

3P-021 改良ウマフェリチンによる鉄イオン取り込みの増強

○岩堀 健治¹, 山根 みどり², 山下一郎²
 (1)JST・さきがけ, (2)奈良先端大・物質)
 holy@ms.naist.jp

[背景・目的] フェリチンは直径 12 nm 内部に直径 7 nm の空洞をもつ球殻状タンパク質である。我々は現在までにウマ由来フェリチンを中心にバイオミネラルゼーション機構の解明を行ってきた。これらの知見をもとにフェリチン内部に Co, Ni, Fe 等の金属酸化物や CdSe, CdS, CuS 等の化合物半導体のバイオミネラルゼーションを行うことで、均一な大きさの種々のナノ粒子を内包するフェリチン-ナノ粒子複合体の作製に成功している。今回、フェリチン内部空洞表面のアミノ酸置換を行う事で、より低濃度の鉄イオンを効率良く取り込むことができる変異フェリチンの作製に成功し、そのフェリチンの性質検討を行った。

[方法・結果] フェリチンにおける金属イオンの取り込みやミネラルゼーションにはフェリチン内部空洞表面にある ferroxidase center (鉄酸化活性部位) および nucleation site (核形成部位) が重要な役割をしていると考えられている。これらのアミノ酸部位に対して、我々が既にウマ由来フェリチンで構築済みである手法と pMK-2 プラスミドを用いて部位特異的変異を行い、数種類の遺伝子変異フェリチン (改良ウマフェリチン) を取得した。作製した改良ウマフェリチンの中で、nucleation site 部分のアミノ酸 Lys を Glu に置換した変異株フェリチン (Fer8E3) において鉄イオンの取り込みを測定したところ、ウマ由来フェリチンの 3 倍以上の鉄イオンの取り込み速度を示し、nucleation site のマイナス電荷アミノ酸の増強が鉄イオンの取り込みに大きな影響を与えていることが明らかになった。現在これらの知見が鉄以外の金属カチオンの取り込みにも影響があるかどうか検討を行っている。

Enhanced iron-uptake activity by modified horse spleen ferritin

○Kenji Iwahori¹, Midori Yamane², Ichiro Yamashita²
 (1)PRESTO, JST, (2)Grad. Sch. Mater. Sci., NAIST)

Key words ferritin, cage-shaped protein, biomineralization, ferrous iron

3P-023 Production and the Potential of Cryptopygus antarcticus endo-β-1, 4-galactanase from Silkworm Expression System

○SunMee Hong¹, Mee-Hye Kang², Choong-Gon Kim³, Youn-Ho Lee⁴
 (1)Dept, Gyeongbuk Inst. for Marine Bioind, (2)Dep. Korea Inst Ocean Sci Technol, (3)Dep. Korea Inst Ocean Sci Technol, (4)Dep. Korea Inst Ocean Sci Technol
 hongsunmee@gimb.or.kr

Endo-β-1, 4-galactanase (CaCel) from Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus*, a cellulase with high activity at low temperature, shows potential industrial use. To obtain sufficient active cellulase for characterization, CaCel gene was expressed in *Bombyx mori*-baculovirus expression systems. Here, rCaCel with a silkworm secretion signal (Bm-CaCel) was successfully expressed and secreted into pupal hemolymph and purified to near 90% purity by Ni-affinity chromatography. The yield and specific activity of rCaCel purified from *B. mori* were estimated at 31 mg/L and 43.2 U/mg, respectively. The optimal pH and temperature for the rCaCels purified from *B. mori* were 3.5 and 50°C and retained more than 30% of their maximal activity at 0°C. Thermostability of Bm-CaCel from *B. mori* at 60°C was higher than that from *E. coli*, probably due to glycosylation.

* This work was supported by the Bio-industry Technology Development Program, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (No: 111062-03-1-HD110; 111116-01-1-SB010).

