

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560954

研究課題名(和文) GRPとカードランによる簡便で低コストな組換えタンパク質固定化法の研究

研究課題名(英文) Studies of the low-cost immobilization system for recombinant proteins using beta-GRP and curdlan.

研究代表者

堀内 正隆(Horiuchi, Masataka)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号：90322825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：カイコ GRPのN末端に存在する構造ドメイン領域(以下 GRP-tag)は、水に不溶性の-1,3-g lucanであるカードランと強くかつ特異的に結合する性質を有する。我々は、この性質を利用した新規の組換えタンパク質固定化法について研究を行った。さまざまな宿主で発現させたGRP-tag融合組換えタンパク質は、細胞抽出液または培地からカードランビーズ上にワンステップで固定化された。また、ディスク型やシート状などのさまざまな形状のカードラン担体の作製にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Amino terminal domain of Silkworm GRP (GRP-tag) tightly and specifically associates with a water-insoluble -1,3-g lucan, curdlan. We have studied a novel immobilization system for recombinant proteins based on the association between the GRP-tag and curdlan. The recombinant proteins fused to the GRP-tag were expressed in several hosts and were immobilized in one step on the curdlan beads from cell lysates and medium. Furthermore, we succeeded in preparation of a curdlan disk and curdlan sheet as a support carrier for GRP-tag.

研究分野：生物工学

キーワード：タンパク質 バイオテクノロジー バイオリアクター 生物・生体工学 ナノ材料

## 1. 研究開始当初の背景

カイコ  $\beta$  GRP は、昆虫体内に侵入した真菌等の病原体の表層に存在する  $\beta$ -1,3-glucan を認識し、カイコの自然免疫系である prophenoloxidase cascade を活性化するタンパク質である (Ochiai and Ashida, J. Biol. Chem., 1988)。これまでに研究代表者らは、カイコ  $\beta$  GRP の N 末端 102 アミノ酸残基からなる構造ドメインの立体構造を NMR 法によって決定し、この領域における  $\beta$ -1,3-glucan の特異的認識機構を原子レベルで解明することに成功した (Takahasi, Ochiai, Horiuchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009, 図 1)。

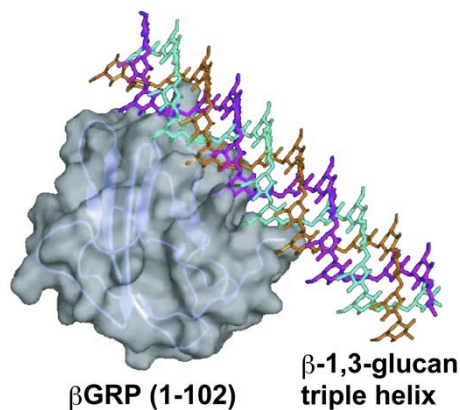


図 1  $\beta$ GRP アミノ末端ドメインと  $\beta$ -1,3-glucan との相互作用モデル

この構造生物学的研究を遂行する過程で、研究代表者らはカイコ  $\beta$  GRP の N 末端ドメインと  $\beta$ -1,3-glucan との相互作用は大変強く、高濃度のタンパク質変性剤を加えなければ相互作用を容易に破壊できないことを見出した。また、水に不溶で低価格な食品ゲル化剤としても知られる  $\beta$ -1,3-glucan のカードランをカイコ体液中に加えると、天然の  $\beta$  GRP をカードラン表面に特異的に吸着させることができ、その一方で体液中の大量の夾雑タンパク質のほとんどはカードランと結合しないことがわかった。この性質を用いることで、 $\beta$  GRP の  $\beta$ -1,3-glucan 結合ドメイン (以下、GRP-tag) を融合した組換えタンパク質を、カードランで構成された担体に簡便かつ強固に固定化するシステムを構築できるのではないかとこの着想を得た。

