

**遺伝子組換え技術による酵素生産に関する研究
～糖転移酵素遺伝子のクローニングおよび発現系の構築～**

生物学課 中田 裕之, 岡 千寿, 田中 正男
大日本インキ化学工業株式会社総合研究所 江原 岳
新潟大学農学部応用生物化学科 渡邊剛志

A Study of Enzyme Production by Use of Recombinant DNA Technique
～ Cloning of Glycosyltransferase Gene and Construction of its Expression System ～

Hiroyuki NAKADA, Gaku EHARA¹, Takeshi WATANABE², Chitoshi OKA and Masao TANAKA

¹Central Research Laboratories, Dainippon Ink and Chemicals Inc. ²Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University

放線菌 *Streptomyces matensis* DIC-108 (大日本インキ化学工業株式会社保有, 以下L-108と略す) が産生する糖転移酵素(以下SGTaseと略す)のN末端のアミノ酸配列よりDNA配列の一部を決定し, サザンハイブリダイゼーションまたはインバースPCR法よりSGTaseの遺伝子を単離し, シグナル領域を含む遺伝子の全塩基配列を決定した。この遺伝子を大腸菌にクローニングし, 発現させた。しかし, SGTaseは35°Cの培養において培養液中に多量に存在したが, これは分泌によるものではなく, 大腸菌が溶解したためと思われる。

1. はじめに

遺伝子組換え技術により, 他の生物のタンパク質を大腸菌等の微生物を利用して大量に生産できるようになった。本研究は, L-108が産生するSGTaseを大腸菌を使って大量生産させる系を構築しようとするものである。

SGTaseは, β-1,3グルカナナーゼの1種であり, グルコースのβ-1,3結合の分解に加え, 糖転移活性を有する, 分子量が約35,000の酵素である。β-1,3グルカンには, 免疫増強作用など種々の生理活性があることが知られており, SGTaseにより合成した配糖体を用いてβ-1,3配糖体特有の生理活性を有する製品開発への応用が期待される。また, β-1,3配糖化技術は, まだ十分に確立されておらず,

SGTaseの大量生産技術確立が糖鎖工学の発展に寄与するものと思われる。

2. 遺伝子のクローニング

2. 1 N末端のアミノ酸配列およびSGTase遺伝子のスクリーニング法

L-108の培養液を陽イオンおよび陰イオン交換樹脂カラムで処理し, SDS-PAGEにより分離後PVDF膜にブロッティングした。これをクマシー・ブリリアント・ブルーで染色後, SGTase部位を切り取り, アミノ酸シークエンサー(アプライド・バイオシステムズ社製473A gas-phase protein sequencer)に供してN末端部のアミノ酸配列を決定した(図1)。プライマー選択には, アミノ酸に対応するコード

