

N-4

膜表在性タンパク質 D-アミノ酸脱水素酵素の大量発現と精製条件検討

Study of overexpression and purification of membrane-associated protein D-amino acid dehydrogenase

○佐藤理来¹, 谷川実², 西村克史³Riku Sato¹, Minoru Tanigawa², Katsushi Nishimura³

1. 緒言

近年の研究により D-アミノ酸が生体内で重要な役割を持つことが明らかになってきた.¹⁾ しかし、高濃度の D-アミノ酸は、菌の生育阻害を引き起こすため生体内での D-アミノ酸分解が必要となる.¹⁾ その D-アミノ酸分解を担う酵素の一つが膜タンパク質である D-アミノ酸脱水素酵素 (DAD) である. DAD は D-アミノ酸の酸化時に生じた電子を電子伝達系に渡す生体内で重要な役割を持っている.

膜タンパク質には、膜貫通型と膜表在性タンパク質があり、それらの多くは重要な生体反応に関与していることから、医薬品のターゲットとなりうる. しかし、発現量が少なく疎水性タンパク質が多いため精製や結晶化が容易に行えず作用機序や立体構造の特定が難しい. また、膜表在性タンパク質である DAD は疎水性部分が活性に大きく影響していることから、結晶化報告例がない.

本研究では、いまだ N 末端側の膜貫入部位の構造決定がされていない *Escherichia coli* K-12 (*E. coli*) 由来の DAD を、組換え大腸菌を用いて大量発現させ、His タグアフィニティーカラムを用いた精製条件検討し、結晶化に向けた精製条件の確立を目的とした.

2. 実験方法

2.1. DAD の可溶化

E. coli 由来の DAD をコードする遺伝子を導入したプラスミドを C41 (DE3) に形質転換した. 目的タンパク質と His タグの間にプロテアーゼ切断部位の配列を組み込んだ.

組換え大腸菌を LB 培地で振盪培養 (25°C, overnight) し、その後遠心分離により集菌した. 菌体を 1 μM FAD および 500 mM NaCl を含む Tris-HCl (pH 8.5) 緩衝液で懸濁し、フレンチプレスを用いて破碎 (100 MPa, 8 times) した. 破碎液を遠心分離 (140,100 g, 4°C, 1 h) したのちの沈殿物を、界面活性剤を含む緩衝液で一晩可溶化した. 可溶化後、遠心分離 (140,100 g, 4°C, 1 h) し、上澄みに可溶化膜画分を得た.

得た各サンプルに対し、His タグ抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、可溶化膜画分で単一バンドが得られた.

2.2. 金属アフィニティーカラムクロマトグラフィー

を用いた精製条件検討

His タグアフィニティーカラムを用いて精製する際に、使用する buffer に添加するものを検討した. 添加したものは、タンパク質の安定性を向上させるための Glycerol, DAD の疎水性領域を保護するための界面活性剤である.

また、使用する His タグアフィニティーカラムに関しては、Co²⁺タイプの Talon と Ni²⁺タイプの Ni-NTA の二つを使用した.

3. 結果

まず、Tween 20 を用いた精製では、溶出画分にタンパク質が確認でき DAD 活性も確認できた. しかし、再度同様の実験を行ったところ活性を確認できず再現性の低い結果となった.

次にトロンビンをを用いた精製では、プロテアーゼ切断部位で切断されず、洗浄画分に目的タンパク質が確認され、活性もなかった.

さらに Glycerol を用いた精製では、溶出画分で目的タンパク質を確認できたが DAD 活性はなかった.

上記の条件での精製は、Talon カラムクロマトグラフィーを用いており、カラムに充填されている金属が精製後の活性に大きく影響していることが示唆された. そのため Ni-NTA カラムクロマトグラフィーを用いた精製を行った.

最後に、10% Glycerol, 0.5% Triton X-100 を添加し、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーを用いて精製を行った. その結果、溶出画分で単一バンドが確認でき (Fig. 1), その画分をサンプルとして DAD 活性測定を行ったところ、活性を確認できた.

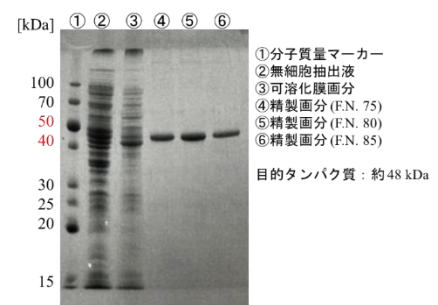


Fig. 1. 精製条件検討後の SDS-PAGE 結果

4. 参考文献

1) 宮本 哲也, D-アミノ酸学会誌 7(1), 2018, p.1-3