3G0915

デキストラン結合ドメインを利用した新規組換えタンパク質精製法

○加世田 国与士¹、児玉 孝雄²、福井 一博³、広瀬 恵子¹（¹工技院・融合研、²九工大・情報工、³岡大・菌）

組換えタンパク質を迅速かつ高効率で精製するために、ポリヒスチジンやグルタチオントランスフェラーゼなどの付加タグを用いたアフィニティーク精製法が開発されている。これらのタグの利用により目的のタンパク質を菌体溶解物から1ステップで精製することも可能である。その傍ら、タグとの相性が悪いと、融合タンパク質の発現が認められない場合や発現しても封入体になってしまうこともある。しばしばこれらの問題は、異種タグの利用で解決される。従って、候補となるタグは多種多様であることが望まれる。□腔内細菌（ミュータンス菌）が合成する酵素 グルコシルトランスフェラーゼは、デキストラン分子と特異的に相互作用するドメイン（DXドメイン）を有する。DXドメインは、架橋性のデキストランである Sephadex ビーズや Sephacryl ビーズに対しても高い親和性で結合する。

緑色蛍光タンパク質（GFP）をモデルタンパク質として、DX 融合タンパク質を作成し、精製を試みた。Abo 等 (1991) が作成したプラスミド 4R/pUC18 に GFP をコードする遺伝子を挿入し、大腸菌 BL21(DE3) 株を形質転換した。大量培養、発現誘導、溶菌処理に引き続き遠心上清に Sephadex G100 ビーズを加えて放置した後、回収したビーズは GFP 由来の蛍光色を呈していた。次いで、可溶性のデキストラン（MW 60,000）で融合タンパク質を溶出させ、SDS-PAGE/CBB 染色で解析した結果、純度は 90% に及んでいた。同様の結果が赤色蛍光タンパク質を用いた場合にも得られた。本法は、既存の精製法と比較して、i) 特殊な樹脂を必要とせず、低コストである。ii) デキストラン分子は不活性であるので、除去する必要がないという利点を有する。また、DXドメインは、変性させても容易にリフォールドするので、封入体からの精製にも適用可能である。

K. Kaseda, T. Kodama, K. Fukui, and K. Hirose : A novel approach for purification of recombinant proteins using the dextran binding domain

3G0945

結晶構造解析を基盤とした抗原抗体相互作用における重鎖 Tyr 残基の役割の解明

○白石 充典¹、津本 浩平¹、近藤 英昌²、熊谷 泉¹（¹東北大・院工・生工、²北工研）

抗体の相補性決定領域のアミノ酸組成には偏りがあることが知られており、特に Tyr 残基の重要性が示唆されてきた。我々は、抗ニトリリゾチーム抗体 HyHEL-10 の Fv 断片とニトリリゾチーム（HEL）との相互作用に着目し、部位特異的変異導入と滴定型熱量測定により、抗原認識機構の詳細な解析を報告してきた。今回は重鎖 33 位、50 位、58 位の各変異抗体-リゾチーム複合体の結晶構造解析をおこなったので報告する。以前の報告より、33 位、50 位の Tyr 残基は水酸基の寄与が非常に大きく、58 位の Tyr 残基は芳香環の寄与が非常に大きいことを示している。今回は Tyr33Phe 変異体（HY33F 変異体）、Tyr50Phe 変異体（HY50F 変異体）、Tyr58Ala 変異体（HY58A 変異体）についてニトリリゾチームとの複合体の構造解析をおこない、Tyr の水酸基の欠如（33 位、50 位）、および芳香環の欠如（58 位）による影響を構造学的に考察することを目指した。各変異体ともに野生型と同条件で同形の結晶が得られた。回折データはフォトンファクトリー（PF）のシンクロトロン放射光を用いて収集し、HY33F 変異体は 2.0 Å、HY50F 変異体は 2.3 Å、HY58A 変異体は 2.1 Å の分解能のデータが得られた。各変異体ともに野生型-HEL 複合体の構造をサーチモデルとして分子置換法により構造を決定した。現在各変異体について構造の精密化をおこなっている。

