

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05814

研究課題名(和文) アスベストを高度に認識するタンパク質の創製

研究課題名(英文) Molecular engineering of highly selective asbestos-binding proteins

研究代表者

石田 丈典 (Ishida, Takenori)

広島大学・統合生命科学研究科(先)・講師

研究者番号：30573373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アスベストは、肺ガンなどを引き起こす。解体現場でアスベストを簡便に検出する技術が求められている。自然界には氷の表面に結合するアンチフリーズタンパク質が知られている。このアンチフリーズタンパク質を変異させて、アスベストの表面に結合するタンパク質に改変することに成功した。この新たなアスベスト結合タンパク質は、アスベストに強固に結合するだけでなく、ほぼアスベストのみ結合するため、精度の高いアスベスト検出技術に応用可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンチフリーズタンパク質を利用して、高度にアスベストを認識するタンパク質を作製することに成功した。この新しいアスベスト結合タンパク質を蛍光で標識することで、アスベストを蛍光で光らせることで迅速にアスベストを検出することができる。この検出技術は、迅速にアスベストを検出する必要がある解体現場や被災地などで活躍できると考えられる。また、アスベスト以外の無機物に応用できるため、有害な無機物質の検査に利用可能である。

研究成果の概要(英文)：Asbestos causes lung cancer and other diseases. Technology is needed to easily detect asbestos at demolition sites. Antifreeze proteins specifically bind to the surface of ice. We succeeded in mutating this antifreeze protein and modifying it into a protein that binds to the surface of asbestos. The new asbestos-binding proteins not only binds strongly to asbestos, but also binds exclusively to asbestos, making it applicable to highly accurate asbestos detection technology.

研究分野：生物工学

キーワード：アンチフリーズタンパク質 アスベスト アスベスト結合タンパク質 フェージディスプレイ法 無機結晶結合タンパク質

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アスベストは、肺ガンや悪性中皮腫などを引き起こす。申請者はアスベストに結合するタンパク質を発見し、アスベストの検査方法に応用した。しかし、角閃石系アスベストには、構造が非常に似ているアモサイトとクロシドライトが存在し、これまでのアスベスト結合タンパク質では両者を区別することはできなかった。また、アスベスト以外にもロックウールなどの非アスベスト繊維が知られている。これまでのアスベスト結合タンパク質は、アスベストと非アスベスト繊維とを区別は可能であったが、繊維の一部に結合することもあり、精度の向上が必要であった。アスベスト結合タンパク質を用いた検査方法を世界標準化するためには、毒性の異なるクロシドライトとアモサイトを区別することや、非アスベスト繊維を精度良く区別できることが望ましく、タンパク質の特異性をさらに向上させる必要があった。

### 2. 研究の目的

アンチフリーズタンパク質 (antifreeze protein, AFP) は、氷に結合するユニットが繰り返した構造を持つ天然の無機結晶結合タンパク質である (図 1A)。AFP は、①平面性の高い強固なユニット構造と②繰り返されたユニット構造による多点結合によって、氷の結晶表面に結合することができる。AFP の認識部位のスレオニン残基をランダムなアミノ酸に置換した変異ライブラリーの中から、標的の結晶表面を認識するユニットを見つけ、さらにそのユニットを繰り返した構造を作ることによって、特異性の高いタンパク質を取得できると考えた (図 1C)。本研究では、AFP の繰り返しユニットの変異ライブラリーを構築し、進化工学を利用することで角閃石系アスベストに結合するユニットを取得する。このユニットを繰り返す (多点で認識すること) で、高い特異性を持ったタンパク質を創製することを目指した。

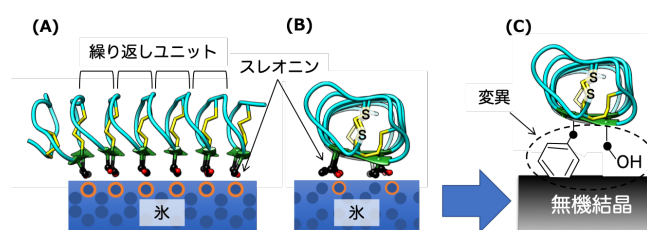


図 1、アンチフリーズタンパク質(AFP)の構造。A は氷の基底面から、B は側面から見た AFP の構造。C は本研究のコンセプト。スレオニン残基を変異させることで、氷以外の無機結晶に応用する。

