

発表番号 36 (0514)

フジツボ幼生セメント組換えタンパク質の大量発現

岡野 桂樹 (秋田県立大学生物資源科学部)

野方 靖之 (電力中央研究所応用生物部)

小黒 美枝子 (ヤマザキ動物看護短期大学)

フジツボは代表的な付着生物で、船底や発電所、工場の取水口などに固着し、大きな被害をもたらす。本研究の究極の目的はフジツボが付着する際に使用する幼生接着剤の全容を明らかにし、その知見を付着防除と塩水環境下で働く効果的な接着剤の開発に活かすことである。

本助成研究においては、平成15年度の助成研究をさらに発展させ、網羅的にセメント接着剤に関与する遺伝子群を同定し、その全長配列を明らかにするとともに、それらの遺伝子産物のpET32a、pET41b大腸菌タンパク質発現系による大量発現系を構築した。

表1にアカフジツボキプリス幼生のセメント関連遺伝子群として特定された遺伝子について、その演繹的に求められたタンパク質の性質を列挙した。すべてのタンパク質は分泌タンパク質(シグナルペプチド配列を有する)であり、セメント分泌器官に大量に発現している。Ccg(Cyprid Cement Gland)-57K, 36K, BSP, ASPが主

要成分であり、ASPを除き、強塩基性タンパク質である。TRPはチロシンを多く含む特徴がある。プロテアーゼインヒビター様タンパク質群はタンパク質接着剤が海洋環境下で微生物分解されることを阻止するために働いている可能性がある。

大腸菌によるタンパク質の発現は上記6群10種類に加え、未だ全長配列は決定されていないセメント高分子をコードする2種類(コードナンバーcg1f-3G5, cg1s-2C6)、リジロキシダーゼ様遺伝子産物の計8群13種類のタンパク質配列について、全長または部分配列をpETベクターに導入することで検討された。その結果、37K, ASPを除く6群10種類のタンパク質(一部については部分的なドメイン配列だけの場合を含む)について、大量発現させる条件を見出すことに成功した。

大量発現された組換えタンパク質については、順次特異抗体を作製することとともに、接着作用や自己集合性などの基本的な性質を調べていく予定である。

表1. アカフジツボキプリス幼生セメント候補タンパク質の性状

		Ccg-BSP	Ccg-ASPs	Ccg-57K	Ccg-36K	Ccg-TRPs	Ccg-Pls
全長ライブラリーEST(576)中の存在数		81	45	15	10	4	6
ホモロジー検索の結果		既知とホモロジーなし					プロテアーゼ阻害タンパク質群
分泌タンパク質か否か?		分泌タンパク質					
タンパク質アミノ酸残基数		102	100	548	380	2種	4群
成熟タンパク質アミノ酸残基数		83	74	524	364	2種	4群
推定分子量(翻訳後修飾なしと仮定)		9.9kDa	8.0kDa	56kDa	40kDa	-	-
pI		12.16	酸性	10.68	11.96	-	-
親水性・疎水性		親水性	親水性	親水性	疎水性	-	-
アミノ酸組成 (多い順に4種またはその特徴)		アルギニン	アスパラギン酸が最も多く、ほかにプロリン、セリン、リジンなど	グリシン	ロイシン	チロシンの含有量が高い	システインが多く、その位置関係が保存されている
		システイン		スレオニン	アルギニン		
		リジン		リジン	バリン		
		プロリン		セリン、アルギニン回数	プロリン		
発現	幼生時期	キプリス幼生	キプリス幼生	キプリス幼生	ノープリウス6期(III)	キプリス幼生	-
	キプリス器官	セメント腺				甲皮に多い	-
大腸菌によるタンパク質発現		x	◎	◎	x	◎	◎
推定機能?		粘着または接着または?				共有結合?	分解阻止?

