

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05168

研究課題名(和文) タンパク質発現を促進させるLEAペプチドの機能発現に至る原理の究明

研究課題名(英文) Elucidation of LEA peptides function in enhancing of protein expression

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：組換えタンパク質の発現量を増大させるLEAペプチドの機能について、タンパク質同士の凝集を抑制する「分子シールド機能」、フォールディングを促進する「分子シャペロン様機能」の仮説を立て、LEAペプチドの機能解明を行った。合成LEAペプチドを用いて分子シールド機能の解明を行った結果、LEAペプチドは熱や塩によるタンパク質の凝集を抑制する機能は確認されなかった。一方、無細胞タンパク質合成系を利用して合成LEAペプチド添加による目的タンパク質の発現量を評価した結果、目的タンパク質の発現量が有意に増加した。これらの結果から、LEAペプチドは細胞内で分子シャペロン様機能を有している可能性が高いと考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したLEAペプチド共発現法は、特徴としてペプチド遺伝子を細胞に導入するのみで組換えタンパク質の発現増大し、他の宿主への適用が容易な点にある。そして発現したペプチドは非常に小分子であるため、その除去精製プロセスは非常に簡便である。本研究で取り組んだLEAペプチドの作用機序の解明により、ペプチドにより引き起こされる生体内の現象が明らかになり、それらを調節・制御する新しい方法論の確立につながるため学術的意義も非常に高い。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized a "molecular shield function" to suppress protein-protein aggregation and a "molecular chaperone-like function" to promote protein folding in order to elucidate the function of LEA peptides, which increase the expression of recombinant proteins in *E. coli*. The results of the molecular shield function elucidation using synthetic LEA peptides showed that LEA peptides did not suppress protein aggregation induced by heat or salt. On the other hand, the expression levels of target proteins were evaluated by the addition of synthetic LEA peptides using a cell-free protein synthesis system, and the expression levels of target proteins were significantly increased. These results suggest that LEA peptides may have a molecular chaperone-like function in cells.

研究分野：生物機能工学

キーワード：組換えタンパク質発現 大腸菌 LEAペプチド シャペロン様活性 分子シールド機能 分子クラウディング LEAタンパク質 GFP

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年、バイオ医薬品など組換えタンパク質の需要は年々拡大している。この組換えタンパク質の生産効率の向上を目的として、代謝工学や細胞工学などの生物工学的な手法によって発現量増大を行う研究が数多く報告されている。

Late Embryogenesis Abundant (LEA) タンパク質は乾燥などのストレスを受けたときに発現し、細胞内のタンパク質凝集を抑制する機能を有している。この LEA タンパク質は、植物と一部の動物において発現していることがこれまで確認されている。特に線虫などに発現が確認されたグループ 3 の LEA タンパク質は、特徴的な 11 アミノ酸配列が繰り返し存在することが知られている。この配列をベースに機能性ペプチド (LEA ペプチド) の設計を行い、大腸菌内で LEA ペプチドと目的のタンパク質を共発現させる遺伝子を導入したところ、菌数当たりの目的タンパク質発現量が倍増することを発見した (図 1)。しかし、その特徴的な配列ではないペプチドを共発現させた場合、タンパク質発現の増大は確認されなく、なぜこの LEA ペプチドが細胞内のタンパク質発現を高効率化するのか、その詳細な分子機構は不明である。

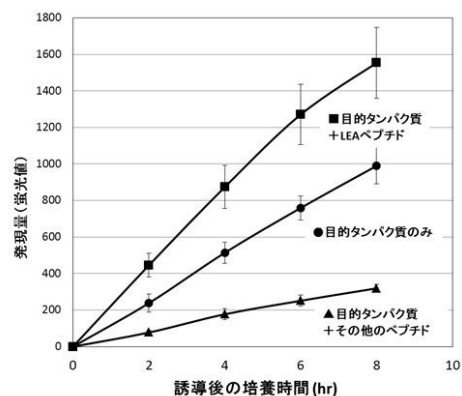


図1 LEAペプチド共発現による目的タンパク質発現量増加

## 2. 研究の目的

これまでの成果から、LEA ペプチドが細胞内で機能しタンパク質発現を増大させるメカニズムとして、以下の仮説を立てた。

(1) LEA ペプチドが成熟タンパク質の疎水性の部分に吸着し、静電性を付与することでタンパク質同士の凝集を抑制し、タンパク質分解から保護することでタンパク質発現量が増加したと考える  
『分子シールド機能説』

(2) LEA ペプチドが未成熟ポリペプチド同士の凝集を抑制し、タンパク質のフォールディングを促進することで成熟タンパク質発現量が増加したと考える  
『シャペロン様活性説』

