

令和元年6月26日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15246

研究課題名(和文) バイオテクノロジーを利用した耐熱化シリカ重合・分解酵素の創製

研究課題名(英文) Directed evolution of thermostable silica polymerizing/degrading enzymes

研究代表者

藤野 泰寛 (Fujino, Yasuhiro)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：70582659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：silicatein及びsilicaseはケイ酸のシリカへの重合及びシリカからケイ酸への分解を触媒するユニークな酵素である。本研究では本酵素にランダム変異を導入し、高温でも触媒機能を維持した酵素を取得することを目的とした。大腸菌においてタンパク質を発現させ、簡易スクリーニングで、70℃に耐えるタンパク質を見出したが、より精密な測定では活性は見られなかった。Brevibacillusを宿主とする培地画分への分泌発現も試みたが、活性型の酵素は得られなかった。また、好熱菌を宿主とするため、発現ベクターを構築したところ、1Lあたり28mgのタンパク質が得られた。この系は産業利用の面から期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では目的とした耐熱性を持ったシリカ重合酵素を作製することは出来なかったが、その発現方法や活性について知見を蓄積することができた。今後、より可溶性が高く耐熱性が高いタンパク質をつなげて活性評価を行うことで目的が達成できると思われる。また、今回作製することのできた好熱菌を宿主とするタンパク質発現系は、従来に比べて発現量が多く、産業利用にも期待が持てる。耐熱性酵素は安定性が高いため、様々なニーズがあるが、本システムを用いることによりそれらが産業に利用できるだけでなく、今回行ったような耐熱化酵素研究の宿主とすることができ、より研究を加速するのに寄与できると思われる。

研究成果の概要(英文)：Silicatein and silicase are unique enzymes which catalyze the polymerization and degradation between silicic acids and silica, respectively. Random mutations were introduced into silicatein gene and then thermostable (>70°C) protein was investigated. We found one candidate mutant by first screening, but it turned to be negative by second screening. We tried the expression system with Brevibacillus to obtain soluble protein in medium fraction, however, no activity was observed with expressed proteins. On the other hand, expression vector in thermophilic bacterium, Thermus thermophilus, was developed. The reporter assay indicated high expression of target protein and the yield reached 28 mg protein per 1L culture. This expression system can be applied in industrial use.

研究分野：応用微生物学

キーワード：silica thermostable シリカ 耐熱化 異種発現系 expression

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ケイ素(Si)は、水溶液中ではケイ酸( $\text{Si}(\text{OH})_4$ )の形態で溶存しており、これが重合して形成されるシリカ( $\text{SiO}_2$ )は地殻の約 60%を占めるケイ素の酸化物である。これほど豊富な元素であるにも関わらず、長い間、ケイ素は生物とは関係のないものと考えられてきた。しかしながら、近年、一部の生物種において、シリカの物理的構造性の強さを骨格形成に利用している生物の存在が指摘されている。海綿はシリカを主成分とする骨片と呼ばれる構造体を有するが、その形成には silicatein [K. Shimizu *et al.*, *PNAS*, **95**, 6234, (1998)] と呼ばれるケイ酸重合酵素や silicase [H. Schroder *et al.*, *Prog Mol Subcell Biol*, **33**,249, (2003)] と呼ばれるシリカ分解酵素が関与している。また、珪藻はシリカを主成分とする細胞壁を持ち、ケイ酸重合ペプチド sillafin [N. Kroger *et al.*, *Science*, **286**, 1129 (1999)] やシリカ結合タンパク質 frustlin [N. Kroger *et al.*, *Eur J Biochem*, **239**, 259 (1996)]など、シリカと相互作用する生体分子が単離されている。

