

分割インティンと分岐ペプチドを用いた触媒的タンパク質スプライシングの開発

(群馬大院理工) ○高橋 剛

Development of catalytic protein splicing using split intein and branched peptide (*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*) ○Tsuyoshi Takahashi

Inteins are self-excising protein segments that ligate their flanking sequences (N-extein and C-extein) in protein splicing. Inteins are widely used as a protein engineering tool in biotechnology and chemical biology. Split inteins can perform protein trans-splicing (PTS) resulting in ligation of the two distinct polypeptides. Inteins are single turnover enzymes that splice out during the splicing reaction. Therefore, intein molecules could not participate repeatedly in the reaction. In protein splicing, the N-extein unit is transferred to a cysteine, serine, or threonine at +1 position via the thioester or ester bond resulting in formation of a branched intermediate. In the present study, I have attempted to construct a catalytic protein splicing using a branched peptide, and to develop a detection method for ligand-protein interactions using the catalytic protein splicing.

Keywords : *Intein; Protein trans-splicing; Branched intermediate; Ligand-protein interaction*

インティンは、自身に連結しているポリペプチド鎖(エクステイン)を継ぎ合わせ、自分自身を切り出す活性(タンパク質スプライシング)をもつ酵素様のタンパク質である。タンパク質スプライシングでは、N エクステインがインティンの 1 残基目の Cys または Ser の側鎖と(チオ)エステルを形成した後、C エクステイン 1 残基目(+1)の Cys、Ser または Thr の側鎖にエステル転移し、分岐構造をもつ中間体が生成する。その後、インティンが切り出されることで、エクステインが天然のペプチド結合で繋がる。分割インティンは、2つのインティン断片(N インティン、C インティン)間の自発的会合により、2つの異なるポリペプチド鎖を連結させる活性(タンパク質トランススプライシング; PTS)を示す。当研究室はこれまでに、分割インティンの改良や、分割位置の変更により、自発的な会合を抑制した分割インティンを設計し、分割インティンに合成化合物と標的タンパク質をそれぞれ連結させることで、化合物-タンパク質間の相互作用に依存して PTS 反応が進行する系の構築を行ってきた¹⁾。しかし、インティンによるスプライシング反応は、シングルターンオーバーであり、一般的な酵素反応のように、何度も繰り返して反応に関与することはできない。

本研究では、タンパク質スプライシング反応の中間体として生成する分岐ペプチドを用いることで、インティンが繰り返し反応に関与する触媒的タンパク質スプライシングの開発を目的とした。また、この系を用いて、合成化合物とタンパク質間の相互作用を蛍光検出する方法の構築を試みた。

1) H. Hagiwara, E. Fujii, T. Iwabuchi, T. Takahashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2024**, 97, uoae019.