

Brevibacillus choshinensis 分泌発現系を用いた

¹⁵N 安定同位体標識試料作成

三菱化学生命科学研究所 (MITILS)

○谷生道一, 田中利好, 田中剛史, 河野俊之

¹⁵N isotope labeling of a protein secreted by *Brevibacillus choshinensis* for NMR study
Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS)

○Michikazu Tanio, Rikou Tanaka, Takeshi Tanaka, and Toshiyuki Kohno

The *Brevibacillus choshinensis* expression system is useful to produce recombinant proteins with disulfide bonds as secreted proteins. To use this expression system for protein NMR studies, we developed a method for the ¹⁵N-isotope labeling of a recombinant protein. We found that the labeled protein can be produced by using the ¹⁵N labeled medium commonly used in the *Escherichia coli* expression system, and that the stable isotope incorporation rate is approximately 91%. ¹H-¹⁵N HSQC spectra revealed that the ¹⁵N-labeled protein is correctly folded and retains its activity. Therefore, the *B. choshinensis* expression system should be useful for protein NMR studies.

【序】NMR によるタンパク質研究において、安定同位体標識は必要不可欠な技術である。最も良く用いられている大腸菌発現系では、比較的 low コストによる安定同位体標識試料作成が可能であるが、分泌性タンパク質のようにジスルフィド (SS) 結合を有するタンパク質などの発現では、封入体を形成することが多く適切ではない。酵母 *Pichia pastoris* 分泌発現系では、SS 結合を多く含むタンパク質の大量発現の成功例が多く報告されており、比較的 low コストでの安定同位体標識法も確立されているがこの系による発現量は、目的タンパク質に依存することが多い。また昆虫細胞、動物細胞、あるいは無細胞発現系を用いた同位体標識法も確立されているが、一般的に発現量が低く、高コストである。一方、グラム陽性菌の *Brevibacillus choshinensis* 分泌発現系は、遺伝子の由来にかかわらず、SS 結合を有するタンパク質の大量分泌生産に数多く成功しており、扱いやすさと安全性、さらに low コストで培養できることから、優れた発現系と考えられている。そこで本研究では、SS 結合を有するタンパク質の NMR による構造および機能研究支援のため、*B. choshinensis* を用いた安定同位体標識試料作成法の確立を目的とした。

【方法】発現条件検討のためのモデルタンパク質として、細胞質タンパク質である 12-kDa ヒト FK506 結合タンパク質 (FKBP) を採用し、発現ベクターは pNCMO2 (タカラバイオ) を用いた。作成したベクターはエレクトロポレーション法により *B. choshinensis* HPD31-SP3 株 (タカラバイオ) に形質転換した。形質転換体は、¹⁵N 安定同位体標識 C.H.L 培地 (~97% ¹⁵N、クロレラ工業) にて 48~72 時間培養し、培地中に分泌された ¹⁵N 標識 FKBP を、アフィニティーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製し、質量分析および ¹H-¹⁵N HSQC NMR 測定を行った。

Brevibacillus choshinensis, secretion, isotope labeling, recombinant protein

たにおみちかず、たなかりこう、たなかたけし、こうのとしゆき

【結果と考察】*B. choshinensis* により生産した非標識および ^{15}N 標識 FKBP の質量分析の結果、本方法による ^{15}N 標識率は、約 91% であることが分かった (Fig. 1)。また、この試料の ^1H - ^{15}N HSQC NMR スペクトル (Fig. 2A) は、大腸菌発現系により得られているそれと類似していることから、*B. choshinensis* によって発現した FKBP は正常な folding を保持していることが分かった。一方、M9 培地による発現実験を試みたが、菌の発育は見られるものの、目的タンパク質の発現量は極めて低いことが分かった。以上のことから、*B. choshinensis* 分泌発現系を用いた組み換えタンパク質の安定同位体標識試料作成には、C.H.L. 培地が有用であることが分かった¹⁾。

次に、同様の方法を用いて、SS 結合を 2 ヲ所持つ分泌性タンパク質ヒト M-フィコリン フィブリノーゲン様ドメイン (FD1、26.8 kDa) の ^{15}N 標識試料作成を試みた。FD1 は、大腸菌発現では封入体を形成することが知られている。FD1 の *B. choshinensis* による発現を試みた結果、正常活性を保持したタンパク質の分泌生産に成功した。さらに、 ^{15}N 標識 C.H.L 培地を用いることで、 ^{15}N 標識 FD1 の試料調製、および ^1H - ^{15}N HSQC NMR スペクトルの取得に成功した (Fig. 2B)。

これらの結果は、*B. choshinensis* 分泌発現系が、SS 結合を有する分泌性タンパク質の NMR 研究に極めて有用であることを示している。

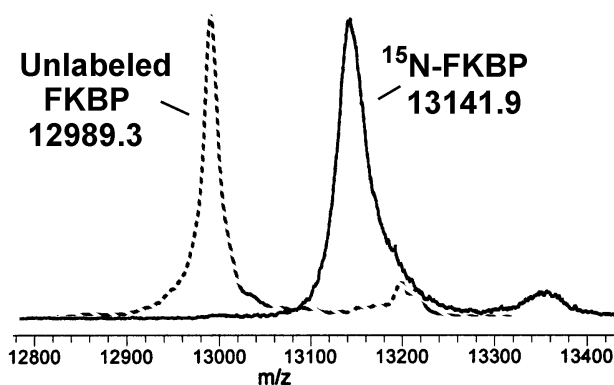


Fig.1. MALDI-TOF mass spectra of unlabeled (.....) and ^{15}N -labeled (—) FKBP, secreted by *B. choshinensis*. The ^{15}N isotope incorporation rate is ca. 91%.

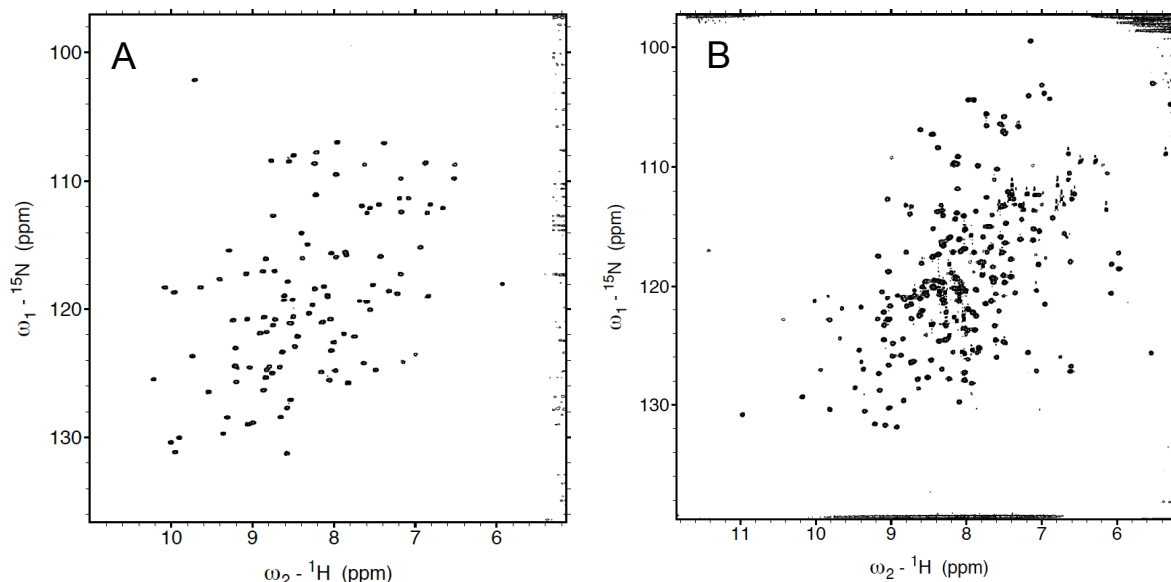


Fig.2. ^1H - ^{15}N HSQC spectra of ^{15}N labeled FKBP (A) and human M-ficolin fibrinogen-like domain (FD1, B), secreted by *B. choshinensis*. FD1 has two disulfide bonds²⁾.

【参考文献】 1) Tanio *et al.*, (2008) *Anal. Biochem.* **373**, 164-166.

2) Tanio *et al.*, (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 3889-3895.