

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570108

研究課題名（和文） サイトカインENFペプチドファミリーの受容体活性化機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism of receptor activation by ENF peptide family.

研究代表者

河野 敬一 (KAWANO KEIICHI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任教授

研究者番号：10136492

研究成果の概要（和文）：ENFペプチドは成長の制御や細胞増殖、免疫細胞の活性化など様々な活性を有する昆虫由来のサイトカインである。我々は、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いた融合発現系を用いることで、このサイトカインの解析に有効な大量生産系の構築に成功した。また、このENFペプチドの受容体活性化機構に関連するタンパク質であるGBP-BPとの相互作用解析を進め、その作用機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：ENF peptides are insect cytokines that possesses diverse biological activities such as larval growth regulation, cell proliferation, and stimulation of immune cells. In the present study, we constructed the expression systems of ENF peptides using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, which is an efficient host for high-level production of heterologous proteins. To inhibit degradation by protease, we developed the method to produce peptides fused to thioredoxin and we successfully produced ENF peptides efficiently. In addition, we studied the interactions between ENF peptides and GBP-BP that is related to the end of the activation of ENF peptides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：サイトカイン、昆虫、自然免疫、NMR

1. 研究開始当初の背景

ENFペプチドファミリーは、昆虫の体液から発見された、約20残基からなる一連のペプチド性の因子の名称であり、そのN末端3残基がファミリー内で保存されている

(Glu-Asn-Phe) ことから名付けられた。現在までにチョウやガなどの鱗翅目昆虫での発見を中心に20種類以上の存在が複数のグループから報告されており、その活性は極めて多岐にわたる。細胞レベルでは、細胞増殖活性、分化の制御、異物を排除する血球細胞

の活性化などが報告されており、その生理活性としては、個体の発育制御、脳、頭部の形成、筋肉の収縮を伴う麻痺の誘発、心臓拍動の制御などが明らかになっている。よって ENF ペプチドファミリーは、極めて多彩な機能を持つサイトカインであると考えられる。ENF ペプチドファミリーの一つである GBP (growth-blocking peptide) は佐賀大学農学部の早川らにより、寄生蜂の寄生に伴う成長抑制の現象の研究の中で発見され、これが世界で初めての ENF ペプチドの報告となった。その後、現在までに、早川と研究代表者のグループでは、ENF ペプチドに関する様々な共同研究を展開してきた。

サイトカインがその作用する細胞の種類によって多様な活性を示すこと自身は珍しくはない。しかし驚くべきことに ENF ペプチドは、まったく異なった複数の受容体を刺激する能力を持ち、その刺激により活性の異なることが、変異体などを用いた研究成果から明らかになってきた。このことは、ENF ペプチドがわずかに 20 残基程度の小分子であることを考えると、極めて興味深い事実である。

さらに、この ENF ペプチドが昆虫培養細胞のみならず、ヒト培養細胞などに対し脊椎動物由来の EGF と同様の活性を示すことが発見され、実際 EGF 受容体に直接結合・刺激し、チロシンリン酸化を促すことが明らかになった。研究代表者のグループがおこなった NMR による立体構造解析の結果からも EGF の C 末端ドメインと相同性のある立体構造を有することが明らかになっている。

2. 研究の目的

EGF 受容体ファミリーを刺激するリガンド分子は、主にガン関連の研究により数多く発見されているが、既知のものは全て 3 組のジスルフィド結合を有する、いわゆる EGF モチーフ構造をとっている。約 20 残基で 1 組のジスルフィド結合しか有さない ENF ペプチドが EGF 受容体のアゴニストとして働くメカニズムの解明は学術的にも、応用面でも極めて意義深い成果が期待される。また、昆虫の血球細胞の活性化における、ENF ペプチドの受容体は同定されていないが、活性化の収束に大きく関与すると考えられる GBP 結合タンパク質 (GBP-BP) が近年同定されており、GBP との結合様式の解析などの研究課題は興味深い。ENF ペプチドはプラズマ細胞の活性化後に遅れて、血球エノシトイドの溶血を引き起こし、この血球内で特異的に合成され存在する GBP-BP の放出を促すことが近年発見されている。GBP が、食細胞であるプラズマ細胞を刺激することにより免疫機構が活性化され、同様に GBP の刺激によりエノシトイドから放出される GBP-BP が

GBP に結合することで沈静化に向かうと考えられている。

そこで、ENF ペプチドの分子レベルでの受容体動作機構を解明する事を目的とし、まず代表的な ENF ペプチドである GBP の効率的な生産技術の検討と改良に取り組んだ。ENF ペプチドは比較的小分子のペプチドであり化学合成も可能なサイズではあるが、NMR 法を用いた受容体等との相互作用解析には安定同位体標識試料の調製が有効であり、そのためには効率的な発現系の構築が必要なためである。また、これと並行して大腸菌を用いた GBP-BP の発現系を構築し、ENF ペプチドとの相互作用について、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いた解析を進めた。ENF ペプチドは低分子のペプチドであり、良好な NMR スペクトルを得ることが可能な分子であることから、Tr-NOE 法等を用いた相互作用部位の解析が有効と考えられるが、このためには ENF ペプチドと GBP-BP の結合の状態を適切にコントロールする必要があり、この目的でも SPR 法による解析で得られた情報は重要になると考えられるため、優先して解析を行った。

