

1P-089 IE2 プロモーターを用いたヒト由来糖転移酵素の発現によるカイコ N 型糖鎖の改変

加子 夏未¹, 加藤 竜也^{1,2}, 近藤 幸子^{3,4}, 矢木 宏和³, 加藤 晃一^{3,4,5},
○朴 龍洙^{1,2}
(¹静大院・農・応生化,²静大グリーン科学技術研,³名市大院・薬学研究所,⁴株式会社医学生物学研究所,⁵自然科学研究機構)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景】近年、抗体医薬はがん治療の効果等から開発が進められている。外来タンパク質の大量発現が可能なカイコは抗体生産系として期待されるが、生産される糖タンパク質の N 型糖鎖は昆虫細胞と同様にパウチマンノース型が大部分であり、哺乳類細胞でみられる複合型糖鎖は殆ど認められない。これがカイコを用いたタンパク質発現系の欠点である。本研究はこれを改善すべく、*Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus 由来 second immediate early regulatory 遺伝子(OpIE2)プロモーターを用い、カイコ内でそれぞれヒト β-1,2-N-acetylglucosaminyltransferaseII (hβ2GnTII) 及びヒト β-1,4-galactosyltransferaseI (hβ4GalTI) を発現し、カイコの N 型糖鎖合成経路改変を試みた。【方法・結果】hβ2GnTII、hβ4GalTI 遺伝子をカイコで発現可能な *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus バクミドに挿入し組換えバクミドを構築した。糖転移酵素をモデルタンパク質のヒト IgG1(hIgG1)とカイコ蛹で共発現した。精製 hIgG1 で N 型糖鎖構造解析を行った。2 種類の糖転移酵素を IE2 プロモーターで発現した時、約 28%の末端ガラクトース N 型糖鎖が検出され、その内約 11%が二分岐末端にガラクトースを持つ N 型糖鎖であった。

Modification of N-glycan of silkworms by expression of human-glycosyltransferases using IE2 promoter

Kako Natsumi¹, Tatsuya Kato^{1,2}, Kondo Sachiko^{3,4}, Yagi Hirokazu³, Kato Koichi^{3,4,5},
○Enoch Y. Park^{1,2}
(¹Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., ²Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., ³Fac. Pharm., Nagoya City Univ., ⁴MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD., ⁵National Institutes of Natural Sciences)

Key words silkworm, N-glycosylation, human B-1, 2-N-acetylglucosaminyltransferaseII, human B-1, 4-galactosyltransferaseI

1P-090 疎水性相互作用とイオンペアのみを考慮した新規タンパク質間相互作用の設計

○八木 創太¹, 山岸 愛美¹, 赤沼 哲史², 内田 達也¹, 山岸 明彦¹
(¹東葉大・生科,²早大・人間科学)
yamagish@toyaku.ac.jp

【背景と目的】タンパク質間相互作用はシグナル伝達、免疫反応、細胞骨格形成等多くの生物機能の根源的な現象である。タンパク質間相互作用は相補的な形状を持った結合面の複数の非共有結合により形成されるため、人工的な結合面設計は、依然として難しい課題である。本研究では、スレリスリンと cysLARFH 間に簡単な原理に基づく新規タンパク質間相互作用を創出することを目的とした。

【方法】両タンパク質表面の αヘリックス上に疎水性結合面を作製した。さらに、両タンパク質間でイオンペアを形成させるため、スレリスリンの疎水性結合面近傍に負電荷アミノ酸を、cysLARFH には正電荷アミノ酸をそれぞれ導入した。負電荷型スレリスリンと正電荷型 cysLARFH を別々に発現・精製し、混合することで相互作用を解析した。

【結果と考察】プルダウンアッセイ法により、両者の間で分子間結合が確認された。また、FRET から求めた解離定数は 0.2 μM であり、高い結合親和性が示された。さらに、分子両端の対称的な位置にそれぞれ同一の結合面を持つスレリスリンと cysLARFH を作製し、混合したところ、両者が交互に重合した線維状構造体を構築できた。αヘリックス上に疎水性相互作用とイオンペアのみを考慮して新規タンパク質間相互作用面を設計できることが分かった。また、自己集合型のタンパク質繊維素材の開発の可能性を示した。

De novo design of protein-protein interaction with consideration of only hydrophobic interaction and ion-pairing

