

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660268

研究課題名(和文)高機能型タンパク質凝集体の生産を可能とする画期的システムの構築

研究課題名(英文) Novel system to produce highly functional proteins as protein inclusion in Escherichia coli.

研究代表者

早川 徹 (Hayakawa, Toru)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：30313555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：4AaCterタグは連結したタンパク質をアルカリ可溶性の凝集体として生産するペプチドタグである。本研究では未だ明らかにされていない4AaCterタグの凝集体形成メカニズムを解析するほか、その発展的な利用の可能性を追求した。様々な欠失変異体を解析した結果、4AaCter内で分子間結合を担う2カ所の領域(MIF1及び2)を特定し、これらがホモもしくはヘテロに重合することで凝集体が形成されると推察された。また凝集体形成に大腸菌由来のタンパク質(P49及びP50)が関与する可能性も示唆された。発展的な利用に関して、4AaCterタグの利用が可溶性殺虫トキシンの製剤化にも有効であることが示された。

研究成果の概要(英文)：4AaCter is a peptide-tag derived from mosquitocidal Cry4Aa toxin, and fusion with this tag facilitate formation of the protein inclusion in Escherichia coli. In this study, through the analyses using various truncated mutants of 4AaCter-tag, two domains (MIF1 and 2) that related to formation of protein inclusion were identified in the amino acid stretch of 4AaCter. Our data suggested that MIF domains polymerize by binding itself and/or each other, and facilitate formation of protein inclusion. In addition, proteins (designated as P49 and P50) which may be related to the formation of protein inclusion were detected in Escherichia coli proteins. In this study, the potency of 4AaCter-tag was investigated to prepare the formulation of insecticidal Cry46Ab toxin. Application of 4AaCter-tag yielded excellent results, including increase in the production level, simplification of the product purification and high toxicity against Culex pipiens larvae.

研究分野：境界農学・昆虫科学

キーワード：Bacillus thuringiensis 4AaCter-tag Cry4Aa Cry46Ab 大腸菌 タンパク質凝集体形成

1. 研究開始当初の背景

Bacillus thuringiensis(BT 菌)は孢子形成期にクリスタルを形成する土壌細菌である。クリスタルはアルカリ可溶性を示すタンパク質凝集体で、特異的な殺虫トキシン(Cry トキシン)やヒトガン細胞に選択的なトキシン(パラスポリン)などで構成されるものもある。Cry トキシンがクリスタルとして生産される理由については未だに不明であるが、「限られたスペースに大量のタンパク質を収納する」、「環境中のプロテアーゼによる分解からタンパク質を保護する」、「高発現による悪影響から BT 菌自身を保護する」等、タンパク質生産における大きな利点になっている。また「自然環境下における高い安定性」や「一度に多量のトキシンを標的昆虫に投与できる」など、微生物殺虫資材としての利点もある。

クリスタル形成機構についてはほとんど明らかにされておらず、Cry トキシンの種類(特にプロトキシンのサイズ)によって異なるようである。例えば 130 kDa 型のプロトキシンとして生産される Cry トキシンは自立的にクリスタル形成し、活性化の過程で除かれる C 末端側半分の領域がクリスタル形成に重要と考えられている。本研究でもこのことに注目して、殺虫トキシン Cry4Aa の C 末端側領域からタンパク質凝集体の形成を促すポリペプチド(4AaCter, I⁶⁹⁶ ~ P⁸⁵¹)を発見している(Hayakawa et al., 2010)。本研究では 4AaCter を発現用タグとして利用する技術の開発を進め、本系が梅毒菌表面抗原タンパク質、TpN(Hayakawa et al., 2010)や急性腎炎などの腎臓病のバイオマーカー、シスタチン C (Hayashi et al., 2013)の生産に有効であることを実証している。一方より小さなプロトキシン(70 kDa 型及び 30 kDa 型)として生産される Cry トキシンは 4AaCter に相当するようなポリペプチドを含まず、そのクリスタル形成には Bt 菌由来のアクセサリタンパク質が必要と考えられている。

