

(様式第9 別紙2：公開版)

1. 養成技術者氏名： 張 子蓮

2. 養成カリキュラム名：安定糖鎖関連酵素と磁気微粒子を利用した反応システムの開発

3. 養成カリキュラムの達成状況

生物が有する酵素・タンパク質の有効な利用を目的として、15年度後期では計画に有るとおり主に三つの項目：有用タンパク質・酵素の効率的発現、多種タンパク質の簡便精製法、有用酵素の効率的なスクリーニング法について検討研修を行った。有用タンパク質・酵素の効率的発現検討については、本年度前期で検討した発現条件を用いて、さらに超好熱古細菌 *Sulfolobus tokodaii* strain 7 ゲノム情報から選択した6個の糖合成関連酵素遺伝子に関して効率的な発現が可能か検討した。多種タンパク質の簡便精製法の検討については、熱処理とアフィニティ法を組み合わせる事により、耐熱性蛋白質を簡便に精製できる事を見出した。この方法を用いた12種類の耐熱性酵素のすべてが効率よく精製出来たので、この方法は多種類の耐熱性たんぱく質の精製に応用出来ると考えられた。有用酵素の効率的なスクリーニング法については、主に糖ヌクレオチド合成に関与する酵素をモデルとして、耐熱性酵素の反応条件、酵素の安定性、酵素活性評価などの解析を行ったところ、効率的な酵素活性のスクリーニング法への応用の可能性を広げることが出来た。今後これらの方法を、プレジジョン・システム・サイエンス社が有する磁気微粒子技術と融合させて、さらに効率的な精製手法やスクリーニング手法の開発に結びつけていきたい。さらに、これらの本年度習得した技術を総合的に結びつける事で生物的生産システムの開発の可能性は高くなると考えられる。

以上のように15年度後期に計画していたカリキュラムの大部分に関しては、実施出来ていたりほぼ検討結果が得られてきている。よって今年度の目標は、ほぼ達成出来たと考える。

4. 成果

現在の工業生産は高温高圧下での化学的生産プロセスのように膨大な量のエネルギーを必要とするので地球温暖化等の問題点も指摘されている。さらにその生産過程で多くの不要な廃棄物も同時に生産されてきている。一方、このようなエネルギーを大量に消費する生産プロセスでは無く、消費するエネルギーを減らそうとする動きがある。

その中でも、生物が有している様々な機能は現在用いられている化学反応による物質生産に較

べて遙かに効率が良い。さらに、生物では異性体等の識別も行うので、生産効率・有効性を格段に上げることが出来る。ただ、それらの有用な機能を有する生物そのものを用いることが出来る例は、非常に限られているので、生体内でそれらの反応を司っている酵素を利用する事が最も有効な手段だと考えられる。特に特殊な環境に生息する微生物が有する酵素・タンパク質には、非常に安定性の高いものがあるのでそれらの酵素・タンパク質の大量生産、安定化等の問題を解決すると大きく利用の可能性が広がると思われる。

そこで、カリキュラムでは生物が有する安定な酵素・タンパク質を有効に利用して、プレシジョン・システム・サイエンス社が有する磁気微粒子技術との融合を図ることで、今まで大量にエネルギーを消費していた化学反応に変わる地球環境にも優しい生産プロセス・システムの構築を目標としている。

この目標を達成するために、今年度後期には主に下記3点のカリキュラムについての検討を行った。このカリキュラムの実施によって得られた成果は、酵素工学研究会、日本生化学会、分子生物学会年会等において発表してきた。これらの場では、多くの研究者と交流する事が出来、中でも好熱古熱菌が有する酵素の安定性や応用性などが注目されて高い評価を得た。

(1) 有用タンパク質・酵素の効率的発現の検討

好熱古細菌のゲノム情報に基づいて、様々な生物に不可欠な糖鎖合成に関連する酵素を見出した。その中から特に興味深い6個の遺伝子を選択して、pET系ベクターにクローニングした。これらの遺伝子クローニングの際には、His タグの有無や、発現ベクターの種類の違いによる発現効率を検討するために2種類の発現ベクターpET28及びpET21を用いて各々タグの有り無しのクローンを構築した。本年前期に検討した大腸菌での効率的な発現手法を用いて発現を試みた結果、1個の遺伝子については効率的に可溶性タンパク質が発現されることを確認したが、残りの5個については発現量が極めて少ないかまたは不溶性の封入体として発現していることが見出された。これらの有用酵素の今後の利用を考慮すると、誘導剤IPTGの濃度や培養温度、時間などの発現条件のほかに、目的遺伝子そのものも発現の効率に大きいな影響があるのでそれらのファクターについても今後検討する必要がある事が見出された。

(2) 多種タンパク質の簡便精製法の検討

今年度前期で検討した熱処理とアフィニティ法とを組み合わせることによって、可溶性耐熱

タンパク質についての簡便なタンパク質の精製方法をほぼ確立することが出来た。この方法が多種類の蛋白質の精製に適用出来るかどうかを検討するためにさらに、12種類の His タグの付いたタンパク質をモデルとして精製を行った。結果としては、すべての目的タンパク質を比較的簡便に精製することが出来た。そこで、多種類のタンパク質の精製に適用出来るこの手法を、プレジジョン・システム・サイエンス社が有する磁気微粒子技術と融合させて、酵素生産・精製システムの自動化に進めていきたい。このシステムは、次世代のポストゲノム解析に非常に役立つと思われる。

不溶性蛋白質として発現したものについて上述の方法で簡便に精製する事は非常に困難である。これらの蛋白質については、まず可溶化する事が前提となる。蛋白質の不溶化は、蛋白質の構造形成がうまくいかないために起こる現象である。機能を有する蛋白質を得るためには、正しい構造に戻す事が必要である。そこで、変性剤を用いて封入体から機能を有する蛋白質を可溶化させる方法を検討した。一つ目の方法としては、まず封入体蛋白質を尿素で可溶化し、その後透析によって徐々に尿素を取り除いて正しい構造に戻すという方法である。この方法を検討した結果、蛋白質は尿素によって封入体から簡単に可溶化することができるが、透析過程で再度変性してしまい沈殿してしまう場合が多かった。二つ目の方法としては、尿素で蛋白質を可溶化した後、アフィニティ法で目的蛋白質を変性したままで精製した後透析で、精製した蛋白質から徐々に尿素を除くことを試みた。この方法で精製した蛋白質には、耐熱性が見出され高温で酵素活性もあることが確認された。この方法の問題点としては目的蛋白質を変性したままで精製するので、アフィニティ法での精製過程で大部分の蛋白質は吸着されず、効率的でない点が挙げられる。今後さらに効率的な可溶化手法を検討する必要があると考えている。

(3) 有用酵素の効率的なスクリーニング法の検討

有用酵素の効率的なスクリーニング法を確立するためにはまず耐熱性酵素が有する機能の特性を把握しなければならない。そのためには耐熱性酵素の解析によって酵素が有する性質を確実に明らかにする必要がある。そのモデルとして、前期で酵素活性測定方法を確立した糖ヌクレオチド合成に關与する遺伝子である ST0452 蛋白質について、後期でさらに酵素活性の特性、特に金属イオン、pH、温度などの影響、基質特異性、速度パラメータなどの解析を詳細に行った。その結果、本酵素は金属イオン依存性酵素であり、酵素活性に対する金属イオンの影響は $Co > Mn > Mg > Zn > Ca$ である事が明らかとなった。酵素反応の至適 pH については、検討した pH2 ~ 10 間では、pH7.5 での活性が最も高く見出された。基質特異性について解析した結果、この酵素は遺伝子情報から推測した

基質である dTTP と Glucose-1-phosphate のほかに、遺伝子情報から推測されていない UTP、N-acetyl-glucosamine -1-phosphate や D-fructose-1-phosphate も基質として利用できることが判明した。この種類の酵素で多種類の糖ヌクレオチドの合成に利用できることが明らかとなり、極めて応用性が高いと考えられる。熱安定性のメカニズムや基質認識部位や活性部位などの解析を行うことにより、今後様々な酵素での応用化の可能性を高めていきたい。

これらの結果から、古細菌が有する耐熱性酵素には予想されない機能や基質を利用出来たりする事が見出されたので、今後の機能スクリーニングで注意が必要だと思われる。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表

なし。

(2) 口頭発表

1. Zhang ZL, Tsujimura, M Tajima H and Kawarabayasi Y, Characterization of the thermo-stable enzymes involved in the biosynthesis of dTDP-L-rhamnose from a thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain7. 酵素工学研究会第50回講演会(2003年10月24日、東京大学), 講演要旨集 P45
2. Zhang ZL, Tsujimura M, Tajima H and Kawarabayasi Y. Characterization of the e L-rhamnose biosynthetic genes from thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain7, 第76回日本生化学会(2003年10月15 - 18日、横浜), 生化学2003, 75(8): 789
3. Zhang ZL, Tsujimura, M, Akutsu, J, Nakano, S, Tajima H and Kawarabayasi Y Characterization of thermostable multifunctional enzyme for biosynthesis of polysaccharide identified from *S. tokodaii* strain7, 第26回分子生物学会年会(2003年12月10 - 13日、神戸)、プログラム P113.
4. 阿久津純一、辻村昌也、張子蓮、中野新太、今野聡 養王田正文、河原林裕、好酸性超好熱古細菌 *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来発現の検討, 第26回分子生物学会年会(2003年12月10 - 13日、神戸)、プログラム P253.

(3) 特許等

なし