

# 短い溶解度向上タグを用いた大腸菌における封入体形成の解析及びその防止への応用

黒田 裕

(東京農工大学大学院 工学研究院)

## 研究の目的

大腸菌は増殖が速く培養が容易なため、組換えタンパク質の大量発現系の宿主として汎用されている。しかし、組換えタンパク質が大腸菌体内で封入体を形成してしまい、他の発現系が必要となる場合も多い。本計画では、我々が開発したタンパク質・酵素の試験管内の溶解限界濃度(以下、溶解度)を著しく向上させる 3~10 残基の短いペプチド系溶解度向上タグ (SEP-tag、文献 1~3) を用いて、タンパク質の溶解度と大腸菌体内の封入体形成の関係を系統的に解析し、さらに、SEP-tag を封入体形成の防止へ応用する。

## 方法

SEP-tag を各モデルタンパク質に付加した発現系を作製し、大腸菌で発現し、全発現量に対する可溶性画分と不溶性画分(封入体)の割合を測定する。モデルタンパク質には分子量 10kD~57kD の 6 種類のタンパク質、CAD 1-86 C34S、GLuc (文献 4)、N-intein (文献 5)、GFP (文献 5)、VanX E181A、P57 を選び、それらに対し、3 種類の長さの SEP-tag (含有する荷電アミノ酸が 3、6、9 残基) を C 末端に付加した変異体を作製する(表 1)。SEP-tag としては、GGR<sub>n</sub> と GGE<sub>n</sub> 配列を用いる (G はグリシン、R はアルギニン、E はグルタミン酸)。n は、E 及び R の個数を示し、個数を変えることによって、モデルタンパク質の溶解度を制御する。荷電アミノ酸の種類はタンパク質の等電点により

表 1. 本研究で用いたモデルタンパク質とその変異体

	MW(kDa)	pI	NoTag	C3D	C6D	C9D	C3R	C6R	C9R
CAD 1-86 C34s	10.0	9.8	○	—	—	—	○	○	○
N-intein	14.4	4.4	○	○	○	○	—	—	—
GLuc	18.6	6.7	○	○	○	○	○	○	○
VanX E181A	23.6	5.8	○	○	○	○	—	—	—
VanX	23.6	5.6	○	—	—	○	—	—	—
GFP	27.2	5.8	○	○	○	○	—	—	—
P57	56.7	5.2	○	○	○	○	—	—	—

作製した発現系を○で示す。発現系には pAED4 を用いた (発現ベクターに関する詳細は文献 6~8)。これらのコンストラクトは共通の N 末端、C 末端の塩基配列を持つ。2 列目の MW (kDa) は分子量、3 列目の pI はタグ無しのアミノ酸配列から計算した等電点を示す。VanX は溶菌活性を有するため不活性化した VanX E181A も用いた。モデルタンパク質をコードする塩基配列の上流に NdeI サイト (CATATG)、下流にはアデニン 1 塩基をはさんで NcoI サイト (CCATGG) が存在する。さらにその下流には SEP-tag 配列、終始コドン (TAA)、BamHI サイト (GGATCC) が続く。

決定し、塩基性タンパク質にはアルギニン、酸性タンパク質にはアスパラギン酸を用いる。これらの変異体を大腸菌株 BL21 (DE3) pLysS、JM109 (DE3) pLysS を宿主として、37、30、25°Cで発現し、可溶性画分と不溶性画分 (封入体) の割合を SDS-PAGE および画像処理ソフトウェアにより解析する。また、GFP、VanX、GLuc など、活性を有するタンパク質に対しては、0 残基、9 残基の荷電アミノ酸を含む SEP-tag を付加した変異体 (C0D、C9D) の活性を測定する。

