

第6回(平成26年度第3回)CRCフォーラム(平成26年12月15日(月)開催)
「TDUで展開する先端微生物研究」

天然高分子化学エンジニアリング

夏目 亮 准教授
工学部環境化学科

TDU
東京電機大学

第6回 CRCフォーラム
「TDUで展開する先端微生物研究」

生体高分子化学エンジニアリング

東京電機大学 工学部環境化学科
応用微生物研究室 夏目 亮

構成

自己紹介

生体高分子のエンジニアリング

研究紹介

転写因子の構造機能相関解析

酵素の構造機能相関解析

複合糖質合成酵素に関する研究

自己紹介

細胞レベル；微生物の代謝を利用した物質生産 = 醗酵

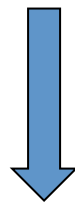
分子レベル；転写制御 → 酵素反応 → 物質

蛋白質分子

蛋白質工学

結晶構造解析

蛋白質分子の構造機能相関解析



微生物の転写因子、酵素
真核生物の転写関連因子

転写制御機構、代謝制御機構を理解したい

自己紹介

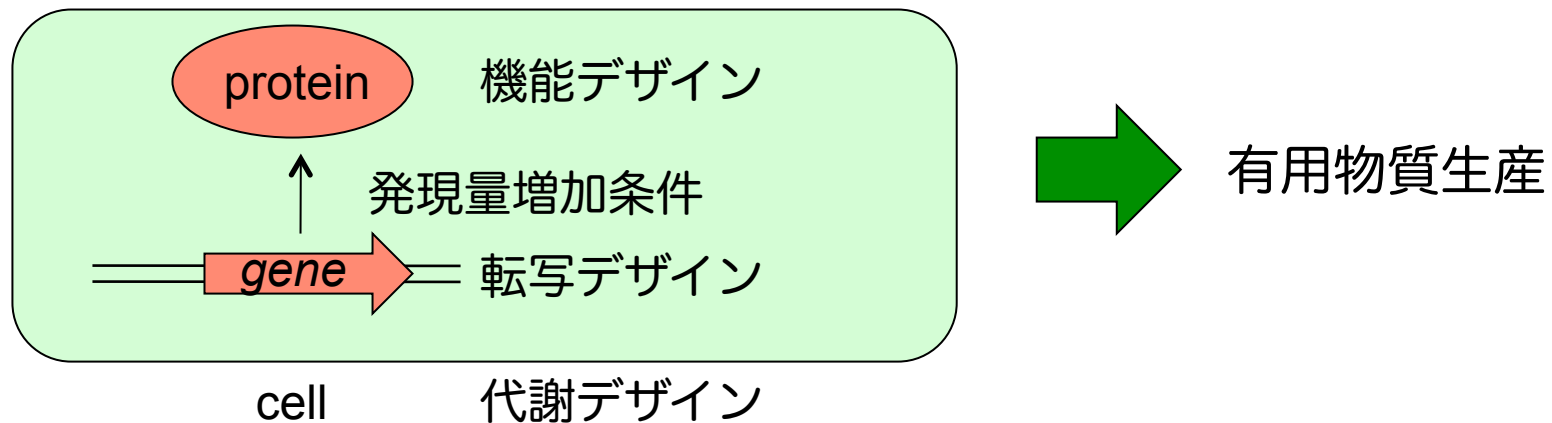
これまでに関わってきた研究など

- (1) 有用酵素の蛋白質工学的研究
- (2) 微生物の代謝を制御する転写因子の構造機能相関解析
- (3) 真核生物の転写制御因子の構造機能相関解析
- (4) 微生物の代謝工学研究