○Sota Yagi¹, Manami Ymagishi¹, Satoshi Akanuma², Tatsuya Uchida¹,
Akihiko Yamagishi¹
(¹Sch.Life Sci., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci., ²Faculty Hum. Sci., Waseda Univ)

Key words protein interaction, hyperthermophilic, fiber

1P-091 N 末端ペプチドタグ付加による難発現タンパク質発現量の増大

○加藤 晃代^{1,2}, 永井 里美², 中野 秀雄²
(¹科技財団,²名大院・生命農学)
teruyo.ojima@gmail.com

【背景と目的】大腸菌や酵母は組換えタンパク質発現のために最も良く用いられている。しかし、発現させたいタンパク質によっては、発現量そのものが少なく、可溶性・不溶性ともに合成されない場合がある。タンパク質による発現量の違いの原因として、mRNA の安定性、コドンの影響等、諸説存在するが明確にはわかっていない。そのため、発現量が少ない場合は、1)コドン変換、2)他のタンパク質との融合発現、3)発現系や培地の変更、4)シャペロン因子との共発現など、手間のかかる検討を要するのが一般的である。そこで我々は、難発現タンパク質の発現量向上のための簡便な方法開発を目指し、N 末端へのペプチドタグ挿入を検討した。

【方法と結果】大腸菌における高発現タンパク質の N 末端アミノ酸配列傾向より、4 アミノ酸の SKIK ペプチドタグを設計した。これを、大腸菌で難発現であったウサギ抗体、マウス抗体、人工ペプチド配列の開始コドン直後に付加し、大腸菌を宿主としたときの発現量への影響を調べた。SDS-PAGE 解析の結果、すべてのサンプルにおいて、数倍~100 倍の発現量増大が認められた。さらに、*S. cerevisiae* の発現系および大腸菌無細胞タンパク質合成系においても、本ペプチドタグ付加により発現量が向上した。以上より、N 末端への SKIK タグの付加は、難発現タンパク質の発現量向上のための有効な方法であると考えられた。【謝辞】本研究は、知の拠点あいち重点研究プロジェクト 2 「食の安心・安全技術開発プロジェクト」による成果のひとつである。

N-terminal peptide tag for improvement in the expression level of hardly expressed proteins in *E. coli* and *S. cerevisiae*

○Teruyo Kato^{1,2}, Satomi Nagai², Hideo Nakano²
(¹ASTF, ²Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words peptide, difficult to express protein, N-terminal

1P-092 18 アミノ酸種でつくられたヌクレオシドニリン酸キナーゼの安定性と触媒活性

○赤沼 哲史
(早大・人間科学)
akanuma@waseda.jp

【背景と目的】現存生物が持つタンパク質の多くは、普遍遺伝暗号表にコードされた 20 種類のアミノ酸からつくられている。しかし、タンパク質を合成するのにアミノ酸が本当に 20 種類必要であるかについては明確な答えが得られていない。もし、タンパク質の合成に 20 種類ものアミノ酸が必要ではなく、より単純なアミノ酸組成からタンパク質を合成できるのであれば、既存タンパク質の改変や人工タンパク質の設計を単純化することが可能となる。

祖先型タンパク質設計法は、進化情報に基づく耐熱性タンパク質の合成法である。この方法を用いて合成したヌクレオシドニリン酸キナーゼ (NDK) である Arc1 は、変性温度が 113°C と著しく高い耐熱性を持ち、触媒効率も天然の NDK と同程度かそれ以上である。また、システインを持たないため、19 アミノ酸種から構成されている。

【方法】Arc1 に含まれるアミノ酸の 1 種類をすべて別のアミノ酸に置換することで欠損させた、18 種類のアミノ酸で構成された Arc1 改変体を 19 個作製した。それぞれの耐熱性と触媒活性の大きさを解析した。

【結果】グルタミンまたはトリプトファンを欠損させても耐熱性、触媒活性ともにほとんど変化しなかった。また、フェニルアラニン、イソロイシン、あるいはメチオニンも欠損させても触媒活性には影響は見られなかったが、耐熱性はわずかに低下した。一方、ヒスチジンまたはアスパラギンを欠損させると触媒活性が大きく低下したが、耐熱性はむしろ向上した。より詳細な結果と考察はポスターにて報告する。

Stability and catalytic activity of nucleoside diphosphate kinases composed of 18 amino acid alphabets

○Satoshi Akanuma
(Faculty Hum. Sci., Waseda Univ.)

Key words thermostability, catalytic efficiency, reduced amino acid set, nucleoside diphosphate kinase