

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23760747

研究課題名(和文) カイコを用いたヒト由来タンパク質のハイスループットな発現・精製システムの開発

研究課題名(英文) Development of high-throughput human protein expression and purification system in silkworms

研究代表者

加藤 竜也(Tatsuya, Kato)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00397366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：カイコさなぎを用いて多種類の組換えタンパク質を一度に発現・精製できるシステムの構築を行った。組換えBmNPV DNAを大腸菌から96ウェルプレートを用いて抽出し、カイコさなぎにDNAを注射して組換えタンパク質を発現させる系を構築できた。またカイコさなぎから96ウェルプレートと精製用のレジンをを用いて、組換えタンパク質を精製する系も構築できた。今後は精製や抽出ステップの改良を行うことで、より実用的な発現・精製システムの構築を目指す。

研究成果の概要(英文)：Multi-expression and purification of recombinant proteins in BmNPV bacmid-silkworm expression system were constructed. Many kinds of recombinant BmNPV bacmid DNA were prepared in a 96 well plate and recombinant proteins were also purified in a 96 well plate packing a purification gel. The further improvement of protein extraction and purification step leads to the establishment of a more practical silkworm system.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

科研費の分科・細目：バイオ生産プロセス

キーワード：カイコ ハイスループット タンパク質発現

## 1. 研究開始当初の背景

生物の生理機能を担う中心は100,000種以上のタンパク質であり、それらタンパク質の構造・機能を解明することは、生命現象を理解する上で不可欠であり、ヒトの疾病の原因の究明および創薬のターゲットの探索につながる。日本ではタンパク 3000 プロジェクトなどにより 4000 以上のタンパク質の基本構造を明らかにしており、アメリカ NIH でもタンパク質の構造を網羅的に解析しようとする Protein Structure Initiative (PSI-1, -2) 研究が進められている。

微生物由来のタンパク質は大腸菌や酵母を用いてある程度構造解析が進んでいる。しかし、ヒト由来タンパク質は、翻訳後修飾など複雑な構造を有し、糖鎖付加経路を持たない大腸菌では不溶性状態になりやすいため、構造解析があまり進んでいない。そこで、活性型で多くの検体(タンパク質)を一気に処理できるハイスループット発現・精製系の構築が望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、カイコで迅速に組換えタンパク質生産が可能なカイコ-*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (カイコ核多核体病ウイルス、BmNPV)バクミド発現系を用いた、ヒト由来タンパク質のハイスループット発現・精製系の開発を目指すことを目的としている。具体的には(1)簡便な遺伝子クローニング法の確立、(2)ハイスループット組換えバクミド構築、(3)カイコさなぎを用いたハイスループット遺伝子発現・精製法の構築を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 簡便な遺伝子クローニング法の確立

ハイスループット遺伝子クローニングを実現するベクターの構築を行った。この場合に、通常のリガーゼ反応によらないT4DNAポリメラーゼを利用した Ligation-Independent Cloning (LIC)法を用いた、遺伝子クローニングが可能であるベクターを構築した。

(2) ハイスループット組換えバクミド構築  
96 ディープウェルプレートを用いて組換え

BmNPV バクミドを有する大腸菌を培養し、各種 96 ウェルプレートを用いて、大腸菌から組換え BmNPV の抽出を行った。

(3) カイコさなぎを用いたハイスループット遺伝子発現・精製法の構築

(2) で抽出した組換え BmNPV バクミドを使用し、カイコさなぎで組換えタンパク質の発現を行った。またさなぎから 96 ウェルプレートとヒスチジンタグおよび FLAG タグ用精製レジンを利用して、組換えタンパク質の精製を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 簡便な遺伝子クローニング法の確立

LIC 法に適したベクターの構築を行った。発現させるタンパク質の C 末端側に Strep-Tag II またはヒスチジンタグを付加させることができるベクターを構築し、ヒト由来 microsomal triglyceride transfer protein (hMTP) 遺伝子とヒト由来 protein disulfide isomerase (hPDI) 遺伝子をそれぞれ LIC 法で、それぞれの構築した LIC ベクターに構築した。構築したベクターを用いて組換え BmNPV バクミドを構築した。構築した組換え BmNPV バクミドをカイコ幼虫に注射することで、hMTP-hPDI 複合体の発現を行った。カイコ幼虫脂肪体をバッファーで懸濁し超音波破碎により、カイコ脂肪体破碎液を得た。その破碎液から、TALON アフィニティクロマトグラフィーおよび StrepTactin アガロースゲルクロマトグラフィーにより、hMTP-hPDI 複合体を精製した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製タンパク質を検出したところ、予想される約 120kDa と約 60kDa の分子量のタンパク質バンドが確認された(図1)。このことから hMTP-hPDI 複合体はカイコ幼虫で発現・精製できたこと、および構築した LIC 用ベクターが予想通りにカイコを用いたタンパク質発現に利用できることが確認できた。