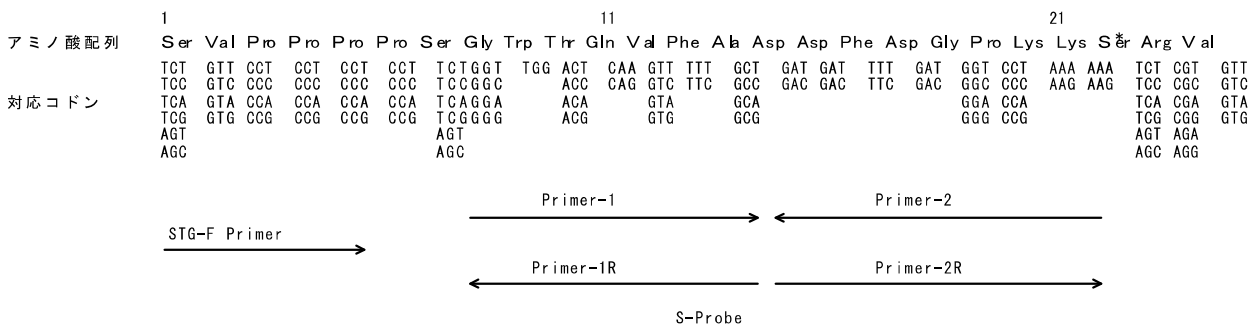


図1 N末端のアミノ酸配列とプライマー

STGase遺伝子の塩基配列表

60

GGGCTACGGC CCCGAGCACC GCGCCCGTGT GCGCACCCCCGGCCCCGGTTTCCCCGGTTC
120

GCGCCCATTC GAGAGGTGAA CTCCCGTGCG GGGGAGAGAC TTTCACGGTT ACACCTCTTG
180

ACCCCGAAGGGGCTCCGGAGCACATTGGCGGGACCGTGAG AGCGCTCTCACGCGATGTTC
 S1プライマー Met Phe 240
 CGGGCTCTCAGGGCCTGTCCGCACAACCATCAGCACCGAGAGGTCATCCCCACATGAAC
 Arg Ala Leu Arg Ala Cys Pro His Asn His Gln His Arg Glu Val Ile Pro His Met Asn

S2プライマー 300
 GACACCTCCGGCACCCCCGATCCCCCACGCACGGCGGGCGGCTGAGGCGCACCCCTCGTC
 Asp Thr Ser Gly Thr Pro Arg Ser Pro His Ala Arg Arg Arg Leu Arg Arg Thr Leu Val

360

GCC CTC GCGGGCGCACTGGCGCTCGGGGCGGGCGCCCTCACCTCACCGGCCCCACCGCC
 Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ala Leu Gly Ala Gly Ala Leu Thr Leu Thr Gly Pro Thr Ala
 N末端プライマー 420
 AGC GCC TCC GTG CCG CCC CCG CCG TCGGGCTGGACCCAGGTCTTCGCCGACGACTTC GAC
 Ser Ala Ser Val Pro Pro Pro Pro Ser Gly Trp Thr Gln Val Phe Ala Asp Asp Phe Asp

480

GGCCCAAGGGCAGCGGCGTCGACACCGGCGACTGGCGGTACGCCACCGGCACCGGCTAC
 Gly Pro Lys Gly Ser Gly Val Asp Thr Gly Asp Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Thr Gly Tyr
540

CCC GGC GGC CCC TCCA ACTGGGGCACCGGCGAGATCGAGACGATGACGTCGAACCCGGAG
 Pro Gly Gly Pro Ser Asn Trp Gly Thr Gly Glu Ile Glu Thr Met Thr Ser Asn Pro Glu
600

AACGTCTCCCTCGACGGCAACGGCAACCTGCGCATCACCCCGCGGCGCGACGGCGCCGGC
 Asn Val Ser Leu Asp Gly Asn Gly Asn Leu Arg Ile Thr Pro Arg Arg Asp Gly Ala Gly
660

AACTGGACGTCTGGGGCGCATCGAGACCGCCCGCGACGACTTCCAGCCCCGGCCGGCGGC
 Asn Trp Thr Ser Gly Arg Ile Glu Thr Ala Arg Asp Asp Phe Gln Pro Pro Ala Gly Gly
720

ACG CTG CGG GTC GAGGCCCGCATCCAGGTCCCGAACGTCACCGGCGACGCGGCCAAGGGC
 Thr Leu Arg Val Glu Ala Arg Ile Gln Val Pro Asn Val Thr Gly Asp Ala Ala Lys Gly
780

TAC TGG CCC GCGTTCTGGATGCTCGGCGCCCCGTACCGGGGCGACTACTGGA ACTGGCCC
 Tyr Trp Pro Ala Phe Trp Met Leu Gly Ala Pro Tyr Arg Gly Asp Tyr Trp Asn Trp Pro
840

GCCGTCGGCGAGCTGGACATCATGGAGAACACCCAGGGCATGAACACGGTGTTTCGCCACG
 Ala Val Gly Glu Leu Asp Ile Met Glu Asn Thr Gln Gly Met Asn Thr Val Phe Ala Thr

