

Sortase を用いたロバストなタンパク質マイクロアレイの作製

Fabrication of a robust protein microarray using sortase

白形 優依¹、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)

Yui Shirakata¹, Ryo Wakai¹, Shingo Ueno^{1,2}, Takanori Ichiki^{1,2}

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

E-mail: shirakata@bionano.t.u-tokyo.ac.jp

【緒言】 進化分子工学は、タンパク質やペプチドを人工的に改変し、優れた機能を有する生体分子を創出する技術である。分子進化の工程において、多種の改変体の機能をハイスループットに解析する事が重要である。我々は1枚のチップ上に $10^6 \sim 10^7$ 種のタンパク質をその場合合成・固定化したタンパク質マイクロアレイの開発を進めてきた[1]。従来、タンパク質マイクロアレイにおけるタンパク質固定化には配位結合が利用されてきたが、共有結合ではないため結合力が弱く、タンパク質機能解析の際に使用条件が制限される。そこで、ペプチド連結酵素である sortase A (SrtA) に着目した。SrtA は LPXTG (X は任意のアミノ酸) とオリゴグリシンを認識し、LPXT(G)_n という共有結合を形成する酵素である[2]。本研究では、SrtA による結合が Histag による結合と比較して、低い pH に対して安定である事を示した。加えて微細化した凹版印刷技術を生体分子に応用したマイクロインタリオプリント法^[1]を用いて、SrtA による蛍光分子修飾ペプチドのマイクロアレイ作製を行った。

【実験方法・結果】 ニッケルニトリロ三酢酸を修飾した基板上に Histag ペプチド及び EGFP を、ペンタグリシンを修飾した基板上に sortag ペプチドをそれぞれ滴下・固定化した。続いて、pH4.6 のリン酸二水素ナトリウム溶液中で処理を行った後に蛍光観察し、pH に対する安定性を確認した。

ペプチドマイクロアレイ作製方法の概略を Fig.1 に示す。Si ウエハー上に SU-8 でピラーパターンを形成した後、ポリジメチルシロキサン (PDMS) を塗布し、125°C で 30 分間硬化させた。硬化した PDMS を Si ウエハーから剥離することで、マイクロモールドを作製した。酸素プラズマ処理で親水化した PDMS モールド上に、4 μM SrtA と 50 μM 蛍光 (STELLA-650) 修飾 ALPETG ペプチドの混合溶液を滴下し、ペンタグリシン修飾基板を載せ、37°C で 100 分間静置した。1×PBS で基板を洗浄した後に蛍光観察した結果、STELLA-650 修飾ペプチドのアレイ形成を確認した (Fig. 2)。

【参考文献】 [1] M. Biyani *et al.*, *Microarrays*, **4**(3), 311-323 (2015).

[2] O. Schneewind *et al.*, *The EMBO journal*, **12**, 4803-4811 (1993).

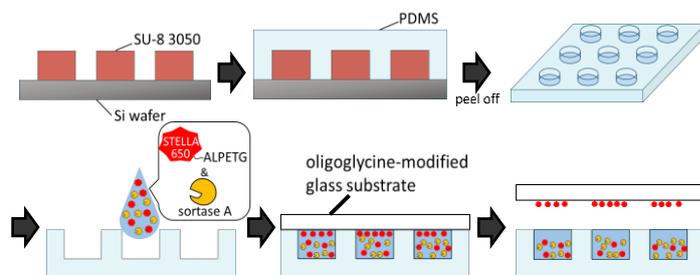


Fig. 1 Schematic illustration of fabrication of peptide microarray by combination of sortase-mediated peptide ligation and microintaglio printing

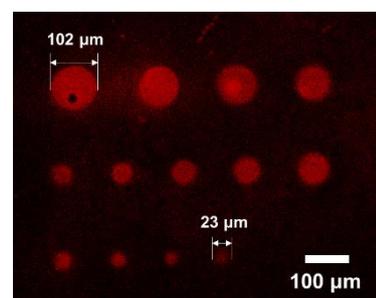


Fig. 2 Fluorescence microscope image of STELLA-650 labeled ALPETG peptide printed on oligoglycine-modified surface