

大腸菌のペリプラズム空間での マウス酸性哺乳類キチナーゼの発現

大川 一明 大学院化学応用学専攻 / 小山 文隆 工学部 応用化学科 教授

キーワード: キチン, 酸性哺乳類キチナーゼ, ペリプラズム空間, 酵素の大腸菌内分布

概要 酸性哺乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCCase) は、喘息マウスモデルで発現レベルが増加し、アレルギー炎症、食物消化などに密接に関わっていることが示されている。AMCCase を生化学的に研究するには精製酵素が必要である。現在、AMCCase は培養細胞や昆虫細胞で生産されている。我々は、マウス AMCCase を大腸菌で発現するため、その cDNA を大腸菌発現ベクター pEZZ18 に組み込み、細胞外で発現することを試みた。マウス AMCCase は、N 末に Protein A を、C 末に V5 epitope と His タグ を有する Protein A-AMCCase-V5-His として発現した(図1)。発現した融合タンパク質はペリプラズム画分に最も多く存在することが分かった(表1, 図2)。また、このペリプラズム画分に存在する融合タンパク質は IgG Sepharose, その後 Ni Sepharose を用いることで精製することができた(図2)。

Protein A-AMCCase-V5-His

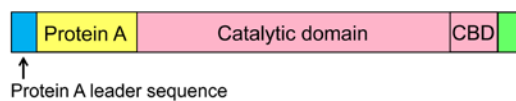


図1. 大腸菌で発現した融合タンパク質の模式図

表1. 大腸菌での目的タンパク質の分布

| Fraction | Total activity (U) | Distribution (%) | Total Protein (mg) | Specific activity (U/mg) |
|----------------------|--------------------|------------------|--------------------|--------------------------|
| Medium | 0.021 ± 0.005 | 4 ± 1.0 | 0.208 ± 0.07 | 0.107 ± 0.038 |
| Periplasm 1 (Peri 1) | 0.201 ± 0.063 | 33 ± 6.8 | 0.497 ± 0.09 | 0.410 ± 0.131 |
| Periplasm 2 (Peri 2) | 0.343 ± 0.149 | 54 ± 8.5 | 1.03 ± 0.11 | 0.349 ± 0.164 |
| Cytoplasm | 0.044 ± 0.009 | 7 ± 1.8 | 0.311 ± 0.10 | 0.151 ± 0.050 |
| Insoluble | 0.014 ± 0.009 | 2 ± 1.1 | 0.436 ± 0.11 | 0.030 ± 0.016 |

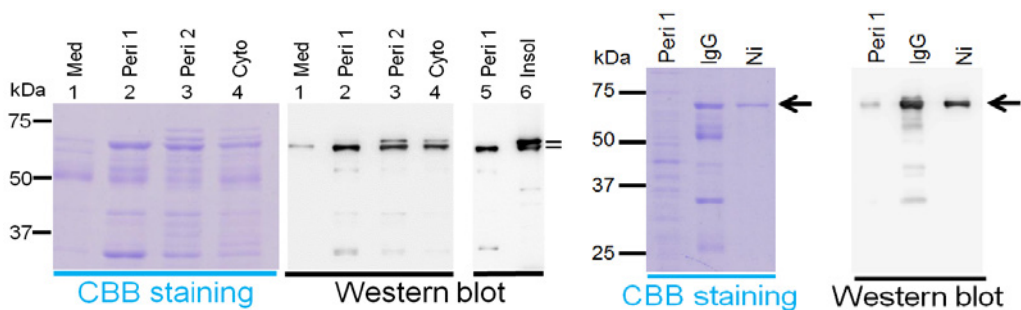


図2. 大腸菌で発現、精製した融合タンパク質の分析

アピールポイント

我々は、大腸菌のペリプラズム空間に、活性のあるマウス AMCCase を発現する系を確立した。

利用・用途 応用分野

この融合タンパク質は生物・医学的機能の詳細な解明に役立つ。

関連情報

- 関連論文: Kashimura, A., Okawa K., Ishikawa, K., Kida, Y., Iwabuchi, K., Matsushima, Y., Sakaguchi, M., Sugahara Y. and Oyama F. (2013) Protein A-mouse acidic mammalian chitinase-V5-His expressed in periplasmic space of *Escherichia coli* possesses chitinase functions comparable to CHO-expressed protein. *PLoS ONE* 8: e78669
- 関連URL: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0078669>