2. 研究の目的

クリスタル形成は BT 菌が Cry トキシンのような毒素タンパク質でも大量生産できるように発達させたシステムと考えられる。本研究では殺虫トキシン Cry4Aa に由来するポリペプチド 4AaCter を用い、大腸菌でクリスタル様のタンパク質凝集体を形成させることに成功した。また 4AaCter の利用がタンパク質、特に臨床検査薬材料となる抗原タンパク質の効率的生産に有効であることを実証してきた。一方、凝集体の形成機構には不明な部分が多く、4AaCter の有効性も抗原タンパク質の生産以外で示されていない。

本研究では未だ明らかにされていない 4AaCter タグの凝集体形成メカニズムを解析するほか、その発展的な利用の可能性を追求する。

3. 研究の方法

(1) 発現ベクターの構築

発現ベクター-p4AaCter-C の構築: 異種タンパク質の C 末端側に 4AaCter タグを付加して発現するベクターを構築した。ベクターはグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)の C 末端側に 4AaCter タグを付加して発現するベクター(pGST-4AaCter 696-851, Hayakawa et al., 2010)から GST コード領域を除き、代わりに新しいマルチクローニングサイト(MCS)と PreScission protease 切断サイトを挿入することで構築した。組換えは Site directed mutagenesis 法で行った。

発現ベクター-pP20 の構築: Bt 菌に由来するシャペロン様タンパク質 P20 を異種タンパク質と同時に発現するベクター-pP20 を構築した。P20 遺伝子はベクター-pTR20 (Yoshisue et al., 1992)から PCR 法で増幅した。異種タンパク質を GST 融合タンパク質として発現させるベクター-pGEX 6P-1 (GE Healthcare)から GST コード領域を除いた pΔGST に P20 遺伝子を挿入し、P20 遺伝子の上流に新しい MCS

及び P20 用のリボゾーム結合配列を挿入した。pP20 の MCS に異種タンパク質遺伝子を挿入すると、P20 と異種タンパク質の両方の遺伝情報を持つポリシストロニックな mRNA が転写され、同時に両方のタンパク質が生産されると期待された。

(2) 組換えタンパク質

組換えタンパク質の発現

タンパク質は大腸菌 BL21 を用いて発現させた。タンパク質の発現は培養液に 0.5 mM IPTG を加え、37 °C, 4 h 培養することで誘導した。大腸菌菌体内における凝集体の形成は光学顕微鏡(Axio Observer A1, CarlZeiss)下で観察した。タンパク質凝集体は超音波破碎した大腸菌液を遠心分離(12,000 g, 5 min, 4 °C)することで回収した。発現タンパク質の凝集体形成率は SDS-PAGE 法及びウェスタンブロッティング法による解析結果から計算した。

タンパク質凝集体のアルカリ可溶性

タンパク質凝集体のアルカリ可溶性を調査した。具体的には 100 µg のタンパク質凝集体を 500 µl のアルカリバッファー(50 mM NaHCO₃, NaOH, pH 9-12)で懸濁した。室温で 30 min 可溶化した後、遠心分離によって可溶化上清を回収し、SDS-15% PAGE で解析した。

水晶発振子マイクロバランス (QCM)

ポリペプチド間の結合親和性の解析には Single Q 0500 quartz crystal microbalance device (As One)を用いた。ペプチド間の解離定数 K_D は Q-up analysis (Scinics)を用いて算出した。

(3) バイオアッセイ

4AaCter タグを付加することで凝集体として生産した(製剤化)トキシンの生物活性は、アカイエカ幼虫を用いたバイオアッセイで評価した。アカイエカは大日本除虫菊株式会社(中央研究所)より提供していただいたものを用いた。大腸菌で生産したトキシン凝集体を 3 齢アカイエカ幼虫に投与し、48 時間後の

死虫率を測定した。50 %致死濃度(LC₅₀)はプロビット法(Finney 1971)で算出した。

4 . 研究成果

(1)4AaCter 凝集体の形成機構に関する研究

4AaCter タグと連結したタンパク質は、大腸菌でアルカリ可溶性の凝集体として生産・蓄積される。また同様の凝集体は 4AaCter の一部のポリペプチド(4AaB7, F⁸⁰² ~ E⁸³⁴)と連結した場合でも観察される(Hayakawa et al., 2010; 2011)。これは凝集体形成に關与する機能構造が 4AaB7 内に存在することを示唆している。そこで本研究では以下の研究を進めた。

4AaB7 欠失変異体の凝集体形成能

凝集体形成に關与すると考えられる機能構造を特定する目的で、4AaB7 ポリペプチドの N 末端及び C 末端欠失変異体を構築し、GST 融合タンパク質として発現させた。まず完全長の 4AaB7 を連結した GST の凝集体形成率は 92.9±1.0%で、タグなし GST の凝集体形成率は 18.8±4.9%であった。そして N 末端側から順次欠失させた 5 種の変異体(N807, N812, N817, N822, N827)の凝集体形成率はそれぞれ 42.4±3.2, 34.2±5.3, 43.5±6.0, 34.0±3.1, 17.3±0.8%であった。凝集体形成率は段階的に減少し、その境界は N807 と N827 にあった。同様に C 末端側から順次欠失させた 4 種の変異体(C809, C814, C819, C824)の凝集体形成率はそれぞれ 52.9±2.3, 48.7±3.6, 45.8±2.6, 70.0±3.6 であった。興味深いことに C 末端側から欠失させた場合も凝集体形成率は段階的に減少し、その境界は C809 と C824 にあった。これらの結果をまとめると、4AaB7 に凝集体形成に關与する機能構造が 2 カ所(F⁸⁰²-K⁸⁰⁹及びL⁸²²-S⁸²⁹)存在することが示唆されていた。本研究では便宜上それらを MIF1(F⁸⁰²-K⁸⁰⁹)及び MIF2(L⁸²²-S⁸²⁹)と呼ぶことにした。4AaB7 のアミノ酸配列を他の Cry トキシンのアミノ酸配列と比較解析した結

果、MIF1 及び MIF2 は B7 配列内で最も相同性の高い領域を挟むように、比較的多様な配列の領域内に位置していた。

MIF は 4AaB7 間の分子間結合を担う

MIF1 と MIF2 は分子間結合を担う領域で、これらが重合することにより凝集体が形成されると推察された。そこで MIF1 及び MIF2 同士、MIF1 と MIF2 間の結合を明らかにするため、変異体 C809 (MIF1 を含む) 及び N822 (MIF2 を含む) の結合を QCM 法で解析した。その結果、MIF1 及び MIF2 同士、MIF1 と MIF2 間の解離定数(KD)はそれぞれ 6.6 ± 3.8 , 1.4 ± 0.9 , $4.8 \pm 2.8 \mu\text{M}$ と見積もられ、MIF1 と MIF2 がホモもしくはヘテロに結合することが明らかになった。

凝集体の形成に大腸菌タンパク質が関与

4AaB7 融合タンパク質を大腸菌で発現させると大きなタンパク質凝集体が形成される。しかし同じタンパク質を昆虫細胞などで発現させても小さなタンパク質凝集体しか形成されない。これは凝集体の形成に大腸菌由来のタンパク質が関与する可能性を示唆している。そこで人工合成した MIF ポリペプチドを固定したアフィニティカラムを作製し、MIF と結合する大腸菌タンパク質を検出しようと考えた。解析の結果、MIF1 と結合する 49 及び 52 kDa の大腸菌タンパク質が検出された。4AaCter タグによって形成されたタンパク質凝集体は、MIF 間の結合及び MIF1 と大腸菌タンパク質との結合によって形成されている可能性が示唆された。

Bt 菌に由来するシャペロン様 P20

Bt 菌 *israelensis* 株に由来するシャペロン様 P20 は Cry トキシンの正確な折りたたみに寄与すると考えられている。そこで本研究では P20 が 4AaCter タグによる凝集体形成にも関与するかどうかを調査した。P20 の発現には発現ベクター-pTR20 (Yoshisue et al., 1992) を用いた。pP20 は p15A 由来のレプリコンを持ち、pGEX などの ColE1 型レプリコンを持つ

