

反応性タグを用いた相互作用検出系による翻訳後修飾ペプチドと Skp1-Fbox タンパク質複合体との相互作用の検出

(群馬大理工¹・群馬大院理工²) ○巻本亜樹¹・高橋 剛²

Detection of Interactions Between Peptides Bearing Post-Translational Modifications and Skp1-Fbox Protein Complexes Using Reactive Tag-Based Detection Method (¹*Department of Science and Technology, Gunma University*, ²*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*)○Aki Makimoto,¹ Tsuyoshi Takahashi²

SCF (Skp1/Cullin/F-box) complexes act as E3 ubiquitin ligase, and some F-box proteins selectively recognize the substrate proteins bearing post-translational modifications such as phosphorylation and glycosylation. Recently, we have developed a detection method for ligand-protein interactions using reactive peptide tags and an enzyme reconstitution (interaction-dependent native chemical ligation and enzyme reconstitution; IDNCL-ER). We successfully detected the phosphopeptide-protein interactions inside cells using IDNCL-ER. In the present study, we have attempted to detect the interactions of a phosphopeptide with a complex of the F-box protein Fbw7 and Skp1. To do this, the reactive peptide tag and a NanoLuc luciferase fragment were introduced at the N-terminus of Skp1 (NLn-Skp1). His-tagged Fbw7 and NLn-Skp1 were expressed in *E. coli*. A phosphopeptide derived from the C-terminal cyclin E degron was used, and reactive tag was introduced at its C-terminus (CycEdegC-NLc). The binding assay has been performed using NanoLuc-based IDNCL-ER.

Keywords : *post-translational-modification; detection of interaction; E3 ubiquitin ligase ; F-box protein*

複合体型 E3 ユビキチンリガーゼである SCF (Skp1/Cullin/F-box) 複合体は、構成要素に Skp1 と F-box タンパク質をもち、F-box タンパク質のいくつかは、基質タンパク質の翻訳後修飾部位などを認識している。リン酸化や糖鎖修飾などのタンパク質の翻訳後修飾は、タンパク質の高次機能の発現や、様々な機能調節と密接に関連している。そのため、F-box タンパク質と翻訳後修飾部位をもつ基質との相互作用を調べることは、ユビキチン-プロテアソーム分解系の理解のみならず、E3 リガーゼを標的とした分子標的薬開発などに繋がると期待される。当研究室ではこれまでに、反応性ペプチドタグを用いた合成化合物-タンパク質間相互作用検出法 (IDNCL-ER) の開発を行ってきた。本研究では、F-box タンパク質の一つである Fbw7 と Skp1 の複合体と Cyclin E の C 末端領域に由来するリン酸化ペプチドとの相互作用について、IDNCL-ER による検出を試みた (図)。



図. IDNCL-ER による Fbw7-Skp1 複合体とリン酸化ペプチドの相互作用検出。