

学 位 論 文 の 内 容 の 要 約

氏 名	菅又 泰博
学位の種類	博士（生命科学）
学府又は研究科・専攻	大学院工学府 先進健康科学専攻
指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	磁性細菌粒子上への難発現タンパク質の効率的発現技術の開発

【論文の内容の要約】

現在、診断薬分野における自動化免疫測定や細胞分離、免疫沈降などのタンパク質固定化担体としてナノサイズの人工磁性粒子が広く利用されている。人工磁性粒子上にタンパク質を固定化するためには、目的タンパク質の大量生産、精製および化学修飾といった複数のステップが必要となる。一方、本研究の対象である磁性細菌粒子を用いることで、タンパク質の発現、精製および磁性粒子の調製を 1 ステップで行うことが可能となる。当研究室ではこれまで、磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 が生合成する磁性細菌粒子上に特異的に存在するタンパク質をアンカー分子とし、様々な外来タンパク質を融合タンパク質として発現させてきた。しかしながら、S-S 結合を必要としない細胞内分子や水溶性分子は比較的容易に磁性細菌粒子上に発現できるものの、S-S 結合を有する高等動物由来の細胞外タンパク質や複数回膜貫通タンパク質を十分なレベルで機能発現させることは極めて困難であった。そこで本研究では、このような「難発現タンパク質」を磁性細菌粒子上へ効率的に発現させる技術を開発することを目的とし、複数回膜貫通タンパク質、S-S 結合を有するタンパク質それぞれについて異なる手法を用いた発現検討を行った。

第一の方法として、GPCR の一つであるヒト甲状腺刺激ホルモン受容体 (hTSHR) をメインターゲットとし、発現誘導システムを用いて磁性細菌粒子上への発現を試みた。テトラサイクリン発現誘導システムにより従来の恒常的発現系では認められなかった hTSHR および、ケモカイン受容体である CXCR4 と CCR5 の発現に成功した。hTSHR の一部は磁性細菌粒子を覆う脂質二重膜に挿入されていることが示唆され、また、リガンドと自己抗体の両方に対する結合能が認められた。このことから、TSHR のみならず他の GPCR を始めとした膜タンパク質の発現に発現誘導システムが有用であることが示された。

第二の方法として、S-S 結合タンパク質をペリプラズムに発現させると同時に、細胞質内の磁性細菌粒子上にこれと結合するタンパク質を発現させ、これらを磁性細菌粒子の抽出過程で結合

させる *in vitro* docking 法の開発を行った。モデルタンパク質である抗 β -Galactosidase 単鎖抗体-IgG Fc 融合タンパク質 (scFv-Fc) は、磁性細菌粒子上のアンカータンパク質 Mms13 と Fc 結合タンパク質 (ZZ) の融合タンパク質 (Mms13-ZZ) と磁性細菌粒子抽出過程で結合 (*in vitro* docking) したことが確認された。結合量は細胞破碎後 10 分で最大となり、また、磁性細菌粒子上に捕捉された scFv-Fc はペリプラズムで S-S 結合を形成し正しく折り畳まれたと考えられた。さらに、従来型の直接発現法では抗原結合活性が認められなかったのに対し、本手法による scFv-Fc は β -Galactosidase 結合活性を示したことから、*in vitro* docking 法は S-S 結合タンパク質の新規磁性細菌粒子発現法として有用であることが示唆された。

本研究では創薬ターゲットとして極めて重要な GPCR および免疫測定法を利用した体外診断薬への利用が期待される抗体分子に着目して、2 種類の異なる方法で磁性細菌粒子上での機能発現を試みた。特に、ペリプラズム発現系と磁性細菌粒子 (細胞質) 発現系を同時に行い、*in vitro* でドッキングさせる手法は本研究が初めての試みである。本研究は複数回膜貫通タンパク質や S-S 結合を有する外来タンパク質を表面に有する磁性細菌粒子の新規作製技術を提供するものであり、表面抗原を利用した細胞分離やリガンド受容体、細胞内蛋白質間の相互作用の解析等、基礎研究における利用のみならず、創薬探索におけるアゴニスト/アンタゴニスト同定や体外診断薬用の担体としての有用性が期待できる。