ベクタープラスミドと和合性を示す。また目的タンパク質と P20 を共発現する発現ベクター-pP20 (本研究)も構築した。しかし現時点では P20 の明らかな発現が検出できておらず、発現タンパク質の正確な折りたたみへの影響も確認できていない。P20 に関しては大腸菌での発現に調製した人工遺伝子の作製を検討中である。

(2) 4AaCter を利用したトキシンの製剤化

4AaCter タグを付加することで形成させたタンパク質凝集体は、Bt 菌のトキシクリスタルと同様な性質(鱗翅目や双翅目昆虫幼虫の中腸消化液と同様なアルカリ性条件 (pH 10.5)下で可溶化する)を示す。つまり 4AaCter タグを付加して生産したトキシ凝集体を、Bt 菌のトキシクリスタルと同様な用途(殺虫製剤)で利用できることを示唆している。

Cry46Ab 凝集体の生産

Bt 菌 TK-E6 株に由来する Cry46Ab はヒトガン細胞に対する選択的な細胞損傷活性のほか、病気を媒介することで問題となる蚊幼虫にも殺虫活性を示す。Cry46Ab は微生物殺虫剤として有望な資材であり、大腸菌などを利用した効率的な生産系の構築が望まれている。しかし Cry46Ab は 30 kDa 型のプロトキシンとして生産され、大腸菌などの異種細胞で生産しても効率的にクリスタル形成しないと考えられている。本研究では 4AaCter タグを利用すれば効率的に Cry46Ab 凝集体が生産できると期待した。

タグなしの Cry46Ab を大腸菌で生産した結果、発現タンパク質の 61%しか凝集体に取り込まれなかった。一方 4AaCter タグを C 末端側に付加する自作のベクター(p4AaCter-C)を利用して生産した Cry46Ab はほぼ 100%が凝集体に取り込まれた。また 4AaCter タグを付加することで Cry46Ab の生産量も約 4 倍に上昇した(Cry46Ab 凝集体 = $31 \pm 3 \text{ mg/l}$ culture; Cry46Ab-4AaCter 凝集体 = 118 ± 8

mg/l culture)。これは Cry46Ab 凝集体の形成率が上昇することで大腸菌細胞に対する悪影響が低減でき、生産効率の上昇につながったと考えられた。一方、Cry46Ab 凝集体の生物活性(アカイエカ幼虫に対する殺虫活性)は 4AaCter タグを付加することで減少し、Cry46Ab 凝集体の LC₅₀ 値が 0.10 ± 0.03 μM であるのに対し、Cry46Ab-4AaCter 凝集体の LC₅₀ 値は 0.24 ± 0.04 μM だと見積もられた。凝集体のアルカリ可溶性を調査した結果、Cry46Ab-4AaCter 凝集体の可溶性は特に pH9-11 の範囲で低下しており、高発現の結果としてタンパク質の正確な折りたたみが行われなかったことが考えられた。

Cry46Ab 凝集体の生産条件の検討

過剰な高発現による不活性凝集体の形成を避けるため、大腸菌の培養温度を 37 から 30 に下げた。その結果 Cry46Ab-4AaCter 凝集体のアルカリ可溶性は改善され、殺虫活性も Cry46Ab 凝集体と同様なレベル(LC₅₀=0.09 ± 0.02 μM)になった。低温培養はトキシン凝集体の形成効率に影響しなかったが、トキシンの生産量は大幅に減少した。この問題もタンパク質発現を誘導した後の培養時間を 4 h から 8 h まで延長することで解消できた。本条件で Cry46Ab-4AaCter 凝集体の生産量は 156 ± 12 mg/l culture、アカイエカ幼虫に対する LC₅₀ 値は 0.11 ± 0.02 μM と見積もられた。

Cry46Ab-4AaCter 凝集体の安定性

凝集体形成は紫外線や乾燥、プロテアーゼによる分解からトキシンを保護すると期待される。そこで 4AaCter タグを付加して作製したトキシン凝集体の水環境中での安定性を調査した。具体的には Cry46Ab 凝集体(37 °C, 4 h)と Cry46Ab-4AaCter 凝集体(30 °C, 8 h)の水懸濁液を室温で放置し、2 週間及び 4 週間後の生物活性(殺虫活性)を調査した。その結果、トキシン凝集体は共に少なくとも 4 週間まで水環境中でも安定であることが示された。懸濁液として室温で放置した Cry46Ab

凝集体の 2 週間及び 4 週間後の LC₅₀ 値はそれぞれ 0.06 ± 0.01 及び 0.07 ± 0.01 μM と見積もられ、Cry46Ab-4AaCter 凝集体の LC₅₀ 値はそれぞれ 0.05 ± 0.02 及び 0.05 ± 0.01 μM と見積もられた。水で懸濁して放置した方が若干高い殺虫活性を示したことは、水の中で凝集体同士が集まってさらに大きな凝集体を形成した結果と考えられた。

以上、本研究の結果は 4AaCter タグの利用が殺虫トキシンの製剤化にも有効であること示していた。

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 3 件)

Hayakawa T., Yoneda N., Okada K., Higaki A., Howlader M.T.H., Ide T. *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba works synergistically with Cry4Aa but not with Cry11Aa for toxicity against mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) larvae. *Applied Entomology and Zoology*, 査読有, Vol. 52, No. 1, 2017, 61-68, doi: 10.1007/s13355-016-0454-z

早川 徹 蚊を殺すトキシン由来のポリペプチドを利用して効率的なタンパク質の生産系を構築する。昆虫と自然 査読無 第51巻 7号 2016, 41-42

Matsumoto R., Shimizu Y., Howlader M.T.H., Namba M., Iwamoto A., Sakai H., Hayakawa T. Potency of insect-specific scorpion toxins on mosquito control using *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, Vol. 117, No. 6, 2014, 680-683, doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.004.

[学会発表] (計 9 件)

早川 徹(早川 徹)、ペプチドタグ4AaCterを利用したCryトキシンの製剤化、平成29年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2017年3月 21-22日、茨城県つくば市

早川 徹(早川 徹)、抵抗性の発達阻止を可能とする新しい蚊防除資材、第12回昆虫病理研究会シンポジウム(招待講演)、2016年9月15日-17日、宮城県岩沼市

早川 徹(早川 徹)、殺蚊Cryトキシンが示す殺虫活性助長作用、日本蚕糸学会第 8 6 回大

会、2016年3月17日-18日、京都府京都

早川徹(早川徹)、Bt菌が産生するCryトキシンを用いて蚊の効率的な防除法を開発する試み、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、2015年12月1日-4日、兵庫県神戸市

早川徹(早川徹)、殺蚊トキシン由来のペプチドタグ4AaCterによるタンパク質凝集体形成機構、平成27年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会-日本蚕糸学会第85回大会-、2015年9月26日-27日、北海道札幌

檜垣亜由子(早川徹)、BT菌亜種israelensisに由来するCyt1Aaの大腸菌を用いた効率的生産法、第11回昆虫病理研究会シンポジウム、2014年9月18-20日、山梨県富士吉田

米田直也(早川徹)、殺蚊トキシンCry11Baを用いた効率的蚊防除システムの構築を目指して、第11回昆虫病理研究会シンポジウム、2014年9月18-20日、山梨県富士吉田

岡田光司(早川徹)、殺蚊トキシンCry4Aaの作用機構に関する研究、第11回昆虫病理研究会シンポジウム、2014年9月18-20日、山梨県富士吉田

早川徹(早川徹)、効率的且つ持続的蚊防除システムの構築に向けた最近の取り組み(シンポジウム、招待) 第11回昆虫病理研究会シンポジウム、2014年9月18-20日、山梨県富士吉田

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 1件)

名称：Protein production method, fusion protein, and antiserum
発明者：Hiroshi Sakai, Toru Hayakawa
権利者：Okayama University, Japan lamb Co., Ltd.
種類：特許
番号：Patent No: 8865428
取得年月日：2014 / 10 / 21
国内外の別：国外(USA)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

早川 徹 (HAYAKAWA Toru)
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号：30313555