

分割インテインを用いた細胞質ペプチド: *N*-グリカナーゼ活性の細胞内発光検出

(群馬大院理工¹・東京都医総研²・理研³) ○高橋 剛¹・内林 達也¹・高橋 諭¹・石井 希実¹・松尾 一郎¹・吉田 雪子²・鈴木 匡³

Luminescence Detection of Cytoplasmic Peptide:*N*-Glycanase Activity inside Cells Using Split Inteins (¹*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*, ²*Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science*, ³*RIKEN*) ○Tsuyoshi Takahashi¹, Tatsuya Uchibayashi¹, Satoshi Takahashi¹, Nozomi Ishii¹, Ichiro Matsuo¹, Yukiko Yoshida², Tadashi Suzuki³

Cytoplasmic peptide:*N*-glycanase (PNGase) can cleave the linkage between sugar and asparagine side-chain on *N*-linked glycoproteins. One of the PNGase function is to recruit *N*-linked glycoproteins into proteasome when the proteins become unnecessary. PNGase activity is important, but a convenient method to detect the PNGase activity has not been developed. In our laboratory, artificial split inteins that self-catalyze protein trans-splicing (PTS) based on *Npu* DnaE have been developed and conjugated with split NanoLuc luciferase. Incorporation of *N,N'*-diacetylchitobiose (GlcNAc₂) into an intein fragment peptide can decrease the PTS activity, and removing GlcNAc₂ from the peptide can recover the PTS activity. In the present study, we have attempted to detect the PNGase activity inside cells using the PTS-based luciferase assay.

Keywords : *Cytoplasmic Peptide:N-glycanase; Split Intein; Luciferase*

細胞質ペプチド:*N*-グリカナーゼ (PNGase) は、*N* 結合型糖鎖をもつタンパク質上の糖とアスパラギン側鎖のアミド結合を切断する酵素であり、細胞内において不要となった糖タンパク質のプロテアソームでの分解などに関与している。PNGase 活性の低下は、様々な疾患と関係するため、PNGase 活性を調べるためのプローブの開発が望まれている。当研究室では、タンパク質トランススプライシング(PTS)活性をもつ分割インテインと NanoLuc ルシフェラーゼを複合化することで、PTS 反応の進行により、活性型ルシフェラーゼが生成する系を構築した¹⁾。この系を用い、11 アミノ酸からなる *N* インテインと NanoLuc 由来のペプチド配列を連結したペプチド中に、*N,N'*-diacetylchitobiose をもつ Asn 残基を導入したペプチドを設計・合成した。PNGase による脱糖鎖反応により、PTS 反応が効率的に進行し、PNGase 活性をルシフェラーゼ発光により検出できることが明らかとなった²⁾。本研究では、分割インテインとルシフェラーゼを用い、ヒトやマウスなどの哺乳動物の PNGase (Ngly1) の細胞内活性の検出を試みた。

糖ペプチドを細胞内に移行できるように、細胞透過性ペプチドとして知られている R9 配列を導入したペプチドを設計・合成した。Ngly1 を過剰発現する HeLa 細胞や、マウス 3T3-L1 細胞を用い、細胞内 Ngly1 活性の発光検出について検討した。

1) M. Kawase, M. Fujioka, T. Takahashi, *ChemBioChem*, **2021**, 22, 577.

2) T. Takahashi, T. Uchibayashi, N. Ishii, I. Matsuo, Y. Yoshida, T. Suzuki, *Chem. Commun.*, **2022**, 58, 13282.