

ブレビバチルス発現系によるエンビジン組換えタンパク質の発現と精製

市原 啓子*

エンビジンはタンパク質の構造的な特徴からイムノグロブリン (Ig) スーパーファミリーに分類される細胞表面の1回膜貫通型糖タンパク質である。モノカルボン酸トランスポーターのコファクターと考えられているが、機能に関しては不明な点が多い。著者は、エンビジンの機能を解明する目的で、エンビジン組換えタンパク質を昆虫細胞やほ乳類培養細胞、大腸菌を用いて発現させたが、いずれも収量が低くて実験に利用することはできなかった。本研究では、ブレビバチルス *Brevibacillus choshinensis* において、プロテアーゼ活性をほとんど示さない菌株を利用して培養上清にタンパク質を分泌させる発現系で組換えエンビジンタンパク質の発現を試みた。まず、エンビジンの細胞外領域の I-set ドメインの158アミノ酸残基をコードする cDNA を特異的なプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応で増幅し、アミノ末端 (N 末端) に6個のヒスチジンペプチドがタグ配列 (His タグ) として連結するよう発現ベクターを構築した。このベクター DNA を用いてブレビバチルスを形質転換し、得られたコロニーの菌体を 2SY 培地で液体培養をおこなったところ、培養上清に組換えエンビジン (以下 rEmb55 と略す) タンパク質が産生されていることがわかった。培養上清を Ni-NTA カラムにアプライした、100mM のイミダゾールで rEmb55 タンパク質は溶出された。溶出液中に3種のタンパク質が含まれていたため、それらのアミノ酸配列を同定するために MALDI TOF/TOF による質量分析をおこなった。2つが rEmb55 タンパク質であったが、1つは C 末端で分解が起こっていた。ブレビバチルス発現系の収量としては低いものであるが、エンビジンの機能を調べる量としては問題ないと考えられる。

キーワード：エンビジン、ブレビバチルス、組換えタンパク質発現、精製

I. はじめに

エンビジンはタンパク質の構造的な特徴からイムノグロブリン (Ig) スーパーファミリーに分類される細胞表面の1回膜貫通型糖タンパク質である¹⁾。ほ乳類や鳥類など脊椎動物で遺伝子が同定されている。マウスでは発生初期に発現が高く²⁾、培養細胞で強制発現させるとフィブロネクチンへの接着能が向上すること^{2,4)}、モノカルボン酸トランスポーター MCT2 と細胞膜表面で複合体を形成すること³⁾、新規の神経筋接合部位で発現上昇すること⁵⁾などが報告されているが、機能に関しては不明な点が多い。

筆者は、エンビジンの機能解析に利用する目的で、

昆虫細胞やほ乳類の培養細胞でエンビジン組換えタンパク質を強制発現させた。いずれの場合にも発現量が低く組換えタンパク質を精製するには至らなかった。大腸菌を利用して細胞外ドメインとグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質 rEmb_ex-GST を発現させた。十分な発現量があったので、グルタチオンを担体とするカラムにかけたがカラム内で不溶化してしまった。グルタチオンでは溶出できずドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で溶出できたが、純度の高い融合タンパク質を得ることは難しかった (市原、未発表データ)。

グラム陽性細菌であるブレビバチルス *Brevibacillus choshinensis* において、プロテアーゼ活性をほとんど示さない菌株を利用して培養上清にタンパク質を分泌

* 愛知学院大学心身科学部健康栄養学科
(連絡先) 〒470-0195 愛知県日進市岩崎町阿良池12 E-mail: kichi@dpc.agu.ac.jp

させる発現系が開発され⁶⁾, 様々な酵素やサイトカインが組換えタンパク質としてつくられている^{7,8,9,10)}. 本研究では, この発現系を利用し, 組換えエンビジンタンパク質の発現を試みた. 大腸菌とブレバチルスとのシャトルベクターにエンビジン cDNA を組み込み, アミノ末端 (N 末端) に 6 個のヒスチジンペプチドがタグ配列 (His タグ) として連結するようデザインした. このベクター DNA を用いてブレバチルスを形質転換し, 得られたコロニーの菌体を液体培養をおこなったところ, 培養上清に組換えエンビジン (以下 rEmb55 と略す) タンパク質が産生されていることがわかった. さらに His タグを利用してキレートカラムクロマトグラフィーで培養上清中の rEmb55 タンパク質を精製することが可能であった. ブレバチルス発現系の収量としては低いものであるが, 純度の高い組換えエンビジンタンパク質を得ることができた.

