

原著論文

マラリア小胞体局在性カルシウム結合タンパク質の 大腸菌を用いた高発現とその特性解析

平岡修^{1)*}, 高島康秀³⁾, 坂本沙祐里¹⁾, 杉山成²⁾, 森田将之³⁾, 綿矢有佑³⁾, 金恵淑³⁾

¹⁾ 就実大学薬学部生体分子化学研究室, ²⁾ 大阪大学大学院工学研究科,

³⁾ 岡山大学大学院医歯薬総合研究科

Functional expression and characterization of EF-hand endoplasmic reticulum-resident calcium-binding protein, PfERC from *Plasmodium falciparum* in *Escherichia coli* for crystallization

Osamu Hiraoka^{1)*}, Yasuhide Takashima³⁾, Sayuri Sakamoto¹⁾, Shigeru Sugiyama²⁾,
Masayuki Morita³⁾, Yusuke Wataya³⁾, Hye-Sook Kim³⁾

1) Department of Biomolecular Chemistry, School of Pharmacy, Shujitsu University

2) Graduate School of Engineering, Osaka University

3) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University

(Received 4 December 2013; accepted 14 December 2013)

Abstract

We previously reported the *in vitro* and *in vivo* antimalarial potencies of 1,2,6,7-tetraoxaspiro [7.11]nonadecane (N-89) and 6-(1,2,6,7-tetra-oxaspiro[7.11]nonadec-4-yl)-hexan-1-ol (N-251) bearing endoperoxide structure such as a current first-line antimalarial agent, artemisinin, and also, was identified the EF-hand endoplasmic reticulum-resident Ca²⁺ binding protein, PfERC from *Plasmodium falciparum* as a cellular target protein of N-89 and N-251. In this paper, we described the expression of the PfERC from *Plasmodium falciparum* which was secreted as a maltose-binding protein fusion into the *Escherichia coli* periplasm using an autoinduction recombinant protein expression system. The PfERC was prepared from the fusion protein by restriction protease Factor Xa digestion and purified to homogeneity in milligram quantities using a series of steps involving cation exchange and gel filtration chromatographies. The purified PfERC specifically bound Ca²⁺, with an apparent dissociation constant (K_d) of 50 x 10⁻⁶ M, and also, specifically bound N-89 was confirmed by surface plasmon resonance system. It has been expected that the PfERC expression and purification protocol developed in this study allows for X-ray crystallography, biochemical and biophysical studies, and will aid in the elucidation of the molecular mechanisms.

Key word : recombinant protein expression, *E.coli*, antimalarial agent, PfERC, X-ray crystallography

【緒言】

マラリアは *Plasmodium* 属の原虫が媒介し、熱帯から亜熱帯地域を中心に流行している世界最大の原虫感染症であり、人類にとって大変な脅威となっている。2010年のWHOの報告によると、2009年には2億2500万人以上の人々が感染し78万人が死に至っている。現在、マラリア感染症に対してWHOが推奨している治療薬として、アルテミシニン (Fig.1) を基本とした多剤併用療法 (artemisinin-based combination therapies : ACT) が第一選択として用いられている¹⁾。アルテミシニンは、1979年に中国古来の青蒿 (*Artemisia annua*) から単離された環状過酸化構造を有するユニークな構造をもち、従来からの既存薬 (クロロキン、ネフロキン) に対する耐性株の出現により、現時点でのマラリア治療における最後の砦と言われている^{2) 4)} (Fig.1)。しかしながら、近年、タイ・カンボジア国境付近でアルテミシニンの耐性株の出現が報告され、一刻も早い新薬の開発が急務となっている。そこで我々は、そのユニークな環状過酸化構造に着目し、この構造を有する約500種類の化合物を合成し、抗マラリア活性をスクリーニングしたところ³⁾、*in vitro* で哺乳動物細胞と比較して328倍の選択毒性を示し、また *in vivo* においても数 mg/kg で優れた抗マラリア活性を示す1,2,6,7-tetraoxaspiro[7.11]-nonadecane (N-89, Fig.1)⁵⁾ およびその誘導体である6-(1,2,6,7-tetra-oxaspiro[7.11]nonadec-4-yl)-hexan-1-ol (N-251)⁶⁾ を見出すことに成功した。さらに、その作用機序を解明する目的で、アズラクトン (Azlactone) カラムに固定するために側鎖にリジ