中でも最も研究が進んでいるのが、カイメン由来のケイ酸重合酵素である silicatein である。Silicatein は単量体のケイ酸( $\text{Si}(\text{OH})_4$ )を基質とし、その脱水縮合を触媒し、多量体のシリカ( $\text{SiO}_2$ )<sub>n</sub>を形成する。Silicatein は既に遺伝子が同定され、大腸菌における発現系が構築されている。精製された酵素は tetramethylethoxysilane(TMOS), tetraethoxyethylsilane(TEOS), sodium silicate 等のケイ酸前駆体を基質とすることができ、且つ、シリカだけでなくチタニアなどの金属酸化物の重合も促進できるなど、そのユニークな活性から注目を浴びている。しかしながら、silicatein は不溶性の高い酵素であり、大腸菌では正しい構造で発現しにくいことが明らかとなっている。したがって、その精製には可溶化を促進する fusion partner やタンパク質の refolding が必要である。また、カイメンは約 20 の海水中に生育しており、silicatein タンパク質自身の耐熱性もそれほど高くないことが想像できる。一方で、酵素を産業利用する際には、酵素自身の安定性が重要となる。一般に、反応温度が高いほど反応は早く進み、且つ、耐熱性酵素は熱に対してだけでなく、様々な化学的・物理的要因に対して安定であることが多い。従って、耐熱性 silicatein を創製することは、本酵素を産業利用する上で重要な因子である。

### 2. 研究の目的

ケイ素は地球上に豊富に存在するにもかかわらず、生化学の分野においては微量元素として扱われ、シリカの構造堅牢性を構造維持に利用している生物である珪藻、海綿以外では精力的な研究がなされてこなかった。一方、シリカは工業的な面からみれば優秀な反応触媒であり、特にナノ粒子としての形態制御には注目が集まっている。従って、ケイ素の生化学と工業的利用法をリンクさせる研究は非常に価値のあるものだと考えられる。半導体産業を中心とする現在のケイ素産業は、その原料をケイ砂と呼ばれる高純度のシリカを含む地下資源に依存している。ところが、ケイ砂は原油同様、その資源の枯渇が叫ばれている。さらには半導体、触媒工業においてはその粒径制御が重要な課題となる。生体分子は基質特異性が高く、不純物を含まないシリカを合成できる可能性が高く、さらには原子・分子レベルでの反応制御を行うため、現在のトップダウン型の微細加工ではなく、ボトムアップ型の粒子制御ができる期待も高い。しかしながら、酵素はその安定性の欠如から工業的利用には大きなハードルがある。耐熱酵素は熱安定性のみならず、pH、有機溶媒等にも高い安定性を示すことが知られており、これを工業的に利用できれば上記の問題を解決するブレイクスルーとなり得る。

以上のことから、本研究ではカイメン由来のケイ酸重合酵素である silicatein を中心に、進化的手法を用いて、耐熱性酵素を取得することを目標とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) silicatein の大腸菌を宿主とした異種発現

Silicatein 遺伝子はコドンが大腸菌に最適化し、合成遺伝子として取得した。この配列を発現ベクター pET21a に挿入し、大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し、発現株を取得した。当該株をアンピシリンを含む LB 培地で培養し、0.5 mM IPTG で発現を誘導させ、菌体破碎後、SDS-PAGE により発現を確認するとともに、抗 His-tag 抗体を用いた Western blotting により目的産物であることを確認した。

#### 2) error-prone PCR による変異ライブラリの作製

Silicatein の耐熱化を図るため、error-prone PCR(epPCR)によって silicatein 配列内にランダムな変異を導入した。epPCR には GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)を使用した。得られた PCR 産物を基に MEGAWHOP 法[K. Miyazaki, *Methods Mol Biol.*, **231**: 23-28, (2003)] を用いて変異ライブラリを作製した。

#### 3) 耐熱化酵素の 1 次スクリーニング

酵素活性の評価は Muller らの方法に従った。まず、96 well plate 上の LB 寒天培地(amp, IPTG 含有)に取得した大腸菌株を接種し、再度コロニーを形成させた。次いで plate を 70 °C で 30 分間処理し、これに 60  $\mu\text{M}$  ケイ酸溶液を重層し、室温で 24 時間静置した。その後、plate の各 well にモリブデンブルー発色試薬を添加し、活性の有無を確認した。基質として添加したケイ酸はモリブデン酸と反応し青色を呈するが、酵素機能が発揮されシリカに重合された場合は、ケイ酸濃度が減少するため発色しない。

