

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05234

研究課題名（和文）相互作用界面のマスキングを介した有用タンパク質の高効率生産および精製技術の開発

研究課題名（英文）development of high-efficiency production and purification technology for useful proteins through masking of the interaction interface.

研究代表者

南畑 孝介（Minamihata, Kosuke）

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：90648586

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）：難発現性の成長因子の高効率生産を達成するために、それらのレセプターと共発現することで、ホスト生物内での安定性を高める効果について検討した。より具体的にはIL-2をターゲットに、カイコバキュロウイルス発現系を用いて、IL-2ならびにその各種レセプターを共発現することで、カイコ体内におけるインターロイキンの発現量増加について検討を行った。その結果、レセプターを共発現させたカイコ血清中におけるIL-2の発現量の増加をウエスタンブロッティングによって確認することが出来た。しかしながら、IL-2とレセプターとの分離手法を構築するに至らず、最終生成物としてIL-2を単離することは達成できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難発現性タンパク質において、結合タンパク質（レセプター）を存在させることで、その安定化を行うことができることを示す成果が得られ、将来的な難発現性タンパク質の高効率生産に繋がる知見が得られたと考える。具体的には、ターゲットとなる難発現性タンパク質とレセプターの界面に変異を導入し、pHや塩条件などマイルドな環境変化にตอบสนองしてアフィニティを変化できる仕組みを導入することで、ホスト生物内では十分なアフィニティを発揮し、難発現性タンパク質の安定化を行い、精製時に適宜、アフィニティを弱めて、レセプターとの分離を可能とする技術を構築することで、難発現性タンパク質の高効率な発現、精製が可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）：I investigated the effect of co-expression with their receptors on the stability of growth factors with low production yields, aiming to achieve high-efficiency production. Specifically, targeting IL-2, I examined the increase in the expression level of interleukin in silkworms by co-expressing IL-2 and its various receptors using a baculovirus expression system. As a result, I was able to confirm the increase in the expression level of IL-2 in silkworm serum by co-expressing the receptors through Western blotting. However, I did not succeed in developing a separation method between IL-2 and its receptors and were unable to isolate IL-2 as the final product.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：サイトカイン 遺伝子組換えタンパク質 インターロイキン タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

組換えタンパク質の生産性向上は、常にバイオ分野における最重要課題である。生産性向上への既存のアプローチは、コドンの最適化や、可溶化タグの導入など、タンパク質が正常に合成され、正しい構造を形成することに注力したものである。しかし、正しくフォールディングしたタンパク質であっても、容易に変性する場合や、宿主に毒性を与えるなどして、生産量が低下する場合は数多く存在する。つまり、組換えタンパク質の生産を向上させるためには、単に立体構造を正しく作り上げるための工夫だけでなく、フォールディング後において個々のタンパク質の性質や機能に応じたケアをする必要があるといえる。これまでに、正しい構造のタンパク質に対してケアを行い、その生産性を向上させるというアプローチに基づく、遺伝子組換えタンパク質発現の効率向上に関する研究は十分に行われていなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、タンパク質間相互作用(PPI)を利用し、タンパク質表面の結合ドメインを適切にマスキングすることで、組換えタンパク質を高効率に生産ならびに精製する技術の構築を目指し、検討を行った。具体的には、サイトカインに対するレセプターを構築し、それらに対応するサイトカインとともに共発現させ、PPIを介して、サイトカインの構造を安定化し、さらにその機能を制御することで生産性の向上を図る。また精製タグを導入できない難発現性のサイトカインに対して、レセプターの PPI を介した精製方法の開発を行うことを目的とし、検討を行った。

3. 研究の方法

モデルとなる難発現性のタンパク質として、サイトカインの一種であるインターロイキン 2 (以下 IL-2) を選択し、そのレセプターである、IL-2R α 、IL-2R β および γ と共発現させることで、IL-2 の生産性向上効果について評価した。より具体的には、まず、IL-2 ならびにその各種レセプターを発現するバキュロウイルスベクターを構築し、カイコバキュロウイルスタンパク質発現系を用いて、IL-2 ならびにその各種レセプターを発現するバキュロウイルスベクターを共感染させることで、共発現を行った(図1)。IL-2 単独あるいはレセプターを共発現させた場合とで、IL-2 の発現量の向上があるかどうかを、ウエスタンブロッティングによって評価した。

