

大腸菌を宿主としたブロックコポリマーの大量発現系の構築

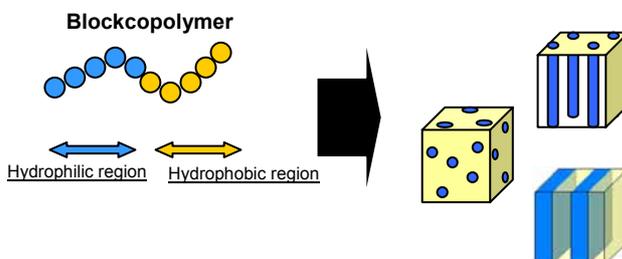
黒田研究室

学籍番号：06251508

古勢 美緒

〔背景・目的〕

ブロックコポリマーとは、親水性・疎水性の高分子ブロックが途中で枝分かれすることなく共有結合で直線的に結合した高分子化合物である。ブロックコポリマーは、構成する各ブロックの量比に応じて球、シリンダー、ラメラなどの特徴的なマイクロドメイン構造を形成するマイクロ相分離をおこすことが知られており、このブロックコポリマーを用いたフィルム



は各種機械部品、電子・光学材料、光ディスクなど精密情報機器材料、生体適合性材料など様々な分野への応用が期待されるため研究が活発化している。ブロックコポリマーには一般的に合成高分子系ブロックコポリマーが用いられるが、応用としてペプチド系ブロックコポリマーを利用することにより、フィルムの性質を決定するブロックの量比をアミノ酸残基の個数を変えることで正確かつ容易に制御でき、またブロックコポリマーの生産に有機溶媒を使用しないため環境にやさしいフィルムの開発が期待される。そこで、本研究ではこのフィルムの開発の重要な初段階として、大腸菌を宿主としたブロックコポリマーの最適な発現条件を検討した。

〔方法〕

既存のプラスミド(pMMHa blockcopolymer) の他に、既に大量発現することがわかっている pAEDCAD 配列の後ろにブロックコポリマー配列を挿入した pAED CAD blockcopolymer およびそこから CAD 配列を除いた pAED blockcopolymer を作製した。これらのプラスミド、6種類の培地、および4種類の宿主大腸菌を用いてタンパク質発現量の比較を SDS-PAGE ゲルを用いて行った。得られた最適条件において2Lスケールで大量培養しブロックコポリマーの収量を測定した。

| プラスミド | 宿主大腸菌 | 培地 |
|-------------------------|-------------------|----------------|
| pMMHa blockcopolymer | JM109 (DE3) PLysS | LB |
| pAED CAD blockcopolymer | JM109 (DE3) | 2×YT |
| pAED blockcopolymer | BL21 (DE3) PLysS | Superbroth |
| | | NZYM |
| | BL21 (DE3) | SOB |
| | | Auto Induction |

〔結果・考察〕

BL21 (DE3) PLysS、pMMHa blockcopolymer を用いた Auto Induction 法での培養が最も発現量が多いことがわかった。その他の組み合わせではほとんど発現はみられなかった。この最適条件で 2L 培養・精製を行い、フィルムを試作できる量のペプチド 0.462mg / 2L を得ることができた。(必要最低量は 20-50 μ l (10mg/ml))

今後、発現系の条件や方法をさらに改良し、フィルムマイクロ相分離条件 (たんぱく質濃度、温度、pHなど) の検討や、有機溶媒存在下での規則的なシリンダー構造を形成する際に妨げになる2次構造の形成の有無の確認、ブロックの組成や量比と形成する構造の検討を行うためにより多くのペプチドを得られるよう研究を進めていく必要がある。

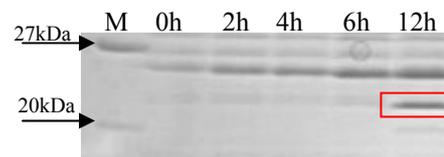


Figure1. Auto Induction 法において pMMHa blockcopolymer で BL21 (DE3) PLysS を形質転換した際の発現結果 (Mw=21852)

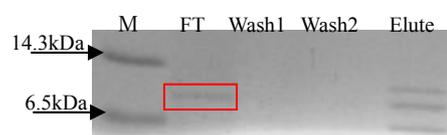


Figure2. CNBr 処理後 His アフィニティー吸着後透過 (Mw=8289)