

D318

部位特異的・共有結合的タンパク質マルチラベル化技術の開発

(九大院工)○(学)安倍 弘喜・(正)神谷 典穂*・(正)後藤 雅宏

1. 緒言

生体内で精巧緻密な機能を発現するタンパク質へ、DNA やリガンド、蛍光物質など複数の機能性物質を組み合わせ、人工的に設計、導入することによって、タンパク質をユニークな機能性バイオ素子へと変換できる。この研究において重要となるのが、複数の機能性物質の導入数の制御およびタンパク質の機能保持である。本研究では、タンパク質間の架橋化反応を触媒する微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) を利用し、MTG による部位特異的 1 ステップマルチラベル化技術の開発を試みた。今回、新規に MTG 認識グルタミン残基を有する多機能化基質 FITC-QG-Biotin を設計し (Figure 1a)、この調製した多機能化基質を MTG の酵素反応を利用して、N 末端に MTG 認識リジン配列を含む大腸菌由来アルカリホスファターゼ (NK6-AP) への導入を試みた (Figure 1b)。また、設計した基質の分子構造が MTG の基質認識に及ぼす影響を検討するため、動力学解析を行った。

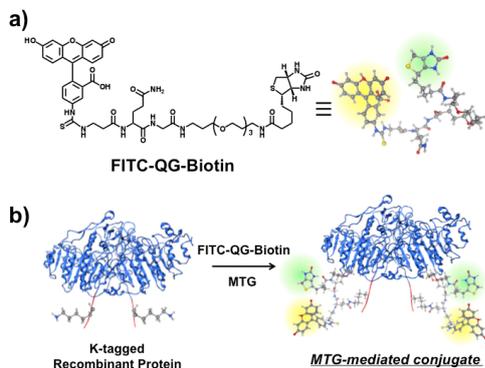


Figure 1 (a) FITC-QG-Biotin の構造
(b) 本研究の概念図

2. 実験操作

2-1. MTG による酵素への多機能化基質の導入評価

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8) 中に、最終濃度がそれぞれ 1 mM、0.5 mg/ml、1 U/ml となるように多機能化基質 (FITC-QG-Biotin)、NK6-AP、MTG を加えた。比較として、野生型のアルカリホスファターゼ (wild-type AP)、すでに MTG の基質となることを知られている FITC-QG、MTG を加えないものを用意した。それらをよく攪拌し、4 °C で 6 時間静置させることで反応を行った。反応後のサンプルに対して、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による解析を行った。SDS-PAGE によって得られたゲルを Bio-Rad 社の蛍光イメージャー FX-Pro で観察することによって比較を行った。

2-2. FITC-QG および FITC-QG-Biotin の動力学解析

100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中に、最終濃度 0.05 U、5 mM、0.5 ~ 2 mM となるように MTG、モデル基質ペプチド (MRHKGS-NH₂)、FITC-QG (あるいは FITC-QG-Biotin) を加え、37°C で酵素反応を行い、HPLC で反応の進行を追跡した。

3. 結果および考察

3-1. MTG による酵素への多機能化基質の導入

Figure 2 より、MTG を加え、NK6-AP と反応させた両基質の Lane において、NK6-AP のバンド位置から FITC に由来する蛍光が見られ、wild-type AP を用いたもの、MTG を加えなかった Lane には蛍光は見られなかった。よって、MTG により NK6-AP のタグ選択的に FITC-QG-Biotin が導入されることを確認した。

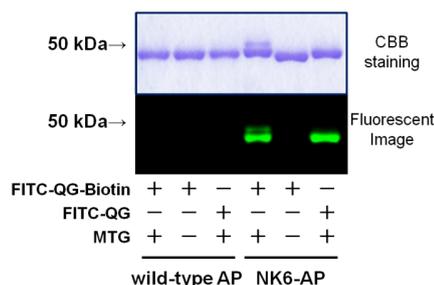


Figure 2 SDS-PAGE 解析結果

3-2. FITC-QG および FITC-QG-Biotin の動力学解析

Table 1 に、実験結果を Michaelis-Menten 式に従って解析し、決定した FITC-QG および FITC-QG-Biotin の動力学定数を示す。結果より、FITC-QG の C 末端に PEG リンカーを介しビオチンを導入しても、MTG の反応性に大きな影響を与えないことが明らかになった。

Table 1 各基質の動力学定数

Substrate	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{M/s}$]	k_{cat}/K_m [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$]
FITC-QG	0.98	3.4	44
FITC-QG-Biotin	1.3	3.2	32

4. 結言

本修飾技術は、対象タンパク質へ定量的かつ安定に異なる機能を導入が可能なることから、厳密な構造・機能制御が必要とされるナノバイオマテリアル創製技術への応用が期待される。

*E-mail. nori_kamiya@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp