

**Confidential**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Date | 2022/09/22 | Description | 新規作成 | | | | | | |
| Issue | 横河電機 MKHQ INVC | | | Author |  | Check |  | Approval |  |
|  |  | | |  |  |  |  |  |  |
|  |  | | |  |  |  |  |  |  |

Form Y-E31-2　Size A4

**３．２　要素技術の現状**

**３．２．１　目的タンパク質の発現系構築**

* 目的タンパク質

設計・改変したセルロース結合性タンパク質（CBD）のセルロース結合能を評価するために設計CBD配列・Linker配列・蛍光タンパク質であるEGFP配列からなる融合タンパク質を合成した（図1. CBD-Linker-EGFP配列）。

* ユニバーサルカセット設計

融合タンパク質用のタンパク質発現系として、コムギ胚芽無細胞合成系とメタノール資化酵母発現系の両方を選択できるように、目的遺伝子配列の組み換えを双方向に簡便に行うことが可能なユニバーサルカセットを設計した。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成用の発現ベクターであるpEU-E01-MCSとピキア酵母用の発現ベクターであるpPICZαAのMCS（マルチクローニングサイト）上にある制限酵素認識部位を比較し、CBD配列・Linker配列・EGFP遺伝子配列を別々に制限酵素処理して組み替えられるようにpPICZαAを改変した（図2）。pPICZαAのMCS上のPmlI認識配列をEcoRV認識配列に変更し、NotⅠ認識配列以降からc-myctタグ配列、6xHisタグ配列を削除し、SmaI認識配列のみに変更した。MCS外にEcoRV認識配列、SmaI認識配列が各々の1箇所存在するため、一塩基置換を行った。改変のための人工遺伝子合成・組み換えはジェンスクリプトジャパンに委託した。

* 発現ベクター構築（コムギ胚芽無細胞タンパク質合成用）

設計CBD配列・Linker配列・EGFP配列（C末端にTEVプロテアーゼ認識配列＋6xHISタグ付加、以下EGFP-TEV-HIS配列）をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成に至適化されたpEUベクターに組み換えた。MCS内の5’側からEcoRV認識配列とKpnI認識配列の間にCBD配列を、KpnI認識配列とNotⅠ認識配列の間にLinker配列を、NotⅠ認識配列とSmaI認識配列の間にEGFP-TEV-HIS配列を組み換えた。ただし、NotⅠは8塩基認識のため、フレームがずれないようにNotⅠ認識配列の前に1塩基挿入した。CBD配列・Linker配列・EGFP配列についてはピキア酵母発現系に用いることを想定し、コドン最適化を行った。人工遺伝子合成・組み換えは日本ジーンウィズ株式会社に委託した。

* コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系での合成・タンパク質精製

構築したコムギ胚芽無細胞タンパク質合成用の発現ベクターをテンプレートとしてタンパク質合成を行った。合成（1.2mL）には株式会社セルフリーサイエンスの合成キット(WEPRO7240H Core Kit)を用いた。まず mRNA 転写反応(37℃、6 時間)を行った。mRNA 転写物は 0.5 μL 分をアガロース電気泳動(1%)にて確認した(図)。その後、96 ウェルプレート(227 μL合成)ないし 24 ウェルプレート(1.2 mL 合成)中で重層法による翻訳反応(15℃、20 時間)を行った。重層法による翻訳反応はプレート中に翻訳バッファー(上層)をまず入れておき、翻訳反応液(下層)をその下に入れて重層を形成させて行った。それぞれの反応組成は下記の通りである（表）本合成の可溶性画分より His タグを利用したアフィニティー精製を行った。得られた精製タンパク質は Nanodrop による濃度測定および SDS-PAGE により確認した。

* 大腸菌発現系での合成

大腸菌発現系により安定同位体標識した CBD ペプチドを調製するための検討試験を実施した。2 種類の GST タグ融合 CBD 発現ベクターを構築し、大腸菌 BL21(DE3) 株に形質転換した。培養温度と IPTG 誘導濃度を振ることで安定同位体非含有 M9 最小培地における発現条件検討試験を行い、GST-CBD タンパク質の最適条件 (37℃、3 時間、0.1 mM IPTG 濃度) を決定した。100 mL スケール培養で発現誘導を行い、大腸菌を破砕した後 Glutathione Sepharose 4B によるアフィニティー精製を行った。精製タンパク質は Factor Xa によるタグ切断を行った後、Benzamidine Sepharose FF 処理による Factor Xa 除去と、Glutathione Sepharose 4B 処理によるGST タグおよび GST タグ未切断の目的タンパク質除去を行い、CBD ペプチドのみを得た。本試験は、株式会社テクノプロに委託して実施した。

* メタノール資化酵母発現系での合成

Pichia 酵母発現系により安定同位体標識した CBD ペプチドを調製するための条件検討試験を実施した。2 種類の GST タグ融合 CBD 発現ベクターを構築し、Pichia 酵母 X-33 株に形質転換した。それぞれ 5 クローンを選択して BMMY 培地で培養後、メタノールによる発現誘導を行うことで最も発現量の高いクローンをそれぞれ 1 つ単離した。この結果をもとに酵母発現用最小培地であるFM22 培地を用いたスケールアップ発現誘導を行ったが、目的タンパク質の発現誘導は確認できなかった。比較対照である BMMY 培地を用いた発現精製では、微量の目的タンパク質が確認できた。本試験は、株式会社テクノプロに委託して実施した。