II. 材料と方法

1. 材料

ブレバチルス発現系キット (ベクター DNA, ブレバチルスコンピテントセル, 形質転換試薬) および His タグ付き発現ベクター pNC-HisT, 制限酵素, ライゲーションキット, 大腸菌 DH5 α コンピテントセルは, タカラバイオ社より購入した. ブレバチルス培養用の 2SY 培地および TM 培地はキットの説明書に従って調製した.

2. 方法

1) 発現ベクターの作成

マウスエンビジン cDNA を鋳型とし, プライマー moEmb 89F 5'-ccacgtgatcccgccctgatccggctgagggc 3' と moEmb 555R 5'-ccgcgaattctcacttcagcacagtagaatcc 3' を用い, Prime Script taq ポリメラーゼにより PCR 反応を行なった. 反応生成物である 500bp の DNA 断片を, さらに, *Bam* HI と *Eco* RI で切断した後, アガロースゲルを用いて精製した. 発現ベクター pNC-HisT は, *Bam* HI と *Eco* RI で切断し, 脱リン酸化酵素で処理した. この発現ベクターに, エンビジン DNA 断片を挿入し発現ベクター pNC-HEmb55 を得た. これを用いて大腸菌を形質転換し, 得られたコロニーよりプラスミド DNA を抽出した. インサートサイズの正しいクローンを 3 つ選び, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit で反応させた後, DNA シーケンサー ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied

Biosystems) で塩基配列を確認した.

2) ブレバチルスの形質転換と組換えエンビジンタンパク質の発現確認

塩基配列を確認した発現用プラスミドの DNA を精製し, ブレバチルスコンピテントセルを NTP 法で形質転換した. MTNm プレート (TM 培地, 20mM MgCl₂, ネオマイシン 10 μ g/ml, 1.5% アガー) 上で 37 °C 一晚培養した後, コロニーの出現を確認した. コロニー 10 個について, ネオマイシン (終濃度 25 μ g/ml) を含む 3ml の 2SY 培地 (2SY/Nm) および TM 培地 (TM/Nm) にそれぞれ植菌し, 30°C, 120rpm で培養した. 24 時間培養したところで, TM/Nm 培地での菌懸濁液から 0.3ml をとりだし等量の LB/40% グリセロールと混和してグリセロールストックとし, -80°C で保存した. 48 時間目では, 各培養液から 0.1ml をとりだし, 2 x SDS-PAGE サンプルバッファーと混和し, 98°C, 3 分間加熱し電気泳動用試料を作成した. 60 時間後に培養を終了し, 培養の上清のみを冷凍保存した.

培養上清を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し, ゲルからニトロセルロース膜にタンパク質を転写した¹¹⁾. 抗 Penta-His 抗体 (マウスモノクローン抗体, キアゲン社), および抗エンビジン抗体 (ウサギポリクローン抗体)⁴⁾ を一次抗体としてウェスタンブロットを行い rEmb55 タンパク質を確認した.

3) カラムクロマトグラフィーによるエンビジンタンパク質の精製

組換え rEmb55 タンパク質を高発現するブレバチルスのクローンを選び, グリセロールストックを 20ml の 2SY/Nm 培地に植えて 30 °C, 120rpm で 60 時間培養した. 培養液を 5000 x g, 4°C で 15 分間遠心し, 培養上清を得た. Ni-NTA アガロース担体 (キアゲン社) 0.4ml をカラムに充填し, カラムバッファー (50mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.2, 0.3M NaCl, 10mM イミダゾール) で平衡化した. 培養上清は 0.45 μ m フィルターに通した後カラムにかけた. 10ml のリン酸緩衝塩液および 10ml のカラムバッファーで洗浄し, 溶出には, カラムバッファーに, それぞれ 50mM, 100mM, 200mM, 300mM のイミダゾール添加した溶出液を用いた. 溶出画分を一部として SDS-PAGE を行い, 銀染色によりタンパク質のバンドを確認した.

