高溶菌活性を持つ VanX 変異体の探索		
黒田研究室	06251023	木村 俊太

[背景・目的]

大腸菌からのタンパク質精製において細胞破砕は必要不可欠な過程である。通常、細胞破砕では超音波などにより細胞壁を破砕するが、これらの方法はタンパク質の凝集や変性の原因となり得るためより穏和な条件での細胞破砕系が求められている。本研究室ではこの課題を解決するためにVanXを用いた新規の細胞破砕系の開発を行っている。

VanXはバンコマイシン耐性遺伝子群の一つで、細胞壁の構成要素であるD-Ala-D-Alaを加水分解するジペプチダーゼである。当研究室で VanX の大腸菌内発現実験を行ったところ、VanXを25℃で発現させると細胞壁合成を阻害し、大腸菌の溶菌が起こることを発見した。この特性を利用して目的タンパク質と VanX を共発現させることにより、物理的ショックを与えることなく目的タンパクを細胞外へ溶出させることを可能とする新規細胞破砕系の開発研究を行っている。

そこで本研究では、VanX を利用した新規細胞破砕系の開発における目的タンパク質の収率向上を目的とし、その実現のために高溶菌活性型のVanX変異体の検索を行った。

[方法]

<変異体の作成> VanX Wild Type(WT)を鋳型にしてQuikChangeによる一残基ランダム置換、及びErrorPronePCRによるランダム置換を行い、変異体プラスミドを作成した。QuikChangeによる変異導入部位は、立体構造からの機能への関連性の推定、及び類似配列との比較によるアミノ酸保存度による検討を行った上で73Lys、115Ser、121Alaとした。作成した変異体プラスミドでBL21(DE3)を形質転換し、各シングルコロニーをZYM-5052培地に植菌し12hr培養した。

<スクリーニング> 上述の培養液に対して核酸染色試薬(PI)による蛍光測定、及び培養液の濁度測定による高溶菌活性変異体のスクリーニングを行った。PI は正常な膜を持つ細胞には透過せず、損傷した膜を持つ細胞にのみ透過し核酸を染色するため、本研究では菌体の溶菌の有無や程度を測定するために用いた。希釈した培養液と PI を反応させ、Typhoon8600により蛍光を測定した。培養液の濁度は20mMリン酸バッファーで10倍希釈し590nmでの吸光度を測定した。

<溶菌活性の評価>溶菌活性は BL21(DE3) を形質転換後、LB培地でO.D.0.8～0.9まで37℃で培養し、IPTG添加後、25℃あるいは 30℃で培養を行い 30 分毎に濁度を測定してO.D.曲線を作成し、IPTG添加後4時間後のO.D.(od4)を溶菌の指標とした。Fig.1にWTのO.D.曲線を示す。

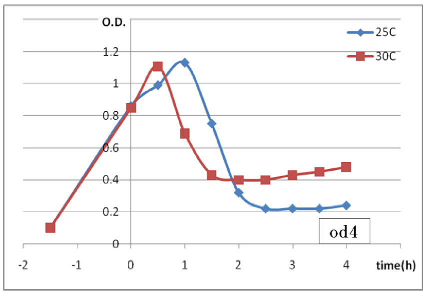

Fig.1：WTのO.D.曲線

[結果及び考察]

<検出された変異体の評価>

25℃および30℃で溶菌活性を測定した各変異体はDNAシークエンシングにより配列確認を行った。すでに D-Ala-D-Ala ジペプチダーゼ活性が 3 倍に上昇する変異体として報告されているS115Aだが、溶菌活性では明らかにWTより低下していた(Table 1参照)。よって溶菌活性はジペプチダーゼ活性と直接の比例相関は持たないと考えられる。

次に、25℃での測定においてWTと同程度の溶菌活性を示す変異体を8検体発見し、その中でもR128C、A84Tについては30℃での測定においてWTよりも少し高い溶菌活性を示した(Table 1参照)。

立体構造でこの2つの変異体の変異部位を確認すると、活性部位から離れていることが分かり、酵素の活性の変化ではなく、安定性の変化が溶菌活性を上昇させたと考えられる。

今後、本研究で得られた高溶菌活性変異体を前述の新規細胞破砕系に導入し、目的タンパクの収率向上を検討したい。

Table1： 各変異体の od4 値

	WT	A84T	R128C	S115A	K73C	K73V	M80L	S115C	A121C	A121S
25℃	0.24	0.24	0.25	0.54	0.26	0.28	0.36	0.34	0.33	0.36
30℃	0.48	0.39	0.39	1.35	0.48	0.61	0.76	1.17	1.12	1.19