

Tag Pol-3 インテインの改変とスプライシング活性の評価

(群馬理工¹・群大院理工²) ○大友 真歩¹・高橋 剛²

Engineering of Tag Pol-3 intein and evaluation of their protein splicing activities
(¹*Department of Science and Technology, Gunma University*, ²*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*) ○Maho Otomo¹, Tsuyoshi Takahashi²

Inteins are self-excising protein segments that ligate their flanking sequences in protein splicing. Inteins are classified into 3 classes based on sequence and the mechanism of splicing. Most inteins are members of class 1, and contain three conserved nucleophiles, serine, threonine, or cysteine. Inteins are widely used in a protein engineering field. However, widely used inteins contain Cys residues at position 1 and/or +1, and the reactions must be performed under reducing conditions. In the present study, we have attempted to develop active intein variants based on Tag Pol-3 intein that does not contain the Cys residue, and to evaluate the protein-splicing activity of the engineered inteins. Split β -lactamase is used as the extein, and the protein splicing can be characterized by β -lactamase activity.

Keywords : *intein*

インテインは、その両端に繋がっているポリペプチド鎖（NおよびCエクステイン）を連結させるタンパク質スプライシング活性をもつ酵素様のタンパク質である。インテイン部分が分割された分割型インテインは、2つのポリペプチド鎖を連結させることができるため、タンパク質工学分野で広く利用されている。これまでに、天然型だけでなく、人工的に分割した分割インテインが多数開発されている。これら汎用的に使われているインテインは、主にクラス 1 に分類されるものであり、インテインのスプライシング活性に必要なアミノ酸として、インテイン 1 残基目に Cys または Ser、C エクステイン 1 残基目に Cys、Ser、または Thr をもつ。特に、高いスプライシング活性をもつインテインの多くは、活性残基としての Cys をもっているため、スプライシング反応は、還元的条件下で行う必要がある。一方、抗体に薬物を修飾した抗体薬物複合体（Antibody-drug conjugates; ADC）などは、次世代抗体医薬として期待されているが、分割インテインを用いたタンパク質ラベル化法は、抗体などのジスルフィド結合をもつタンパク質への適用が困難である。本研究では、酸化的条件下でも反応が進行するシステインをもたないインテインの 1 つである、*Thermococcus aggregans* 由来 TagPol-3 インテインに着目し、高いスプライシング活性をもつ Tag Pol-3 インテイン変異体の構築を試みた。

スプライシング活性を簡便に評価するために、エクステインとして、 β ラクタマーゼ (β LA) を用いた。TagPol-3 インテイン遺伝子に、エラーブローン PCR によりランダムに変異を導入し、ライブラリを作製した。TagPol-3 インテインライブラリを大腸菌ペリプラズムで発現させ、アンピシリンを含む培地中で培養を行うことで、スプライシングが進行して活性型 β LA が生成するクローンの選別を試みた。