

## プロジェクト研究発表 要旨

BP発表、学位論文発表、中間発表、CS、FS、IS（該当するものに丸印）

発表日：平成 26 年 2 月 16 日	
学籍番号:12648026	氏名:二宮拓也
主指導教員:津川若子	副指導教員:黒田裕、早出広司
プロジェクト研究プログラム(該当項目に丸印): 技術開発実践型 技術開発プランニング型	
発表タイトル:大腸菌細胞壁合成阻害作用を利用した組換えタンパク質抽出法の開発 (公開・非公開)	

### [背景・目的]

大腸菌内から目的の組換えタンパク質を回収するため大腸菌を破碎する必要がある。破碎方法として超音波破碎などの物理的な手法がよく用いられるが、熱などによりタンパク質が損傷を受ける場合がある。また、試料数が多い実験においては破碎工程の簡略化による効率化が望まれる。この問題に対し、当研究室において細胞壁合成阻害作用を持つ VanX 酵素を用いて大腸菌の自己溶菌による穏和な条件で簡単にタンパク質を抽出する方法を開発した。本研究ではこの細胞壁合成阻害による溶菌機構に着目し、より簡便な手法の開発を目指し、 $\beta$ ラクタム系抗生物質を用いて大腸菌を溶菌させる、新規のタンパク質抽出法の開発及びその評価を行った。

### [研究方法]

アンピシリンの溶菌作用を利用して目的タンパク質の回収が可能か検証した。可溶性画分に発現する 4 種のモデルタンパク質【Green Fluorescent Protein (GFPuv)、Gaussia Luciferase (GLuc)、Caspase-Activated DNase (CAD) 1-86 C34S、Intein N 末端ドメイン (N-intein)】を用いた。大腸菌 BL21 (DE3)株に各遺伝子をコードした pET26b 及び pAED4 プラスミドをそれぞれ挿入した。発現誘導後、抗生物質等の試薬を添加し濁度を測定することで溶菌効率の評価を行った。さらに、培地上清画分の SDS-PAGE 解析を行い各モデルタンパク質の放出割合を調べた。

### [結果・考察]

まず、GFPuv を用いて、種々の添加剤や添加量や添加のタイミング等溶菌条件の検討を行った。大腸菌内で GFPuv を発現誘導後、抗生物質を培地に添加し、各時間における培地の上清画分を SDS-PAGE を用いて解析した。これにより、抗生物質の溶菌作用を利用したタンパク質抽出が可能であると判断した。さらに、抗生物質添加時期の最適化を行ったところ、溶菌誘導が早いほどタンパク質が十分に発現されないまま溶菌してしまう傾向がみられたため、本研究では発現誘導後 2 h 以降に溶菌誘導を行った。次に、抗生物質耐性菌に対する溶菌誘導法を検討するため、抗生物質と  $\beta$ ラクタマーゼ阻害薬を組み合わせて溶菌誘導を行い、その後の濁度変化を測定した。その結果、抗生物質と  $\beta$ ラクタマーゼ阻害薬を 1:1 の割合で併用して溶菌誘導を行った場合、低濃度の抗生物質添加量で十分な溶菌効果が確認されたため、この条件を以降の実験でも用いた。さらに、自己溶菌によって得られた GFPuv の蛍光測定を超音波破碎で得られたものと比較した結果、同程度の蛍光強度を示した。このことから、本手法は目的タンパク質の状態に影響を与えないことが示唆された。次に、溶菌効率を向上させるため、溶菌誘導開始時及び集菌前にリゾチームと界面活性剤を添加した結果、溶菌効率が向上した。さらに、溶菌により得られた目的タンパク質の精製工程を効率化させるため、発現誘導後に培養液を濃縮してから溶菌誘導をかけ、非濃縮時と同等のタンパク質を回収できるか検証した。その結果、培養液を濃縮すると溶菌効率が著しく低下したが、これは、濃縮により菌体密度が非常に高まり細胞分裂効率が低下したためであると推測される。次に、4 種のモデルタンパク質を用いて本手法の検証を行った結果、培地上清画分からそれらを検出できた。しかし、 $\beta$ ラクタム系抗生物質による溶菌は細胞分裂過程で起こるため、細胞分裂効率に比例して溶菌効率に変化すると考えられる。以上より、 $\beta$ ラクタム系抗生物質を用いた新規のタンパク質抽出法を開発することができた。今後は、他の細胞破碎法との溶菌効率及び収量の比較、及び実用化に向けた溶菌条件検討を行う。