HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the overexpression of antimicrobial peptides in E. coli [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	冨澤, 聡
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12009号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59933
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Satoshi_Tomisawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　　氏　名　　冨澤　聡

学 位 論 文 題 名

Studies on the overexpression of antimicrobial peptides in *E. coli*
（大腸菌を用いた抗菌ペプチドの大量生産に関する研究）

抗菌ペプチドは、多くの生物が有する自然免疫を担う分子である。わずか数個のアミノ酸から成るものから、数十個のアミノ酸から成るものまで存在し、分子内の塩基性アミノ酸の割合が高く、生理的条件下で正電荷を帯びるものが多い。このため、負に帯電した細菌の細胞膜を選択的に認識する。抗菌ペプチドは、主に微生物の細胞膜を破壊することで抗菌活性を発揮すると考えられている。多くの抗菌ペプチドは幅広い抗菌スペクトラムを有し、グラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌等に対し活性を示す。

抗菌ペプチドの機能解析や立体構造解析には多量の試料を必要とする。しかし、分子量が小さく、宿主由来のプロテアーゼによる分解を受けやすい抗菌ペプチドは、遺伝子組換えによる大量発現には適さず、十分な収量が得られないものも数多く存在する。また、抗菌ペプチドの抗菌活性のため、宿主に対して毒性を示す場合もあり、その安定な生産は、極めて困難である。ターゲットとする抗菌ペプチドを不活性な封入体(インクルージョンボディー)として発現させる方法は、分解と毒性の抑制に効果的であるが、ペプチドの封入体形成を効率よく制御することは必ずしも容易ではない。

そこで本研究では、ターゲットとする抗菌ペプチドをより確実に封入体として得るために、大腸菌を宿主に用い、共発現を利用した発現系の開発を進めた。この発現系では、ターゲットとする抗菌ペプチドの他に、封入体形成能の高いタンパク質(パートナータンパク質)を共発現させている。これにより、ターゲットの封入体の形成が促進され、著しい発現量の向上が期待できる。

ABF-2 (antibacterial factor-2)は、線虫 *Caenorhabditis elegans* 由来の抗菌ペプチドである。既存の酵母を宿主とした発現系では、ABF-2 の大量生産が困難なため、これまでの ABF-2 研究は野生型の抗菌活性測定に留まっていた。そこで、第一章では、大腸菌を宿主として用い、パートナータンパク質との共発現による ABF-2 の大量発現法の開発を行った。パートナータンパク質の電荷が ABF-2 の封入体形成に与える影響を検討するため、パートナーとして電荷の異なる相同性の高い 4 種類のタンパク質を選択し、詳細な比較を行った。これらのタンパク質は、類似した立体構造を形成し、分子量も

同程度であるが、等電点のみが異なる。その結果、正電荷を有する ABF-2 の発現量は、負電荷を有するパートナータンパク質によって最も効果的に増強されることが明らかになった。また、封入体中に含まれる ABF-2 は、そのままの状態では精製できないため、高濃度の変性剤を用いて ABF-2 を含む封入体を可溶化し、変性条件下での精製を行う必要があるが、この過程もイオン交換クロマトグラフィーにより効率的に進められることが明らかになった。その後、透析により変性剤を除去し、効率よく活性型の ABF-2 をリフォールディングさせることができた。また、本発現系を用いて、NMR 解析に有用な安定同位体ラベルされた ABF-2 の調製にも成功した。ラベル化 ABF-2 を用いた NMR 測定では、分離の良い良好なスペクトルを得ることができた。最終精製後の ABF-2 の収量は、既存の酵母の発現系の収量を大きく上回った。

第二章では、マウス由来の抗菌ペプチドである cryptdin-4（Crp4）をターゲットとし、パートナータンパク質との共発現を利用した大量発現法の確立を目指した各種検討を行った。Crp4 においてもパートナータンパク質との共発現により、明確な発現量の増強が確認された。また、Crp4 は、分子内に 3 組のジスルフィド結合を有する抗菌ペプチドである。一般的にジスルフィド結合を有するペプチドは、変性剤を除去する過程で、ジスルフィド結合の形成を含むリフォールディングをさせる必要があるが、Crp4 は適切な濃度の変性剤存在下で効率よくジスルフィド結合の形成が可能であるという性質を有する。そこでこの性質を利用し、封入体可溶化時に直接 Crp4 のリフォールディングをおこなう手法を試みた。その結果、封入体可溶化時にリフォールディングさせることで、従来のリフォールディング法よりも高収率で正しい立体構造を有する Crp4 を得ることに成功した。

第三章では、Western blotting 法において、抗菌ペプチド等の低分子ペプチドの高感度検出に吸引式反応システムが有効であることを証明した。Western blotting 法は、タンパク質やペプチドの定量や検出に有効な手法である。しかし、従来のメンブレンを振とうさせる方法では、抗菌ペプチドのような低分子ペプチドは、高分子量のタンパク質と比べてメンブレンから剥離しやすく、高感度検出は困難であった。この問題を解決するために様々な手法が開発されているが、低分子ペプチドのメンブレンからの剥離を防ぐことは容易ではない。吸引式反応システムを用いてペプチドの検出を行った結果と従来法を用いた結果を比較したところ、振とうによりペプチドのメンブレンからの剥離が促進されることを示唆する結果が得られた。また、Western blotting 法において検出用の抗体等のメンブレンへの非特異的吸着を防ぐために加えられる 界面活性剤 Tween20 の有無がペプチドのメンブレンからの剥離に与える影響を検討したところ、Tween20 によってペプチドの剥離が促進されることも明らかになった。

本研究により得られた抗菌ペプチドの大量生産と検出に関する知見は、他の抗菌ペプチドへの応用が可能であり、抗菌ペプチド研究を推進する基盤となり得る。