900

ATG CAC TGC GGC ACCT CGC CGG GCG GCC CGT GCA ACG AG ACC AGC GGC ATC GGC GGC CAG
 Met His Cys Gly Thr Ser Pro Gly Gly Pro Cys Asn Glu Thr Ser Gly Ile Gly Gly Gln

960

ACC ACCT GCC CAG GGC ACG ACCT GTC CAG GCC GGT TCC AC ACCT ACC GGAT GGG AGT GGG AC
 Thr Thr Cys Gln Gly Thr Thr Cys Gln Ala Gly Phe His Thr Tyr Arg Met Glu Trp Asp

1020

CGC TCG TCG GAC GTG GAG GAG ATCC GCT TCT CCG CCG GAC GAC CAC CTT CCG CAC CCG TC
 Arg Ser Ser Asp Val Glu Glu Ile Arg Phe Ser Leu Asp Asp His Thr Phe His Thr Val

1080

CGG GAG AAC CAG GT C GAC GCG AC GAC C TGG TCG AAC GCC ACC GAC CAG GCT TCT TCG TC
 Arg Glu Asn Gln Val Asp Ala Thr Thr Trp Ser Asn Ala Thr Asp His Gly Phe Phe Val

1140

ATC CTC AAC GTGG CGAT GGG CCG GCG GCT TCC CCG AC GCG GTT CCG CCG GCG GCC CCG AC GCG
 Ile Leu Asn Val Ala Met Gly Gly Gly Phe Pro Asp Ala Phe Gly Gly Gly Pro Asp Ala

1200

GGC ACC CAG CCC GGC CACT CGAT GCT CGT GGA CTAC GTG CAG GTG CTC ACC GCT CCT CGA
 Gly Thr Gln Pro Gly His Ser Met Leu Val Asp Tyr Val Gln Val Leu Thr Ala Ser *

1260

CCC GCT GTCCC ACC CCCC CA CAC CCG GCTC ATCC GGC CGG TGAC GAG GGC CCC CGC CACC

1320

CCG CGC GGG GCG CCT CGT CCG GGT ACC GGC CCC GTC GTT CA GCG GCG TTCC GCG CGG AACG

1380

CCC GCC GCGT CCG GGA AGCC GAC CGC GGC CCG CCC CACG CCG CCG GCAG CTC GGT GTGC

1440

GCG AGG AGCC GCT TGG CCT CCAG CACA ACA CGG GCC AGG TGCG CAG GAG CAG CCG AAG

1500

GCG TCC GCGG ACG CGG TGGC GGG TGG CGAA GCC CGCTCC ACG AGCC GCA GCAG GGC GCG

1560

GGT CGAC GCG TGG CGCG GCAC GGC CGT GTG CAG GCT CGGC GGC AGG GTGA CCG CGT GCTC

1620

← C 末端側プライマー

GTGCC AACGG CGCAGAGACG GCAGGACGCG GGGCGGAGCG CGGCGAGCCGGGCGGTCCG

1665

GGCCGGGCTG CATGGCGAGGACGGTTCCGC GGTACCCGGC GTCCC

ン数が少ない部分を選定し、想定されるコドンに対応したミックスプライマー(図1, Primer-1, Primer-2)を作製した。これらのミックスプライマーを用いたPCRによりDNA断片(44塩基)のバンドが形成された。

2. 2 N末端の塩基配列の決定

上記の44塩基のDNA断片をpT7BlueTベクターに組み込み、大腸菌にクローニングし、塩基配列を決定した。これをもとにインバースPCR用のプライマー(図1, Primer-1R, Primer-2R)およびサザンハイブリダイゼーションのプローブ(図1, S-Probe)を作製した。