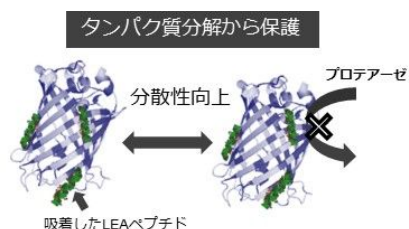


図2 分子シールド機能によるタンパク質の分散性向上と分解からの保護

上記仮説に基づきメカニズムを解明し、組換えタンパク質を高効率に発現させる新しい手法として確立する事が、本研究課題の核心である。上述の双方の仮説とも LEA ペプチドと目的タンパク質間の相互作用がこの現象のカギとなるため、これらの相互作用に着目しメカニズム解明に取り組む。そして、タンパク質発現における LEA ペプチドの作用機序を解明し、組換えタンパク質発現の新奇発現量増大技術として確立させることが本研究の目的である。

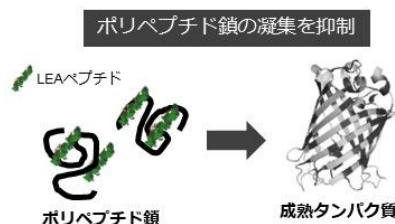


図3 シャペロン様活性によるタンパク質フォールディングの促進

## 3. 研究の方法

### 3-1 分子シールド機能としての分子評価

本研究では、人工合成した LEA ペプチドを用いて、図 4 に示す検討項目により、分子シールド機能の解明をおこなった。対照として、LEA ペプチドの変異体およびランダムな配列を有するペプチドを使用し、LEA ペプチドの有意性を明らかにする。以下に手法により、評価項目を検討した。

- 1) 動的光散乱法およびゼータ電位測定によるタンパク質分散状態の解析
- 2) 等温滴定型熱量測定 (ITC) による相互作用解析、示差走査熱量計 (DSC) によるタンパク質分解に対する安定性の評価
- 3) 分子シミュレーションによる LEA ペプチドとタンパク質への結合状態解析
- 4) 円二色性 (CD) スペクトルによるペプチド主鎖の構造解析

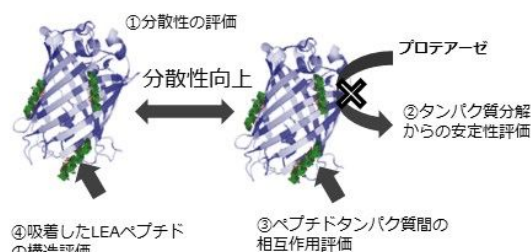


図4 分子シールド機能説明のための検討項目

### 3-2 シャペロン様活性としての分子評価

3-1 同様に人工合成 LEA ペプチドを用いて、以下のシャペロン様機能の解明をおこなった。

- 1) 無細胞タンパク質発現系の構築とタンパク質発現評価
- 2) リフォールディング実験によるシャペロン様活性説の解明

## 4. 研究成果

### 4-1 分子シールド機能の評価

タンパク質が凝集しやすい条件の下、LEA ペプチドがその凝集を抑制するのかを動的光散乱法によりリアルタイムに測定を行い、分子シールドとしての凝集抑制作用を評価した。また、LEA ペプチド-タンパク質複合体のゼータ電位を測定することで、LEA ペプチドの表面電気特性とタンパク質発現量増大との相関を確認した。検証の結果、LEA ペプチドは熱や塩によるタンパク質の凝集を抑制する機能は確認されなかった。

一方、分子シミュレーションによる相互作用の予測では、GFP の  $\alpha$  バレルと離れた親水的な GFP 表面と相互作用していることが確認された。しかし、等温滴定型熱量測定により LEA ペプチドは GFP と相互作用していないことが示唆され、熱示差走査蛍光強度測定により LEA ペプチドがタンパク質の構造安定性を向上しないことが示唆された。また、CD スペクトル測定では LEA ペプチドが極端な疎水的環境でないと  $\alpha$  ヘリックス構造をとらないことを明らかにした。

さらに細胞内に近い環境を再現して検証する必要があると考え、分子クラウディング概念を取り入れ実験を行った。現在まで、LEA ペプチドにはその溶液中においてタンパク質凝集を抑制する機能は確認できていない。以上のことから、細胞内において LEA ペプチドは発現したタンパク質に対して分子シールドとして機能していない可能性が高いと考察した。

### 4-2 シャペロン様機能の評価

再構成型の無細胞タンパク質合成系を利用して、LEA ペプチドによる目的タンパク質の発現量増大を検討した。目的タンパク質として GFP を単独で発現させた場合と比較し、GFP と LEA ペプチドを共発現させると GFP 発現量が 2.5 倍ほど増加した。また、細胞内のように混み合った状態に分子が存在する分子クラウディング条件を、様々な濃度の PEG を無細胞タンパク質合成系に添加することで構築した。この分子クラウディング条件下において、GFP を単独で発現するサンプルに合成 LEA ペプチドを添加させると LEA ペプチドの添加量の増加に伴い GFP 発現量が有意に増大した。