#### 4) silicatein の *Brevibacillus* を宿主とした分泌発現

上記 3)の活性測定法が、煩雑かつ安定性に乏しかったため、*Brevibacillus* を宿主とした分泌発現を試みた。本システムでは、目的タンパク質は培地画分に直接生産され、その後の活性測定が簡便に行えると考えた。Silicatein 遺伝子を *Brevibacillus* のコドン頻度に合わせて核酸合成し、発現ベクターである pBIC1, pBIC2, pBIC3, pBIC4, pNC-HisE にクローニングした。培養後、培地画分を SDS-PAGE に供し、発現を確認するとともに、抗 His-tag 抗体を用いた Western blotting により目的産物であることを確認した。

#### 5) silicatein の *Thermus thermophilus* を宿主とした発現

耐熱性酵素の発現宿主として、また、耐熱性酵素のスクリーニング用宿主として高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の利用を試みた。筆者が以前に報告した silica 誘導性 promoter を利用し、シリカ濃度依存的な発現ベクターである pSix1 を構築した。この発現ベクターに silicatein 遺伝子をクローニングして発現の確認を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) 大腸菌を宿主とした変異酵素ライブラリとスクリーニング

大腸菌 BL21(DE3)を宿主として、silicatein-pET21a により形質転換した発現株を取得した。

SDS-PAGE 及び Western blotting で確認したところ、既報の通り、わずかながらも発現が確認された。そこで、Mullerらの方法に従い、大腸菌コロニーを直接 60  $\mu$ M ケイ酸溶液に曝露することで、組換え silicatein が活性を有しているかを確認した。図 1 に示す通り、発現プラスミドを持たない株(図中 Enz(-))では、シリカ曝露後にモリブデン反応性の単量体ケイ酸が残存しており、コロニーが青く染まった。一方、silicatein 発現株(図中 Enz(+))においてはコロニーは発色せず、単量体ケイ酸が存在しないことが確認された。これは silicatein の活性により、単量体ケイ酸がモリブデン不活性な重合体シリカへと変換されたためである。

このように、常温での silicatein の活性が確認できたため、本プラスミドを基に error-prone PCR による変異ライブラリを構築した。変異ライブラリを基に大腸菌 BL21(DE3) Rosetta2 pLysS を形質転換し、それぞれコロニーを単離し、96 well plate に接種した。このプレートに耐熱化酵素のスクリーニングを行った。これまでに約 3000 株のスクリーニングを行ったところ、70、30 分の処理後においても、コロニーが青く染まらなかった候補変異体を 1 株取得した(図 2)。この変異株の塩基配列を確認したところ、silicatein 遺伝子 109 番目の G が C に置換されていた。その結果、アミノ酸配列において wild type の 36 番目のアラニンがプロリンへと変化していた。次いで、この変異タンパク質 A36P

の大量発現を試みたが、十分量の酵素が発現しなかったため、発現ベクターを pCold TF に変更し、Trigger Factor との融合発現で、低温誘導による発現系を構築した。この系では目的タンパク質が可溶性画分に十分量発現した。精製した酵素を既報に従い、活性評価を行ったが、室温では活性が見られたものの、70 では活性を見いだせなかった。

上記のように silicatein は単独では不溶性に発現し、可溶性パートナーとの融合発現で可溶性に発現させることが可能であった。しかしながら、pCold TF の可溶性タグは大腸菌シャペロンの Trigger Factor を基にしており、本研究のような耐熱性酵素のスクリーニング条件には不向きであると考えられる。そこで、好熱菌由来の可溶性の高いタンパク質をターゲットとし、これらのタンパク質 silicatein の融合発現系を大腸菌において作成した。Kondo らが報告した *Thermus thermophilus* 由来の数種の可溶性タンパク質[Kondo et al., *Anal Biochem*, **385**: 278-285 (2009)]との融合発現を試みたがいずれも可溶性のタンパク質は得られなかった。

#### 2) *Brevibacillus* を宿主とした分泌発現

上記のように silicatein タンパク質は大腸菌で発現させると不溶性画分に発現する。さらに、活性測定が一度コロニーを作らせてからのアッセイとなり、煩雑でハイスループット化が困難であった。そこで、培地画分に目的タンパク質を分泌する *Brevibacillus* を用いた発現系を構築した。プロモーター強度及び分泌シグナルの異なるプラスミド pBIC1~4 及び pNC-HisE を発現ベクターとして、silicatein 遺伝子をクローニングした。これらの発現株の内、pBIC4 及び pNC-HisE をベースにしたものにおいては、培地画分に目的タンパク質と思われるバンドを確認できた。しかしながら、確認されたバンドは目的のものより約 3 kDa 大きく、通常は培地画分への分泌過程で除かれるはずの signal peptide が残ったままになっていることが示唆された。