ン残基を有するN-89誘導体 (N-346) を固定化したカラムを用いて、マラリア細胞抽出液中のN-89標的タンパク質であるPfERC (*Plasmodium falciparum* endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein : 小胞体局在性カルシウム結合タンパク質) を同定してすでに報告した⁷⁾。PfERCは、6つのEF-handドメインと、N末端に小胞体分泌シグナルおよびC末端に小胞体局在化シグナル (IDEL) を有する343アミノ酸からなる小胞体局在性カルシウム結合タンパク質であり⁸⁾、CREC (Cab45, Reticulocalbin, ERC-55, Calumenin) タンパク質ファミリーに属することが知られている⁹⁾。CRECタンパク質ファミリーの細胞内での機能については未だ不明な点が多いが¹⁰⁾ (Fig.2)、PfERCと同様に2~8個のEF-handドメインとC末端に小胞体局在化シグナルを有すること、そして小胞体内でのCa²⁺制御への関与および細胞の生存に必須であることが報告されている⁹⁾。これらの知見は、PfERCの機能がCRECタンパク質ファミリー様であり、そして細胞の生育に必須であると推測され、PfERCが、抗マラリア薬探索に対するユニークな新規標的になることを想像させる。実際に、マラリア原虫にN-89を投与すると、PfERCが減少し、さらに、PfERCを高発現させた遺伝子組換え原虫に対しては、N-89の感受性が低下することが確認された⁷⁾。また、N-89は、既存のquinoline 骨格を基本としたクロロキンやメフロキン耐性株にも有効性を示すことから、PfERCが抗マラリア薬探索のための新しい独創的な標的になることが期待される。

そこで、今回、我々は、PfERCの X 線結晶構造解析を行い、新規抗マラリア薬の *in silico* デザインおよび構造生物学的な視点からのPfERCの生物学的な機能の解明を行う目的で、PfERCの大腸菌を用いた高発現および特性解析を試みたのでここに報告する。

【方法】

発現プラスミドの構築

大腸菌を用いたPfERCの高発現には、pMALTM Protein Fusion and Purification System (New England Biolabs) を使用した。熱帯熱マラリア原虫FCR-3株のゲノムDNAからPCR法によりアミノ末端のシグナル配列を除去したΔPfERC部分(アミノ酸番号: 27-343) を制限酵素, *Sma*I 認識配列および Gly²⁷ (コドンGGG) から始まる 5'- sense primer (5'-GTCCCCGGGGATAACATGAAATACAATGA-3') および Ile³⁴⁰, Asp³⁴¹, Glu³⁴², Leu³⁴³, 終止コドン TAA, そして制限酵素, *Xho*I 認識配列を含む3'- antisense primer (5'- CGCTCGAGCTATAATTCATC AATTGCTG - 3')を用いて増幅させた。そのDNAを、マルトース結合タンパク質 (MBP:*malE*) との融合タンパク質としてペリプラズム画分に分泌発現させ、制限プロテアーゼ, Factor XaによりMBPを切断除去できるよう設計されたベクター, pMALpプラスミドDNAの*Sma*I および*Xho*I 部位に組み込み、発現ベクターpMALp-ΔPfERCを作製した (Fig.2)。

培養および発現条件

マラリアなどのAT-richなゲノム中のレアコドン認識できるtRNAを導入した大腸菌,

BL-21-CodonPlusTM (DE3)-RIL cells (*E.coli* B F *ompT hsdS* (r_B⁻ m_B) *dcm*⁺ *Tet*^r *galλ*(DE3) *endA Hte* [*argU ileY leuW Cam*^r]) (Stratagene)に、構築した発現プラスミド, pMALp-ΔPfERCを形質転換し, *lac* オペロンを利用したオートインダクション用高密度培養用培地, MagicMediaTM (Invitrogen)中で, O.D.₆₀₀ が 6.0以上になるまで30 °Cで培養した。その後, 培養温度を15 °Cに低下させて42時間培養後, 浸透圧ショック法によりペリプラズム画分を回収した。

