

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05164

研究課題名(和文) バイオシリカ由来タンパク質を介した無機材料とバイオ分子を結ぶための基盤技術開発

研究課題名(英文) Development of basic technology for connecting inorganic materials and biomolecules via the biosilica-derived protein

研究代表者

清水 克彦 (SHIMIZU, Katsuhiko)

鳥取大学・地域価値創造研究教育機構・教授

研究者番号：90326877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：海綿動物六放海綿類カイロウドウケツのシリカ骨格タンパク質グラシンは、pH 8-9において選択的にシリカに結合し、グラシンのヒスチジンとアスパラギン酸を豊富に含む領域がシリカとの結合を担うこと、その解離定数は40 nMであることを明らかにした。グラシンは、シリカの他、pH 7-9において酸化チタンに、pH 7において酸化アルミニウムに選択的に結合したが、酸化チタン、酸化亜鉛に対しては特異的な結合性を示さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、グラシンおよびその部分ペプチドは、温和な条件のもと、組換えタンパク質とシリカ、酸化ゲルマニウム、酸化アルミニウムといった無機材料との複合化に有用であることが示された。この技術は、酵素やセンサータンパク質などの工業的に有用なタンパク質のシリカや金属酸化物への固定化、有機分子と無機材料の性質を融合した新規ナノハイブリッド材料やバイオエレクトロニクス材料等の開発に道を拓くと期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study reveals that glassin, a protein occluded in the silica skeleton of the sponge Euplectella, binds to silica with high specificity at pH 8-9. Detailed analysis demonstrated that the histidine- and aspartic acid-rich region of glassin is responsible for the binding to silica, and that its dissociation constant is 40 nM. In addition to silica, glassin selectively bound to titanium oxide at pH 7-9 and to aluminum oxide at pH 7, but did not show specific binding to titanium oxide and zinc oxide.

研究分野：海洋生物学

キーワード：バイオミネラルゼーション 海綿動物 シリカ 酵素固定化

1. 研究開始当初の背景

グラシン (glassin) は、研究代表者らが、深海性の海綿動物カイロウドウケツのシリカ骨格中に見出した水溶性タンパク質で、中性 pH、室温でシリカナノ粒子の形成を促進する(引用文献)。その一次構造は、既知のタンパク質とのアミノ酸配列の類似性が全くなく、ヒスチジンとアスパラギン酸が規則的に配列する領域 (HD 領域)、プロリンが多い領域 (P 領域)、ヒスチジンとスレオニンが規則的に配列する領域 (HT 領域) が連なり、この3つの領域が繰り返されるタンデムリピートを特徴とする(図1)。グラシンの新たな機能としてシリカナノ粒子への特異的結合を見出した。例えば、緑色蛍光タンパク質 (GFP) またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) とグラシンの融合タンパク質を発現する大腸菌の抽出液をシリカナノ粒子と混合すると、GFP や GST の活性を保持したまま融合タンパク質が選択的に粒子に保持される。この機能は、組換えタンパク質に付加するタグとして、工業用酵素やセンサータンパク質などの有用なタンパク質とシリカ材料との複合化、組換えタンパク質の精製・再利用のツールとして利用することが可能である。しかしながら、グラシンがどのような仕組みでシリカ表面に結合するかは不明である。また、グラシンのシリカナノ粒子への結合の最適化や粒子からグラシンを溶出するための条件を検討する必要がある。さらに、グラシンが結合するシリカ以外の無機材料、例えば産業上有用な酸化ゲルマニウム、酸化チタンや酸化亜鉛などの金属酸化物を見出すことができれば、グラシンの用途はさらに拡大する。

