

2B11-2 イネのセリンデヒドラターゼ/ラセマーゼ: Mg²⁺による酵素反応の制御機構

○郷上 佳孝, 伊藤 克佳, 松島 由貴, 老川 典夫
(関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科)

[目的]D-アミノ酸は、生体内に存在する希少アミノ酸と考えられてきたが、近年分析技術の発達に伴い、ヒトなどの哺乳動物の体内に遊離型D-アミノ酸が存在することが明らかにされ、その由来や生理的機能が注目されている。イネのセリンラセマーゼはセリンのラセミ化と脱水反応を触媒する多機能酵素である。本研究では本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を調べ、本酵素の二つの酵素反応の制御機構を解明することを目的とした。

[方法]イネのセリンラセマーゼホモログ遺伝子 (*Os-serh*) を高発現ベクターに挿入し大腸菌で発現させ、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーを用いて精製後、デヒドラターゼ活性およびラセマーゼ活性に及ぼす金属イオンの影響を調べた。デヒドラターゼ活性はサリチルアルデヒド法、ラセマーゼ活性はHPLCにより生成物を定量し測定した。

[結果及び考察]本酵素のデヒドラターゼ活性はFe²⁺、Al³⁺、ATPで活性化され、Mg²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺により阻害された。またラセマーゼ活性はMg²⁺、Ca²⁺で活性化され、Zn²⁺、Cu²⁺、ATPにより阻害された。反応速度論的解析より Mg²⁺ の添加は本酵素のラセマーゼ活性の触媒効率を高めることが明らかとなった。このことから Mg²⁺ が本酵素の二つの酵素反応の調節に関与している可能性が示唆された。

Serine dehydratase/serine racemase from *Oryza sativa* L.: Regulation of enzyme reaction by Mg²⁺

○Yoshitaka GOGAMI, Katsuyoshi ITO, Yuki MATSUSHIMA,
Tadao OIKAWA
(Dept. Life Sci. &Tech., Fac. Chem., Materials & Bioeng., Kansai Univ.)

Key words oryza sativa L., serine racemase, serine dehydratase

2B11-4 ポリエチレンイミン (PEI)- グルタチオンキャリアーを用いた GST- 融合タンパク質の細胞導入

○村田 等¹, 二見 淳一郎¹, 北添 翠¹, 小坂 恵¹, 多田 宏子¹,
甲斐 敬², 妹尾 昌治¹, 山田 秀徳¹
(¹岡山大学, ²日本触媒)

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質は大腸菌による発現システムにおいて目的タンパク質が活性型で得られやすいこと、グルタチオン固定カラムにより簡単に精製できることから、タンパク質取得の方法としてよく用いられる。通常、GST融合タンパク質は*in vitro*の解析に用いられるが、もしGST融合タンパク質を簡便に細胞内に導入し、細胞内での解析ができれば、*in vitro/in cell*での機能の比較などが可能になり、より便利である。そこで我々はGSTとグルタチオンの相互作用に着目し、カチオン性ポリマーであるポリエチレンイミン (PEI) にグルタチオンを連結したGST融合タンパク質の細胞内導入キャリアー (PEI-グルタチオンキャリアー) の合成を行った。この合成の過程で1つのPEIに複数のグルタチオンを連結したものが GST 融合タンパク質を細胞内に導入できることを見出した。またタンパク質導入法では主にエンドサイトーシス様の経路でタンパク質が細胞内に取り込まれており、エンドソームから細胞質への放出が重要な課題であった。そこで様々な化学修飾を施したPEI-グルタチオンキャリアー誘導体を合成し、エンドソームを不安定化するものを検索したところ、1,3-ブタジエンをPEIの末端に付加することでGST融合タンパク質を細胞質に効率良く放出することができた。

Intracellular delivery of GST-fused proteins by polyethylenimine-glutathione conjugates

○Hitoshi MURATA¹, Junichiro FUTAMI¹, Midorji KITAZOE¹,
Megumi KOSAKA¹, Hiroko TADA¹, Takashi KAI², Masaharu SENO¹,
Hidenori YAMADA¹
(¹Okayama university, ²Nippon-shokubai)