組換えタンパク質の精製

回収したペリプラズム画分を終濃度が 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.15 M NaClとなるように調製し, EDTA-free protease inhibitors cocktail (Roche Applied Science) および0.15 M NaCl, 1 mM CaCl₂を含む 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 緩衝液で平衡化した Amyrose Resin High Flow (New England Biolabs)カラムに添加してアフィニティークロマトグラフィーを行った。得られた融合タンパク質を16 °Cで48時間, 制限プロテアーゼ, Factor Xaにより消化してMBPタグを除去したのち, 1 mM CaCl₂を含む20 mM Tris-HCl, pH 8.0緩衝液で平衡化したUNOTM Q6 陰イオン交換カラム (12 mm ID x 53 mm L; BIO-RAD) に添加して0-0.3 M NaClの濃度勾配で溶出させた。さらに, 0.15 M NaCl および 1 mM CaCl₂を含む20 mM Tris-HCl, pH 8.0 緩衝液で平衡化したSuperdexTM 200 10/30 GL(10 mm ID x 300 mm L; GE Healthcare)カラムでゲルろ過クロマトグラフィーを行い, ほぼ単一になるまで精製した。

動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering:DLS)

による粒径分布評価

4 mg/mLの濃度でPBSに溶解した Δ PfERC溶液を12 μ Lフローセルに入れ, ソフトウェア, Dynamics V5で制御されたDynaPro-MSTS型 (ProteinSolutions)を用いて出力25 W, 780 nmのレーザー光を3 秒間/回で20回照射し, 多分散度 (Polydispersity:Pd)を測定した¹¹⁾¹²⁾¹³⁾.

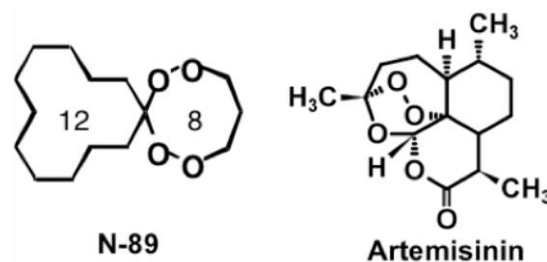


Fig. 1 N-89およびアルテミシニンの構造

表面プラズモン共鳴法による Δ PfERC に対する

Ca²⁺およびN-89結合活性の測定

表面プラズモン共鳴法により分子間相互作用を検出する装置, Biacore T-100 (GE Healthcare Life sciences)を用いて, Δ PfERCとN-89およびCa²⁺との相互作用を調べた。濃度20 μ g/mLの精製 Δ PfERC 30 μ LをSeries S Sensor chip CM5 に固定化した。Ca²⁺結合能の測定については, analyteとしてCaCl₂を終濃度3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μ Mとなるように 20 mM PIPES, pH6.0, 150 mM NaClに溶解し, また, N-89結合能の測定については, N-89を終濃度6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ Mとなるように20 mM PIPES, pH 6.0, 150 mM NaCl, 5% DMSO, 0.1% Tween20に溶解したのちに, どちらの場合も温度 25 $^{\circ}$ C, 流速 30 μ L/minで測定を行った。

【結果】

SDS-PAGEにより各精製ステップにおける発現産物の精製度の状態を解析した (Fig.3)。最終ステップのUNOTM Q6 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによりほぼ単一にまで精製されたことがわかった。大腸菌1リットル培養液あた

