科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号: 17104 研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2013~2015

課題番号: 25820405

研究課題名(和文)乾燥ストレス耐性ペプチドを利用したタンパク質発現系の構築とその作用機構の解明

研究課題名(英文) Construction of protein expression system using the desiccation tolerance peptide and the elucidation of the mechanism

研究代表者

池野 慎也(Ikeno, Shinya)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号:20437792

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):ネムリユスリカのLEAタンパク質を参考に設計した13アミノ酸のLEAペプチドを大腸菌内で目的タンパク質と共発現させると、細胞当たりの目的タンパク質の発現量が倍増する事をこれまでに明らかにしてきた。本研究では、ペプチド配列のルールに則ったライブラリーを作成し、その中からタンパク質発現効率の増大を示すLEAペプチド配列を探索した。その結果、配列中のグリシンをリシンやアスパラギンに置換するとLEAペプチドの効果が増大することを明らかにした。また、LEAペプチドの発現量および発現誘導を制御することで、LEAペプチドを共発現させない時と比べて目的タンパク質の発現量を最大で10倍増大させることに成功した。

研究成果の概要(英文): We have designed LEA peptide based on the motif sequence of LEA protein from polypedilum vanderplanki, and the protein expression system was constructed to co-express target protein with the LEA peptide in E.coli. The purpose of the study is to construct and characterization of LEA peptide 13mer motif for the expression of target protein in E.coli, through the co-expression system. In this study we employed the mutation in our original LEA peptide sequence and replace the Glycine with other amino acids at the 6th and 12th position. The protein expression increased with time in LEA-K and LEA-N was co-expressed compared with co-expression with original LEA peptide. In contrast, the expression of GFP was reduced in LEA-S as compared to original one. We have also investigated enhancement of protein expression using LEA peptide co-expression system to control expression levels of the peptide. The expression of a target protein was more than ten times to co-express with the LEA peptide.

研究分野: 生物工学

キーワード: LEAペプチド 共発現 大腸菌 タンパク質発現

1.研究開始当初の背景

遺伝子組換え技術の発展と共に、高等生物の酵素や抗体といった機能性タンパク質を大腸菌や酵母などの細胞を利用して大量生産することが汎用的な手法となってきた。しかし、これらの発現系では、発現誘導剤などを用いて大量にタンパク質を発現させると、細胞内で封入体を形成し凝集してしまうため、むやみに大量発現させることはできないという課題がある。

有用タンパク質を高効率に生産する方法 として、以下の手法が挙げられる。

高い発現能力を有するプロモーターや 分子シャペロン発現系を利用する手法

mRNA 分解酵素の欠損株を用いた手法 親水性のタンパク質を目的のタンパク 質と融合させて発現させる手法

しかし、、 の手法は、宿主が特定されてしまうため、他の宿主への転用が出来なく、その汎用性が低い。また、 の手法は、発現後に融合させた親水性タンパク質を酵素処理などで除去する必要があるため、その精製プロセスが煩雑となる欠点を有する。

以上の背景から、シンプルなプロセスによる、新しい有用タンパク質の高効率生産技術の開発が望まれている。

2.研究の目的

報告者は、ネムリユスリカの LEA タンパク質を参考に設計した 13 アミノ酸からなる特定配列のペプチド(以下 LEA ペプチド)を大腸菌内で目的タンパク質と共発現させると、細胞当たりの目的タンパク質の発現量が倍増することを発見した。本研究の目的は、前頁に記述した LEA ペプチドの配列ルールに則った機能性ペプチドライブラリーを作成し、その中からタンパク質発現効率増大を示す機能性ペプチド配列を探索することである。そして、得られたペプチド配列の特性を足がかりに、増大のメカニズムの解明を目指した。

3.研究の方法

(1)<u>タンパク質発現効率増大を示す機能性</u> ペプチド配列の探索

これまでの研究で得られた LEA ペプチド配列をベースとして、配列を改変した LEA ペプチド共発現系ライブラリー作成し、発現効率がより増大するペプチドを探索する。 LEA ペプチド配列の規則性に変異を加えるとその増大効果が減少することから、その規則性に関与しない配列に変異を導入した。本研究では、親水性アミノ酸を改変した LEA ペプチド共発現系の構築を行い、そのタンパク質発現増大効果を評価した。

(2) <u>LEA ペプチド発現量の制御による目的</u>タンパク質発現の評価

LEA ペプチドの発現量を増大(減少)させたときの目的タンパク質発現の影響を検討

する。LEA ペプチドおよび目的タンパク質の 遺伝子を発現誘導剤が異なるベクターに導 入し、LEA ペプチドおよび目的タンパク質の 発現を発現誘導剤の添加量で制御する。

(3)<u>無細胞タンパク質発現系を利用したタ</u>ンパク質凝集状態のリアルタイム測定

大腸菌の発現システムを利用した無細胞タンパク質発現系を用いて、目的タンパク質の発現量増大を検討する。目的タンパク質の発現量を測るのと同時に、試験管内で発現したタンパク質の凝集状態を動的光散乱法により測定を行うことで、LEA ペプチドの凝集抑制作用を検討する。

