

講演番号：3C26a10

講演日時：3月19日 11:45～ C校舎 26会場

帰納法による可溶性発現技術の開発

Development of soluble expression techniques by inductive method

○松井 大亮^{1,2}、浅野 泰久^{1,2} (¹富山県大工・生工研セ、²JST, ERATO)

○Daisuke MATSUI^{1,2}, Yasuhisa Asano^{1,2} (¹Toyama Pref. Univ., ²ERATO, JST)

【目的】 異種発現系で酵素遺伝子を発現させた場合、封入体の形成で活性を示さないことが多く、この点が異種宿主による酵素の発現において問題となっている。われわれは、大腸菌で封入体を形成する植物キャッサバ由来ヒドロキシニトリルリアーゼや海洋性細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来 L-リジンε-酸化酵素を、アミノ酸置換により活性を持つ酵素として発現することに成功している。これらの結果を踏まえて、他の封入体形成酵素のランダム変異酵素ライブラリーから可溶化する酵素を見出し、可溶性発現の共通性を調査した。

【結果】 変異導入による可溶性酵素の単離：節足動物由来マンデロニトリル酸化酵素 (*ChuaMOX*) やシロイヌナズナ、キイロショウジョウバエ由来アミノ酸代謝関連酵素など大腸菌で封入体を形成するタンパク質に変異を導入し、それらの可溶性発現を検討した。*ChuaMOX* では、Val455 が Ala や Glu、Gln、Asp、Asn に置換されて活性を持つ酵素として発現していることを見出した。野生型酵素と変異型酵素 V455E の封入体をグアニジン溶液で可溶化した後に、還元剤と補酵素を含む緩衝液に滴下し、経時的に活性を測定することでリフォールディングのタイムコースを測定した。その結果、変異型酵素の方が、リフォールディング効率が高く、上記の変異はフォールディングに影響していると推定された。また、シロイヌナズナ由来 L-アルギニン脱炭酸酵素 (*AtADC*) では、Arg430 が Leu や Ala、Val に置換されることで、活性を示すことを明らかにした。

二次構造に着目した可溶性発現：上記の *ChuaMOX* 変異体を二次構造予測法で解析した結果、Val455 は、α-ヘリックス構造に存在しており、ヘリカルホイールの図を描いた結果、親水性領域に存在する疎水性アミノ酸残基であった。*AtADC* Arg430 も同様にα-ヘリックス構造のアミノ酸配列中に存在しており、Arg430 は疎水性領域に存在する親水性アミノ酸残基であることが明らかとなった。「**α-ヘリックス構造部分の親水性領域に存在する疎水性アミノ酸残基を親水性アミノ酸、または同部分の疎水性領域に存在する親水性アミノ酸残基を疎水性アミノ酸に変異を導入**」することで活性を持つ可溶性酵素として発現できる可能性があると考え、他の不溶性発現酵素の二次構造を予測し、α-ヘリックス構造の、「疎水性領域に存在する親水性アミノ酸残基」もしくは、「親水性領域に存在する疎水性アミノ酸残基」を特定し、変異導入により活性型酵素を探索した。その結果、キイロショウジョウバエ由来 D-アミノ酸酸化酵素、L-オルニチン脱炭酸酵素、および L-グルタミン酸脱水素酵素を活性型酵素として発現させることに成功した。

heterologous expression, mutagenesis, secondary structure

発表責任者：浅野 泰久 (asano@pu-toyama.ac.jp)