

クロロカテコール分解を調節するタンパク質CbnRの 大量発現条件の検討

著者	森内 良太, 小川 直人
雑誌名	技術報告
巻	20
ページ	35-38
発行年	2015-03-10
出版者	静岡大学技術部
URL	http://doi.org/10.14945/00009243

クロロカテコール分解を調節するタンパク質

CbnR の大量発現条件の検討

○森内良太¹、小川直人²

¹静岡大学 技術部 教育研究支援部門、²静岡大学 農学研究科 共生バイオサイエンス専攻

1. 背景

土壌細菌である *Cupriavidus necator* NH9 株は、ポリ塩化ビフェニル (PCB) 代謝産物である 3-クロロカテコールを分解する遺伝子群を有しており、それら遺伝子群の発現は転写調節因子である CbnR タンパク質により制御されている¹⁾²⁾。LysR 型転写調節因子ファミリー (LTTR) に属している CbnR は、被制御遺伝子群の上流に位置するプロモーター領域に結合し、さらに誘導物質であるムコン酸を認識することで転写を活性化させる (Fig. 1)。しかし、CbnR による発現調節メカニズムの全体像については不明である。その理由として、CbnR と DNA が結合した共結晶構造が捉えられておらず、実態がわからないためである。そこで CbnR/DNA の複合体を得るために、まずは大量の精製 CbnR が必要となった。本研究において私は、CbnR タンパク質大量精製の基盤となる、大量発現条件の検討を支援した。

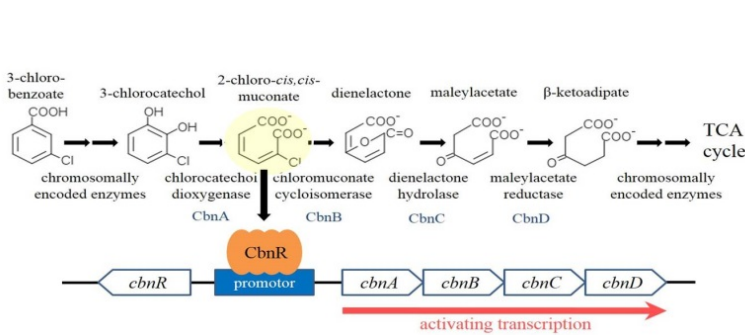


Fig. 1 CbnR による *cbn* オペロンの転写制御様式

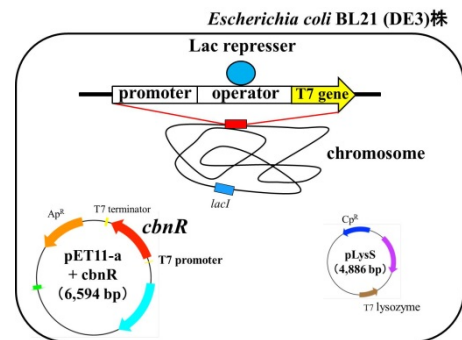


Fig. 2 本発現系が持つ染色体とプラスミド模式図

2. 目的と実験計画

2.1 目的

これまでの研究より、大腸菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pLysS 株に、*cbnR* 遺伝子をクローニングしたプラスミド pET11a+*cbnR* を組み込んだ系が作製された (Fig. 2)。また本発現系を使用した CbnR の発現は、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加することで誘導され、その誘導温度と時間はそれぞれ 37°C、3 時間 (これを従来の条件とする) で行われていた。このとき、大腸菌から抽出した粗タンパク質の濃度は 3.7 mg/ml であった。本研究では、上記発現系を用いて抽出した粗タンパク質の濃度と CbnR の発現量を、従来の条件よりも多くすることを目的とした。

2.2 実験計画

上記のように、本発現系における CbnR の発現は IPTG により調節されている。つまり、IPTG を添加することで染色体上のオペレーターからリプレッサーが外れ、T7 ポリメラーゼが誘導されて、pET11a+*cbnR* 上にある T7 プロモーター下流の *cbnR* 遺伝子が発現する (Fig. 2)。IPTG による最適な誘導温度と誘導時間は、使用する発現系や発現させるタンパク質に依存して異なる。そのため、誘導時の温度と時間を変える

ことで、CbnR 発現量の増加が期待されると考えた。具体的な温度と時間については、文献³⁾やこれまでの経験則より Table に示した条件を考え、検討実験に用いることとした。また検討実験により確立した新たな条件と従来の条件から抽出した粗タンパク質を使用し、転写調節因子等のタンパク質を精製するために適したアフィニティークロマトグラフィーを用いて CbnR を精製し、そのタンパク質量や純度を比較しようと考えた。

