

ペプチド連結酵素を用いたタンパク質のその場合成・固定化技術

In situ synthesis and immobilization of protein on solid surface using transpeptidase

若井 涼¹、上野 真吾^{1,2}、一木 隆範^{1,2}

(1. 東大院工、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]タンパク質は、生体内で様々な役割を担っており、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 という共有結合を作る酵素である[1]。本研究では、この sortase 反応を用いたタンパク質マイクロアレイ作製のコンセプト実証のため、無細胞合成した LPETGG ペプチド融合 GFP を用いた、sortase の液相中での連結反応を確認した後、基板上への蛍光分子修飾ペプチド固定化実験を行ったので報告する。

[実験方法・結果] 4 μM sortase、2 mM テトラメチルローダミン(TMR)修飾ペプチド(GGG-TMR)、及び無細胞合成した LPETG 融合 GFP(GFP-LPETGG)を用いて Sortase の液相中での連結反応を行った。連結反応溶液から数時間毎にサンプルを回収し、SDS-PAGE によって連結前後の GFP を分離し検出することで反応量の時間変化を確認した。連結反応後の GFP 蛍光輝度の低下が観察されたため、反応系全体の GFP 量が一定になるように、連結後の GFP 量に補正係数 3.5 を乗じた値を用いて解析した。本結果により sortase 反応によって、無細胞合成した GFP-LPETGG のうち 8 割以上が、24 時間以内に連結されることが分かった(Fig.1)。固相固定化用基板として、ペンタグリシンを修飾したガラス基板を作製した。ガラス基板に、アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)を修飾した後、N-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS)、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, hydrochloride (EDC)存在下で Fmoc-Gly5-PEG12-COOH を反応させ、Fmoc の脱保護を行うことでペンタグリシン修飾基板を作製した。作製した基板上に、1.75 μM sortase、50 μM 蛍光修飾 ALPETG ペプチド(STELLA650-ALPETG)の混合溶液を滴下して、37°C で 72 時間静置した。1 x PBS で洗浄後、基板上に固定化された STELLA650-ALPETG を観察した。その結果、sortase 反応による特異的な固定化が確認できた(Fig.2)。今後は、タンパク質のその場合成・固定化に向け、固相固定化の反応条件、洗浄条件の検討を行っていく予定である。

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

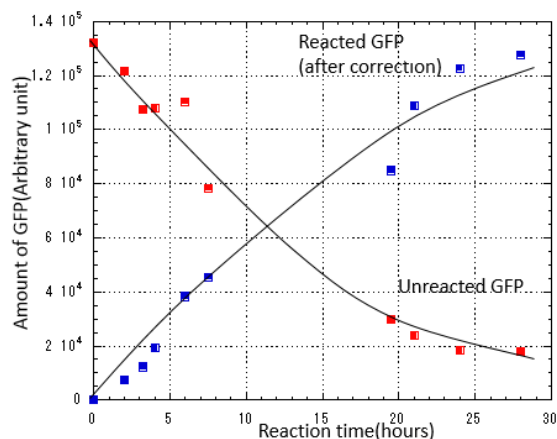


Fig.1 The sortase mediated peptide connection to the GFP. The value of reacted GFP was corrected by multiplication with a factor of 3.5.

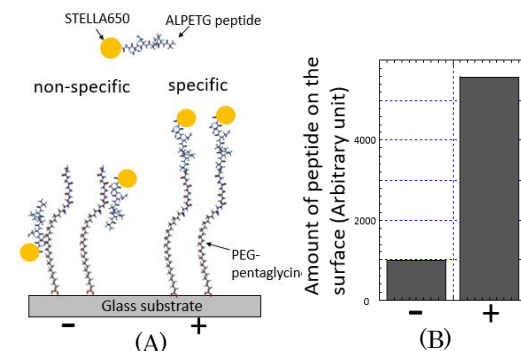


Fig.2 Result of immobilization of STELLA650-ALPETG peptide on pentaglycine-modified substrate by sortase. (A): schematic representation. (B): quantified result of the amount of peptide on the substrate. “-” and “+” represent presence or not of sortase.