4) 質量分析器によるアミノ酸配列の確認

100mM イミダゾールで溶出された画分より 4 μ g を SDS-PAGE で分離し, クマジーブリリアントブルー染色を行いバンドを確認した. ゲルよりバンドを切り出

し、ヨードアセトアミドで還元アルキル化を行った後、ゲル内トリプシン消化を37°Cで一晩行った。アセトニトリルでペプチドを抽出し、時間飛行型質量分析器(4800 MALDI TOF/TOF Analyzer, Applied Biosystem社)にかけた。ペプチドのアミノ酸配列は、MASCOTデータベース(<http://matrixscience.com/>)により同定した。

III. 結果

ブレバチルス組換え体の3つのクローンを48時間培養し、培養上清をSDS-PAGEにかけた(図1, A)。TM/Nm培地(図1, A, レーン1~3)より2SY/Nm培地(図1, A, レーン4~6)での方が組換えタンパク質のバンドがはっきり見えた。rEmb55タンパク質の発現にはTM培地より2SY培地の方が適していることがわかった。同じ試料を、抗Hisタグ抗体でウェスタンブロットをおこなったところ、どちらの培地においても20kDa付近にバンドを確認することができた(図1, B)。さらに、2SY培地での培養上清を抗エンビジン抗体でウェスタンブロットをおこなう(図1, C)と、2本のバンドが認められた。今回の実験では、cDNAから推定されるタンパク質の分子量は20kDaである。Hisタグは、N末端に連結されていることから、18kDaのバンドではカルボキシ末端(C末端)側のいくつかのアミノ酸が欠落していることが予想された。

N末端に連結したHisタグを利用してエンビジン組

換えタンパク質をNi-NTAアガロースを担体とするキレートカラムクロマトグラフィを行った。カラムに培養上清をかけ、イミダゾールの濃度を上昇させて溶出を行ったところ、rEmb55タンパク質は、100mMイミダゾールですべて溶出されることがわかった(図2)。溶出された画分に含まれる3本のタンパク質(図2, 矢頭)のうち、バンド1とバンド2はウェスタンブロットで確認されたものと一致するが、30kDa付近のバンド3については不明なタンパク質であった。

溶出画分の3つのタンパク質を同定するため、電気泳動で分離したタンパク質の各バンドを、ゲル内トリプシン消化し、生成したペプチドのアミノ酸配列を時間飛行型質量分析器MALDI TOF/TOF Analyzerで解析した。MASCOTデータベースより、バンド1とバンド2はマウスエンビジン(EMB_MOUSE, P21995)、バンド3はカナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ(KANU_BACSP, P05058)であることが確認できた。バンド1, 2で同定されたアミノ酸配列を、cDNAから予想されるアミノ酸配列と比較すると、バンド2ではC末端のペプチドが検出されていたがバンド1では検出されていなかった(図3)。バンド1は、C末端が分解されて10から19アミノ酸残基が短くなった分子であることが確かめられた。

さらに、500mlの組換え体の培養を行い、カラムクロマトグラフィによりrEmb55タンパク質を精製したところ、200 μ gの収量があった。

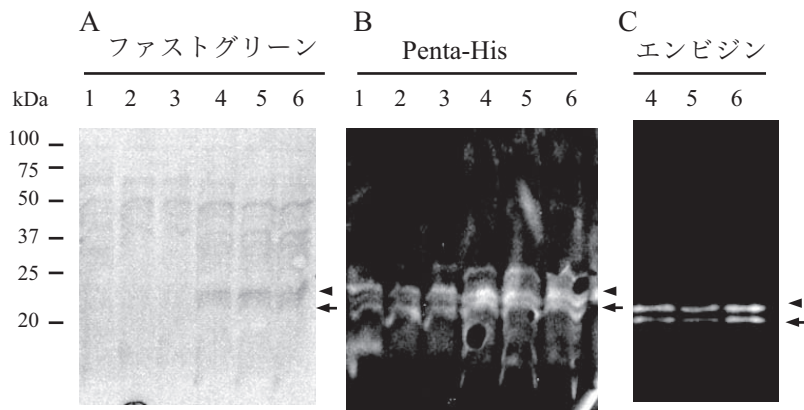


図1 rEmb55タンパク質の発現と確認

レーン1と4, レーン2と5, レーン3と6は同一の組換え体を培養。1, 2, 3はMT/Nm培地, 4, 5, 6は2SY/Nm培地で培養した培養上清。A: ファストグリーンで全タンパク質を染色, B: 抗Penta-His抗体, C: 抗エンビジン抗体。矢頭と矢印で示した2本のバンドがrEmb55タンパク質である。

