

ブレビバチルス BIC 発現系を用いたエンビジンの 部位特異的組換えタンパク質の発現と精製

市原啓子*1)

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。モノカルボン酸輸送体 2 の協同因子や、神経筋接合部位の形成における調節因子として機能することが報告されているが、実際のエンビジンの機能は良くわかっていない。さらに、細胞内ドメインの結合タンパク質に関しては知見がない。膜タンパク質の相互作用を研究するにあたり、膜タンパク質全体を精製することが困難なことから、部位特異的な組換えタンパク質が広く用いられている。

エンビジンについては、pNC-HisT を発現ベクターとし I-set ドメインを含む領域をブレビバチルス発現系で rEmb55 タンパク質として発現させることに成功しているが、その収量は文献的に報告されている他のタンパク質と比較して低かった。近年、ブレビバチルスでは *brevibacillus in vivo cloning* (BIC) 法が開発されている。タンパク質を効率よく細胞外に分泌させるためには、適切な分泌シグナルを目的とするタンパク質と組み合わせることが重要である。BIC 法では、それぞれ異なる分泌シグナルを含む 4 種類の直線状発現ベクターを利用することができるので、目的とするタンパク質を高発現するクローンを簡便に選択することができる。本研究では、ヒスチジンタグ付きのタンパク質として、2 つの組換えエンビジンタンパク質を BIG 法で作成した。一つは I-set ドメイン、もう一つは細胞内ドメインの組換えタンパク質である。

I-set ドメインの場合には、最も強い発現は pBIC4 の分泌シグナルだった。これは pNC-HisT と同じ分泌シグナルである。BIC 系での rEmb55_BIC の収量は、rEmb55 の収量と同等だった。形質転換菌の増殖中やカラム精製の間、rEmb_BIC は分解が起こっていた可能性が高い。このような不安定性が収量の低さの理由と考えられる。細胞内ドメインの組換えエンビジンタンパク質の場合、pBIC3 の分泌シグナルをもつクローン (BIC3-8) で最も発現量が多かった。BIC3-8 を 100 ml の 2SY 培地で培養すると、カラム精製のあとの組換えタンパク質 rEmb_Ct の収量は 20 mg だった。

以上の結果から、BIC 法は部位特異的な組換えタンパク質の産生には都合のよい方法であるが、タンパク質の収量そのものはそれ自身のアミノ酸組成や構造的な安定性に関係することがわかった。

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

1. はじめに

エンビジンはイムノグロブリン (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⁾。マウスでは発生初期に発現が高く^{1,2)}。類縁タンパク質であるペイシジンと同様、モノカルボン酸輸送体の協同因子として報告されている^{3,4)}。エンビジンは、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^{2,5)}、新規

*1) 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 1 2 E-mai: kichi@dpc.agu.ac.jp

の神経筋接合部位で発現上昇すること⁶⁾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。

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構成され、細胞外や細胞内で他のタンパク質分子と相互作用することが予想される。膜タンパク質は精製が難しいため、結合タンパク質の探索には分子全体でなく、一般的に、部位特異的な組換えタンパク質を利用することが多い。筆者は、グラム陽性細菌であるブレバチルス *Brevibacillus choshinensis* の細胞外へ分泌タンパク質として組換えタンパク質を発現させる発現系^{7,8)}を利用し、エンビジンの細胞外領域の I-set ドメインを可溶性の組換えタンパク質 rEmb55として単独で発現させた⁹⁾。ブレバチルスは、組換えタンパク質の効率の良い発現系で 1 リットルの培養液から 100 mg 以上のタンパク質が精製される^{10,11,12,13)}が、エンビジン rEmb55では 0.5 mg 以下だった。近年、ブレ

バチルス発現系において菌体内相同組換えを利用した BIC (Brevibacillus in vivo cloning) 法が開発されている¹¹⁾。BIC 系では、直鎖状ベクターと目的タンパク質をコードする遺伝子 DNA を混合し、ブレバチルス宿主菌を形質転換することで 1 ステップで発現プラスミドが作成できる。さらに、ひとつの組換えタンパク質を発現させたい場合、異なる分泌シグナルをもつ発現ベクター (pBIC1, pBIC2, pBIC3, pBIC4) を利用すれば (図 1, A), 4 種類の分泌シグナルの中から最も効率の良い発現プラスミドを選択できることから、簡便で効率的な組換えタンパク質の発現系として着目されている。本研究では、ブレバチルス BIC 発現系において、異なる分泌シグナルをコードする発現ベクターを利用して、エンビジンの細胞外 I-set ドメインおよび細胞内ドメインについて、部位特異的な組換えタンパク質を作成することを試みた。

