

L20

高反応性トランスグルタミナーゼ基質ペプチド配列の探索

(九大工) ○(学)尾上 佳大・(九大院工) (正)神谷 典穂・(学)南畠 孝介・
(学)安倍 弘喜・(学)毛利 剛・(正)後藤 雅宏・(名大農) 人見 清隆

[緒言]

微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) は、グルタミン (Q) 側鎖とリジン (K) 側鎖等の 1 級アミン間の架橋反応を触媒する酵素である。MTG の基質となるペプチドをタグとしてタンパク質へ導入することで、MTG 反応を介した部位特異的タンパク質修飾が可能となる。しかし、既往の MTG 基質ペプチド配列は反応性が低く、架橋反応を十分に進行させるには過剰量の基質添加が必要であった。MTG による架橋反応を低基質濃度で定量的に進行させるためには、高い反応性を有するペプチド配列の取得が必要である。そこで本研究では、Q 側の基質ペプチドについて、ファージディスプレイ法を用いて高反応性配列の探索を行った。また、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いる評価系を構築し、得られたペプチド配列の反応性について考察した。

[実験、結果および考察]

ファージディスプレイ法を用いた Q 側基質の探索

本検討では、K 側の基質として既存の MTG 基質配列 (MKHKGS) を選択し、その N 末端がビオチン修飾されたペプチド (biotin-MKHKGS) を用いた。biotin-MKHKGS と 7 残基のアミノ酸で構成されるランダムペプチドを提示したファージライブライアリを MTG 反応により架橋し、ビオチン化したファージをアビジングゲルにより回収することで高反応性 Q 側基質ペプチド配列を提示したファージを濃縮した (Fig. 1)¹⁾。このファージの DNA 配列を解析し、基質ペプチド 1 (peptide 1) を得た。

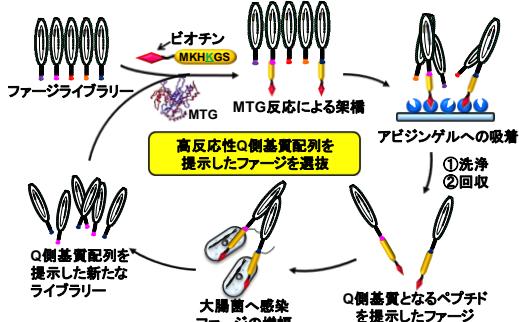


Fig. 1 ファージディスプレイ法の概要

FRET 阻害効率を指標とする MTG 反応性の評価

Q 側基質の N 末端側アミノ酸残基が MTG 活性部位との相互作用に重要であるという考察に基づき、peptide 1 の N 末端側のアミノ酸残基を除いた peptide 2 及び 3 を合成し、MTG の活性測定用 Q 側基質として汎用される Z-QG との比較検討を行った。方法として、対照配列に蛍光基 RhodamineB を導入した peptide 3 (Rho) と N 末端に MKHKGS 配列を導入した緑色蛍光タンパク質 (NK-EGFP) が、MTG 反応を介して架橋されることで生じる FRET が、各種ペプチドの添加によりどの程度阻害されるかを指標とする評価系を構築した (Fig. 2)。

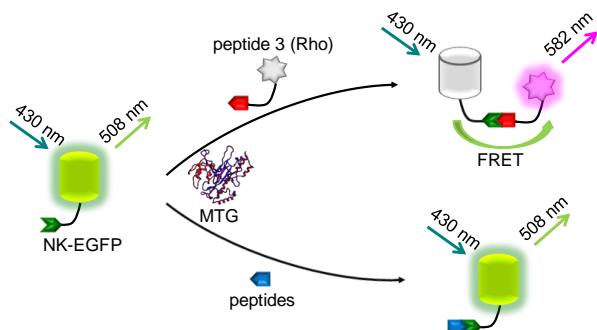


Fig. 2 FRET 阻害効率に基づく反応性の評価系
[反応温度 20°C ; pH 8.0 ; [MTG] = 0.1 U ; [peptides] = [peptide 3 (Rho)] = 10 μM ; [NK-EGFP] = 0.1 μM]

検討の結果、いずれのペプチドも Z-QG に比べ極めて高い FRET 阻害効率を示した。また、N 末端側のアミノ酸残基の性質と有無が、MTG の基質認識に大きな影響を与えることが示唆された。結果の詳細と考察については、講演にて発表する。

[結言]

ファージディスプレイ法により MTG の新たな Q 側基質配列を見出した。得られたペプチド配列の反応性は既往の基質よりもはるかに高く、N 末端側のアミノ酸残基が基質認識の鍵を握ることが示された。

[参考文献]

1. Sugimura et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **477**, 379-383 (2008)