大腸菌内における GFP と LEA ペプチドの発現タイミングを制御することで LEA ペプチドの分子シャペロン様機能を検証した。その結果、LEA ペプチド発現を GFP 発現後に行ったサンプルは、GFP 発現量の増加は見られなかった。一方、LEA ペプチド発現を GFP 発現よりも先に行うことで GFP の発現が大幅に増大した。これらの結果から、LEA ペプチドはフォールディングを促進する分子シャペロンとして機能している可能性が高いと考察した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akhtar Mahmuda, Mizuta Kazuhiro, Shimokawa Tomoko, Maeda Minoru, Talukder Md Mahabubur Rahman, Ikeno Shinya	4. 巻 -
2. 論文標題 Enhanced insecticidal activity of <i>Bacillus thuringiensis</i> using a late embryogenesis abundant peptide co-expression system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 106207 ~ 106207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2021.106207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Alaa Huwaidi, Khairunisa Amira Ahmad, Mahmoud Magdy, Noor Azmi Shaharuddin, Shinya Ikeno, Amir Syahir	4. 巻 23
2. 論文標題 Identification of Mycosporine-like amino acids and expression of 3-Dehydroquinate synthase gene in UV radiations-induced <i>Deinococcus radiodurans</i> R1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Malaysian Journal of Biochemistry & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 19 ~ 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Metwally Khaled, Ikeno Shinya	4. 巻 191
2. 論文標題 A Short Peptide Designed from Late Embryogenesis Abundant Protein Enhances Acid Tolerance in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Biochemistry and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 164 ~ 176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12010-020-03262-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Akhtar Mahmuda, Shimokawa Tomoko, Wu Yinghan, Arita Taichi, Mizuta Kazuhiro, Isono Yuria, Maeda Minoru, Ikeno Shinya	4. 巻 -
2. 論文標題 Intermittent induction of LEA peptide by lactose enhances the expression of insecticidal proteins in <i>Bacillus thuringiensis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 池野 慎也	4. 巻 53
2. 論文標題 LEAペプチドの機能発現による組換えタンパク質の高効率発現	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 50～52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Shinya Ikeno, Khaled Metwally, Pathak Nishit, Alaa Huwaidi, Amir Syahir
2. 発表標題 In vivo expression of LEA peptide for enhancing resistances to abiotic stresses in Escherichia coli
3. 学会等名 The 25th Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Ikeno
2. 発表標題 Functional peptide: its full potential and application
3. 学会等名 International Congress of The Malaysian Society For Microbiology 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Khaled Metwally, Shinya Ikeno
2. 発表標題 LEA peptides confer tolerance to low pH in Escherichia coli
3. 学会等名 The 14th Asian Congress on Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 崎村雄貴, 高内和重, 池野慎也
2. 発表標題 ネムリユスリカ由来のLEA タンパク質配列から設計したLEA ペプチドの 合成とタンパク質保護機能の評価
3. 学会等名 第56 回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤幸喜, 中島一紀, 池野慎也
2. 発表標題 LEA ペプチド共発現法によるシリカテイン高発現技術の開発及びその活性 評価
3. 学会等名 第56 回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池野慎也, メトワリーキャレド
2. 発表標題 変異導入LEA ペプチドの発現による大腸菌の酸耐性の向上
3. 学会等名 第71 回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Ikeno
2. 発表標題 Development of functional short peptide and its application
3. 学会等名 Pure and Applied Chemistry International Conference 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yinghan Wu, Shinya Ikeno, Hua Li
2. 発表標題 Protection of ferulic acid against ultraviolet radiation using late embryogenesis abundant proteins
3. 学会等名 8th International Joint Symposium on Applied Engineering and Sciences (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Junpei Shoji, Shinya Ikeno
2. 発表標題 Significant impact on co-expressed protein expression by synonymous substitutions of LEA peptide codons
3. 学会等名 8th International Joint Symposium on Applied Engineering and Sciences (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinya Ikeno, Hayato Nakamura, Khaled Metwally
2. 発表標題 Expression of basic LEA peptides improves stress tolerance in Escherichia coli
3. 学会等名 The 26th Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayato Nakamura, Khaled Metwally, Shinya Ikeno
2. 発表標題 Improvement of UV resistance in Escherichia coli by expression of mutant LEA peptide
3. 学会等名 9th International Joint Symposium on Applied Engineering and Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daiki Tsuchimoto, Shota Imamura, Kousuke Hanada, Shinya Ikeno
2. 発表標題 Evaluation of salt stress tolerance of mutant LEA peptide expressing Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 9th International Joint Symposium on Applied Engineering and Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yinghan Wu, Hisham N. Farrag, Tamaki Kato, and Shinya Ikeno
2. 発表標題 Nano-design of cyclic peptide for protection of functional molecules from ultraviolet radiation and its functional evaluation
3. 学会等名 第16回ナノ・バイオメディカル学会大会
4. 発表年 2021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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関