

E309

プロテオーム解析技術を用いた プラスチック基板親和性ペプチド候補のスクリーニング

(京工織大工芸科学) (正)熊田 陽一 (学)中塚 一喜 ○(学)村田 祥
(エンプラス) 大瀬 琢人 (京工織大工芸科学) (正)岸本 通雅*

【緒言】

従来、固体表面に親和性を有するペプチドは、ランダムペプチド提示フェージや、大腸菌等のライブラリ中からバイオパンニング法によって単離されてきたが、これらの操作は煩雑な上、非特異吸着による多くの偽陽性クローンの出現によって、単離が困難となる場合が多い。一方、プロテオミクスの発展に伴って、二次元電気泳動やMALDI-TOF MS等の技術が確立され、タンパク質、ペプチドの解析・同定が容易になってきた。このような背景から本研究では、プロテオーム解析技術(二次元電気泳動、MALDI-TOF MS、HPLC等)を用いて、大腸菌の菌体破碎溶液中から、プラスチック親和性ペプチド候補をスクリーニングする手法を開発したので報告する。また本研究では、モデルプラスチック部材として、ポリカーボネイト(PC)ならびにポリメタクリル酸メチル(PMMA)を用いた。

【実験操作】

①親和性タンパク質のスクリーニング

大腸菌の菌体破碎溶液とプラスチック片(表面積約125cm²)を混合し、5時間タンパク質を吸着させた。その後、PBS、超純水でプラスチック片を洗浄し、8M Urea、4% CHAPS 溶液で吸着したタンパク質を溶離した。溶離液を凍結乾燥により約5倍に濃縮し、二次元電気泳動を行い、ペプチドマスマフィンガープリント法で同定した。

②親和性タンパク質のクローニング

親和性タンパク質の遺伝子を、大腸菌ゲノムから PCR によってクローニングし、大腸菌 BL21(DE3)で過剰発現させたところ、インクルージョンボディとして回収された。これらを可溶化し、His Trap HP カラムを用いて精製した。

③親和性ペプチドのスクリーニング

精製したタンパク質溶液と、トリプシン溶液を混合し、37℃で一晩消化することで、各タンパク質のペプチド溶液を得た。このペプチド溶液とプラスチック片(表面積200cm²)を混合し、2時間ペプチド断片を吸着させた。その後、吸着前後での溶液中のペプチド成分の違いを、HPLCにより分析した。吸着後、著しく減少の見られるペプチド断片を回収し、MALDI-TOF MSを用い、アミノ酸配列を決定した。

【結果および考察】

Fig.1に示すように、大腸菌の菌体破碎溶液中から、PCおよびPMMAに親和性を有するタンパク質をスクリーニングしたところ、Malt porin (MLT)、Omp porin (OMP)、Elongation factor Tu (ELN)が回収された。また、これらのタンパク質を遺伝子組み換えにより大量生産し、高純度に回収し、トリプシンおよびキモトリプシンにより、ペプチド断片に分解した。このペプチド断片をプラスチックに吸着させ、その前後でのペプチド成分の違いをHPLCにより分析したところ、Fig.2に示すように著しく減少したペプチドが、PCに対して6種類、PMMAに対して3種類検出され、質量分析によりこれらのアミノ酸配列を決定した。

現在は、同定されたペプチド断片を固相合成し、PCおよびPMMAに対する親和性の評価を行っている。

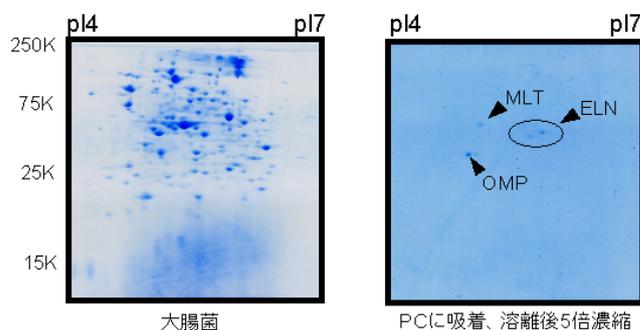


Fig.1 大腸菌サンプルと、PCに吸着・溶離後5倍濃縮したサンプルの二次元電気泳動結果。

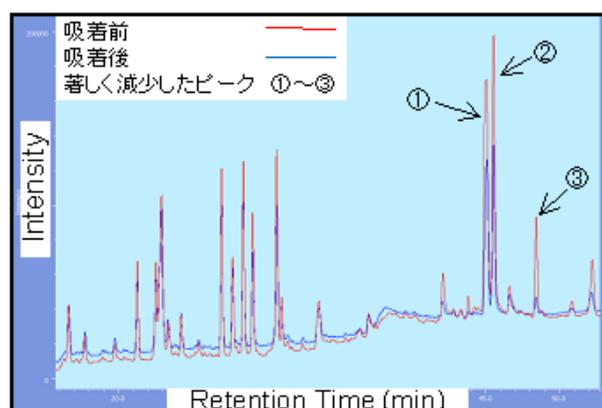


Fig.2 吸着前後のペプチド溶液のクロマトグラム(PC)

※連絡先 : 075-724-7539
kishimoto@chem.kit.ac.jp