

L0021-16	短い溶解度向上ペプチドタグ (SEP-tag) による封入体形成防止法				
	氏名	石原謙一郎	主査	黒田	副査

[背景・目的]

大腸菌はタンパク質収量の多さ、価格の安さから組換えタンパク質発現の宿主としてよく用いられているが、封入体と呼ばれる不活性な凝集体を形成してしまうことが多く、問題とされている。この問題への主な対処法としては、変性剤を用いて封入体の巻き戻しを行う手法、融合タンパク質の付加により封入体形成を防止とする手法が用いられている。しかし、巻き戻しには実験条件の検討に時間を要する、汎用性が低い、タンパク質の再凝集により効率が低下するなどの問題がある。また、融合タンパク質はその大きさゆえに切断する必要がある、目的タンパク質との相互作用により構造や機能に影響を与えるなどの問題点が存在する。そのため、このような問題点を克服した封入体形成防止法の開発が望まれている。

我々はタンパク質の溶解度が封入体形成と深く関係すると考え、現在までの研究で開発した短い溶解度向上ペプチドタグ (SEP-tag) を、封入体形成の防止へ応用できるか試みた。SEP-tag とはグリシンをリンカーとした数個の荷電アミノ酸で構成されたペプチドタグで、荷電アミノ酸の増加につれて目的タンパク質の溶解度を指数的に向上させることが確認されている。その効果は、分子間の静電的反発により凝集を阻害するためだと考えられている。

[研究方法]

6種類のモデルタンパク質、CAD 1-86C 34S (10.0kDa)、N-intein (14.4kDa)、GFP (27.2kDa)、VanX E181A (23.6kDa)、GLuc (18.6kDa)、plu1218 (56.7kDa) 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成した。荷電アミノ酸の種類はタンパク質の等電点により決定し、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た。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、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 SDS-PAGE および画像処理ソフトウェアにより解析した。また、GFP、VanX、GLuc に関しては、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) の活性を測定した。

[結果・考察]

SDS-PAGE の結果から、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高いことが示された (Figure1)。アスパラギン酸を含む SEP-tag の場合、アスパラギン酸の分子量とモデルタンパク質の分子量の比が約20%以下となるような場合、培養温度 37°C で高い封入体形成の抑制効果を発揮した。約 20~30% の場合では、培養温度 30°C で効果を発揮した。また、酸性タンパク質にアルギニンを付加した場合には十分に封入体形成を抑制しなかった。これらの結果から、SEP-tag を使用する場合、タンパク質の等電点により荷電アミノ酸の種類を選択し、タンパク質の分子量に応じて荷電アミノ酸の残基数を変更することが必要だと考えられる。また、培養温度も封入体形成への影響を考える上で重要な因子であり、培養温度 37°C で封入体形成を抑制しなかった変異体も、培養温度を 30、25°C に低下させると封入体形成を防止し、モデルタンパク質によっては、封入体形成を完全に防止した。

さらに、SEP-tag が目的タンパク質の活性に与える影響を測定した (Table1)。GFP、VanX の場合、C9D 変異体の活性は、C0D 変異体のそれぞれ 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。これは、SEP-tag がモデルタンパク質の活性に影響を与えているものの、活性を大きく損なっていないことも示している。

以上の結果より、タンパク質の溶解度の向上は封入体形成を防止する上で有効な手法であり、SEP-tag は組換えタンパク質の活性に大きな影響を与えずに、汎用性の高い新たな封入体形成防止法となることが示唆された。

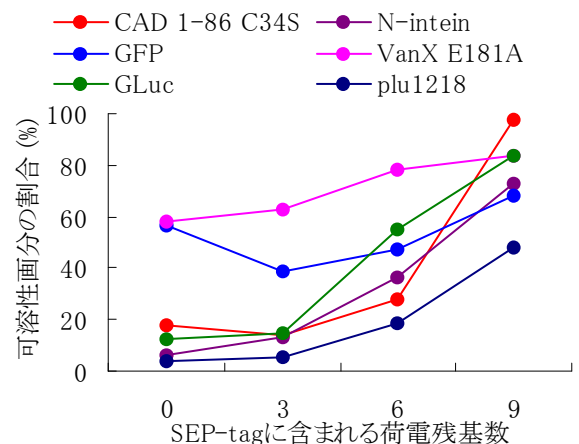


Figure1 SEP-tagによる封入体形成の抑制

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

Table1 SEP-tagが活性に与える影響