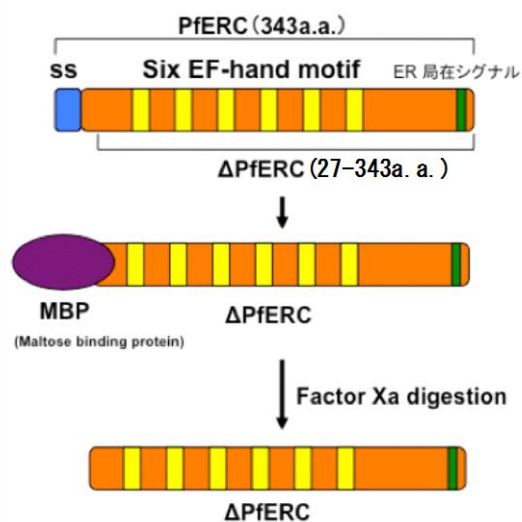


Fig. 2 PfERC の構造および発現の方法

り, 約2 mgの精製組換え Δ PfERCが得られた。

次に, ゲルろ過法により発現産物の存在状態を解析した (Fig.4)。45 KDa付近に対称形の単一なピークが観察された。さらに, このピークをNative-PAGEにより解析を行ったところ, 40-50 KDa付近の分子サイズであることが確認されたことから, 得られた発現産物は単量体として発現および精製されていることがわかった。

