

枯草菌母細胞へのタンパク質高蓄積システムの開発

佐藤 勉

法政大学 生命科学部

研究の目的

基礎研究・応用研究を問わず、ある特定の宿主を用いた異種タンパク質の発現・精製は日常的に行われるプロセスである。異種タンパク質発現は高発現かつ簡便性が求められる。また、タンパク質はそれぞれ構造と性質が異なるため、目的のタンパク質に応じて発現・精製法を変更する必要がある。そのため、これまで種々の異種タンパク質に対応する様々な発現系が開発されてきた。

枯草菌は有孢子細菌であり栄養源枯渇により細胞内に孢子を形成する。この時期は培地中の細胞数が最大数に達する時期である。孢子は休眠性の細胞であり、熱や放射線、薬剤に対する耐久性および水環境中で拡散する性質も持つ。孢子の耐久性にはタンパク質成分である孢子内部のスポアコートタンパク質と外部のクラストタンパク質が関与している。一方、水環境中での拡散にはクラスト外層に位置するポリサッカライドが関与している。孢子形成期の細胞は、不等分裂によって大きな細胞（母細胞）と小さな細胞（フォアスポア）に分かれる。フォアスポアは将来孢子となる細胞であり、母細胞は孢子の形成を孢子の外側から構築する細胞である。母細胞とフォアスポアには同一の染色体 DNA が存在するが、それぞれで機能する RNA ポリメラーゼの σ 因子が異なり、母細胞で $\sigma^E \rightarrow \sigma^K$ 、フォアスポアで $\sigma^F \rightarrow \sigma^G$ の順に機能し、それぞれのコンパートメントに必要な一群の遺伝子が発現することにより孢子形成が進行する。孢子最外のタンパク質層はクラストであるが、このうち CotY が最も発現量が多い。*cotY* の転写には σ^K が関与している。一方、孢子ポリサッカライド合成には *spsA-L* オペロンから産生される酵素群が必要である。これらの酵素によりクラストタンパク質の一つである CgeA を起点にポリサッカライドが合成される (1)。母細胞内で孢子が成熟すると母細胞成分を包む細胞膜と細胞壁が消失する。細胞壁の分解すなわち溶菌には、CwlB、CwlC、CwH などの溶菌酵素が関与している。細胞膜と細胞壁が分解することで、母細胞から孢子が放出される。一方、*cwlBCH* 変異株は厚い細胞壁を保ち、孢子が母細胞から遊離しにくいことが報告されている (2)。

本研究では枯草菌孢子形成に関する上記の知見に注目し、母細胞に異種タンパク質を蓄積して回収する新たな方法の開発を目的とした。

方法

母細胞はスポア関連タンパク質の生合成を専門とするため、細胞内のプロテアーゼによる分解を受けにくい。また、遺伝子発現が σ^E や σ^K 支配下の遺伝子に限定さ

れるため、発現するタンパク質分子種が少なく異種タンパク質精製を容易にする。枯草菌の孢子形成を利用した異種タンパク質発現に考慮する課題とその解決策を以下に記す。1) 培養液中の細胞が最大となる時期に異種タンパク質を発現させる。枯草菌においては孢子形成期が該当する。2) 強力なプロモーターを用いる。 P_{cotY} は母細胞が機能する強力なプロモーターである。3) マルチコピープラスミドを用いる。プラスミド、pKM-1はコピー数が多い。4) 細胞内の異種タンパク質生産環境を整える。孢子ポリサッカライド合成に関与する *spsA-L* を破壊し、これにポリサッカライド合成に要する転写・翻訳装置およびタンパク質合成に必要な基質・エネルギーを異種タンパク質生産に転用させる。5) 細胞に蓄積した異種タンパク質を回収する。宿主の細胞壁溶解に関わる *cwlBCH* を破壊することにより細胞壁を厚くし、回収を容易にする。特に Hosoya ら(2)の知見から以下の可能性を考えた。母細胞成分内の細胞壁を通過する分子は細胞壁外に移行させることができる。一方、培養液中の分泌されたプロテアーゼは厚い細胞壁を介して外側から内側に移行できない。厚い細胞壁に包まれた母細胞は、内部に孢子を含むため重量があり、遠心で沈殿として回収できる。高分子量のタンパク質は厚い細胞壁を通過できず、細胞壁に包まれた孢子とともに沈殿として回収できる。沈殿に緩衝液を加え、攪拌と遠心を数回繰り返す(洗浄)ことで、細胞外に分泌されていたプロテアーゼは除去できる。得られた沈殿画分に lysozyme を含む緩衝液を加えてインキュベートすると、細胞壁が溶解し、細胞壁を通過しなかった母細胞成分が溶出する。遠心により上清(母細胞タンパク質)と沈殿(孢子と細胞残渣)に分離できる。以上のコンセプトにより考案した新たな異種タンパク質の蓄積と回収方法(図1)の有効性を実証した。

