

VanX の発現系と精製法の改良		
黒田研究室	03251501	朱田梨恵

【背景・目的】 バンコマイシンはグリコペプチド系抗生物質のひとつであり、近年、日本では MRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)の治療薬として用いられている。しかし約 20 年前にバンコマイシン耐性を持つ腸球菌(VRE)の存在が報告されてから現在までに、様々な国でも同様の耐性菌が確認され、VRE 対策などの研究に注目が集まっている。その研究対象の一つに Van 酵素群がある。今回の研究に用いた VanX はバンコマイシン耐性に関与する遺伝子の一つであり、一旦形成された D-Ala-D-Ala ジペプチドを加水分解する活性を持ち、ペプチドグリカンの中の D-Ala-D-Ala が D-Ala-D-Lac に構造置換することでバンコマイシンの D-Ala-D-Ala への結合を阻害し、耐性を獲得することが分かっている。

現在、VanX 酵素の立体構造は X 線結晶構造解析により決定されているが、NMR においては、十分なスペクトルが得られておらず、サンプル調製や測定条件を改良する必要があった。そこで本研究では、VanX の NMR を用いた基質相互作用等の解析用サンプルの調製における可溶化を目的とし、精製過程で分子間 S-S 結合が影響しているであろう問題になっている 78,157 残基目の 2 つのシステイン残基をアラニンまたはセリンに置換するなどの簡略化を試みた。

【方法】 VanX 内の二つのシステイン残基をそれぞれアラニン、またはセリンに置換した 4 種類の変異体 C78S/C157S, C78S/C157A, C78A/C157S, C78A/C157A を QuikChange site-Directed Mutagenesis Kit を用いて作製した。その後 His-tag 精製を用いた精製の単純化を可能にする為に、pET-11a から N 末端側に His-tag をもつ pET-15b に VanX を導入し、大腸菌による大量発現条件を、宿主、温度、IPTG 添加量、培養時間などから検討した。その後、C78A/C157A における大量発現および精製、CD スペクトルからの構造の確認を行った。

【結果と考察】 VanX 内の 4 種類の変異体 C78S/C157S, C78S/C157A, C78A/C157S, C78A/C157A を作製し、変異導入をシークエンスで確認後、ベクターへの組換えを行い、発現チェックを行った。VanX (C78A/C157A) が最も上清画分で発現する条件として、宿主 BL21(DE3)/pLysS を使い、O.D.0.6 で IPTG を添加後、37°C で 4 時間培養を用い、大量培養を行った。ソニケーション後のサンプルは His アフィニティーカラムを用いて精製し、Tof Mass による確認後、CD 測定により、二次構造をとっていると思われるスペクトルを得ることができた。今後の方針として、C78A/C157A のスペクトルが VanX と全く同じ二次構造を保持しているかを CD スペクトルの比較から行い、他の変異体についても同様に比較検討し、NMR 解析用サンプルの簡略化を試みたい。

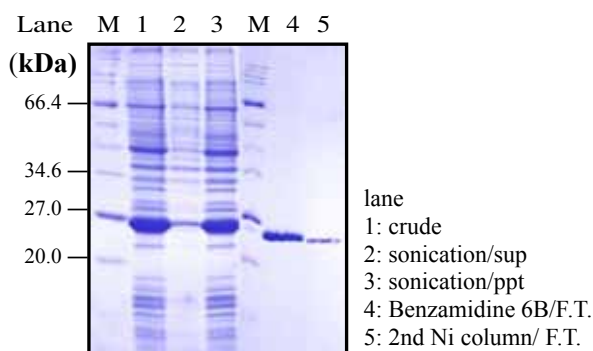


図 1.SDS-PAGE VanX(C78A/C157A)の精製過程

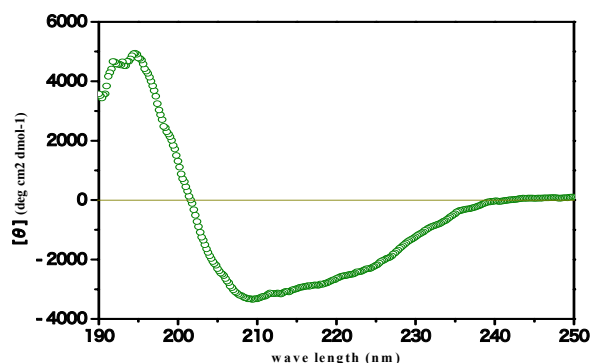


図 2.C78A/C157A の CD 測定

測定条件：濃度 4.3 μ M