

大腸菌のコールドショック発現系を用いる亜鉛含有型金属酵素の高発現系構築法

郷上佳孝¹⁾, 老川典夫^{1,2)}

(¹⁾関西大学・工・生物工*, (²⁾関西大学ハイテクリサーチセンター)

Method for the construction of the high-expression system of Zinc-containing enzyme with the coldshock vector in *Escherichia coli*.

Yoshitaka GOUGAMI¹⁾ and Tadao OIKAWA^{1,2)}

¹⁾Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kansai University, Suita Osaka 564-8680

²⁾Kansai University High Technology Research Center, Suita, Osaka 564-8680

Summary

We purified the guanidinobutyrase (GBase, guanidinobutyrate amidinohydrolase, EC 3.5.3.7), which catalyzes the hydrolysis of 4-guanidinobutyrate (4-GB), a in *Arthrobacter* sp. KUJ 8602, and characterized it enzymologically. However, its structure has not been studied at all.

To elucidate the three-dimensional structure of GBase, we need the high expression system of the enzyme in *Escherichia coli*, but SDS-PAGE analysis showed that the most of GBase was expressed into the insoluble fractions with the general expression system used, and the enzyme was not able to refold by the dilution additive method with urea or guanidine hydrochloride. We succeeded to express GBase with the co-expression of chaperone and pCold plasmid, and this method would be applicable for other metal-containing proteins.

目 的

近年、酵素やその他のタンパク質を大量に得るために、大腸菌での発現系が用いられる。しかし、大腸菌内で大量に発現させたタンパク質は、フォールディングがうまくいかず、封入体を形成することが多い。特に金属含有タンパク質の場合、含有金属を適切な位置に導入しなければ活性型タンパク質は得られず、この点で金属非含有型タンパク質より大腸菌での高発現系の構築は、一般に困難である¹⁾。

グアニジノブチラーゼは、D-アルギニンやグアニジノ酪酸などのグアニジノ化合物を、尿素とアミノ化合物へ加水分解するアミジン加水分解酵素である。本酵素は、Zn²⁺やCo²⁺などを活性発現に必要とする金属含有タンパク質である。そこで、本研究では、本酵素をモデルタンパク質として用い、大腸菌の各種発現系を用いて、金属含有タンパク質の高発現系構築法を検討した。

実験方法

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によりグアニジノブチラーゼ遺伝子 (*gbh*) を増幅し、制限酵素処理、ライゲーションを行い、pETベクター系、pQEベクター系、pColdベクター系を用いて大腸菌における発現系を構築した。またpETベクター系及びpColdベクター系では、シャペロンベクター^{2,3)}の共発現系をも構築した。グアニジノブチラーゼ活性は、グアニジノ酪酸を基質として用い、生成する尿素をジアセチルモノオキシム法により定量し測定した。

*所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

結果及び考察

pET3b, pET11, pET17b, 及びpQE30を用いて*gbh*を発現させたところ, いずれの発現系においても可溶性画分における活性は低かった。しかし, SDS-PAGEの結果, すべての発現系においても不溶性画分には, 大量に目的タンパク質が封入体として存在していることが明らかとなった (Fig. 1)。

得られた封入体を8M尿素で変性後, 段階的透析法⁴⁾によるリフォールディングを試みたが, 活性型タンパク質は得られなかった。次にTable 1のプラスミドを用いて, トリガーファクター, groEL, groES, dnaK, dnaJなどの分子シャペロンとの共発現系を構築した。本共発現系ではpET3b, pQE30発現系と比べて, 少量ではあるが可溶性に本酵素を発現することができた (Table 2)。

一方, pColdベクター系を用いた場合, pET3b (比活性: 0.046 U/mg), pQE30 (比活性: 0.229 U/mg) より高い活性を示した。特にシャペロンベクターの共発現系を用いた場合, pGKJE-8 (比活性: 7.055 U/mg), pTf-16 (比活性: 3.998 U/mg), pGro-7 (比活性: 2.494 U/mg) 及びpKJE-7 (比活性: 2.199 U/mg) となり, 活性は著しく増加した (Table 3)。

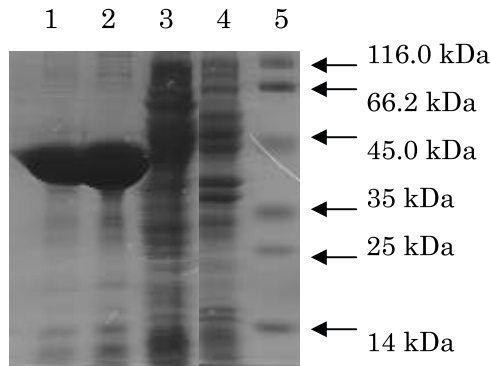


Fig. 1 SDS-PAGE 1 (10% polyacrylamide gel) Almost all GBase was expressed into insoluble fractions in E.coli. Lane 1: BL21 (DE3) pET3b-gbh insoluble cell extract, lane 2: M15 pQE-30-gbh insoluble cell extract, lane 3: BL21 (DE3) pET3b-gbh soluble cell extract, lane 4: M15 pQE-30-gbh soluble cell extract, lane 5: protein molecular weight.