## 結果

本研究で、溶解度と封入体形成の関係を網羅的に解析することが初めて可能になったのは、我々が開発したペプチド系溶解度向上タグ (SEP-tag) が目的タンパク質の溶解度のみを変え、それ以外の特性に、影響しないことにある。まず、全体を通して、効果の度合いにはタンパク質の種類や培養条件によって少々ばらつきがあったものの、SEP-tag は本研究で用いた全タンパク質に対して封入体形成を抑制する効果を有していた。酸性タンパク質に対しては、アスパラギン酸を含む SEP-tag を付加した。たとえば、N-intein では SEP-tag が非常に効果的に機能しており、封入体の形成をほぼ完全に抑制した (図 1 では、C0D は封入体で発現しているが、C9D はほとんど可溶性画分で発現していることが示されている)。また、SDS-PAGE 解析から、SEP-tag がその荷電アミノ酸残基数に依存して封入体形成を抑制し、残基数が多いほどその効果も大きいことも示された (図 2)。SEP-tag の荷電アミノ酸残基数の依存性は、分子量 2 万以下のタンパク質で特に明確に示された。分子量 2 万以上のタンパク質に対する効果には少々ばらつきが見られたが、分子量 57kD のタグ無(C0D)P57 タンパク質が封入体で発現するに対して、C9D を付加すると半分近くの P57 タンパク質が可溶性画分に発現したことから、SEP-tag が分子量の大きいタンパク質の封入体形成も効果的に抑制することが示唆された。

次に、図 2 で示す通り、弱酸性タンパク質の GLuc にアスパラギン酸を付加すると封入体

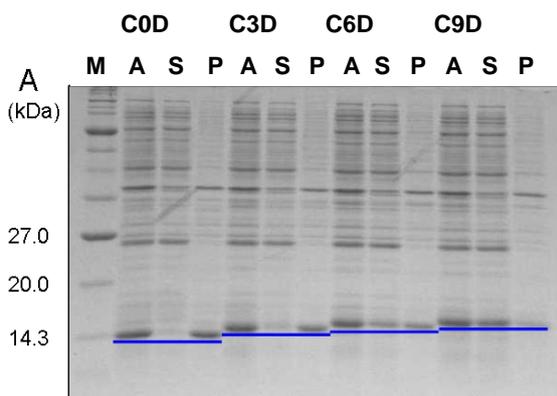


図 1. SDS-PAGE による N-intein の発現確認  
N-intein は、BL21(plysS)を宿主に用いて 37°Cで発現した。M は分子量マーカー、A、P、S は、それぞれ全菌体、封入体画分、可溶性画分を示す。C0D はタグ無し、C3D、C6D と C9D がそれぞれ 3、6、9 個のアスパラギン酸を含む SEP- tag を付加した N-intein タンパク質。N-intein を青線で示す。

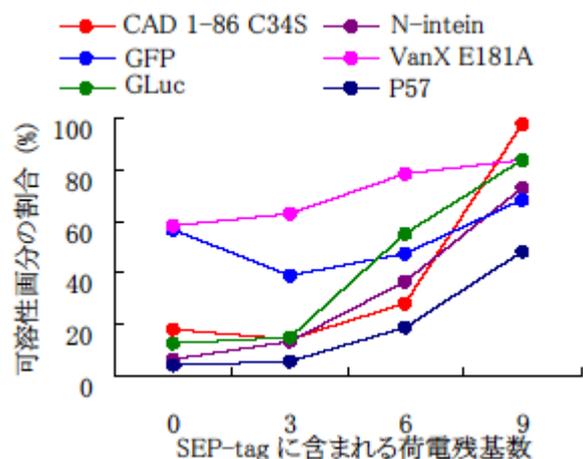


図 2. SEP-tag に含まれる荷電残基数と封入体形成の抑制

での発現が大きく抑制された。一方、GLuc にアルギニンを付加した場合には封入体形成の抑制が見られなかった。このことから、タンパク質の等電点により SEP-tag の荷電アミノ酸の種類を選択することが必要であることが示された。現に、塩基性タンパク質である CAD1-86 に対しては、アルギニンからなる SEP-tag の効果が大きかった (図 2)。

さらに、培養温度も封入体形成へ影響すると考えられている。本解析でも、培養温度 37°C では SEP-tag の付加が封入体形成を抑制しなかったタンパク質でも、培養温度を 30°C、25°C に下げると SEP-tag の付加が封入体形成を抑制し、モデルタンパク質によっては、封入体形成が完全に抑制された。我々は本結果を、37°C では熱安定性の低いタンパク質は変性しており溶解度が大きく低下しているため、SEP-tag は機能しないが、タンパク質が天然状態にある 30°C や 25°C では、SEP-tag の効果が大きかったと解釈した。

