

## インテインタグを用いた合成化合物-タンパク質間相互作用の検出

(群馬大院理工) ○高橋 剛

Detection of Interactions between Synthetic Compounds and Proteins Using Intein Tag  
(Graduate School of Science and Technology, Gunma University) ○Tsuyoshi Takahashi

We attempted to construct a detection method using short reactive peptide tags derived from reporter enzyme fragments and protein reconstitution to generate active reporter enzymes. Employing NanoLuc luciferase as a reporter enzyme, interactions between synthetic peptides and proteins was successfully detected. However, the reaction between peptide tags was not efficient enough to detect the interactions at lower concentrations. On the other hand, split intein self-catalyzes protein trans-splicing. In the present study, I have designed the peptide bearing a ligand based on the branched intermediate in PTS. Moreover, a target protein bearing an engineered *Npu* DnaE intein was also designed. When the ligand interacts with the target protein, new peptide can be generated by the intein activity. Using this peptide product, the peptide-protein interaction was successfully detected by NanoLuc luciferase activity.

**Keywords :** *Intein; Protein Trans-Splicing; NanoLuc Luciferase; Enzyme Reconstitution*

薬剤などの合成化合物とタンパク質との相互作用の高感度検出は、細胞内での合成化合物の作用などを調べることを可能とする。本研究室では、合成化合物とタンパク質間との相互作用を調べる方法として、反応性ペプチドタグを用いた相互作用検出法の開発を行っている。本検出法では、相互作用に依存してペプチドタグ間がネイティブケミカルライゲーション (NCL) によって連結すること利用している。しかし、反応性ペプチドタグの安定性や、反応効率などに問題があった。一方、**protein trans-splicing (PTS)** 反応を触媒する分割型インテインは、3段階の反応により、ペプチド鎖を連結させる。そこで、PTS 反応の中間体である枝分かれ構造をもつペプチドと分割インテインを用いることで、合成化合物とタンパク質間の相互作用に依存して、新しいペプチド配列が生じる系を構築できると考えた (図)。

リン酸化チロシン含有ペプチド (pYEEI) と SrcSH2 タンパク質をモデルとして、ペプチドおよびタンパク質を作製した。枝分かれ部分に Ser または Cys をもつペプチドを合成し、相互作用に依存したペプチド鎖の生成について検討した。生成したペプチド鎖を認識する NanoLuc ルシフェラーゼ断片を用いた再構成反応により、pYEEI と SrcSH2 との相互作用について、発光測定により検討した。

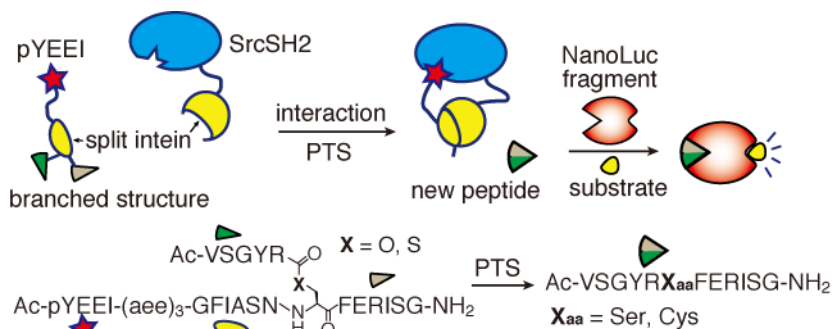


図. インテインタグを用いた相互作用検出の模式図と設計したペプチド配列.