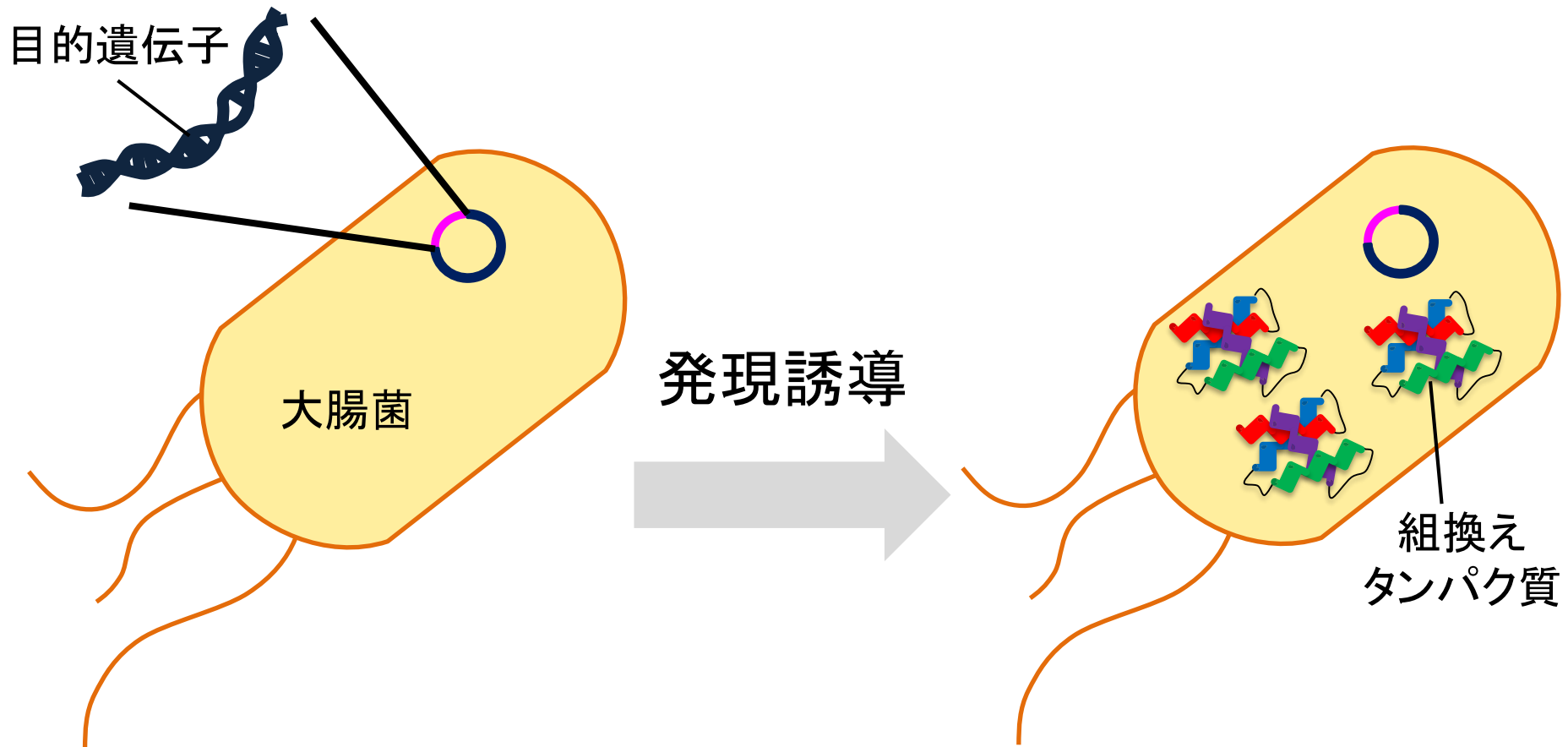


組換えタンパク質の細胞内蓄積量を 増加させる新手法

国立大学法人 宇都宮大学
バイオサイエンス教育研究センター
准教授 児玉 豊

組換えタンパク質発現技術とは

遺伝子組換えの手法を用いて宿主細胞に
機能性タンパク質を生産させる技術



組換えタンパク質の利用

酵素、抗体、ペプチド



基盤研究

機能解析

構造解析

産業利用

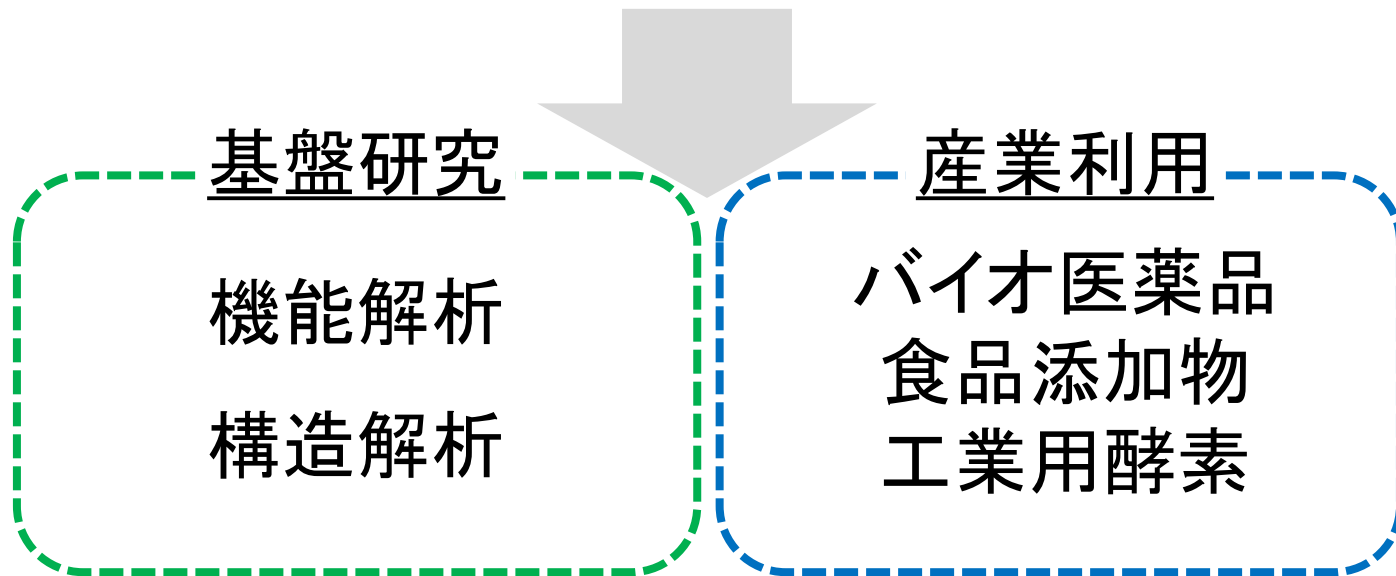
バイオ医薬品

食品添加物

