

# 志田 敏夫

## 目的別テーマ：天然繊維の高機能化と応用

### 15年度研究テーマ

15-2-9 : 微生物酵素のよって合成される繊維状高分子に関する研究

### ABSTRACT

*DNA fragment (tgl gene) for construction of Tgl (transglutaminase) expression plasmid was amplified by PCR (polymerase chain reaction) method using B. subtilis 168 chromosomal DNA as a template. To obtain the His-tagged transglutaminase of B. subtilis, the fragment was cloned into the expression plasmid pQE30. Competent E. coli KP3998 was transformed with the resulting plasmid pQE-Tgl. The His-tagged Tgl protein was purified with HisTrap column.*

### 研究目的

酵素分子同志や酵素分子と異種機能を有する分子を組み合わせ「酵素ハイブリッド」を作成することもより優れた酵素やバイオ素材を創出するためには有力な手法の一つである。化学結合によりクロスリンクを形成させる方法は主に有機化学反応試薬を用いるものが主流であるが、反応のコントロールが難しく酵素の失活や不均一な複合体が形成されるなどの危惧が少なからずある。クロスリンク形成に酵素（特にトランスグルタミナーゼ）を用いることにより、マイルドな条件で特異な部位間での複合体形成を目指す。トランスグルタミナーゼはタンパク質のグルタミン残基側鎖のカルボキシアミノ基とアミノ基を持つ化合物のクロスリンクを触媒する。

すでにトランスグルタミナーゼがかまぼこの凝固剤として用いられている例があるが、タンパク質（酵素）の高機能化など生化学的視点からの応用や、医薬品への応用はみられない。マイルドな条件下で部位特異的なクロスリンクが形成される酵素反応を基軸とした酵素ハイブリッドの作出法およびその利用法が開発されることが期待される。

### 一年間の研究内容と成果

枯草菌の標準的な野生株としてゲノム解析が終了している枯草菌 168 の染色体 DNA を鋳型に用いてトランスグルタミナーゼ遺伝子 (*Tgl*) を PCR 法で増幅して、発現用プラスミッド pQE30 にクロニングした。このようにして作ったプラスミッド pQE-Tgl はヒスタグが融合されたトランスグルタミナーゼを発現するように設計した。大腸菌 KP3998 を用いて目的のタンパク質を発現させた。封入体を形成しやすいことが分かったので分子シャペロンを用いて可溶化することを試みた。分子シャペロンプラスミッド pG-KJE8 を共存させる発現系でのタンパク質調製を試みた。発現したタンパク質を大腸菌破碎後の上清からヒスタグとの親和性を利用して精製する HisTrap カラムを利用して精製した。現在、発現量を上げて酵素反応の諸実験に供することができるよう発現系の再構築を行っている。

### 展望

枯草菌は古くよりアミラーゼなどの酵素製剤の製造に使われてきた。また、類縁菌である納豆菌は食品である納豆の製造に使われてきたグラム陽性の微生物である。安全な微生物の酵素を使うことはその応用に関して特にヒトに対する毒性を危惧する必要性が本来低い。今後大量発現系を確立して、種々の酵素ハイブリッドの作成を試みていく。