

報 文

セルロース担体セルロファインに対するセルロース結合部位を付加した融合タンパク質の吸着

柏木 豊^{1, §}, 山口 加奈子¹, 吉田 智子¹, 栗原 洋子¹, 木村 佳枝²,
成田 清一³, 楠本 憲一¹, 鈴木 聡¹

¹食品総合研究所, ²青森県農林総合研究センターグリーンバイオセンター,
³青森県ふるさと食品研究センター下北ブランド研究開発センター

Adsorption of a recombinant protein with cellulose binding module on a cellulose based chromatographic matrix, Cellulofine

Yutaka Kashiwagi^{1, §}, Kanako Yamaguchi¹, Tomoko Yoshida¹, Yoko Kurihara¹, Yoshie Kimura²,
Seiichi Narita³, Ken-ichi Kusumoto¹, Satoshi Suzuki¹

¹National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

²Agricultural Biotechnology Research Center of Aomori Prefecture, 221-10 Nogi-Yamaguchi, Aomori, Aomori 030-0142

³Aomori Prefectural Local Food Research Center, 154 Ueno, Oohara, Mutsu, Aomori 039-4401

Abstract

A fusion protein gene of endo-β-glucanase (EG) attached cellulose binding module (CBM) was constructed. The end-β-glucanase gene was cloned from fungus *Robillarda* sp. strain NFRI1090 and the CBM gene was cloned from fungus *Trichoderma viride*. The fusion protein gene was transformed to *Pichia pastoris* gene expression system and the fusion proteins were produced as recombinant protein. The fusion protein, EG attached CBM, adsorbed on Cellulofine CG-700 m column in low salt concentration buffer and easily eluted by high salt concentration buffer. The fusion protein method with CBM is useful for separation of a recombinant protein from crude protein mixture.

緒 言

近年の急速な生物ゲノムの塩基配列解析の進展に伴い、莫大な数の遺伝子が明らかになってきた。ゲノム情報解析を引き継ぐポストゲノム研究として、明らかになった遺伝子機能の解明に注目が集まっている。遺伝子機能の解析における研究手段の一つとして、遺伝子にコードされたタンパク質を DNA 組み換え技術によって生産し、タンパク質を単離精製してその性質を

解明することが考えられる。しかしながら、一般に、微生物等の組み換え技術によって生産したタンパク質は、微生物細胞由来のタンパク質等の成分と複雑に混在しており、目的タンパク質を精製するには多くの精製ステップを要することが予想される。そこで、酵素等が基質に対して特異的に吸着する性質を利用したアフィニティーによる分離技術が考えられている。組み換え DNA 技術を用いて、酵素の基質結合領域を付加した融合タンパク質を生産し、不溶性基質を担体として基質結合領域のアフィニティーによる分離方法も開

2007年11月8日受付, 2007年12月10日受理

§連絡先 (Corresponding author) ykswg@affrc.go.jp

発されている。デンプン、キチンに対する結合領域の利用¹⁾²⁾や、His オリゴマーをアフィニティータグとして用いる方法³⁾などは実験室的な分離技術として用いられている。これらの方法は、担体に対する特異的結合性を利用するため、分離効率がよいことが期待されている。目的タンパク質に対して、付加する複数のアフィニティータグを用意し、これらの組み合わせによって、適したアフィニティータグを選択できることは、多様な遺伝子の翻訳産物を分離精製するためには、有用なことである⁴⁾⁵⁾。

アフィニティータグの一つとして、嫌気性菌 *Clostridium* 属菌由来セルラーゼのセルロース結合モジュール (Cellulose binding module: CBM) が強力な結合力を有することが知られている⁶⁾。一方、糸状菌由来セルラーゼの CBM は、比較的分子量で、セルロースに対して、中程度の結合力を示すことが知られている⁷⁾。

そこで、本研究では、糸状菌 *Trichoderma viride* 由来セロビオヒドロラーゼ (cellobiohydrolase: CBH) I のセルロース結合モジュール (CBM) をアフィニティータグとして用い、目的タンパク質の分離手法について検討した。セルロース吸着性が低いエンド- β -グルカナーゼ (endo- β -glucanase: EG) を目的タンパク質とし、CBM との融合タンパク質を組み換え DNA 技術によって作製し、得られた融合タンパク質をセルロース系クロマトグラフィー担体に対するアフィニティーによって分離する手法を確立し、得られた知見を報告する。

実験方法

1. 菌株および培地

使用した微生物は以下の通りである。CBM 遺伝子のクローニングには、*Trichoderma viride* IFO31137 株を用いた。酵素タンパク質の生産には、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* GS115 株を用いた。各種ベクターの作製および DNA シーケンス用プラスミドの調製には、*Escherichia coli* DH5a 株を用いた。

2. 遺伝子クローニング

T. viride 由来 CBHI の CBM 遺伝子クローニングは、ゲノム DNA をテンプレートとしてダイレクト PCR 法を用いて行った。*T. viride* IFO31137 株を YPD 液体培地 (2%ポリペプトン, 1%酵母エキストラク

ト, 2%グルコース, 40mg/L 硫酸アデニン) 中にて、25°C, 2日間、振とう培養し菌体を収集した。得られた菌体から、ISOPLANT (ニッポンジーン) を用い、取扱説明書に記載の操作に従ってゲノム DNA を抽出した。

T. viride 由来 CBHI 遺伝子の塩基配列情報 (DDBJ: AB021656) をもとにして、リンカー-セルロース結合モジュール (linker-CBM) 領域の 5'-および 3'-末端に対応する PCR プライマー、Primer1 および Primer2 を合成した。Primer4 には *Robillarda* sp. NFRI1090 株由来エンド- β -グルカナーゼ I (EGI) cDNA の翻訳終止コドン直前の 12nt 配列を付加し、Primer5 は終止コドン直後に PstI 制限サイトを付加した。これらのプライマーを用いて *T. viride* ゲノム DNA を鋳型として PCR 法によって linker-CBM 領域を増幅した。PCR 反応は、KOD-Plus-DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) を用いて取扱説明書の記載に従って行った。

一方、*Robillarda* sp. NFRI1090 株由来エンド- β -グルカナーゼ I (EGI) (DDBJ: AB030819) の cDNA をベクター pHIL-D2 (Invitogen) に組み込んだ pHILD2-EGI を鋳型 DNA として、PCR プライマー Primer3 および Primer4 を用いて、EGI をコードする DNA 断片を増幅した。Primer3 は EGI cDNA の EcoRI 制限サイトを含ま 87~106 番目の配列を用い、Primer4 は linker-CBM における linker 領域の 5 末端 12nt を付加してある。

続いて、PCR 増幅によって得られた linker-CBM 断片と EGI 断片を等モル混合し、Primer3 および Primer2 を用いて、fusion PCR を行い、EGI-linker-CBM 遺伝子を作製した。以上の PCR 反応は、KOD-Plus-DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) を用いて取扱説明書の記載に従って操作を行った。

3. 遺伝子導入ベクタープラスミドの構築

プラスミドベクター pHILD2-EGI を EcoRI および PstI にて消化し、pHIL-D2 プラスミド本体を含む断片をアガロース電気泳動により分離精製した。一方、PCR 増幅断片 EGI-linker-CBM を PstI- EcoRI によって消化し、アガロース電気泳動によって精製した。得られた pHIL-D2 および EGI-linker-CBM 断片を、T4 DNA リガーゼ (Ligation Kit Ver.2, TAKARA) によって連結した。

4. 酵母による融合タンパク質生産

遺伝子産物の分泌生産には、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* GS115 株を宿主とした遺伝子発現系である *Pichia* Expression Kit (Invitrogen, USA) をもちいた。形質転換および形質転換株の培養は、取扱説明書の記載に従って操作を行った。

5. セルロース担体に対するアフィニティーによる融合タンパク質の分離

pHILD2-EGI を保持する形質転換株、pHILD2-EGI-linker-CBM を保持する形質転換株を、それぞれメタノール誘導条件にて培養し、セルロース活性を有する培養上清を得た。90%飽和硫酸アンモニウムによって塩析を行い、15,000rpm, 20min. の遠心分離により沈殿を収集した。タンパク質沈殿を 0.01M 酢酸緩衝液 (pH5.5) — 0.05M NaCl に対して透析を行い、部分精製酵素を得た。