Table IPTG による誘導検討の条件

誘導温度	誘導時間
37°C、30°C、25°C	3、5、7時間
20°C	10、15、20時間

3. 方法

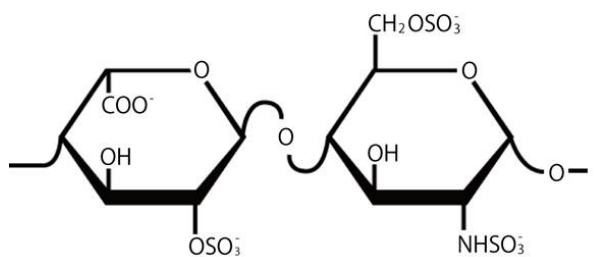
3.1 CbnR 発現条件の検討

100 mL の LB 培地に抗生物質（アンピシリン、クロラムフェニコール）と、前培養していた大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET11a+cbnR 株を加え、37°C で回転培養を行った。濁度を示す O.D.₆₀₀ が 0.4 になった時点で培養を止め、培養液を氷冷し、終濃度 1 mM となるように IPTG を添加した。この後の誘導温度と時間を、Table に示す条件に沿って検討した。その後、遠心分離機で菌体を回収し、バッファー（50 mM Tris-HCl、50 mM NaCl、pH 8.0）を用いて懸濁した。超音波破碎機により細胞を破碎し、再び遠心分離機で遠心後、上清の可用性画分を回収した。SDS-PAGE により粗タンパク質を分子量によって分離し、CbnR の発現量を確認した。また濃度については Bradford 法により定量し、測定は 3 連で行った。

3.2 精製した CbnR の比較

CbnR の精製は、Heparin-Agarose (Fig. 3) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより行った。アフィニティークロマトグラフィーとは物質同士の親和性を利用したクロマトグラフィーで、例えば抗原抗体反応や核酸とタンパク質の特異的結合を利用したものがある。本実験で用いた Heparin-Agarose は、転写調節因子などの DNA 結合タンパク質を特異的に結合する性質を持ち、これまでに LTTR ファミリーである ClcR の精製において使用されている⁴⁾。

3.1 の検討実験より確立した条件と従来の条件を用いて、粗タンパク質を抽出した。bed volume が 2 ml となるように Heparin-Agarose を 15 mL チューブに加え、カラムを作製した。そこに抽出した可用性画分（粗タンパク質）を添加し、バッチ法により CbnR の精製を行った (Fig. 4)。精製に使用した平衡化バッファーの組成は、50 mM Tris-HCl、50 mM NaCl、pH 8.0 であり、これに (NH₄)₂SO₄ が 1 M となるように加えたものを溶出バッファーとして使用した。精製した CbnR を SDS-PAGE に供試し、その量と純度を比較した。



L-イブロン酸 2-硫酸 N-スルホ-D-グルコサミン 6-硫酸

Fig. 3 ヘパリンの基本構造



Fig. 4 バッチ法による CbnR 精製の様子

4. 結果

4.1 CbnR 発現条件の検討

SDS-PAGE の結果を Fig. 5 に、各粗タンパク質の濃度を Fig. 6 に示した。SDS-PAGE ではタンパク質量を全て 50 μg に調製し、100V で 90 分泳動した。CbnR の分子量は 32 kDa であるため、矢印の線上にあるバンドの太さ（タンパク質発現量）を比較した。①のレーンが、従来の条件から抽出した粗タンパク質の泳動結果であり、この条件よりも明らかに CbnR のバンドが太くなっていたのは、30°C で 5 時間（レーン⑤）、25°C で 5 時間あるいは 7 時間誘導した条件（それぞれレーン⑥と⑦）であった。またレーン①や⑤のタンパク質は、20 kDa 付近にバンドが見えていたが、レーン⑥や⑦の当該バンドは薄く、ほとんど見えていなかった。次に Fig. 6 より、SDS-PAGE のレーン⑤、⑥、⑦に相当する粗タンパク質のうち最も濃度が高かったのは、レーン⑦の 25°C で 7 時間誘導した条件であった。これらの結果より、25°C で 7 時間誘導した条件が、従来の条件よりも適していると考えた。

