

研究成果報告書

(国立情報学研究所民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		酵素を用いた蛋白質の安定化技術の開発とその細胞内への応用			
研究テーマ (欧文) AZ		Enzyme-mediated protein stabilization and application for cell biology.			
研究氏 代 表 名 者	カカナ CC	姓)タナカ	名)ツトム	研究期間 B	2008～ 2009 年
	漢字 CB	田中	勉	報告年度 Y	2010
	ローマ字 CZ	Tanaka	Tsutomu	研究機関名	神戸大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		神戸大学 自然科学系先端融合研究環 助教			
概要 EA (600字～800字程度にまとめてください)					
<p>本研究では、蛋白質の熱安定性、プロテアーゼ耐性を向上させるための新しい蛋白質改変技術を開発し、蛋白質安定化のための指針を提供することを目的とする。蛋白質の N 末端と C 末端を蛋白質連結酵素(ペプチド転移酵素)で連結し、環状化蛋白質にすることで安定性を大幅に向上させるというアプローチを用いる。Sortase と呼ばれる蛋白質連結酵素は LPXTG 配列の C 末端と GGG 配列の N 末端を連結する反応を触媒する。環状化させたい目的蛋白質の N 末端に GG 配列、C 末端に LPXTG 配列を付与するだけで、Sortase を添加するとその蛋白質の N 末端と C 末端が連結され、蛋白質を環状化する事が出来る。</p> <p>初めに、モデルタンパク質として EGFP 及び DHFR を選択し、このタンパク質に上記の Sortase の認識配列を付加した組換えタンパク質を発現・精製した。これらのタンパク質に Sortase を添加すると、環状化反応が起こることが確認できた。そこで、この環状化タンパク質の熱安定性を調べたところ、変性温度が約10℃ほど向上していることが分かった。以上より、本手法はタンパク質の安定性を向上させる優れた手法であることが分かった。</p> <p>続いて、本手法の汎用性を検討するために、いくつかのタンパク質について環状化が可能かどうか検討した。すると、シングルドメイン抗体は環状化に成功したものの、比較的分子量の大きいβグルコシダーゼ等の酵素は環状化反応が進みにくいという結果になった。これは、立体障害により環状化反応が阻害されていると示唆され、環状化反応を進めるためのリンカーデザインが重要であることが示された。</p> <p>また、本手法を生きた細胞内に応用するために、Sortase の発現ベクターを構築した。これら大腸菌、酵母、それから動物細胞で発現を検討したところ、大腸菌では多量の発現が認められたが、酵母ではその発現量は少なく、動物細胞に至ってはごく微量であった。それぞれの細胞内で酵素活性を調べると、大腸菌では活性を持っていたが、酵母及び動物細胞ではごくわずかな活性のみであった。以上より、活性を持った酵素を大量に発現させることが今後の課題であり、また細胞内への応用につながると期待できる。</p>					
キーワード FA	タンパク質	安定化	酵素		

(以下は記入しないでください)

助成財団コード TA						研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC						シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入して下さい）									
雑誌	論文標題 GB	該当無し							
	著者名GA		雑誌名GC						
	ページGF	~	発行年GE					巻号 GD	
雑誌	論文標題 GB								
	著者名GA		雑誌名GC						
	ページGF	~	発行年GE					巻号 GD	
雑誌	論文標題 GB								
	著者名GA		雑誌名GC						
	ページGF	~	発行年GE					巻号 GD	
図書	著者名HA	該当無し							
	書名HC								
	出版者HB		発行年HD					総ページ HE	
図書	著者名HA								
	書名HC								
	出版者HB		発行年HD					総ページ HE	

欧文概要EZ

The aim of this study is to establish enzyme-mediated protein stabilization and its application inside living cells. We have focused on Sortase, a transpeptidase. Sortase recognizes LPXTG amino acid sequences and cleaves between T and G, and then ligated with N-terminal polyglycine sequences. Our strategy is that the substrate sequences, i. e., LPXTG and GGG sequences, are introduced both N- and C-terminus of the target protein. Then Sortase allows to conjugate its N- and C-terminus and produces the circular protein. EGFP and DHFR were chosen as model proteins and these substrate tags appended EGFP and DHFR were successfully conjugated by Sortase and circular EGFP and circular DHFR were obtained. Then the thermal stability of these circular proteins were significantly improved, suggesting our strategy is very useful for protein stabilization. The optimal linker design between N-terminal and C-terminal is one of the issue for expanding versatility of this method.

In the application inside cells, we tried to express sortase inside E.coli, yeast and mammalian cells. Overexpression can be achieved inside E.coli, however, the expression levels inside yeast and mammalian cells were quite low. Although enzymatic activity was observed inside all cells, the improvement of expression levels retaining its enzymatic activity should be required.