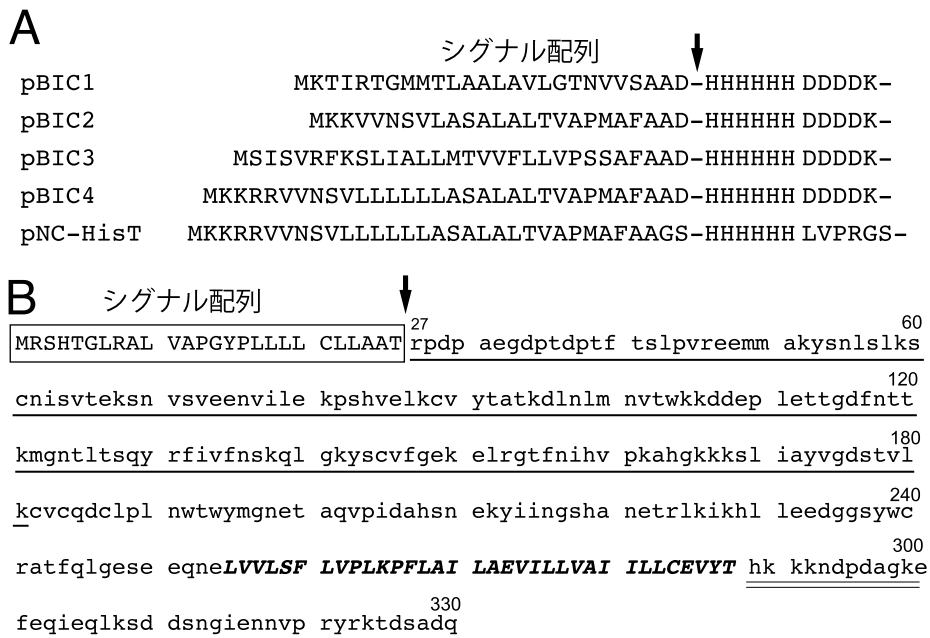


図 1 ブレバチルス発現ベクターの分泌シグナルとマウスエンビジンのアミノ酸配列

A. 4 種の pBIC 発現ベクターと pNC-HisT ベクターのシグナル部分のアミノ酸配列を示す。pBIC ベクターではエンテロキナーゼ認識配列 (DDDDK) が、pNC-HisT ではトロンピン認識配列 (LVPRGS) が目的とするタンパク質の配列と連結する。

B. マウスエンビジンは、26 アミノ酸残基のシグナル配列 (囲み) をもつ。I-set ドメインは一本線の下線、細胞内ドメインは二本線の下線、斜字体は膜貫通部分である。

A, B ともに矢印はシグナル配列の切断部位を示す。

II. 材料と方法

1. 材料

本研究では、タカラバイオ社のブレビバチルス発現系キットおよび PCR 試薬を使用した。ブレビバチルス培養用の 2 SY 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とブレビバチルスの形質転換

マウスエンビジン cDNA を鋳型とし、I-set ドメインについては、mEmb_BIC89_F, 5'-GATGACGATGACAAA CGCCCTGATCCGGCTGAG 3' と mEmb_BIC555_Rv, 5'-CATCCTGTAAAGCTT CACTTCAGCACAGTAGAAT 3', 細胞内ドメインについては mEmb_BIC862_F, 5'-GATGACGATGACAAA GAAGTGACACACAAG 3' と mEmb_BIC999_Rv, 5'-CATCCTGTAAAGCTT CACTGATCTGCAGAGTCAG 3' をプライマーとして Prime Script taq ポリメラーゼにより PCR 反応を行った。反応生成物をそれぞれアガロースゲル電気泳動で精製し DNA 濃度を測定した。pBIC DNA (50 ng) と PCR 生成物をモル比で 1:2 になるよう混合し、キットの説明書にしたがってブレビバチルスコンピテントセルを形質転換し、ネオマイシン入りの MT 寒天培地にまき 37°C で一晩培養した。pBIC ベクターに共通する配列を利用して、6 個から 12 個のコロニーに対して PCR を行いインサートの長さ確かめ、正しいものだけをネオマイシン (終濃度 25 μ g/ml) を含む 3 ml の 2 SY 培地 (2 SY/Nm) および TM 培地 (TM/Nm) にそれぞれ植菌し、30°C, 120 rpm で培養した。菌体から得られたプラスミド DNA を用い、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) 組換えエンビジンタンパク質の発現確認、カラムによる精製