Table 1 Various chaperone plasmids

Plasmid	Chaperone
pGkJE-8	dnaK-dnaJ-grpE groES-groEL
pGro-7	groES-groEL
pKJE-7	dnaK-dnaJ-grpE
pGTf-2	groES-groEL-tig
pTf-16	tig

Table 2 Comparison of the specific activities of T7 type plasmid with chaperone plasmid

Plasmid	Specific activity (U/mg)
<i>Arthrobacter</i> (Control)	1.030
pET-3b	0.046
pQE30	0.229
pET3b-pGKJE-8	0.452
pET3b-pGro-7	1.020
pET3b-pKJE-7	0.091
pET3b-pGT-f2	0.343
pET3b-pT-f16	0.620

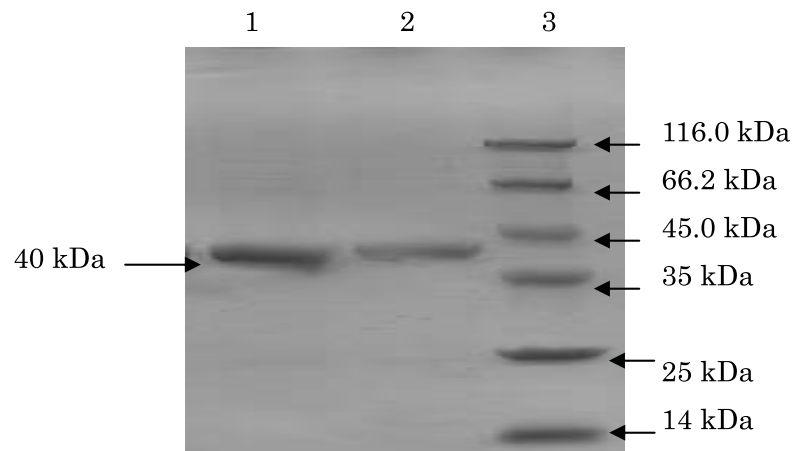
Table 3 Comparison of the specific activities between Cold-shock systems

Plasmid	Specific activity (U/mg)
<i>Arthrobacter</i> (Control)	1.030
pCold4-pGKJE-8	7.055
pCold4-pGro-7	2.494
pCold4-pKJE-7	2.199
pCold4-pGT-f2	0.643
pCold4-pTf16	3.998

さらにpCold1-pGKJE8において培養温度、シャペロン誘導条件、タンパク質誘導条件などを検討したところ、最大で15 U/mgの比活性を得ることに成功した。そこで本発現系を用いて、得られた組み換えタンパク質を精製した。

Ni-NTA agarose (QIAGEN) と DEAE-TOYOPEARL (東ソー) の二種類のクロマトグラフィーを用いてそれぞれステップワイズ法により精製した (Table 4)。

また組み換え酵素と親酵素において、諸性質に差がないことを確認するため、最適温度と熱安定性を測定したところ、両者は良く一致した (Fig. 3, Fig. 4)。

**Fig. 2** SDS-PAGE 2 (10% polyacrylamid gel)

Protein samples were taken at two steps (After Ni-NTA agarose and DEAE-TOYOPEARL column chromatographies) during purification of GBBase from soluble fractions of *E. coli*.

Lane 1, 2: Purified GBBase of BL21 (DE3)-pGKJE8-pCold1-gbh, lane 3: protein molecular weight.

Table 4 Purification of the recombinant GBBase

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	6469	758.7	15	100	1.0
Ni-NTA	2970	13.6	99	46	6.6
DEAE-TOYOPEARL	811	6.1	133	13	8.8

