

分割インテインとカナマイシンキナーゼの再構成を利用した新規リガンド探索法の構築

(群大理工¹・群大院理工²) ○信澤 佳奈¹・渡辺 雄太郎²・高橋 剛²

Construction of a ligand screening method using split intein and reconstruction of kanamycin kinase (¹*Department of Science and Technology, Gunma University*, ²*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*) ○Kana Nobusawa,¹ Yutaro Watanabe,² Tsuyoshi Takahashi²

Peptide molecules are good candidates for drug development, peptides have a potential to bind to target proteins and to inhibit protein-protein interactions. Such bioactive peptides can be obtained by screening from a peptide library. On the other hand, we have attempted to improve and engineer split inteins that have protein trans-splicing (PTS) activity. We have successfully developed a system in which peptide-protein interactions promote the PTS reaction using an engineered split intein with altered split position. In the present study, we have constructed a convenient method for selecting peptides that bind to target proteins, such as murine double minute 2 (MDM2) and Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), using the split intein and reconstitution of kanamycin kinase, aminoglycoside 3'-phosphotransferase (APH).

Keywords : Split Intein; Protein Trans-splicing; Peptide-protein Interaction

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の改良に関する研究を行ってきた。通常とは異なる位置で分割したインテインを用いることで、分割インテイン間の自発的な会合を抑制できる。これまでに、この分割インテインの一方に、標的タンパク質を配置し、もう一方に、相互作用するペプチドを配置することで、ペプチド-タンパク質間の相互作用に依存して PTS 反応が進行する系の構築に成功した。このとき、反応生成物として、カナマイシンキナーゼである aminoglycoside 3'-phosphotransferase (APH) を用いることで、ペプチド-タンパク質間の相互作用により、カナマイシン含有培地中で大腸菌が生育できる。本研究では、改良型分割インテインと APH を用いて、MDM2 や Keap1 に結合するペプチドの探索を試みた。

改良型分割インテインは、当研究室で開発した *Npu DnaE* インテイン改変体をもとに設計した¹⁾。NNK (N = A, G, C, T; K = G, T) コドンを用いて、12 アミノ酸からなるペプチドライブラリを設計し、C インテインおよび APH の C 末端 7 アミノ酸配列と融合させた。APH の N 末端配列および N インテインを標的タンパク質と融合させ、それぞれの融合体を大腸菌で発現させた。カナマイシン含有培地で大腸菌を培養し、生育した大腸菌がもつプラスミドの配列を解析し、得られたペプチドのアミノ酸配列を同定した。MDM2 を標的とした実験では、MDM2 に結合するペプチド配列が複数得られ、実際に MDM2 と強く相互作用することが明らかとなった。

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