

新規機能性オリゴ糖結合タンパク質を用いた 食品分析用バイオセンサーの開発

新潟大学大学院 自然科学研究科
中井 博之

研究の目的

糖質結合タンパク質を活用することで、ヒトの健康保持増進に有益な生理活性を示す機能性オリゴ糖を選択的に測定可能とする食品分析用バイオセンサーの開発を目指し、本申請研究では機能未知の糖質結合タンパク質の基質特異性を調査することで、バイオセンサー開発時の基礎データの蓄積を図る。

実験方法

糖質結合タンパク質の調製

各種微生物のゲノム情報を基に、糖質結合タンパク質をコードすると推定される17種類の遺伝子(表1)をPCRで増幅後、大腸菌発現用ベクター pET24a (C末端にヒスチジンタグを形成させるために使用)もしくは pET28a (N末端にヒスチジンタグを形成させるために使用)に挿入

し、大腸菌 BL21 (DE3) もしくは大腸菌 Rosetta 2 (DE3) を形質転換した。得られた大腸菌を、LB 培地 (BL21 使用の際は 50 µg/mL カナマイシン、Rosetta 2 使用の際は 50 µg/mL カナマイシンと 20 µg/mL を添加) を用いて OD600 = 0.6 まで 37°C で培養し、0.1 mM IPTG により組換えタンパク質を誘導生産した。18°C、24 時間の培養後、遠心分離 (4,000 × g, 20 min) にて集菌し、超音波破碎により菌体を破碎し、菌体残渣や不溶性タンパク質などの夾雑物を遠心分離 (20,000 × g, 20 min) により除去した後、上清液中に含まれる対象タンパク質を SDS-PAGE により確認した。対象タンパク質の生産が確認された菌株を用いて、上記と同一条件により 200 mL 系で大量培養した後、ニッケルキレートアフィニティークロマトグラフィーにより対象タンパク質を精製した。その後、透析チューブを用いて 5 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) もしくは 10 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0)、150 mM NaCl 条件下に溶媒置換した。

表1 今回研究対象とした糖質結合タンパク質遺伝子

No	Organism	GenBank ID	Locus Name
SB1	<i>Bacillus selenitireducens</i>	ADI00312	Bsel2821
SB2	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	ABY35237	Caur_2022
SB3		ABX41393	Cphy1013
SB4	<i>Lachnoclostridium phytofermentans</i>	ABX42248	Cphy1879
SB5		ABX43671	Cphy3317
SB6	<i>Listeria innocua</i>	CAC98197	Lin2972
SB7	<i>Escherichia coli</i> 29	AAC74392	b1310
SB8		ABX81336	Acl0720
SB9	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	ABX81340	Acl0724
SB10		ABX40818	Cphy0431
SB11		ABX41248	Cphy0862
SB12		ABX42089	Cphy1717
SB13	<i>Lachnoclostridium phytofermentans</i>	ABX42095	Cphy1723
SB14		ABX42628	Cphy2265
SB15		ABX42635	Cphy2274
SB16	<i>Listeria innocua</i>	CAC96084	Lin0852
SB17	<i>Thermoanaerobacter</i> sp. strain X514	ABY93081	Teth514_1796

結合基質の調製

本研究室で保有しているホスホリラーゼを用いて、対象タンパク質の結合基質と推定されるオリゴ糖の酵素合成を行った。ホスホリラーゼはその反応の可逆性および厳密な反応位置選択性から、糖受容体（糖1-リン酸）と糖受容体を出発材料とした選択的なオリゴ糖生産に利用可能である。そこで本申請研究では、*Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl 由来コージビオースホスホリラーゼ (Caur2019) を用いて β -グルコース1-リン酸とグルコースからコージオリゴ糖を、*Lachnoclostridium phytofermentans* 由来ニゲロースホスホリラーゼ (Cphy3313)¹⁾ と α -1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼ (Cphy3314)²⁾ を用いて β -グルコース1-リン酸とグルコースからニゲロオリゴ糖を、*Thermoanaerobacter* sp. strain X514 由来1,2- β -オリゴマンナンホスホリラーゼ (Teth514_1788) を用いて α -マンノース1-リン酸とマンノースから1,2- β -オリゴマンナンを調製した。