## 2. 研究の目的

本研究は、GRP-tag とカードランを利用した簡便な組換えタンパク質の固定化に関する基盤研究と、安全かつ低コストな固定化酵素やプロテインチップなどの応用へ向けた研究を行うことを目的としている。具体的には、GRP-tag とカードランを用いたアフィニティーシステムの物理化学的あるいは生化的な特性を明らかにし、このアフィニティーシステムを適用可能なアプリケーションの開発を行う。研究期間内には以下のことを明らかにするための実験を行う。

学的な特性を明らかにし、このアフィニティーシステムを適用可能なアプリケーションの開発を行う。研究期間内には以下のことを明らかにするための実験を行う。

(1) 複数の標的タンパク質 (細胞内タンパク質や分泌タンパク質、膜タンパク質など) を、GRP-tag 融合タンパク質として大腸菌、昆虫細胞、動物細胞あるいはカイコ虫体で発現させ、カードランビーズによる固定化が可能な GRP-tag 融合タンパク質の種類や発現宿主の関係を明らかにする。

(2) カードランの特徴である加工性の良さを生かし、フィルム状、板状あるいは管状などさまざまな形状に加工したカードランを作製する方法を確立した。これら各種形状のカードランに対し、GRP 融合タンパク質を添加し、カードランビーズと同等の特異性や結合強度を有しているか明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) GRP-tag 融合組換えタンパク質の調製

大腸菌用発現プラスミドとして、pET-22b のマルチクローニングサイトの 5' 側に、成熟型  $\beta$  GRP の 1-111 番までの領域をコードする遺伝子を組み込み、GRP-tag 融合組換えタンパク質発現用プラスミド pET-GRP-3C-His を構築した (図 2)。このプラスミドに Tob の N 末端ドメイン (TobN)、CCR4-associated factor 1 (Caf1)、interferon regulatory factor 3 (IRF-3) および retinoic acid-inducible gene I protein (RIG-I) 遺伝子を挿入後、大腸菌 BL21 (DE3) 株に導入し、GRP-tag 融合タンパク質の発現を誘導した。発現後の大腸菌抽出液をカードランビーズと 4 °C で 1 h 混和し、ビーズを 300 mM NaCl を含むリン酸緩衝液で十分に洗浄した。ビーズに特異的に結合した GRP-tag 融合タンパク質を HRV3C protease で処理することで、標的タンパク質を GRP-tag から遊離、精製した。

昆虫細胞における発現には、Invitrogen 社の Bac-to-Bac バキュロウイルス発現システムを利用した。トランスファープラスミド pDEST8 に分泌シグナルをもつ GRP-tag (secGRP-tag) およびマルチクローニングサイトを挿入し、新たにトランスファープラスミド pFastBac-secGRP-3C-His を構築した。このプラスミドに標的タンパク質をコードする遺伝子を挿入後、Bacmid DNA と相同組換えを行い、発現用バキュロウイルス DNA を構築した。この組換えバキュロウイルス DNA を、昆虫細胞 Sf21 へ導入し、組換えバキュロウイルスの産生および目的とする secGRP-tag 融合タンパク質の分泌を行った。分泌された secGRP-tag 融合タンパク質は、培地に直接カードランビーズを混和することによりアフィニティー精製した。

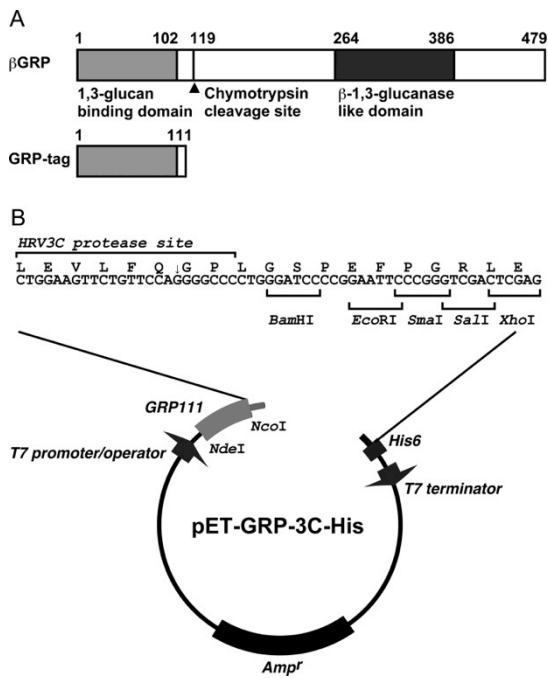


図 2 GRP-tag 融合タンパク質発現プラスミドの構築

A:  $\beta$ GRP 全長 (上) と GRP-tag (下) の模式図.