4. 研究成果

(1) <u>タンパク質発現効率増大を示す機</u> 能性ペプチド配列の探索

LEAペプチドは13アミノ酸から構成されている。この中で発現タンパク質の保護に機能していないと考えられる6番目と12番目のGlyに対して、その遺伝子に変異を導入し、替わりにSer、Leu、Asn、Lys、Gluが発現する新規LEAペプチドの設計を行った。この設計のもと、目的タンパク質と新規LEAペプチドを共発現するベクターの構築を行った。また、タンパク質発現におけるN末ルールを鑑み、2番目のアミノ酸を欠損させたLEAペプチドも構築した。

Dual 発現ベクターの各プロモーターの下流に目的タンパク質の遺伝子、新規 LEA ペプチドの遺伝子をそれぞれ組み込み、共発現ベクターを構築した(Fig.1)。その形質転換大腸菌に発現誘導剤を添加し、LEA ペプチドと目的タンパク質を共発現させた。発現誘導後、各時間に集菌し、濁度及び蛍光値の測定を行うことで細胞増殖とタンパク質発現の経時変化を調べた。

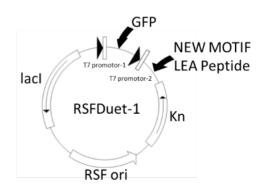


Fig.1 Deal expression vector

LEAペプチド内のGIyをSerに置換したLEAペプチド(LEAS ペプチド)を共発現させた時、発現量の増大は確認されなかったが、その他の新規LEAペプチドを共発現させた時、これまでに開発してきたLEAペプチドを共発現させた時よりもGFPの発現量が増大した。特にGIyをLysやAsnに置換したLEAペプチド(LEAK、LEANペプチド)を共発現させると、こ

れまでの研究で最も効果を示していた LEA ペプチドを上回る発現量が得られた。一方、LEA ペプチドの N 末端に変異を入れた LEA ペプチドを共発現させたときは GFP の発現量が低下した。

(2) LEA ペプチド発現量の制御による目的 タンパク質発現の評価

LEA ペプチドと目的タンパク質の GFP が 2 種類の異なる発現系でそれぞれ発現できる 双方の発現が制御可能な共発現系を構築し、LEA ペプチドの発現量とその発現誘導のタイミングが GFP の発現量に与える影響を評価した。pBAD 系ベクターと pET 系ベクターに目的 タンパク質である GFP の遺伝子と LEA ペプチドの遺伝子をそれぞれ導入し、新たな LEA ペプチド共発現系の構築を行った (Fig.2)。 GFP 発現を Arabinose、LEA ペプチド発現を IPTG でそれぞれ誘導し、IPTG の添加量を調整することで LEA ペプチドの発現制御を行った。

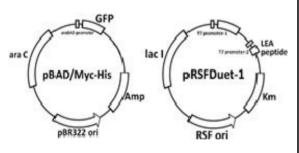


Fig.2 co-expression system of GFP and LEA peptide

Arabinose添加量と IPTG添加量をそれぞれ変化させたときの GFP 発現量を評価した。LEAペプチドを共発現させない場合、Arabinose添加量を 0.1%から 0.8%に増加すると GFP の発現量は約 2 倍になった。一方、LEAペプチドを共発現させると GFP の発現量は飛躍的に増加した。0.1mM の IPTG で LEAペプチドを発現誘導させたとき、GFP 発現が最も増加した。IPTG を添加しない場合と比較して最大 10 倍の増大効果が得られた。

一方、GFP の発現誘導開始と同時及びそれ 以降に LEA ペプチドの発現誘導を行ったとき、 それぞれの GFP の発現量に大きな差は見られ なかった。しかし、GFP の発現誘導前に LEA ペプチドを発現誘導した場合、GFP の発現量 が著しく増加した。

0.1mM以上のIPTG添加でLEAペプチドを共発現させるとGFP発現が減少する結果は、LEAペプチドが過剰に存在することがその機能に対して負に働いていることを示している。また、GFP発現の前にLEAペプチドを共発現させておくと発現量増大効果が飛躍的に向上することから、LEAペプチドが細胞内に存在する環境は発現したタンパク質を保護することに重要な意味を持つと考えられる。

(3)<u>無細胞タンパク質発現系を利用したタ</u>ンパク質凝集状態のリアルタイム測定

無細胞タンパク質発現法を利用し、GFP と LEA ペプチドの共発現を行った。無細胞タン パク質発現には PUREfrex 1.0 (Gene Frontier)を用いた。これはタンパク質発現に必要な転写、翻訳、エネルギー再生に必要 なタンパク質、リボソームを個別に精製後、 アミノ酸や NTP などと混合した再構成型無細 胞タンパク質合成系である。GFP 単独で発現 させた場合と、GFPと LEA ペプチドを共発現 させた場合の GFP 発現量は、その差が確認さ れなかった。この無細胞タンパク質発現系を 用いた LEA ペプチドの機能検証により、LEA ペプチドはタンパク質発現・フォールディン グを促進するのでは無く、目的タンパク質の 表面に吸着し、目的タンパク質の分解を抑制 する分子シールド機能として働き、その結果 発現量が増大している可能性が有力である と示唆された。