助成番号 0514

フジツボ幼生セメント組換えタンパク質の大量発現

岡野 桂樹 (秋田県立大学生物資源科学部)

野方 靖之 (電力中央研究所応用生物部)

小黑 美枝子 (ヤマザキ動物看護短期大学)

① 研究の背景と目的

フジツボは代表的な付着生物で、船底や発電所、工場の取水口などに固着し、大きな被害をもたらす汚損生物である。フジツボの付着はプランクトン幼生期の最終段階に位置するキプリス幼生がタンパク質接着剤(セメント)を放出し、その体を塩水環境下で固定することで達成される。付着した幼生はその場で変態し、幼体、親へと成長する¹⁾。

本研究の究極の目的はフジツボキプリス幼生が放出する接着剤の全容を明らかにし、その知見を付着防除と塩水環境下で働く効果的な接着剤の開発に活かすことである。しかしながら、本研究を遂行する上で大きな障害がある。それはキプリス幼生が1 mm 弱と小型であり、放出される接着剤がきわめて少量である点である(図1)。

そこで、我々はセメントを合成し、放出する目的だけに特化した器官であるセメント腺に注目し、セメント腺で大量に翻訳される分泌タンパク質群こそがセメントに直接関係があるという作業仮説のもとに本研究を開始した。すなわち、平成15年度のソルトサイエンス研究財団の助成を得て、アカフジツボキプリス幼生のセメント腺から全長cDNAライブラリーを作製し、そのEST解析を行うとともにセメント腺主要タンパク質の解析を行い、2種類のセメント候補遺伝子(Ccg-57k, Ccg-36k)を同定することに成功した²⁾。本助成研究は15年度の研究をさらに発展させ、網羅的にセメント接着剤に関与する遺伝子群を同定するとともに、それらの遺伝子産物を、大腸菌発現ベクターを用いて大量発現させる系を確立することで、機能解析への道を開くことを目的とした。

② 研究方法

②-1 実験材料(アカフジツボキプリス幼生)

アカフジツボ幼生は、共同研究者である電力中央研究所野方博士グループ(千葉県我孫子市)から供与されたものを使用した。すなわち、宮城県志津川湾で採集した成体から孵化したノープリウス幼生を7-8日間、電力中央研究所で飼育し、キプリス幼生に変態した直後に宅急便で秋田県立大学に輸送した。輸送された幼生は実

験に必要な時期が来るまで20°Cのインキュベーター内で飼育した。

②-2 セメント腺サブトラクション cDNA ライブラリーの作製とその小規模 EST 解析

すでに記載されている方法¹⁾を用いて解剖単離したアカフジツボキプリス幼生のセメント腺と甲皮(殻)から、NucleoSpin RNA II kit (MACHEREY-NAGEL 社)を用いて totalRNA を抽出した。平成15年度においては、セメント腺 total RNA から Creator cDNA construction kit を用いて、全長cDNA ライブラリーを構築したが、今回は Clontech PCR-select cDNA subtraction kit (Clontech)³⁾を用いて、サブトラクション cDNA ライブラリーを作製した。全長 cDNA ライブラリーで行った操作と同様に、セメント腺サブトラクションライブラリーからランダムに576クローン(96穴プレートによるので96 x 6)を選択し、EST解析した。

②-3 組換えセメント関連タンパク質の大腸菌による網羅的発現

3種類の大腸菌発現ベクター pET41b (Novagen), pET32a (Novagen), pCold (Takara) と適当な発現用大腸菌 {BL21(DE3), Rosseta-gami(DE3)pLys (Novagen)} を用いてアカフジツボキプリス幼生のセメント腺タンパク質群の網羅的発現実験を行った。組換えタンパク質の抽出には Bugbuster 試薬を、His₆ タグの Western blotting 検出には BD Universal His-tag Western Detection kit (BD Biosciences) を、組換えタンパク質の精製には His Bind Purification kit (Novagen) を使用した。

③ 実験結果と考察

③-1 キプリス幼生セメント腺に発現する遺伝子群の網羅的解析のまとめ

15年度に作製したアカフジツボキプリス幼生の全長cDNAライブラリーのEST解析のまとめを図2に、今回作成したサブトラクション cDNA ライブラリーのEST解析のまとめを図3に示す。既知遺伝子と有意な(E<0.02)相同性(ホモロジー)を持つ配列を有するクローンの割合は全長ライブラリー EST では193個(33.5%, 図2)で、サブト

