

平成28年度

杉山産業化学研究所助成

補酵素B₁₂関与ジオールデヒドラターゼの低溶解性化
領域を用いるカラム不要なタンパク質精製法の単量
体蛋白質への拡張

報告書

平成29年12月

岡山大学大学院

自然科学研究科

飛松 孝正

〔研究の目的〕

遺伝子工学とペプチドタグに対する親和性カラムの開発により、組換え体酵素を容易に精製できるようになったものの、依然としてコストと時間を必要とする。組換え体酵素の利用を促進するためには、よりローコストで簡便な精製法の開発が望まれている。我々が研究対象にしている補酵素B₁₂関与ジオールデヒドラターゼ (DD) は、大腸菌で大量発現させると沈殿画分に得られ、その画分を洗浄後に抽出するだけで精製できる。このように目的酵素を沈殿画分に得て、その洗浄と可溶化操作だけで精製できるカラム不要な精製法を一般化したいと考えていた。これまでにDDの溶解性や抽出性を決定している領域がβおよびγサブユニットのN末端領域であることと、そのβサブユニットのN末端60アミノ酸残基 (Nβ60) をタグに用いて、2量体や4量体の可溶性酵素に1分子当たり4つ付加すれば、組換え体酵素が中塩濃度で沈殿画分にえられ、その画分を洗浄後に低塩濃度溶液に懸濁すれば可溶化して簡便に精製できることを見出している。本研究では、本精製法の適用範囲を多量体から単量体可溶性酵素にまで拡張することを目指した。

〔結果と考察〕

可溶性単量体酵素としてNβ60タグを付加するN末端とC末端の距離がDDのβとγサブユニットのN末端の距離とほぼ同じ約70 Åであるホスホエノールピルビン酸カルボキシナーゼ(PCK)を選んだ。大腸菌ゲノムよりPCK遺伝子を単離し、本法で精製できる2量体酵素のグルタチオン-S-転位酵素(GST)とPCKおよびNβ60タグとの融合タンパク質(Nβ60-GST-PCK-Nβ60)の発現系を構築した。大腸菌で大量発現させ、種々の塩濃度での溶解性を見ることで精製が可能であるかを調べた。大量発現させたNβ60-GST-PCK-Nβ60は、Nβ60-GST-Nβ60と同様に、1M硫酸濃度で大腸菌破碎後の沈殿画分にえられ、低塩濃度では可溶性画分に回収された。そこで、Nβ60-GST-PCK-Nβ60を大量発現させた大腸菌を1M硫酸濃度下で破碎し、えられた沈殿画分を洗浄後に低塩濃度で可溶化させることで、精製Nβ60-GST-PCK-Nβ60をえられるかを調べたところ、図1の各精製ステップの画分のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に示したように、洗浄過程で除去できる予定の大腸菌タンパク質が除去できず、低塩濃度緩衝液による可溶化後のタンパク質画分には98.7 kDaの目的融合酵素に加えて、大量の大腸菌タンパク質が混入していた(図1. レーンE1, E2)。洗浄時の溶液組成を検討したり、沈殿から低塩濃度で抽出された抽出タンパク質に塩を加えて沈殿形成させ、その沈殿の洗浄後に再度そこからの可溶化を検討したりしたものの、混入した大腸菌タンパク質の効果的な除去法を見出すことができなかった。

単量体酵素の2量体化での精製が困難であったので、第2の方策を試した。つまり、単量体酵素のN末端とC末端とにタグを付加すればオリゴマーを形成するので、タグ付加組換え体酵素の塩析濃度がかなり低下すると予想された。このタグの有無による溶解度の塩濃度差を用いれば、タグ付加酵素をある塩濃度で得た後に、タ

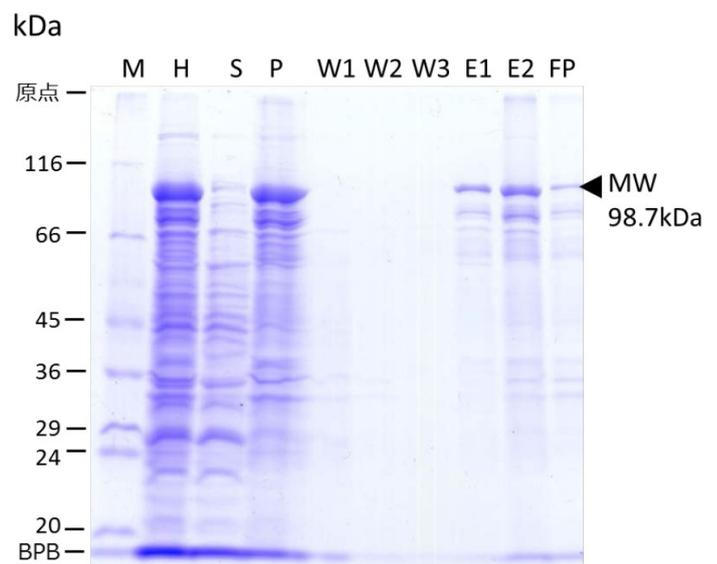


図1. グルタチオン-S-転位酵素(GST)との融合タンパク質化での2量体化による、単量体可溶性酵素、ホスホエノールピルビン酸カルボキシナーゼ(PCK)の低溶解性化による精製の試み。精製の各ステップの画分をSDS-PAGE後にタンパク質染色した。M: 分子量マーカー; H: ホモジェネート; S: 上清画分; P: 沈殿画分; W: 洗浄画分; E: 中質画分; EP: 抽出後の残差沈殿画分