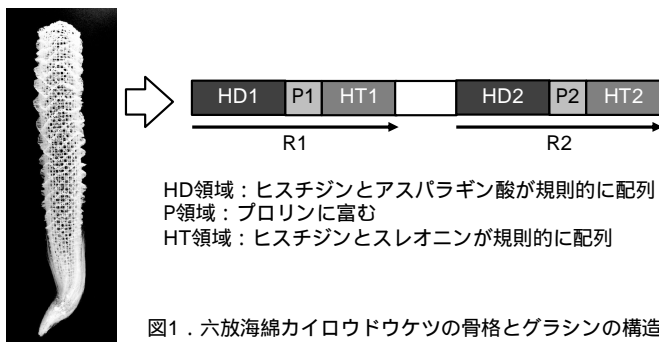


図1. 六放海綿カイロウドウケツの骨格とグラシンの構造

これまでにシリカバイオミネラルから抽出されたタンパク質として、海綿動物 *Tethya aurantia* 由来のシリカ形成酵素シリカチン(引用文献)や、珪藻由来のシリカ形成促進ペプチドシラフィン(引用文献)が知られているが、シリカやその他の無機材料への結合に関する研究は行われていない。本研究は、グラシンの結合能を生かした、シリカやその他の無機材料と有用タンパク質とを複合化したバイオ素子やナノ材料の構築という、新規性を備えた有機無機複合材料の創製に道を拓く。

2. 研究の目的

グラシンのシリカへの結合メカニズムを解明し、結合条件の最適化と溶出条件の探索を行う。また、シリカ以外の金属酸化物、具体的には、産業上有用な酸化ゲルマニウム、酸化チタンや酸化亜鉛に対するグラシンの結合能力を評価し、特異性に結合する材料について、結合条件の最適化と溶出条件の探索を行う。これらの結果を総合して、グラシンを介した組換えタンパク質とシリカナノ粒子および金属酸化物材料との複合化についての基盤技術を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌タンパク質発現系を用いた組換えグラシンおよびグラシンの各領域からなる部分ペプチドの調製

グラシンおよび部分ペプチド (HD2, P2, HT2, HD2 + P2 + HT2 = R2) をコードする遺伝子を緑色蛍光タンパク質 (GFP)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子と接続した融合タンパク質発現ベクターを構築した(図2, 引用文献)。これらベクターを用いて形質転換した組換え大腸菌を作製し、培養して組換えタンパク質を発現させた。組換えタンパク質が生産されたことは、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認した。GFP 融合タンパク質は、Ni-ニトリルトリ酢酸 (NTA) カラム、GST 融合タンパク質はグルタチオンアフィニティカラムを用いて精製した。精製したタンパク質は Bradford 法により定量した。GST 活性は、還元型グルタチオンと1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼンを基質として生成物の吸光度を測定し、得

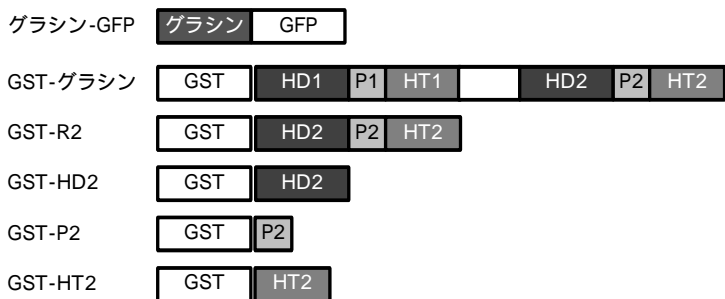


図2. 作製したコンストラクトの模式図

た。GFP の蛍光は青色 LED 照射により観察，または Qubit 4 フルオロメーターで測定した。

(2) 組換えグラシン融合タンパク質の微粒子シリカへの固定化条件の検討

精製した組換え融合タンパク質がシリカに固定され、活性を保持しているか否かを確認した。pH 5-9 の条件下，組換え GFP 融合タンパク質を非晶質微粒子シリカと混合し，遠心分離により微粒子シリカを沈殿させた。沈殿の蛍光を確認するとともに，上清の蛍光を測定し，微粒子シリカへの吸着を定量的に解析した。同様に GST 融合タンパク質を微粒子シリカと混合し，遠心分離によりシリカを沈殿させ，GST 活性を測定した。

(3) 組換えグラシンの微粒子シリカとの解離定数(K_D)測定

組換えタンパク質の希釈系列を調製し，微粒子シリカと混合後，室温で 10 分間，30 rpm で攪拌した。遠心分離し，回収した各上清のタンパク質濃度を測定した。GFP 融合タンパク質では，上清の蛍光強度を測定し，各希釈系列における微粒子シリカに吸着したタンパク質量と遊離タンパク質濃度を算出した。GST 融合タンパク質については GST 活性を経時的に測定し，各希釈系列におけるシリカ吸着タンパク質濃度と遊離タンパク質濃度を算出した。その後，横軸をシリカ吸着タンパク質濃度，縦軸をシリカ吸着タンパク質濃度/遊離タンパク質濃度としてスキャッチャードプロットを作成し，直線の傾き (K) の逆数 ($-1/K$) を求めることで K_D を算出した。

