タグが開発された。HiBIT タグは、NanoLuc の C 末 11 アミノ酸を改変したもので、NanoLuc の N 末側の LgBiT と高親和性で結合し NanoLuc が再構成され、基質存在下で強い発光が生じる。この発光により、*in vitro* 反応ばかりでなく、生きた細胞内においても目的タンパク質を検出できる。本研究では、この HiBIT タグを二量体、三量体としたときに発光による検出感度が向上するか調べた。まず pCS2 ベクター上で、EGFP 配列に FLAG-HiBIT ペプチド配列を 1~3 量体で付加し、これらのプラスミドを鋳型にして mRNA を合成した。これらの mRNA を 1 細胞期のゼブラフィッシュ胚へ顕微注入し、後期エピボリー期にタンパク質を調製した。これらのタンパク質を HiBIT ブロッキング法で分析した結果、発光の強度に大きな違いは見られなかった。これは、この実験で使用した FLAG-HiBIT ペプチド配列の多量体に対して、LgBiT が効率的に相互作用できないためであり、多量体化の際には立体構造上の HiBIT タグの配置を綿密に設計する必要があることを示唆する。