

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14392

研究課題名（和文）難発現タンパク質の生産可能化技術構築

研究課題名（英文）Development of technologies enabling production of difficult-to-express proteins

研究代表者

加藤 晃代（KATO, Teruyo）

名古屋大学・生命農学研究科・招へい教員

研究者番号：40727640

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまでの申請者らの研究により、大腸菌や酵母などで生産性の低いタンパク質をコードする遺伝子の開始コドン直後にSer-Lys-Ile-Lys(SKIK)をコードするDNAを挿入することで、その生産性が向上することを明らかとしてきた。本研究においては、SKIKコードコドンの挿入により、転写ではなく翻訳工程が効率化していることを明らかとした。また、コドンの影響は認められず、SKIK以外の配列においてもタンパク質生産向上効果が認められた。このことから、翻訳で生じる新生鎖がタンパク質自身の生産性に影響する可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ある特定の機能を有するタンパク質（機能的タンパク質）を、組換え発現系を用いて安価・簡単・大量に生産する技術は、ライフサイエンス研究および産業を支える柱の一つであり、その重要性はますます高まっている。しかし、タンパク質の種類によっては、微生物等で簡単に生産されないものも存在し、それがなぜなのかははっきりわかっていない。

本研究で得られた成果は、これまで生産の難しかったタンパク質を、簡単に大量に作ることを可能とするための基盤技術開発のひとつであり、将来的に、医薬品や化成品、食品等の産業における様々な製品の製造プロセスを効率化できたり、低コスト化できたりする可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Insertion of a DNA encoding Ser-Lys-Ile-Lys (SKIK) immediately after the start codon of a gene encoding a difficult-to-express protein greatly improves its productivity in *Escherichia coli* or yeast. In this study, it was clarified that the insertion of the SKIK coding codon makes the translation process efficient, not the transcription process. In addition, the effect of codon usage was not observed, and the protein production improving effect was also observed in sequences other than SKIK. From these results, it was thought that the nascent chain generated by translation may affect the productivity of the protein itself.

研究分野：応用微生物学

キーワード：N末端 ペプチドタグ 大腸菌 翻訳

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ある特定の機能を有するタンパク質(機能性タンパク質)を、組換え発現系を用いて安価・簡単・大量に生産する技術は、ライフサイエンス研究および産業を支える柱の一つであり、その重要性はますます高まっている。これまでに、申請者は、大腸菌や酵母などで難発現なタンパク質遺伝子の開始コドン直後に、Ser-Lys-Ile-Lys をコードする DNA 配列(N末端 SKIK ペプチドタグ)を挿入することで、その発現量を増大可能であることを見出してきた。一方で、これまでに大腸菌および酵母発現系において SKIK ペプチドタグによるタンパク質発現量増大効果を明らかとしたが、その一般性や、メカニズムが不明である。難発現タンパク質の生産性を簡単に増大させることができる本技術を産業応用し、将来的にタンパク質を自由自在に高発現できる技術を開発するためには、タグの汎用性やそのメカニズムを解明することが必要である。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究においては、SKIK ペプチドタグの汎用性やそれによるタンパク質生産性向上のメカニズムを明らかとすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

大腸菌系による SKIK ペプチドタグの適用性解明

タグをコードするコドンを変更した複数の変異体や、その他数アミノ酸からなるペプチドタグを作製し、コドンの影響、アミノ酸の影響を検討する。これにより、コドンまたは翻訳で生じる数アミノ酸の新生鎖のどちらが重要かを推定することができる。

発現系の検討

大腸菌の IPTG 誘導のみならず、オートインダクションおよび無細胞タンパク質合成系への適用を検討する。

### 4. 研究成果

まず、SKIK をコードするコドンの影響を調べるために、36 種類の変異体を作製した。大腸菌で難発現であったウサギ由来の scFv 抗体遺伝子を用い、それらの開始コドン直後に SKIK がコードされる DNA を挿入し、大腸菌の IPTG 誘導発現系でコドン影響を解析した。大腸菌の菌体あたりの目的タンパク質量を Dot blot 法により解析し、定量したところ、コドンによる大きな影響がないことがわかった(図1)。