セルロース担体には、Cellulofine CG-700 m (生化学工業) を用いた。Cellulofine CG-700 m カラム (ϕ .1.0 × 14.5 cm) を 0.01M 酢酸緩衝液 (pH5)–0.05M NaCl (Buffer 1) にて平衡化し、部分精製酵素液をカラムにアプライし酵素を吸着させた。流速 0.7 mL/min. にて緩衝液を送液し、カラムを洗浄した後、0.01M 酢酸緩衝液 (pH5)–0.1M NaCl (Buffer 2) に緩衝液を交換し、同じ流速にて送液し溶出を行った。

6. 分析方法

酵母 *Pichia pastoris* 形質転換株の酵素活性の検出は、形質転換株を、1%カルボキシメチルセルロース (CMC) を添加した寒天平板培地に生育させ、Congo Red による染色にて行った。0.1% Congo Red 溶液を酵母コロニーが生育した寒天平板培地シャーレに注ぎ入れて、室温にて 10~30 分間染色し、Congo Red 液を廃棄した後、1M NaCl にて遊離 Congo Red 色素を除去し、コロニー周囲のハローの有無によって CMC 分解活性を検出した。

酵素活性は、1%カルボキシメチルセルロース (CMC) を基質として、0.1M 酢酸緩衝液 (pH5) 中、

37°C にて酵素反応を行い、生成する還元糖量を Somogyi-Nelson 法にて定量することによって測定した。グルコースを標準として、1 分間に 1 μ mol の還元糖を遊離する酵素量を 1 ユニットとした。

タンパク質量は、牛血清アルブミンを標準として、DC プロテインアッセイ (BioRad, USA) によって測定した。

カラム溶出液のタンパク質量の測定は、各フラクションの 280 nm の紫外吸収を測定することによった。

SDS-PAGE は、Laemmli の方法⁸⁾ に準拠し、プレキャストゲル (レディーゲル J, BioRad) を用いて行った。分子量スタンダードとして、SDS-PAGE スタンダード Broad (BioRad) を用いた。

DNA シーケンスは、Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Kit V1.1 (Applied Biosystems, USA) を用いて、ABI PRISM 310 ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems, USA) によって行った。

実験結果および考察

1. *T. viride* CBHI の cellulose binding module のクローニング

Fig. 1 に示した手順にしたがって *T. viride* CBHI の CBM をクローニングした。*T. viride* 菌体からゲノム

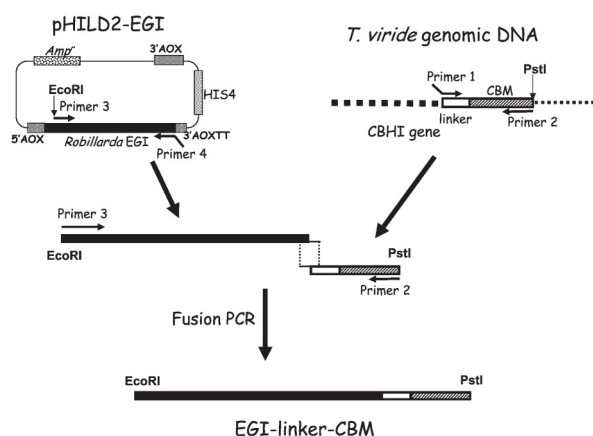


Fig 1. PCR cloning of the fusion protein gene, EGI-linker-CBM

Table 1. PCR Primers

Primer1:	5'-ACCTCAAGAGCACCTGGCGGAAAC-3'
Primer2:	5'-CTCTCAGTGCTTGTAACCTGCAGAC-3'
Primer3:	5'-GGAGAATTCGGCGTCTGGTC-3'
Primer4:	5'-CTCACCTCAAGAGCACCTGGCGGAAAC-3'