(1) 有用酵素の蛋白質工学的研究

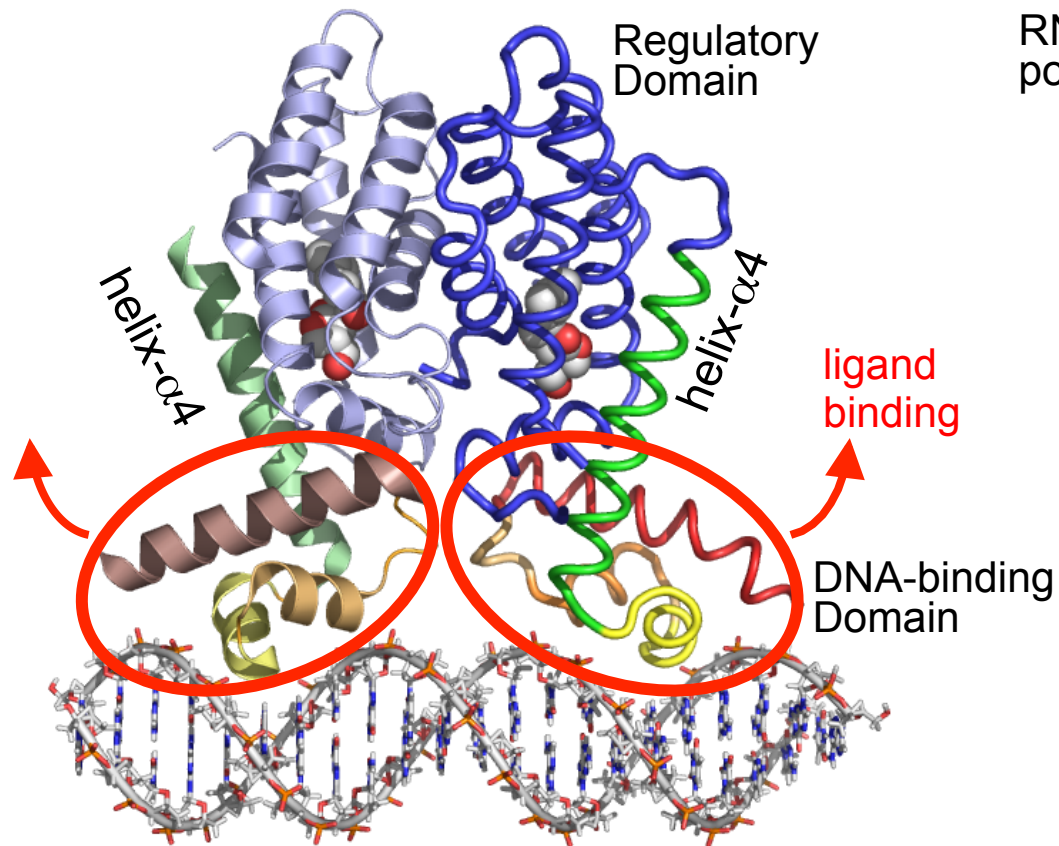
得られた教訓

- 蛋白質分子の機能解析／機能改変は、立体構造情報をもとに行なうべきである。
- 有用物質の工業生産は、精製した組換え酵素を用いた方法で行なうよりも、微生物の代謝を利用した醗酵法で行なった方が有利である。