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) <u>Shinya Ikeno</u>, Tetsuya Haruyama, Boost Protein Expression through Co-Expression of LEA-Like Peptide in Escherichia coli, PLOS One,(査読有) 8 巻 12 号 、 2013 年、DOI:10.1371/journal.pone.0082824

[学会発表](計 16件)

- 1)パサック ニシット,<u>池野慎也</u>, Mutation in LEA peptide for expression of the target protein in E.coli through the co-expression system、化学工学会 第81年会、平成28年3月13日、関西大学(大阪市)2)<u>池野慎也</u>、岩水岳教、パサック ニシット、LEAペプチドの発現量調節による細胞内タンパク質発現への影響、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会、平成27年12月1日、神戸ポートアイランド(神戸市)
- 3) Takanori Iwamizu, <u>Shinya Ikeno</u>, Control of peptide expression levels for enhancement of protein expression in LEA peptide co-expression system , International Symposium On Applied Engineering and Science 2015 (SAES2015) , 平成 27年11月23日, Putrajaya (マレーシア)
- 4) <u>池野慎也</u>、濱田洋、 Pathak Nishit、LEA ペプチドへの変異導入による目的タンパク質発現の高効率化、第 67 回日本生物工学会大会、平成 27 年 10 月 26 日、城山観光ホテル(鹿児島市)
- 5)岩水岳教、濱田洋、<u>池野慎也</u>、LEA ペプチド共発現法におけるペプチド発現量が目的タンパク質発現に与える影響、第 67 回日本

生物工学会大会、平成 27 年 10 月 28 日、城山観光ホテル(鹿児島市)

- 6)岩水岳教、濱田洋、<u>池野慎也</u>、第52回化 学関連支部合同九州大会、平成27年6月28 日、北九州国際会議場(北九州市)
- 7) 濱田洋、<u>池野慎也</u>、春山哲也、タンパク 質発現量の増大を目的とした LEA ペプチド への変異導入、化学工学会 第80年会、平 成27年3月19日、芝浦工業大学(東京)
- 8) Hiro Hamada, <u>Shinya Ikeno</u>, Tetsuya Haruyama、Small peptide co-expression system for efficient protein expression in E.coli Symposium of Applied Engineering and Sciences 2014、平成 26 年 12 月 20 日、九州工業大学(北九州市)
- 9) 濱田洋、<u>池野慎也</u>、春山哲也、LEA ペプチドへの変異導入によるタンパク質発現量増大への影響、第37回日本分子生物学会年会、平成26年11月27日、パシフィコ横浜(横浜市)
- 10) <u>Shinya Ikeno</u>, Hiro Hamada, Tetsuya Haruyama、Efficient protein expression system by co-expression with small peptide in Escherichia coli、The 20th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community、平成26年11月7日、Chiayi,(台湾)
- 11) <u>池野慎也</u>、濱田洋、春山哲也、配列の特 異性に着目した新規 LEA ペプチドの構築とタ ンパク質発現の高効率化への応用、第 66 回 日本生物工学会大会、平成 26 年 9 月 11 日、 札幌コンベンションセンター(札幌市)
- 12) 濱田洋、<u>池野慎也</u>、春山哲也、変異導入 した LEA ペプチドが目的タンパク質に与える 影響第 51 回化学関連支部合同九州大会、平 成 26 年 6 月 28 日、北九州国際会議場(北九 州市)
- 13) 濱田洋、<u>池野慎也</u>、春山哲也、タンパク 質発現を亢進する LEA ペプチド配列の最適化、 化学工学会 第79年会、平成26年3月20日、 岐阜大学(岐阜市)
- 14) <u>池野慎也</u>、濱田洋、春山哲也、LEA タンパク質由来のペプチド共発現によるタンパク質発現の高効率化、化学工学会 第79年会、平成26年3月20日、岐阜大学(岐阜市)
- 15) <u>Shinya Ikeno</u>, Nana Uchida, Tetsuya Haruyama LEA peptide accelerates protein expression in cell, International Symposium On Applied Engineering and Science 2013 (SAES2015), 平成 25 年 9 月 30日, Putrajaya (マレーシア)
- 16)<u>池野慎也</u>、内田奈々、春山哲也組換えタンパク質の発現を亢進させる LEA ペプチド共発現系の開発、第 65 回日本生物工学会大会、平成 25 年 9 月 20 日、広島国際会議場(広島市)

〔産業財産権〕

取得状況(計 1件)

名称:有用タンパク質の高発現方法

発明者:池野慎也、春山哲也

権利者:国立大学法人九州工業大学

種類:特許

番号:第5875052号

取得年月日:平成28年1月29日

国内外の別:国内

〔その他〕 ホームページ等

http://www.life.kyutech.ac.jp/~ikeno/

6. 研究組織

(1)研究代表者

池野 慎也 (IKENO Shinya)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・

准教授

研究者番号: 20437792