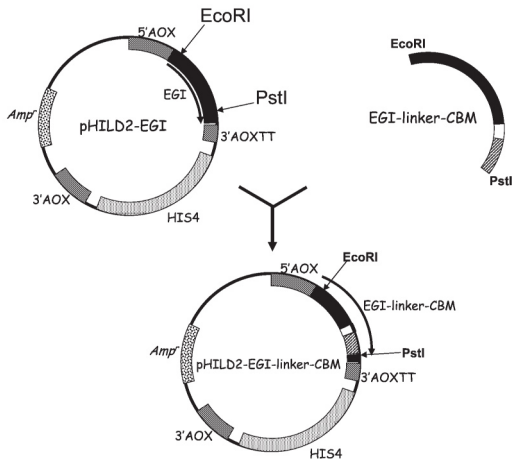


Fig 2. Construction of the recombinant plasmid pHILD2-EGI-linker-CBM

DNA を抽出し、これを鋳型として、Table 1 に示した Primer4 および Primer5 を用いて、ダイレクト PCR によって、linker-CBM 断片を増幅した。一方、*Robillarda* sp. 株由来の EGI を組み込んだプラスミドベクターを鋳型として、Primer4 および Primer5 を用いて EGI をコードする DNA 断片を増幅した。得られた EGI 断片と linker-CBM 断片を混合し、Primer6 および Primer5 を用いて fusion PCR 法によって、EGI-linker-CBM をコードする DNA 断片約 1.3 kb を作製した。

Fig. 2 に示すように、得られた DNA 断片を、実験方法に記載した操作にて pHILD2- EGI ベクターの EcoRI-PstI 切断部位に組み込み、組み換えベクター pHILD2-EGI-linker-CBM を構築した。

2. 酵母への遺伝子導入と融合タンパク質の生産

組み換えベクター pHILD2-EG-linker-CBM および pHILD2-EGI をそれぞれ *Pichia pastoris* GS115 株に対してエレクトロポレーション法によって形質転

(A) Recombinants by pHILD2-EGI (B) Recombinants by pHILD2-EGI-linker-CBM

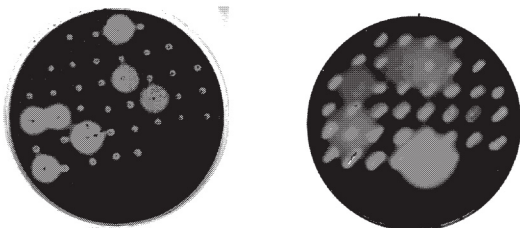


Fig 3. Detection of the recombinant strains of cellulase secreting

換を行った。形質転換株は、宿主株の His 要求性を相補し最小培地に生育するコロニーを選択した。形質転換株のコロニーを、1% CMC を含む最小培地に移植し、コロニー形成後、Congo Red 染色によって、CMC 分解活性を有する形質転換株を選択した。Fig. 3 に示すように、組み換えプラスミド pHILD2-EGI-linker-CBM ならびに pHILD2-EGI による形質転換株の中から、Congo Red 染色におけるハローを生じる株が得られた。糸状菌 *Robillarda* のエンド- β -グルカナーゼ I (EGI) は、菌体外分泌酵素である。ここで、酵母 *Pichia pastoris* の酵素生産系に用いたベクター pHILD2 は、分泌シグナル配列を持たない発現ベクターである。*P. pastoris* は、糸状菌由来酵素 EGI の

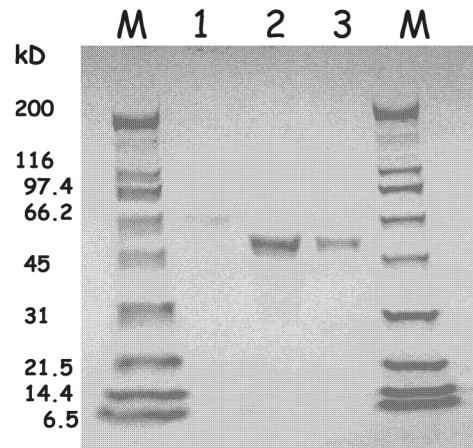


Fig 4. SDS-PAGE of recombinant enzymes
1: EGI-linker-CBM, 2: EGI, 3: purified EGI standard

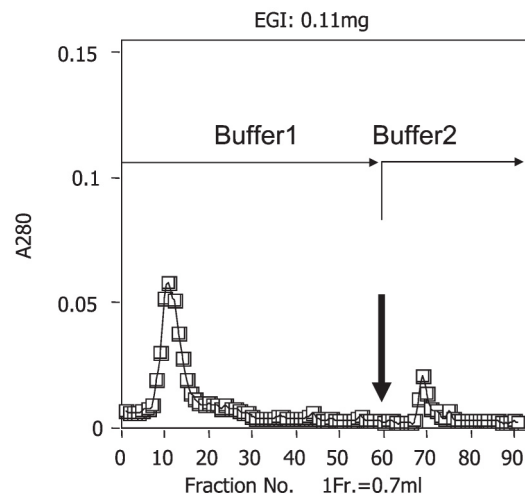


Fig 5. Elution profiles of EGI on Cellulofine column

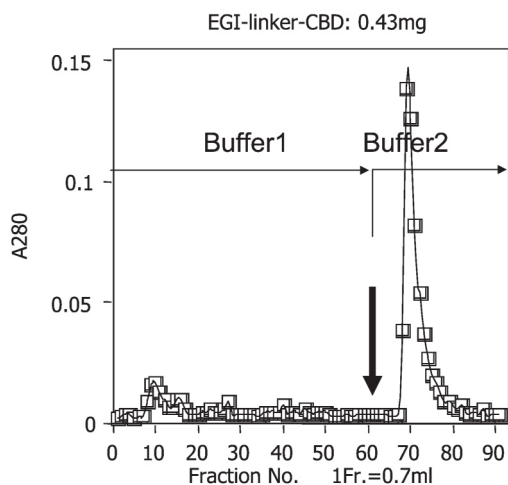


Fig 6. Elution profiles of EGI-linker-CBM on Cellulofine column

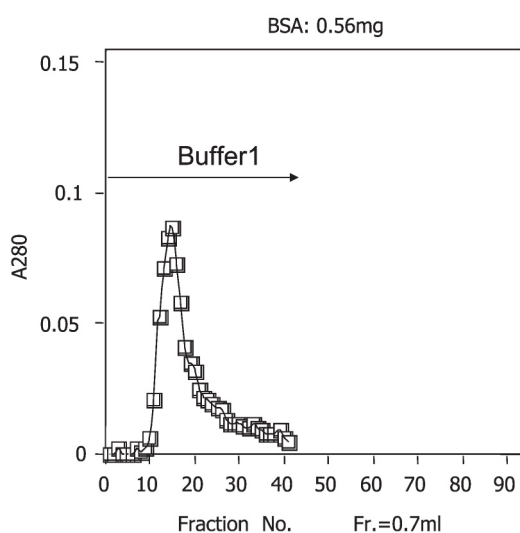


Fig 7. Elution profiles of BSA on Cellulofine column

分泌シグナル配列を認識し、酵母菌体外に分泌していた。

Fig. 3 に示したハロー形成株のうちから、それぞれ1つの菌株を選択し、メタノールによる誘導培養を行い、培養上清から硫酸アンモニウム塩析により酵素タンパク質を濃縮した。得られたタンパク質濃縮液を透析し、SDS-PAGEによりタンパク質を分析したところ、各タンパク濃縮液のCBB染色バンドはほぼ単一のバンドを与えた。Fig. 4のlane1, lane2およびlane3は、それぞれpHILD2-EGI-linker-CBM形質転換株、pHILD2-EGI形質転換株の培養上清の濃縮液、および精製EGI標品である。P. pastoris形質転換株は、本実

験で用いた培養条件では、導入遺伝子がコードするタンパク質を効率よく分泌生産し、硫酸アンモニウムによる塩析で、比較的高純度の目的タンパク質を得ることができた。

3. Cellulofine CG-700 m カラムによる目的タンパク質の吸着、脱吸着

エンド- β -グルカナーゼ I (EGI) 0.11 mg を Cellulofine CG-700 m カラムに重層し、低塩濃度の Buffer1 にて通液した溶出パターンでは、フラクション 11 をピークとする溶出曲線が得られ、カラムにアプライした EGI のほぼ全量が吸着せずに溶出した。カラム容積の約 3.7 倍の Buffer1 にてカラムを洗浄後、高塩濃度の Buffer2 に溶出緩衝液を交換してカラムに通液すると、わずかな溶出ピークが得られた。

EGI-linker-CBM の 0.43 mg を、Buffer1 にて平衡化した同じカラムに重層し、カラム容積の約 3.7 倍の Buffer1 にて洗浄したが、ほとんどタンパク質は溶出しなかった。続いて、高塩濃度 Buffer2 に溶出緩衝液を交換し通液すると、吸着していたタンパク質のほぼ全量が単一のタンパク質ピークとして溶出し、回収された。