またさらに発現させるタンパク質の N 末端側に Strep-Tag II、ヒスチジンタグ、FLAG タグをそれぞれ付加させることができるベクターを構築し、その構築したベクターを用い

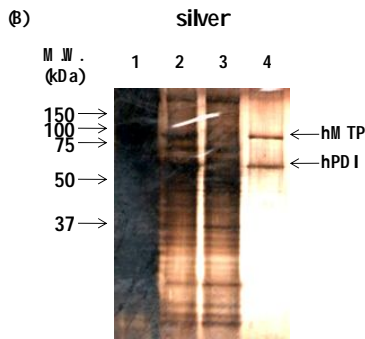


図1 hMTP-hPDI 複合体の精製

ヒト由来 ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体サブユニットタンパク質(E1, E2, E3)をカイコ幼虫で発現させた。それぞれのサブユニットタンパク質をカイコ幼虫脂肪体から TALON アフィニティクロマトグラフィー、StrepTactin アガロースゲルクロマトグラフィーおよび anti-FLAG M2 antibody アガロースクロマトグラフィーにより精製を行い、それぞれのサブユニットタンパク質の精製を確認した(図2)。この結果より、構築したN末端側にタグを付加させることができる LIC ベクターも、カイコを用いた組換えタンパク質生産に利用できると確認できた。

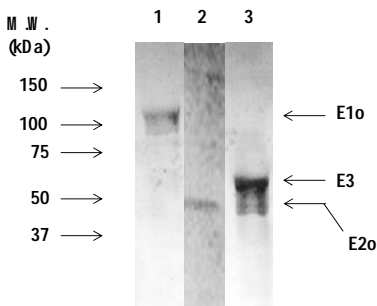


図2 -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼサブユニットタンパク質の精製

(2) ハイスループット組換えバクミド構築  
各種 96 ウェルプレートを用いた組換えバクミドの抽出を行った。ここで用いた大腸菌は、それぞれ所属する研究室で以前に構築した組換えバクミドを有する大腸菌を用いた。それぞれの大腸菌は、蛍光タンパク質(GFPuv, AcGFP, mCherry)と融合させたヒト由来タンパク質遺伝子を持つ BmNPV バクミドを有している。それぞれの大腸菌を 2xLB 培地(1.5ml)を含む 96 ウェルディープウェルプレートで一晩培養し、遠心分離により集菌した。バクミドのアルカリ抽出法と同様の方法で溶菌し、抽出液をワットマンユニフィルタークリアーポリスチレンライセートマトリックス

(96 ウェル)を通すことで不要物を取り除いた。次に 6.1M ヨウ化カリウムを加え、ワットマン BAC プレップユニフィルター(96 ウェル)に結合させた。結合した DNA を TE バッファーで溶出させることで、BmNPV バクミドを抽出した。抽出した BmNPV バクミドは、大腸菌内に共存するヘルパープラスミドとともに抽出されるが、DNA 濃度は平均 50-60 ng/ul (48 サンプル)であった。この DNA をカイコさなぎあたり 45ul (約 2.5 ug) 注射して、組換えタンパク質の発現を行った。組換えタンパク質の発現は、融合した蛍光タンパク質の蛍光を検出することで行った。注射後、6-7 日後に GFPuv や AcGFP の緑色蛍光や mCherry のピンク色の蛍光が確認されたことから(図3)、組換えタンパク質が発現していることが確認できた。ポリアクリルアミド電気泳動で確認したところ、融合タンパク質の蛍光が確認できたことから、組換えタンパク質発現が確認できた。これらの結果から、各種 96 ウェルプレートを用いた組換え BmNPV バクミド抽出は、カイコさなぎを用いた組換えタンパク質発現に利用できるといことが示された。

