

共発現を利用した不溶性顆粒発現法の 抗菌ペプチド立体構造解析への応用

(北海道大学・大学院理学院¹、
北海道大学・大学院先端生命科学研究院²、
北海道大学・大学院理学研究院³)
○相沢智康^{1,2}、北條江里¹、梅津喜崇¹、
神谷昌克²、熊木康裕³、出村誠²、河野敬一^{1,3}

NMR structural analysis of antimicrobial peptides produced by aggregation-prone protein coexpression method

¹Grad. Sch. of Sci., Hokkaido Univ., ²Fac. of Advanced Life Sci., Hokkaido Univ., ³Fac. of Sci., Hokkaido Univ.

Tomoyasu Aizawa^{1,2}, Eri Hojo¹, Yoshitaka Umetsu¹, Masakatsu Kamiya², Yasuhiro Kumaki³, Makoto Demura², Keiichi Kawano^{1,3}

We demonstrated that coexpression of the aggregation-prone protein remarkably enhanced the target peptide's expression level. It seems that overexpression of the partner protein protects the target peptide from proteolytic degradation by forming insoluble inclusion bodies, thus accounting for the higher observed yields. Antimicrobial factor (ABF), one of our targets, is a small antimicrobial peptide consisting of 67 residues stabilized with four intramolecular disulfide bridges derived from the nematode *C. elegans*. In the case of overexpression in *E. coli* by using vector without partner protein, ABF was hard to synthesize even in insoluble form, probably because of proteolysis. In the case of coexpression of ABF and a positively charged partner protein, the amount of expressed ABF was significantly reduced although the partner protein was clearly overexpressed as an inclusion body.

【序論】

抗菌ペプチドは一般には比較的残基数が少ないため、化学合成を用いた試料調整が一般的である。しかしながら、NMR法を用いた立体構造解析や相互作用解析に有用である安定同位体ラベル化などのために、微生物を用いた調整が望まれる場合も少なくない。この場合、抗菌ペプチドの毒性や分解の回避のために、不溶性顆粒としての発現がしばしば選択され、自発的な不溶性顆粒形成が期待出来ないケースでは、不溶性の高い蛋白質との融合蛋白質として発現する方法などが用いられている。我々は目

<キーワード> 大腸菌、共発現、不溶性顆粒、抗菌ペプチド

あいざわ ともやす、ほうじょう えり、うめつ よしたか、かみや まさかつ、
くまき やすひろ、でむら まこと、かわの けいいち

的蛋白質を不溶性顆粒として安定かつ大量に発現させる新しい方法として、不溶性顆粒形成能の高い蛋白質との共発現系が有用であることを見出し、検討を重ねている。この手法の改良と、安定同位体ラベル化試料の効率的な調整に成功し立体構造解析を進めている抗菌ペプチドの研究例について報告する。

【実験】

単独では不溶性顆粒形成が困難で、発現量が極めて少ない線虫 *C. elegans* 由来抗菌ペプチド ABF-2 (antibacterial factor-2, Mw. = 6999) と不溶性顆粒形成能が極めて高いことが知られる数種のリゾチームスーパーファミリーに属する蛋白質との共発現系を構築し、大腸菌内での発現の検討を行った。回収した不溶性顆粒は変性剤による可溶化の後、イオン交換クロマトグラフィによって共発現蛋白質および夾雑物を分離し、透析法による巻き戻しを行った。巻き戻しが完了したサンプルを逆相 HPLC により精製し、正しいジスルフィド結合を持った ABF-2 を得た。安定同位体を含む培地を用いることで、 ^{15}N および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識 ABF-2 の調製をおこない、NMR 法による帰属及び立体構造解析を進めた。

【結果・考察】

ABF-2 は単独の発現系ではわずかにしか発現が認められなかったが、不溶性顆粒形成能を有する蛋白質との共発現を行うことで、不溶性顆粒化に成功し大量の発現が確認された。興味深いことに、高い不溶性顆粒形成能を有するリゾチームスーパーファミリー内の蛋白質間においても、共発現による ABF-2 の不溶性顆粒化促進の度合いに違いが見られた。特に不溶性顆粒を形成する蛋白質の等電点が、目的ペプチドの不溶性顆粒化に大きく関係すると考えられ、高い塩基性の ABF-2 の不溶性顆粒化には、低い等電点を持つ共発現蛋白質が極めて有効であった。

NMR 法による解析の結果、ABF-2 は他の線虫由来抗菌ペプチドと同様に、N 末端はジスルフィド結合により安定化された $\text{CS}\alpha\beta$ モチーフを有していたが、C 末端側には構造の収束しない領域があることが明らかになった。活性の調節に関与すると予想されるこの領域は、特にプロテアーゼの分解を受けやすいことが予想されるため、共発現系を用いた試料調整法は極めて有効であると考えられる。

【謝辞】本研究の一部は、新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業の補助を受けて行われた。

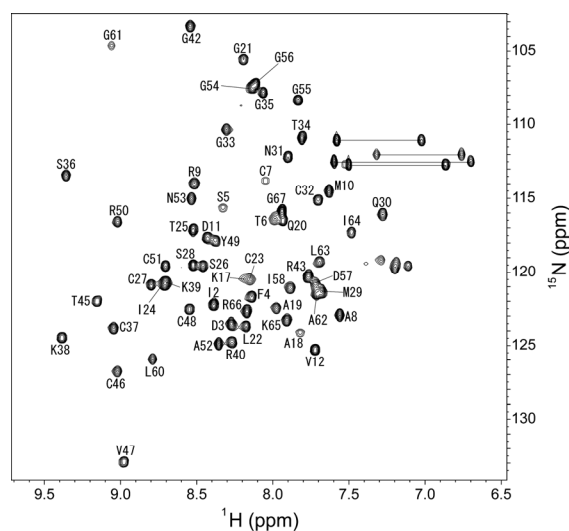


Fig. 1 ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of ABF-2.