

B206

ペルオキシダーゼを利用する新たなタンパク質翻訳後修飾技術の創出

(九大院工)○(学)南畠 孝介・(正)神谷 典穂*・(正)後藤 雅宏

1. 緒言

20種類のアミノ酸によって構成されるタンパク質は、触媒作用や特異的な分子認識能などの優れた特性を有しており、その利用価値は非常に高いものである。タンパク質機能を有効利用する上で、タンパク質修飾技術が大きな役割を果たしており、現在、様々なタンパク質修飾技術が報告されている。その一つとして、遺伝子工学的手法によってタンパク質末端に導入したペプチドタグを用いる方法が挙げられる。そこで本研究では、チロシンを含むペプチドタグを用いたタンパク質架橋技術の開発を目指した。チロシンは通常の生体環境では反応性の低いアミノ酸であるが、その側鎖にフェノール構造を有しており、種々の酸化還元酵素の作用によりフェノールがラジカル化し、共有結合形成および重合化することから、新たなタンパク質修飾技術への応用が期待される。本研究では、モデルタンパク質として *E. coli* 由来 Alkaline phosphatase (以下 BAP) を用い、BAP にチロシンを含むペプチドタグ (Y-tag) を遺伝子工学的に導入し、Horseradish peroxidase (以下 HRP) の酸化反応による Y-tag 導入 BAP の架橋化および固定化を検討した。

2. 実験

2-1. Y-tag BAP の発現

遺伝子工学的手法を用いて、BAP の N 末端にタンパク質精製用のヘキサヒスチジンタグ、C 末端に Thrombin の認識配列 (LVPGRS) および Y-tag (Y1 配列: GGGGY; Y3 配列: GGYYY) を付与した Y-tag BAP を構築した。同様に C 末端側の組換えを行なわない野生型 BAP (WT-BAP) を構築した。C 末端に Y1 タグおよび Y3 タグを付与した BAP を、以下 CY1-BAP ならびに CY3-BAP と略記する。構築した WT-BAP, CY1-BAP および CY3-BAP の発現は大腸菌 BL21(DE3) 株で行なった。

2-2. HRP による Y-tag BAP 架橋の検討

WT-BAP, CY1-BAP および CY3-BAP をそれぞれ、0.2 mg/mL の HRP を含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 液中に 0.2 mg/mL の終濃度で加えた。次に H₂O₂ を複数回に分けて終濃度 100 μM で添加した。H₂O₂ を全て添加後、37 °C で一晩インキュベートした。BAP の複合化は反応溶液の SDS-PAGE により確認した。

3. 結果および考察

3-1. HRP による Y-tag BAP 架橋の検討結果

図 1 に HRP による複合化反応後の BAP の SDS-PAGE

写真を示す。これより CY1-BAP および CY3-BAP に関して、HRP と H₂O₂ が存在する条件で、BAP の 52 kDa 付近のバンドが減少し、255 kDa 以上の高分子側に新たなバンドが確認され、BAP 同士が複数個結合していることが示唆された。一方、WT-BAP に関しては高分子量側に新たなバンドは確認できなかった。このことから、Y-tag の付与が BAP 同士の複合化に大きく関与していると示唆された。

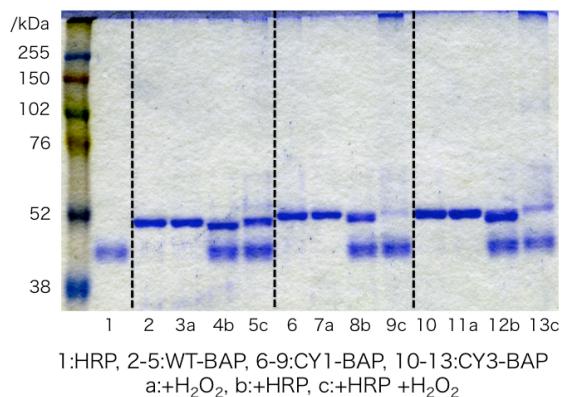


図 1 HRP の酵素反応による BAP の架橋反応

3-2. Y-tag を介した BAP 架橋化の確認

HRP の酵素反応による BAP の架橋化が、Y-tag を介して起きているかを検証するため、Y-tag BAP を Thrombin 処理 (20 U/mL, 37 °C, O/N) し Y-tag を切断した後に、HRP による架橋化を検討した。図 2 に SDS-PAGE による解析結果を示す。

図 2 より、Thrombin 処理により Y-tag を切断した Y-tag BAP は、CY1-BAP および CY3-BAP ともに架橋化しなかった。このことから HRP の酵素反応による BAP の架橋化は Y-tag 内のチロシン残基特異的に進行していることが示唆された。

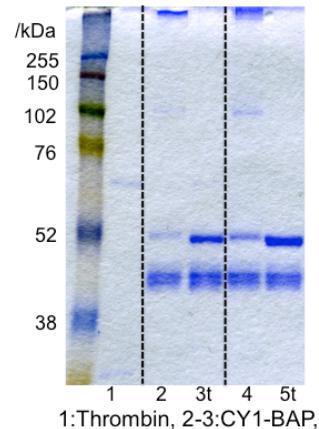


図 2 Thrombin 処理後の Y-tag BAP の架橋反応

4. 結言

Y-tag のチロシン残基は HRP によって効率良く基質認識され、BAP の架橋複合体の調製に成功した。

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