

## 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



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。

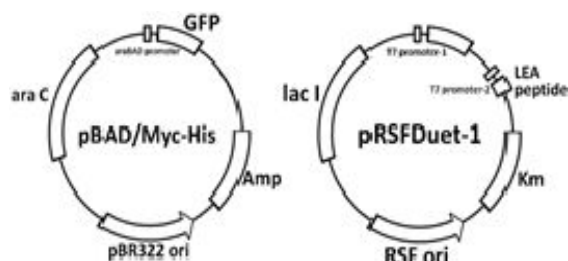


Fig.2 co-expression system of GFP and LEA peptide

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に及びそれ以降に 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) 無細胞タンパク質発現系を利用したタ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 PUREflex 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なく、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) Shinya Ikeno, 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) パスツク ニシット, 池野慎也, 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) 池野慎也, 岩水岳教, パスツク 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, Shinya Ikeno, 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) 池野慎也, 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, 池野慎也, 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、池野慎也、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、池野慎也、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, Shinya Ikeno, 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、池野慎也、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) Shinya Ikeno, 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) 池野慎也、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、池野慎也、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、池野慎也、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) 池野慎也、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) Shinya Ikeno, 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) 池野慎也、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