B: pET-GRP-3C-His の模式図.

(2) カードランビーズの調製

カードラン 9 g を 0.5 M NaOH 300 mL 中で十分に攪拌溶解し、5000 x g, 5 min 遠心することで、不溶性成分を除去した。このカードラン溶液を 1-butanol 300 mL および Tween20 6 mL と混合し、スクリー型の本モジナイザーで激しく攪拌しているところへ、氷酢酸 34 mL を数滴ずつ添加することで、カードランの粒子を形成させた。得られたカードランビーズは、ゲルベッドの 10 倍量以上の水で洗浄後、20 % エタノール中で保管した。

(3) カードランディスクおよびシートの調製

カードランビーズと同様のカードランアルカリ溶液を、24 または 96 ウェルマイクロタイタープレートに、厚さ 1~5 mm となるように添加し、酢酸蒸気で飽和したデシケーターに封じ、室温で 24 h 静置し、カードランを硬化させた。硬化後のカードランディスクは純水で洗浄後、20 % エタノール中で保管した。また、カードランアルカリ溶液中に紙製の紙 (またはポリプロピレン製不織布) を浸漬後、ろ紙を取り出し、酢酸蒸気で飽和したデシケーター中に吊るし、室温で 24 h 静置し、カードランを硬化させた。得られたカードランシートは、純水で洗浄後、20 % エタノール中で保管した。カードラン担体の形状の観察は、実体顕微鏡を用いた。

4. 研究成果

(1) 大腸菌による GRP-tag 融合タンパク質の発現 (図3)

GRP-tag を融合させる標的タンパク質として、すでに構造や機能のわかっている4種類のタンパク質; TobN、Caf1、IRF-3 および RIG-I を選択した。これら標的タンパク質の遺伝子を、GRP-tag 遺伝子あるいは代表的なアフィニティタグである GST-tag 遺伝子の下流に融合し、大腸菌 BL21 (DE3) 株において発現させた。その結果、いずれの標的タンパク質においても GRP-tag を用いた場合の方が GST-tag を用いた場合よりも可溶性画分から精製される融合タンパク質の収量の多いことが確認された。

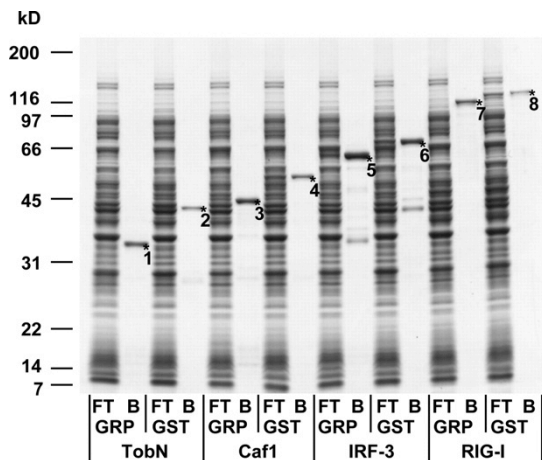


図 3 GRP-tag 融合タンパク質または GST-tag を融合させた4種類のタンパク質を含む大腸菌抽出液からのカードランビーズ (GRP) またはグルタチオンセファロースビーズ (GST) による精製 FT, アフィニティビーズの素通り画分, B, アフィニティビーズに特異的に相互作用した融合タンパク質.

