

1P-089 放線菌ホスホリパーゼ A₂を利用した組換え大腸菌による異種蛋白質の分泌発現

○岡野 葵, 氏家 彩奈, 中野 秀雄, 岩崎 雄吾
(名大院・生命農学)
iwasaki@agr.nagoya-u.ac.jp

【目的】組換え大腸菌による異種蛋白発現において、目的蛋白質が培地中に分泌されると有利である。本研究室では、*pelB*シグナル配列を付加した *Streptomyces violaceoruber*由来ホスホリパーゼ A₂ (svPLA₂) を大腸菌で発現させたところ、その触媒活性の有無にかかわらず培地中に分泌されることを見いだした。そこで本研究では、種々の蛋白質を svPLA₂ との融合蛋白として発現させることで、分泌発現が可能かどうかを検討した。

【方法と結果】触媒活性を欠損させた H64A 変異型 svPLA₂ を「分泌タグ」として、その下流に、(1) 大腸菌アルカリホスファターゼ、(2) 放線菌ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C、(3) 枯草菌 α アミラーゼ、(4) *Candida antarctica* lipase B、および (5) 抗卵白リゾチーム単鎖抗体を連結した各種発現プラスミドを構築し、pET システムを用いて発現させた。培養温度、誘導時間、各種シャペロンの利用等に関して発現条件を検討した結果、全ての融合蛋白質の培養上清中への分泌がみられた。特に抗卵白リゾチーム単鎖抗体においては、シャペロンである Skp との共発現が有効であった。次に発現した融合蛋白を培養上清から精製したところ、100 mL のフラスコ培養から 0.1~2.7 mg の収量で精製蛋白が得られ、それらの酵素活性または抗体活性を確認した。

Use of *Streptomyces* phospholipase A₂ as a fusion tag for extracellular production of heterologous proteins in recombinant *Escherichia coli*

○Aoi Okano, Ayana Ujije, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words phospholipase A₂, scFv, secretion, *Escherichia coli*

1P-091 分子シャペロン sHsp (small heat shock protein) の会合状態のアミロイド β 凝集への影響

○吉田 知識^{1,2}, 座古 保², ソルヤード カリン², 前田 瑞夫^{1,2}
(¹東大院・新領域, ²理研・バイオ工学)
chishikinoyoshida@gmail.com

アルツハイマー病は、アミロイド β (A β) が自己会合した線維などの凝集体によって引き起こされると考えられている。sHsp の一種である HSP27 は、A β と相互作用することが知られている。HSP27 は通常マルチマー状態をとっているがリン酸化するとダイマーに解離する。マルチマー状態の HSP27 は A β モノマーの凝集を防ぐことが知られているが、ダイマー状態の A β への影響は不明であった。本研究では、ダイマー状態の HSP27 が A β 凝集に与える影響を調べた。

リン酸化した HSP27 (ダイマー) 及びリン酸化していない HSP27 (マルチマー) 存在下において A β 42 (25 μ M) モノマーを 37℃ で 24 時間インキュベートし、得られたサンプルの A β 凝集体の量や構造と PC12 細胞に対する細胞毒性を評価した。A β 凝集体の量や構造の評価には ThT assay と Native PAGE/western blot(WB) を用い、細胞毒性の評価には MTT assay を用いた。

ThT assay の結果から、ダイマー HSP27 はマルチマー HSP27 と同様に、A β 42 の線維状凝集を防ぐことがわかった。また、WB の結果から、ダイマー及びマルチマー状態の HSP27 存在下では共に A β 42 はモノマーもしくは可溶性プロトフィブリル状態であることが示された。そしてダイマー HSP27 はマルチマー HSP27 と同様に A β 42 の細胞毒性を抑えることがわかった。

Effect of quaternary structure of molecular chaperone sHsp (small heat shock protein) on amyloid-beta aggregation

○Tomonori Yoshida^{1,2}, Tamotsu Zako², Karin Sorgjerd², Mizuo Maeda^{1,2}
(¹Grad. Sch. Front. Sci., Univ. Tokyo, ²Bioeng. Lab., RIKEN)

Key words amyloid beta, chaperone, small heat shock protein, quaternary structure

1P-090 タンパク質フォールディングメモリーによるリパーゼの改変

○里村 淳, 永山 充, 三浦 夏子, 黒田 浩一, 植田 充美
(京大院・農)
miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景】プロテアーゼやリパーゼが有するタンパク質成熟化の過程で切断除去される配列であるプロペプチドの多くは、酵素活性部位のフォールディング形成を補助する働きがある。このプロペプチドに複数変異を導入することで、野生型と同じアミノ酸配列であるが、活性や安定性が異なる酵素を作り出すことに成功してきた [1]。切断除去されるプロペプチドの変異が、成熟領域の構造に「記憶」として残されることから、この現象を「タンパク質フォールディングメモリー」と呼んでいる。本研究では、タンパク質フォールディングメモリーを応用して、リパーゼの基質認識を改変することを目的としている。

【結果】*Rhizopus oryzae* lipase (ROL) のプロペプチドに親水性アミノ酸を多く含む配列を導入した。このプロペプチド変異型 ROL は野生型の ROL に比べ、リパーゼ活性が 1.3 倍強くなっていることがわかった。さらに、プロペプチド変異 ROL は本来のリパーゼ活性に加え、ペプチダーゼ活性も示した。現在さらに、プロペプチド変異 ROL の安定性や構造を解析しており、まとめて報告する [2]。

[1] Nagayama M., et al., *Biochemistry*, 51, 3547-3553(2012)

[2] Satomura A, submitted

Modification of lipases by protein folding memory

○Atsushi Satomura, Mitsuru Nagayama, Natsuko Miura, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words protein folding memory, intramolecular chaperone, lipase

1P-092 多種類ヒト CT 抗原の効率的な生産システムの開発

○藤田 佳那, 木戸 桃子, 本莊 知子, 二見 淳一郎
(岡山大院・自科)
futamij@okayama-u.ac.jp

絶えず細胞増殖が必要な精巣では、細胞増殖を亢進するタンパク質群の発現があり、これらががん細胞でも悪用されている例がある。その中でも免疫原性を示すものが cancer/testis (CT) 抗原として分類され、現在 150 種類以上の存在が報告されている。この CT 抗原の大半は天然変性タンパク質であり、単独ではフレキシブルな変性状態で、大半が凝集・分解が進みやすい不安定な物性のタンパク質である。この CT 抗原タンパク質の研究・診断薬開発の研究を進めるため、多種類の CT 抗原を全長かつ水溶性で取得したいことから、大腸菌およびヒト由来の HEK293 細胞を宿主とした生産系の検討を進めている。大腸菌を宿主とした場合、大半が不溶性のインクルージョンボディを形成したが、Cys 残基を含むタンパク質であるため、可逆的カチオン化技術を活用することで高純度の CT 抗原が精製できた。一方で、いくつかの CT 抗原は大腸菌で極めて低発現であった。近年、ヒト由来の HEK293 細胞を用いたタンパク質生産技術が向上しているため、高発現ベクターを活用してヒト由来の HEK293 細胞を用いた各種の CT 抗原の生産に取り組んだところ、多くの抗原が低コストで安定的に生産できることが確認できた。これらの一連の取り組みについてご紹介したい。

Development of expression system for multiple human CT-antigens

○Kana Fujita, Momoko Kido, Tomoko Honjo, Junichiro Futami
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

Key words protein, protein engineering