

D317

基質認識配列周辺の構造変化を利用した酵素反応の制御

(東大院工)○(学)山村裕一, (正)平川秀彦, (正)山口哲志,(正)長棟輝行*

【緒言】

近年、複数の酵素の空間配置を制御することにより逐次反応の反応効率の向上が可能であることが報告されており、複数のタンパク質の連結を制御することの重要性は増しつつある。しかし、遺伝子工学的な融合タンパク質は連結数が多くなるほどミスフォールディングが起りやすく、活性型として発現させるのは難しい。そこで、タンパク質を別個に発現させた後、融合する技術の開発が重要である。

黄色ブドウ球菌由来のトランスペプチターゼであるソルテース A (SrtA) はアミノ酸配列 LPXTG を認識し、N 末端に GG 配列を有するペプチドまたはタンパク質 (グリシンドナー) をペプチド結合で連結する。SrtA による反応は可逆反応であるため、逆反応の抑制が収率向上に繋がると期待される (Fig.1)。

トリプトファン同士の疎水性相互作用により β -hairpin 構造を形成するペプチド (Trp zipper) が報告されている。反応収率の向上を図るため、我々は基質認識配列周辺に Trp zipper を導入することにより、連結後に認識配列に β -hairpin 構造をとらせ、逆反応の抑制を図った。

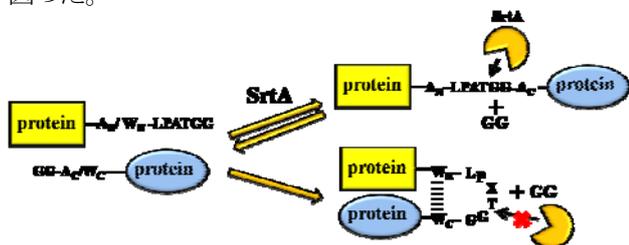


Fig.1 連結反応および逆反応のスキーム

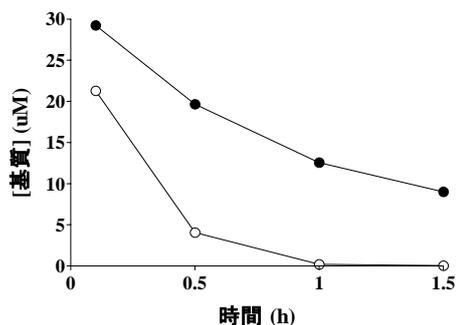
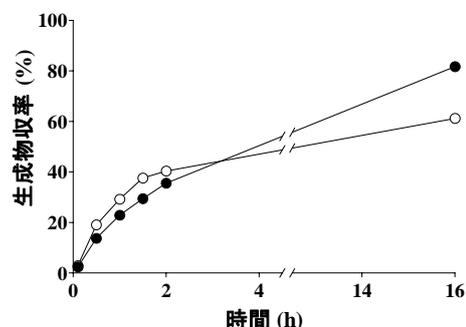
【結果および考察】

まず我々は、トリプトファンを導入した LPATGG を含むペプチド (W_N -LPATGG- W_C) が β -hairpin 構造を形成することを確認するために、円偏光二色性測定により 2 次構造を評価した。固相合成法で作製した W_N -LPATGG- W_C は 208 nm に負のコットンが見られ、 β -hairpin 構造を形成していることを確認した。

次に、 W_N -LPATGG- W_C が SrtA の基質となるかどうかを調べた。グリシンドナーとして Gly₃ を用いてチオレドキシニン (Trx) とマルトース結合タンパク質 (MBP) を W_N -LPATGG- W_C で連結した Trx- W_N -LPATGG- W_C -MBP の SrtA による切断反応を SDS-PAGE によって評価した。また、コントロールとして W_N , W_C をアラニンに置換した Trx- A_N -LPATGG- A_C -MBP も同様に評価した。その結果、 β -hairpin 構造を形成することにより Trx- W_N -LPATGG- W_C -MBP は、Trx- A_N -LPATGG- A_C -MBP

P に比べて切断されにくいことが明らかとなった (Fig.2)。

そして、Trx- W_N -LPATGG- W_C -MBP を生成する Trx- W_N -LPATGG と GG- W_C -MBP の連結反応 (反応 1)、および Trx- A_N -LPATGG- A_C -MBP を生成する Trx- A_N -LPATGG と GG- A_C -MBP の連結反応 (反応 2) の経時変化を SDS-PAGE によって評価した。連結反応の初速度は反応 2 の方が大きかったのに対して、16 時間後における生成物濃度は反応 1 が高かった (Fig.3)。既往の研究により、グリシンドナーの N 末端から 3 番目以降のアミノ酸も反応速度に影響を及ぼすことが明らかになっており、グリシンドナーに含まれるトリプトファンが反応速度を低下させたためと考えられる。また、 β -hairpin 構造は逆反応を阻害するために、反応 1 は反応 2 より反応収率が向上したと考えられる。したがって、基質認識配列周辺のアミノ酸を最適化することにより生成物収率を向上させることが可能であることが示された。

Fig.2 基質濃度の経時変化 (Trx- A_N -LPATGG- A_C -MBP (○), Trx- W_N -LPATGG- W_C -MBP (●)), 反応条件: [基質]=30 μ M, [SrtA]=15 μ M, [Gly₃]=1 mMFig.3 生成物収率の経時変化 (Trx- A_N -LPATGG & GG- A_C -MBP (○), Trx- W_N -LPATGG & GG- W_C -MBP (●))

*E-mail : nagamune@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp

Tel : 03-5841-7328, FAX : 03-5841-8657