M. Shiroishi, K. Tsumoto, H. Kondo, I. Kumagai : Role of Tyr residues in antigen-antibody interaction

3G0930

抗体 Fv-EPO 受容体キメラ細胞外ドメインの大腸菌を用いた発現・調製系の構築

○北村 武¹、津本 浩平¹、河原 正浩²、上田 宏²、長棟 輝行²、熊谷 泉¹（¹東北大・院工・生工、²東大・院工・化生）

我々は、赤血球前駆細胞に存在し、EPO を認識するマウス由来の膜貫通型レセプター EPO-R について、その EPO 認識ドメインを抗ニトリリゾチーム（HEL）抗体 HyHEL-10 の VH、VL 領域に置き換えた抗体受容体キメラ蛋白質が in vivo において HEL に対して結合能を持つこと、さらに HEL が EPO の代わりに、造血を誘導することを報告してきた。本年会では、この造血作用の分子機構を詳細に解析するため、キメラ蛋白質の細胞外ドメインを大腸菌を用いて不溶性顆粒として発現させ、巻き戻しに成功したので報告する。抗体受容体キメラ蛋白質の各々の鎖をコードする遺伝子を T7 プロモーター支配下の発現ベクターに組み込み、大腸菌 BL21(DE3) を用いて大量発現させた。遺伝子産物は不溶性顆粒として得られ、活性回復のための巻き戻し操作を行った。巻き戻しは、段階透析法を用い、変性剤濃度が 1M と 0.5M の時に、L-Arg と酸化型グルタチオンを添加することにより行なった。ほぼ 100 % に近い回収率で巻き戻すことができた。溶菌活性阻害度測定と表面プラスモン共鳴法を用いて、巻き戻し産物の機能を評価したところ、可溶性 Fv 断片に比べて若干親和性が劣るものの、VH と VL が共存するときのみ十分な活性を有することを確認した。現在、蛍光スペクトル、CD スペクトルの測定、熱量測定などにより、抗体受容体キメラ蛋白質の性格付けを行っている。

Takeshi Kitamura, Kouhei Tsumoto, Masahiro Kawahara, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune, and Izumi Kumagai Dept. Biomol. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., Dept. Chem., Biotechnol. Grad. Sch. Eng., Univ. of Tokyo : Construction of an antibody Fv-Epo receptor chimera extracellular domain using Escherichia coli expression system

3G1000

適応設計された金属キレート特異的結合性 DNA の進化的物性

○田淵 一郎¹、飯塚 悦弘¹、エリ パルハット²、伏見 譲¹（¹埼玉大・工、²理研・脳科学センター）

われわれは random 配列 ssDNA の in vitro selection により、Ni 錯体結合性 ssDNA を得、これらより 34mer の Ni-NTA 結合 ssDNA (NBD34N) を設計した。NBD34N の結合特異性を 7 種の金属及び 4 種の Ni 錯体に対して測定した結果、Ni-NTA を特異的に認識していることが解った。NBD34N は 2 次構造予測では単一の 2 次構造をとるが、affinity-chromatography では Ni-NTA との結合能がある構造 (B 型) と無い構造 (A 型) が存在し、この 2 つの構造は動的平衡に無く、単離できた。核酸分解酵素処理後断片は A, B 型共ほぼ同一、TGGE でも Tm の異なる類似融解特性を示し、A 型の化学修飾では Ni-NTA 結合構造 A' 型へ変化した。NBD34N の予測構造は 2 つのループとステムから成り、変異体の結合特性解析からループ間の 4 塩基が相互作用し 3 次構造を形成すると推定される。NBD34N は actinomycin の結合により Ni-NTA 結合性の物の比率が上がった。actinomycin は二本鎖の minor groove 側から結合するとされる。これらから A、B 型はループ間の folding の方向がステムの minor groove 及び major groove 側に対して異性体の可能性がある。NBD34N は補因子存在下で活性化し EDTA で可逆に imidazole で不可逆に失活した。わずか 34mer からなり活性制御可能で特異的に分子を認識するという高機能 DNA が得られたことになる。この活性制御可能性は、適応設計における淘汰圧には含まれていなかった。AffinityLandscape を少し登った所の配列が、その立体構造の多型性・柔軟性に伴って副次的に持っていた性質である。適応度の山の中腹では、このように、立体構造は一般に多型であるか、柔軟性があると考えられる。この配列は特定の機能に対して未だ十分進化していないが、多くの機能の山への登山口になりうると言う意味で、進化能を持った配列と言える。われわれはこの意味で進化能の大きな配列を「上高地配列」と呼んでいる。

I. Tabuchi, Y. Iizuka, P. Eli, Y. Husimi : Studies on in vitro evolved ss-DNA.