

タンパク質固定化用アフィニティタグを開発しています。

プロテオーム解析技術を用いるアフィニティペプチドタグの効率的スクリーニング技術

■キーワード

アフィニティペプチドタグ プロテオーム解析技術 タンパク質の配向制御 スクリーニング

■研究の概要

■背景

タンパク質の固定化技術は、固定化酵素、イムノアッセイ、クロマトグラフィ、DDS等、バイオプロセスならびに医療分野を中心に広く利用されています。特に、プラスチック基板表面へのタンパク質の固定化技術はタンパク質固定化チップ(Protein Chip)等の構築において極めて重要であり、基板表面への高集積化ならびに配向制御法の開発が強く要求されています。

■目的

従来、用いられてきた物理吸着法や共有結合法によるタンパク質の固定化は、密度、生理活性、配向性の3者を高く維持することが困難です。本研究では、機能的タンパク質のプラスチック基板表面への配向固定を目的とし、当該タンパク質の末端部に「のりしろ」となるペプチドタグのスクリーニングを行っています。基板表面に特異的かつ高親和的に相互作用するペプチドタグがスクリーニングできれば、任意の機能的タンパク質を高密度・高活性・高配向に固定化することが可能となります。

■内容

本研究では、近年、バイオチップへの利用が検討されつつある2種類のプラスチック基板(ポリカーボネート(PC)、ポリメタクリル酸メチル(PMMA))に対するアフィニティペプチドタグのスクリーニングを実施しました。右図に示すごとく、大腸菌タンパク質群を一次ライブラリとし、二次元電気泳動ならびにPMF法によってプラスチック基板に対して高親和的に作用するタンパク質を単離・同定・クローニングしました。さらに、これらが大腸菌によって高発現し、これらをトリプシンまたはキモトリプシンによってペプチド断片に分解しました。プロテアーゼ消化産物中からPC、PMMAそれぞれに高親和的に作用するペプチドタグ候補をHPLCによって分離し、MALD-TOF MSによって分子量を同定、さらに親和性タンパク質のアミノ酸配列と親和性ペプチド候補の分子量を基に親和性ペプチドのアミノ酸配列を決定しました。これらのペプチドタグはPC、PMMA基板に対して強い親和力を有し、タンパク質固定化用のペプチドタグとしての有用性が示されました。

■研究・技術のプロセス/研究事例

■応用

本研究で開発したアフィニティペプチドタグは、PC、PMMA両基板へのタンパク質の固定化に極めて有効であると考えられ、現在、ペプチドタグ融合酵素の固定化実験を行っています。

また、本スクリーニング技術を応用すれば、有機・無機材料を問わず様々な固体表面に対して高親和的に作用するペプチドタグを極めて効率的に獲得可能です。

したがって、医療用プラスチックやバイオセンサー、マイクロアレイチップ基板、分離単体等に対する親和性ペプチドの獲得も可能であり、応用範囲はきわめて広いと考えられます。

■研究・技術のポテンシャル

■将来展望

本研究で獲得したポリカーボネート親和性ペプチド(PC-tag)ならびにポリメタクリル酸メチル親和性ペプチド(PMMA-tag)は、バイオチップ基板上への抗体・酵素等の高密度・高活性・高配向な固定化に極めて有効であると考えられ、現在、それらの検討を行っています。また、別プロジェクトとして半導体センサー基板表面に親和的に作用するペプチドタグの開発も行っています。

■セールスポイント

本技術を用いれば、あらゆる固体表面に対して高親和的に付着するペプチドタグを取得できます。さらに、取得したペプチドタグを用いて様々なバイオ分子を固体表面上に提示できます。