工業用酵素

組換えタンパク質の利用

酵素、抗体、ペプチド



タンパク質の蓄積量の増加 = 生産コストの低下

従来技術

転写や翻訳を高効率化するシステム

- ・高い発現能力を有するプロモーター(転写の促進)
 - ・コドンの最適化(翻訳の促進)
 - ・分子シャペロン発現(タンパク質の可溶化)
 - ・親水性タンパク質との融合(タンパク質の可溶化)
-

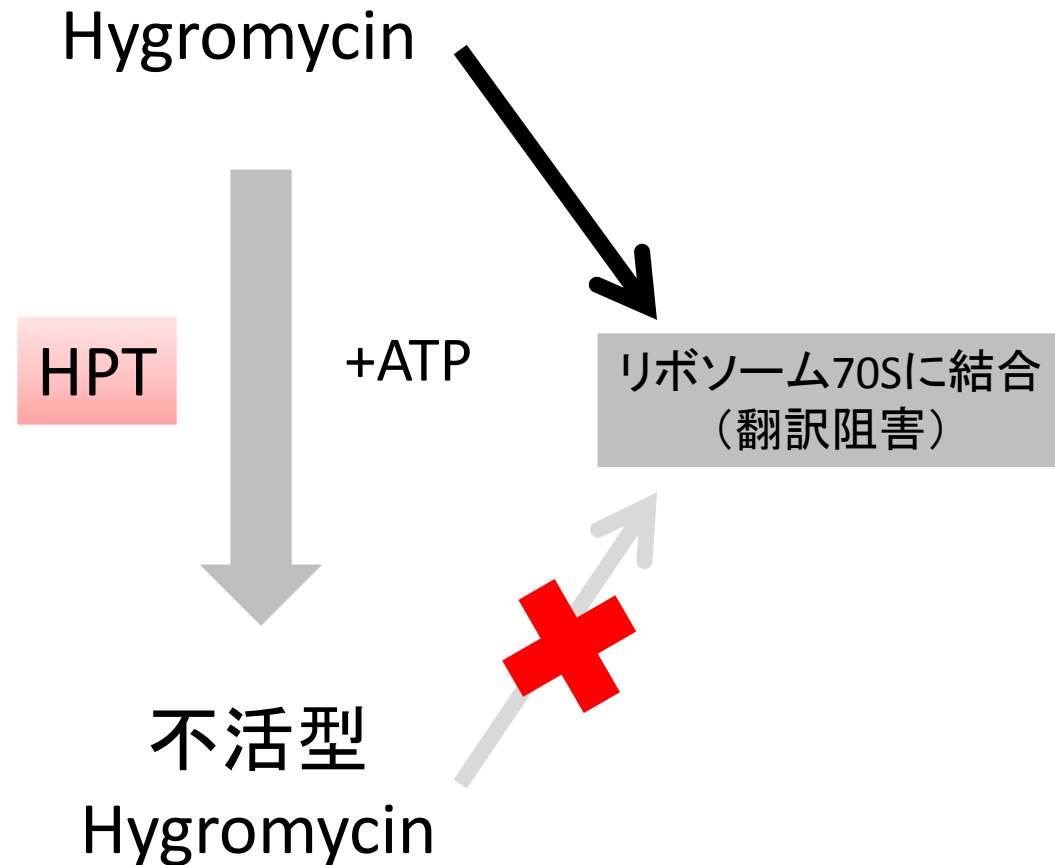
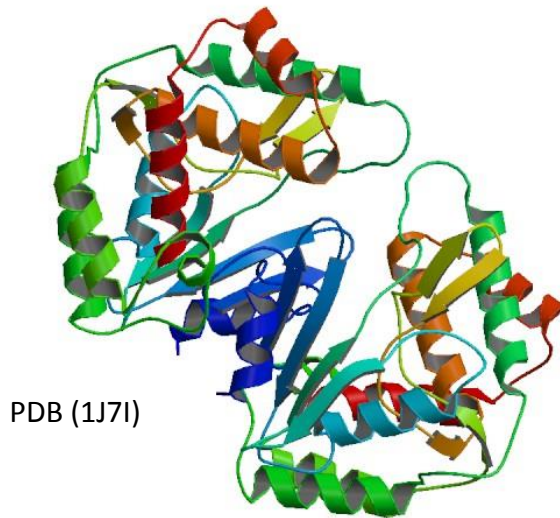
本技術

転写産物(mRNA)を安定化するシステム

- ・新奇のmRNA安定化配列(HPT酵素の改変実験から発見)

ハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT)

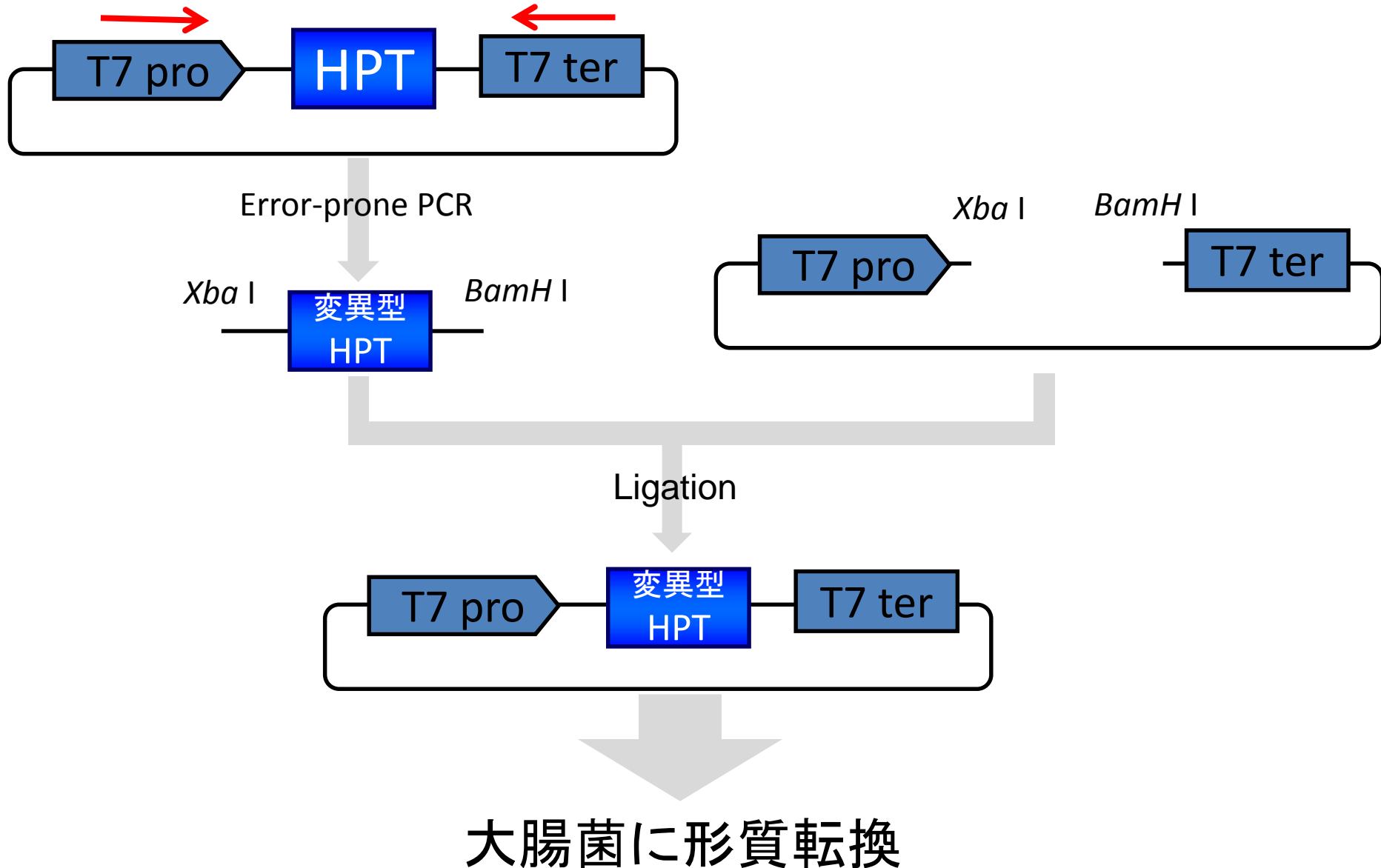
Hygromycin
Phosphotransferase (HPT or HPH)