Production and the Potential of Cryptopygus antarcticus endo-β-1, 4-galactanase from Silkworm Expression System

○SunMee Hong¹, Mee-Hye Kang², Choong-Gon Kim³, Youn-Ho Lee⁴
 (1)Dept, Gyeongbuk Inst. for Marine Bioind, (2)Dep. Korea Inst Ocean Sci Technol, (3)Dep. Korea Inst Ocean Sci Technol, (4)Dep. Korea Inst Ocean Sci Technol)

Key words insect cell, bacteria, glycoside hydrolase, Antarctic springtail

3P-022 ケイ藻由来フェリチンの大量発現系の構築と緒性質の検討

○山根 みどり¹, 岩堀 健治², 山下一郎¹
 (1)奈良先端大 物質, (2)JST・さきがけ)
 holy@ms.naist.jp

【背景・目的】直径 12 nm の球殻状のフェリチンタンパク質は内部に直径 7 nm の空洞を保持し、この部分に鉄イオンを蓄積し生体内の鉄濃度の維持に重要な役割をしている。フェリチンは哺乳類から細菌まで多くの種に普遍的に存在するが、近年、海洋性ケイ藻類 (*P. multiseriis*) において初めてその存在が確認された。このフェリチンは非常に低濃度の鉄を取り込むことができると言われているが、その他の詳細な機能等はほとんど明らかになっていない。そこで今回、本ケイ藻由来フェリチンの解析を進めるために大量発現系と精製法を確立し、金属取り込みに関する機能解析を試みた。

【方法・結果】ケイ藻由来フェリチンの大量発現系の構築は、我々が行っているウマ由来フェリチンと同じ手法を用いて *P. multiseriis* のフェリチン遺伝子に相当する部分を pMK-2 プラスミドに導入しタンパク質発現を検討した所、ほとんど発現しなかった。そこで、プラスミドを pET30a に変更し、大腸菌 BL21(DE3) 株に形質転換後 26°C で 21 時間培養することで本フェリチンタンパク質の大量発現と可溶性画分における回収が初めて可能となった。さらにこれをイオン交換カラムとゲル濾過カラムにより精製することで最終的に 1L の培養液から 70 mg 以上の精製フェリチンを取得し、ケイ藻由来フェリチンの大量発現系構築と精製法を確立した。また、精製フェリチンを用いて初期の鉄の取り込みを調べたところ、従来のウマ由来フェリチンの 10 倍以上であるという結果が得られた。現在、この知見をもとに鉄イオン以外の金属の取り込み活性も調べている。

Purification and characterization of a recombinant ferritin protein from *P. multiseriis*

○Midori Yamane¹, Kenji Iwahori², Ichiro Yamashita¹
 (1)Grad. Sch. Mater. Sci., NAIST, (2)PRESTO, JST)

Key words ferritin, iron-storage protein, biomineralization, *P. multiseriis*

3P-024 カイコ N 型糖鎖付加経路改変に向けたカイコ内のヒト由来糖転移酵素発現

○加子 夏未¹, 加藤 竜也^{1,2}, 朴 龍洙^{1,2}
 (1)静大院・農・応生化, (2)静大グリーン科技研)
 szd723@gmail.com

【背景・目的】近年、抗体医薬はがん治療の効果が副作用の少なさ等から開発が進められている。カイコは外来タンパク質大量生産系として有用であるが、生産される糖タンパク質の N 型糖鎖は高マンノースもしくはパウチマンノース型が多く、哺乳類細胞でみられる混合型や複合型糖鎖は殆ど認められない。これがカイコ由来の糖タンパク質の質低下の最大要因である。本研究では、カイコ体内でそれぞれ human β-1,2-N-acetylglucosaminyltransferaseII (hβ2GnTII) または human β-1,4-galactosyltransferaseI (hβ4GalTI) の発現を行い、N 型糖鎖の合成経路改変を試みた。【方法・結果】hβ2GnTII または hβ4GalTI 遺伝子を、カイコで発現可能な *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) バクミドに挿入し、組換え BmNPV バクミドを構築した。これら糖転移酵素は、カイコアクチンプロモーターまたは OpIE2 プロモーターで発現制御され、カイコ蛹でそれぞれ発現させた。ウエスタンブロットにより目的タンパク質発現を確認した。レクチンブロットにより、カイコ内在性タンパク質の N 型糖鎖構造を推定した。N 型糖鎖の末端 N-アセチルグルコサミンを認識するレクチンを用いた場合、モックサンプルに比べ hβ2GnTII を発現したサンプルでバンドの増強が認められた。一方、末端ガラクトースを認識するレクチンを用いた場合、モックサンプルに比べ hβ4GalTI を発現したサンプルでバンドの増強は認められなかった。現在、各糖転移酵素とヒト IgG の共発現を行い、IgG の N 型糖鎖変化を確認している。

Expression of human-glycosyltransferases in silkworms targeting for modification of N-glycosylation pathway

○Natsumi Kako¹, Tatsuya Kato^{1,2}, Enoch Y. Park^{1,2}
 (1)Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., (2)Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words Silkworm, N-Glycosylation, glycosyltransferase, Human IgG1