タンパク質の結晶化の指標の一つとして動的光散乱法: Dynamic Light Scattering (DLS) によ

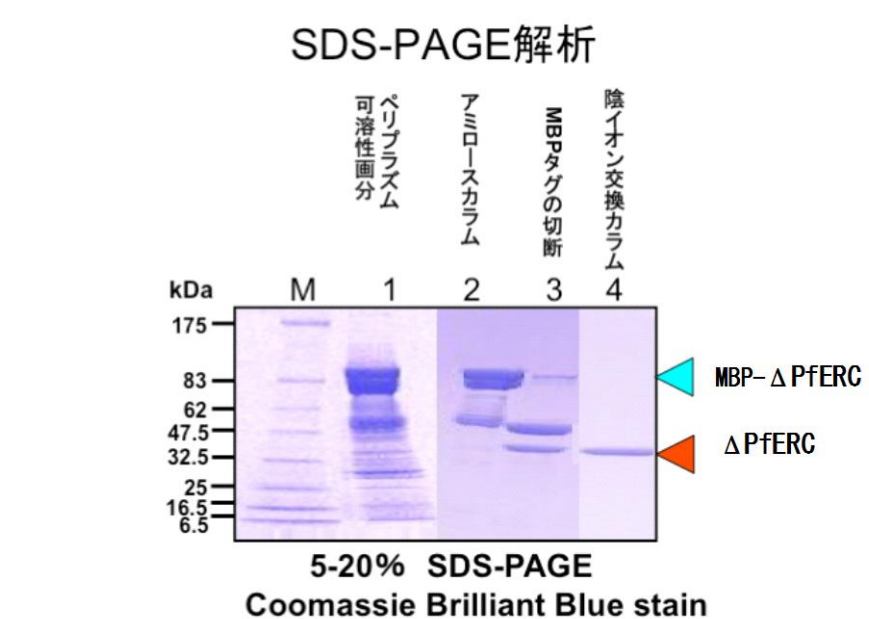


Fig. 3 SDS-PAGE解析による各精製ステップにおける純度の確認

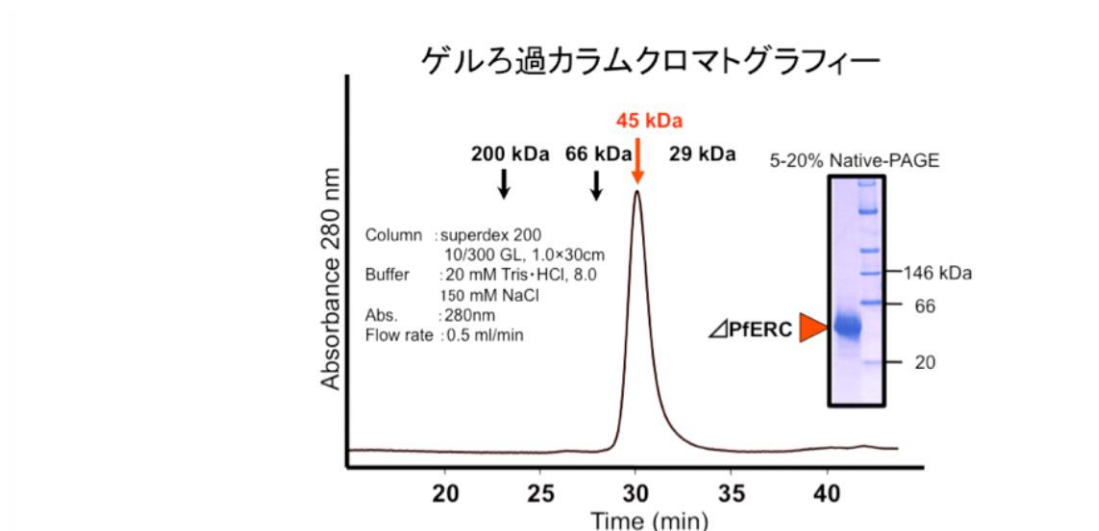
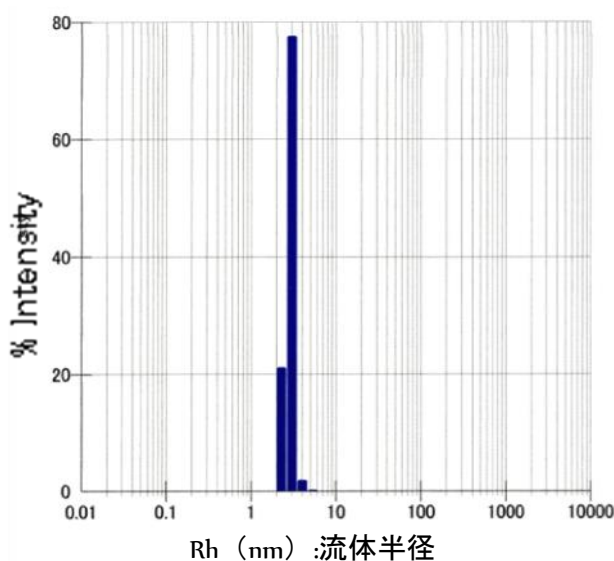


Fig. 4 Gelfiltration HPLC および Native-PAGE による発現産物の評価

る粒径分布評価がある^{11) 12)}. 得られた Δ PfERCの粒径分布を評価するために, DLSにより分散性を調べた (Fig.5). Regularization Histogramから, 粒径半径が 2 nm から 3 nm 付近にのみ鋭いシングルピークが観察され, 得られた発現産物がほぼ均一な状態の分子種として存在していることがわかった. さらにこのデータから, SVD 法

(Singular Value Decomposition)¹⁴⁾により分子の分散性を計算したところ, 平均流体半径が, 2.907 nm, 予想分子量が, 40.9 KDa, 波形の広がり具合を示す, Polydispersity : Pd 値は, 17.5 %であった(Monomodal Histogram). Pd = 17.5 %は, この波形が1種類のピークのみからなることを示し, Monomodal, すなわち, 単分散性であることを示

Regularization Histogram



Monomodal Histogram

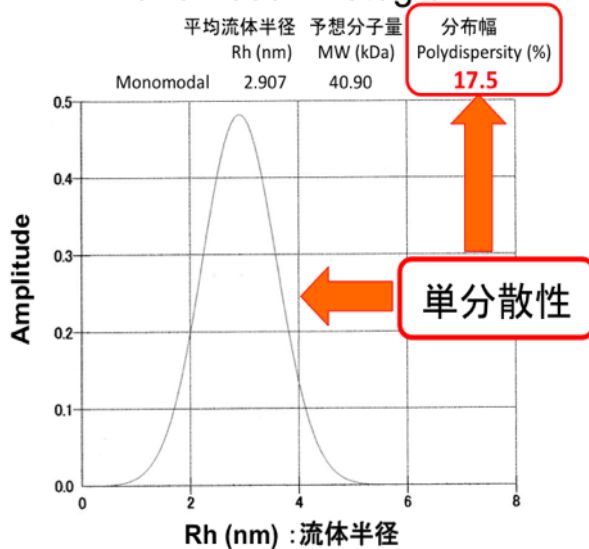


Fig. 5 動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering : DLS) による粒径分布評価

している。結晶化を開始するにあたり、この値は一つの指標となっており、今回のPd 値は、20 % 以下であることから、本試料の結晶化を開始するにあたって十分な要件を満たしていると推測される¹⁵⁾。

