

Brevibacillus Expression System を用いた組換えタンパク質分泌生産

谷生 道一、河野 俊之

株式会社三菱化学生命科学研究所 蛋白質立体構造研究グループ

■ はじめに

現在、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞、無細胞など、種々の異種タンパク質発現系が開発されている。異種発現の利点としては、天然組織から得ることが困難な試料を調製できることに加え、変異導入、重原子や安定同位体導入試料の調製が行えることなどが挙げられる。最もよく用いられている大腸菌発現系は、目的タンパク質を短時間で大量に得られることや操作が簡便であり安価であることから、最初に構築が試みられる発現系であるが、ジスルフィド(SS)結合を有する分泌性タンパク質や高等生物のタンパク質の発現では、不溶性の封入体を形成することも多い。この場合、封入体からのリフォールディングや、ペリプラズムへの分泌生産などを行う方法もあるが、それらは一般的に収量が低い。

酵母 *Pichia pastoris* は、SS結合を有するタンパク質の分泌生産に極めて有用な発現系であるが、その発現量は目的タンパク質に大きく依存する。

昆虫細胞や動物細胞の発現系は、大腸菌で発現が困難であるものも含めさまざまなタンパク質の発現に成功しているが、大腸菌に比べると生産量は一般的に低く、高コストである。また、酵母を含む真核生物発現系の利点の一つとして、リン酸化や糖鎖修飾などの翻訳後修飾が挙げられるが、構造解析の視点からみるとこれら翻訳後修飾は目的タンパク質試料の不均一性の原因となり、構造解析の妨げになることがある。

無細胞発現系は、細胞毒性を有するようなタンパク質発現に有用であり、またアミノ酸選択的安定同位体標識をする場合に代謝を考慮する必要がないという利点があるが、高コストであることに加え、還元的環境で合成反応を行うため、SS結合を有するタンパク質生産には不向きという問題がある。このように、これらの異種タンパク質発現系にはそれぞれ一長一短があるため、研究目的とコストを考慮して適切な発現系を選択する必要があるが、特にSS結合を有するタンパク質の分泌生産に関しては、選択できる発現系が少ないように思われる。

我々の研究室では、複数の発現系を用いて種々のタンパク質の構造機能解析を行っているが、2年ほど前から *Brevibacillus* Expression System を導入している。本発現系は、2006年末にタカラバイオから発売されているもので、既に多数の組換えタンパク質の分泌生産に実績がある¹⁻⁴⁾。我々の研究室においても、大腸菌や酵母では正常発現が困難であった分泌性タンパク質や細胞質タンパク質の分泌生産に成功しており⁵⁻⁷⁾、操作が簡便であり安価であるこ

とから、本発現系は大腸菌に次いで、あるいは同時に試すべき系となりつつある。

本稿では、我々が *Brevibacillus* Expression System を用いて行った組換えタンパク質の分泌生産例と、この系を用いた安定同位体標識法について紹介する。

■ 組換えタンパク質の発現と精製

以下に、ヒトM-フィコリン異物認識ドメイン(FD1：分子量26.8 kDa)およびヒトFK506結合タンパク質(FKBP：分子量13 kDa)の発現系構築および精製の方法を示す⁵⁻⁷⁾。

【コンストラクト設計】

目的タンパク質をコードするcDNAを、Human Universal QUICK-Clone™ cDNA IIをテンプレートとしてPCRで増幅し、pNCM02ベクターに組み込んだ(大腸菌でクローニング)。この際、C末端側に6×Hisタグが付くようにプライマーを設計した。作製した発現ベクターは、製品に付属するマニュアルに従って、エレクトロポレーション法により *Brevibacillus choshinensis* Electro-Cells に導入した。

【発現チェック】

得られた形質転換体のコロニーを、3~5 mlの培地(内径14~18 mm試験管など)を用いて培養した(37℃、200 rpm 往復振とう培養、1~3日間)。培地には、2SYNm(2% グルコース、4% ソイトン、0.5% 酵母エキス、1 mM 塩化カルシウム、50 µg/ml ネオマイシン)とTMNm(1% グルコース、1% ポリペプトン、0.5% カツオ肉エキス、0.2% 酵母エキス、0.001% 硫酸鉄、0.001% 硫酸マンガン、0.0001% 硫酸亜鉛、50 µg/ml ネオマイシン)の2種類を試した。SDS-PAGEおよびウェスタンブロットティング法(抗His抗体)による発現確認を行った結果、FD1は2SYNm培地でのみ発現し、FKBPは2SYNmとTMNmのいずれの培地でも同程度発現することがわかった。培地の調製は2SYNmの方が容易であるため、スケールアップには2SYNm培地を用いることにした。