(2) GRP-tag 融合タンパク質とカードランビーズ複合体の化学的安定性

アフィニティークロマトグラフィーシステムにおける精製条件は、アフィニティタグとそのリガンドとの間の物理的および化学的な安定性によって制限されている。そこで GRP-tag とカードランビーズが pH 4 から 9 の間でも安定かどうかを調べた。その結果、GRP-tag は pH 4 から 9 の間でもカードランビーズから外れることはなかった。一般に広く用いられている GST-tag、His-tag および MBP-tag のいずれもが pH 6 以下ではリガンドとの結合能を失うことから、GRP-tag とカードランの複合体の pH 安定性は特筆すべきものである。

次に高濃度の塩、界面活性剤および変成剤が存在する場合のGRP-tagとカードランとの複合体の安定性を調べた。その結果、GRP-tagは4 Mの塩化ナトリウム、20% Triton X-100あるいは4 M urea存在下でもカードランビーズから解離しないことがわかった。

(3) GRP-tag融合タンパク質の酵素活性および構造の測定 (図4)

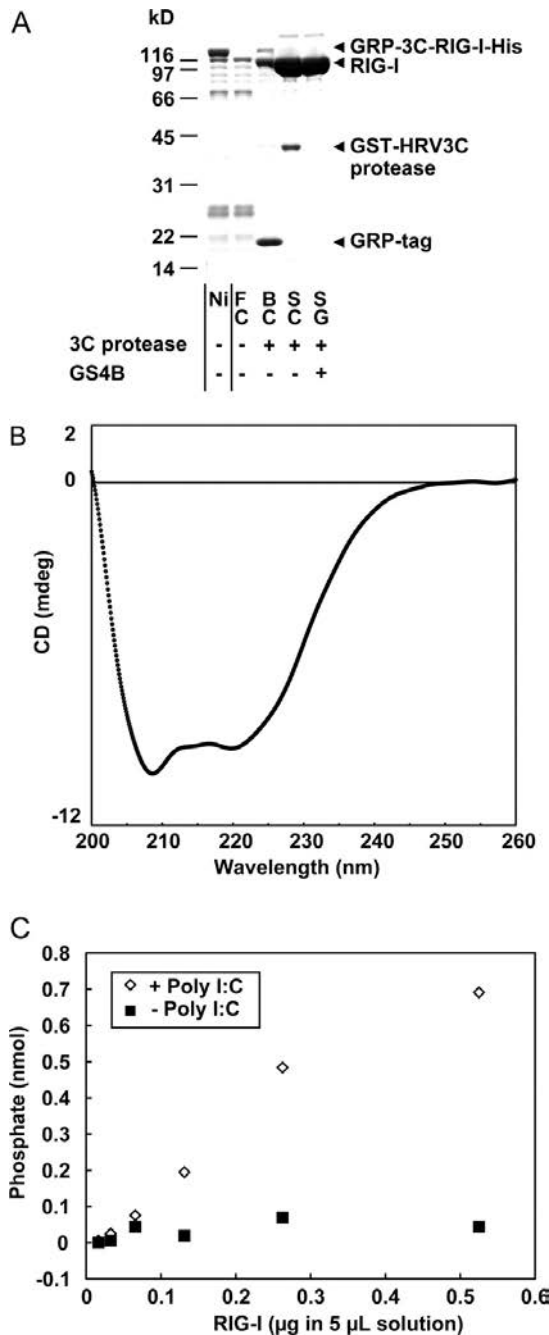


図4 GRP-tagおよびHis-tagによる二段階アフィニティー精製を行ったRIG-Iタンパク質の二次構造および酵素活性の測定

A: 各精製段階におけるRIG-IのSDS-PAGE. Ni Ni-NTA Superflowビーズによる第一段階の精製で得られたタンパク質. FC, カードランビーズに吸着しなかった素通り画分のタンパク質. BC, Ni精製されたタンパク質をカ

ードランビーズに吸着させた後, GST融合HRV3Cプロテアーゼ処理し, ビーズ上に残ったタンパク質. SC, Ni精製されたタンパク質をカードランビーズに吸着させた後, GST融合HRV3Cプロテアーゼ処理し, 上清に遊離したタンパク質. SG, SCにおける上清にGlutathioneビーズを加え, GST融合HRV-3Cプロテアーゼを除去した後の上清に含まれるタンパク質.