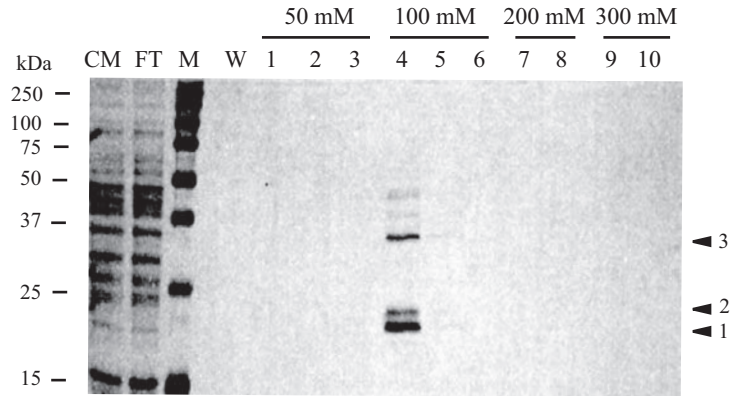


図2 カラムクロマトグラフィーによる rEmb55 タンパク質の精製
CM, 培養上清, FT, 素通り, M, マーカー, W, 洗浄, 1 から 10 は溶出画分の番号, 矢頭 1, 2, 3 は 100mM で溶出された 3 つのタンパク質の位置を示す。

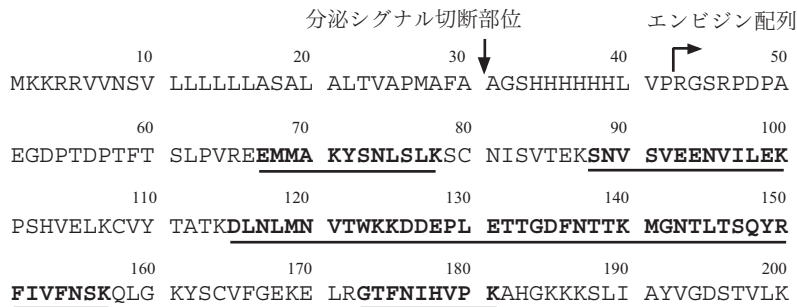


図3 cDNA から予想される組換えエンビジンタンパク質のアミノ酸配列
太字はバンド 2 から検出されたペプチドの配列, アンダーラインは, バンド 1 から検出されたペプチドの配列を示す。

IV. 考察

エンビジンは, N 末端側から I-set ドメイン, Ig ドメイン, 膜貫通ドメイン, 細胞内ドメインからなる. rEmb55 タンパク質は 158 アミノ酸残基からなる I-set ドメインに対応し, 3 個のシステイン残基を含むが, プレバチルス発現系によって His タグ付き分泌タンパク質として産生させることができた. さらに, 1 回のカラムで高純度の標品として精製できることがわかった. プレバチルス発現系では, 1 リットルの培養液において, 組換えタンパク質として数十から数百ミリグラム^{8,9)}の収量が報告されている. rEmb55 タンパク質では, 1 リットルあたりでは 400 μ g の収量なので, 一般的なプレバチルス発現系の収量と比較して非常に少ない. しかしながら, プレバチルス組換え体の培養およびカラムクロマトグラフィー精製は容易にできるので, エンビジンの機能解析に必要なタンパク質

をつくるには十分な方法と考えられる. さらに, 分泌シグナルを変更したり, 培養液の組成や培養条件を調節することにより発現量が増加することも知られている^{8,10)}. エンビジンに関しても, これらの条件を適正化することにより生産性を向上させることができるかもしれない.

本研究で用いたプレバチルス発現系はプロテアーゼ活性が低いことが特徴である. rEmb55 タンパク質では, 培養上清の段階で完全長のポリペプチドの他に C 末端が分解して短くなった分子が見いだされた. 分解が菌体内で起こったのか, 培養上清中なのかは不明であるが, C 末端側に分解の起こりやすいアミノ酸配列が含まれている可能性が高い. カラム精製の時にプロテアーゼ阻害剤を添加する必要があるかもしれない.

プレバチルス発現系での問題点は, プレバチルスの組換え体のコロニーは常温のプレート上でせいぜい 1 週間程度しか保存できず, コロニーをプレートか

らプレートへ継代培養を繰り返すと組換えタンパク質の発現が低下することである。本研究では、この問題を回避するために、形質転換後のコロニーから液体培養をおこなったすべてのクローンをグリセロールストックとして -80°C で保存した。グリセロールストックを作成することで、プレートによる継代を行う必要がなくなり、必要な時に組換えタンパク質の発現と精製を行うことが可能になった。グリセロールストックから培養した場合には、保存期間に関係なく一定の発現をみることができた。