標準試料として牛血清アルブミン (BSA) の 0.56 mg を Buffer1 にて平衡化した同じカラムに重層し、Buffer1 にて通液すると、カラムのベッド容積に相当するフラクションにほぼ全量が溶出し、セルロースに対して相互作用しないタンパク質は、低塩濃度条件にてカラムに吸着せずに溶出した。

T. viride 由来の酵素 CBHI のセルロース結合モジュールを、セルロース担体 Cellulofine CG-700m に吸着性を示さないエンド- β -グルカナーゼに付加した融合タンパク質は、強力な吸着性を示すことが明らかになった。さらに、融合タンパク質が吸着したセルロース担体からは、吸着タンパク質を高塩濃度緩衝液によって容易に溶出回収することができた。

本研究では、組み換え DNA 技術によって、セルラーゼのセルロース結合モジュール (CBM) を付加した融合タンパク質を酵母 P. pastoris の遺伝子発現系によって生産し、得られた CBM 付加タンパク質をセルロース担体によって、分離精製することが可能であることを明らかにした。本研究にて作製した CBM 付加ベクター、P. pastoris 遺伝子発現系、セルロース担体 Cellulofine を用いることにより、組み換えタンパク質の分離精製の簡便化が可能であると考えられる。

謝 辞

本研究は、農林水産省交付金研究プロジェクト「動植物工場」によって行われたものである。

要 約

糸状菌 *Robillarda* sp. NFR11090 株由来エンド- β -グルカナーゼ (EGI) に *Trichoderma viride* 由来セロビオヒドロラーゼ I のセルロース結合モジュール (CBM) を付加した組み換え融合タンパク質遺伝子を作製し、*Pichia pastoris* の分泌発現系に導入することによって生産した。得られた組み換え融合タンパク質のセルロース担体カラムに対する吸着、脱着を行い、融合タンパク質 (EGI-linker-CBM) が Cellulofine CG-700 m カラムに対して低塩濃度にて吸着し、高塩濃度条件にて容易に溶出回収することが可能であることを明らかにした。CBM を付加した組み換え融合タンパク質を Cellulofine によって吸着、溶出することは、組み換えタンパク質の分離精製において有用である。

参考文献

- 1) T. Paldi, I. Levy, O. Shoseyov, Glucoamylase starch-binding domain of *Aspergillus niger* B1: molecular cloning and functional characterization, *Biochem. J.*, **372**, 905-910 (2003)
- 2) M. Hashimoto, T. Ikegami, S. Seino, N. Ohuchi, H. Fukuda, J. Sugiyama, M. Shirakawa, T. Watanabe, Expression and characterization of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12, *J. Bacteriol.*, **182**, 3045-3054 (2000)
- 3) S. T. Loughran, N. B. Loughran, B. J. Ryan, B. N. D' Souza, D. Walls, Modified His-tag fusion vector for enhanced protein purification by immobilized metal affinity chromatography, *Anal. Biochem.*, **355**, 148-150 (2006)
- 4) M. Linder, T. Nevanen, L. Soederholm, O. Bengs, T. T. Teeri, Improved immobilization of fusion protein via cellulose-binding gomains, *Biotechnol. Bioeng.*, **60**, 642-647 (1998)
- 5) P. Tomme, A. Boraston, B. McLean, J. Kormos, A. L. Creagh, K. Sturch, N. R. Gilkes, C. A. Haynes, R. A. J. Warren, D. G. Kilburn, Characterization and affinity application of cellulose-binding domains, *J. Chromatogr. B*, **715**, 283-296 (1998)
- 6) E. Shpiget, A. Goldlust, G. Efroni, A. Avraham, A. Eshel, M. dekel, O. Shoseyov, Immobilization of recombinant Heparinase I fused to cellulose-binding domain, *Biotechnol. Bioeng.*, **65**, 17-23 (1999)
- 7) G. Carrad, M. Linder, Widely different off rates of two closely related cellulose-binding domain from *Trichoderma reesei*, *Eur. J. Biochem.*, **262**, 637-643 (1999)