

26PB-am007

百日咳菌由来アミノペプチダーゼ N (PepN) のクローニング

高口 寛子¹, ○中村 裕喜¹, 渡邊 峰雄², 廣村 信¹, 小川 和加野¹, 松原 大¹ (¹第一薬大, ²北里生命科学研究所)

【目的】百日咳菌はアミノ酸に対する栄養要求性が高いことが知られている。以前我々は、百日咳菌ペプチダーゼのスクリーニングにより、アミノペプチダーゼ N(PepN)活性が高いことを明らかにしている。百日咳菌由来の PepN の結晶構造解析は行われておらず、この構造解析により栄養獲得機構の詳細究明を行うことが可能と思われる。今回の研究において、百日咳菌由来の PepN の結晶構造解析および役割について検討することで、PepN の遺伝子クローニング、活性発現条件の確立を目指した。

【方法】 *Bordetella pertussis* Tohama 株由来のゲノム DNA を鋳型として用い、PCR にて増幅、DNA フラグメントをプラスミド pET28a へ導入した後、大腸菌 BL21(DE3) へと形質転換を行った。形質転換を行った大腸菌 BL21(DE3)/pBOKM3,4,6,7 を用い、LB 培地にて培養を行いサンプルとした。サンプルに対し Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 濃度、培養温度の条件検討を行い、L-Alanyl β-naphthylamide (Ala-βNA) を用いた活性測定、SDS-PAGE による PepN 発現確認を行った。

【結果・考察】 LB 培地を用いた実験では IPTG による発現誘導の制御ができず、特定条件下での再現性のない制御に留まった。LB 培地による制御は条件が非常に厳しいと判断し、最少塩培地を用い再度サンプル調整を行い、SDS-PAGE を行った結果、IPTG によるコントロールが可能であることが示唆された。しかし、現時点では活性発現が不十分であり、大部分が凝集体として発現していると考えられる。今後は温度、IPTG 濃度等の条件検討を行うことで活性発現条件を検討し、大量生成を目指していく。