琉球大学学術リポジトリ

蛋白質脱リン酸化酵素(PP2A)の遺伝子工学による生産と利用

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 新城, 富貴子, 池原, 強, 池原, さつき, 今村, 志穂子, 徳田, 五月, 安元, 健 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016731

蛋白質脱リン酸化酵素（ＰＰ２Ａ）の遺伝子工学による生産と利用

沖縄県地域結集型共同研究事業　コア研究室
新城 富喜子、池原 強、池原 さつき、今村 志穂子、徳田 五月、安元 健

１．はじめに

蛋白質脱リン酸化酵素２Ａ（ＰＰ２Ａ）は、蛋白質のセリン/スレオニン残基の脱リン酸化を触媒する酵素で真核細胞に普遍的に存在し、蛋白質リン酸化酵素と共に生体反応調節機構の一つとして代謝調節、シグナル伝達、ＤＮＡの複製、転写、細胞増殖など広い細胞機能に関与している。生体内では、触媒サブユニット（Ｃ－サブユニット）と調節サブユニット（Ａ－サブユニット）が結合して２量体を形成して存在し、この基本複合体に第三のサブユニットで多様性に富んだＢ－サブユニットが結合し３量体を形成する。調節サブユニットはＰＰ２Ａの細胞局在や活性制御、基質特異性などに関与していると考えられている。

近年、ＰＰ２Ａの活性を特異的に阻害する天然毒が次々と発見され、ヒトや家畜の中毒の原因となっている。代表的な毒素にはオカダ酸とミクロシスチンがあり、オカダ酸は渦鞭毛藻により産生され、それを捕食する海綿や貝類に蓄積濃縮され下痢性貝中毒を引き起こす。また、腫瘍化促進作用を持つことも知られている。ミクロシスチンは淡水中でしばしば大量発生するらん藻類により産生され、強い肝臓毒性を有している。ＰＰ２Ａはこれらの天然毒に高い親和性を持ち微量で活性が阻害されることから、これら毒素の検出に、また生物学的な研究試薬として有用であると考えられる。しかし、現在市販されているＰＰ２Ａはヒト赤血球より精製されたもので、純度が低く不安定でかつ高価なことから、実験試薬として使うには限度があった。

今回、私たちはすでに明らかとなっているＰＰ２Ａサブユニットの１次構造から遺伝子工学的手法を用いＰＰ２Ａの生産を試みた。バキュロウイルス－昆虫培養細胞発現系を利用することにより酵素活性を有するリコンビナントＰＰ２Ａの発現を可能とし、大量精製されたＰＰ２Ａの特性とその利用開発を検討した。

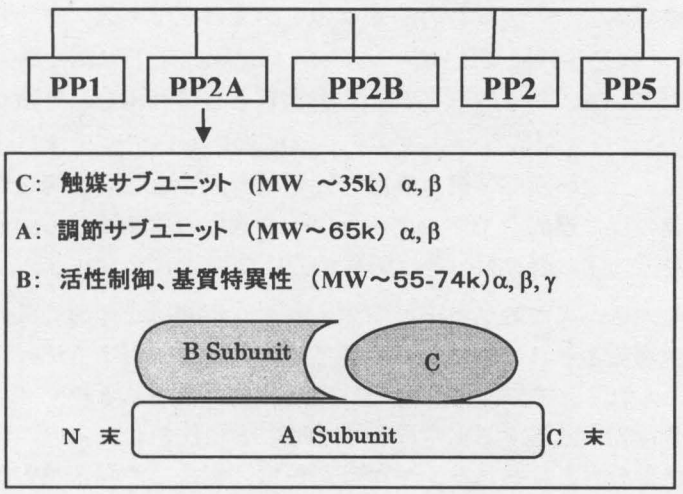
２．実験方法

昆虫細胞である High Five Cell をスピナーフラスコで浮遊培養し、ヒト型リコンビナントＰＰ２ＡのＣ－サブユニットあるいはＡサブユニットをコードするバキュロウイルスを感染させＣ－サブユニットあるいはＡ／Ｃダイマーを発現させた。発現された各サブユニットは、アフィニティー法を用いて精製し、各サブユニットの発現あるいは複合体の形成はウエスタンブロットにより確認した。Ｃ－サブユニットの脱リン酸化活性あるいは天然毒(オカダ酸、ミクロシスチン)による活性阻害は、ｐＮＰＰを基質とし発色法により測定した。

３．結果と考察

バキュロウイルス－昆虫培養細胞発現系により発現されたＰＰ２ＡのＣ－サブユニットあるいはＡ／Ｃダイマーは、アフィニティー法により高純度に精製された。精製されたＣ－サブユニットは高い脱リン酸化活性をもち、低濃度の天然毒により活性が阻害された。また、精製されたＡ／Ｃダイマーを、HeLa 細胞の可溶性画分と混合すると、可溶性画分中に存在するネイティブなＢ－サブユニットと結合し三量体を形成した。このように、遺伝子工学的な技法で生成されたＰＰ２Ａが天然に存在するＰＰ２Ａの特性を保持しており、生化学的研究試薬として使用可能である。現在、天然毒素簡易検出キットを作製しており、さらに利用用途を開発する予定である。

図１．セリン／スレオニン脱リン酸化酵素の分類



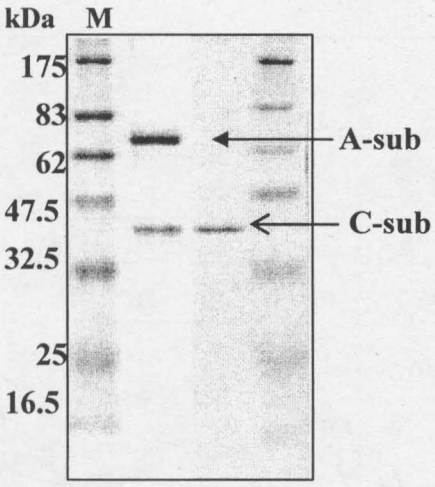


図２．精製されたＡ／Ｃダイマーと
Ｃ－サブユニット

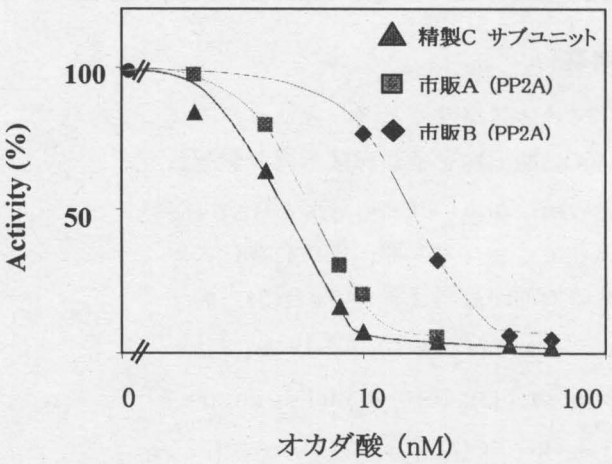


図３．オカダ酸による脱リン酸化活性阻害