

2Kp18 LEAモチーフペプチド共発現による組換えタンパク質の高効率発現

○池野 慎也, 春山 哲也
(九工大院・生体工)
haruyama@life.kyutech.ac.jp

【目的】

タンパク質を大腸菌等の細胞内で大量発現させると、発現させたタンパク質は封入体となる場合が多く、そのことが目的タンパク質の大量生産の支障となっている。この課題を解決するため、発表者らは植物と一部の動物に存在する乾燥ストレス耐性タンパク質：Late Embryogenesis Abundant Protein (LEAタンパク質)に着目した。このタンパク質をモチーフとして作成したペプチドを封入体形成の抑止剤として有用することで、高効率にタンパク質発現を行う発現系の構築を検討した。

【方法及び結果】

Dual発現ベクターの各プロモーターの下流に、LEAタンパク質の主配列を繰り返し反したペプチド遺伝子とGFP遺伝子を挿入し、共発現ベクターを構築した。その形質転換大腸菌に発現誘導剤を添加することにより、細胞内にGFPおよびLEAタンパク質のモチーフペプチド (LEAペプチド) を共発現させ、経時ごとにその発現効率の向上を検討した。11アミノ酸からなるペプチドを共発現したとき、共発現させなかったときと比べてGFP発現量が2倍増強することを確認した。一方、主配列を繰り返したペプチドを共発現させた場合、その繰り返し数が増える度にGFPの発現量が減少した。また、発現誘導4時間後のGFPのmRNA量をReal-time PCRを用いて確認したところ、各サンプル間のmRNA量に違いが見られなかった。本ペプチドの作用機序としては目的遺伝子の転写量が変わらないことから、発現したペプチドが目的タンパク質の凝集を抑止する、または目的タンパク質のフォールディングを促進することで目的タンパク質の生成量が向上していると考えられる。

Boost protein expression by using coexpression of LEA-like peptide

○Shinya Ikeno, Tetsuya Haruyama
(Grad. Sch. Life Sci. System Eng., Kyushu Inst. Tech.)

Key words protein expression, *Escherichia coli*, peptide, expression system

2Kp20 耐熱性ポリリン酸キナーゼ2 (PPK2) の探索とATP再生系への利用

○半田 智大, 本村 圭, 廣田 隆一, 岡田 真以, 池田 丈, 黒田 章夫
(広島大院・先端・生命機能)
hirota@hiroshima-u.ac.jp

【目的】ATPは多くの生合成反応に必要なエネルギー物質であり、リン酸化反応をはじめとする多くのバイオプロセスにおいてその効率的な供給が求められる。ポリリン酸キナーゼ (PPK) は、ATPから無機リン酸のポリマーであるポリリン酸を合成するが、その反応は可逆的である。ポリリン酸は非常に安価であるため、PPKの逆反応を利用したATP再生系は、ものつくりのためのATP再生系として非常に有用である。近年、従来型のPPK (PPK1) とは構造が異なるPPK2が *Pseudomonas aeruginosa* より単離され、PPK1に比べATP合成活性が高いことが示された。そこで、本研究ではPPK2を用いたATP再生系を構築し、その有効性を評価することを目的とした。

【実験方法・結果】 *P. aeruginosa* のPPK2配列を元にデータベース検索を行った結果、数種類の好熱性細菌において相同遺伝子が見出された。これらの遺伝子をpETベクターにクローニングし、*E. coli* Rosetta2 (DE3) 内で発現させた。次にこれらの組み換えタンパク質の精製を行い、生化学的解析を行った。これらのタンパク質は全てPPK活性を示し、基質としてADPのみではなくAMPも利用できるという特徴を有することが分かった。さらに、*Thermus thermophilus* HB27由来のPPK1と比較し、PPK2はATP合成活性が高いことが明らかとなった。

Isolation of thermophilic polyphosphate kinase 2 (PPK2) and its application to ATP regeneration system