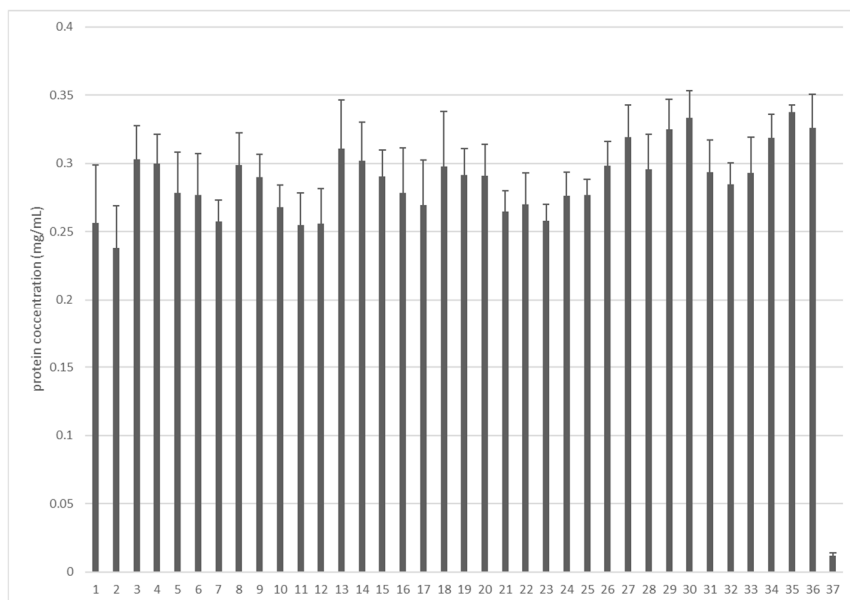


図1. 36 パターンの SKIK コードコドンにおけるタンパク質生産量  
1 から 36 : SKIK タグ付きの各変異体。37 : タグなし

また、菌体の生育に合わせて IPTG を添加しなければならない誘導方法、培地成分により発現誘導のかかるオートインダクション法、菌体を使用しない無細胞タンパク質合成系を検討したところ、いずれにおいてもタグの効果が認められ、特に産業的にも重要なオートインダクション法においてもタグの効果が認められることがわかった(図2)。

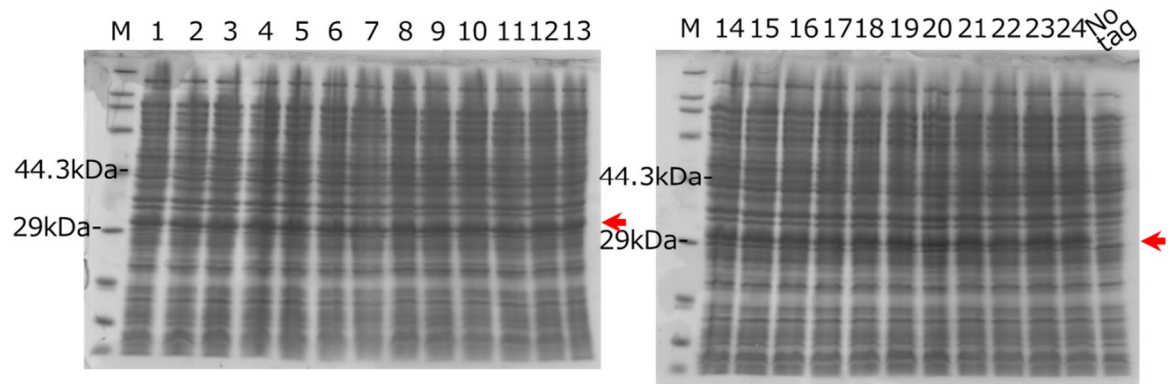


図2. オートインダクション法におけるタグの効果  
SDS-PAGE の CBB 染色結果を示す。矢印が目的タンパク質バンド。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤 晃代、田村 廣人、中野 秀雄
2. 発表標題 N末端SKIKペプチドによるモノクローナル抗体生産量増大と機構解明
3. 学会等名 第70回日本生物工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古川 裕貴, 加藤 晃代, 中野 秀雄
2. 発表標題 タンパク質生産量を増大させるN末端SKIKペプチドタグ配列に関する研究
3. 学会等名 第71回日本生物工学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考