さらに、N末端のミックスプライマー(図1, STG-F Primer)とPrimer-2を用いて同様にN末端からの65塩基の配列を決定した。

2. 3 サザンハイブリダイゼーション

染色体DNAを複数の制限酵素で切断し、遺伝子を得るためにサザンハイブリダイゼーションを行った。プローブの標識および検出にはアマシャム社のECLシステムを使用した。その結果、制限酵素Sma Iでは約1.5kbのバンドならびにBamH IおよびSal Iではそれぞれ約0.9kbと2.7kbのバンドが検出された。

2. 4 遺伝子の単離および塩基配列の決定

Sma Iで切断された約1.5kbの付近の断片を回収し、プラスミドpZEr0-1とライゲーションして目的遺伝子をクローニングした。

また、Sma I断片によるインバースPCRでもクローニングに成功した。

シーケンシングには、アプライド・バイオシステムズ社製ABI373A-18を使用し、得られたクローンより遺伝子の全塩基配列を決定した(SGTase遺伝子の塩基配列表)。

3. 発現系の構築

3. 1 PCRによる遺伝子の取得

N末端側のプライマーには、シグナル領域に含まれると思われるもの2種(S1, S2)およびN末端のもの(N)を作成し、これらにはNco Iの制限酵素サイトを付与した。他方、C末端側のプライマー(C)には、BamH Iの制限酵素サイトを付与した。プライマーの位置をSGTase遺伝子の塩基配列

表に示す。これらのプライマーを用いてPCRを行い、3つのバンド(S1-C, S2-C, N-C)つまりSGTaseの遺伝子を取得した(図2)。

3. 2 発現系の構築

これら3つのバンドを切り出して回収し、制限酵素処理後、高発現ベクターpTrc99Aに組み込んで大腸菌(JM109株)にクローニングした。各株のタンパク質のSDS-PAGEの結果を図3に示す。

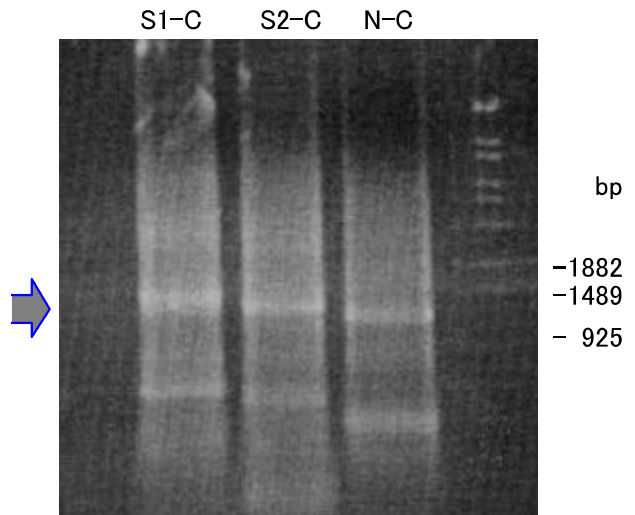


図2 PCRによる遺伝子の取得

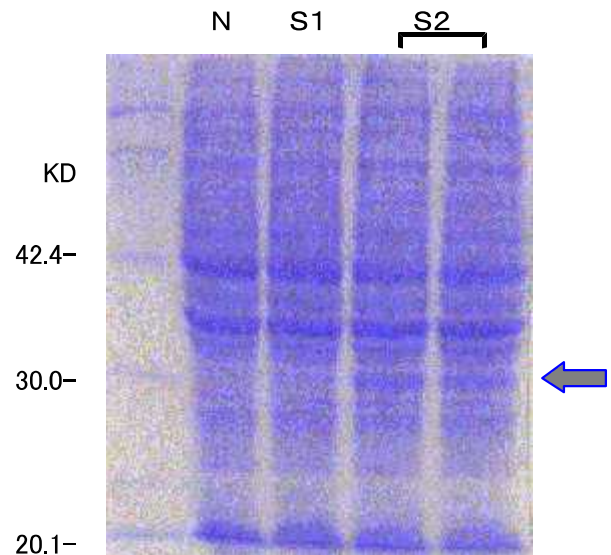


図3 形質転換株によるタンパク質の生成

シグナル配列を有するS2-Cを組み込んだ株(S2株)がSGTaseを最も生成し、S1-Cを組み込んだ株(S1株)もわずかに生成した。しかし、シグナル配列のないN-Cを組み込んだ株(N株)はほとんどSGTaseを生成しなかった。この原因は不明