グを除去すれば溶解性が向上した目的酵素が選択的に可溶性画分に回収・精製できることを期待した。

まず、PCK遺伝子を用いてN860タグとの融合タンパク質(N860-PCK-N860)の発現系を構築し、大腸菌で大量発現させた。大量発現させたN860-PCK-N860の溶解性の硫酸濃度依存性を調べたところ、50 mM リン酸カリ緩衝液(pH7)にはよく溶解したものの、大腸菌の可溶性タンパク質が沈殿しない1.25 M 硫酸濃度で、ほとんどのN860-PCK-N860が沈殿することが示された。そこで、この1.25 M 硫酸濃度を沈殿化と洗浄に用いることで、N860-PCK-N860を洗浄後の沈殿からの可溶化で精製できるかを調べた。図2の精製過程のSDS-PAGE解析にみられるように、大量発現させたN860-PCK-N860のほとんどは高塩濃度で沈殿画分(P)に存在し、1.25 M 硫酸を含む緩衝液で洗浄後に、10 mM 酸カリ緩衝液(pH7)で抽出・精製できることが明らかになった。デンストメーターで調べたレーンE1の精製酵素のタンパク質純度は88±3%であった。また、PCK活性の測定より、精製酵素の回収率は93±5%であった。さらに精製PCKの比活性は1.6±0.1 U/mgであり、タグの分子量を補正した比活性2.0 U/mgは文献値の2.4 U/mgに近い値であった。

再現性を見るために、N末端とC末端間の距離が35 ÅのD-セリンデヒドラターゼ(DSD)にも本精製法が適用できるかを調べたところ、図3のように同様の操作で精製できることが示された。レーンE1の精製酵素画分のタンパク質純度は91±2%であった。また、DSD活性より、精製酵素の回収率は97±9%で、比活性は87±6 U/mgであった。タグの分子量を補正した比活性113 U/mgは文献値の120~140 U/mgに匹敵する値であった。

以上より、4量体や2量体酵素に加えて単量体酵素もN860タグをN末端とC末端とに付加すれば、精製用カラムを用いることなく、迅速かつ簡便に、高収率・高純度で活性な酵素を調製をできることが示された。今回精製できたタグ付き単量体酵素のように生理的塩濃度で高溶解性なら、タグ付で酵素反応に使用し、塩を添加して酵素を回収できるという利点もあり、工業的にも魅力的である。今後は、精製例を増やして技術を一般化するとともに、実際に研究や実用上で有用な酵素を本法で精製できることを示して、この技術の有用性を示したい。

〔謝辞〕今回、このような研究の機会を賜りました一般財団法人杉山産業化学研究所に厚く御礼申し上げます。

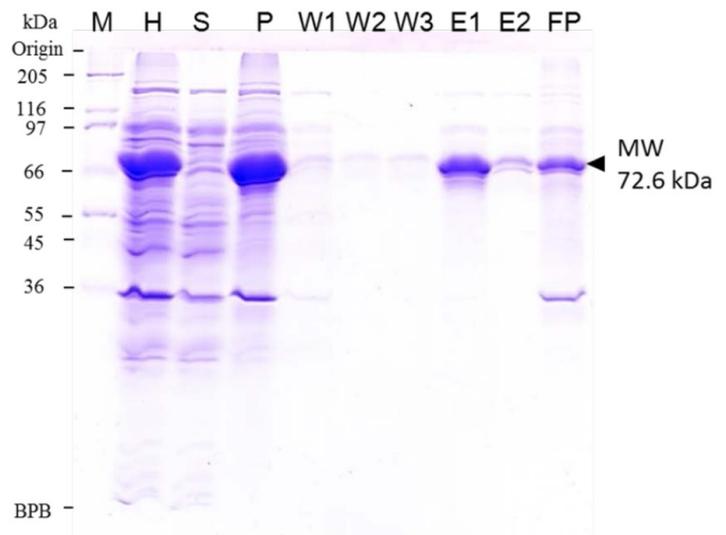


図2. 単量体可溶性酵素、ホスホエノールピルビン酸カルボキシナーゼ(PCK)の低溶解性化による精製の試み。精製の各ステップの画分をSDS-PAGE後にタンパク質染色した。M:分子量マーカー; H:ホモジェネート; S:上清画分; P:沈殿画分; W:洗浄画分; E:中質画分; EP:抽出後の残差沈殿画分

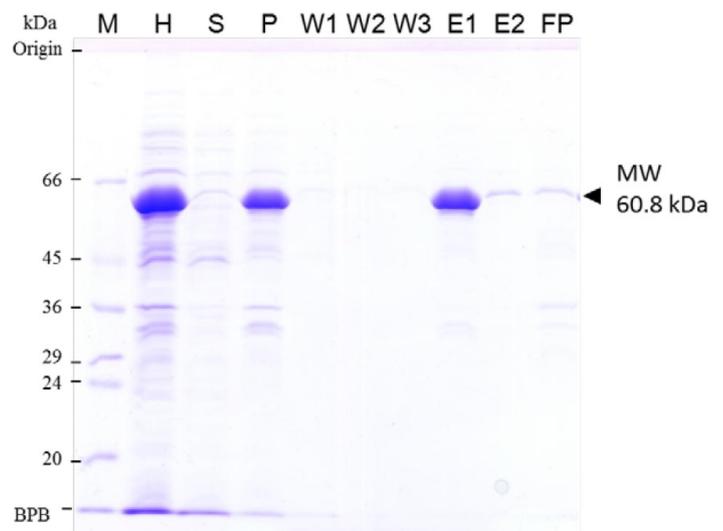


図3. 単量体可溶性酵素、D-セリンデヒドラターゼ(DSD)の低溶解性化による精製の試み。精製の各ステップの画分をSDS-PAGE後にタンパク質染色した。M:分子量マーカー; H:ホモジェネート; S:上清画分; P:沈殿画分; W:洗浄画分; E:中質画分; EP:抽出後の残差沈殿画分