Key words polyethylenimine, glutathione, GST, protein-transduction

2B11-3 フジツボ水中接着蛋白質の固相化タグとしての利用

○紙野 圭¹, 漆田 洋平¹, 中野 雅博¹, 森 陽一¹, 田畑 泰彦²
(¹海洋バイオ研, ²京大再生医科研)

唯一の付着性甲殻類フジツボは、cementと呼ばれる細胞外蛋白質複合体を分泌して、自己のカルサイトを主とする殻底と、合成高分子から金属、生体表層にいたるあらゆる外来基質とを、水中で強固に接着する。これまでの研究者らの研究により、19kDaと20kDaの2種の蛋白質（以下cp-19kおよびcp-20k）が接着基質表層への吸着に関与することが明らかとなっている。いずれも翻訳後修飾を受けていない単純蛋白質であることが確認されており、大腸菌での可溶性組み換え蛋白質の調製系も確立した。QCM-D およびSPRによる解析から、前者は合成高分子から酸化金属にいたる様々な材質表層に単一分子層相当量で吸着する“マルチプル表層吸着蛋白質”であり、後者はカルサイトおよびいくつかの金属にのみ単一分子層相当量吸着する“特異的表層吸着蛋白質”であることも明らかとなっている。本研究では、生物モチーフ配列の固相化タグとしての本蛋白質の利用を目的とした。

インテグリン認識配列 (G-R-G-D-S-P-G) の両端にCを付加した配列が、それぞれの水中接着蛋白質遺伝子のC末端側に融合するように、cDNAを調製した。組み換え蛋白質はNi固定化カラムおよびイオン交換カラムにより精製した。精製挙動はそれぞれのオリジナル蛋白質の精製とほぼ同じであった。精製蛋白質の QCM-D の挙動を調べたところ、オリジナル蛋白質とほぼ同等の吸着性を保持していた。これら蛋白質の細胞接着に及ぼす影響についても報告する。

Utilization of barnacle underwater adhesive proteins as immobilization-tag

○Kei KAMINO¹, Youhei URUSHIDA¹, Masahiro NAKANO¹,
Youchi MORI¹, Yasuhiko TABATA²
(¹Marine Biotech. Inst., ²Inst. Frontier Med. Sci., Kyoto Univ.)

Key words adhesion, immobilization, cell immobilization

2B11-5 昆虫細胞を利用したヒト β1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ 2 の生産及び精製

○百嶋 崇¹, 仁科 拓也², 石切山 元希², 朴 龍洙¹
(¹静大・創科技院・統合バイオ, ²静大・農・応生化)

【目的】ヒト由来の糖タンパク質の構造解析に用いる試料は、真核生物で生産したタンパク質を使用する方が好ましい。そこで宿主としてタンパク質の発現量が比較的多く、翻訳後修飾が起こる昆虫細胞を選択した。また精製を容易にするためにHisタグを利用し、さらに目的タンパク質をGFP融合タンパク質として発現させた場合について、培養上清からの精製方法を検討した。

【方法及び結果】発現用の細胞には、ヒト β1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ 2 (β3GnT) を GFP 融合タンパク質として発現するTn-5 細胞由来の形質転換株を使用した。これを無血清培地で浮遊培養して得た上清を精製法の検討に使用した。まず精製に使用する緩衝液のpHおよび4℃における培養上清の安定性を確認した後、Ni Sepharoseを利用したアフィニティークロマトによる精製を行った。イミダゾールで溶出した画分を回収して透析したサンプルは、糖鎖解析に利用できる純度であった。さらに立体構造解析用サンプルとするために、融合タンパク質の切断の検討を行った。

Production of human beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 using insect cell and its purification

○Takashi DOJI¹, Takuya NISHINA², Motoki ISHIKIRIYAMA²,
Enoch Y PARK¹
(¹Integ. Biosci, Sect., Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ²Dept. Appl. Bioi. Chem., Shizuoka Univ.)

Key words beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2, Insect cell