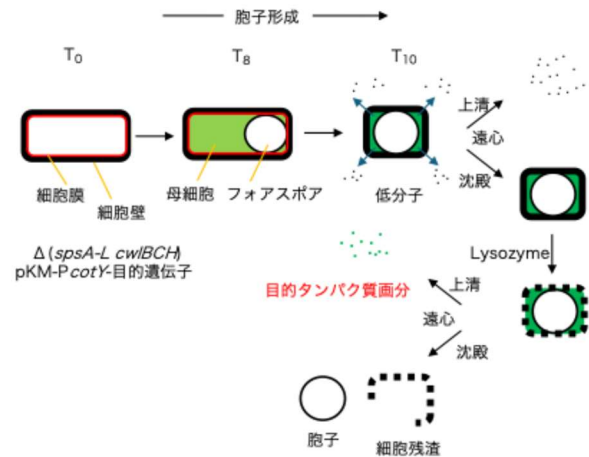


図1 枯草菌母細胞への異種タンパク質蓄積・回収方法の概略

結果

まず、*cotY*プロモーターを持つマルチコピープラスミド(pKM-1- P_{cotY})株を作製し、 P_{cotY} の下流にそれぞれ *gfp* および *lacZ* を連結した。プロモーターからの孢子形成特異的な異種タンパク質発現を調べた。これらのプラスミド保有株の孢子形成開始 6 時間後(T₆)よりこれらの異種タンパク質の発現が認められた。母細胞で形成される孢子ポリサッカライド層は孢子最外に位置し容積率が高い(1)。孢子ポリサッカライド遺伝子は *spsA-L* にコードされる。この欠損変異導入によりこれらの異種遺伝子発現量がさらに増大した。次に、*cwlBCH* 変異を異種タンパク質発現株に導入したとこ

ろ、母細胞壁の溶解が遅延、異種タンパク質の母細胞内での保持時間が延長された。*cwlBCH* 変異株の T₁₀以降に見られる細胞壁に包まれた構造体の内部には成熟した孢子が存在する。孢子は密度が高く遠心で容易に沈殿画分に移行する。沈殿にリン酸緩衝液を加え攪拌し、構造体の純度を高めた。沈殿に lysozyme を含む緩衝液を加え攪拌することで細胞壁が溶解する。従って、 Δ (*spsA-L cwlBCH*) 株を用いて蓄積された異種タンパク質はこの操作により緩衝液内に溶出する。

Lysozyme 処理後の溶液を遠心することにより、上清（異種タンパク質画分）と沈殿（孢子画分）とを分けることができると考えた。この操作は極めて簡単であり短時間に高濃度の異種タンパク質を含む画分を得ることができる。 Δ (*cwlBCH spsA-L*) 株にそれぞれ pKM-1-P_{cotY}-*lacZ* と pKM-1-P_{cotY}-*gfp* を導入した株の上清中の全タンパク質に対するそれぞれのタンパク質の比率は 35%以上であった(図2)。この結果は Δ (*cwlBCH spsA-L*) を宿主に用いることでより精製の進んだ異種タンパク質画分を得ることができることを示している。

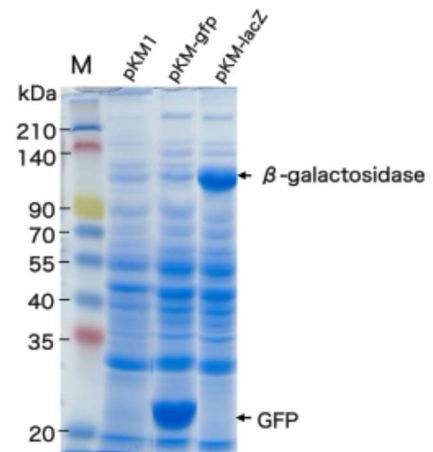


図2 Δ (*spsA-L cwlBCH*) 株の母細胞で発現・蓄積させ回収した β -galactosidase と GFP

結論

枯草菌孢子形成母細胞特異的プロモーター(P_{cotY})を持つマルチコピーベクターを作製した。宿主として、孢子ポリサッカライド合成酵素をコードする *spsA-L* と母細胞壁溶解に関わる *cwlBCH* 破壊株を作製した。この宿主・ベクター系を用いて、異種タンパク質を母細胞に蓄積させ、回収する技術を開発した。遠心と Lysozyme 処理だけで 35%以上相対量となる異種タンパク質が得られたことは、本システムは新たな異種タンパク質発現・蓄積・回収システムとして有効であることを示している。

文献

- 1) Nakaya, Y., Uchiike, M., Hattori, M., Moriyama, M., Abe, K., Kim, E., Eichenberger, P., Imamura, D., and Sato, T. (2023) Identification of CgeA as a glycoprotein that anchors polysaccharides to the spore surface in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **120**:384-396.
- 2) Hosoya, S., Lu, Z., Ozaki, Y., Takeuchi, M., and Sato, T. (2007) Cytological analysis of the mother cell death process during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **189**:2561-2565.