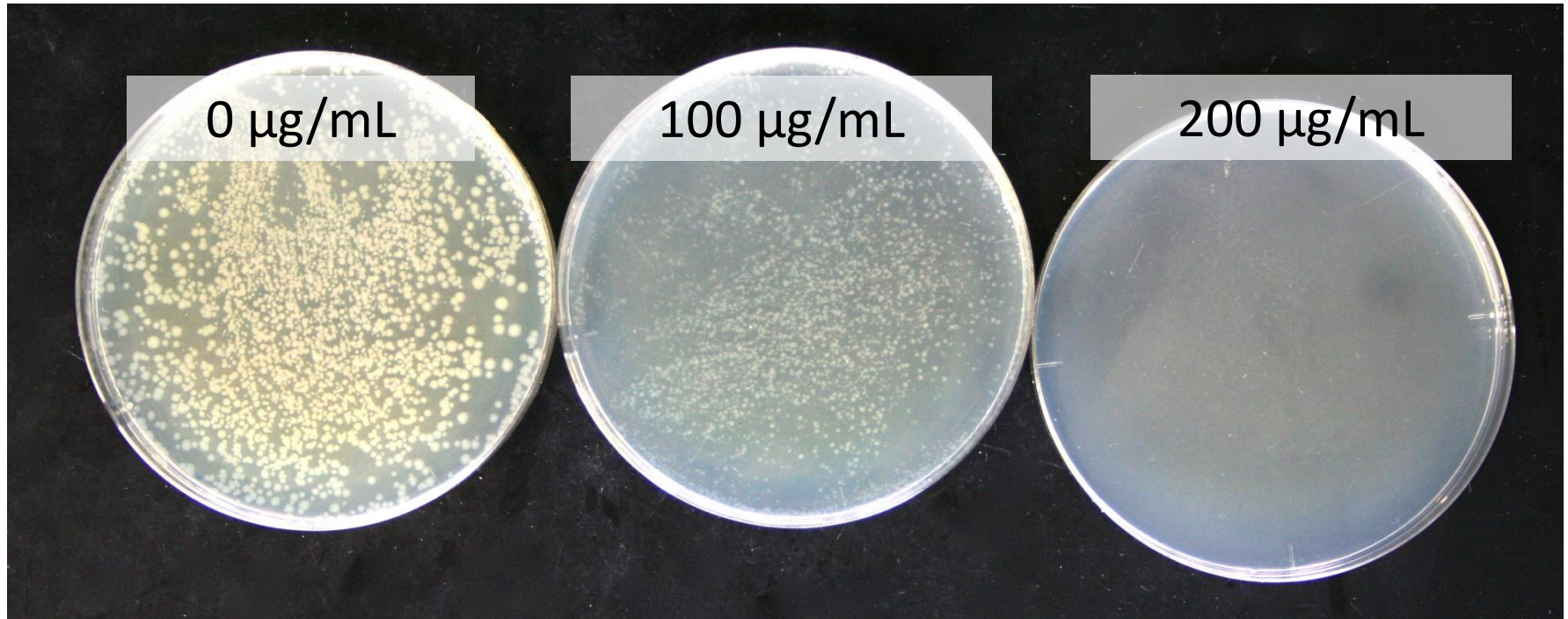
HPTの改良目標

- ・蓄積量の増加
- ・酵素活性の向上

Error-prone PCR法を用いた 変異型HPTライブラリの作製手順



野生型HPTを発現する大腸菌は ハイグロマイシン濃度200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上では生育できない



ハイグロマイシン濃度 200-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で
変異型HPTを選抜

高濃度ハイグロマイシン耐性のクローン

野生型HPT

変異型HPT

ハイグロマイシン
(250 µg/mL)