基質特異性の調査

今回、糖結合タンパク質を固定化して表面プラズモン共鳴法により結合特異性を調べた。先に調製した糖結合タンパク質をリガンドとし、各種糖質（グルコース、マンノース、ガラクトース、トレハロース、コージビオース、ニゲロース、マルトース、イソマルトース、ソホロース、ラミナリビオース、セロビオース、スクロース、ラクトース、 β -1,4-マンノビオース、 β -1,4-マンノシルグルコース、 β -1,4-マ

ンノシル-N-アセチルグルコサミン、 β -1,2-マンノピオース）をアナライトとして、糖質結合タンパク質と各種糖類の結合能を表面プラズモン共鳴装置 Biacore 2000 を用いて調べた。センサーチップは金基板上に弱陽イオン交換体であるカルボキシメチル基が固定された Sensor Chip CM5 を使用し、リガンドの固定にはアミンカップリング法を用いた。固定化条件は5 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) を用いて100 μ g/mL になるように希釈したリガンドを、流速10 μ L/min、固定時間7 min の条件で、約7 μ g 固定できるように調製した。また、ブランクとして、100 μ g/mL の牛血清アルブミン (BSA) を同一条件下にてセンサーチップ上に固定した。その後、それぞれのリガンドに対して、1 μ M に調製したアナライトを送液し、センサーグラム上の質量値（平衡値）の変化を測定することにより、結合能を調べた。

結果と考察

糖質結合タンパク質の調製

今回研究対象とした糖質結合タンパク質の大腸菌による発現に使用したベクター、大腸菌株、発現確認結果、タンパク質収量を表2に示す。今回タンパク質調製を試みた17種の糖質結合タンパク質の内2つを除いて全て大腸菌での生産系の構築に成功した。また対象タンパク質は全てシグナル配列を有しており、細胞外もしくは細胞膜上に局在していると予測される。

表2 糖質結合タンパク質の発現条件および収量

No	発現ベクター	大腸菌株	発現	タンパク質精製収量 (mg protein/200 mL culture)
SB1	pET24a	BL21(DE3)・Rosetta2 (DE3)	—	—
SB2	pET24a	Rosetta2 (DE3)	+	46
SB3	pET24a	BL21 (DE3)	+	ND
SB4	pET24a	BL21 (DE3)	+	46
SB5	pET24a	BL21 (DE3)	+	111
SB6	pET24a	BL21 (DE3)	+	86
SB7	pET24a	BL21 (DE3)	+	115
SB8	pET24a	BL21 (DE3)	+	62
SB9	pET24a	BL21 (DE3)	+	ND
SB10	pET24a	BL21 (DE3)	+	ND
SB11	pET24a	BL21 (DE3)	+	44
SB12	pET24a	BL21 (DE3)	+	67
SB13	pET24a	BL21 (DE3)	+	29
SB14	pET24a	Rosetta2 (DE3)	+	14
SB15	pET24a	BL21 (DE3)・Rosetta2 (DE3)	—	—
SB16	pET24a	Rosetta2 (DE3)	+	ND
SB17	pET28a	BL21 (DE3)	+	44

ND, not determined.

結合基質の調製

A) コージオリゴ糖の調製

500 mM β -グルコース 1 リン酸, 250 mM グルコース, 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 1 mg/mL Caur2019 を含む全量 2 mL の反応液を, 50°C, 72 時間インキュベーションした後, 0.1 M HCl 下で一晩処理することで反応を停止した. 得られたコージオリゴ糖は, アンバーライト

MB4 による脱塩後, HPLC (Asahipak NH2P-50 10E カラム: 10 mm ϕ \times 250 mm, 3 mL/min 60% アセトニトリル) を用いて分離精製した. 収量は, コージビオース (Koj2) 12 mg, コージトリオース (Koj3) 28 mg, コージテトラオース (Koj4) 17 mg, コージペンタオース (Koj5) 30 mg, コージヘキサオース (Koj6) 36 mg であった.