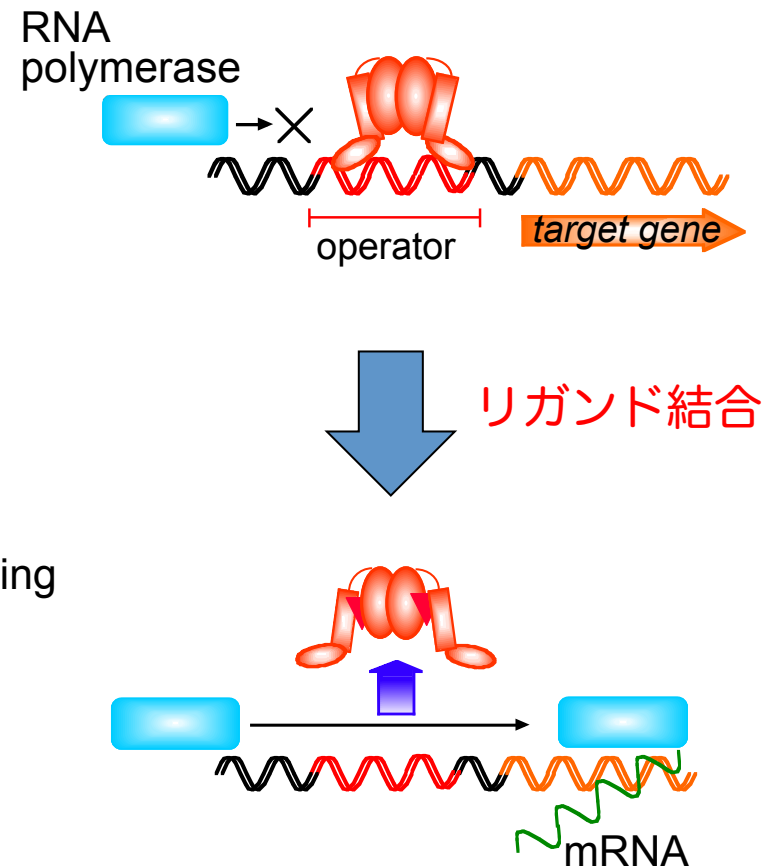


(2) 微生物の代謝を制御する転写因子の構造機能相関解析

自己調節因子受容体相同蛋白質CprBの結晶構造解析



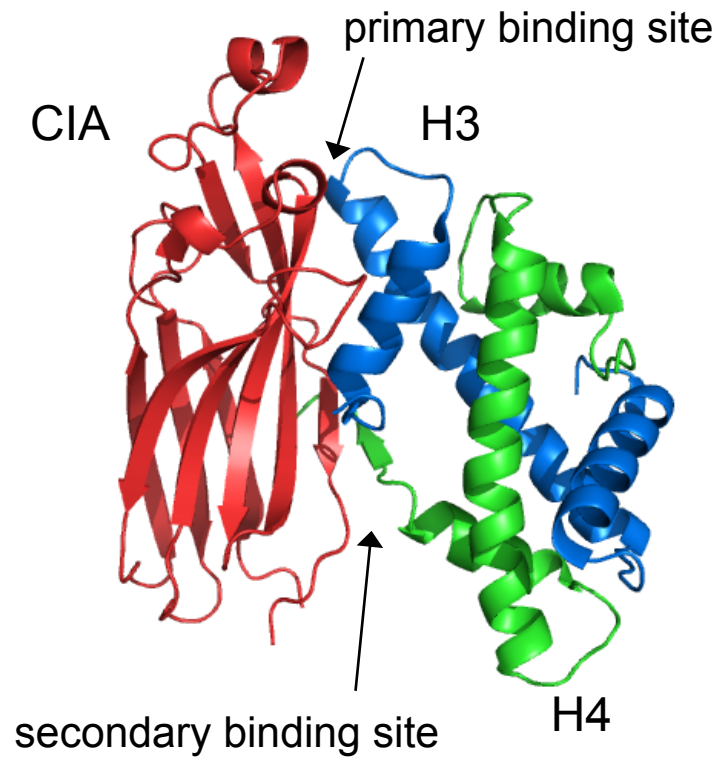
Natsume. et al., *J. Mol. Biol.* (2004)