であるが、シグナル領域がないために合成されてもプロテアーゼによって分解されるためではないかと推測される。

4. 活性の確認

4.1 グルカナーゼ活性

グルカナーゼ活性の確認には、カードラン(β -1,3グルカン)を含んだ寒天プレートでカードランの分解によってアニリンブルーの色が消失するかどうかで判定した。SGTaseを再生したSDS-PAGEをカードラン-アニリンブルー寒天プレートに貼り付けてグルカナーゼ活性を確認した結果を図4に示

す。図3の結果同様、S1株およびS2株には、アニリンブルーの消失が見られ、活性があることが確認されたが、N株では消失がなかった。

4.2 糖転移活性

糖転移活性は、図5に示すとおり、糖基質としてラミナリペンタオースを用い、p-ニトロフェニル- β -グリコシド(pNPG)への転移反応(pNPG \rightarrow pNPG4)を行わせ、高速液体クロマトグラフィー(ヒューレット・パッカー社製HP1090M)により分析した。図6に分析例を示す。

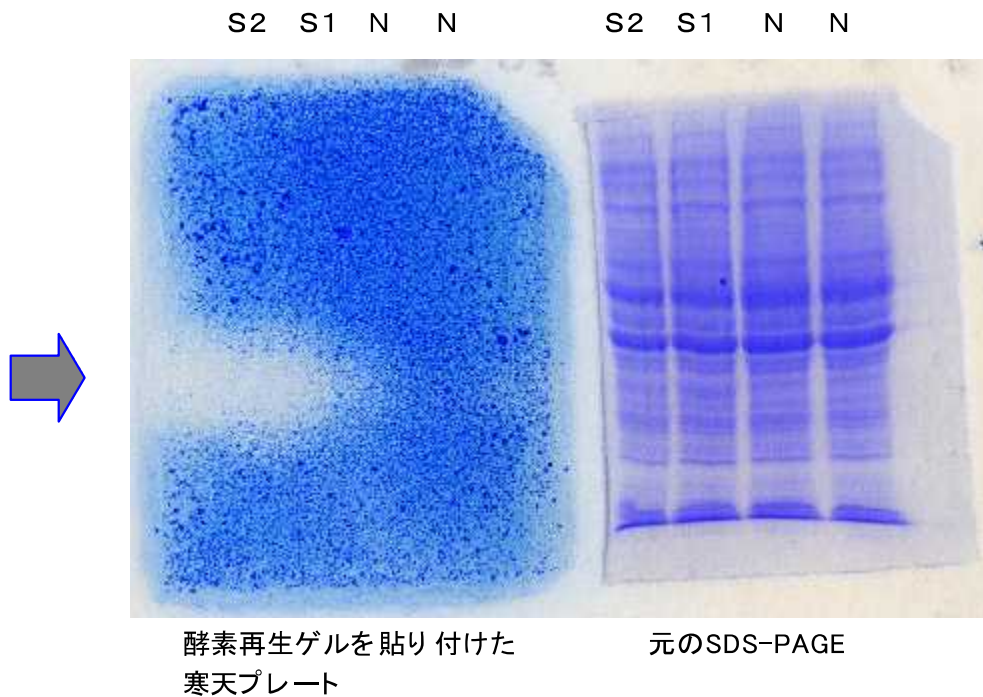


図4 グルカナーゼ活性の確認

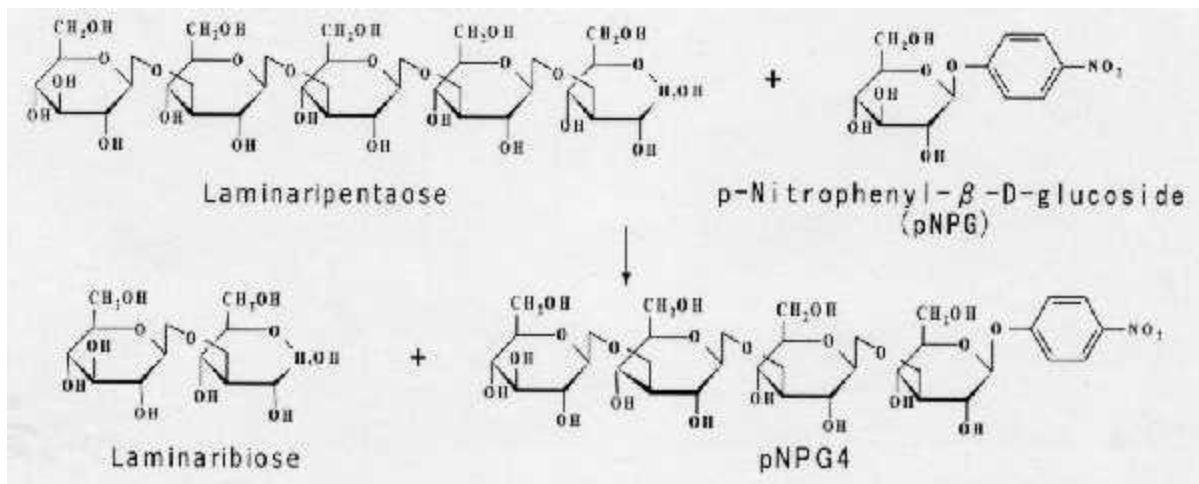


図5 転移活性確認の反応式

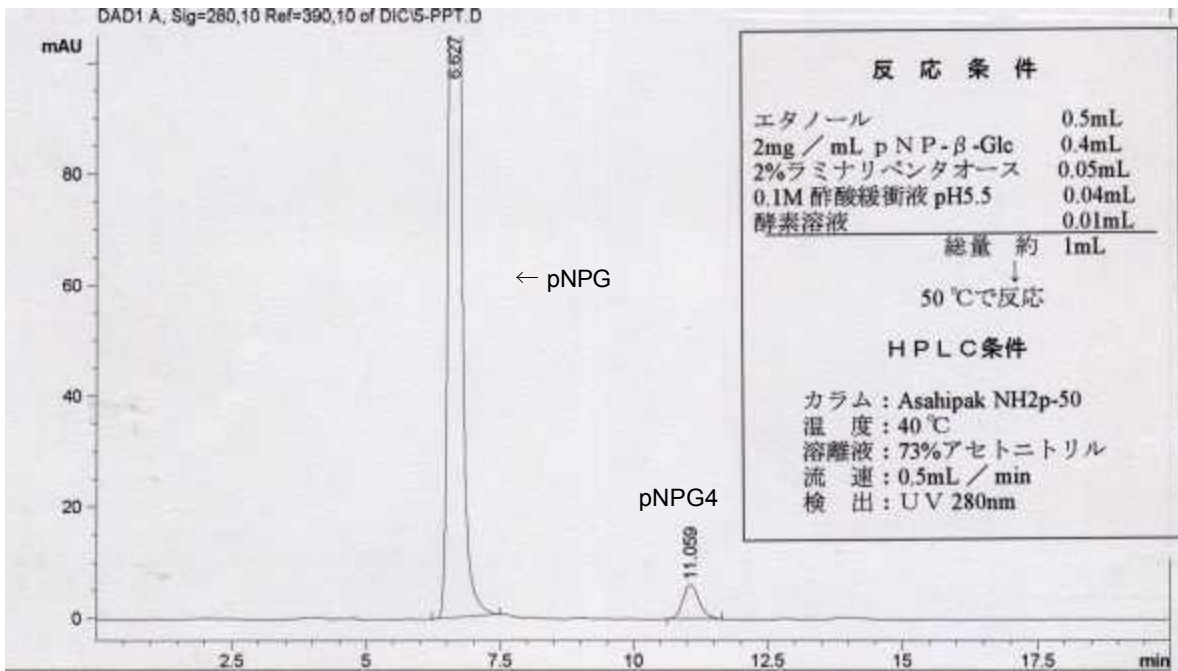


図6 高速液体クロマトグラフィーによる糖転移活性の確認

4. 3 温度の影響

大腸菌の培養温度が酵素生産にどのような影響を与えるかを調べた。形質転換株 S 2 を 25℃, 30

℃および35℃で20時間培養後、菌体および蒸発乾固した培養液をSDS-PAGEにかけた。図7に示すとおり菌体では、すべての温度区においてSGTaseが生成されている。他方、培養液では35℃区におい