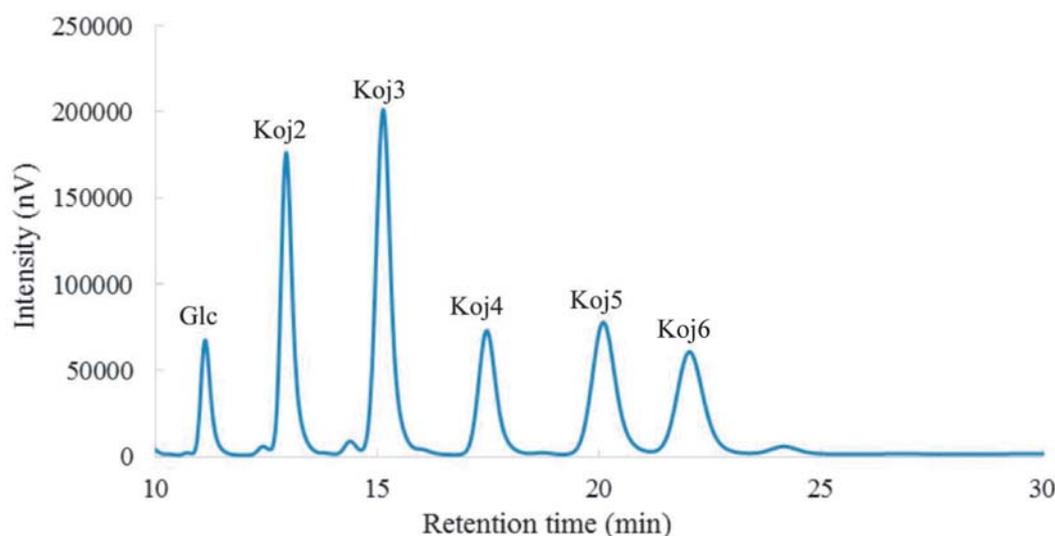


図1 コージオリゴ糖のHPLCチャート

B) ニゲロオリゴ糖の調製

500 mM β -グルコース 1 リン酸, 500 mM グルコース, 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 130 μ g/mL Cphy3313, 25 μ g/mL Cphy3314 を含む全量 4 mL の反応液を, 30°C, 72 時間インキュベーションした後, 50°C 下で 30 min 熱処理することで反応を停止した. 得られたニゲロオリゴ糖は, アンバーライト MB4 による脱塩後, ゲル濾過クロマトグラフィー (TOYOPEARL HW40 カラム: 50 mm ϕ \times 1000 mm, 1 mL/min 超純水) により分離精製した. 収量は, ニゲロース 40 mg, ニゲロトリオース 45 mg, ニゲロテトラオース 36 mg, ニゲロペンタオース 15 mg, ニゲロヘキサオース 16 mg であった.

C) 1,2- β -オリゴマンナン調製の調製

500 mM α -マンノース 1 リン酸, 500 mM マンノース, 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0), 1.5 μ M Teth514_1788 を含む全量 4 mL の反応液を, 30°C, 72 時間インキュベーションした後, 0.1 M HCl 下で一晩処理することで反応を停止した. 得られた 1,2- β -オリゴマンナンは, アンバーライト MB4 による脱塩後, HPLC (Asahipak NH2P-50 10E カラム: 10 mm ϕ \times 250 mm, 3 mL/min 65% アセトニトリル) を用いて分離精製した. 収量は, β -1,2-マンノピオース (Man2) 31 mg, β -1,2-マンノトリオース (Man3) 24 mg, β -1,2-マンノテトラオース (Man4) 21 mg, β -1,2-マンノペンタオース (Man5) であった.