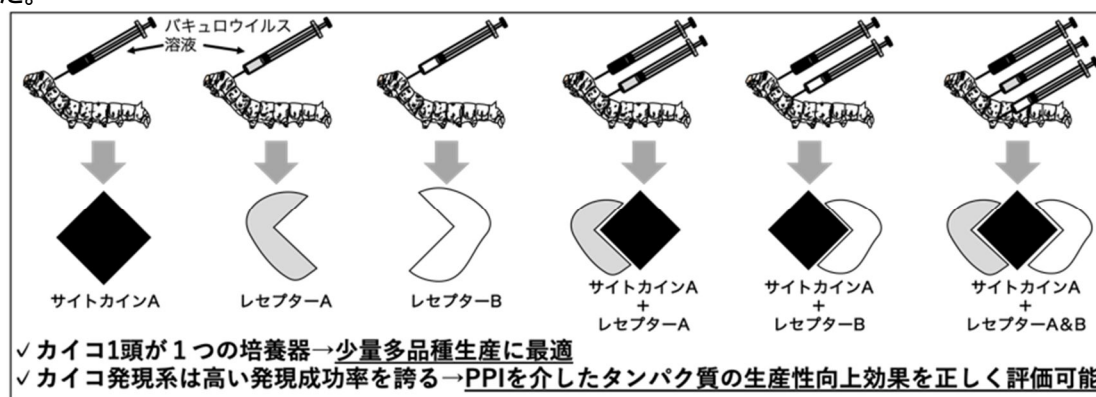


図1 カイコ・バキュロウイルス発現系による PPI を介した難発現性タンパク質の生産性向上の評価

4. 研究成果

IL-2のC末端に His-tag-StrepTag2-His-tag (以下 HSH) を付与した IL2-HSH ならびに StrepTag2 を付与した IL2-Strep の 2 種類のコンストラクトを構築した。この 2 種類の IL-2 コンストラクトに対して、IL-2R α 、IL-2R β ならびに γ をカイコバキュロウイルス発現系において、共発現させた。なお、各種レセプターに対しては HSH タグを付与した。また、全てのタンパク質にはシグナルペプチドとして、カイコ由来の 30K 配列を N 末端に付与して発現を行った。

図2に、カイコ血清の SDS-PAGE 解析ならびに His-Tag を検出したウエスタンブロッティング解析結果を示す。図2より、カイコ血清中における IL-2 ならびに各種レセプターの発現量は低く、SDS-PAGE 解析による CBB 染色においてはバンドを確認することは出来なかった。ウエスタンブロッティング解析において、まず IL-2 単独で発現した場合には、IL2-HSH のバンドは確認されず、カイコ内でほとんど発現していないことが示された。IL-2 の各種レセプターについては、対応する分子量においてバンドが確認され、発現量が低いながらも発現を確認することが出来た。IL2-HSH と各レセプターを発現した条件において、IL-2 に相当する分子量の領域にわずかにバンドを確認することが出来た。ウエスタンブロッティングにおける His-tag の検出自体は、コントロールとしておいた精製済み HisTag 導入 SpyCatcher のバンドがはっきりと確認できて

いることから、問題なく行えていると考えられる。特に IL-2R α 、および c と共発現させたレーンにおいて IL2-HSH のバンドがより強く確認できた。IL-2 との親和力の観点では、IL-2R α が最も強く、Kd 値として 10 nM 程度であり、一方、IL-2R β ならびに c は、14 nM ならびに > 50 μ M と報告されており、親和力と発現量の相関は見られなかった。しかしながら、共発現による IL-2 の一定の発現量向上効果を確認することが出来たと言える。

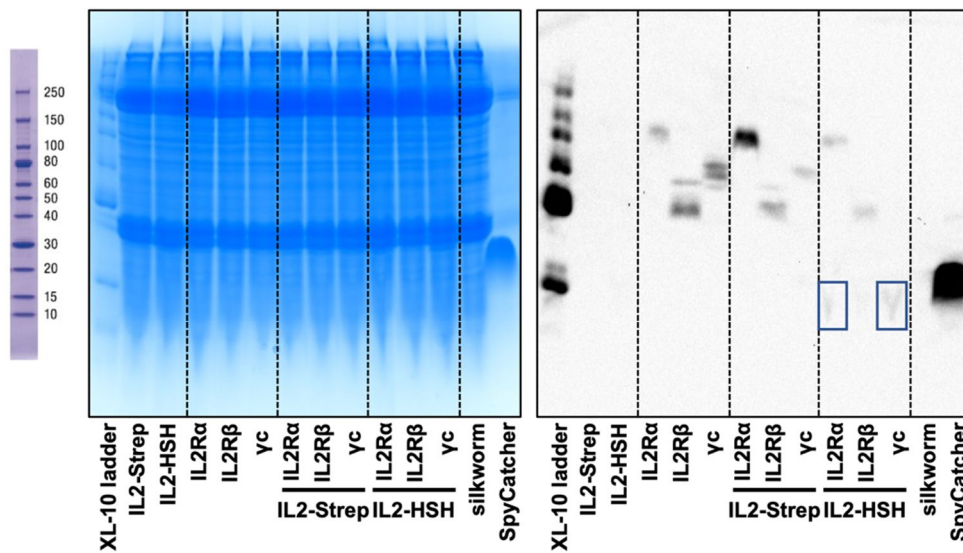


図2 IL-2と各レセプターを共発現させたカイコ血清のウエスタンブロットティング解析結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------