さらに、Biacore T-100 (表面プラズモン共鳴法) を用いてΔPfERCのCa²⁺結合活性を調べた (Fig.6)。

Ca²⁺の濃度を徐々に上げていくと、濃度依存的にレスポンスの増強が観察され、Lineweaver-Burk plot 解析により、Kd 値は、約50 μMであった。

次に、ΔPfERCのN-89結合活性を調べた (Fig.7)。この場合もN-89の濃度を徐々に上げていくと濃度依存的にレスポンスの増強が観察された。Analyteのコントロールとしてアルテミシニンを

使用した場合は、レスポンスの増強は観察されなかった。このことは、得られた発現産物が、N-89と特異的に相互作用することを示し、N-89とアルテミシニンの作用機序が異なることを示唆する結果である。したがって、近年になって出現が確認され始めたアルテミシニン系薬剤に対する耐性原虫にN-89が有効であることが期待され、N-89は、アルテミシニンに代わるマラリア制圧に貢献できる有望な抗マラリア薬になると考えられる。

【考察】

一般に、多細胞生物由来のタンパク質を単細胞生物を用いて大量発現させる際には、なるべく発現速度を低下させ、長時間にわたってゆっくりと生産させることにより良好な結果が得られる場合が多い。この観点から、今回、我々は、発現誘導を徐々に強めていくシステムである *lac* オペロンを利用したオートインダクション用培地、

