

## 分割インテインとカナマイシンキナーゼの再構成を利用したペプチド-タンパク質間相互作用の大腸菌内での検出

(群馬理工<sup>1</sup>・群馬大院理工<sup>2</sup>) ○渡辺 雄太郎<sup>1</sup>・高橋 剛<sup>2</sup>

Detection of Peptide-Protein Interactions in *E. Coli* Using Split Intein and Reconstitution of Kanamycin Kinase. (<sup>1</sup>Department of Science and Technology, Gunma University, <sup>2</sup>Graduate School of Science and Technology, Gunma University,) ○Yutaro Watanabe,<sup>1</sup> Tsuyoshi Takahashi<sup>2</sup>

Protein-protein interactions play important roles inside cells. Peptide molecules are good candidates for drug development, because peptides have a potential to inhibit the protein-protein interactions. Screening from a peptide library is useful to discover such bioactive peptides. On the other hand, we have engineered split inteins that have protein trans-splicing (PTS) activity based on *Npu* DnaE intein. We have successfully developed the detection method for peptide-protein interactions using an engineered split intein. In the present study, we have attempted to construct a convenient method for detecting peptide-protein interactions in *E. coli* using the split intein and reconstitution of a kinamycin kinase, aminoglycoside 3'-phosphotransferase (APH).

**Keywords :** split intein; protein trans-splicing; peptide library; kanamycin kinase

合成化合物やペプチドライブラリから、標的タンパク質に結合する分子を獲得する技術が多数開発され、利用されている。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を改良し、通常とは異なる位置で分割したインテインを用いることで、ペプチド-タンパク質間の相互作用に依存して PTS 反応が進行する系の開発に成功した。本研究では、分割インテインとカナマイシンキナーゼである aminoglycoside 3'-phosphotransferase (APH) の分割体を組みあわせ、大腸菌の生存を指標としたペプチド-タンパク質間相互作用検出法の開発を試みた (図)。

相互作用既知のモデルとして、MDM2 タンパク質と PMI (TSFAEYWNLSP) ペプチドを用いた。PMI 配列のいくつかのアミノ酸を Ala に置換した変異体を用い、相互作用の有無による大腸菌の生存への影響を調べた。カナマイシン存在下において、PMI ペプチドを発現する大腸菌は生育した。一方、MDM2 に対する親和性が大きく低下する 7 残基目を Ala に変えた W7A analog では、大腸菌が生育しなかった。このことから、MDM2 と PMI との相互作用に依存して、活性型 APH が大腸菌内で生成し、カナマイシンを無毒化していることが示唆された。

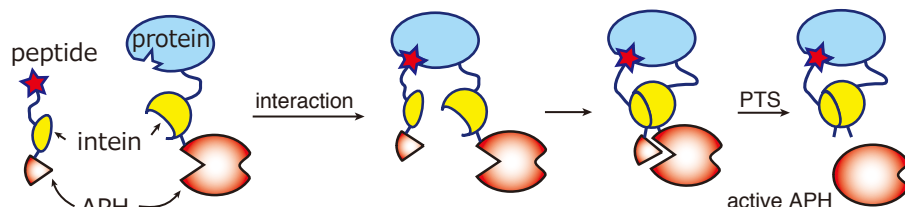


図. ペプチド-タンパク質間相互作用に依存した活性型 APH の生成の模式図.