

短いペプチド系溶解度向上タグが封入体形成に与える影響の解析		
黒田研究室	学籍番号：04251062	細岡 亜沙実

【背景・目的】

組換えタンパク質は医療、工業あるいは研究など幅広い分野で使用されている。組換えタンパク質の多くは大腸菌での大量発現系で生産されているが、不活性な封入体を形成することが多い。封入体を形成した組換えタンパク質は活性な状態への巻き戻しが必要である一方、巻き戻し条件や過程の煩雑性などから収率が極めて低い場合が多いため、簡便で汎用性の高い封入体防止法が望まれている。封入体形成は目的タンパク質の溶解限界濃度（以下、溶解度）に大きく左右されるとの知見に基づき、飛躍的な溶解度向上を示した短いペプチド系タグが封入体形成防止タグとして応用できると考えた。そこで本研究では短いペプチド系溶解度向上タグが封入体形成に与える影響の解析を目的とする。

【方法】

モデルタンパク質には 37°C 培養で封入体を形成し、かつ分子量や等電点の異なる 4 種類、CAD (1-86) C34S (MW: 9995.5, pI: 9.77), N-intein (MW: 14388.2, pI: 4.36), GFP (MW: 27156.5, pI: 5.8), VanX E181A (MW: 23611.5, pI: 5.76), を対象とした。タグの種類はタンパク質の等電点によって決定し、塩基性タンパク質 (CAD) にはアルギニン (R) から成るタグを、酸性タンパク質 (N-intein, GFP, VanX E181A) にはアスパラギン酸 (D) から成るタグを各モデルタンパク質の C 末端側に付加した。

野生型 (タグ付加なし; 0) および長さがそれぞれ 3, 6, 9 残基のタグを付加した変異体を BL21 (DE3) pLysS で発現させ、目的タンパク質の全発現量に対する上清画分と沈殿画分 (封入体) の割合を SDS-PAGE および Image J (バンド強度解析ソフトウェア) で解析した。

【結果・考察】

SDS-PAGE の結果から短いペプチド系溶解度向上タグが封入体形成に影響を与えることが分かった (Fig. 1A)。モデルタンパク質には 8 割程度封入体を形成するタイプ (CAD, N-intein) と 4 割程度封入体を形成するタイプ (GFP, VanX) があつた。いずれの場合もタグを付加することで封入体の形成が約 1~2 割程度になることから (Fig. 1B)、封入体を形成する傾向が高いタンパク質ほどタグ付加による封入体防止効果が高いことが分かった。特に、1) タグの長さ、2) 培養温度、が封入体形成への影響を考える上で重要な因子である事を明らかにし、タグの長さは長い方が良く、培養温度は低い方が良いとの傾向を示した。最適な組み合わせ (CAD; 25°C 培養, C9R) では、封入体形成の割合が約 67% 減少した (Fig. 1B)。本研究結果から封入体形成はタンパク質の溶解度を向上させることで防止できることを明らかにし、当研究室でこれまで研究してきた短いペプチド系溶解度向上タグが封入体形成防止タグとして応用できることを示した。

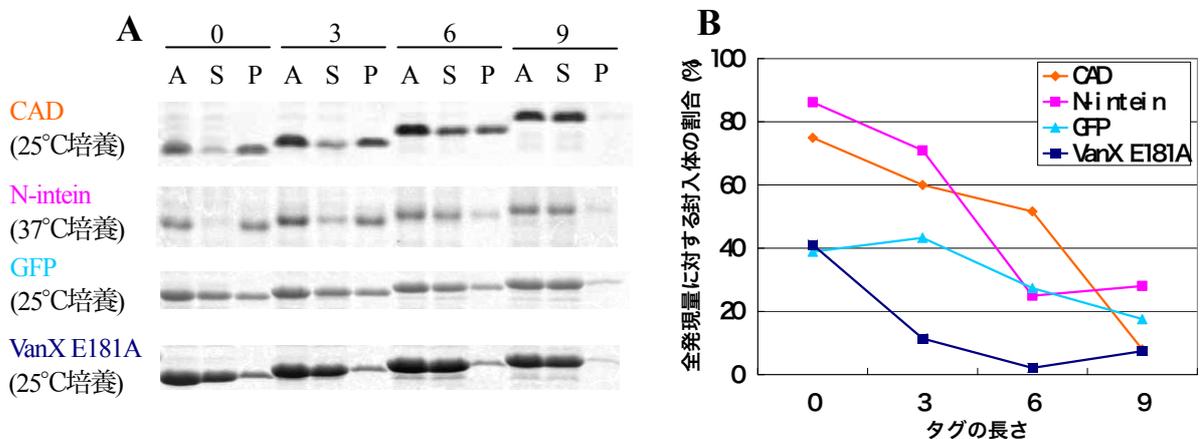


Figure 1 短いペプチド系溶解度向上タグが封入体形成に与える影響

A: SDS-PAGE による解析 0, 3, 6, 9 はタグの長さを示す, A; 全菌体, S; 上清画分, P; 沈殿画分 (封入体)
 B: A の図を Image J でバンド強度を定量化したグラフ