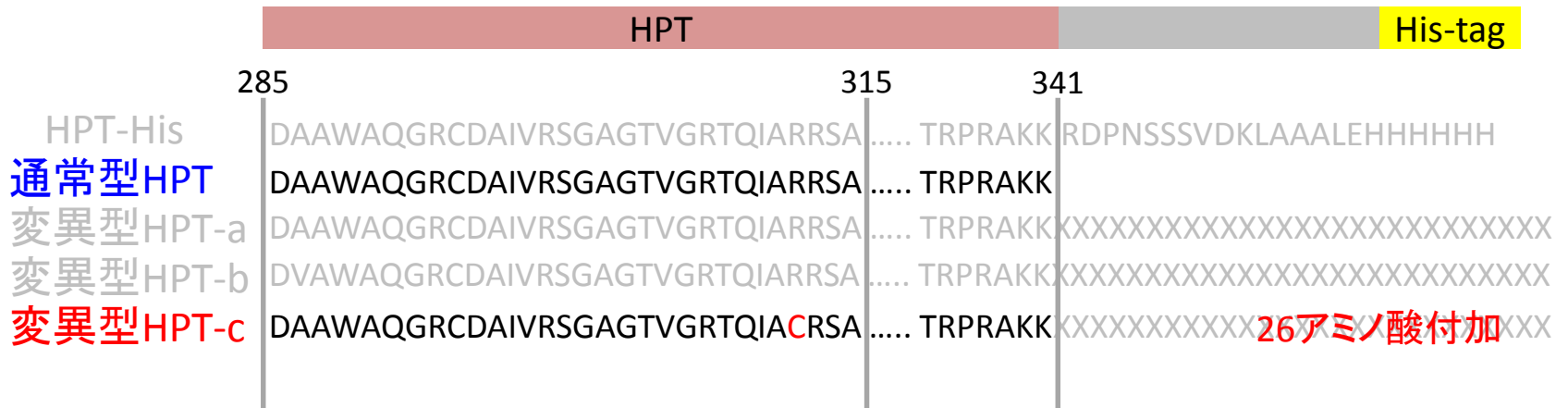
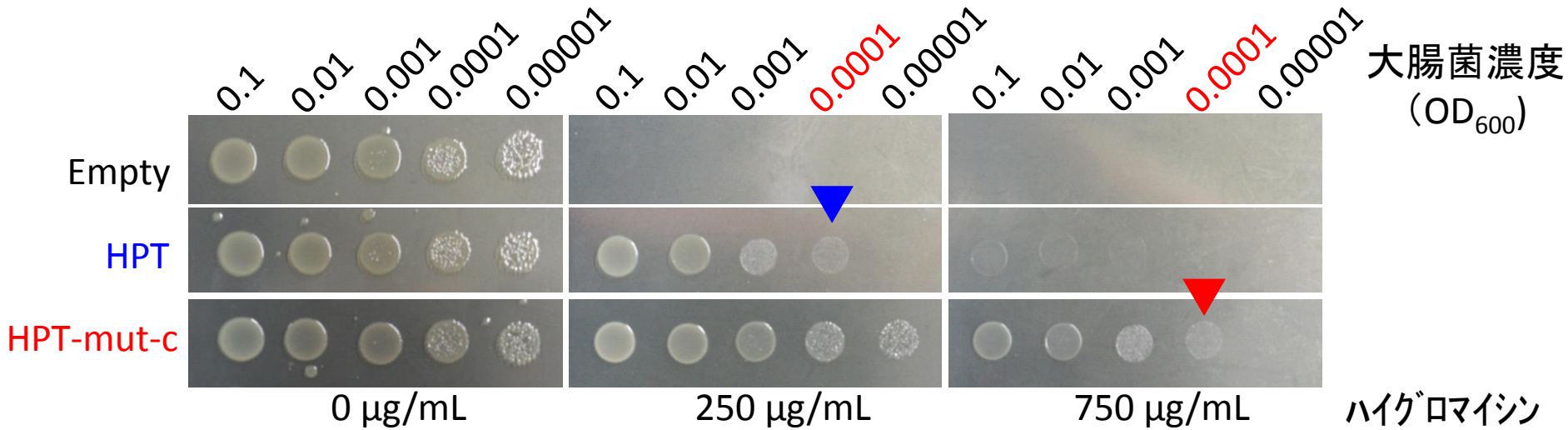
— + + + + + + +