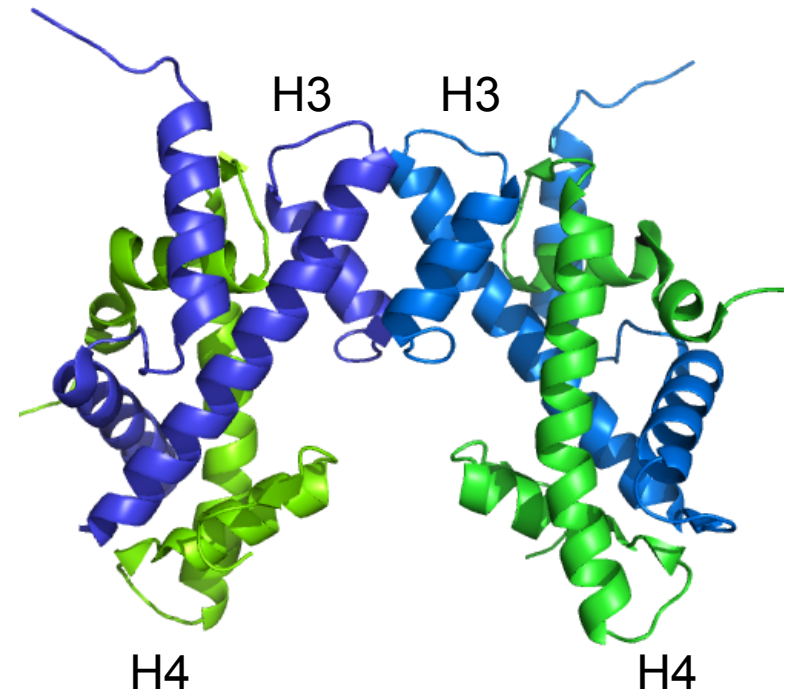
自己調節因子を介した
転写調節の分子機構モデル

(3) 真核生物の転写制御因子の構造機能相関解析

ヒストンシャペロンCIA-ヒストンH3/H4複合体の結晶構造

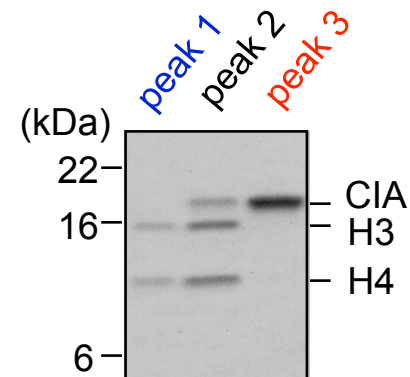
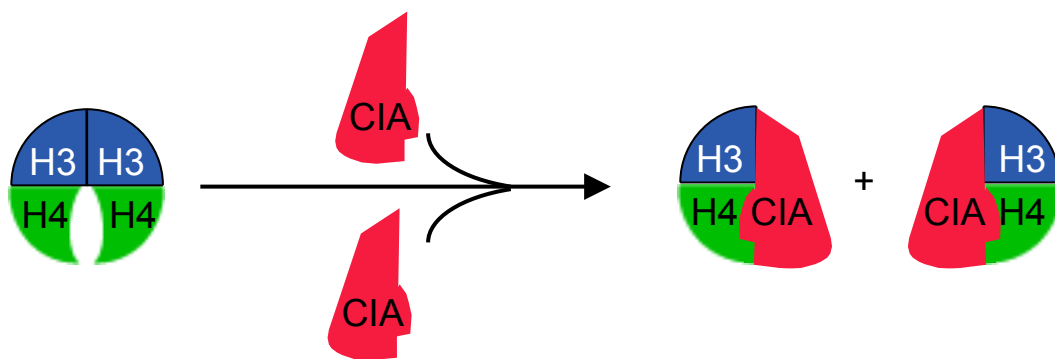
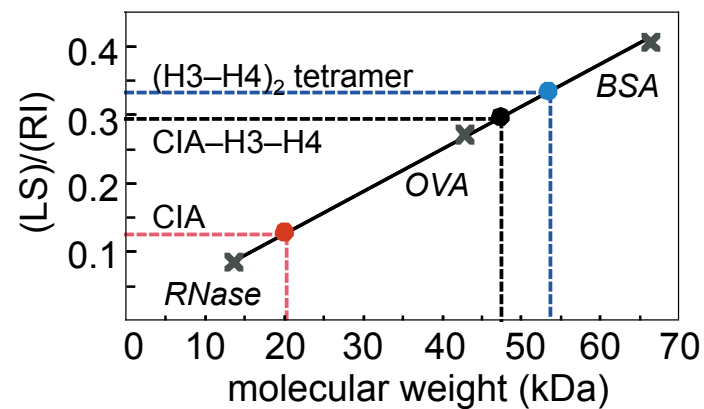
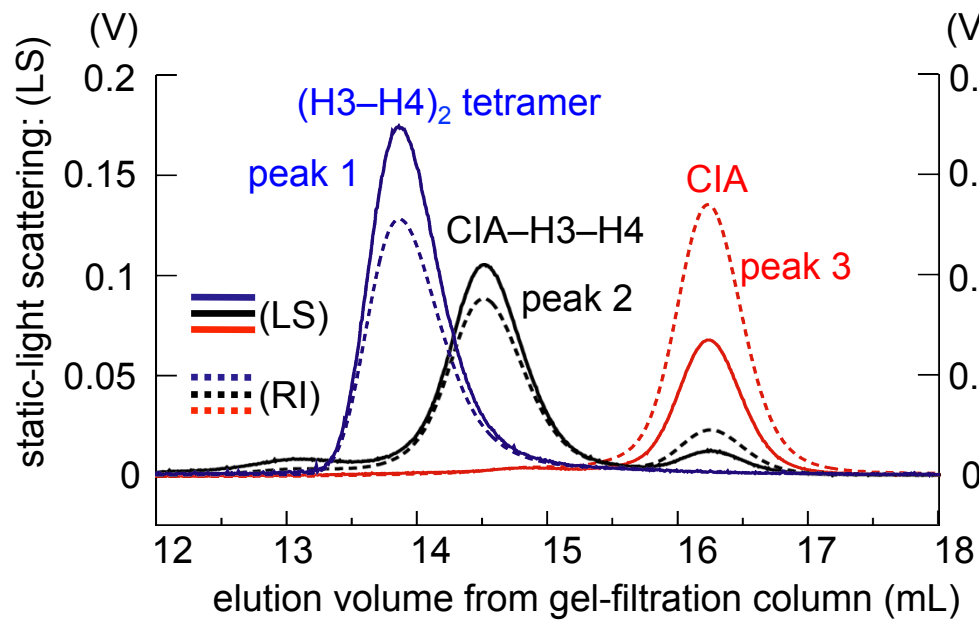


