

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	大腸菌でのバイオ医薬品糖タンパク質産生系の開発				
研究組織	代表者	所属・職名	食品栄養科学部・助教	氏名	藤浪 大輔
	研究分担者	所属・職名	食品栄養科学部・准教授	氏名	伊藤 創平
		所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	食品栄養科学部・助教	氏名	藤浪 大輔

講演題目	
非典型アミノ酸の導入によるシステイン糖転移酵素の創出	
研究の目的、成果及び今後の展望	
<p>目的：</p> <p>タンパク質は 20 種類のアミノ酸から構成される、いわゆる「制限付き」ポリマーである。本研究では、20 種以外の非典型アミノ酸を、大腸菌生合成的にタンパク質に組み込むことで、酵素の高機能化を試みる。実験対象として、タンパク質の翻訳後糖鎖修飾を担う糖転移酵素を選定した。</p> <p>翻訳後糖鎖修飾は、タンパク質の機能と安定性に寄与し、アスパラギン結合型 (N 型) とセリン・スレオニン結合型 (O 型) 糖鎖修飾が知られている。化学的にシステイン (S 型) に糖鎖修飾を施した糖タンパク質は O 型に比較し、高い血中安定性など優れた生物活性を示す。よって本研究では O 型糖転移酵素を、非典型アミノ酸の導入により、S 型糖転移酵素に改変することを研究課題に設定した。</p> <p>成果：</p> <p>人工酵素の鋳型となる糖転移酵素の探索を行った。その結果、P. alvei より新規 O 型糖転移酵素を発見した。この酵素はヒトに由来する O 型糖転移酵素に比較し、①幅広いドナー糖ヌクレオチド基質特異性、②ユニークなアクセプタータンパク質基質特異性を示した。よって、将来的にワクチンアジュバンドなど、非ヒト型糖タンパク質の創出に寄与する可能性が考えられている。この酵素の立体構造予測から、活性中心にあるヒスチジンが触媒塩基として、糖転移が起こるセリン・スレオニンのヒドロキシル基の活性化 (脱プロトン化) に関与することが示唆された。よってこのヒスチジンの pKa を変化させることで S 型糖転移酵素への改変が可能になると考えた。</p> <p>このヒスチジンを d-メチルヒスチジン、3-ピリジルアラニンに置換することを試みた。しかし、これら非典型アミノ酸の導入効率が低いことが問題になった。また、e-メチルヒスチジン、2-メルカプトヒスチジンはタンパク質に導入されなかった。以上の理由により、現在までに置換改変体の活性測定を行えるまでには至っていない。</p> <p>今後：</p> <p>d-メチルヒスチジン、3-ピリジルアラニンの導入効率を上げるために、大腸菌の培養条件を検討する。創出した S 型糖転移酵素について、酵素反応の pH プロファイルを調べ、触媒塩基 pKa と一致していることを確認する。触媒塩基の pKa を NMR により決定する。糖転移酵素以外の酵素についても実験を行う。</p>	