液体培養開始後 24 時間で、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 PVDF 膜 (孔径 0.22 μ m) にタンパク質を転写した¹⁴⁾。抗 Penta-His 抗体 (マウスモノクローン抗体, キアゲン社) を一次抗体, HRP 標識抗マウス IgG 抗体を二次抗体とし、ECL-Prime (GE ヘルスケア社) で発光させライトキャプチャー (アトー社) で検出した。

エンビジンタンパク質の精製では、組換えタンパク質を高発現するブレビバチルスのクローンを選り、グリセロールストックを 100 ml の 2 SY/Nm 培地に植え、30°C, 120 rpm 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 アガロースカラム (キアゲン社) をカラムバッファー (50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.2, 0.3 M NaCl, 10 mM イミダゾール) で平衡化し、培養上清を通過させた後、20 ml のカラムバッファーで洗浄した。溶出には、カラムバッファーに、それぞれ 100 mM, 200 mM, 300 mM のイミダゾールを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⁹⁾。得られた組換えタンパク質は Pierce 660nm Protein Assay kit (サーモサイエンティフィック社) で定量した。

III. 結果

1. エンビジン I-set ドメインの組換え体 (rEmb55_BIC) の発現

4 種類の pBIC ベクターのそれぞれに同一の DNA 断片を同時にクローニングし、形質転換されたブレビバチルス菌のコロニーを得た。エンビジン遺伝子をもつプラスミドが含まれるかどうかを PCR 法で調べたところ、pBIC1, 2, 3, 4 でそれぞれ 12 個のコロニーあたり 2, 10, 6, 5 個だった。同じベクター由来の形質転換菌を 3 クローンずつ液体培養し、発現の高いものを 1 つ選択した。シグナル配列による組換えタンパク質の発現量を比較するため同一の条件で培養し SDS-PAGE とウェスタンブロット法で比較した (図 2, A)。I-set ドメインでは、4 つのベクターのいずれにおいても組換えタンパク質が産生されていたが (図 2, A, 下段)、BIC4 のクローンが最も発現が高く、BIC2 のクローンで発現が低かった。この組換えタンパク質のアミノ酸配列 (図 1, B) は、rEmb55 と同一であるが、BIC ベクターより生成されることから rEmb55_BIC と命名した。組換えエンビジンの産生量は、TM/Nm 液体培地の方が 2 SY/Nm 液体培地を

