

D106

新たなタンパク質複合化技術を用いた固定化酵素調製法

(九大院工)○(学)南畑 孝介・(正)神谷 典穂・(正)後藤 雅宏

1. 緒言

タンパク質は、触媒作用や分子認識能などの優れた機能を有しており、その利用価値は非常に大きいものである。このタンパク質を有効利用する上で、タンパク質修飾技術が大きな役割を果たしている。現在、様々なタンパク質修飾技術が報告されているが、その一つに、遺伝子工学的手法によってタンパク質末端へ導入したペプチドタグを用いる方法が挙げられる。本研究では、チロシンを含むペプチドタグによるタンパク質修飾技術構築を目指し検討を行ってきた。チロシンは通常、反応性の低いアミノ酸であるが、酸化還元酵素の作用により、側鎖のフェノール構造上でラジカル化し、重合化するユニークな反応性を有していることから、新規なタンパク質修飾技術への応用が期待される。これまでに、*E. coli* 由来アルカリホスファターゼ (以下 BAP) をモデルタンパク質として、チロシンを含むペプチドタグ (Y-tag) を遺伝子工学的に C 末端へ導入した Y-tag BAP を調製し、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (以下 HRP) の酸化反応による Y-tag BAP の架橋化を検討してきた。その結果、Y-tag BAP は HRP の酵素反応により、Y-tag 特異的に架橋、複合化することが明らかとなった。今回、この Y-tag と HRP の酵素反応による新しいタンパク質複合化技術を用い、Y-tag BAP をフェノール類と共重合させることで酵素固定化フェノール微粒子の調製を検討した(図 1 参照)。

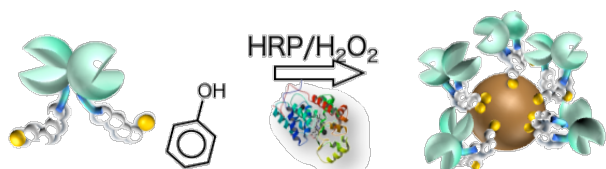


図 1 本研究の概念図

2. 実験

2-1. Y-tag BAP の発現

遺伝子工学的手法を用いて、BAP の N 末端にヘキサヒスチジンタグ、C 末端にトロンビンの認識配列 (LVPRGS) および Y-tag (GGGGY) を付与した Y-tag BAP を構築した。同様に C 末端側の組換えを行わない野生型 BAP (WT-BAP) を構築した。Y-tag を付与した BAP を、以下 CY1-BAP と略記する。構築した WT-BAP、CY1-BAP の発現は大腸菌 BL21(DE3) 株で行なった。

2-2. フェノール誘導体の重合検討

表 1 に示す種々のフェノール誘導体を 2 mM の濃度で 10 mM Tris HCl (pH8.0) に溶解させ、所定量の HRP および H_2O_2 を加え、フェノール誘導体の重合を行った。

表 1 重合を検討したフェノール誘導体

phenol	catechol	hydroquinone	resorcinol
pyrogallol	chloro-hydroquinone	α -naphthol	β -naphthol

2-3. HRP による Y-tag BAP 固定化酵素の調製

10 mM Tris-HCl (pH8.0) に所定濃度の各種 BAP、HRP およびフェノールを添加し、攪拌しながら H_2O_2 を加えることでフェノール微粒子上への BAP の固定化を行なった。得られた BAP 固定化フェノール微粒子を遠心分離により回収し、酵素活性の評価を行った。

3. 結果および考察

3-1. HRP によるフェノール誘導体の重合検討結果

HRP の酵素反応によるフェノール誘導体の重合を検討した結果、いずれのフェノール誘導体も反応性を示したが、フェノールでのみ沈殿物が得られた。そこで、フェノールと BAP との共重合を検討した。

3-2. BAP 固定化フェノール微粒子の酵素活性測定結果

BAP とフェノールの共重合結果および得られた BAP 固定化フェノール微粒子の酵素活性測定結果を図 2 に示す。図 2 より、フェノール微粒子も酵素活性を示したことから、HRP の酵素反応により BAP はフェノール微粒子上へと固定化されていると考えられる。ここで、Y-tag BAP は WT-BAP よりも高い酵素活性を示したことから、Y-tag 付与の有意性が示唆された。

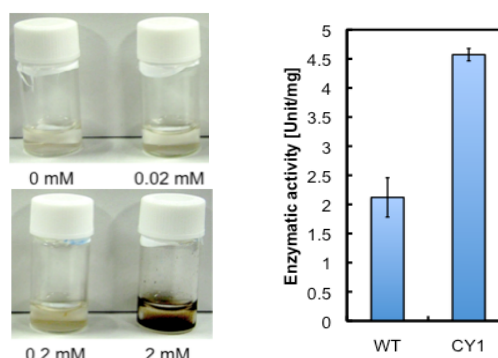


図 2 BAP/フェノールの重合結果および活性測定結果

4. 結言

HRP の酵素反応により BAP をフェノール微粒子上へ固定化することに成功した。

*E-mail. nori_kamiya@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp