

分割インテインによるルシフェラーゼ再構成を利用した細胞質ペプチド: *N*-グリカナーゼ活性検出系の構築

(群馬大理工¹・群馬大院理工²・東京都医総研³・理研⁴) ○内林 達也¹・高橋 諭²・石井 希実²・松尾 一郎²・吉田 雪子³・鈴木 匡⁴・高橋 剛²

Construction of a Detection Method for Cytoplasmic Peptide:*N*-Glycanase Activity Using Split Intein-Based Luciferase Reconstitution (¹*Department of Science and Technology, Gunma University*, ²*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*, ³*Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science*, ⁴*RIKEN*) ○Tatsuya Uchibayashi,¹ Satoshi Takahashi,² Nozomi Ishii,² Ichiro Matsuo,² Yukiko Yoshida,³ Tadashi Suzuki,⁴ Tsuyoshi Takahashi²

Cytoplasmic peptide:*N*-glycanase (PNGase) can cleave the linkage between sugar and asparagine side-chain on N-linked glycoproteins. One of the PNGase function is to recruit N-linked glycoproteins into proteasome when the proteins become unnecessary. Evaluating PNGase activity is important to understand the intracellular functions and lifetime of N-linked proteins. However, a convenient method for PNGase activity measurement has not been developed. On the other hand, we have constructed artificial split inteins that have protein trans-splicing (PTS) activity based on *Npu* DnaE intein. In the present study, we have attempted to develop a convenient method for detecting PNGase activity using the split intein-based NanoLuc luciferase reconstitution.

Keywords : cytoplasmic peptide:*N*-glycanase (PNGase); split intein; protein trans-splicing; NanoLuc luciferase

タンパク質の翻訳後修飾の一つである N 結合型糖鎖は、タンパク質の安定性や機能などの制御に重要な役割を果たしている。細胞質ペプチド: *N*-グリカナーゼ (PNGase)は、N 結合型糖鎖をもつ糖タンパク質の糖とアスパラギン側鎖の結合を切断する酵素であり、細胞内において不要となった糖タンパク質のプロテアソームでの分解に関与している。PNGase 活性の低下は、様々な疾患と関係するため、PNGase 活性を調べるためのプローブの開発が望まれている。一方当研究室では、タンパク質トランススプライシング(PTS)活性をもつ分割インテインの開発および PTS 反応に依存した活性型ルシフェラーゼ再構成系の構築を行っている。本研究では、NanoLuc ルシフェラーゼと分割インテインを用いた PNGase 活性の新規検出法の開発を試みた。

11 アミノ酸からなる N インテインと NanoLuc 由来のペプチドを連結したペプチド (Ac-VSGYRCLSGDTEILTA-NH₂; NLs-IntN0S) 中の Asp 残基を *N,N'*-diacetylchitobiose を側鎖に導入した Asn 残基で置換したペプチド (NLs-IntN2S) を合成した。C インテインと NanoLuc 断片を連結したタンパク質 (IntC-NLlg) を作製し、各ペプチドとの PTS 反応を評価した。糖鎖をもつ NLs-IntN2S よりも NLs-IntN0S を用いた時の方が PTS 反応が速く進行した。さらに、NLs-IntN2S を酵母由来 PNGase と反応させ、その生成物を PTS 反応させた結果、PNGase との反応時間に依存して、PTS の反応速度が増大することが分かった。これらの結果から、分割インテインを用いた PTS 反応により、PNGase 活性を追跡できることが明らかとなった。