謝 辞

DNA シーケンサー、質量分析器の使用に際して、愛知学院大学歯学部吉村文信教授、佐藤美紀枝技術員の協力と支援をうけたことに深く謝意を表す。

文 献

- 1) Huang RP, Ozawa M, Kadomatsu K, Muramatsu T. (1990) Differentiation. **45**, 76-83. Developmentally regulated expression of embigin, a member of the immunoglobulin superfamily found in embryonal carcinoma cells.
- 2) Huang RP, Ozawa M, Kadomatsu K, Muramatsu T. (1993) Dev Biol. **155**, 307-14. Embigin, a member of the immunoglobulin superfamily expressed in embryonic cells, enhances cell-substratum adhesion.
- 3) Wilson MC, Meredith D, Fox JE, Manoharan C, Davies AJ, Halestrap AP. (2005) J Biol Chem. **280**, 27213-21. Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70).
- 4) 市原啓子, 村松喬 (2009). 第 82 回日本生化学会大会抄録集.
- エンビジンによるフィブロネクチン基質への細胞接着能の向上.
- 5) Lain E, Carnejac S, Escher P, Wilson MC, Lomo T, Gajendran N, Brenner HR. (2009) J Biol Chem. **284**, 8930-9. A novel role for embigin to promote sprouting of motor nerve terminals at the neuromuscular junction.
- 6) Takagi H, Kadowaki K, Uda S. (1989) Agric. Biol. Chem., **53**, 691-699. Screening and Characterization of Protein-Hyperproducing Bacteria without Detectable Exoprotease Activity.
- 7) Miyauchi A, Ozawa M, Mizukami M, Yashiro K, Ebisu S, Tojo T, Fujii T, Takagi H. (1999) Biosci Biotechnol Biochem. **63**, 1965-1969. Structural conversion from non-native to native form of recombinant human epidermal growth factor by *Brevibacillus choshinensis*.
- 8) Tanio M, Tanaka R, Tanaka T, Kohno T. (2009) Anal Biochem. **386**, 156-60. Amino acid-selective isotope labeling of proteins for nuclear magnetic resonance study: proteins secreted by *Brevibacillus choshinensis*.
- 9) Teramura N, Tanaka K, Iijima K, Hayashida O, Suzuki K, Hattori S, Irie S. (2011) J Bacteriol. **193**, 3049-56. Cloning of a novel collagenase gene from the gram-negative bacterium Grimontia (*Vibrio*) hollisae 1706B and its efficient expression in *Brevibacillus choshinensis*.
- 10) Onishi H, Mizukami M, Hanagata H, Tokunaga M, Arakawa T, Miyauchi A. (2013) Protein Expression and Purification **91**, 184-191. Efficient production of anti-fluorescein and anti-lysozyme as single-chain anti-body fragments (scFv) by *Brevibacillus* expression system.
- 11) Ichihara-Tanaka K, Oohira A, Rumsby M, Muramatsu T. (2006) J Biol Chem. **281**, 30857-64. Neuroglycan C is a novel midkine receptor involved in process elongation of oligodendroglial precursor-like cells.

(最終版平成 26 年 1 月 7 日受理)

Production and Purification of Recombinant Embigin Protein Secreted by *Brevibacillus Choshinensis*.

Keiko ICHIHARA-TANAKA

Abstract

Embigin is a cell surface transmembrane protein which is classified as the immunoglobulin (Ig) superfamily. Embigin is thought to be the cofactor of monocarbonate transporter 2, but its function is not fully understood yet. In the previous studies, I produced the recombinant embigin proteins in insect cells, mammalian cells, and *E. coli* cells. In any case the yield was too low to use for the research. In this paper, I designated the recombinant embigin protein, rEmb55, to be produced as a secreting form in specific strain of *Brevibacillus choshiensis* characterized as lacking protease activity. First, the mouse embigin cDNA fragment encoding 158 amino acid residues corresponding to the I-set domain of embigin extracellular region was amplified with a set of specific primers by polymerase chain reaction, then the fragment was ligated to the *Brevibacillus* expression vector pNC-HisT in frame to the cloning site, obtained the pNC-HEmb55. After the confirmation of insert sequence, *Brevibacillus choshiensis* was transformed, and many colonies developed. Several colonies were inoculated in the 2SY medium cultured for 48 hours, and successively secreted the rEmb55 protein, which was able to be detected by both anti-Penta His antibodies and anti-embigin antibodies by western blotting. Next, the rEmb55 protein containing culture medium was applied to the Ni-NTA column. 100 mM imidazole effectively eluted the rEmb55 protein. As the eluate contained three proteins, I confirmed their peptide sequence using MALDI TOF/TOF analyzer. Two proteins were the rEmb55 protein; one was the full size, and the other was deleted at carboxy-terminal end. Finally I obtained 200 μ g of the rEmb55 protein from 500 ml of culture medium. This yield is low as compared to the *Brevibacillus* expression studies, but this amount seems to be good for examining embigin function.

Keywords: embigin, *Brevibacillus choshinensis*, recombinant, expression, purification