N末端にGRP-tag、C末端にHis-tagを融合させたRIG-Iタンパク質を、Ni-NTA superflowビーズおよびカードランビーズを用いて二段階のアフィニティー精製を行った。その結果、RIG-Iは110 kDという高分子量のタンパク質であるにもかかわらず、高純度の試料として得ることができた。このRIG-Iについて、poly I:C存在下におけるATP-ase活性の測定を行った。その結果、RIG-Iはpoly I:Cの濃度に依存してATP活性が増加することがわかり、その酵素としての機能が保持されていることが明らかとなった。また、円二色性スペクトルを測定したところ、208および222 nmに極大値が観察され、正しい二次構造を形成していることが確認された。

(4) 昆虫細胞によるGRP-tag融合タンパク質の発現 (図5)

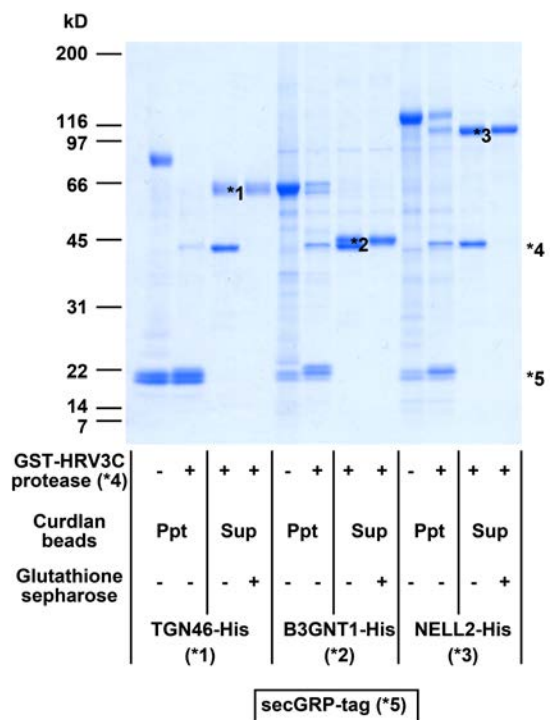


図5 昆虫細胞培地中に分泌された3種類のsecGRP-tag融合タンパク質の精製

Ppt, カードランビーズに特異的に吸着した培地中のタンパク質. Sup, カードランビーズ吸着後, GST融合HRV3Cプロテアーゼで処理後の上清に遊離したタンパク質.

GRP-tag融合タンパク質のうち、大腸菌による発現では不溶化してしまうものが存在した。それらのうち、Protein kinase C-binding protein NELL2 (NELL2)、Trans-Golgi network integral membrane protein 2 (TGN46) および  $\beta$ -1,4-glucuronyltransferase 1 (B3GNT1) を選び、昆虫細胞*Sf21*における発現を行った。その際、天然 $\beta$ GRPの分泌シグナルをN末端にもつGRP-tag (secGRP-tag) との融合タンパク質とすることで、分泌発現するかどうかを確認した。その結果、培地中には糖鎖の付加されたsecGRP-tag融合タンパク質が分泌され、これらはカードランビーズにより5%牛胎児血清を含む培地からワンステップで純度よく精製することができた。また、本来細胞内貯留型タンパク質であるEYFPについてもsecGRP-tagをつけて発現させたところ、細胞内の小球への蓄積が観察され、その一部は細胞外へ分泌されることが確認された。

#### (5) カードランビーズの大量調製法の開発 (図6)

カードランビーズを効率的かつ大量に調製するため、ビーズの原料であるカードランの初期濃度や、回転型ホモジナイザーを用いた場合の攪拌速度について検討した。その結果、カラムのエンドフィッティングを通り抜けない均質なカードランビーズを、一度に100 mL以上生産する方法を確立した。この新型カードランビーズを詰めたガラスカラムを用いることで、大容量の試料抽出液や培地をチューブ型ポンプによって連続添加できるようになった。

