

二段階ペプチド進化によるシステイン-イソチオシアネート間での共有結合形成ペプチドペアの開発

(東大院理¹) ○大野 湧仁¹・Alexander Vinogradov¹・菅 裕明¹

Development of a covalent bond-forming peptide pair between cysteine and isothiocyanate realized by two-step peptide evolution (¹*Graduate School of Science, The University of Tokyo*)
○Yuto Ohno¹, Alexander Vinogradov¹, Hiroaki Suga¹

Isothiocyanate (ITC) is known to react with Cysteine (Cys) to form dithiocarbamate (DTC). However, the reaction is reversible, and therefore DTCs are not stable (**Fig. 1**). In this study, the stability and conjugation kinetics of DTC conjugates were improved specifically to a pair of peptides through a two-step mRNA display (**Fig. 2**). In the first step, Cys peptides which form stable DTCs, were screened against an ITC-containing amino acid derivative (ITC-Bio), and the screening gave the 1st evolution hit (Cys-C1). Next, reactive ITC peptides were evolved against Cys-C1, and the 2nd evolution hit (ITC-L1) was obtained. The cross reactivity of these evolution hits was examined in the presence of Cys-M1, a random Cys-containing sequence. Only the combination of Cys-C1 and ITC-L1 (★) showed high reactivity (**Fig. 3**). Two-step peptide evolution developed in this study has the potential to be applied for tag-probe protein modification.

Keywords : Bioconjugation; Isothiocyanate; Cysteine; Dithiocarbamate; mRNA display

イソチオシアネート(ITC)はシステイン(Cys)と反応しジチオカーバメート(DTC)を形成するが、不安定で逆反応により分解する¹(**Fig. 1**)。本研究では、二段階の mRNA ディスプレイを用い、ペプチド配列特異的に DTC の安定性と形成速度を向上させた(**Fig. 2**)。まず ITC アミノ酸誘導体 (ITC-Bio)に対し安定な DTC を形成する Cys ペプチドを選抜し、第一段階ヒットペプチド Cys-C1 を得た。それに対し高い反応性を示す ITC ペプチドを選抜し、第二段階ヒットペプチド ITC-L1 を得た。Cys を含むランダムに設計された Cys-M1 を加えて、これらのペプチドの反応直行性を検証したところ、二段階進化で得られた Cys-C1 と ITC-L1 の組み合わせ(★)でのみ高収率を達成することに成功した (**Fig. 3**)。本研究で開発された二段階ペプチド進化はタンパク質修飾に用いるタグ-プローブペアの開発に応用できると期待される。

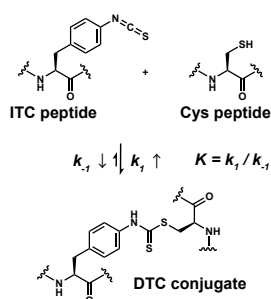


Fig. 1 DTC formation

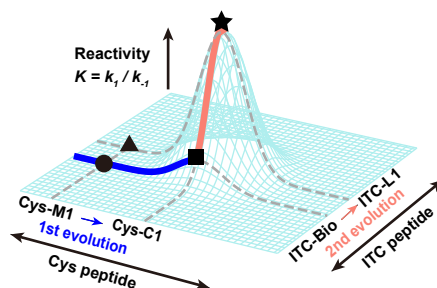


Fig. 2 two-step peptide evolution

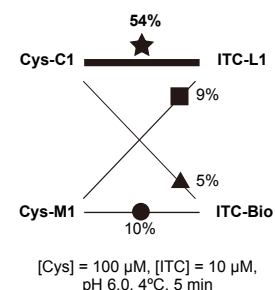


Fig. 3 DTC formation yield

1) Nakamura, T. et al. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, 22, 536.