

## 29AB-am007

コンドロイチン硫酸に特異的な加水分解酵素である HYAL4 の酵母 (*Pichia pastoris*) での発現および精製

○柴本 秀太<sup>1</sup>, 杉田 真千子<sup>1</sup>, 水本 秀二<sup>1</sup>, 菅原 一幸<sup>1,2</sup>, 山田 修平<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>名城大薬, <sup>2</sup>北大院生命)

脊髄が損傷するとコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CS-PG) が過剰生成され、神経の軸索再生が阻害される。脊髄損傷モデルマウスにコンドロイチナーゼ ABC を投与し CS を分解すると神経は再生し歩行可能となる (Bradbury *et al.* Nature, 416, 2002)。しかし、細菌由来のコンドロイチナーゼ ABC およびその分解産物には免疫原性があるため、臨床応用には課題がある。我々はヒアルロニダーゼ 4 (HYAL4) がヒアルロン酸ではなく、CS を特異的に加水分解する酵素であることを見出し (Kaneiwa *et al.* Glycobiology, 20, 2010)、HYAL4 が脊髄損傷の治療に有効であると考えた。そこで今回は、活性のある HYAL4 の大量精製を目的とした。HYAL4 は Asn368 の N 型糖鎖が失われると酵素活性が失われることから (Kaneiwa *et al.* J. Biol. Chem, 287, 2012)、大腸菌ではなく真核生物の酵母を用いて酵素の産生を行った。

マウス HYAL4 を含む酵母用の発現ベクターを作製し、酵母 (*Pichia pastoris*) に組み込み、HYAL4 を安定発現するクローンを樹立した。次に HYAL4 を発現する酵母を培養し、そのコンディションドメディウムを回収した。陽イオン交換 SP Sepharose カラムとアフィニティカラム His trap を用いて発現タンパク質を精製した。得られた HYAL4 について、タンパク質定量、SDS-PAGE、CS を基質とした酵素活性の測定を行った。

2 ステップの精製で、HYAL4 をほぼ均一に得ることができた。この酵素は、CS に対して特異的な分解活性を有していた。今後は精製した HYAL4 の熱安定性を測定し、脊髄損傷における軸索再生阻害に関する動物モデル実験に適用する予定である。