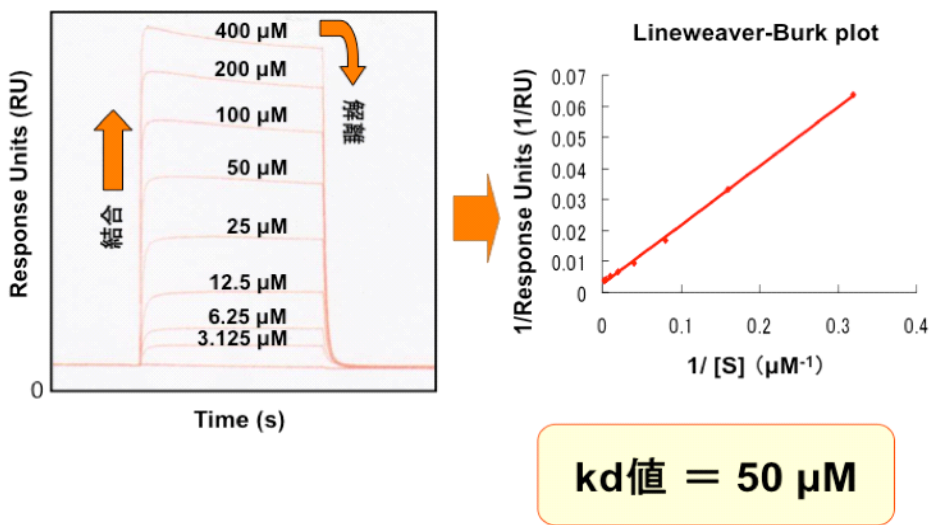


Fig. 6 Biacore T-100を用いたカルシウム結合活性の測定

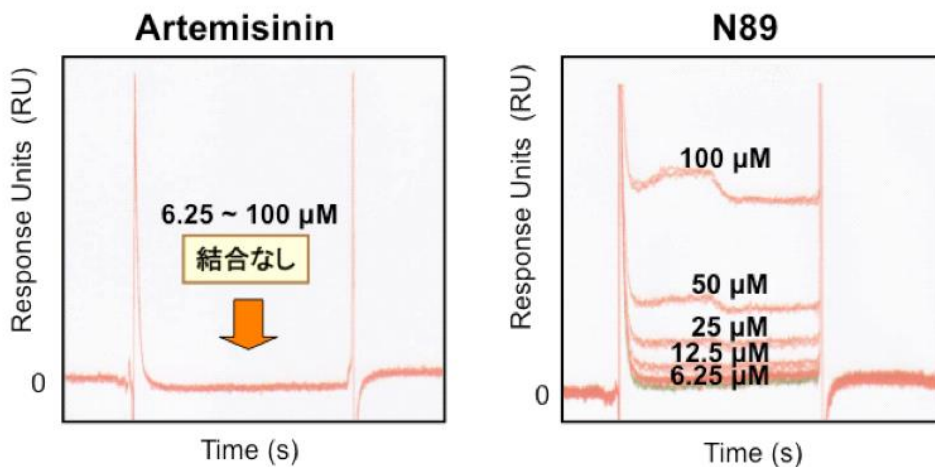


Fig. 7 Biacore T-100を用いたN-89結合活性の測定

MagicMedia™ を導入し、培養温度を低下 (25 °C 以下) させるタイミングおよびその後の培養時間などの発現条件の検討を試みた。また、PfERCのアミノ酸一次配列情報から、PfERCがマラリア細胞内の小胞体内に局在することが推測されることから、発現システムとして分泌発現系の採用を検討した。そこで、我々は、大腸菌を用いた分泌発現に成功例が多く報告されているマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質としてペリプラズム画分に分泌可能なpMAL™システムを採用した。さらに、マラリア原虫のゲノムはAT-richなDNA配列を有し、通常の大腸菌が保持するtRNAが認識できるコドンに制限がかかる可能性がある。したがって、レアコドンを認識できるtRNAを導入した大腸菌、*E. coli* BL-21-CodonPlus™ (DE3)-RIL cells をΔPfERC生産宿主株として採用した。これらのシステムおよび菌株を用いて、発現誘導の速度や培養温度を変化させるタイミング、そして培養時間について様々な条件で高発現のための試行錯誤を繰り返したところ、今回の発現条件 (Late Log-phaseで15 °Cに培養温度を低下後、42時間培養) に至った (data not shown)。この方法により、大腸菌1リットルの培養あたり、完全精製体として約2 mgのΔPfERCが得られることがわかった。一般に、この生産量は、X線結晶構造解析を行うにあたり十分な量である。

また、得られた発現産物は、ゲルろ過法および動的光散乱法により、単量体として精製され、試料内に存在する分子種も均一で単分散性を示すことがわかった。さらに、4 °Cで1ヶ月間保存しても分解することなく、あるいは凝集して沈殿を

起こすこともなく安定して存在することをSDS-PAGE解析により確認している (data not shown)。これらのことは、得られた発現産物が、非常に安定性の高い、そして純度の高い試料であることを示唆している¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。

さらに、Biacore T-100を用いたCa²⁺およびN-89結合活性の測定において、それぞれ特異的な結合を示し、得られた発現産物が活性を保持した試料であることがわかった。今回、ΔPfERCのCa²⁺に対する解離定数は、50 μMであった。PfERCは、そのアミノ酸一次配列情報から、6個のEF-hand構造およびC末端に小胞体局在化シグナルをもつCRECタンパク質ファミリーに分類されるが⁸⁾⁹⁾、このファミリーの特徴として、Ca²⁺との親和性は比較的 low、Kd値は10⁻⁴~10⁻³ Mであることが知られている。ΔPfERCが、CRECファミリーとは異なりCa²⁺に対して高親和性を示したことは、PfERCの機能を考える上で何らかの新しい知見を提供する可能性があることは興味深い。

今回の結果は発現産物が活性型タンパク質であることを意味し、結晶化用試料に供するには全く問題ないと考えられる。また、今回、N-89に対する特異的結合が観察されたにもかかわらず、正確な解離定数は測定できなかった。この原因としては、N-89の溶解性が低いために、DMSOや界面活性剤であるTween20の存在下で測定せざるを得なかったことに起因すると考えられる。すなわち、移動相や溶媒の組成に起因するノイズの発生による測定の妨害や、さらには、過酸化物質であるN-89の安定性が低いことも要因として考えられ、今後の課題として残されている。いずれにせよ、同じ環状過酸化構造をもつアルテミシニンに

対しては、 Δ PfERCとの相互作用は全く観察されなかったため、N-89の抗マラリア活性の作用機序はアルテミシニンの作用機序²⁾と異なることが推測される。このことは、PfERCが新規抗マラリア薬探索のための新しい標的であり、PfERCの高次構造解析は、その後の創薬研究を飛躍的に進展させる可能性を秘めていると考えられる。