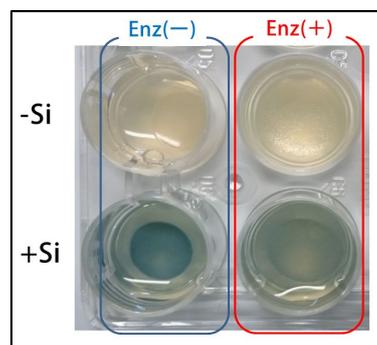


図 1 silicatein の活性評価  
(25 )



図 2 耐熱化 silicatein のスクリーニング

signal peptide と silicatein の間には enterokinase 認識サイトが挿入されている為、発現産物を enterokinase で処理したところ、silicatein に相当する 24 kDa 付近にバンドが確認されたため、本発現条件下では signal peptide が残ったままで発現されていることが分かった。この培養液の培地画分を用いて、silicatein の活性評価を TMOS を基質として行ったところ、silicatein の活性は見られなかった。野生型の silicatein では signal peptide を含む propeptide が切断を受け、活性型の silicatein となることが知られているが、その際 propeptide の切断部分は silicatein の活性ポケットを覆い、活性を低下させている。アミノ酸配列は異なるが、本発現系でも同様なことが起こり、酵素機能が発揮できなかったものと推察される。

この問題を解決するために、より大きな融合タグをつけて回避することを試みた。本研究が耐熱性酵素の取得を目的としている為、上記 1)と同様に *Thermus thermophilus* 由来の数種の可溶性タンパク質との融合発現を試みた。しかしながら、恐らくコドン頻度の問題と思われるが、融合タンパク質の発現はほとんど見られなかった。今後、*Thermus* 由来の遺伝子部分を *Brevibacillus* に至適化するなどの対策が必要である。

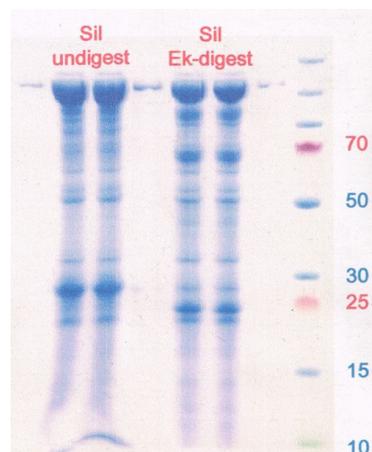


図 3 *Brevibacillus* における silicatein の発現 (培地画分)

### 3) *Thermus* 属細菌での発現に向けたベクター系の開発

筆者はこれまでに *Thermus* 属細菌がシリカ存在下で発現するタンパク質に関して研究を行ってきた。本タンパク質(silica-induced protein; Sip)のプロモーターは強力であり、異種タンパク質発現に利用できるものと思われた。そこで、耐熱化酵素の新たな宿主-ベクター系の開発をめざし、発現ベクターの構築に取り組んだ。sip promoter を含む plasmid である pSix1 に耐熱性  $\beta$ -galactosidase を挿入し reporter assay を行ったところ、シリカ添加時には活性が 11 倍に増大していた。この耐熱性  $\beta$ -galactosidase は、大腸菌で発現させた場合ほとんど封入体として発現していたが、*Thermus* 属細菌内では可溶性画分に発現していた(図 4)。また、本発現系では培養液 1 L あたりから 27 mg 精製標品を得ることができた。このことから、sip promoter を利用した *Thermus* 属細菌発現系は、耐熱性酵素の研究や産業用酵素の生産に有用であると期待している。