【大量培養および精製】

3~5 ml 2SYNm培地で前培養した菌液1 mlを、100 ml(in 500 ml フラスコ)の2SYNmまたはSYNm(2% グルコース、0.8% ソイトン、0.5% 酵母エキス、50 µg/ml ネオマイシン)に植菌し、27~37℃での100 rpm 旋回培養により、1~5日間培養を行った。目的タンパク質の発現量と必要量に応じて、培養フラスコ数を増やした。目的タンパ

ク質の精製は、培養上清をpH 8付近に調整後、TALON[®] Metal Affinity Resinを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより行い、続いてイオン交換(FKBPでは省略)、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した(図1)。

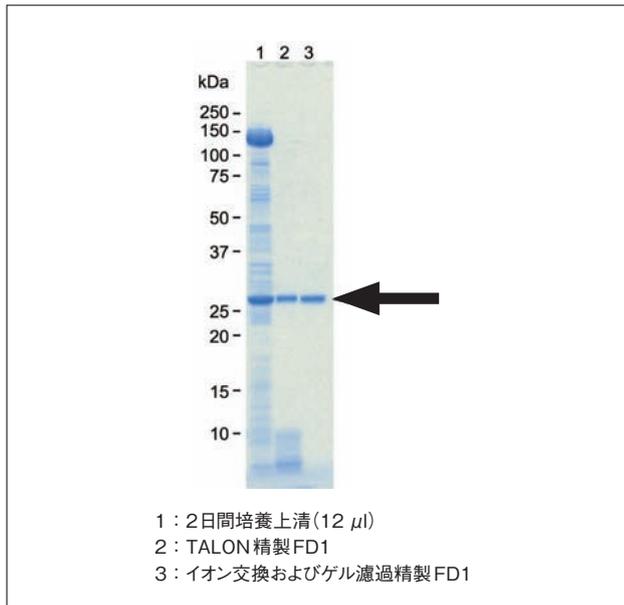


図1 *Brevibacillus* 発現系でのFD1の発現と精製

【安定同位体標識】

2SYNm培地で前培養した菌液1 mlを、100 ml(in 500 ml フラスコ)の安定同位体標識C.H.L.培地(コロレラ工業、50 µg/ml ネオマイシンを添加)に植菌し、27~37°Cでの100 rpm 旋回培養により、1~5日間培養を行った。標識タンパク質は、アフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。アミノ酸選択的標識には、非標識C.H.L.培地に標識アミノ酸(100 mg/L)を添加した培地を用いた。

■ 結果

【*Brevibacillus* 分泌発現】

FD1は、自然免疫の異物認識タンパク質として働くヒトM-フィコリンの基質結合ドメインであり、2つのSS結合を有する(図2)。我々は既に酵母*P. pastoris*によるFD1の分泌生産に成功し、その結晶構造を明らかにしているが⁸⁻¹⁰⁾、この系では変異体FD1のほとんどが発現しなかった。そこで、*Brevibacillus* Expression Systemを用いて、FD1およびその種々の変異体の分泌発現を試みたところ、正常活性を保持したタンパク質の分泌生産に成功した⁶⁾。発現条件としては、試験管培養では200 rpmの振とう培養で最も良く発現することがわかり、フラスコ培養では、旋回回転数が100 rpm程度で最も良く発現し、回転数を上げると発現量が低下する傾向があった。培養温度は37°Cで最も良く発現した。しかし、ある変異体FD1では、37°C培養で発現した試料では基質結合能が無く、27°C培養で発現した試料では正常な基質結合活性を示した例があった。これは、目的タンパク質が大量に分泌生産されていても、その安定性に依存して(特に変異体の場合)不可逆的な変性が起こりえることを示唆している。培地組成についてもさ

まざまな検討を行った結果、分泌生産の培地には0.8%程度のソイトンが最も良く、また塩化カルシウムを加えない方が発現に良いことがわかった。同様の傾向はFKBPでも見られた。一方、この条件の培地(SYNm)を用いてコロニーからの前培養を行うと、菌の発育が極めて悪かった。以上を考慮し、最終的なFD1の発現条件は、前培養は2SYNm(3~5 ml)にて、37°C、200 rpm(往復振とう)で一晩(15~18時間)、本培養はSYNm(100 ml)にて、27°C、100 rpm(旋回)で2~4日間とした。この条件で、1 L培養当たり約10 mgの精製FD1が得られ、収量は*P. pastoris*の場合(5~8 mg/1 L培養)よりもやや高かった。以上の条件で発現した変異体FD1の活性解析により、FD1の基質結合に關与する残基の同定に成功した⁶⁾。

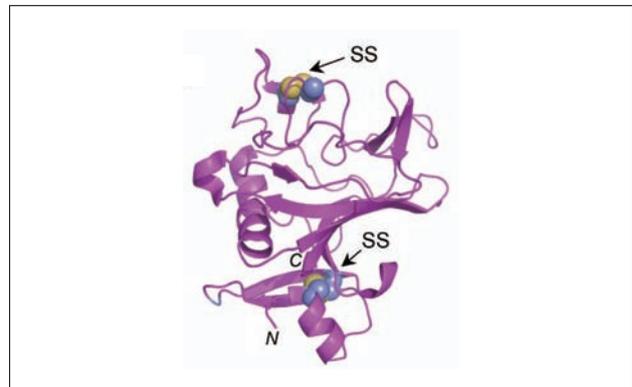


図2 FD1の結晶構造(PDB ID 2D39)⁹⁾

FKBPは細胞質タンパク質でありSS結合を持たないが、*Brevibacillus*によって問題なく分泌生産をすることができた^{5,7)}。培養条件および精製条件は、FD1の場合とほぼ同じであるが、このタンパク質は比較的安定であることから、前、本培養のいずれも37°Cで行った。2SYNm培地でのFKBPの収量は、1 L培養当たり約16 mg精製タンパク質であった。

我々の研究室では、FKBP以外にも*Brevibacillus*を用いた細胞質タンパク質の分泌生産に成功している。あるタンパク質(大腸菌由来)の例では、培地中の酸化的環境により一部のタンパク質分子間でSS結合を生じ、単量体と二量体が混在していたが、精製途中でジチオスレイトール(DTT)を10 mM程度加えることで、すべて単量体として精製することができた。また別のタンパク質(ヒト由来)の例では、大腸菌(細胞内)においても発現がみられるが、精製のための細胞破碎時にプロテアーゼとの接触に起因すると考えられる分解が起こった。そのため、*Brevibacillus*による分泌生産を試みたところ、目的タンパク質は分解されることなく精製できた。これらの結果は、*Brevibacillus*発現系が、SS結合を有する分泌性タンパク質だけでなく、細胞質タンパク質の発現にも有用であることを示している。

【安定同位体標識】^{5,7)}

タンパク質の構造機能解析、特にNMR法による解析には、目的タンパク質の安定同位体標識が不可欠であるが、これまで*Brevibacillus*発現系を用いた安定同位体標識法は確立されていなかった。我々は、FD1のNMR解析の必要

性に迫られていたこともあり、*Brevibacillus*による安定同位体標識法の確立を試みた。モデルタンパク質として、既にNMR信号の帰属が成されており、20種のアミノ酸すべてを含んでいるFKBPを採用した。M9培地を含む、複数の微生物用の最少培地による発現検討を行った結果、クロレラ工業のC.H.L.培地が発育・発現共に最も良いことがわかった。C.H.L.培地におけるFKBPの収量は、1 L培養当たり約2~13 mg精製タンパク質であった(37°C、1~2日間培養)。¹⁵N標識C.H.L.培地を用いて標識したFKBPの¹⁵N標識率は約91%であり、その¹H-¹⁵N HSQC NMRスペクトルは、大腸菌で得られたそれと類似していたことから、*Brevibacillus*発現系で得られた試料は正常な折りたたみ構造を保持していることを確認できた。また、この系を用いたアミノ酸選択的標識法の確立のため、非標識C.H.L.培地に一種類の¹⁵N標識アミノ酸のみを添加した培地(プロリンを除く19種類を調製)による発現を試みた。各¹⁵N標識アミノ酸含有C.H.L.培地から得られた標識試料の¹H-¹⁵N HSQC NMRスペクトル解析の結果、*Brevibacillus*発現系では、9種類のアミノ酸残基において選択的標識が可能であることがわかった(表1)。一方、酸性アミノ酸と芳香族アミノ酸は培養1日目から他のアミノ酸へ代謝されることが明らかとなり、グリシン、イソロイシン、ロイシン、セリン、スレオニン、特定のアミノ酸へ代謝されることがわかった。また、システインを含むC.H.L.培地では培養2日目以降に、チロシンを含む培地では3日目以降に、FKBPの分解が観測された。このため、システイン標識FKBPは、培養1日目の上清から得た。

同様の方法でFD1の安定同位体標識を試みたが、C.H.L.培地のみではFD1の発現量が低いことがわかった。そのため、*Brevibacillus*において低代謝(選択的標識が可能)である9種類のアミノ酸のうち、システインを除く8種のアミノ酸をそれぞれ100 mg/Lとなるように添加したC.H.L.培地(C.H.L.aa)を用いて培養したところ、FD1の発現量が上昇した。そこで、アミノ酸選択的標識FD1の作製には、目的のアミノ酸を標識アミノ酸に置換したC.H.L.aa培地、あるいは標識システインを加えたC.H.L.aa培地を用いることにした。この改良の結果、FD1においてもアミノ酸選択的標識が可能であることがわかり、各試料の¹H-¹⁵N HSQC NMRスペクトルの取得に成功した(図3A~C)。FD1の収量は、C.H.L.aa培地1 L当たり2~5.5 mg精製タンパク質であった(5日間培養)。また、システイン添加によるFD1の分解は見られなかった。以上より、*Brevibacillus*発現系における、簡便で比較的安価な安定同位体標識試料調製法を確立することができた。

表1 *Brevibacillus*^{*1}のアミノ酸選択性⁷⁾

アミノ酸	主な代謝産物	代謝率(%) ^{*2}	選択性
Ala	—	< 20	○
Arg	—	< 35	○
Asn	—	< 30	○
Asp	ほぼすべてのアミノ酸	—	×
Cys	—	< 18	○
Gln	—	< 61	○
Glu	ほぼすべてのアミノ酸	—	×
Gly	Cys, Ser, Trp	—	△
His	—	< 25	○
Ile	Leu, Val	—	△
Leu	Ile, Val	—	△
Lys	—	< 26	○
Met	—	< 16	○
Phe	ほぼすべてのアミノ酸	—	×
Ser	Cys, Gly, Trp	—	△
Thr	Cys, Gly, Ser, Trp	—	△
Trp	ほぼすべてのアミノ酸	—	×
Tyr	ほぼすべてのアミノ酸	—	×
Val	—	< 23	○

*1 *Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3株

*2 ¹⁵Nアミノ酸標識FKBPの¹H-¹⁵N HSQC NMRスペクトルにおける各アミノ酸残基のNMR信号の平均強度相対比から算出

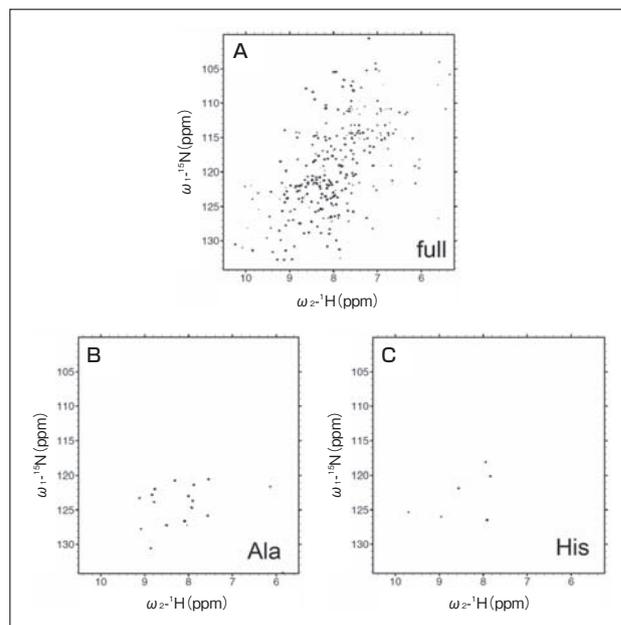


図3 *Brevibacillus*発現系を用いた¹⁵N安定同位体標識

¹⁵N均一標識FD1(A)、[α -¹⁵N]Ala標識FD1(B)、および[α -¹⁵N]His標識FD1(C)の¹H-¹⁵N HSQC NMRスペクトル。FD1は二カ所のSS結合を有する(図2参照)。野生型FD1は、水溶液中で三量体を形成するため、NMR測定試料には、単量体となる変異体FD1(F127S/L128S)を用いた^{6,7)}。

■ まとめ

組換えタンパク質の分泌生産の利点としては、(1)正常なSS結合を形成する、(2)菌体破碎を行うことなく培地から目的タンパク質を精製できる、(3)細胞内ではなく培地中に発現するため目的タンパク質が大量に得られる可能性がある、(4)細胞内発現では封入体を形成しやすいタンパク質でも、培地中へ分泌されることによる希釈効果により、正常な折りたたみ構造を持つ可能性がある、(5)細胞

