

分割型大豆由来ペルオキシダーゼと分割型インテイン融合体の構築

(群大院理工) ○岩渕 泰世・高橋 剛

Construction of Fusion Proteins Consisting of Split Soybean Peroxidase and Split Intein

(Graduate School of Science and Technology, Gunma University) ○Taisei Iwabuchi, Tsuyoshi Takahashi

Fluorescent proteins and enzymes have been widely used for detecting the interactions between synthetic compounds and proteins inside cells where many impurities exist. On the other hand, horseradish peroxidase (HRP) has been widely used in the field of biochemistry. In this study, we attempt to construct the fusion proteins in which soybean peroxidase (SBP) and *Npu* DnaE intein, a highly active split intein. Split intein can self-catalyze protein trans-splicing reaction (PTS). The recombinant SBP was expressed in *E. coli* and purified. Enzymatic activity of the recombinant SBP was similar to that of HRP. To design the fusion proteins, we have constructed circular permutant SBP (cpSBP) proteins in which the positions of N- and C-terminals are changed. Based on this, we have also attempted to construct the fusion proteins based on the cpSBP.

Keywords : soybean peroxidase; split intein; protein trans-splicing; reporter proteins

細胞内など夾雑物が多数存在する環境下で、特定のタンパク質の相互作用によってシグナル伝達や増殖、細胞死等が制御される。そのため、夾雑物が多数存在する環境下で、タンパク質と特定の合成化合物や小分子との相互作用を検出することは、制御メカニズムの解明、阻害剤やリガンドの探索等のために重要である。そのような相互作用検出には、種々のレポータータンパク質（蛍光タンパク質やルシフェラーゼ）などが用いられている。当研究室ではこれまでに、ペプチド-タンパク質間の相互作用を検出する方法として、 β ガラクトシダーゼと分割型インテインを組み合わせた方法を開発し、糖やリン酸化ペプチドとタンパク質間の相互作用の検出に成功した。しかし、感度が低いことや検出に時間がかかるなどの問題があった。

一方、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) や western blot で汎用されている。しかし、HRP などの植物由来ペルオキシダーゼは、多数のジスルフィドをもつため、レポータータンパク質としての利用には制約がある。本研究では、分割インテインと大豆由来ペルオキシダーゼ (soybean peroxidase; SBP) を融合したタンパク質を構築し、分割インテインのスプライシング活性により、ペルオキシダーゼ活性が発現する系の構築を目的とした。最初に、SBP の大腸菌発現系を構築し、酵素活性を測定したところ、報告されている大腸菌発現の HRP と同程度の酵素活性を示した。次に、インテインとの融合体を構築するために、末端の位置を変更した円順列変異型 SBP (cpSBP) を作製し、酵素活性を評価した。さらに、スプライシング活性に優れた *Npu* DnaE インテインとの融合体を構築し、スプライシングに依存した活性型酵素の生成について評価した。