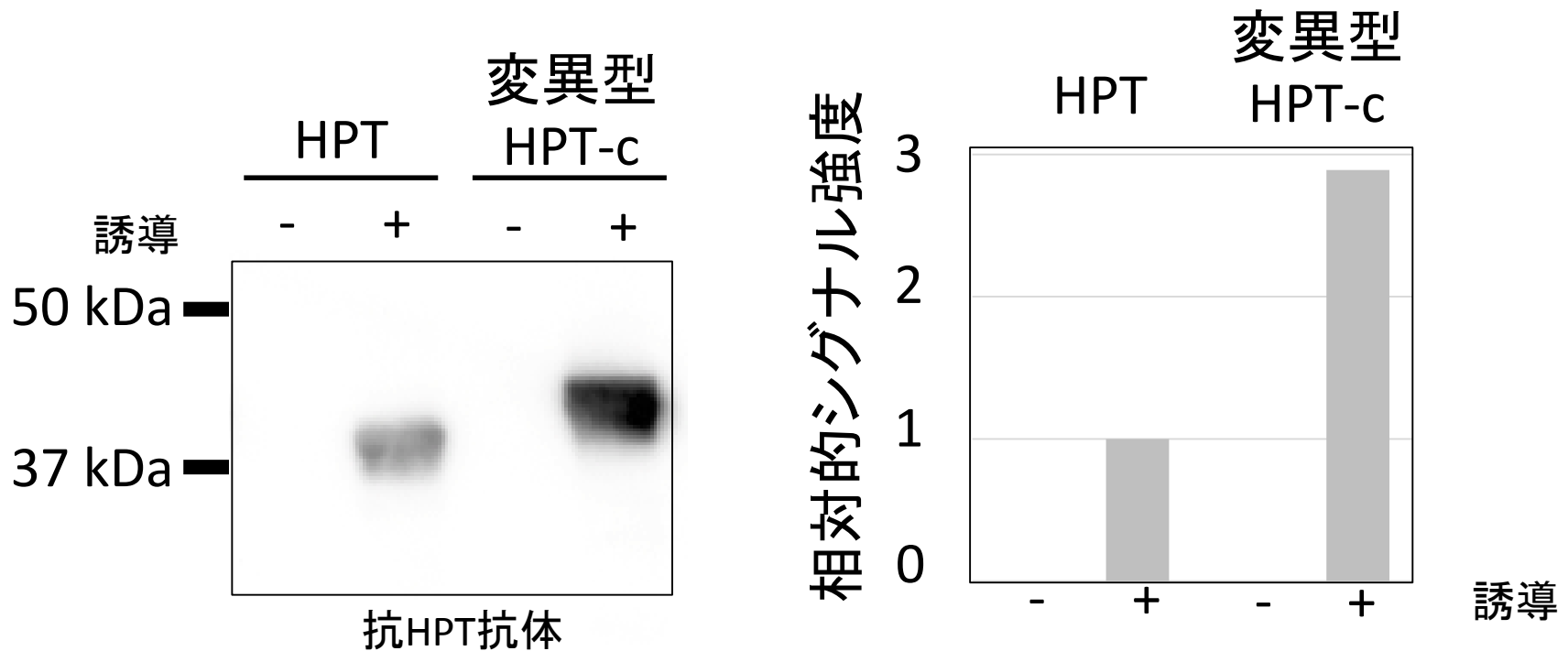
新奇のアミノ酸配列が付加

	HPT			His-tag
	285	315	341	
HPT-His	DAAWAQGRCDIVRSGAGTVGRTQIARRSA	TRPRAKK	RDPNSSSVDKLAAALEHHHHHH
通常型HPT	DAAWAQGRCDIVRSGAGTVGRTQIARRSA	TRPRAKK	
変異型HPT-a	DAAWAQGRCDIVRSGAGTVGRTQIARRSA	TRPRAKK	XXXXXXXXXXXX26アミノ酸付加XXX
変異型HPT-b	DVAWAQGRCDIVRSGAGTVGRTQIARRSA	TRPRAKK	XXXXXXXXXXXX26アミノ酸付加XXX
変異型HPT-c	DAAWAQGRCDIVRSGAGTVGRTQIACRSA	TRPRAKK	XXXXXXXXXXXX26アミノ酸付加XXX