さらに、SEP-tag がモデルタンパク質の活性に与える影響を測定した (表 2)。GFP、VanX に C9D を付加した変異体の活性は、SEP-tag を付加しない組換えタンパク質のそれぞれ 68%、79% に減少した。しかし、GLuc C9D 変異体では C0D 変異体の 130% に上昇した。本研究では、SEP-tag がモデルタンパク質の活性に影響を与える可能性は最小であり、30% の変化は活性測定の実験誤差範囲内であると判断した。

表 2. SEP-tag の活性への影響

	C0D に対する活性 (%)
GFP C9D	68
VanX C9D	79
GLuc C9D	130

## 結論

数残基の荷電アミノ酸からなる SEP-tag は、分子量 6 千のタンパク質の試験管内の溶解度を劇的に向上させることが知られていた (文献 1~3)。本研究では、組換えタンパク質が菌体内で封入体を形成する最大の要因はそのタンパク質の溶解度が低いことにあるという仮説に基づき、SEP-tag が封入体形成に与える影響を調べた。その結果、分子量および等電点の異なる 6 種類のタンパク質の C 末端に SEP-tag を付加し、タンパク質の溶解度を向上させることで封入体形成が抑制された。今回用いたモデルタンパク質には複数の SS 結合を含む GLuc や分子量が 6 万近い P57 タンパク質も含まれているが、すべてのタンパク質で SEP-tag の封入体防止効果が見られた。また、活性への影響は 30% 以下で、異なるサンプルを取り扱った際の実験誤差範囲内と判断した。

本研究において、①SEP-tag に含まれるアミノ酸をタンパク質の等電点によって選ぶことが必要であること、②SEP-tag が組換えタンパク質の活性に大きな影響を与えない、汎用性の高い新たな封入体形成防止法 (特許出願中、文献 3) となることが複数のタンパク質で系統的に示せたことは重要な研究成果であると考えられる。

## 文献

1. A. Kato, K. Maki, T. Ebina, K. Kuwajima, K. Soda, and Y. Kuroda, Mutational analysis of protein solubility enhancement using short peptide tags, *Biopolymers*, 85:12-18 (2007)

2. 加藤淳、泉川直重、黒田裕、タンパク質溶解性向上技術 ～SEP-tag について～、生物物理、48 : 185-189、(2008)
3. 特願 : 2007-303780 加藤淳、惣谷志保里、泉川直重、黒田裕 : ペプチドの溶解度計算方法、及びそれを用いたペプチドタグの設計方法とタンパク質の合成方法、平成19年(2007)11月22日出願、特許出願人 : 国立大学法人東京農工大学
4. T. Rathnayaka, M. Tawa, S. Sohya, M. Yohda, and Y. Kuroda, Biophysical characterization of highly active recombinant *Gaussia luciferase* expressed in *Escherichia coli.*, *Biochim Biophys Acta*, 1804:1902-1907 (2010)
5. T. Kamioka, M. Tawa, S. Sohya, T. Yamazaki, and Y. Kuroda, Improved protein splicing reaction for low solubility protein fragments without insertion of native extein residues (NERs), *Biopolymers (Peptide Science)*, 92:465-470 (2009)
6. M. M. Islam, S. Sohya, K. Noguchi, S. Kidokoro, M. Yohda, and Y. Kuroda, Thermodynamic and structural analysis of highly stabilized BPTIs by single and double mutations, *PROTEINS*, 77:962-970 (2009)
7. M. M. Islam, S. Sohya, K. Noguchi, M. Yohda, and Y. Kuroda, Crystal structure of an extensively simplified variant of bovine pancreatic trypsin inhibitor in which over one-third of the residues are alanines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:15334-15339 (2008)
8. Y. Kuroda, and P. S. Kim, Folding of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) variants in which almost half the residues are alanine, *J. Mol. Biol.*, 298, 493-501 (2000)