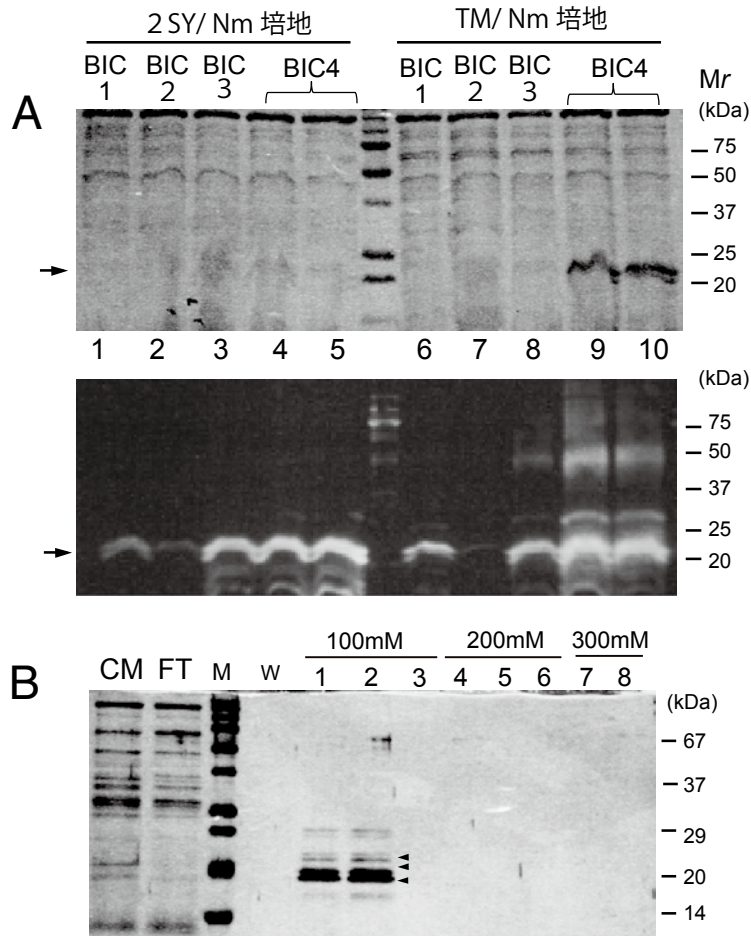


図2 エンビジンのBIC法I-setドメイン組換えタンパク質の発現とカラム精製

- A. BICベクターごとの発現。上段はCBB染色したゲル，下段は，膜に転写後の抗Penta-His抗体によるウェスタンブロット。レーン1と6 (BIC1-5)，レーン2と7 (BIC2-3)，レーン3と8 (BIC3-4)，レーン4と9 (BIC4-2)，レーン5と10 (BIC4-8)。矢印は，発現した組換えタンパク質を示す。
- B. BIC4-2クローンを用いたI-setドメイン組換えタンパク質のカラム精製培養上清 (CM)，カラム通過 (FT)，洗浄 (W)，1から8は，溶出画分。矢頭は，溶出された組換えタンパク質 rEmb55_BICを示す。

用いた場合より多かった (図2, A, 上段)。しかしながら，TM/Nm培地で培養した場合には，カラムクロマトグラフィーを行うと予想されるサイズより小さいところに複数本のバンドが認められ，本来の組換えタンパク質の収量が少いことがわかった。そこで，2 SY/Nm液体培地でBIC4-2を培養しカラム精製を行った (図2, B)。BIC4-2由来の組換えエンビジン rEmb55_BICは，すでに報告した rEmb55と同様，100 mM イミダゾールで溶出され，SDS-PAGEでは19 kDaのサイズを示した。収量は，培養ごとにばらつきがあり，100 mlの培養液あたり20から40 μ gだった。

2. エンビジン細胞内ドメインの組換え体 (rEmb_Ct) の発現

I-setドメインの場合と同様，4種類のpBICベクターのそれぞれに同一のDNA断片を同時にクローニングし，形質転換されたブレヴィバチルス菌のコロニーを得た。エンビジン遺伝子をもつプラスミドが含まれるかどうかをPCR法で調べたところ，pBIC1, 2, 3, 4でそれぞれ6個のコロニーあたり3, 3, 6, 2個だった。TM/Nm液体培地で培養し，培養上清中に含まれる組換え体をSDS-PAGEとウェスタンブロット法で調べた (図3, A)。細胞内ドメインとして46アミノ酸残基発現させているが，CBB染色でも抗Penta-His抗体でもバンドとして検出することができた。TM/Nmと

