

## D105

## 酵素を用いた抗体結合ドメインー機能性タンパク質調製法の最適化

(神戸大院工)○(学)坂本 崇幸・(神戸大研究環) (正)田中 勉\*

(神戸大院工) (正)近藤 昭彦

## 【緒言】

抗体は優れた分子認識能をもつ。この抗体に他の機能性タンパク質を結合させた融合タンパク質は疾病の診断や環境汚染物質の測定などの様々な分野で応用されている。現在、このような融合タンパク質は主に化学修飾法で作られているが、化学修飾法ではアミノ酸側鎖のアミノ基やカルボキシル基をターゲットにしているため、目的タンパク質の修飾部位と修飾率が完全に制御できないという問題点がある。

本研究ではタンパク質と抗体を連結するためにタンパク質連結酵素に着目した。連結したい2種のタンパク質に酵素の基質配列であるタグ配列を付加する。そして、酵素によりタグ配列を部位特異的に連結する。この方法を用いることにより、それぞれのタンパク質の元の機能を維持したまま目的の融合タンパク質のみを調製することができる。

しかし、抗体は遺伝子改変が困難であり、これらのタグ配列を付加する事が出来ない。そこで本研究では抗体と Affinity を持ち、かつ遺伝子改変が容易な ZZ ドメインを用いた。この ZZ ドメインにタグ配列を付加させ、連結酵素を用いてタンパク質と結合させる。そして、ZZ ドメインの Affinity を利用してこの ZZ-機能性タンパク質複合体を抗体に結合させることで、抗体-酵素複合体の簡便な調製法の開発を目指した。さらに、目的タンパク質とタグ配列の間に linker を挿入し、その長さを検討することにより反応条件を最適化し、効率良く融合タンパク質を調製することを狙った。

## 【実験方法】

本研究ではタンパク質連結酵素として *Staphylococcus aureus* 由来の SortaseA (SrtA) を用いた。この酵素は基質配列 LPETG を T と G の間で切断し、そこへ N 末端に GG 配列を持つ別のタンパク質を連結する反応を触媒する。本研究では抗体と連結させる機能性タンパク質としてアルカリフォスファターゼ (AP) を選んだ。遺伝子改変により N 末端に連続した5つのグリシンからなる配列を付加した AP (Gly5-AP)、C 末端に LPETG 配列を付加した ZZ ドメイン (ZZ-LPETG) をそれぞれ発現、精製した。これら2種類のタンパク質を混合し、SrtA を加えて 37°C で 24h 静置した。その後、SDS-PAGE によりそれらの複合体である ZZ-AP が得られたかどうか検証した。また、それぞれのタンパク質の機能

についても検証した。

続いて、linker を挿入した ZZ ドメイン (ZZ-lin-LPETG) の発現ベクターを構築し発現、精製した。リンカー配列として ESSGGG、VTVTVTVASASAESSGGG、VTVTVTVLNLNLASASAESSGGG を選んだ。そして ZZ-LPETG と同様に SrtA を用いて Gly5-AP と連結させ、その後 SDS-PAGE により ZZ-AP の収率を比較した。

## 【結果と考察】

Fig.1 より Gly5-AP、ZZ-LPETG、SrtA の3種類が存在するときのみ ZZ-AP に相当する分子量のバンド (85kDa) が確認された。一方で、タグ配列を持たない AP では連結反応は起こらなかった。以上より酵素を用いてタグを介して特異的にタンパク質の連結が可能であることが示された。また、この ZZ-AP 複合体が連結後も抗体への特異的な結合能を有していること、および AP の酵素活性が維持されていることも確認できた。

続いて linker を挿入した ZZ ドメインを用いた場合でも ZZ-LPETG の場合と同様に、タグを介して AP と部位特異的に連結することに成功した。そして、その収率は、VTVTVTVLNLNLASASAESSGGG の linker が最も高い事が示された。

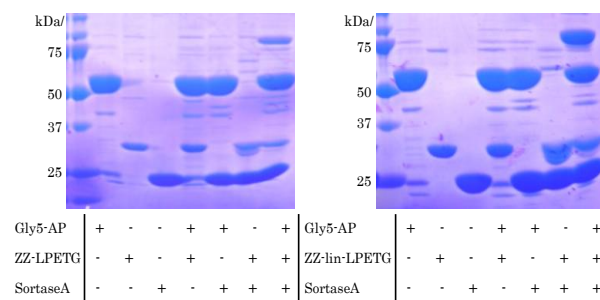


Fig.1 SDS-PAGE analysis of ZZ-AP

## 【結言】

ZZ ドメインを介して抗体-酵素融合タンパク質の新規調製法の開発に成功した。さらに、linker 長を検討することにより、より効率良く融合タンパク質を取得することに成功した。また、本技術は様々な種類のタンパク質を連結可能であり、汎用性の高い優れた手法である。

Tel/Fax:078-803-6202

E-mail:tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp