平成２６年度 学内研究助成金 研究報告書

研　究　種　目	■奨励研究助成金	□研究成果刊行助成金
	□21 世紀研究開発奨励金 （共同研究助成金）	□21 世紀教育開発奨励金 （教育推進研究助成金）
研 究 課 題 名	蛋白質異常凝集体分解シャペロン・アンフォルジンの発現系確立	
研究者所属・氏名	研究代表者：先端技術総合研究所　高圧力蛋白質研究センター 講師　櫻井一正 共同研究者：なし	

１．研究目的･内容

本研究の最終目的はアンフォルジンという分子の構造、およびアンフォルジンの蛋白質凝集解きほぐし活性の物理化学的機構の知見を得ることである。その実験基盤のため、大腸菌および酵母を用いたアンフォルジンの発現、精製法を構築することが本課題の目標である。

２．研究経過及び成果

従来、アンフォルジンの発現は本来の由来である *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした大量発現系を使用していた。しかしこの発現系では培地 1 L あたり数十μg 程度の発現量しか得られておらず、物理化学的実験を行うのは難しい状況であった。そこで、*Pichia pastoris* および *Escherichia coli* 発現系を用いた、アンフォルジンの大量調製法の確立を目指した。

はじめに、*P. pastoris* による発現を検討した。*S. cerevisiae* 用に構築された既存のベクター中のアンフォルジンの構造遺伝子を元に、種々のアンフォルジン遺伝子（全長体、N 末端欠損体、システイン→アラニン置換体）を作成した。それらの遺伝子を 2 種類の *P. pastoris* 用ベクター（分泌発現用 pPIC9 と細胞内発現用 pPIC Z）に組み込み、発現を試みた。しかし、細胞内発現系でも分泌発現系でもアンフォルジンの発現は見られなかった。アンフォルジンをコードする mRNA の合成は確認されたことから、翻訳直後のアンフォルジンは非常に不安定で、細胞内の品質管理機構によって加水分解を受けているのではないかと考えられる。この結果と考察は、26 年度近畿大学先端技術総合研究所紀要にて報告した。

続いて、大腸菌による発現を検討した。上と同様、アンフォルジン遺伝子を大腸菌発現用プラスミド pAED4 に組みこみ、このプラスミドを用いて *E. coli* BL21(DE3)株の形質転換を行った。得られた形質転換体を培養し、アンフォルジンの発現誘導を行った。結果、封入体の形で発現することが分かり、その収量は数十 mg/L 培地という高いものであった。ただし、ウェスタンブロットから、N 末端欠損アンフォルジンは分解を受けやすいことが分かった。そこで、以降の実験は全長アンフォルジンを用いて進めることとした。

得られた封入体を尿素水溶液で溶解し、尿素存在下で Ni カラムによる His-tag 精製を行った後、希釈法でアンフォルジンのリフォーディングを試みた。折り畳みの効率は DLD 活性試験にて行った。この試験では、アンフォルジン活性をモデル基質の DCIP の消費速度の形で定量する。折り畳み溶液に何も加えなかった場合 0.012 nmol/min の活性だったが、アルギニンと FAD を加えた場合、0.021 nmol/min という活性増加が得られた。しかし、これでも以前報告された活性強度の 10 分の 1 程度にとどまっている。そこで、現在はより効率良い折り畳み条件を検討している。

まとめると、アンフォルジンは大腸菌で封入体として有意な量発現することが分かった。得られた封入体からのリフォールディング条件は、今後さらなる検討が必要ではあるものの、十分活性を持つアンフォルジンを得ることが可能だということも確認できた。

３．本研究と関連した今後の研究計画

研究目的の欄でも述べた通り、本研究の最終目的はアンフォルジンという分子の構造、およびアンフォルジンの蛋白質凝集解きほぐし活性の物理化学的機構の知見を得ることである。

蛋白質はある条件下で、疾病に関与する異常凝集体を形成することが知られている。以前、アンフォルジンがタウ蛋白質やアミロイド β が形成する異常凝集体を解きほぐすことが報告された。この性質は、疾病に関連する蛋白質異常凝集体の除去に利用できると考えられる。そのためには、物理化学的実験を行うことで、解きほぐし反応の機構を理解することが必須であるが、その研究試料確保のため、発現系の確立が必須であった。

研究経過及び成果の欄で述べた通り、大腸菌発現系で発現が確認されたが、更なるリフォールディング条件の検討を要するという状況である。そこで今後は、今年度中に発現アンフォルジンの折り畳み条件の検討を完了し、関連する研究会や論文雑誌に報告することを予定している。続いて構造研究、物理化学研究に移行することを予定している。上で述べた通り、アンフォルジンの特異的な性質を解明し、最終的には異常凝集に関わる疾病の治療法に結びつけたいと考えている。

４．成果の発表等

発　表　機　関　名	種類（著書・雑誌・口頭）	発表年月日(予定を含む)