以上のことより、本研究で得られた発現産物は、発現量、分散性、安定性、および特異性をもった活性の保持という点から総合的に考えて、結晶化用試料として、新規抗マラリア薬のスクリーニング用試料として、モノクローナル抗体作成用試料として、PfERCの細胞内における機能解析用試料として、あるいはN-89の薬効解析を行っていく上で非常に適した試料であると考えられる。

【引用文献】

- 1) Davis, T. M.; Karunajeewa, H. A.; Ilett, K. F. Artemisinin-based combination therapies for uncomplicated malaria. *Med. J. Aust.* 182, 181-185. (2005)
- 2) Eckstein-Ludwig, U.; Webb, R.J.; Van Goethem, I.D.; East, J.M.; Lee, A.G.; Kimura, M.; O'Neill, P.M.; Bray, P.G.; Ward, S.A.; Krishna, S. Artemisins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 424, 957-961. (2003)
- 3) Kim, H.S.; Shibata, Y.; Wataya, Y.; Tsuchiya, K.; Masuyama, A.; Nojima, M. Synthesis and antimalarial activity of cyclic peroxides, 1,2,4,5,7-pentoxocanes and 1,2,4,5-tetroxanes. *J. Med. Chem.*, 42, 2604-2609. (1999)
- 4) Klayman, D. L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 228, 1049-1055. (1985)
- 5) Kim, H. S.; Shibata, Y.; Wataya, Y.; Tsuchiya, K.; Masuyama, A.; Nojima, M. Synthesis and Antimalarial activity of cyclic peroxides, 1,2,4,5,7-pentoxocanes and 1,2,4,5-tetroxanes. *J. Med. Chem.*, 42, 2604-2609. (1999)
- 6) Sato, A.; Hiramoto, A.; Morita, M.; Matsumoto, M.; Komichi, Y.; Nakase, Y.; Tanigawa, N.; Hiraoka, O.; Hiramoto, K.; Hayatsu, H.; Higaki, K.; Kawai, S.; Masuyama, A.; Nojima, A.; Wataya, Y.; Kim, H. S. Antimalarial activity of endoperoxide compound 6-(1,2,6,7-tetraoxaspiro [7.11]nonadec-4-yl)hexan-1-ol. *Parasitol. Int.*, 60, 270-273. (2011)
- 7) Morita, M.; Hitomi, S.; Hiramoto, A.; Sato, A.; Hiraoka, O.; Sakura, T.; Kaneko, O.; Masuyama, A.; Nojima, M.; Wataya, Y.; Kim, H. S. *Plasmodium falciparum* endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein is a possible target of synthetic antimalarial endoperoxides, N-89 and N-251. *J. Proteome Res.*, 11, 5704-5711. (2012)
- 8) Rawlings, D.J.; Kaslow, D.C. A Novel 40-kDa Membrane-associated EF-hand Calcium-binding protein in *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.*, 267, 3976-3982. (1992)
- 9) Honore, B. The rapidly expanding CREC protein family: members, localization, function, and role in disease. *Bioessays*, 31, 262-277. (2009)
- 10) Sahoo, S. K.; Kim, T.; Kang, G. B.; Lee, J. G.; Eom, S. H.; Kim, do, H. Characterization of calumenin-SERCA2 interaction in mouse cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 284, 31109-31121. (2009)
- 11) 京都大学大学院薬学研究科創薬科学専攻 構造生物薬学分野 <http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/structbl/technique/dls.html>
- 12) 加藤博章「動的光散乱法を用いたタンパク質の結晶化の支援法」日本結晶学会誌 39, 315-319, (1997)
- 13) Ferré-D'Amaré, A.R. and Burley, S.K.: *Methods in Enzymol.*, 276, 157, (1997)
- 14) Bertero, M., Boccacci, P., Pike E. R.: *Proc.R.Soc.Lond.Ser.A*, 398, 23, (1985)
- 15) Gloria E.O.borgstahl How to Use Dynamic Light Scattering to improve the Likelihood of Growing Macromolecular Crystals. *Methods in Molecular Biology*, vol. 363: Macromolecular Crystallography Protocols : volume, 1, 109-129.