

学位（修士）論文要旨

論文提出者

平成 26 年度 入学
工 学 府 生命工学 専攻
学籍番号 14641112
氏 名 櫻井博光 印

論文指導教員氏名 黒田裕

論文題目

(英文) Enhancement of TEV solubility using Solubility Enhancement Peptide (SEP)-tag

(和文) 溶解性向上ペプチド(SEP)タグによる TEV 蛋白質の溶解性向上検討

論文要旨（1000字程度）

[背景・目的]

産業的な応用や学術的な研究において酵素や抗体はその重要性が近年高まっており、その効率的な精製方法が期待されている。低分子抗体や酵素などの蛋白質精製において、大腸菌は蛋白質の収量の多さや精製コストの安さから組換え蛋白質発現の宿主としてよく用いられている。その一方で、封入体と呼ばれる不活性な凝集体を形成してしまうことが問題とされている。封入体形成への主な対処法としては、変性剤を用いて封入体の巻き戻しを行う手法、融合蛋白質の付加により封入体形成を予め防ぐ手法などが用いられているが、それぞれ汎用性や構造・機能への影響などの問題が存在する。当研究室では、アミノ酸の溶解度を制御する目的で、アミノ酸数残基の溶解性向上ペプチドタグ (SEP-tag) を開発した。このタグはグリシンのリンカーと単一種のアミノ酸から構成され、特にアルギニンやアスパラギン酸のタグなど電荷をもつものでは溶解性の大幅な向上が確認されている。本研究では、scFv, 酵素に対して SEP-tag を付加することで、大腸菌での封入体形成の抑制効果を検討する

[研究方法]

モデル蛋白質として、抗 EGFR scFv 抗体と TEV プロテアーゼを選択し、サブクローニングと点変異を用いてそれぞれの発現系として抗 EGFR C9R, TEV C9R とタグ無しのコントロールを pET-15b に構築した。これらの系を用い BL21 (DE3)pLysS 株を形質転換し、培養、発現誘導後、一定時間毎にのサンプルを回収し、SDS-PAGE を行い、上清・沈殿中の蛋白質の割合を求めた。次に、この発現チェックからタグの効果が期待される TEV プロテアーゼについて、200mL の中スケールで発現を行い、その後の精製過程におけるタグの溶解度への影響を調査した。また、精製したタグ付き TEV プロテアーゼについて、活性測定を行うことで、タグによる活性への悪影響の有無を確かめた。

[結果・考察]

5mL 試験官培地スケールでは、TEV プロテアーゼに対して 31,25°C で上清画分での蛋白質が確認できた。そのため、以降の SEP-tag に対する調査は TEV プロテアーゼを中心に行うことに決定した。TEV プロテアーゼの発現精製過程において、200mL 羽根つきフラスコでの培養では、5mL 試験官培地と比べ TEV C9R の発現量が増加していることが確認され、C9R タグが発現量の増加に寄与していることが示唆された。精製済みの TEV C9R を用いて活性測定を行った所、基質のバンドが消化されていることが確認され、C9R タグが TEV プロテアーゼを失活させることはないことがわかった。