ペプチド連結酵素による共有結合を利用したタンパク質その場固定化技術の開発

Development of in situ immobilization of protein using covalent bonding by transpeptidase

東大院工 [1]、ナノ医療イノベーションセンター[2]
○若井 涼 [1]、上野 真吾 [2]、白形 優依 [1]、一木 隆範 [1, 2]
Eng. Univ. Tokyo[1], iCONM[2] °Ryo Wakai[1], Shingo Ueno[2], Yui Shirakata[1],Takanori Ichiki[1, 2]
wakai@bionano.t.u-tokyo.ac.jp

[緒言]タンパク質マイクロアレイとは、基板上に多種のタンパク質を配列したものであり、タンパク質の機能解析、及び分子探索において重要な役割を担うと期待されている。機能解析、分子探索は大規模で行うことによって高効率での解析、探索が達成されるが、大規模タンパク質マイクロアレイの作製にはその場合成法が有効であるといわれている。その場合成法では、マイクロアレイ上にタンパク質固定化する際に、現状では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 A (SrtA) に着目した。SrtA は LPETG(sortag)と GGG というアミノ酸配列を認識して、LPET-GGG という共有結合を作る酵素である[1]。本研究では、SrtA を用いたタンパク質マイクロアレイ作製に向け、液相条件下で無細胞合成反応を SrtA 反応系が阻害しない条件を決定し、またペンタグリシン基板への蛍光標識 sortag の固定化実験から濃度、反応時間を変化させた際の固定化量変化の傾向を確認したので報告する。

[実験方法・結果]タグ融合タンパク質 GFP-LPETGG の遺伝子と、市販の SrtA、及びポリグリシンを含む基質を用いて、無細胞合成した GFP をその場で SrtA により連結させる反応の進行の様子を確認した。今回はポリグリシンを含む基質として G_5-STELLA650 を用いた。タグ融合 GFP を小麦胚芽系によって無細胞合成し、その GFP と 1 mM G_5-STELLA650 が 2 μM SrtA によって同一反応液内で連結された(Fig.1(a))。しかし、この反応の際、無細胞合成反応の効率が悪く、基質濃度が低下し、それに伴い SrtA 反応が非常に低速になった様子が観察された。そこで、無細胞合成を阻害している物質を特定するため、阻害している可能性がある物質を細分化し、それぞれを別の無細胞合成液に添加することによって、阻害物質の特定を行った。その結果蛍光分子 STELLA650 及び Sortase Storage Buffer (40 mM Tris-HCl pH8.0, 110 mM NaCl, 22 mM KCl, 20%(v/v) glycerol) が無細胞合成を阻害していることが確認された(Fig.1(b))。また SrtA 反応を用いて、基板上に蛍光標識 sortag をペンタグリシン修飾基板上に固定化する実験を行った。反応時間 3 時間、sortag 濃度 50 μM の条件下で SrtA 濃度を変化させ、固定化量の変化を観察した (Fig.2)。SrtA の濃度が高くなるに従い、固定化量が減少しており、酵素反応の平衡が逆反応方向にシフトしたと考えられる。今後は今回検討した反応条件をもとに、その場合成・固定化法の実現を目指す。

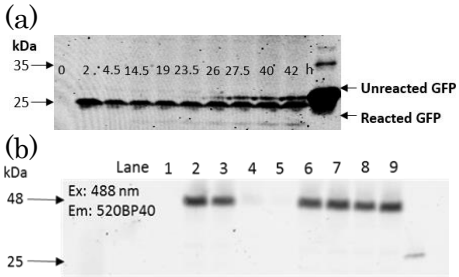

Fig. 1. Results of SDS-PAGE
(a) The result of cell free synthesis reaction and SrtA reaction in liquid phase.(Ex: 488 nm, Em:520BP40)
(b) The result of cell free synthesis including contaminants((Lane1: 0.2 x Sortase Storage buffer, Lane2: Gel filtrered Storage buffer(cell free synthesis buffer）, Lane3: Gel filtrered Sortase A（substituted by cell free synthesis buffer）, Lane4: 1 mM G5-STELLA650, Lane5: 1 mM Fmoc-G5-PEG12-COOH in DMF, Lane6: 2 mM Gly4, Lane7: 1 mM Gly4, Lane8: 0.2 mM Gly4, Lane9:positive control). (Ex: 488 nm, Em:520BP40)

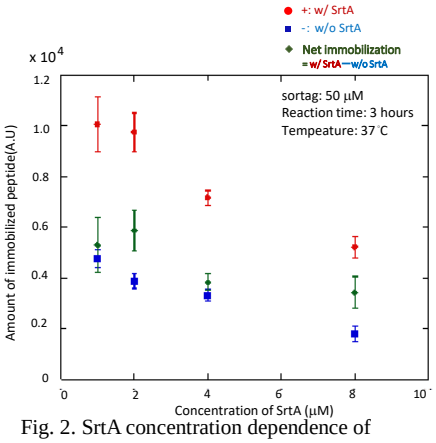

Fig. 2. SrtA concentration dependence of immobilization density (50 μM sortag, 3 hours)

[参考文献] [1]Olaf Schneewind . et al , The EMBO J. 12 , 4803-4811, 199