CIA-histone-H3-H4 complex



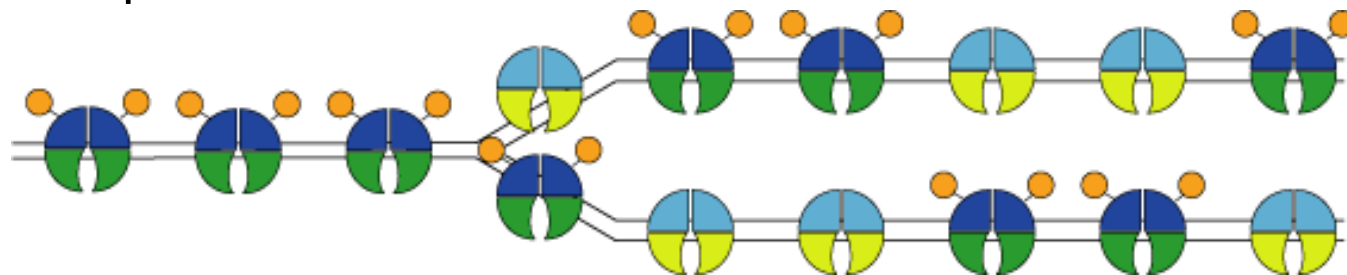
histone (H3-H4)₂ tetramer

CIAはヒストン(H3-H4)₂ 四量体を2つに分割する

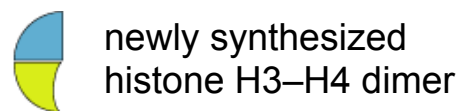
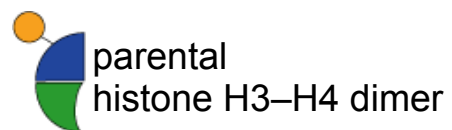
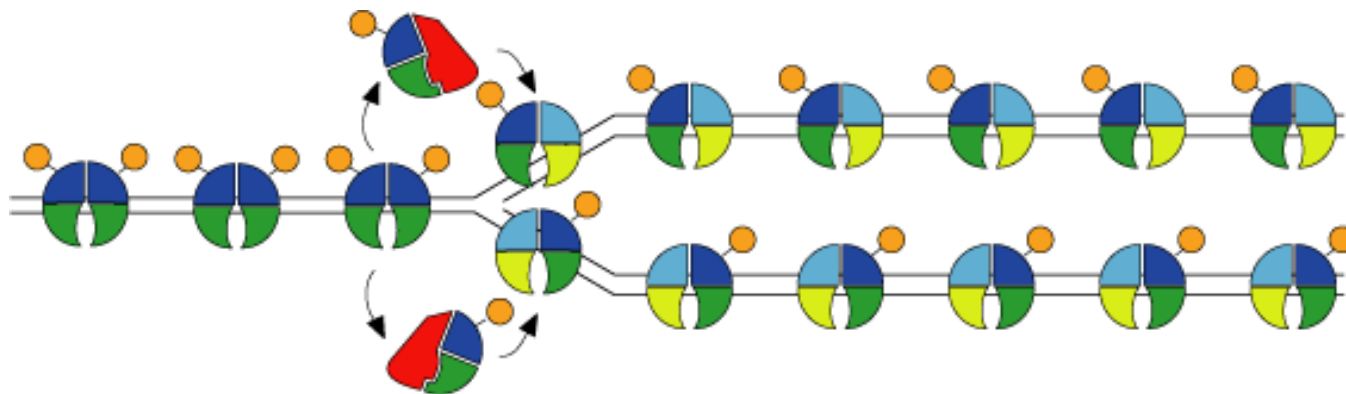


ヌクレオソームの半保存的複製は起きる？

a) random/dispersive



b) semi-conservative



生体高分子化学

こうぶんし【高分子】

多数個の原子が共有結合により次々に結合してできた分子量の大きい分子からなる化合物。普通、分子量が一万以上のものをさす。天然物として天然ゴム・デンプン・タンパク質、人工製品として合成ゴム・合成樹脂・合成繊維などがある。巨大分子。

こうぶんしかがく【高分子化学】

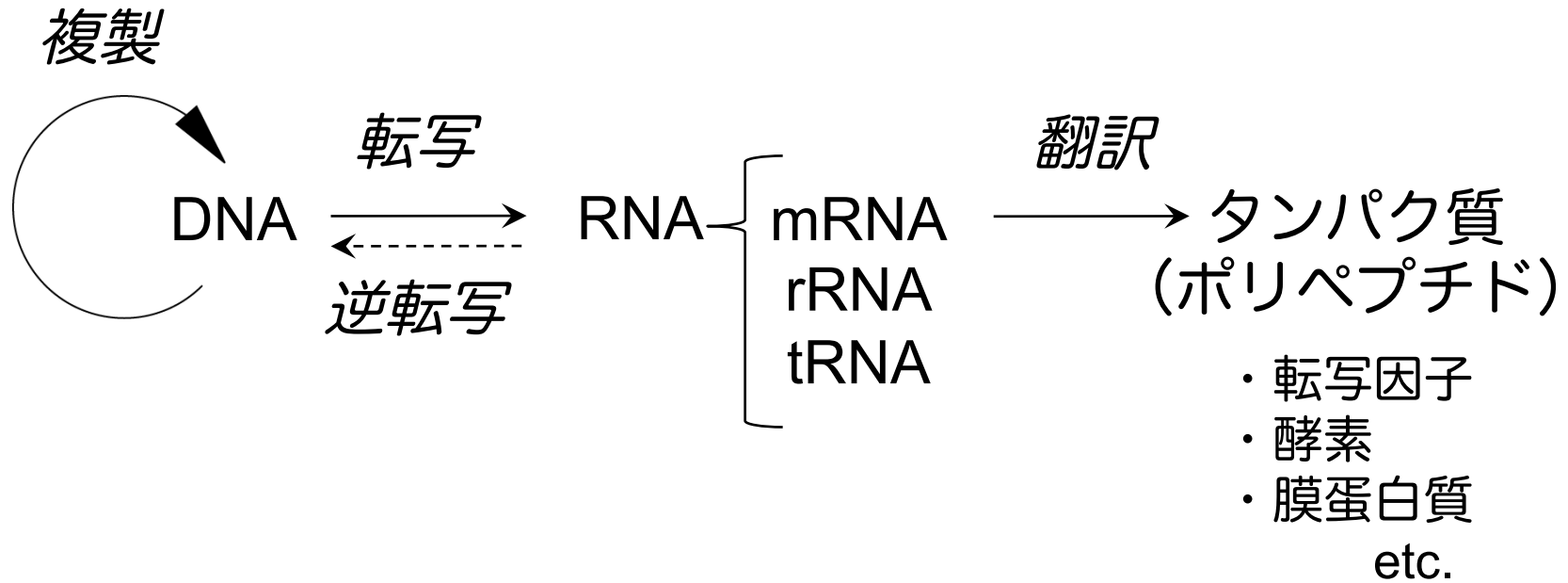
高分子化合物の物性および化学的性質や合成法を研究する化学の一分野。

せいたいこうぶんし【生体高分子】

生体を構成しているタンパク質・核酸・多糖類などの高分子化合物。化学合成されたプラスチックなどの高分子化合物と比べてその結合の様子が複雑で、立体構造の違いにより様々な生理機能を持つものが多い。