内では毒性を有するタンパク質でも細胞外に分泌させることで安定に生産できる可能性がある、などが挙げられる。現在、組換えタンパク質の分泌生産には、主に昆虫細胞などの真核細胞発現系が用いられているが、大腸菌発現系に比べると実験操作が複雑で、高価な設備が必要であるなどの難点がある。その点、本稿で用いた *Brevibacillus* Expression System は、大腸菌発現系の操作経験と実験設備環境があれば容易に導入することができるため、大腸菌で発現が困難なタンパク質を発現したい場合に、まず試してみるべき系の一つとなると考えられる。さらに、本発現系を用いた安定同位体標識試料調製法も確立できたことから、*Brevibacillus* Expression System を利用することで、NMR による分泌性タンパク質の構造研究が今後促進されるものと期待される。

当然のことではあるが、本発現系も万能ではない。我々の研究室でも、発現量が極めて低い、あるいは形質転換体自体が得られない例がいくつかあった。また、2SYNm や TMNm 培地には、His タグ精製を阻害する成分が含まれているらしく、目的タンパク質の収量を上げるために、TALON[®] のレジンを増やしたり、フロースルーを繰り返しレジンにアプライするなど、吸着条件の検討も必要であった。今後、多くのユーザーが使用することで、この発現系の利点・欠点がより明確になり、それらが *Brevibacillus* 発現系のさらなる発展に繋がることを期待したい。

[参考文献]

- 1) Udaka, S., Yamagata, H. : High-level secretion of heterologous proteins by *Bacillus brevis*. (1993) *Methods Enzymol*, **217**, 23-33.
- 2) Miyauchi, A., Ozawa, M., Mizukami, M., Yashiro, K., Ebisu, S., Tojo, T., Fujii, T., Takagi, H. : Structural conversion from non-native to native form of recombinant human epidermal growth factor by *Brevibacillus choshinensis*. (1999) *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**, 1965-1969.
- 3) Yashiro, K., Lowenthal, J. W., O'Neil, T. E., Ebisu, S., Takagi, H., Moore, R. J. : High-level production of recombinant chicken interferon-gamma by *Brevibacillus choshinensis*. (2001) *Protein Expr Purif*, **23**, 113-120.
- 4) Tanaka, R., Mizukami, M., Ishibashi, M., Tokunaga, H., Tokunaga, M. : Cloning and expression of the *ccdA*-associated thiol-disulfide oxidoreductase (*catA*) gene from *Brevibacillus choshinensis*: stimulation of human epidermal growth factor production. (2003) *J Biotechnol*, **103**, 1-10.
- 5) Tanio, M., Tanaka, T., Kohno, T. : ¹⁵N isotope labeling of a protein secreted by *Brevibacillus choshinensis* for NMR study. (2008) *Anal Biochem*, **373**, 164-166.
- 6) Tanio, M., Kohno, T. : Histidine regulated activity of M-ficolin. (2009) *Biochem. J.*, **417**, 485-491.
- 7) Tanio, M., Tanaka, R., Tanaka, T., Kohno, T. : Amino acid-selective isotope labeling of proteins for nuclear magnetic resonance study: Proteins secreted by *Brevibacillus choshinensis*. (2009) *Anal Biochem*, **386**, 156-160.
- 8) Tanio, M., Kondo, S., Sugio, S., Kohno, T. : Overexpression, purification and preliminary crystallographic analysis of human M-ficolin fibrinogen-like domain. (2006) *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, **62**, 652-655.
- 9) Tanio, M., Kondo, S., Sugio, S., Kohno, T. : Trivalent recognition unit of innate immunity system: crystal structure of trimeric human M-ficolin fibrinogen-like domain. (2007) *J Biol Chem*, **282**, 3889-3895.
- 10) Tanio, M., Kondo, S., Sugio, S., Kohno, T. : Trimeric structure and conformational equilibrium of M-ficolin fibrinogen-like domain. (2008) *J Synchrotron Radiat*, **15**, 243-245.

■ 本稿でご使用いただいた製品

・ *Brevibacillus* Expression System*¹ (販売終了)

現在は製品コード HB200、HB300 にバージョンアップしています。

・ TALON[®] Metal Affinity Resin*²

製品コード 635501	10 ml
635503	100 ml

*1 : 本製品はヒゲタ醤油(株)の製品です。

[使用上のご注意]

Brevibacillus Expression System で宿主として用いる *B. choshinensis* Electro Cells は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」の遺伝子組換え生物等に該当します。ご使用の際は、「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置を定める省令」(平成16年文科省・環境省令第1号)および貴組織内の安全委員会の指示に従ってください。

なお、*Brevibacillus* 発現システムは、ご購入に際してライセンス同意書が必要で(詳しくはウェブカタログをご覧ください)。