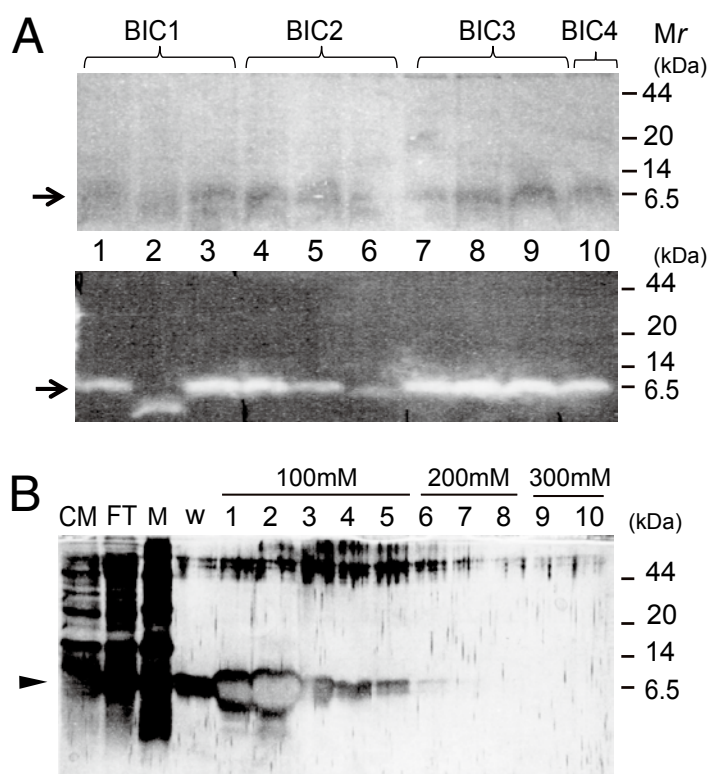


図3 エンピジンの BIC 法細胞内ドメイン組換えタンパク質の発現とカラム精製

- A. BIC ベクターごとの発現. 上段は CBB 染色したゲル, 下段は, 膜に転写後の抗 Penta-His 抗体によるウェスタンブロット. レーン 1 (BIC1-7), レーン 2 (BIC1-8), レーン 3 (BIC1-8), レーン 4 (BIC2-2), レーン 5 (BIC2-5), レーン 6 (BIC2-6), レーン 7 (BIC3-7), レーン 8 (BIC3-8), レーン 10 (BIC4-10). 矢印は, 発現した組換えタンパク質を示す.
- B. BIC3-8 クローンを用いた細胞内ドメイン組換えタンパク質のカラム精製培養上清 (CM), カラム通過 (FT), 洗浄 (W), 1 から 8 は, 溶出画分. 矢頭は, 溶出された組換えタンパク質 rEmb_Ct を示す.

2SY/ Nm の 2 種類の培養液でそれぞれ BIC3-8 を培養したところ, TM/ Nm 培地の方が発現量が多く, 分解は起こっていなかった. そこで, TM/ Nm 液体培地で BIC3-8 を培養し, カラムクロマトグラフィーで組換えタンパク質 rEmb_Ct を精製した (図 3, B). 100 mM イミダゾールで溶出され, 100 ml の培養液で 20 mg を回収することができた. これは I-set ドメインの場合の 1000 倍の発現量である.

IV. 考察

今回, BIC 法を用い 2 つの組換えエンピジタンパク質を発現させることができた. 分泌シグナルは, タンパク質の分泌効率に大きな影響を及ぼす要素である. 目的タンパク質と相性のよい分泌シグナルを選ぶことが効率的なタンパク質の発現と精製には必要であ

る. 特に, タンパク質の部分配列を人工的に組換えタンパク質として発現させる場合には, 適切なシグナル配列が必要である^{9,15)}.

I-set ドメインの組換えタンパク質として rEmb55_BIC を作成した. 産生量の最も多い形質転換菌は, pBIC4 由来の分泌シグナルをもつ BIC4-2 だった. この分泌シグナルは pNC-HisT ベクターでコードされる配列と同一である. 結果として, rEmb55 を超える収量をもつ菌を得ることができなかった. rEmb55_BIC を産生する形質転換菌 BIC4-2 は, MT/ Nm 培地で効率よく組換え体を分泌した (図 2, A). しかしながら, 大量培養では分解産物や組換え体と関係のないタンパク質が同時に分泌されてカラム精製が困難だった. ブレバチルス発現系で使用する菌はプロテアーゼ活性が低いことが特徴であるが, rEmb55 では組換え体は C 末端側が欠落し短くなった分子がカラムで精製され

てきた⁹⁾。I-set ドメインの組換えタンパク質がプレバチルス菌体内あるいは培養液中において、不安定で分解されやすい性質をもつと考えられる。一方、pNC-HisT ベクターを利用した組換えタンパク質を発現では 1 リットルで 0.5 g の収量があることが報告されている¹⁰⁾。以上の結果から、I-set ドメイン組換えタンパク質の発現効率の低さは分泌シグナルによるものではなく、目的とするポリペプチド自体の構造的特性によるものと考えられる。

細胞内ドメイン 46 アミノ酸残基をもつエンビジン組換えタンパク質 rEmb_Ct は、pBIC3 の分泌シグナルが最も効果的だった。組換えタンパク質は、100 ml の培養液からカラムで一度に 20 mg 精製することができ十分な量であった。