3. 研究の方法

P. pastoris を宿主として用い、融合タンパク質とすることによりペプチドの分解を避け安定に発現させる系の検討のために、大腸菌由来の thioredoxin (Trx) を融合パートナータンパク質として利用したペプチド大量発現系の構築を進めた。まず、Trx の C 末端にプロテアーゼ enterokinase (EK) の切断部位及び GBP 遺伝子を導入した Trx 融合ペプチドの細胞内発現系および分泌発現系、さらに Trx と GBP が *P. pastoris* 由来の Kex2 プロテアーゼにより分泌過程で切断される分泌発現系ベクターを構築した (図 1)。

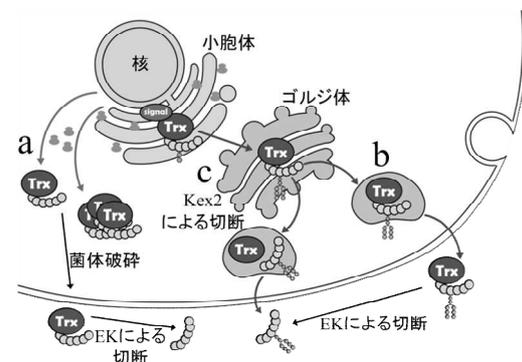


図 1 Trx 融合 GBP 発現系の模式図
a 細胞内分泌経路、b 細胞外分泌経路、c 分泌過程で Kex2 により切断を受ける経路

これらのベクターを用いて宿主 *P. pastoris* を形質転換した後、その系に応じて、菌体内または培養上清から融合タンパク質または成熟型ペプチドの精製法の検討を進めた。

また、全長 430 アミノ酸残基の GBP-BP は中間域 (91-189 残基) に血管内皮増殖因子 (VEGF) レセプター Flt-1 との相同性を、C 末側 (194-430 残基) に *Bombyx mori* 由来のリポタンパク質との相同性を持つことから、全長に加えて、GBP-BP の 193 残基目を境に、二つに分割した N 末ドメインタンパク質と C 末ドメインタンパク質の His-Tag を付加した大量発現系を構築した。これらのタンパク質を用い、CD 分光法による測定、SPR 法による解析相互作用解析などを行った。

4. 研究成果

Trx 融合ペプチドの細胞内発現系および分泌発現系では、バッフルフラスコを用いた通常培養、ファーメンターを用いて培地の温度、pH、溶存酸素濃度などをコントロールしながら行う高密度培養の両方の経路で GBP の安定な生産に成功した。これに対して、Trx とペプチドが分泌発現の過程で分離される系では、通常培養では GBP を単離・精製することができなかった。前者の 2 つの系では、Trx が精製後の EK による切断までの間ペプチドと融合しているため、ペプチドのプロテアーゼによる分解が効率的に抑制されたと推測されるが、後者の系では分泌後、培地中で分解を受けた可能性が推定された。そこで培養条件をより安定に制御できる高密度培養を用いたところ、後者の系を用いても GBP の単離に成功し、その収量は最大で培地 1L あたり約 100 mg に達した。この値は、GBP のみをペプチドとして単独で分泌発現した際のおよそ 5 倍の収量であり、この系がペプチドの大量発現に有用であるということが証明された (図 2)。

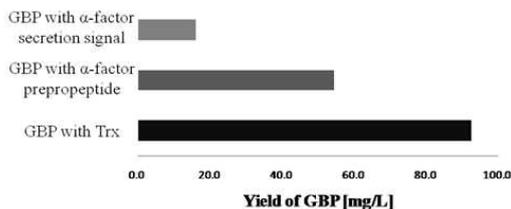


図 2 各種分泌発現系を用いて高密度培養を行った際の GBP の収量の比較

遺伝子組換え GBP-BP は天然由来 GBP-BP と異なり、C 末端に His-tag 配列を持つ。しかし、far-UV CD スペクトル測定の

比較から、同一の構造である可能性が高いこと (図 3)、また SPR 法による相互作用解析から、ストレプトアビジン (SA) を固定化したセンサー表面上に固定化されたビオチン化 GBP との結合能がほぼ同等であることが示された (図 4)。さらに、GBP-BP の GBP に対する経時的な結合能を検証すると、GBP への相互作用能は経時的に減少し、CD スペクトル測定からも経時的な立体構造変化が観察された。これは、GBP-BP による過度な免疫機構の沈静化を抑制するため GBP-BP が自己の活性を減衰させていく機構ではないかと推定される。