ラクシオンライブラリー EST では 103 個 (17.9%, 図 3) であった。未知遺伝子の多くはセメント腺に特異的に発現しており、その主要なものは 4 種類、*ccg-bsp*, *ccg-asp*, *ccg-57k*, *ccg-36k* であった (*ccg* はキプリス幼生のセメント腺遺伝子、またはタンパク質を示す接頭語: *Cyprid Cement Gland* の略、図 2, 3)^{1, 2)}。一方、既知遺伝子と有意な相同性を示す興味深い遺伝子として、種々のプロテアーゼインヒビター様遺伝子^{1, 4)} やリジルオキシダーゼ様遺伝子が見出された (図 2, 3)。

③-2 セメント関連遺伝子産物の性質

Ccg-57K と Ccg-36K タンパク質:

ccg-57k, *ccg-36k* 遺伝子は分子量 57 kDa, 36 kDa のセメント腺主要タンパク質 *Ccg-57K*, *Ccg-36K* をコードしている^{1, 2)}。演繹的に求められた *Ccg-57K* は、548 アミノ酸残基からなる新規タンパク質で、24 残基のシグナルペプチド配列を除いた成熟タンパク質は、グリシン、スレオニン、リジン、セリン、アルギニンを主要アミノ酸とする強塩基性、親水性のタンパク質と推定された (表 1)。一方、演繹的に求めた *Ccg-36K* の配列は、シグナルペプチド (16 残基) を含む 380 残基からなる新規タンパク質であった。シグナルペプチド部分を除いた成熟タンパク質は、ロイシン、アルギニン、バリン、プロリンを主要構成アミノ酸とする強塩基性タンパク質であったが、*Ccg-57K* と異なりきわめて疎水性が高いと推定された (表 1)。両者はセメント合成期に大量に合成され、それ以外の幼生ステージでは発現しないこと、セメント腺のみで発現すること、分泌タンパク質と予想されること、特異なアミノ酸組成を持つことから、有力なセメント基質候補であると考えている。

Ccg-BSP と Ccg-ASP タンパク質:

ccg-bsp 遺伝子は全長およびサブトラクション双方の EST 中にもっとも多く見出された (図 2: 14.1%, 図 3: 22%)。この遺伝子配列から演繹的に求めた *Ccg-BSP* タンパク質のアミノ酸配列は、既知タンパク質とは相同性がなく、102 アミノ酸残基からなり、N 端 19 残基がシグナルペプチドと推定された (表 1)。成熟タンパク質について、そのアミノ酸組成を推定すると、アルギニン、システイン、リジン、プロリンを主要構成アミノ酸とする強塩基性の低分子量タンパク質であることが明らかとなった (表 1)。

ccg-asp 遺伝子は両 EST において、*ccg-bsp* について二番目に多く見出された (図 2: 7.8%, 図 3: 16.1%)。100 アミノ酸残基の N 端 26 残基がシグナルペプチドで、成熟タンパク質は 74 残基と推定された。アミノ酸組成の上では 5 つのアミノ酸部位に置換のある最低 3 種のサブグループに分かれるが、*Ccg-BSP* と異なり、共通してアスパラギン酸が最も多く酸性タンパク質である。

Ccg-TRP タンパク質:

チロシンを多く含み、かつ繰り返し構造に富む分泌性の新規タンパク質群である。繰り返し数の異なる少なくとも 2 種類が存在する。ムラサキガイの接着タンパク質遺伝子とは配列上の相同性はないが、チロシンを多く含むというアミノ酸組成上の“類似性”は存在する⁵⁾。フジツボ付着に関しても、チロシンなどの芳香族化合物の架橋 (共有結合の形成) に基づく固化のメカニズムが関与しているのではないかという議論は、古くから存在する⁶⁾。

リジン酸化酵素:

本年度のサブトラクションライブラリー EST 解析での最も興味深い発見は、リジン酸化酵素をコードする遺伝子が 4 クローン見出されたことであった。現在、全長配列を得るには至っていないが、*Ccg-57K*, *BSP*, *ASP* でリジンが主要なアミノ酸であることと良く符合する。

Ccg-110K タンパク質またはセメント高分子成分:

キプリス幼生の主要タンパク質を 11% SDS-PAGE で調べると 36 kDa, 57 kDa に加えて 110 kDa に強い明瞭なバンドが現れる。36 kDa, 57 kDa は前述のごとく明らかであるが、最も高分子である 110 kDa タンパク質の遺伝子は判明していない。セメント高分子成分には現在、2 つの候補遺伝子がある。一方は、*cgIf-3G5* クローンである。このクローン配列は全長 EST 中に 9 個 (1.6%)。サブトラクション EST に 2 個存在し、キプリス幼生期のセメント腺にのみ特異的に発現する遺伝子である。現在 C 末端側 541 アミノ酸配列が判明しているが N 末端側の同定には至っていない。

もう一方はサブトラクションライブラリーで 1 クローン得られたコード名 *cgIs-2C6* 遺伝子である。この遺伝子は部分配列中央にアカフジツボ親セメントタンパク質 *Mrcp-100k*⁷⁾ の C 末端部分と相同性の高い配列を有するため、幼生期に発現する親セメントタンパク質ホモログを思われる。この遺伝子も C 末端側 365 アミノ酸配列のみが演繹的に明らかになっている。現在判明している部分配列から組換えタンパク質と抗体を作製し、その産物がどの高分子成分に相当するかを検討する必要がある (後述)。

プロテアーゼインヒビタータンパク質群:

4 種類のさまざまなタイプのプロテアーゼインヒビターと相同性を持つ遺伝子群が発見されている。それぞれ特徴的なプロテアーゼインヒビタードメインは保存されているものの、配列全体としてみた場合、既知の遺伝子との相同性はそれほど高くない。分泌シグナルを持つため、セメント腺から分泌されると推測される。セメントの主要成分がタンパク質で構成されているにもかかわらず、キプリス幼生が付着する場所は一般的にタンパク質分解活性

の高い微生物フィルムで覆われていることが多い。タンパク質セメントを微生物分解から防ぐ役割を持つと推測している³⁾。

③-3 セメント関連遺伝子産物の大腸菌による網羅的解析の試み

③-2で紹介したタンパク質(またはその部分的なドメイン配列)の機能解析を行うため、大腸菌による大量発現系の検討を行った。図4は pET41b ベクターを用いて、組換えタンパク質を BL21(DE3) 大腸菌で発現させた例を示している。pET41b による発現では、シグナルペプチド配列を除いた全配列または、遺伝子産物の特徴的な配列部分をコードする遺伝子をフレームを合わせて NdeI-XhoI サイトへ導入することで、組み換えタンパク質に付加される配列がなるべく短くなる(C末端に LE-His6)ように考慮した。導入配列により、発現量はまちまちであるが、CBB 染色で明確に発現が認められる程度の大量発現が見られる例を図4に示した。上段の A~C では Ccg-57K、高分子セメント候補である2種、およびリジロキシンダーゼの部分配列が大量に発現している条件を示した(黒丸囲み)。一方、下段では3種類のプロテアーゼインヒビター群の発現の様子を示した(黒丸囲み)。約半分の例で不溶性分画(封入体)に回収されていた。

図5では pET32a の EcoRI-XhoI サイトを用いて、可溶性を増すためのタグであるチオレドキシンを N 末端側に付加する形で大腸菌に組換えタンパク質を発現させた例を示している。TRP のような親水性の低いタンパク質の発現に際しても、可溶化した状態でセメント腺タンパク質を発現させることができた。また、pET41b の発現では封入体に回収されたプロテアーゼインヒビターの1種(コードネーム:PI-2E11、図4下段右端)がこのシステムでは可溶化された状態で発現できた(図5C)。

現在のところ、適切なベクターと配列を選び出すことで、37K、BSP を除く6群10種類のセメント関連タンパク質(一部については部分的なドメインのみの発現)について、大腸菌による大量発現条件を見出すことに成功した。大量発現されたタンパク質については、順次特異抗体を作製するとともに、酵素活性のあるものは酵素活性を、ないものについては接着作用や自己集合性などの基本的性質を調べていく予定である。

④ まとめと今後の課題

ソルトサイエンス財団の2回の助成(0313, 0514)を受け、我々はアカフジツボキプリス幼生のセメント腺で大量に発現し、かつ分泌タンパク質をコードする遺伝子群を、網羅的に調べた。その結果、予想以上に多数のタンパク

質群が関与する複雑かつ周到にデザインされたプロセスである可能性が徐々に明らかになってきた。さらにセメント関連タンパク質の発現系が確立できたことで、今後さまざまな角度から機構解析を進めることができると確信している。

今後の課題を以下に述べる。まず、第一に、それぞれのタンパク質の特異的な抗体を作製し、各成分を分泌する細胞の同定、分泌順序の同定、セメント内での分布を詳細に調べてみたい。この研究により、セメント固化の生物学的プロセスを物質レベルで追求することが可能になる。ついで、大腸菌で大量に発現させ、精製したたんぱく質を組み合わせて、接着機構の再現を図りたい。そのためには未だ同定に成功していないセメント高分子成分の同定、リジロキシンダーゼなど翻訳後修飾に関する酵素の全長配列の決定と機能的酵素の発現が必須である。最後に各タンパク質を比較的小さいドメインに切り分け、それらを発現するとともにさまざまに翻訳後修飾させることで、セメント腺由来で組成のユニークなペプチド誘導体を大量に調製することにも強い興味を持っている。フジツボの接着剤由来の新しい素材が開発できれば、大変光栄である。

ソルトサイエンス研究財団の助成に心から感謝する。

文献等

- 1) 岡野桂樹 (2005) . キプリス幼生の付着機構 幼生セメント分泌のしくみと幼生セメントの構造:フジツボ類の最新学 (日本付着生物学会 編) 恒星社厚生閣 pp. 168-189.
- 2) 特願 2005-042800 フジツボキプリス幼生のセメント腺に発現するセメント関連タンパク質および遺伝子
- 3) Clontech PCR-select cDNA subtraction kit user manual (BD Biosciences).
- 4) 特願 2005-098634 フジツボキプリス幼生のセメント腺に発現するプロテアーゼインヒビター遺伝子とそれらがコードするペプチド。
- 5) 井上広滋 (2001): 足糸タンパク質の構造から見たムラサキイガイ類の種分化(梶原武/奥谷喬司監修、日本付着生物学会編), 恒星社厚生閣, pp87-105.
- 6) G. Walker, (1971). A study of the cement apparatus of the cypris larva of the barnacle *Balanus balanoides*. *Marine Biology* 9, 205-212.
- 7) K. Kamino, K. Inoue, T. Murayama, N. Takamatsu, S. Harayama, and Y. Shizuri (2000): Barnacle cement proteins. Importance of disulfide bonds in their insolubility. *J. Biol. Chem.* 275, 27360-27365 .

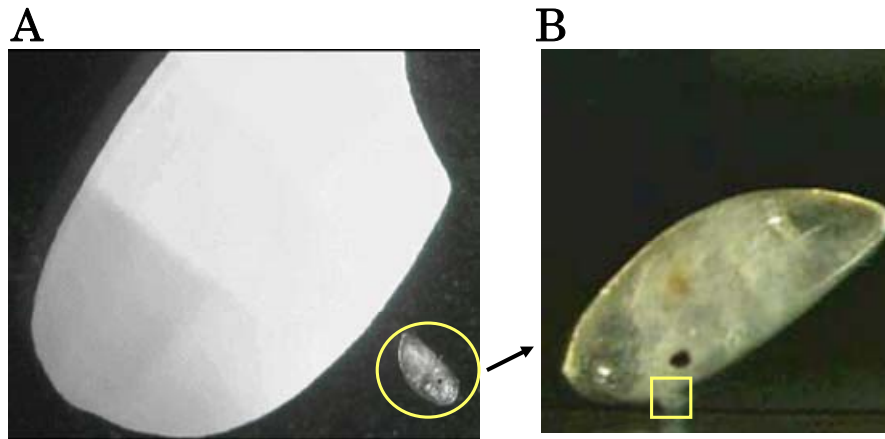


Fig. 1 The settlement-competent cypris larva of the barnacle *Megabalunus rosa*.
 A: Comparison of the size of a larva (circle right below) with that of a rice grain (left). The size of the larva is less than 1 mm. B: A settled larva. The square indicates the settlement site at which the larval cement was released.

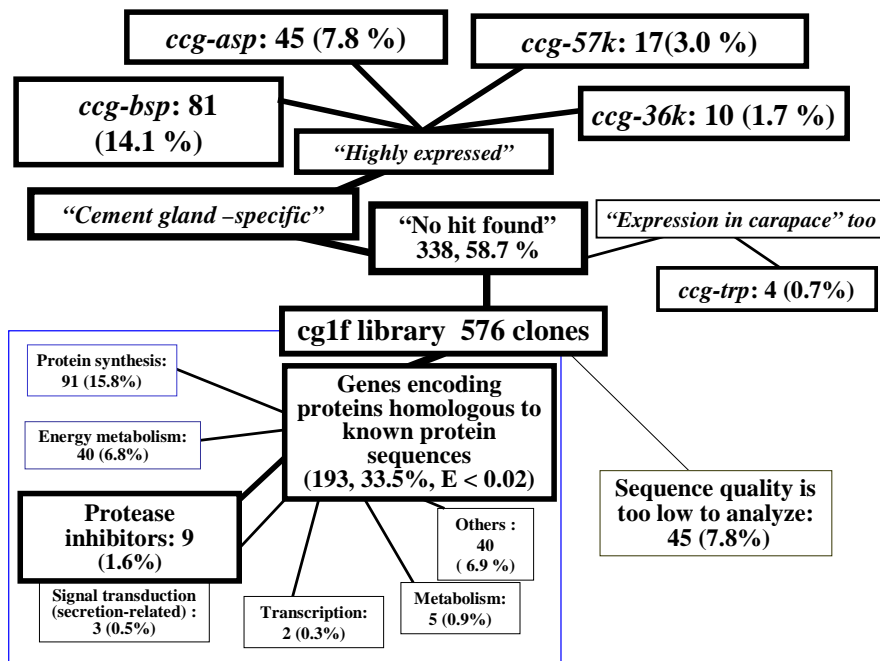


Fig. 2 Summary of the EST analysis from *M. rosa* cyprid cement gland full-length cDNA library. See details in the text.

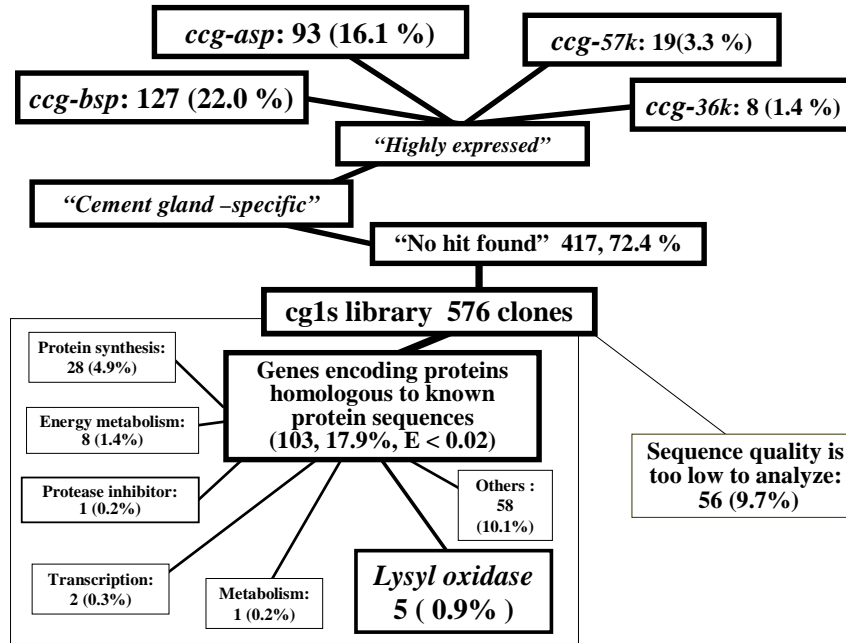


Fig. 3 Summary of the EST analysis from *M. rosa* cyprid cement gland subtraction cDNA library. See details in the text.

Table 1 Characteristics of larval cement related proteins.

Name	Ccg-BSP	Ccg-ASPs	Ccg-57K	Ccg-36K	Ccg-TRPs	Ccg-PIs	
Homology	No significant homology to any known genes					Protease inhibitors	
Signal peptide ¹	◎	◎	◎	◎	◎	◎	
# of AAs ²	102	100	548	380	2 types	4 types	
# of AAs(-SP) ³	83	74	524	364	2 types	4 types	
Predicted M.W. (-SP) ⁴	9.8 kDa	8.0 kDa	56 kDa	40 kDa	—	—	
Predicted pI (-SP) ⁵	12.16	acidic	10.68	11.96	—	—	
Predicted hydrophobicity	hydrophilic	hydrophilic	hydrophilic	hydrophobic	—	—	
Abundant AAs ⁶	Arg	Asp	Gly	Leu	Tyr rich	Cys rich	
	Cys	Pro	Thr	Arg			
	Lys	Lys	Lys	Val			
	Pro	Ser	Ser, Arg	Pro			
Gene expression	Larval stage ⁷	cyprid	cyprid	cyprid	Nauplius6(III)	cyprid	—
	Cyprid organ	cement gland			more carapace	—	
Recombinant protein expression	×	◎	◎	×	◎	◎	
Putative function	cohesion or adhesion ?				covalent bond formation ?	antibacterial ?	

- 1: Presence of signal peptide in ORF was determined by SignalP 3.0 server.
- 2: Total number of amino acid residues of ORF.
- 3: Total number of amino acid residues of mature protein (without signal peptide).
- 4: Predicted molecular weight of mature protein (without signal peptide).
- 5: Predicted pI value of mature protein (without signal peptide).
- 6: From top to bottom, the order is arranged in abundance.
- 7: Gene expression was investigated by quantitative PCR between nauplius 2 and adult stages.

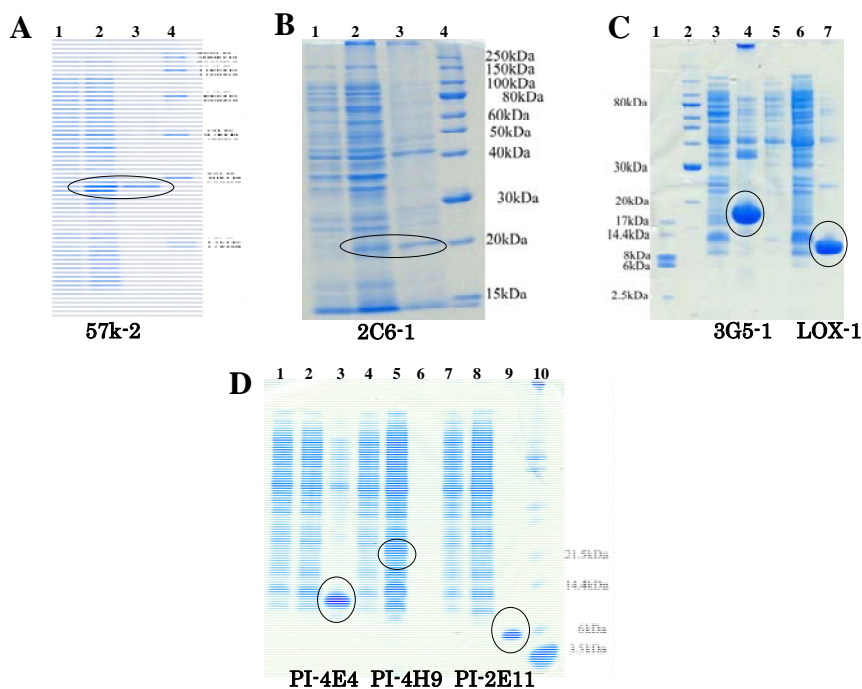


Fig. 4 Expression of recombinant *M. rosa* larval cement related proteins in *Escherichia coli* BL21(DE3) using pET41b vector (Novagen).