(4) グラシンの金属酸化物への吸着検討

(2)のシリカ吸着試験の手順に従い，組換え GFP 融合タンパク質を酸化ゲルマニウム，酸化アルミニウム，酸化チタン，酸化亜鉛と混合し，遠心分離により金属酸化物を沈殿させた。沈殿の蛍光を確認することにより，グラシンの金属酸化物への吸着性を検討した。

4. 研究成果

(1) グラシンのシリカに対する吸着能評価

グラシンのシリカに対する吸着を評価するため，GFP 融合グラシンを用いて pH 5-9 の緩衝液中で微粒子シリカと混合した後，遠心によりシリカを沈殿させ，GFP の蛍光の挙動を観察した。その結果，pH 7-9 において，蛍光は上清にはなく，沈殿に確認されたため，グラシンはシリカに吸着され，このとき GFP は活性（蛍光）を保持していたことが示された（図 3）。pH 6 では蛍光は上清に観察され，グラシンはシリカに吸着されないことが示された。

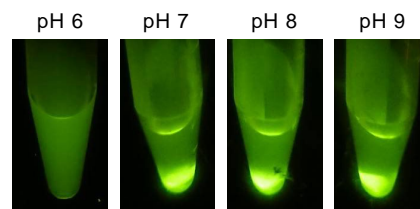


図3. グラシン-GFPのシリカへの吸着

(2) シリカ吸着に関わるグラシンの領域の特定

GST と融合させたグラシン及び各領域のシリカ吸着能を評価した。pH 7 において，すべての GST 融合タンパク質はシリカに吸着された。コントロールとして用いた GST においても 40% がシリカに吸着されたことから，pH 7 ではタンパク質のシリカへの非特異的な吸着が生じる。

pH 8 及び 9 で同様の評価を行ったところ，GST のシリカ吸着は解消され，GST-グラシン及び GST-HD2 は高いシリカ吸着能を保持した。一方，GST-P2 及び GST-HT2 は pH の上昇と共にシリカ吸着力が弱くなった。GST-P2HT2 では pH 8 において高いシリカ吸着能を示したが，pH 9 においては吸着能が 1/2 に低下した。GST 活性測定の結果，GST，GST-P2，GST-HT2 のシリカ吸着能は，pH 8 ではそれぞれ 25%，45%，60% であった。またこれらのタンパク質は，pH 9 ではシリカ吸着能は 20% 以下にとどまった。以上の結果から，グラシンのシリカ吸着能を担う主領域は HD 領域であることが示唆された。

(3) グラシンのシリカ吸着性能の解析

グラシン及び各領域のシリカに対する吸着能を比較するため，各融合タンパク質のシリカ吸着における K_D を算出した。なお，(2)の結果より，グラシンのシリカ吸着能は pH に大きく影響を受けることが明らかとなったため，ここでは pH 7 及び 9 におけるシリカ吸着の K_D を求めた。また，グラシン-GFP を使用した実験では，GFP の非特異的なシリカ吸着を解消するため，シリカ吸着操作の際に 1 M NaCl と 1% Tween20 を添加した。

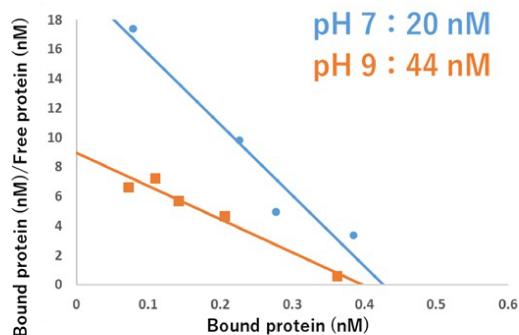


図4. GST-グラシンのシリカへの吸着に関するスキャッチャードプロット

グラシン-GFPのシリカに対するスキッチャードプロットを作成して K_0 を算出した結果、pH 7および9においてそれぞれ4および8 nMであり、グラシンはpH 7において高い吸着能を有することが明らかとなった。