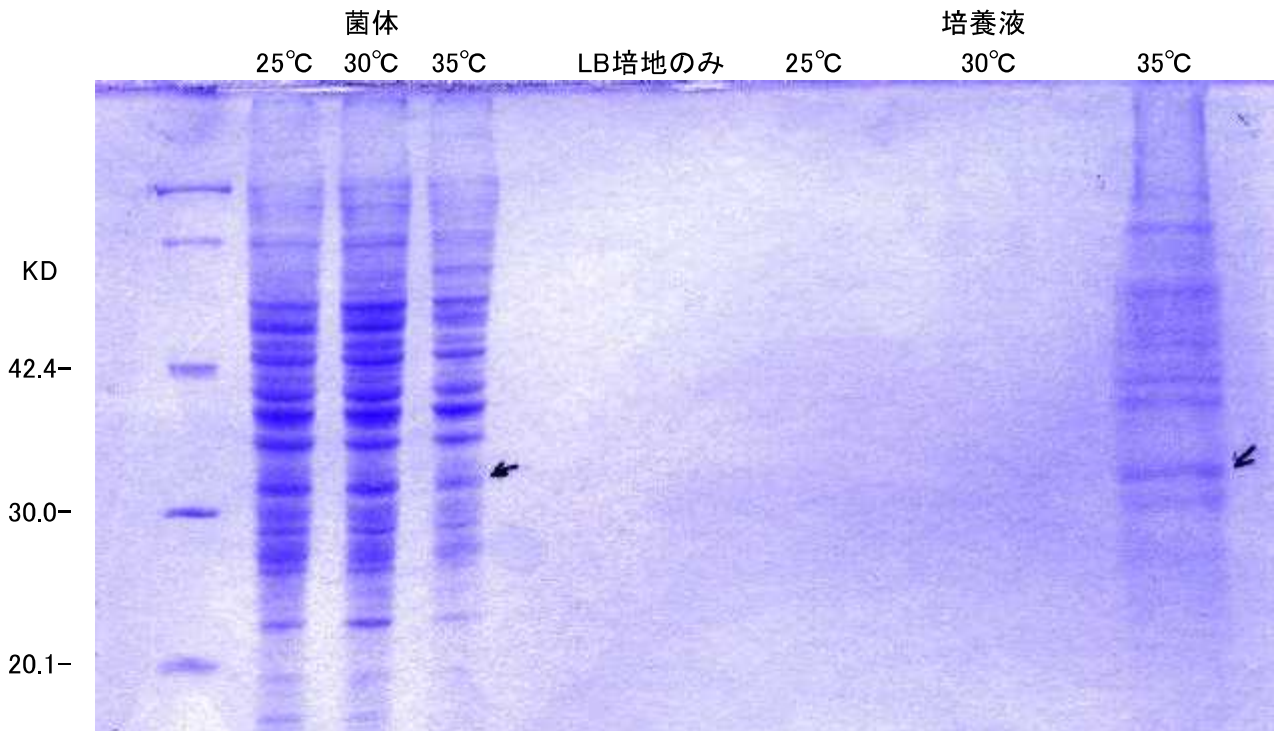


図7 温度による酵素生産への影響

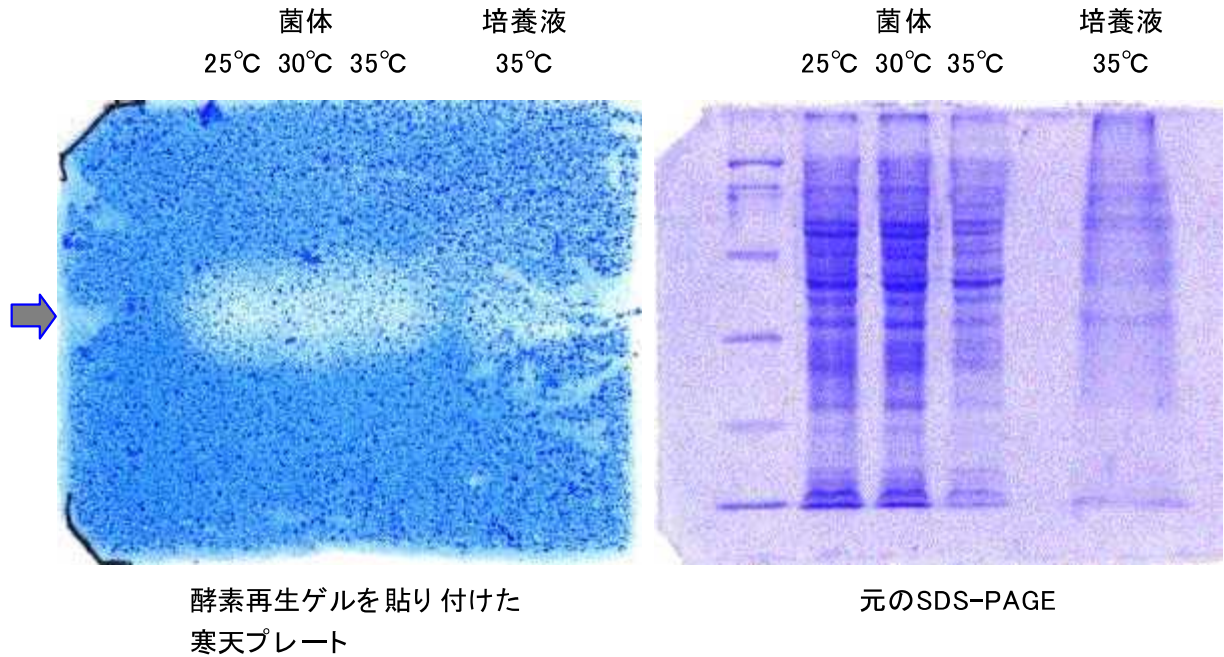


図8 グルカナーゼ活性の確認

でのみ確認されているが、他のタンパク質も存在することからSGTaseが分泌されているのではなく、菌体の溶解により遊離していると思われる。

また、菌体のすべての温度区と培養液の35°C区についてグルカナーゼ活性があることを確認している(図8)。

5. まとめ

放線菌L-108からSGTase遺伝子を大腸菌に導入して、遺伝子が発現していることを確認した。しかし、形質転換した大腸菌が溶解している現象が見られた。このため、L-108へのセルフクローニングを含め、他の微生物による系を検討する必要がある。

また、対象とした放線菌の遺伝子DNAは、G

C含量が高いためPCRが非常に難しく、遺伝子もなかなか取得できなかった。今回は述べなかったが、PCRの反応条件などいろいろ変えたり、TAIL-PCR²⁾等も試みたりした。その中で、PCRの反応液へのジメチルスルホキシド(DMSO)の添加により目的遺伝子を含むバンドの形成に効果的であることが判明した等、本研究はPCR手法の技術向上に資するものであった。

参考文献

- 1) 島本功, 佐々木卓司監修: 植物のPCR実験プロトコール(細胞工学別冊), 秀潤社, p79~82 (1997)
- 2) 同書, p83~89