

プロジェクト名	プロテインホスファターゼの生産と利用開発
研究背景 研究目的 及び目標	<p>プロテインセリンスレオニンホスファターゼ（PP）は、大きくPP1・PP2A・PP2B・PP2Cの4種類に分類され、生体内のタンパク質脱リン酸化により、多くの生体反応の制御機構として重要な役割を果たしている。そのため、様々な分野の研究で生化学試薬としての供給が求められているが、多くのPP分子種が存在するのに対して、市販されているPPは種類が少なく非常に高価であり、また酵素純度やホスファターゼ活性等、試薬としての品質に問題があり、研究者が利用しにくい状況にある。この問題解決法として、遺伝子工学的手法による酵素の生産が有効であるが、PPの発現量と活性の厳しい制御により細胞内で十分な酵素活性を保持したPPを過剰に発現させることが難しく、生産方法を確立させる為にはクリアしなければならない技術的な問題点も多い。そこで、本研究開発では、PP2Aの大量生産に成功し生化学試薬として製品化した実績をもとに、生化学試薬として高品質なPP1・PP2B・PP2C生産方法を確立する。</p> <p>また、ホスファターゼ活性阻害作用を持つ物質を含有する生物資源を探索することにより、沖縄が有する生物資源の機能性と利用開発の可能性を拓げる。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) プロテインホスファターゼの生産方法の確立 遺伝子工学的手法によりPPを生産し、さらに培養や精製条件の検討を行い、生化学試薬として活性および純度の高い良質なPPを生産する。 2) 生化学試薬としての酵素の評価 生産酵素は、その利用目的から生化学試薬としてのホスファターゼ活性及び純度の評価が重要である。その為、測定条件を決定して精製したPPの活性と純度を測定し、市販酵素を比較対照として品質を評価する。 3) プロテインホスファターゼの活性阻害物質を含有する生物資源の探索 PP活性阻害試験に必要な条件検討を行い、生物資源のスクリーニング方法を確立する。そして、沖縄県が有する多様な生物資源の中からPP活性阻害物質を含有する資源をスクリーニングし、有用物質の利用開発に繋げる。
成果概要	<p>本研究事業では、遺伝子工学的手法によりプロテインセリンスレオニンホスファターゼ（PP）の生産を行い、PPの利用開発として、PP活性阻害物質を含有する生物資源のスクリーニングによる有用生物資源の探索を行った。それにより、次の研究成果を得た。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) プロテインホスファターゼの生産方法の確立 PP1触媒サブユニット（3種）、PP2B触媒サブユニット

	<p>トA（2種）及び調節サブユニットB（2種）、PP2C（1種）のサブクローニングに成功し、PP2B二量体とPP2Cの精製に至った。そして、酵素の発現条件と最適培養条件の検討により生産方法を確立した。</p> <p>2) 生化学試薬としての酵素の評価</p> <p>PP1・PP2B・PP2Cの簡易活性測定方法として、pNPPを基質とした測定方法を決定した。また、精製したPP2BおよびPP2Cについてリン酸化ペプチドを用いた活性測定を実施し、酵素活性を評価した。酵素純度についても、電気泳動画像解析により数値化し評価した。さらに、精製酵素と市販されている酵素の活性評価を行い、生化学試薬としての品質を評価した。評価の結果、精製PP2B・PP2C共に、生化学試薬として使用可能な品質であることが認められた。</p> <p>3) プロテインホスファターゼの活性阻害物質を含有する生物資源の探索</p> <p>沖縄産植物24種類を収集し、3種類の溶媒を用いて抽出物を得た。抽出物に多く含まれるリン酸がホスファターゼ活性測定に影響を与えるため、抽出物からリン酸を除去して測定試料とし、(株)トロピカルテクノセンターで製造したPP2Bを用いた生物資源のスクリーニング方法を確立した。陽性対照は免疫抑制剤を用い、PP2B活性阻害試験によってIC₅₀値を算出した。沖縄産植物24種類の抽出物を測定した結果、4種類の植物にPP2B活性阻害作用が認められた。その内の1種類については、特に強いPP2B活性阻害作用が認められた。</p> <p>本研究成果により安価で高品質なPPの生産方法が確立され、研究及び利用開発のツールとしてPPの供給が可能となった。今後、生化学試薬として製品化することにより、PPに関連した様々な研究や利用開発に大変有益だと思われる。</p> <p>また、PP2B阻害物質は免疫抑制剤として使用され、PPの活性阻害物質が機能性物質として有用であることは既に証明されている。その為、PP2B活性阻害試験による生物資源のスクリーニング方法を確立し、収集した沖縄産植物の中から阻害物質を含有する植物を選定できたことは、今後の利用開発へ繋がることを示している。ホスファターゼ活性測定キットや有用資源のスクリーニングキット等の開発、PP活性阻害物質の機能性評価や製品開発など、新たな利用開発への展開が期待される。</p>
連絡窓口	<p>(株)トロピカルテクノセンター（担当：中村、安慶名）</p> <p>連絡先 tel 098-982-1100（代）</p> <p>fax 098-982-1101</p>