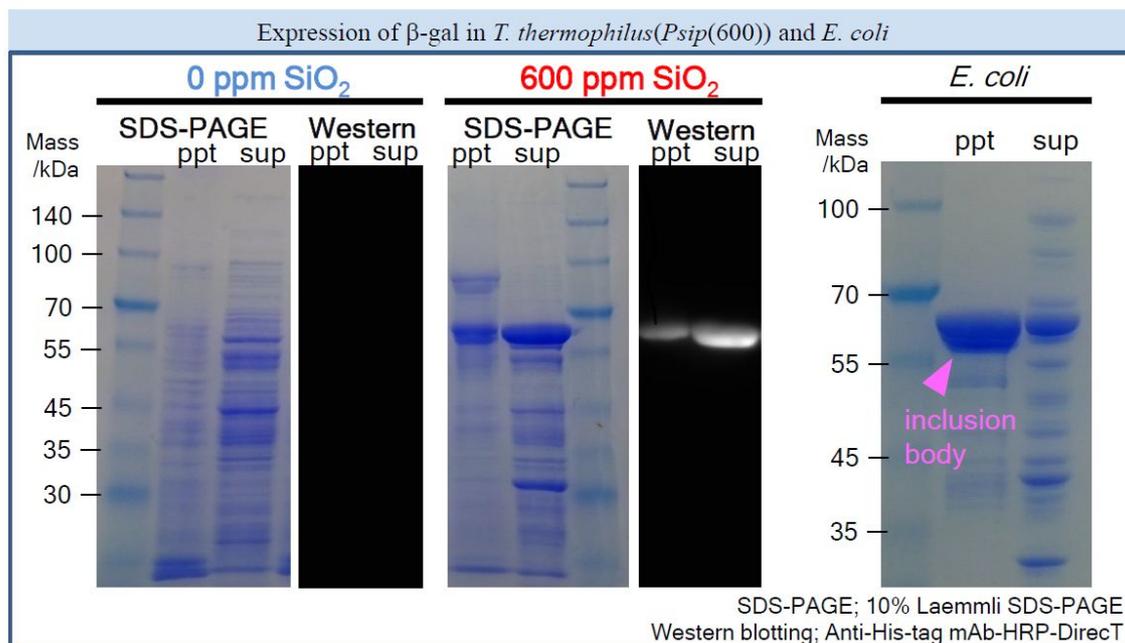


図 4 *Thermus* 属細菌を宿主とする異種タンパク質発現系の構築

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 9 件)

木室綾華、山迫彩華、藤野泰寛、廣政恭明、土居克実、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* に感染する溶菌ファージ Q1 の特性及びゲノム解析、日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019.03

末松佑梨、藤野泰寛、土居克実、高度高熱菌 *Thermus thermophilus* を用いた異種タンパク質

発現システム、日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019.03

藤野泰寛, シリカ誘導性タンパク質の転写・発現機構とその応用開発, 2018 年度農芸化学会西日本支部例会, 2019.01 (支部奨励賞受賞講演)

藤野泰寛、渡邊修平、土居克実、*Thermus thermophilus* を宿主とするシリカ誘導性異種タンパク質発現システムの構築, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018.03

Mina Kim, Mayu Hirose, Martono Hindra, Yuko Nagayoshi, Toshihisa Oshima, Yasuhiro Fujino, Katsumi Doi, Characterization and analysis of domain-function relationship in thermostable endolysin from template bacteriophage  $\phi$ OH2, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018.03.

山迫彩華, サンソントトマスシリシオン, 藤野泰寛, 土居克実, 発酵現場より単離した乳酸球菌ファージ Q1 の特性およびゲノム解析, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018.03.

永吉佑子, 相川浩輝, 中村彩乃, 渡邊修平, 藤野泰寛, 土居克実, 地熱環境より分離した *Thermus* 属繊維状ファージのゲノム比較, 日本ゲノム微生物学会第 12 回年会, 2018.03.

千羽啓太, 黒木未知瑠, 白澤拓海, 原田額郎, 藤野泰寛, 片倉喜範, 土居克実, ファージ由来溶菌タンパク質 Holin の膜穿孔機構を応用したガン細胞へのアポトーシス誘導, 第 24 回日本生物工学会九州支部 沖縄大会, 2017.12.

Sirinthorn Sunthornthummas, Onanong Pringsulaka, Yasuhiro Fujino, Katsumi Doi, Characterization of *Lactobacillus paracasei* phage  $\Phi$ T25 from fermented milk in Thailand, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会, 2017.09.

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：末松 佑梨

ローマ字氏名：SUEMATSU Yuri

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。