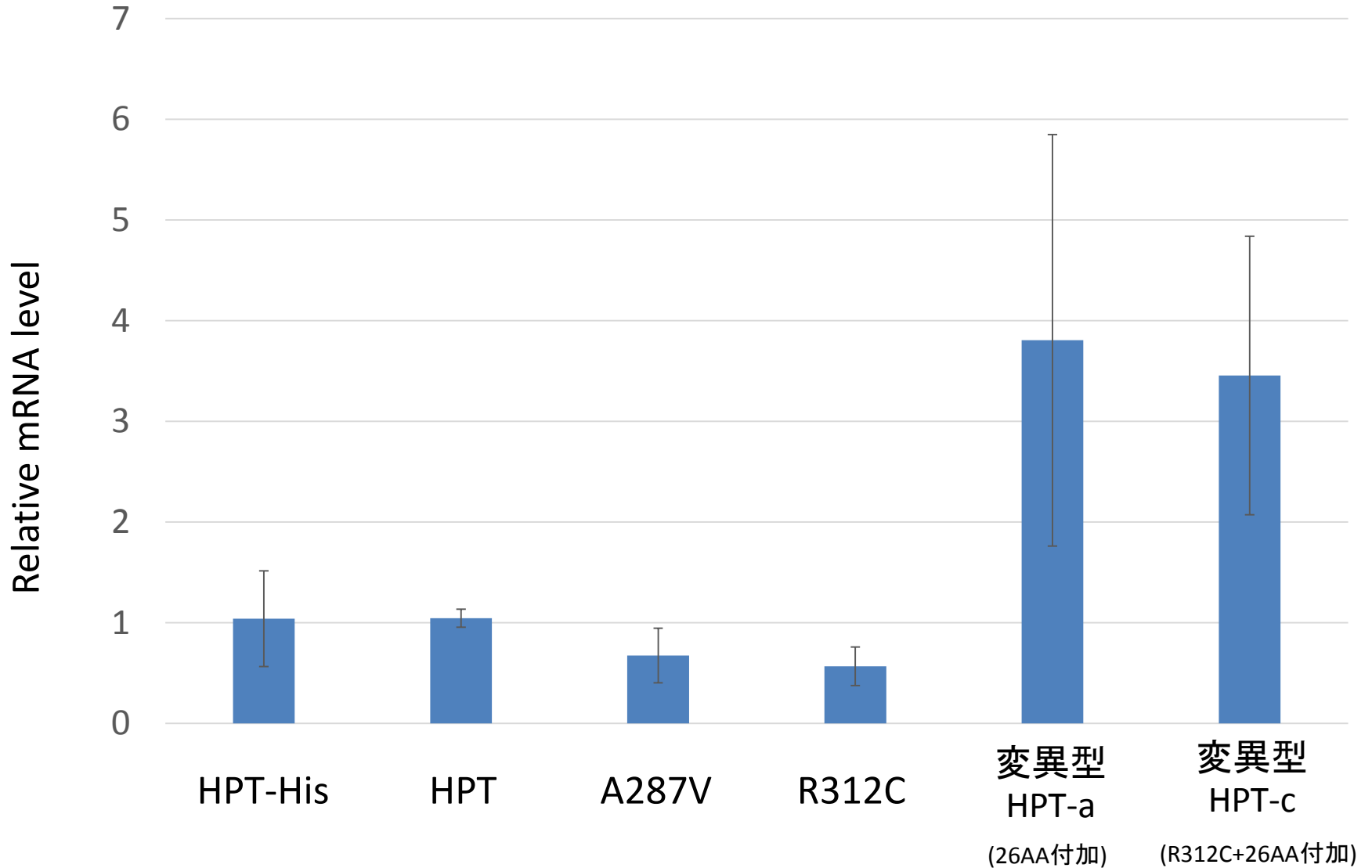
変異型HPTを持つ大腸菌は、 約3倍のハイグロマイシン濃度に耐える



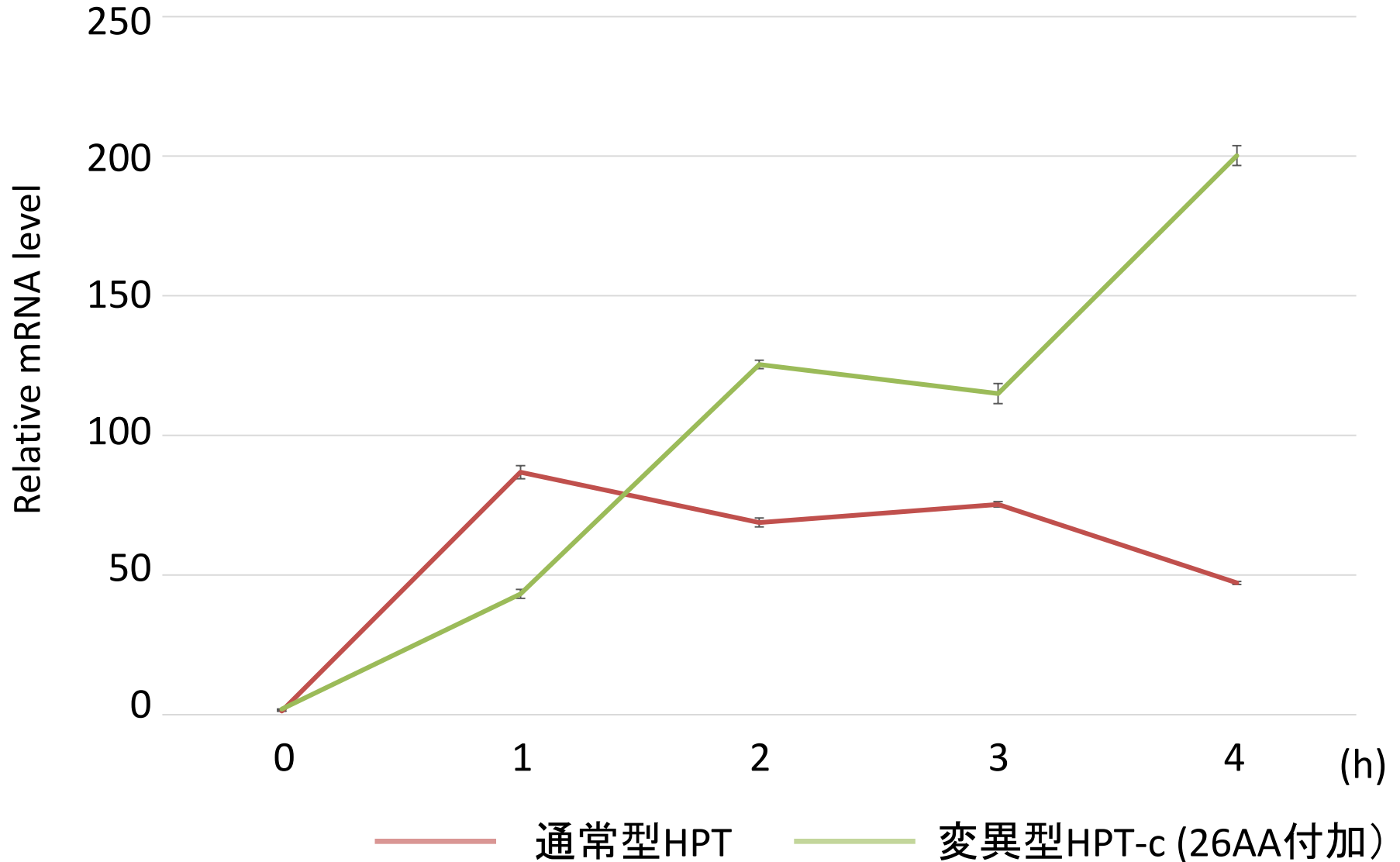
変異型HPTの発現量は約3倍に増加



変異型HPTではmRNAの発現量が向上



変異型HPTではmRNAの安定性が向上



まとめ

	HPT		His-tag
	285	315	341
HPT-His	DAAWAQGRCDAlVRSGAGTVGRTQIARRSA TRPRAKK	RDPNSSSVDKLAALAALEHHHHHH
通常型HPT	DAAWAQGRCDAlVRSGAGTVGRTQIARRSA TRPRAKK	
変異型HPT-a	DAAWAQGRCDAlVRSGAGTVGRTQIARRSA TRPRAKK	XXXXXXXXXXXX26アミノ酸付加XXX
変異型HPT-b	DVAWAQGRCDAlVRSGAGTVGRTQIARRSA TRPRAKK	XXXXXXXXXXXX26アミノ酸付加XXX
変異型HPT-c	DAAWAQGRCDAlVRSGAGTVGRTQIARCSA TRPRAKK	XXXXXXXXXXXX26アミノ酸付加XXX

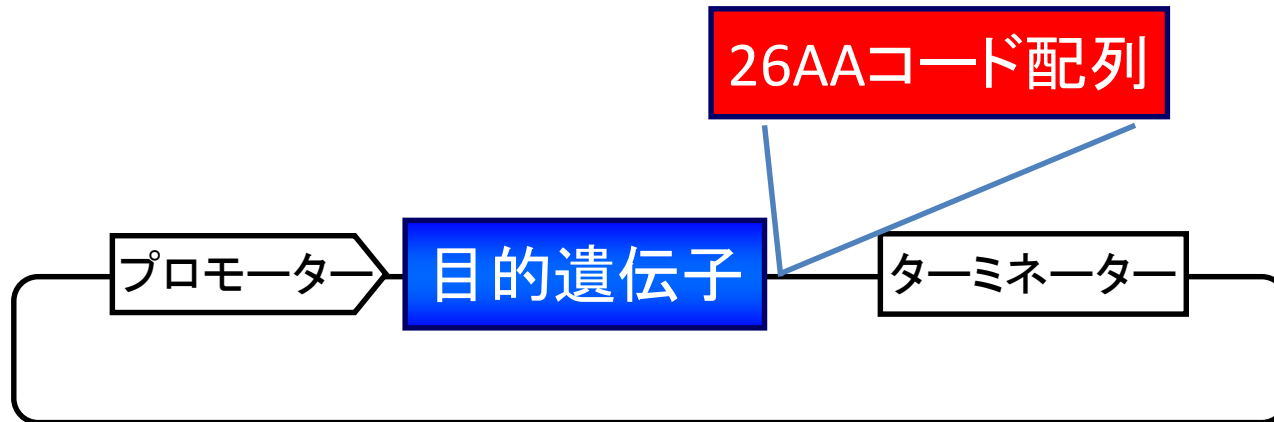
26アミノ酸配列をコードする核酸配列の付加によって
mRNAの安定性が向上



タンパク質の蓄積量が増加

本技術の活用例

	HPT		His-tag
	285	315	341
HPT-His	DAAWAQGRCDIVRSGAGTVGRTQIARRSA		TRPRAKKRDPNSSSVDKLAAALEHHHHHH
通常型HPT	DAAWAQGRCDIVRSGAGTVGRTQIARRSA		TRPRAKK