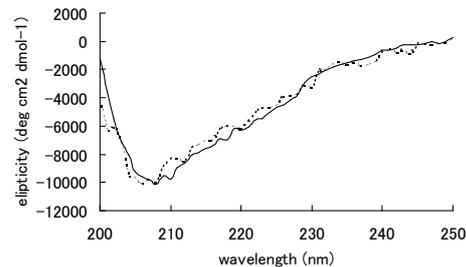


図 3 天然由来の GBP-BP (破線) と遺伝子組換えにより調製された GBP-BP (実線) の Far-UV CD スペクトルの比較

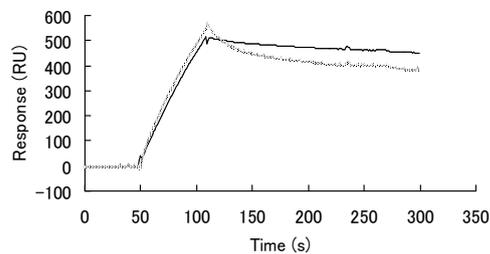


図 4 天然由来 GBP-BP (実線) と遺伝子組換えにより調製された GBP-BP (点線) の結合能の比較

さらに詳細な GBP と GBP-BP の間の相互作用の解析のため、GBP-BP をその C 末端に付加した His-Tag を介して Ni-NTA を持つセンサー表面上に固定化し、GBP との作用を観察した。算出した GBP と GBP-BP 間の解離定数 K_D を、GBP を固定化し GBP-BP を作用させた場合と比較すると、それぞれ $1.77 \times 10^{-6} \text{ M}$ と $6.03 \times 10^{-9} \text{ M}$ と大きな差が示された。この差は SPR 解析において固定化された表面で露出した分子範囲の違い、つまり GBP-BP を C 末端で固定化したことにより、C 末側への GBP の相互作用が立体障害等の影響から制限された可能性が推定される。

この結果より、GBP-BP の C 末側領域が GBP の認識において重要な役割を果たしている可能性が示唆されたため、予想されるドメイン単位 (N 末、C 末ドメイン) での大量発現系を用いて、さらに相互作用解析を進めた。各ドメインを Ni-NTA を介してセンサー表面上に固定化し GBP との相互作用を観察した結果、N 末ドメインは全く GBP と相互作用せず、C 末ドメインのみが GBP との相互作用を示した (図 5)。さらに、Ni-NTA センサー表面上での GBP-BP と GBP 間と、C 末ドメイン-GBP 間の解離定数 K_D (それぞれ $1.77 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 $3.00 \times 10^{-7} \text{ M}$) の比較から、N 末ドメインを除去した C 末ドメインのみの方が、GBP-BP 全長より結合強度が高いことから、C 末ドメインの相互作用における重要性が示された。このことから、GBP-BP の ENF ペプチド認識領域が C 末端ドメイン中に存在することが明確になり、今後の NMR を用いた解析等に向けて、重要な情報を得ることに成功した。

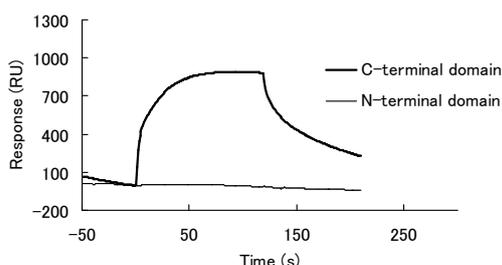


図 5 GBP-BP の C 末端ドメインと N 末端ドメインの GBP との相互作用の比較

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)

①Y Kitamura, T Aizawa, M Kamiya, T Kikukawa, M Demura, K Kawano
Does *Escherichia coli* thioredoxin improve expression efficiency of recombinant peptides in *Pichia pastoris*?
Peptide Science 2011, 375-376, 2011 (査読無)

[学会発表] (計 4 件)

①北村 優紀他、酵母 *Pichia pastoris* による thioredoxin を利用したペプチド生産、第 85 回日本生化学会大会、2012/12/15、福岡国際会議場 (福岡県)

②Yuki Kitamura et al., Does *Escherichia coli* thioredoxin improve expression

efficiency of recombinant peptides in *Pichia pastoris*?、第 48 回ペプチド討論会、2011/9/28、札幌コンベンションセンター (札幌市)

③北村 優紀他、酵母 *Pichia pastoris* による thioredoxin を利用したペプチド大量発現系の構築、第 84 回日本生化学会大会、2011/9/22、国立京都国際会館 (京都市)

④北村 優紀他、酵母 *Pichia pastoris* を宿主としたペプチド大量発現系の構築、第 11 回日本蛋白質科学会年会、2011/6/8、ホテル阪急エキスポパーク (吹田市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

河野 敬一 (KAWANO KEIICHI)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
特任教授
研究者番号：10136492

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし