

ダイズ由来生理活性ペプチドの大腸菌を用いた生産

生命分子化学講座 応用菌学分野

加藤里佳

【背景・目的】 ダイズタンパク質 β -コングリシニンの β サブユニット 51-63 番目の配列 (β 51-63pep) は、食欲抑制ホルモンの一種コレシストキニン (CCK) の放出促進作用を持つことが認められている。一方食事由来タンパク質による CCK 放出機構は未だ完全には解明されていない。CCK 放出機構解明のため、大腸菌を用いたダイズ由来生理活性ペプチド β 51-63pep の生産系を確立することを本研究の目的とした。

【方法】 大腸菌による β 51-63pep の大量発現を行うため、 β 51-63pep をコードする遺伝子を持つ発現用ベクターを構築した。初めに、Overlap Elongation PCR 法により β 51-63pep を直接 7 回繰り返しコードする DNA を作製した。7 回繰り返し DNA を挿入した pDEST15-dir7copy ベクターを構築した。pDEST15-dir7copy ベクターによって形質転換された *E. coli* BL21-AI 株に、GST 融合タンパク質 GST-dir7copy として発現させた。次に、強塩基性である β 51-63pep とその電荷を解消する酸性ペプチド配列を交互に 2 回繰り返しコードした配列を持つ pDEST15-fus2copy ベクターを構築した。酸性ペプチドは β -コングリシニンのアミノ酸配列を参考に設計した。pDEST15-fus2copy ベクターにより形質転換された *E. coli* BL21-AI 株において、GST 融合タンパク質 GST-fus2copy としての発現を誘導した。

【結果・考察】 pDEST15-dir7copy ベクター上にコードされた GST-dir7copy の発現を誘導した。GST タグによるアフィニティークロマトグラフィー、N 末端アミノ酸配列の決定、MALDI TOF-MS によるペプチドマスフィンガープリンティング解析などにより、GST-dir7copy は発現したことが証明された。しかし、強塩基性 β 51-63pep を 7 回繰り返す GST-dir7copy は強塩基性タンパク質であり、分析・精製が困難であった。より効率的な生産系を確立させるため、pDEST15-fus2copy ベクターを構築し、酸性ペプチド配列と β 51-63pep を融合させた GST-fus2copy の発現を誘導した。GST タグによる簡易精製後の SDS-PAGE にて、GST-fus2copy と思われるタンパク質バンドが確認された。しかし、アミノ酸組成分析や質量分析、CNBr 分解後のペプチドの同定では、GST の C 末端側に位置する酸性ペプチドや β 51-63pep の存在を証明することができず、GST-fus2copy 全長が発現していることを確認できなかった。GST-fus2copy と思われていたタンパク質について MALDI TOF-MS により質量分析を行ったところ、GST-fus2copy の翻訳が途中で停止している可能性が高いと考えられた。 β 51-63pep の生産系として、2 つの発現ベクターを構築したが、生産系の確立・工業化のためには他のタンパク質との融合や他の宿主微生物を検討する必要がある。