BIC 法はクローニング用の DNA 断片が準備できれば直線状のベクターとまぜて形質転換を行うことで形質転換菌を得ることができる。さらに 2-3 日の液体培養を行うことで、4 種類の発現ベクターごとの組換えタンパク質の発現量の比較までできた。形質転換菌のプレートは低温保存ができないため、最初の液体培養の一部をグリセロールストックとして -80°C で保存することが重要であった。大量培養はグリセロールストックがあればいつでも可能であった。BIC 法は、簡便で効率的に組換えタンパク質を産生させるよい方法と思われるが、実際の収量は目的とするポリペプチドのアミノ酸組成や高次構造の安定性に関係があることがわかった。

謝辞

DNA シーケンサーの使用に際して、愛知学院大学歯学部吉村文信教授の協力と支援をうけたことに深く謝意を表す。

文献

- 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.
- 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.
- 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).
- Mannowetz N, Wandernoth P, Wennemuth G. (2012) J Cell Physiol. **227**, 2154-62. Basigin interacts with both MCT1 and MCT2 in murine spermatozoa.
- 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.
- 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.
- Takagi H, Kadowaki K, Udaka S. (1989) Agric. Biol. Chem., **53**, 691-699. Screening and Characterization of Protein-Hyperproducing Bacteria without Detectable Exoprotease Activity.
- 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*.
- 市原啓子 (2014) 心身科学 6 巻 (1), 119-124. プレ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.
- Yashiro K, Lowenthal JW, O'Neil TE, Ebisu S, Takagi H, Moore RJ. (2001) Protein Expression and Purification **23**, 113-120. High-Level Production of Recombinant Chicken Interferon- γ by *Brevibacillus choshinensis*.
- Mizukami M, Hanagata H, Miyauchi A. (2010) Curr Pharm Biotechnol. **11** (3) : 251-8. *Brevibacillus* expression system: host-vector system for efficient production of secretory proteins.
- 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.
- Mizukami M, Tokunaga H, Onishi H, Ueno Y, Hanagata H, Miyazaki N, Kiyose N, Ito Y, Ishibashi M, Hagihara Y, Arakawa T, Miyauchi A, Tokunaga M (2014) Protein Expr Purif. **105C**, 23-32. Highly efficient production of VHH antibody fragments in *Brevibacillus choshinensis* expression system.
- 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.
- Ichihara-Tanaka K, Titani K, Sekiguchi K. (1990) J Biol Chem. **265**, 401-7. Recombinant carboxyl-terminal fibrin-binding domain of human fibronectin expressed in mouse L cells.

(最終版平成 26 年 12 月 31 日受理)

Expression and purification of domain-specific recombinant embigin proteins using *Brevibacillus* in vivo cloning system

Keiko Ichihara-Tanaka

Abstract

Embigin is a cell surface transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin (Ig) superfamily. Embigin is reported as the cofactor of monocarboxylate transporter 2, and described as the modulator of neuromuscular junction formation, but its function is not fully understood. In addition, it is not known what proteins are associated with embigin in the cytoplasmic region. To elucidate the molecular interaction of membrane protein with other proteins, domain-specific recombinant proteins are widely used, because the whole molecule of transmembrane protein is hard to purify.

As previously reported, the recombinant embigin protein containing I-set domain (rEmb55) was successfully produced using expression vector pNC-HisT with *brevibacillus* expression system, but the yield was low compared to the other proteins reported. Recently *Brevibacillus* in vivo cloning (BIC) system has been developed. Taking advantage of four linearized expression vectors encoding the different signal sequence, high expression clones can be easily screened, because combination with the appropriate signal sequence is essential for the effective secretion of proteins outside cells. In this study, the author have made two recombinant embigin proteins with a histidine tag sequence with *brevibacillus* expression system. One contains the I-set domain, and the other contains the cytoplasmic domain.

In the case of the I-set domain, the most effective secretion signal was pBIC4, the same sequence as pNC-HisT. The yield of rEmb55_BIC was similar to rEmb55 as reported. During the bacterial culture and protein purification, rEmb55_BIC could well make degradation. This instability is likely the reason for the low yield. In the case of the cytoplasmic domain, pBIC3 expression plasmid (clone BIC3-8) was the highest level. From the culture of BIC3-8 in the 100 ml 2SY medium rEmb_Ct protein was yielded at 20 mg after column purification.

In conclusion, although the BIC expression system is a convenient tool for the production of domain specific recombinant proteins, the amount of protein yield is likely to be affected by the amino acid composition and/or structural stability of the polypeptide itself.

Keywords: embigin, *Brevibacillus choshinensis*, recombinant, expression, purification, *brevibacillus* in vivo cloning method