「スーパー大辞林」より

生体高分子の合成



設計図

コピー

機能するモノ

酵素反応

酵素反応

【利点】

- ・ 温和な条件下での反応

常温
常圧
中性

- ・ 反応の特異性

立体選択性
位置特異性
官能基特異性

- ・ 低環境負荷

【欠点】

- ・ 酵素活性の不安定性
- ・ 基質特異性
- ・ コスト
- ・ 反応時間

エンジニアリング

生体高分子化学エンジニアリング

核酸

遺伝子工学

タンパク質

タンパク質工学

多糖類

糖鎖工学

転写反応、酵素反応の仕組みを理解する



作りかえて応用する **工学的アプローチ**

応用微生物研究として

細胞レベル；微生物の代謝を利用した物質生産プロセス = 醗酵

↳ 分子レベル；転写制御 → 酵素反応 → 物質
タンパク質分子

タンパク質工学

結晶構造解析

タンパク質分子の構造機能相関解析



微生物の転写因子、酵素

転写制御機構、代謝制御機構を理解して応用する

研究紹介

核酸

1) 転写因子の構造機能相関解析

タンパク質

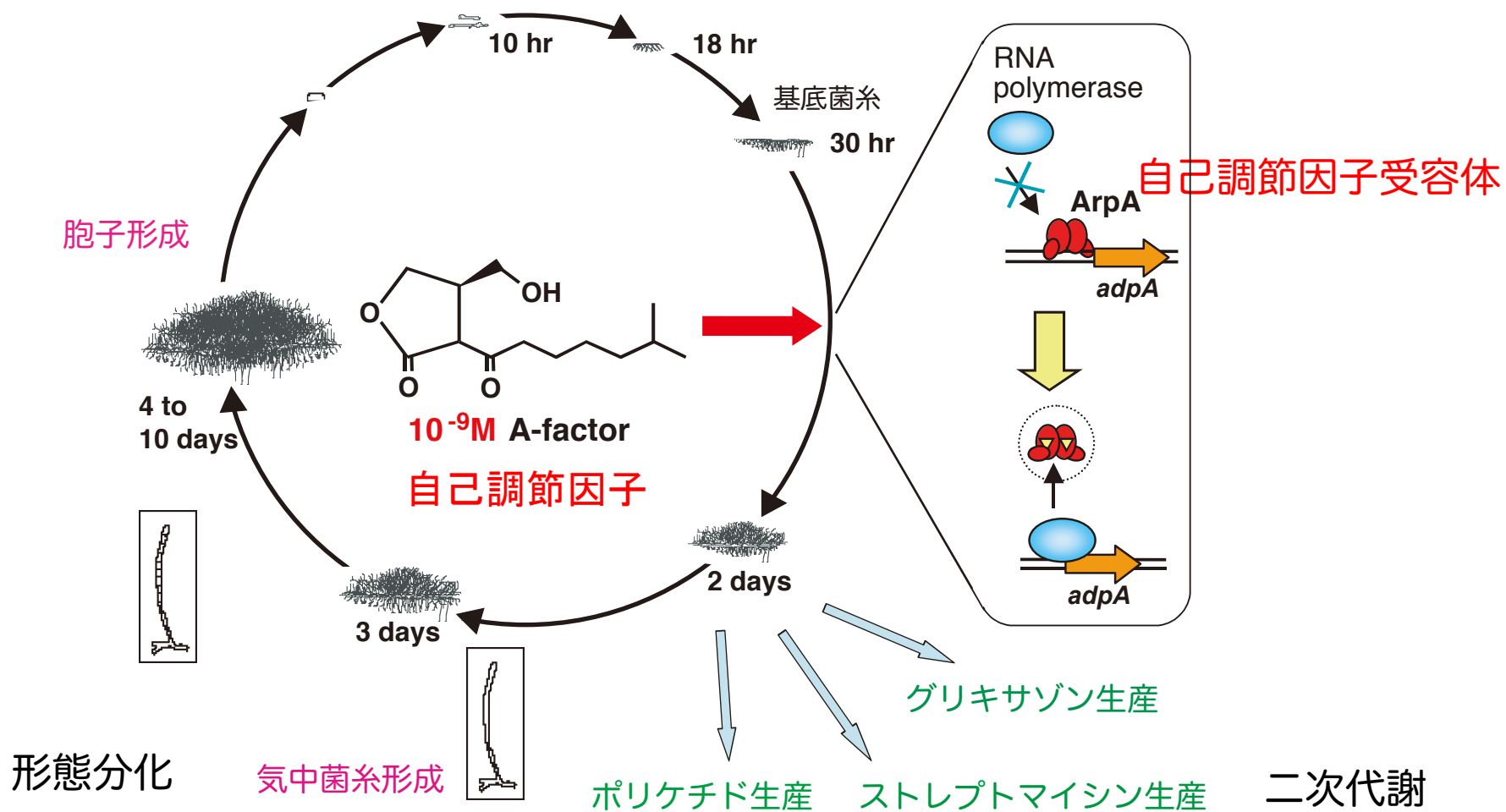
2) 有用酵素の構造機能相関解析

多糖類

3) 複合糖質合成酵素に関する研究

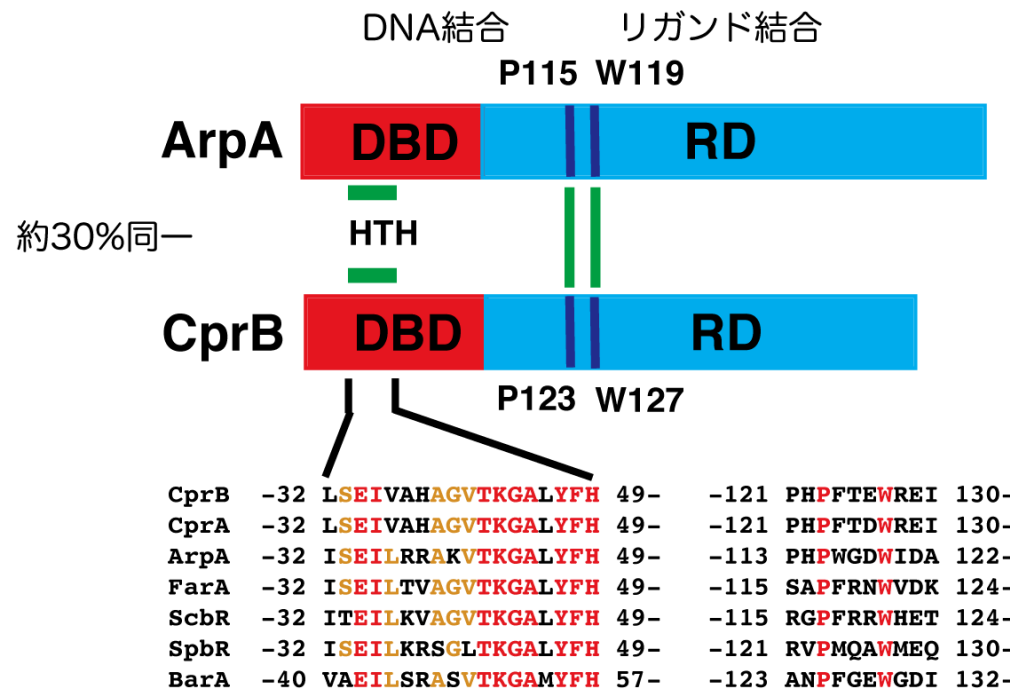
1) 転写因子の構造機能相関解析

放線菌の形態分化・二次代謝を調節する自己調節因子-受容体システム



自己調節因子受容体ArpAの構造機能相関解析

- ArpA-A-factor複合体, ArpA-DNA複合体の結晶構造解析



発現方法を根本から変更・改良



400 mL培養菌体から3段階のカラムクロマトグラフィー精製



mg オーダーの組換えArpAの精製が可能に！



結晶化にトライ



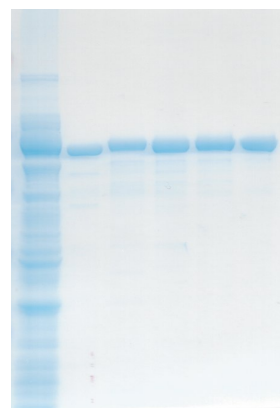
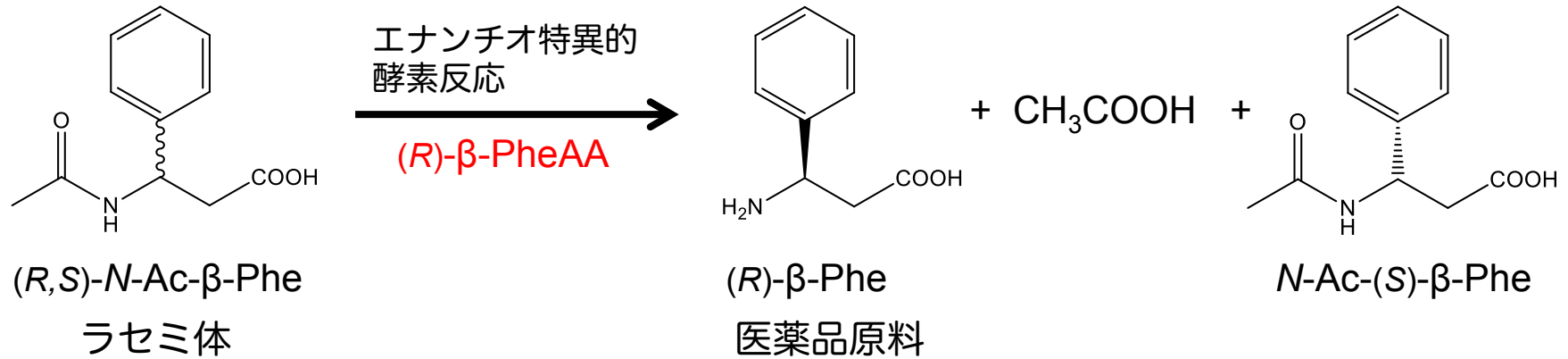
← ArpA
(His-tagged)

