

D314

オートトランスポーターを用いたペプチド表層提示系の検討

(岡山大院自然) ○ (正) 今中洋行*, 植田久子, (正)今村維克, (正)中西一弘

[緒言]

オートトランスポーター(AT)はグラム陰性菌特有の細胞外膜局在膜タンパク質である。ATは、ポリペプチド鎖のN末端側にあるパッセンジャードメイン(Psg)の表層提示過程 (Fig. 1)においてエネルギーを使わないこと、関与するタンパク質が少なくシステムが極めてシンプルであること、バイオ分子輸送以外の生理的機能を有さないことなどの理由により、その有効な利用法の開発が期待されている^[1,2]。

我々は、新規なATタンパク質である*Rhodanobacter* sp. strain LP7315由来のモノグリセリドリパーゼ(MGL)より見出したATドメインを用いて各種バイオ分子の大腸菌細胞表層提示系の検討を進めてきた^[3,4]。本研究では、ペプチドの大腸菌細胞表層提示システムをより詳細に調査すべく、各種ペプチドの細胞表層提示効率について種々の検討を加えた。

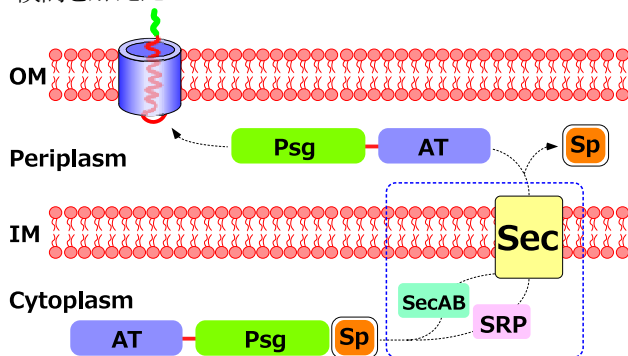


Fig. 1 オートトランスポーターによる膜輸送システム

[実験]

各種発現ベクターの構築

PelBシグナル配列(PelBss)またはクローニングした大腸菌由来のDsbAssを有するpET-22b(+)ベクターにペプチドコーディング配列をそれぞれ挿入し、各種発現ベクターを構築した。

各種ATタンパク質の発現および局在

LB-amp培地中で発現用プラスミドを保持する大腸菌BL21(DE3)形質転換体を培養し、終濃度 0.1 mMのIPTGにより 30°Cで各種ATタンパク質の発現を誘導した。集菌・洗菌後、それぞれ全菌体サンプルを調製した。そして、ペプチドの局在はフローサイトメトリー(FACS)、内膜輸送効率についてはウェスタンブロットティングによって調べた。

[結果および考察]

まず、PelBシグナル配列(PelBss)を用いたFLAG-tagの表層提示を試みた。ウェスタンブロットティングおよびFACS解析の結果、十分な内膜輸送(シグナル切断)効率および表層提示量が得られることがわかった。一方、他のペプチド(PS19; RAFIASRRIKRP, SS25; ADGDGEWTSGR, RevSS25; RRGSTWEGDGDA)の表層提示に関しては、PelBssを用いた場合、FLAG-tagの場合と比べて、内膜輸送効率の大幅な低下がみられた。そこで大腸菌内膜輸送系に関して、Sec依存型のPelBssに加えて、SRP依存型で、共翻訳的な内膜輸送系で機能するDsbAssの利用についても同様の検討を行った。しかし、ウェスタンブロットティングの結果 (Fig. 2), シグナル配列をSec依存型のPelBssからSRP依存型のDsbAssに改変しても、PS19およびRevSS25ではシグナル配列の切断を示唆する低分子量側のバンド(pro)を確認することができなかった。

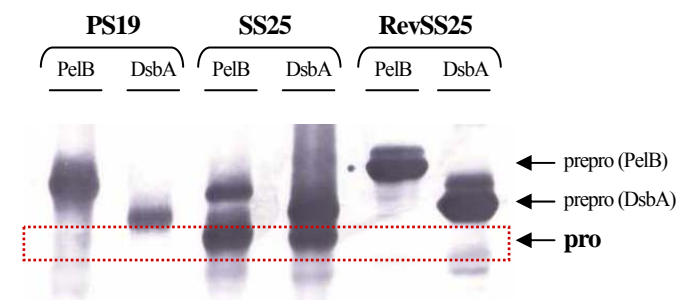


Fig. 2 各種ペプチド連結 AT のウェスタンブロット解析

そこで、これらのサンプル(PS19およびRevSS25)についてFACS解析を行ったところ、やはり蛍光のピークシフトはどちらもわずかしか見られず、ペプチドの表層提示はほとんどなされていないことが分かった。したがって、シグナル配列の改変(PelBss→DsbAss)が内膜輸送効率に及ぼす影響は小さいことが明らかとなった。一方で、推定シグナル配列切断部位下流のアミノ酸配列が、安定なペプチド表層提示に最も重要な要素であることが示唆された。

[References]

- [1] M. Desvaux et al., *Res. Microbiol.*, **155**, 53-60 (2004)
- [2] I.R. Henderson et al., *Microbiol. Mol. Biol.*, **68**, 692-744 (2004)
- [3] 今中ら, 化学工学会第 39 回秋季大会, 30P045 (2007)
- [4] 今中ら, 化学工学会第 74 回年会, Q108 (2009)

*Tel. : 086-251-8202, Fax : 086-251-8264

E-mail : imanaka@cc.okayama-u.ac.jp