

分割インテインを用いたペプチド-タンパク質間相互作用検出法への環状ペプチドの利用

(群馬大理工¹・群馬大院理工²) ○宇部 早波¹・信澤 佳奈²・高橋 剛²

Application of cyclic peptides for detection method for peptide-protein interactions using split intein (¹*Department of Science and Technology, Gunma University*, ²*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*) ○Sanami Ube¹, Kana Nobusawa², Tsuyoshi Takahashi²

To find the peptides capable of binding to the target proteins, several screening methods using peptide library have been developed, such as phage display and mRNA display. In particular, cyclic peptides have excellent properties as therapeutic agents due to their high stability and cell permeability, and the cyclic peptides can be selected using these methods. On the other hand, we have constructed a selection method for peptides that bind to a target protein using an engineered split intein in *Escherichia coli*. Using this method, we successfully selected the peptides that bind to murine double minute (MDM2). However, only 20 canonical amino acids are used in the peptide library in the split intein-based method. In the present study, we have attempted to employ non-canonical amino acids capable of reacting with cysteine sulfhydryl group to construct the cyclic peptide library.

Keywords : *Cyclic peptide; Intein; Protein splicing*

がんなどの疾患に関連するタンパク質に特異的に作用するバイオ医薬品の開発が盛んに行われている。ペプチド骨格をもつ中分子医薬品は、抗体などと比べ合成が容易であることから、近年注目されている。標的分子に特異的に結合するペプチドを創製するために、ペプチドライブラリから標的タンパク質と結合する分子を探索する方法が多数報告されてきた。特に、環状構造をもつ環状ペプチドは、直鎖状ペプチドと比較して生体内安定性が高く、標的タンパク質との結合親和性や特異性に優れたペプチドを得やすいなどの利点がある。

一方、当研究室ではこれまでに、タンパク質トランススプライシング (PTS) 活性を持つ分割インテインを用いて、ペプチド-タンパク質間相互作用に依存して PTS 反応が進行する系の開発を行ってきた¹⁾。これにより、ペプチドライブラリから PTS 反応の生成物として、カナマイシンを無毒化する aminoglycoside phosphotransferase を用いることで、大腸菌の生育を指標として、ペプチド-タンパク質間の相互作用の有無を判別できる。これを利用して、20 種類の標準アミノ酸からなるペプチドライブラリから、標的タンパク質に結合するペプチド探索法の開発に成功した。

本研究では、分割インテインを用いた標的タンパク質結合ペプチド探索法に適用可能なペプチド環化反応について検討した。Cys 側鎖のスルフヒドリル基と反応する *p*-(2-chloroacetamido)-phenylalanine (caaPhe) や *p*-(2-bromoethoxy)-phenylalanine (beoPhe) を導入したタンパク質を大腸菌内で効率よく発現するためのアミノアシル tRNA 合成酵素変異体の構築や発現条件について検討した。

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