2) 酵素の構造機能相関解析

医薬品原料生成に有用な酵素:

Kawasaki. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2006)

・ 組換え酵素の生産／精製系の確立 \longrightarrow 生化学的解析、結晶化



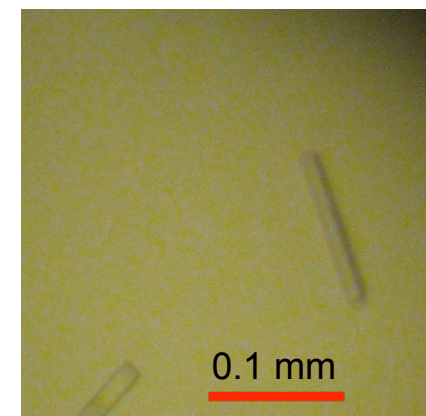
(R)- β -PheAA
(wild type)

Anion exc.
Hydrophobic
Anion exc.
Gel filtration
Hydrophobic
Crude ext.



(R)- β -PheAA
(His-tagged)

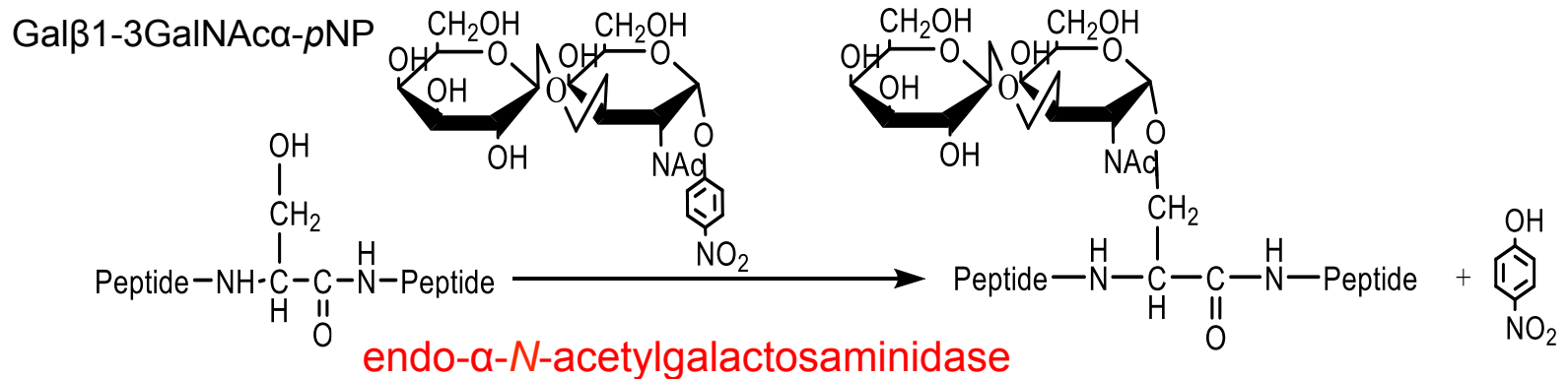
Gel filtration
Anion exc.
Ni-affinity
Crude ext.



Crystal of (R)- β -PheAA

3) 複合糖質合成酵素に関する研究

O型糖ペプチドの一段階合成法の開発→糖鎖工学研究/医薬研究への応用



酵素生産菌のスクリーニングと単離/分類



酵素の高生産条件の確立



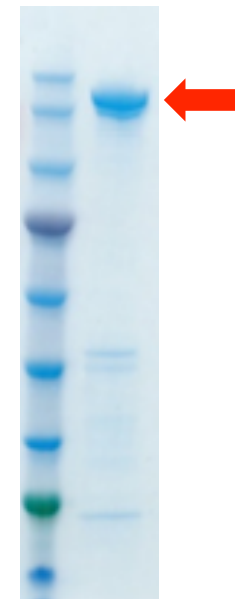
酵素の単離精製 → アミノ酸配列解析



生化学的解析



遺伝子のクローニングへ



今後の展望

有用物質生産、バイオエネルギー生産、有害物質分解

細胞レベル；有用酵素生産微生物の単離

分子レベル；酵素遺伝子のクローニングと組換え酵素生産

育種

遺伝子工学

タンパク質工学

結晶構造解析

酵素分子の構造機能相関解析、機能改変

転写および代謝のデザイン

プロセス全体のデザインを見据えた要素技術の開発研究