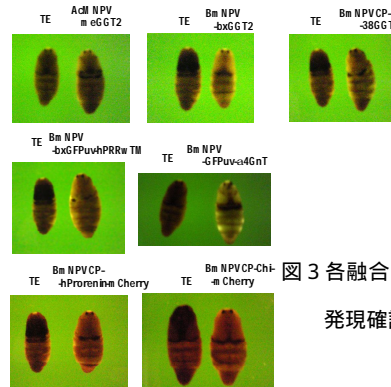


図3 各融合タンパク質の発現確認

(3) カイコさなぎを用いたハイスループット遺伝子発現・精製法の構築

(2) で発現させた組換えタンパク質はそれぞれヒスチジンタグを有しているため、カイコさなぎ破砕液から、それぞれの組換えタンパク質を 96 ウェルプレートに充填した Ni セファロースおよび TALON アフィニティレジンにより精製を行った。精製したタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、融合タンパク質の蛍光で特異的に検出したところ、精製できていることが確認できた。しかしクマシブリアントブルー(CBB)で染

色したところ、非特異的なバンドが多数検出され、完全に精製されていないことが明らかとなった。この結果からヒスチジntagは、カイコさなぎからの精製には適しておらず、他のタンパク質精製tagを使用する必要があることが示された。

カイコ幼虫及びさなぎからの組換えタンパク質精製にはよく FLAG tagが用いられており、効率的に組換えタンパク質の精製が可能であることが示されている。従って、FLAG tagを付加した組換えタンパク質遺伝子を調製し、(2)の方法で組換え BmNPV バクミドの調製を行った。次に抽出した BmNPV バクミドを用いて、カイコさなぎで組換えタンパク質を発現させ、DDDDK tagged protein purification ゲルを充填した 96 ウェルプレートで精製を行った。精製したタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した。CBB 染色により、各組換えタンパク質(ヒト由来ジヒドロキシリポアミドデヒドロゲナーゼ、ヒト由来 1,4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、インフルエンザウイルス (H5N8, H5N1, H1N3) 由来ヘマグルチニン)が精製されていることが確認できたが、約 55kDa 付近に大きなバンドが混入していた(図4)。これは今までに、DDDDK tagged protein purificationゲルを用いて組換えタンパク質をカイコさなぎから精製した時には認められないバンドであった。

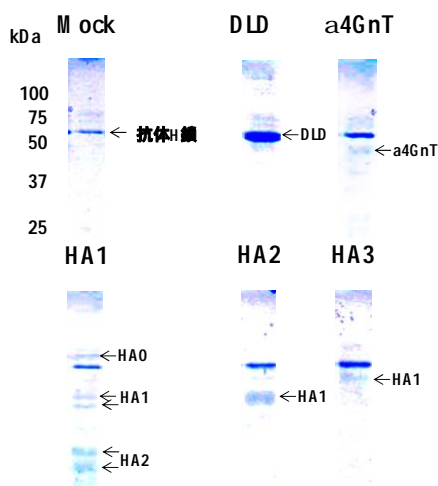


図4 FLAG tag融合タンパク質の精製

このことから使用した DDDDK tagged protein

purification ゲルに結合している抗体の H 鎖が、精製タンパク質と同時に精製されると推測された。

これは、96 ウェルプレートを用いた精製方法を改良することで防ぐことができると考えられる。FLAG tagはヒスチジntagよりもカイコさなぎからの 96 ウェルプレートを用いた組換えタンパク質精製にも効果的であることが示された。

本研究でカイコさなぎを用いたヒト由来タンパク質のハイスループットな発現・精製システム構築の基盤となる研究を行うことができた。この研究結果を基に、今後遺伝子クローニングから組換えタンパク質発現・精製を通して行うとともに、さらに 96 ウェルプレートでの組換え BmNPV バクミド構築を可能にする BmNPV バクミドの改良を行う必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. Kato T, Thompson JR, Park EY : Construction of new ligation-independent cloning vectors for the expression and purification of recombinant proteins in silkworms using BmNPV bacmid system. PLoS One. Vol.8, No.5, e64007, 2013. 査読有

[学会発表](計3件)

1. 加藤竜也, トンプソン ジェームス, 朴龍洙: マルチウェルプレートを用いたカイコ蛹での組換えタンパク質生産、2013年度日本農芸化学会大会、2013年3月、仙台市、東北大学
2. T. Kato : Vector development for high-throughput protein expression in silkworms, IBS2012 15<sup>th</sup> International Biotechnology Symposium and Exhibition, 2012 Sep., Daegu, South Korea.
3. 加藤竜也, トンプソン ジェームス, 朴龍洙: Ligation-independent cloning法を用いたカイコ-バクミド発現用ベクターの構築、2012年度日本農芸化学会大会、2012年3月、京都市、京都女子大学

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤 竜也 ( KATO Tatsuya )

静岡大学・農学研究科・准教授

研究者番号：00397366