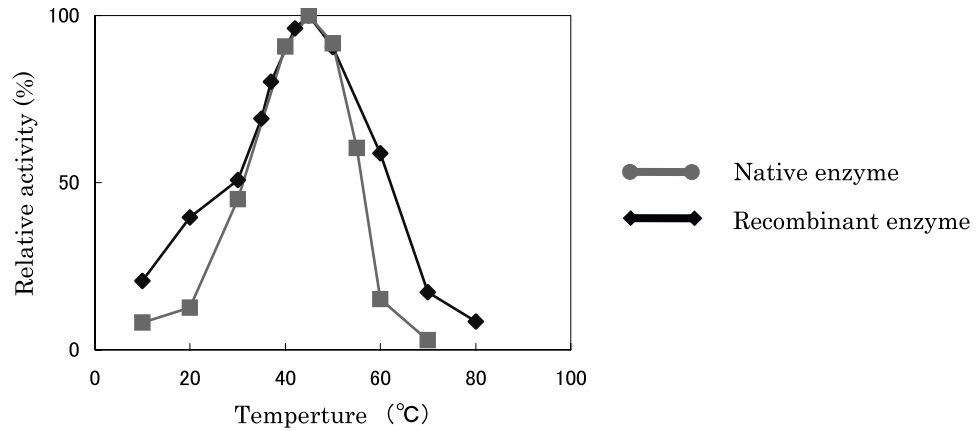


Fig. 3 Comparison of optimum temperature of native on the activity of native enzyme and recombinant enzyme. After the enzyme solution was incubated at various temperatures for 30 min, GBase activity was measured.

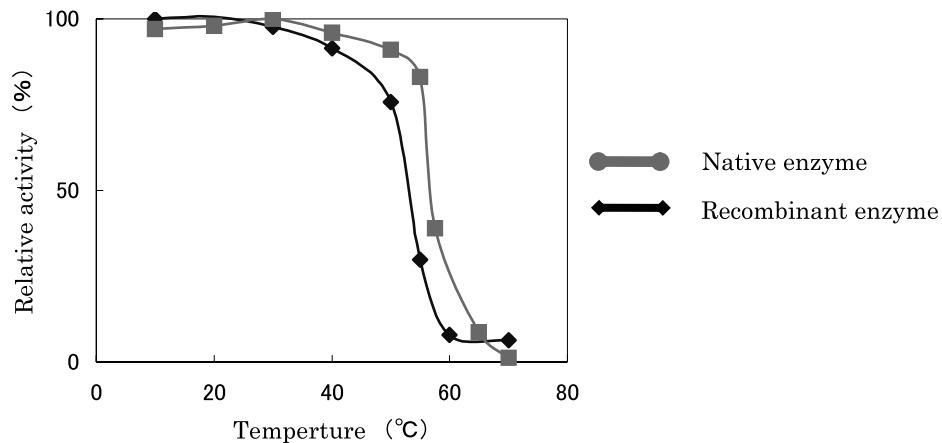


Fig. 4 Comparison of thermal stability of native enzyme and recombinant enzyme. After the enzyme solution was incubated at various pHs at 0°C for 30 min, GBase activity was measured. The standard assay mixture (0.5 ml) contained 60 mM CHES-NaOH buffer, pH9.0, 20 mM 4-guanidinobutyrate and an approximate amount of diluted enzyme solution. After incubation at 37°C for 30 min, 0.5 ml of 12.5% trichloroacetic acid was added into reaction mixture to stop the reaction. The precipitate was removed by centrifugation and urea produced was measured spectrophotometrically. (GBase activity was measured Thiosemicarbazide-Diacetylmonoxime-Urea method.)

まとめ

一般に広く用いられている高発現ベクター系を用いた場合、金属含有タンパク質であるグアニジノブチラーゼ (GBH) は、不溶性画分に封入体として生産され、いずれの発現系においても可溶性画分における活性は低かった。得られた封入体を6Mグアニジン塩酸で変性後、段階的透析法によるリフォールディングを試みたが、活性型タンパク質は得られなかった。pColdベクター系を用いた場合、特にシャペロンベクターとの共発現系を用いた場合、発現させたトリガーファクターやdnaK-dnaJ-grpE, groEL-groESなどのシャペロンが、本酵素の発現に効率よく作用し、可溶化を促すことが確認された。また親酵素と組み換え型酵素の諸性質は良く一致した。

これらの結果から、大腸菌のコールドショック発現系は、GBaseなどの金属含有タンパク質の高発現に有用であると考えられる。

参考文献

- 1) C. Roodveldt and D.S. Tawfik Protein Engineering Design and selection Vol. 18. no.1 pp51 - 58 (2005).
- 2) Kazuyo Nishihara, Masaoki Kanemori, Masanari Kitagawa, Hikdeki Yanagi, Takeshi Yura Applied and Environmental MICROBIOLOGY, May, 1998, p1694 - 1699.
- 3) Kazuyo Nishihara, Masaoki Kanemori, Masanari Yanagi, Takeshi Yura Applied and Environmental MICROBIOLOGY, Mar. 2000 p884 - 889.
- 4) Life Science News 1, Amersham Pharmacia Biotech Rapid and efficient purification and refolding of a (His) 6-tagged recombinant protein produce in *E. coli* as inclusion bodies.
- 5) 熊谷 泉, 津本 浩平, 林 秀也, 三沢 悟, 郷田秀一郎 プロテインフォールド再生のプロセスの開発と応用.
- 6) Amanda E I Proudfoot, Laurence Goffin, Mark A Payton, Timothy N C. Wells, Alain R. Bernard. Biochem, J, 1996, 318 437 - 442.