

共有結合による基板上へのタンパク質の自発的固定化技術の開発

The development of the method for auto-immobilization of protein on glass substrate by covalent bonding

若井 涼¹、上野 真吾^{1,2}、一木 隆範^{1,2}

(1. 東大工、2. ナノ医療イノベーションセンター)

Ryo Wakai¹, Shingo Ueno^{1,2}, Takanori Ichiki^{1,2}

(1. Eng. Univ. Tokyo, 2. iCONM)

wakai@bionano.t.u-tokyo.ac.jp

[緒言] タンパク質の機能を決定しているアミノ酸配列には、膨大な多様性が存在するため、生体内のタンパク質には高機能化の余地が残されている。既存のタンパク質より高機能なタンパク質を人工的に作り出すことができれば、医薬品の開発等で大きな貢献をすることが期待される。その実現のためのひとつの技術として、マイクロアレイによる人工分子進化技術が提案されている。我々はタンパク質や核酸等のバイオマテリアルを人工的に進化・創製する進化分子工学と、微細加工技術を組み合わせて、1枚のチップ上で $10^7 \sim 10^8$ 種のタンパク質を並べて合成し、それらを固定し、一度に分析して良い機能のタンパク質を選択するという研究を進めてきた。しかし、タンパク質固定化の際に、現状ではニッケルニトリロ三酢酸(Ni-NTA)とポリヒスチジンタグ(His-tag)による配位結合が利用されているが、共有結合ではないため結合力が弱く、汎用性に欠ける。そこで、ペプチド連結酵素である Sortase に着目した。Sortase は LPXTG(X は任意のアミノ酸)と GGG というアミノ酸配列を認識して、LPXT-GGG という結合を作る酵素である(Fig.1)[1]。本研究では共有結合によるタンパク質の自発的基板上固定化実現を目指し、反応評価のために必要な遺伝子合成および液相での反応効率の時間変化の観察を行った。

[実験方法・結果] Sortase、テトラメチルローダミン (TMR) 修飾ペプチド (GGG-TMR)、LPETG 融合 GFP(GFP-LPETGG) を用いて Sortase の液相での反応を確認するための実験を行った。この実験では、4 mM GGG-TMR, 2 μ M Sortase, 無細胞合成した GFP-LPETGG を用いて、数時間毎にサンプルを回収し、SDS-PAGE を行って反応量の時間変化を確認した (Fig.2)。Sortase 反応サンプルの、SDS-PAGE 後のゲルを蛍光観察した結果が右の図である。34kDa 付近で GFP の蛍光が時間経過に従い弱まっていく様子が観察され、24kDa 周辺で、時間経過に比例するように GFP、TMR の蛍光が増加していく様子も観察された。ここから、34kDa 付近の GFPuv4-LPETGG が GGG-TMR と時間依存的に連結したことを示しており、Sortase による無細胞翻訳タンパク質へのペプチド連結を確認した。今後、Sortase による無細胞翻訳タンパク質の自発的固定化について検討を進める。

[参考文献] [1]Olaf Schneewind *et al*, *The EMBO J.* **12**, 4803-4811, 1993

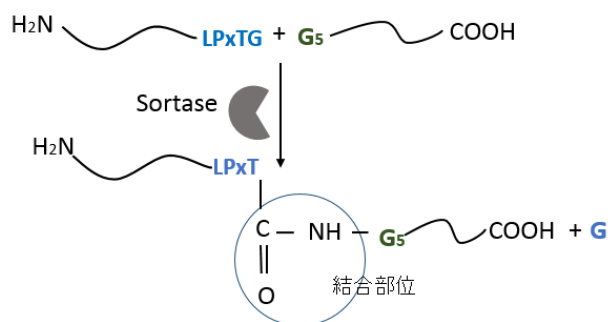


Fig.1 Reaction mechanism of Sortase

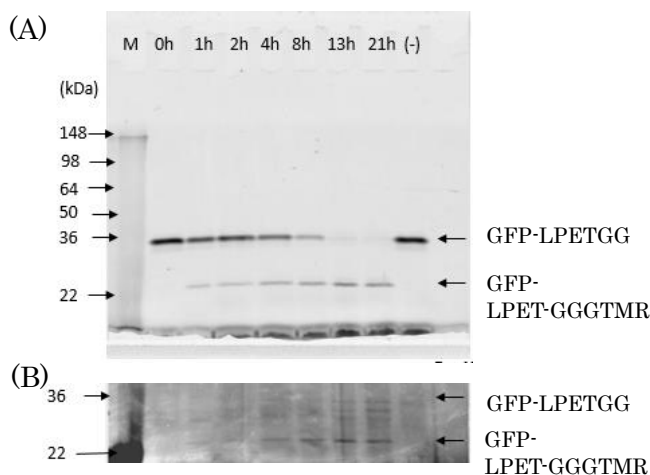


Fig.2 Result of sortase reaction in liquid phase (SDS-PAGE)

(A) Fluorescence image of GFPuv4 (Ex: 488 nm, Em: 540BP40), (B) Fluorescence image of TMR (Ex: 532 nm, Em: 560LP)