

# ω-エチニル型脂肪酸を用いた エイコサペンタエン酸修飾タンパク質の探索

SATテクノロジー・ショーケース2015

## ■ はじめに

南極海水より単離された低温適応性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は 4 °C でエイコサペンタエン酸 (EPA) を合成する。本菌の EPA 合成遺伝子を欠損させた EPA 欠損株 ( $\Delta$ EPA) は、低温での生育速度が低下し、外部添加された EPA により生育が相補されたことから、EPA は本菌の低温環境適応において生理的に重要な役割を担うことがわかっている。これまでに、本菌が細胞分裂サイトに EPA 含有リン脂質から成るマイクロドメインを形成することや、EPA 含有リン脂質が外膜ポーリンタンパク質の生産量や構造形成に影響することを明らかにしている。一方で、パルミチン酸やミスチン酸によるタンパク質の脂肪酸修飾がタンパク質の活性や局在を調節していることが知られている。本研究では、EPA によって特異的に修飾されるタンパク質を探索した。

## ■ 活動内容

### 方法・結果

#### 1. ω-エチニル型 EPA を用いた EPA 修飾タンパク質の探索

EPA 修飾タンパク質の検出・単離・同定を試みた。生体内においても極めて高い官能基選択性でヒュスゲン環化付加反応することが知られているアジドとアルキンによるクリックケミストリーを利用するため、EPA の  $\omega$  末端にエチニル基を導入した clickable EPA (cEPA) を全合成した (Fig. 1)。



Fig. 1 化学合成した cEPA の構造

cEPA を添加した液体培地で、野生株および  $\Delta$ EPA を生育させた。得られた菌体からタンパク質粗抽出液を調製し、アジドビオチンとのクリック反応により EPA 修飾タンパク質を標識した。アジドビオチンと結合した EPA 修飾タンパク質をストレプトアビジンでアフィニティー精製した。精製した EPA 修飾タンパク質の PMF 解析から、dipeptidyl carboxypeptidase (Dcp) のホモログが同定された。本菌の Dcp ホモログには、リポタンパク質中で広く保存されている脂質結合モチーフ配列 (-Leu-Ser-Ala-Cys-, リポボックス) が見いだされた。以上の結果から、本菌の Dcp ホモログはリポタンパク質であることが示唆された。

## 2. LC-MS を用いた Dcp の修飾様式の解析

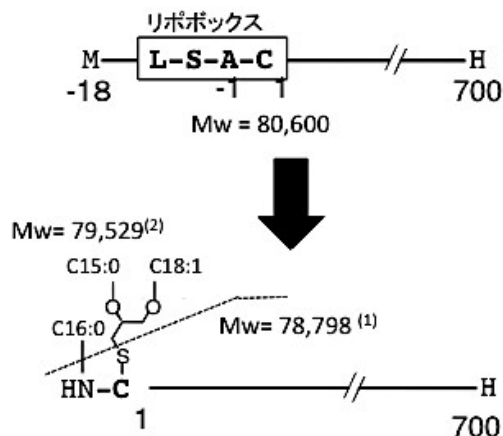


Fig. 2 水溶性 Dcp の予想される修飾様式

- (1) N 末端シグナル配列を除く Dcp の分子量
- (2) 精製タンパク質の MS 解析から予想される成熟型 Dcp の分子量

タンパク質は脂質修飾されることで疎水性が上昇し、細胞膜への局在性や活性が制御され得る。本菌において、Dcp が EPA によって修飾される可能性が示されたことから、EPA の有無が Dcp の膜局在性におよぼす影響を解析した。His タグ融合型 Dcp 高発現ベクターを本菌の野生株および  $\Delta$ EPA に導入した。

4 °C で培養した野生株、および  $\Delta$ EPA の親水性画分と疎水性画分から、His タグ融合型 Dcp をそれぞれ精製した。野生株の可溶性画分から精製した Dcp を LC-MS 解析に供した結果、 $m/z = 79,530$  の単一ピークが得られた。 $\Delta$ EPA の可溶性画分から精製した Dcp から同様の  $m/z$  値を示すピークが検出された。Dcp の一次構造から、シグナル配列を含む未成熟な Dcp の分子量は約 80,600 と予想されたことから、本菌において Dcp は翻訳後修飾されることが示された。本タンパク質の N 末端から 16~19 残基の位置に細菌の脂質修飾タンパク質に高度に保存されている共通配列 (リポボックス) が見いだされており、質量分析の実測値から、可溶性画分に由来する Dcp の N 末端には本菌体内に多く存在するペンタデシル酸 (15:0)、パルミチン酸 (16:0)、およびオレイン酸 (18:1) などの EPA 以外の脂肪酸が結合していることが示唆された (Fig. 2)。

代表発表者 河合 総一郎 (かわい そういちろう)

所属 京都大学 化学研究所  
健康工学研究部門

問合せ先 〒611-0011 京都市宇治市五ヶ庄  
TEL: 0774-38-3241