



# N-terminal SKIK peptide tag markedly improves expression of difficult-to-express proteins in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*

N末端SKIKペプチドタグは大腸菌および酵母における難発現タンパク質の発現量を増大する

(JBB, Vol. 123, No. 5, 540–546, 2017)

加藤 晃代<sup>1,2,3\*</sup>・永井 里美<sup>1,2,3</sup>・中野 秀雄<sup>1,2</sup>

「タンパク質が全然発現しない……。条件検討とか無数すぎてやりたくない。」この面倒くさがりが本研究のモチベーションである。

筆者らは、動物由来のモノクローナル抗体を迅速に探索・評価できる技術開発を行ってきた。本技術では、末梢血から得られるB細胞を材料として、不死化工程を経ずに一細胞由来の逆転写反応とPCRで抗体遺伝子を増幅し、PCR産物を鋳型とした「大腸菌無細胞タンパク質合成系」により抗体生産を行い評価する。そして、良い抗体クローンを大腸菌で生産してしまおう、という戦略を立てていた。ところが、この話は簡単そうに見えてまったくそうではなかった。そもそも、抗体遺伝子を取得できても、モノによってまったく発現しない場合があり、抗体性能を正しく評価できないのである。無論、良い抗体クローンを選べなければ、その後大腸菌で大量生産することもできない。

一般的に、真核生物由来の遺伝子は、原核の翻訳システムで発現困難である場合が多いといわれている。その原因として、レアコドンの存在やmRNAの二次構造などの可能性が考えられているが未だ明確ではない。そのため、目的タンパク質の発現量が少ない場合は、コドン最適化、他のタンパク質との融合発現、培養条件や培地の最適化、シャペロン因子との共発現などの検討を行い、少しでも発現量を上げるための条件を見つけていかなければならない。

しかし、個人的には、無数の条件を闇雲に検討する羽目になるのは面倒くさがりすぎて絶対に嫌だった。そんな状況の中、簡単かつ画期的な方法を求めて論文検索を始め

ると、大腸菌発現系で開始Metに続く2番目のアミノ酸がタンパク質の発現量に重要だという論文を見つけた<sup>1)</sup>。その論文には大腸菌で高発現なタンパク質のN末端アミノ酸配列の傾向にも言及していた。そこからヒントを得て、Ser-Lys-Ile-Lys (SKIK) の4アミノ酸からなるペプチドコード配列を難発現抗体遺伝子のN末端に挿入してみようと考えた。すぐにプライマーを設計し翌々日ぐらいにはSKIK付加の変異体を作って大腸菌の系で発現させてみた。すると、もともとSDS-PAGEでバンドの見えなかったものが、メインバンドとして現れるぐらい発現量が増え、非常に驚いたことを昨日のここのように鮮明に覚えている。手元にあった抗体遺伝子以外にも試してみると、それらにも効果があったため、難発現タンパク質の発現量を簡単に増大するための一つの手段として、N末端SKIKペプチドタグは有用なのではなかろうかと考えた<sup>2)</sup>。さらに、試しにやってみた酵母でも発現量が数倍増えたときは鳥肌がたった。蔵の中でお宝でも見つけたような気分であった(我が家には蔵などないが)。

これまでに、SKIKペプチドタグを付加することによりmRNAあたりの翻訳効率が100倍以上向上し、タンパク質生産量増大に寄与しているとの結果が得られているが、なぜ翻訳効率がそれほど向上するのかはわかっていない。今後、機構解析を進め、タンパク質を微生物などにより、安価・簡単・大量に生産するための技術開発に少しでも貢献できればと考えている。

- 1) Bivona, L. *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, **74**, 248 (2010).
- 2) Ojima-Kato, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 540 (2017).

\* 著者紹介 iBody株式会社 (代表取締役) E-mail: kato.teruyo@ibody.co.jp

<sup>1</sup>iBody株式会社, <sup>2</sup>名古屋大学大学院生命農学研究科応用生命科学専攻, <sup>3</sup>知の拠点あいち