

2P-057 マウス TG2 の無細胞蛋白質合成系での発現

○秦 純平¹, 溝口 琢朗¹, 児島 孝明¹, 人見 清隆², 中野 秀雄¹
 (¹名大院・生命農学,²名大院・創薬)
 nakano@molbiotech-nagoya.org

【目的】進化分子工学による高機能性タンパク質の創出を目的として、本研究室で開発されたビーズディスプレイ法は、蛍光化合物を用いた適切な反応系をデザインすることにより、FACSを用いた変異体タンパク質の効率的なスクリーニングを可能にする。その中で、目的タンパク質のDNAを介したマイクロビーズ上への提示が必要であり、DNA-タンパク質固定化技術にDNA結合タンパク質 scCro (single-chain Cro) タグを用いた手法が提案された。scCro は DNA 上の結合領域である ORC と解離定数 14 pM で結合する。これまでに、この新技術を利用して scCro タグを付加したトランスグルタミナーゼ (TGase) の Gln 側基質ペプチド T26 (scCro-Q) のマイクロビーズ上への提示に成功している。本研究では、scCro タグ変異体を付加した TGase(scCroM-TG) の TGase 活性の確認およびマイクロビーズ上への提示の確認を通じ、TGase の新規アッセイ法の確立を目的としている。

【方法と結果】scCro-Q を無細胞蛋白質合成系で調製し、ORC を固定化したマイクロビーズに供した。このビーズ複合体をフローサイトメトリーによって解析したところ、scCro-Q のビーズ上への提示が観察された。さらに、そのビーズ複合体とビオチン化カダベリンを用いて TGase 反応を行った結果、scCro-Q が提示されたビーズでのみ有意な蛍光シグナルが検出された。同様に scCroM-TG を調製し、これをカゼインを固定したプレートにビオチン化 T26 と共に供し、蛍光標識化した。その結果、scCroM-TG の存在下で有意な蛍光シグナルが検出され、酵素の TGase をその活性が保持された状態でマイクロビーズ上に提示することに成功した。

Expression of mouse-TG2 in *E.coli* cell free protein synthesis

○Jumpei Hata¹, Takuro Mizoguchi¹, Takaaki Kojima¹, Kiyotaka Hitomi², Hideo Nakano¹
 (¹Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., ²Grad. Sch. Pharm., Sci., Nagoya Univ.)

Key words enzyme, binding, screening

2P-058 人工ヒト細胞の創出に向けて

○町田 幸大¹, 重田 友明¹, 梶本 愛¹, 島田 将行¹, 湊元 幹太², 今高 寛晃¹
 (¹兵庫県大院・工,²三重大院・工)
 machida@eng.u-hyogo.ac.jp

精製した個々の細胞内容物から、人工的に細胞を再構築する試みは、様々な生体分子で形成される複雑な細胞内分子ネットワークの役割を明らかにすると共に、各種疾患の効果的な予防法や治療法の確立に大きく貢献できると考えられる。我々はこれまでに、ヒトの翻訳に関与する最小限の因子 (Ribosome, eEF1s, eEF2, eRFs, ARSs, tRNAs) のみを試験管内で混合した再構成型タンパク質合成システムを樹立しており、今回はこのシステムにヒト分子シャペロン群 (NAC, RAC, HSC70, HSP40, HSP110, PFD, CCT) を添加することで、新生鎖を正しくフォールディングさせるようにシステムの改善を行った。さらにこのタンパク質合成・フォールディング共役システムをリボソームに内包することで、人工ヒト細胞の創出に向けた基盤造りに着手した。リボソームに細胞様の機能を持たせるためには、まず、細胞骨格の中心を成すアクチンが合成され、正しくフォールディングし、重合していくことが必須になる。そこで、どのようなシャペロンがヒトβアクチンの合成・フォールディングに必要であるかを調査した。その結果、新生βアクチンのフォールディングにはPFDとCCTの協奏的ネットワークが必須であることが明らかになった。現在は、βアクチンを合成するために必要な最小限の因子のみをリボソームのユニメラ (脂質二重膜) に内包する方法について様々な検討を行っている。

Toward making artificial human cells

○Kodai Machida¹, Tomoaki Shigeta¹, Ai Masumoto¹, Nobuyuki Shimada¹, Kanta Tsumoto², Hiroaki Imataka¹
 (¹Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, ²Grad. Sch. Eng., Mie Univ.)

Key words translation, lipid vesicle, chaperonin

2P-059 マグネトソームディスプレイによる磁性粒子上へのセルラーゼ複合体の固定化制御

○本多 亨, 田中 剛, 吉野 知子
 (農工大院・工)
 y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

【背景と目的】バイオエタノール生産においてセルラーゼによるセルロースの加水分解は、重要なプロセスの1つである。しかし、このプロセスの工業化への障壁は、セルラーゼ使用に伴うコストであり、固定化酵素を用いた再利用が有効な解決手段となる。本研究では、磁性細菌が有するオルガネラ、マグネトソームを磁性担体に用い、マグネトソームディスプレイにより、セルラーゼ複合体の磁性粒子上への効率的な固定化技術を確立し、再利用における有効性を示すことを目的とした。

【方法及び結果】セルラーゼは Endoglucanase (EG) と β-glucosidase (BG) を選定した。各酵素に2種の Dockerin をそれぞれ連結し、融合タンパク質として磁性細菌内の細胞質で発現させた。一方、磁性粒子のアンカーとなる Mms13 と2種の Cohesin をタンデムに結合した融合タンパク質を磁性粒子上に発現させた。これにより、細胞内で、Cohesin と Dockerin の相互作用により、磁性粒子上に2種の酵素が近接して固定化されるものと考えられた。このことを確認するために、形質転換体の破砕液から磁気分離により酵素-磁性粒子複合体を精製し、セルロースの加水分解試験に用いた。その結果、EG または BG 固定化磁性粒子の混合物と比較して、2種の酵素を近接するように固定化した磁性粒子を用いることで、加水分解速度が有意に向上することが確認された。また、再利用を検討したところ、5回までの使用において初期活性の70%以上保持していることが明らかとなった。以上の結果から、作製した酵素-磁性粒子複合体のセルロース分解、及びその再利用試験における有用性が示された。

Controlled immobilization of multiple cellulase complexes on magnetic nanoparticles by magnetosome-display system

○Toru Honda, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino
 (Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words Magnetic nanoparticle, Cellulase

2P-060 改良ウマフェリチンによる低濃度 Cd イオンの取り込みと CdSe ナノ粒子の作製

○岩堀 健治^{1,2}, 山根 みどり³, 山下一郎^{2,3}
 (¹科技構・さきがけ,²奈良先端大・物質,³阪大院・工)
 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、今までにウマ由来フェリチンの内部空洞内での各種ナノ粒子の作製を行ってきた。現在までに直径 7 nm の均一な Co, Ni, Fe 等の金属酸化物や CdSe, CdS, CuS 等の化合物半導体ナノ粒子の作製に成功している。前回の発表では、ウマフェリチンの内部空洞表面にグルタミン酸残基を増強した改良ウマフェリチンを作製し、このフェリチンが低濃度の鉄イオンを効率良く取り込むことを報告した。今回、さらに改良ウマフェリチンの緒性質の検討を行うと共に、鉄イオン以外の金属カチオンであるカドミウム (Cd) イオンの取り込み機構解明と CdSe ナノ粒子作製を行った。

【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リゼーションには空洞表面にある nucleation site (核形成部位) が重要な役割を持つと考えられている。そこで核形成部位付近に存在するアルギニン、及びリジンをグルタミン酸に変えた改良ウマフェリチン (Fer8E3) に対して、低濃度 Cd イオンの取り込みと CdSe ナノ粒子作製を検討した。その結果、通常のフェリチンでは不可能な 0.02 mM という低濃度の Cd イオンを空洞内部に取り込み、CdSe ナノ粒子を作製することが明らかになった。さらに XRD, EDX 分析により作製されたナノ粒子は CdSe ナノ粒子であることが示された。0.02 mM Cd イオンを用いた場合の CdSe コア形成率は 20 % を示し、ウマフェリチンの核形成部位におけるグルタミン酸残基の増強が Cd イオンの取り込みに大きな影響を与えていることが示唆された。

Enhancement of Cd ion uptake by a modified horse spleen ferritin and fabrication of CdSe NPs

○Kenji Iwahori^{1,2}, Midori Yamane², Ichiro Yamashita^{2,3}
 (¹JST, PRESTO, ²Grad. Sch. Mater. Sci., NAIST, ³Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words ferritin, CdSe, nanoparticle, bio-mineralization