A, B., SDS-PAGE (12.5%). C, D: Nu PAGE (Invitrogen). A: Expression of Ccg-57K-2. 1: -IPTG, 2: +IPTG (soluble), 3: +IPTG(insoluble). B: Expression of 2C6-1. 1: -IPTG, 2: +IPTG (soluble), 3: +IPTG (insoluble). C: 3,4:Expression of 2C6-1. 3: +IPTG (soluble), 4: +IPTG (insoluble). 5,6,7: Expression of LOX-1. 5: -IPTG, 6: +IPTG (soluble), 7: +IPTG (insoluble). D: Expression of three types of protease inhibitors. 1~3: protease inhibitor (PI) code 4E4. 4~6: PI-4H9, 7~9: PI-2E11. 1,4,7: -IPTG,2,5,8: +IPTG (soluble). 3,6,9: +IPTG (insoluble). Circles indicate the expressed proteins.

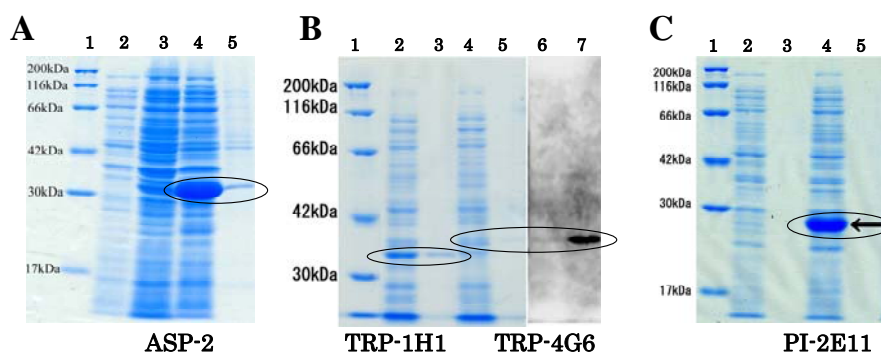


Fig. 5 Expression of recombinant *M. rosa* larval cement related proteins in *Escherichia coli* BL21(DE3) or Rosseta-gami (DE3)pLys using pET32a vector (Novagen).

A, B, C: SDS-PAGE (12.5%). A: Expression of Ccg-ASP-2. 4: +IPTG (soluble), 5: +IPTG (insoluble). B: Expression of two types of TRPs. 2, 4, 6: +IPTG (soluble). 3, 5, 7: +IPTG (insoluble). 6 and 7 show the detection of His6 tag using BD Universal His-tag Western detection kit. C: Expression of a type of PI (code 2E11). 4: +IPTG (soluble). 5: +IPTG (insoluble). Circles indicate the expressed proteins.

0514

Comprehensive expression trials for recombinant larval cement related proteins of the barnacle *Megabalanus rosa* using *Escherichia coli* expression system

Keiju Okano (Akita Prefectural University)

Yasuyuki Nogata (Central Research Institute of Electric Power Industries)

Mieko Oguro-Okano (Yamazaki College of Animal Health Technology)

Summary

Barnacle settles to man-made substrata such as ship hulls and pipelines of the power stations, causing serious troubles, so-called biofouling. The settlement of barnacles is initiated from the release of the proteinaceous adhesives (cement), from the cyprid, which is the final and settlement-competent larval stage. The long term goal of our study is to understand how many proteins are involved in the cement and how they work.

The major obstacles for the researches are the size of the larva (less than 1 mm) and the absolute shortage for the cement amount released from the larva.

Therefore, we have been sequencing and characterizing clones expressed specifically in the cement glands of the cypris larvae of the barnacle *Megabalanus rosa* to identify the larval cement proteins. With the supports from the Salt Science Research Foundation (0314 and the current support), we have successfully identified the genes encoding Ccg-57K, 36K, BSP, ASP, TRP with no homology to known genes, and LOX and several protease inhibitor homologues as the candidates involving in larval cementation process.

pET41b and pET32a (Novagen) vectors were used to express recombinant *M. rosa* larval cement related proteins in *E. coli*. So far, we have succeeded in expressing 57K (C terminal parts), 110K candidates (parts), LOX (C terminal part), ASP, TRP, and three protease inhibitors. Expression of 36K and BSP was still not successful. Large scale production of the cement related proteins is going to be used to produce the corresponding antibodies which should help to identify the mechanisms of cementation in the cyprids, and to perform functional assays.

Overall, the understanding of the cementation mechanism could help to develop anti-fouling technology for barnacles, and to develop new synthetic adhesives working in salt water environment.