続いてGST融合タンパク質のシリカに対する K_0 を算出するため、シリカを添加した後の各上清のGST活性を指標にスキッチャードプロットを作成し、 K_0 を求めた(図4)。その結果、pH 9におけるGST-グラシン及びGST-HD2の K_0 は、共に40 nMとなり、全長のグラシンとHD2領域のシリカ吸着能が同等であった。一方で、GST-グラシン、GST-HD2及びGST-HT2のpH 7における K_0 は、それぞれ、20 nM、14 nM、25 nMであり、pH 7においては、HT領域もグラシン全長やHD領域と同等のシリカ吸着能を有することが明らかとなった。

(4)グラシンの金属酸化物への吸着検討

グラシン-GFPを金属酸化物と混合し、遠心分離により金属酸化物を沈殿させ、沈殿の蛍光を確認することにより、グラシンの金属酸化物への吸着性を検討した。酸化チタンはpH 7-9において、選択的にグラシンを吸着した(図5)。このとき、コントロールとして用いたGFPは吸着操作中に消光してしまうという興味深い現象が見出された。吸着したグラシン-GFPの蛍光は影響が見られていない。GFPは酸化ゲルマニウムと接触することにより消光するが、グラシンがGFPと酸化ゲルマニウムの間に介在することによりこの作用が緩和されると考えられた。酸化アルミニウムに対しては、pH 7において特異的な吸着が見られたが、pH 9では選択性が消失した。酸化チタン、酸化亜鉛に対しては、吸着性を示さなかった。

シリカおよび酸化ゲルマニウムに吸着されたグラシンは、GSTやGFPの活性に影響を及ぼさない塩や界面活性剤では溶出することができず、今後の課題となった。

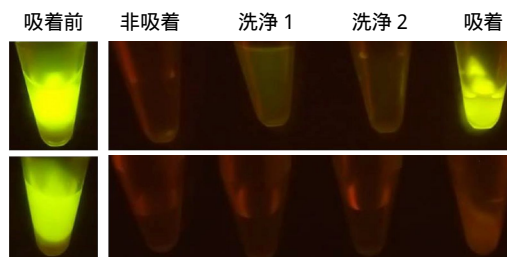


図5. 酸化ゲルマニウムへの吸着
上: グラシン-GFP, 下: GFP

<引用文献>

- Shimizu K, Amano T, Bari MR, Weaver JC, Arima J, Mori N. Glassin, a histidine-rich protein from the siliceous skeletal system of the marine sponge *Euplectella*, directs silica polycondensation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Sep 15;112(37):11449-54. doi: 10.1073/pnas.1506968112.
- Shimizu K, Cha J, Stucky GD, Morse DE. Silicatein alpha: cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(11):6234-6238. doi:10.1073/pnas.95.11.6234.
- Kröger N, Deutzmann R, Sumper M. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science*. 1999 Nov 5;286(5442):1129-32. doi: 10.1126/science.286.5442.1129.
- Nishi M, Kobayashi H, Amano T, Sakate Y, Bito T, Arima J, Shimizu K. Identification of the Domains Involved in Promotion of Silica Formation in Glassin, a Protein Occluded in Hexactinellid Sponge Biosilica, for Development of a Tag for Purification and Immobilization of Recombinant Proteins. *Mar Biotechnol (NY)*. 2020 Dec;22(6):739-747. doi: 10.1007/s10126-020-09967-2.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Michika Nishi, Hiroki Kobayashi, Taro Amano, Yuto Sakate, Tomohiro Bito, Jiro Arima & Katsuhiko Shimizu	4. 巻 22
2. 論文標題 Identification of the Domains Involved in Promotion of Silica Formation in Glassin, a Protein Occluded in Hexactinellid Sponge Biosilica, for Development of a Tag for Purification and Immobilization of Recombinant Proteins.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 739-747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10126-020-09967-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂手勇斗, 美藤友博, 清水克彦, 有馬二郎
2. 発表標題 シリカ粒子形成タンパク質の配列に由来するシンプルな可用性タンパク質固定化タ グの構築
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部会第58回講演会（例会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂手勇斗, 西美智佳, 美藤友博, 有馬二郎, 清水克彦
2. 発表標題 シリカ粒子形成促進タンパク質 “ グラシン ” のシリカ / シリコーンに対する吸着特性
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部会第56回講演会（例会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	美藤 友博 (BITO Tomohiro) (20776421)	鳥取大学・農学部・助教 (15101)	
研究分担者	有馬 二郎 (ARIMA Jiro) (80393411)	鳥取大学・農学部・教授 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スペイン	Center for Advanced Studies of Blanes		