

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 Almasul Alfi

論 文 題 目

Synthesis of difficult-to-express proteins by *Escherichia coli*
expression systems

(大腸菌発現システムを用いた難発現タンパク質の合成)

論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	中野 秀雄
委 員	名古屋大学教授	北島 健
委 員	名古屋大学教授	佐藤 ちひろ
委 員	名古屋大学准教授	岩崎 雄吾
委 員	名古屋大学講師	兒島 孝明
委 員	名古屋大学助教	Jasmina Damnjanovic

論文審査の結果の要旨

Almasul Alfiは、大腸菌の生細胞および無細胞タンパク質合成系を用いて、発現困難な産業用酵素や抗体の誘導体などを活性体として合成する手法の研究開発を行った。以下にその要旨を記載する。

タンパク質中のジスルフィド結合の存在は、タンパク質の構造安定性などに貢献していることが知られている。しかしながら、ジスルフィド結合を多数含むタンパク質を、大腸菌などで異種発現させると、しばしばミスフォールドを引き起こし、凝集体が形成しやすくなる。本論文では、以下に記載する3種類の難発現タンパク質に着目し研究を行った。その一つは、白色腐朽菌が産生するマンガンペルオキシダーゼ (MnP) である。Mnp は Mn^{2+} を Mn^{3+} に酸化するヘムペルオキシダーゼで、非常に強力な非特異的酸化酵素であり、一般には酸化されにくい立体障害的にフェノール性基質にも作用できる。Mnp は5つのジスルフィド結合があり、そのうち3つは非連続であり、大腸菌発現系ではほとんど封入体として発現する。次にMnpとよく似たフォールドを有する西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) に着目した。HRPは、生化学・分子生物学や様々な検査などで幅広く使用されており、2つの連続したジスルフィド結合と2つの非連続的なジスルフィド結合を有し、大腸菌で発現させると封入体として合成されることが知られている。最後に抗体と酵素の2つの機能を有する抗体 (Fab) と酵素の融合タンパク質として開発された Zipbodyzyme の大量合成を試みた。

第二章では、大腸菌細胞質での MnP の可溶性発現について検討した。Mnp には5つのジスルフィド結合があることから、ジスルフィド結合イソメラーゼ DsbC を細胞質内で発現する大腸菌 SHuffle T7 Express を用い、さらに複数のシャペロンタンパク質を共存させ、Mnp の可溶性発現効率を検討した。その結果、DnaK-DnaJ-GrpE との共存により、最も可溶性発現の割合が高くなった。しかしながら DnaK-DnaJ-GrpE は、Mnp をヒスチジンタグにより精製後した後も、MnP と複合体を維持していた。そこで ATP およびその再生システムを加えて一定時間静置すると、これらの複合体は MnP より遊離した。おそらく ATP の存在により ATP に依存したシャペロンのリフォールディングプロセスが完了し、Mnp を遊離させたと考えられる。またその際にヘミンを共存させることにより、MnP がその活性を維持し、市販の MnP と比較して約2倍高い比活性をもたらした。

第三章では、大腸菌 BL21(DE3)に酵母由来スルフヒドリルオキシダーゼ Erv1p および大腸菌ジスルフィドイソメラーゼ DsbC を発現する CyDisCo システムを用いて、MnP、HRP、および Fab-アルカリフォスファターゼ融合タンパク質 (Fab-AP) の発現を検討した。殆どが不溶性として発現したが、HRP は一部可溶化し、活性型として合成することに成功した。

第四章では、抗体 (Fab) ー酵素融合体である Zipbodyzyme の発現において、N 末端タグと、Fab 部分の L 鎖 H 鎖間のロイシンジッパーについて検討した。Fab と融合した酵素は nanoLuc である。タンパク質の N 末端に、タンパク質発現増加タグとして加藤らが発見した SKIK タグを付加することによる、Zipbodyzyme の収量と抗体酵素の両方の活性に与える影響を検討した。SKIK タグの付加により、無細胞タンパク質合成系における合成量が顕著に増大した。得られた Zipbodyzyme の抗体と酵素の両方の機能を利用することで、1 ステップの迅速な免疫検出法により迅速に抗原を検出することができた。

一方大腸菌 BL21 (DE3) で大量合成を試みたところ、ほとんどが封入体として発現した。そこで L 鎖と H 鎖ー酵素の 2 つのポリペプチドを精製し、連続的なバッファー交換によるリフォールディング法の条件を種々検討することで、Zipbodyzyme を活性体として得ることに成功した。

Zipbodyzyme は L 鎖と H 鎖の間の相互作用を、ロイシンジッパー (LZ) の付加により強めている。そこで 4 種の LZ (LZA/LZB、Jun/Fos、acidic Fos/basic Jun、basic Fos/basic Jun) の組み合わせ効果を検討したところ、リフォールディングにおいては、LZA/LZB および acidic Fos/basic Jun がより効率的な活性タンパク質合成をもたらすことを明らかにした。

以上のように Almasul Alfi は、複数のジスルフィド結合を有する難発現タンパク質分子を対象に、無細胞タンパク質合成系、大腸菌細胞質発現系、およびリフォールディング系を使って、活性体として合成する様々な技術開発を行った。

本研究によって得られた成果は、今後の酵素や抗体の科学およびその応用技術に寄与するところが大きい。よって本委員会は本論分が博士(農学)の学論文として十分価値あるものと認め、論文審査に合格と判定した。