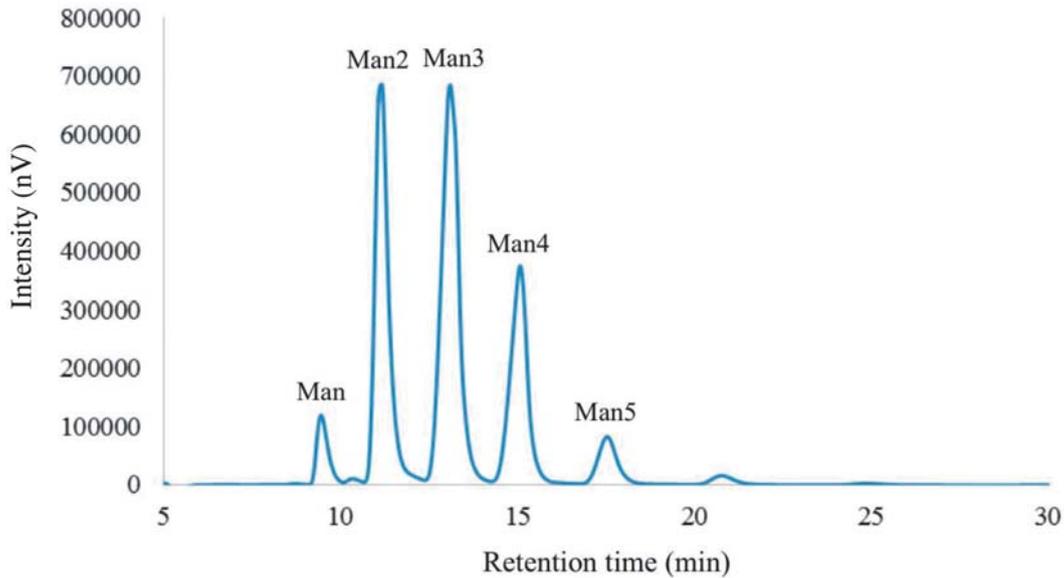


図2 1,2- β -オリゴマンナンの HPLC チャート

基質特異性の調査

糖質結合タンパク質 SB2, SB4, SB5, SB7, SB8, SB11, SB17 をリガンドとして、ホスホリラーゼの逆反応により調製したオリゴ糖を含む各種糖類をアナライトとして、各糖質結合タンパク質の基質特異性を調査した。得られたセンサーグラムは、アナライト添加後の質量変化量から対象ブランクをリガンドとしたアナライト添加後の質量変化量を差し引いたものであり、センサーグラムの質量値（平衡値）の上昇が認められたリガンドを結合能ありとした。実験の結果、*Lachnoclostridium phytofermentans* 由来糖質結合タンパク質 (Cphy3317) はニゲロースに、*Lachnoclostridium phytofermentans* 由来糖質結合タンパク質 (Cphy0862) はラミナリビオースに、*Thermoanaerobacter* sp. strain X514 由来糖質結合タンパク質 (Teth514_1796) は β -1,2-マンノピオースに対して特異性を示す一方で、*Acholeplasma laidlawii* 由来糖質結合タンパク質 (Acl0720) はグルコースや α -グルコシド系に広く結合能が観察された。

まとめ

糖質結合タンパク質は、微生物における糖類の細胞内輸送に関わる ABC 輸送系内に含まれるタンパク質である。微生物の細胞膜上に存在しており、細胞外に存在するオリゴ糖を取捨選択する重要な機能を担っている。我々は、当該糖質結合タンパク質を活用することで、ヒトの健康増進に有益な生理活性を示す機能性オリゴ糖を選択的に測定可能とする食品分析用バイオセンサーの開発を目指し、本研究では機能未知の糖質結合タンパク質の結合メカニズムを動力学的に評価し、バイオセンサー開発時の基礎データの蓄積を図った。17種の糖結合タンパク質遺伝子をク

ローニング後、大腸菌を宿主とした異種発現系を構築した。またホスホリラーゼのオリゴ糖合成反応を用いて合成した希少オリゴ糖（コージオリゴ糖・ニゲオリゴ糖・ β -1,2-オリゴマンナン）を含む各種糖類に対する糖質結合タンパク質の結合能を表面プラズモン共鳴法により解析することに成功した。その結果、厳密な基質特異性を有するものだけでなく、比較的広い認識性を有するものが存在していることが明らかとなった。今後、定性的な結合能を確認するだけでなく、動力学パラメータを算出するための定量性測定、金属イオンなどの補因子の特定、他の固定化法の検討、等温滴定型熱量計・電気化学検出器など他の熱力学測定装置を使用した解析を行う予定である。

引用文献

- 1) Nihira T., Nakai H., Chiku K., Kitaoka M. Discovery of nigerose phosphorylase from *Clostridium phytofermentans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012, 93, 1513-1522.
- 2) Nihira T., Nishimoto M., Nakai H., Ohtsubo K., Kitaoka M. Characterization of two α -1,3-glucoside phosphorylases from *Clostridium phytofermentans*. *J. Appl. Glycosci.* 2014, 61, 59-66.