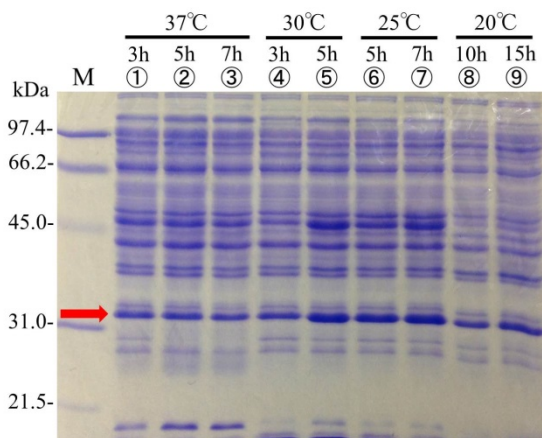


Fig. 5 各条件における粗タンパク質の電気泳動図

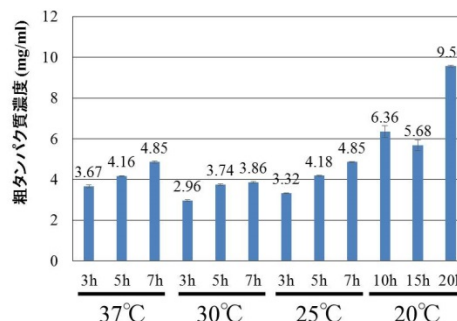


Fig. 6 各条件における粗タンパク質の濃度

4.2 精製した CbnR の比較

SDS-PAGE の結果を Fig. 7 に示した。全てのサンプルを 15 μl ずつロードし、100V で 90 分泳動した。レーン②-⑤は新たな条件より抽出した粗タンパク質を精製し、レーン⑥-⑨は従来の条件より抽出した粗タンパク質を精製したサンプルである。各条件における各レーンの違いは、精製に用いたカラムの違いであり、使用した粗タンパク質はそれぞれの条件で同じである。従来の条件では、CbnR 精製ができていたものの 20 kDa 付近の夾雑物が含まれていた。一方、新たな条件では 20 kDa 付近のバンドは全く見えず、従来よりも純度の高い CbnR を取得できた。さらに、CbnR と思われる 32 kDa 付近のバンドも、従来の条件より太かった。これらの結果より、新たな条件はより選択的に CbnR を精製できており、精製段階においても新たな条件を用いた方が適当であることが示された。

5. 考察

本実験結果より、従来の誘導条件（37°C で 3 時間誘導）よりも新たな誘導条件（25°C で 7 時間誘導）を用いた方が、CbnR の大量発現及び精製に適していると考えられた。

なぜ 37°C よりも 25°C で誘導した方が、CbnR の発現量が多かったのか。タンパク質は細胞内のリボソームで合成され、その後折りたたまれて適切な立体構造をとることで機能する。しかし、熱などにより折りたたみが不安定になってしまった場合、タンパク質の凝集や封入体（不溶性のタンパク質）の形成が起こり、可溶性画分における標的タンパク質量は少なくなってしまう⁵⁾。今回、誘導時の温度を下げたことで発現が遅くなり、タンパク質の折りたたみが緩やかに進行し、その結果タンパク質が凝集せず、可溶性画

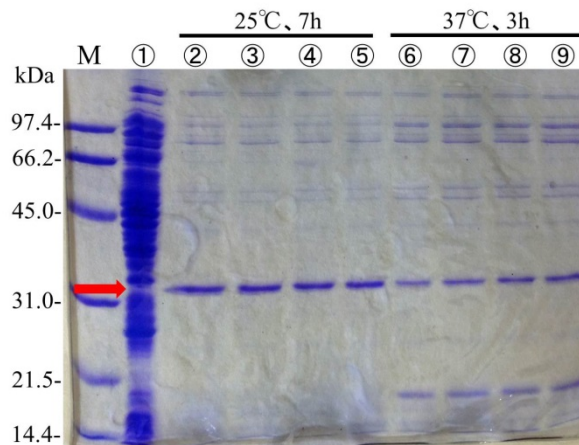


Fig. 7 精製したCbnRの電気泳動比較図

分のCbnRタンパク質量が増加したことが要因ではないかと考える。また、内在性プロテアーゼなどのタンパク質分解酵素の活性が抑えられ、タンパク質分解量が減少した可能性も考えられる。

CbnR発現条件の検討実験において、抽出した粗タンパク質の中で最も高い濃度を示したのは、20°Cで20時間誘導した条件であった (Fig. 6)。しかしCbnRの発現量を比較した場合、25°Cで7時間誘導した条件よりも少なく (Fig. 5)、また誘導サイクルも長いため、最適な条件とはしなかった。

今後培養スケールを大きくして本条件を使用し、大量の粗タンパク質を取得しようと考えている。しかし、30°Cで5時間誘導した条件は25°Cで7時間誘導した条件と同程度のCbnRを発現しているように見える (Fig. 5)。そのため、実際に大量発現実験を行う際には、時間の使い方としてどちらの条件も使用することが可能であると考えられる。

6. 参考文献

- 1) Ogawa N, McFall SM, Klem TJ, Miyashita K, and Chakrabarty AM, *J Bacteriol*, **181**, 6697-705 (1999).
- 2) Ogawa N, and Miyashita K, *Appl Environ Microbiol*, **65**, 724-31 (1999).
- 3) Lu Z, Chen W, Liu R, Hu X, and Ding Y, *Protein Expr Purif*, **74**, 217-22 (2010).
- 4) Coco WM, Parsek MR, and Chakrabarty AM, *J Bacteriol*, **176**, 5530-3 (1994).
- 5) 東端啓貴, 生物工学会誌, **91**, 96-100 (2013).