○Tomohiro Handa, Kei Motomura, Ryuichi Hirota, Mai Okada, Takeshi Ikeda, Akio Kuruda
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words polyphosphate kinase, phosphate, ATP regeneration

2Kp19 亜リン酸デヒドロゲナーゼを用いたNADH再生系の構築

○廣田 隆一, 山根 章太郎, 藤渕 達也, 池田 丈, 黒田 章夫
(広島大院・先端・生命機能)
hirota@hiroshima-u.ac.jp

酵素反応における補酵素類再生系の開発は、工業レベルでの酵素反応利用において非常に重要な課題である。なぜなら、補酵素類の多くは高価であり、必要量を外部から反応等量添加するプロセスは経済的に成立しないためである。そこで、安価な還元剤から補酵素を連続的に生成する、効率的な補酵素再生系の開発が強く求められる。当研究室では、これまでに、耐熱性酵素を利用したバイオ反応プラットフォームと、耐熱性ポリリン酸キナーゼとポリリン酸を用いた、安価なATP再生系を確立した。本研究では、さらに多様な生合成反応に対応するために、高い反応効率と実用レベルでの使いやすさを兼ね備えるNADH再生系の確立を試みた。亜リン酸デヒドロゲナーゼ (PtxD) は、亜リン酸に依存してほぼ不可逆的にNADを還元し、NADHを生成する。また、亜リン酸は非常に安価であることや、この反応では酵素反応を阻害する副反応物が生成しないことなどから、ものつくりのためのNADH再生酵素として非常に有望であると考えられる。本研究では、*Ralstonia* sp. strain 4506株から単離したPtxDを用いてNADH再生系を構築し、医薬品合成の前駆体として用いられるL-*tert*-leucineの合成系においてその有効性を検証した。

Construction and characterization of an NADH regeneration system using phosphite dehydrogenase

○Hirota Ryuichi, Shotaro Yamane, Fujibuchi Tatsuya, Ikeda Takeshi, Kuroda Akio
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words NAD(P)H, Phosphite dehydrogenase, Phosphite, Cofactor regeneration

2Kp21 気生微細藻類産生プロテアーゼのカゼイン分解性

○清水 康平, 油井 信弘, 阿部 克也
(工学院大・工・応化)
bt10335@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】岩場やコンクリート塀など、栄養源が少ない基物表面で生活している気生微細藻類はユニークな生物機能を持っている。本報告では、気生微細藻類が有機窒素源としてカゼインを取り込む過程について検討を行うとともに、産生した細胞外プロテアーゼの精製およびカゼイン分解性について検討した結果を述べる。

【方法】本研究で用いた気生微細藻類は、黄緑藻綱 *Pleurochloris imitans* (*P. imitans*) と緑藻綱 *Choricystis minor* (*C. minor*) であった。2種の藻株は、0.01%カゼイン添加BB液体培地において明暗所下で振とう培養した。藻体および培地を経時的に回収し、生育量およびタンパク質量を測定した。培地中のNH₄⁺はイオンクロマトグラフィーを用いて分析した。プロテアーゼ活性に及ぼす影響は種々の阻害剤を用いて行った。

【結果】14日間の培養における培地中のタンパク質量は、*P. imitans*および*C. minor*の明暗所下において8日目で約80%の減少が見られた。培養8日目の培地のイオン分析を行ったところ、2種の藻株ともに明所下においてNH₄⁺の生成が確認された。おそらく、*P. imitans*はタンパク質をアミノ酸→NH₄⁺に分解して、NH₄⁺を窒素源として取り込むことで増殖し、その一部は脱窒されたと思われる。培養14日目の培地を粗酵素溶液とし、阻害剤を用いて活性測定を行った結果、PMSF存在下で活性が低くなったことから、セリンあるいはシステインプロテアーゼの可能性が示唆された。

Studies on hydrolysis of casein by protease from aerial microalgae

○Kouhei Shimizu, Nobuhiro Aburai, Katsuya Abe
(Dept. Appl. Chem., Fac. Eng., Kogakuin Univ.)

Key words aerial microalgae, protease, casein