変異型HPT-a	DAAWAQGRCDIVRSGAGTVGRTQIARRSA		TRPRAKKXXXXXXXXXX26アミノ酸付加XXX
変異型HPT-b	DVAWAQGRCDIVRSGAGTVGRTQIARRSA		TRPRAKKXXXXXXXXXX26アミノ酸付加XXX
変異型HPT-c	DAAWAQGRCDIVRSGAGTVGRTQIACRSA		TRPRAKKXXXXXXXXXX26アミノ酸付加XXX



26アミノ酸をコードするDNA配列を
既存ベクターに付加することで
mRNAの安定性を向上させることが可能

従来技術との比較

【従来技術】

転写・翻訳を効率化することで

組換えタンパク質の細胞内蓄積量を増加させる。

【本技術】

組換えタンパク質をコードするmRNAの安定性を向上させることで、組換えタンパク質の細胞内蓄積量を増加させる。

👉 従来技術とはメカニズムが異なるため、併用が可能。

実用化に向けた課題

現在、HPTタンパク質の細胞内蓄積量の増加は確認できているが、他のタンパク質での効果は不明であるため、検証実験を計画中。また、大腸菌以外の宿主での有効性も不明。

企業への期待

他のタンパク質や、他の宿主での効果、大規模発現などの実証研究を一緒に行っていただける企業との共同研究およびライセンス契約を希望。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：タンパク質発現を増加させる
付加型アミノ酸配列の同定
- 出願番号 : 特願2016-052607
- 出願人 : 宇都宮大学
- 発明者 : 児玉豊、田中裕之

お問い合わせ先

宇都宮大学 地域共生研究開発センター
産学連携・知的財産部門 野本 義弘

T E L 028-689-6316

F A X 028-689-6320

e-mail chiiki@miya.jm.utsunomiya-u.ac.jp