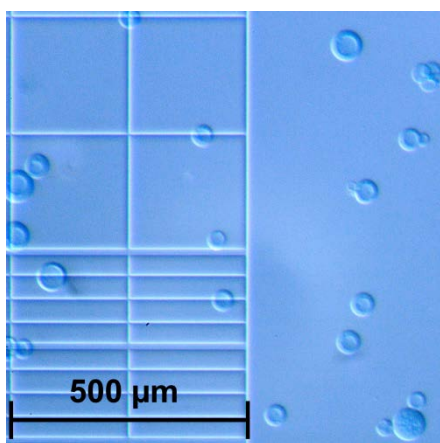


図6 改良された均質な粒径をもつカードランビーズの実体顕微鏡像

#### (6) さまざまな形状のカードラン担体の開発 (図7)

GRP-tag 融合タンパク質を結合させるための新たな形状のカードラン担体の作製を試みた。まずマイクロタイタープレートなどの多穴プレートのウェル底部に、厚さ1~5 mm

までのカードランディスクを形成させた。プレート底部に付着したカードランディスクの表面に、GRP-tag 融合タンパク質を特異的に固定化することができた。カードランディスクはカードランビーズのときと同様、牛胎児血清中のタンパク質による非特異的吸着が非常に少ないことも明らかとなった。そのためこの形状のカードラン担体は、アルブミンなどを含む溶液中での薬剤探索用プロテインチップとしての使用できる可能性が示唆された。またカードランディスクを破壊することなくウェルから取り出すことにも成功した。取り出したカードランディスクに、GRP-tag とともに発現させた抗原タンパク質をカードランディスクに固定することで、安価な経口ワクチンとしての応用が期待される。

次にカードランをろ紙あるいは不織布に吸収させた膜型カードラン担体の作製を試みた。これらはより大きな表面積を必要とする工業用固定化酵素としての利用を視野に入れたものである。膜型カードランの表面に直径50  $\mu$ mの微細な穴を形成し、表面積の向上を図った。筒状容器へ丸めて格納した膜型カードラン担体に、組換えGRP-tag融合プロテアーゼを含む大腸菌抽出液を直接添加したところ、簡便かつ高純度に組換え酵素を膜表面に固定化することができた。膜型カードラン担体はすべて生分解性の素材で構成されていることから、工業分野に限らず、使用後の回収が難しい農業や環境分野における屋外での利用が期待される。

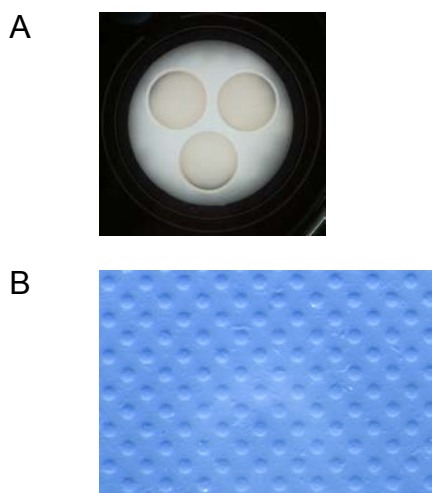


図7 さまざまな形状のカードラン担体  
A, 24ウェルマイクロタイタープレート中から取り出したカードランディスク。  
B, カードランシート表面に規則的に配列させた直径50  $\mu$ mの小孔の実体顕微鏡像。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①Horiuchi M, Takahasi K, KobashigawaY, Ochiai M, Inagaki F, A low-cost affinity purification system using  $\beta$ -1,3-glucan recognition protein and curdlan beads、Protein engineering, design & selection、Vol. 25、pp.405-413、2012、doi: 10.1093/protein/gzs028、査読有

[学会発表] (計1件)

①Horiuchi M, Horiuchi R, Ochiai M, Yokoyama A, Analysis of the gene products related to osseointegration in the early stage of titanium implantation、28th Symposium of the Protein Society、2014. 7. 27-2014. 7. 30、Manchester Grand Hyatt (San Diego, USA)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀内 正隆 (HORIUCHI MASATAKA)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号: 90322825

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし