

論文提出者	工学府博士後期課程 生命工学 専攻 平成 19 年度入学 学籍番号 07831101 氏名 上岡 哲矢 印
主指導教員氏名	黒田 裕
論文題目	組み換えタンパク質の新規精製法及びスプライシング法の開発
<p>論文要旨 (2000 字程度)</p> <p>組み換えタンパク質を細胞に発現させた場合にはその細胞内からそのタンパク質を抽出する必要があり、使用される細胞と抽出方法にはいくつかの種類がある。例えば、細胞では大腸菌、酵母、植物、昆虫やほ乳類等といったものがあり、抽出方法には超音波破碎、フレンチプレス破碎、ビーズ破碎、界面活性剤による溶菌や酵素による溶菌等といったものがある。本論文では、大腸菌を使用した組み換えタンパク質発現のための新規の大腸菌溶菌法を紹介する。</p> <p>大腸菌は、タンパク質発現が 1 日で判断でき、また培養も容易であるために広く用いられる細胞である。大腸菌を破碎するのに実験室では超音波破碎が良く用いられ、工業規模ではビーズ破碎やフレンチプレス破碎が用いられる。どの手法においても大腸菌を集菌する必要がある。その手間を省略できることは大きなメリットを生むため、現在も種々の自動破碎方法が研究されている。</p> <p>博士論文では、大腸菌内で VanX 酵素を発現させると溶菌することの発見とその溶菌活性を用いた新規の自動破碎方法の開発について述べる。この破碎方法は物理的、化学的に破碎を行うよりも組み換えタンパク質に対する影響は少なく、また、他の酵素共発現系よりも単純であるため利用が容易であると考えられる。さらに、封入体として得られる組み換えタンパク質の変性状態のトランススプライシング法の開発について述べている。</p> <p>本論文は、第 5 章から構成されている。</p> <p>第 1 章「序論」では、大腸菌を用いた組み換えタンパク質発現の最初の工程である破碎について、既存の物理的手法と化学的手法、また現在開発されている新規の溶菌手法について述べている。物理的、化学的手法の特徴について述べ、また、現在開発されている新規の大腸菌溶菌手法としてフェージ由来酵素群の共発現系についても述べている。それらの特徴と本論文で開発した溶菌手法の特徴から、この開発した手法の意義を記した。</p> <p>第 2 章「VanX による大腸菌の自己溶菌の発見」では、バンコマイシン耐性酵素群の VnaA 酵素群のひとつである VanX 酵素を通常よりも低い発現温度で培養すると大腸菌が自然溶菌する現象を発見した。VanX は D-アラニル-D-アラニン : D-Ala-D-Ala を加水分解するジ</p>	

ペプチダーゼである。D-Ala-D-Ala はムレインモノマーのペプチド鎖端に結合してムレインモノマー同士を架橋させるのに重要な役割を担っている。しかし、VanX のジペプチダーゼ活性により、大腸菌内の D-Ala-D-Ala の存在率が減少し、細胞壁合成が阻害され引き起こされる溶菌だと結論づけた。

第 3 章「VanX 酵素を利用した大腸菌破碎法の省略によるタンパク質精製法の開発」では、今回発見した VanX の溶菌活性を利用するために目的の組み換えタンパク質（本論文では GFPuv）を共発現させる系を作成した。この共発現系は大腸菌破碎を行わずとも目的タンパク質を培地面分に回収することができる。また、既存のフェージ由来溶菌系が複数酵素の共発現を必要とするのに対し、単一酵素を共発現すればよく、その溶菌機構ゆえに発現と増殖が同時行われている自動発現誘導培地と組み合わせることでより効率よく培地面分に GFPuv を回収できるものであった。この開発した系は精製工程の省略という点と自動発現誘導培地による平易な発現誘導という点において、産業規模での組み換えタンパク質発現のみならず、大腸菌を用いたスクリーニングにおいても、既存の界面活性剤添加による自動溶菌や分泌タグの融合タンパク質を用いた手法よりも組み換えタンパク質に対する影響も手間も少なく済むと考える。現在、この溶菌破碎法を用いたスクリーニングが行われている。

第 4 章「アルギニンを利用した不溶性タンパク質反応系の開発」では、封入体として得られる組み換えタンパク質の変性状態からの巻き戻しの際にアルギニンを透析外液として用いるとその巻き戻し効率が向上するという知見を利用し、*ssp.* DnaE インテインの N/C 断片とループ領域で分断した GFPuv をそれぞれ融合させたものトランスプロテインスプライシングをした。各断片を個々にアルギニンを用いた透析法で巻き戻し反応させた場合はプロテインスプライシングを確認できなかったが、各断片を変性状態で混合しアルギニンを用いた透析法により巻き戻して反応を透析中に起こすと接ぎ合された GFPuv が得られた。この反応はグアニジン塩酸とアルギニンという変性剤存在下で変性した状態で反応していると考えられ、封入体として得られたタンパク質においても問題なくタンパク質の活性を利用できる系が開発されたことが示された。

第 5 章「結論」では、得られた成果を要約し、本研究の総括を行った。

TITLE	Development of a novel purification and splicing method of recombinant proteins
NAME	Tetsuya Kamioka

ABSTRACT

The extraction of recombinant protein from *E.coli* is a first process of protein purification. However, cell disruption is a time and effort consuming process in both the Lab scale and industrial scale by the cell harvest of upper stream process. I found the *E.coli* cell lysis by expression of VanX which is an enzyme of dipeptidase of D-Alanyl-D-Alanine. This enzyme interferes the synthesis of peptidoglycan layer by the result of dipeptidase activity of hydration of D-Alanyl-D-Alanine. Subsequently, I developed the cell disruption system using VanX. This method was the co-expression system of the VanX and target protein. The *E.coli* cell was lysed by the co-expressed VanX and after the intracellular proteins and other substances were extracted to the culture medium. The extracted recombinant protein was able to purify from the culture medium. This developed method has the advantage on the protein purification that can skip the cell harvesting and cell disruption step.