### 3. 研究の方法

(1) **ランダム化した変異ユニットライブラリーの作製** アンチフリーズタンパク質として *Tenebrio molitor* の antifreeze protein (TmAFP) を用いた。TmAFP の N 末端から数えて第 37～61 番目のアミノ酸領域を取り出し、第 39、41、51、53 番目のスレオニン (T) をランダムなアミノ酸に置換した変異型の TmAFP 遺伝子を設計した。具体的には、スレオニン (T) をコードする遺伝子を、縮重コドンである NNK コドンセット (N=A, T, G, C; K=G, T) で置換した遺伝子を調製した。この遺伝子をファージミドベクター pCANTAB5E2 の制限酵素サイト SfiI と NotI の間の領域に、In-Fusion クローニング法によって導入し、大腸菌 TG1 株に形質転換を行なった。この大腸菌に、ヘルパーファージを感染させてファージ粒子を形成させ、ランダム化した変異ユニットライブラリーを作製した。

(2) **ランダム化した変異ユニットライブラリーからのアスベスト結合ユニットのスクリーニング** 上記(1)で調製したファージライブラリーを用いて、角閃石系アスベストに結合する変異ユニット (アスベスト結合ユニット) のスクリーニングを行なった。5.0×10<sup>9</sup> 粒子のファージライブラリーとアモサイトを緩衝液 A [Tris-HCl (pH9.0)、0.3 M 塩化ナトリウム、0.5% Tween80] 中で、30 min 攪拌し結合させた。その後、遠心分離 (11600g、4℃、3 min) によって沈殿させ、未結合のファージを取り除き洗浄した。この洗浄操作は合計で 5 回行なった。洗浄後、アモサイトに結合したファージを大腸菌 TG1 に感染させ、さらにヘルパーファージを加えてファージを増幅した。増幅したファージは、2.5 M 塩化ナトリウム含有 20% ポリエチレングリコール溶液を用いた PEG 沈殿法によって精製した。以上の一連の操作 (バイオパニング) を合計 6 回行うことで、アモサイトに強く結合するファージを取得した。6 回目のパニング操作の後に得られたアモサイトに結合するファージが持つ変異型 TmAFP の塩基配列のシーケンス解析し塩基配列を決定した。

(3) **プラスミドの作製** 野生型 TmAFP またはアスベスト結合ユニット (NKRK) を 2, 3 つタンデムに提示した TmAFP と GFP を融合した遺伝子 [順に GFP-TmAFP-wild、GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>2</sub>、GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>3</sub> と呼ぶ] を人工遺伝子として合成した (Famsac 社)。上記の遺伝子を、pET47b の BamHI と NotI の間の領域に制限酵素処理とライゲーションにより導入し、pET47b-GFP-TmAFP-wild、pET47b-GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>2</sub>、pET47b-GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>3</sub> を作製した。アスベスト結合ユニット (NKRK) を 1 つ提示したものは、pET47b-GFP-TmAFP-wild を鋳型にして、Primer-P1 (GGGACCCGGGTACCAGGATCCGATGGTGAGCAAAGG) と Primer-P2 (CAGAGCGAGCTCTGCGGCCGCTTACTTATACAGTTCATCCATACC) を用い

てインバース PCR を行うことによって、pET47b-GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>1</sub> を作製した。

(4) タンパク質の発現と精製 上記で作製したプラスミドを、大腸菌 SHuffle T7 Express に形質転換した。LB 培地で前培養を行なった後、Magic Media E. coli Expression Medium に 2.5 % (v/v) 植菌し、28°C で 44 時間振とう培養した。培養液を遠心分離して得られた菌体ペレットに、Bacterial Protein Extraction Reagent (B-PER) を加えて懸濁し、さらに超音波により破砕を行なった。この細胞破砕液を His SpinTrap TALON に供して精製を行なった。精製したタンパク質は SDS-PAGE にて解析を行なった。

(5) アスベスト結合タンパク質の結合評価 アスベストへの結合量を評価するために、結合緩衝液 [0.4 M リン酸緩衝液 (pH 8.0)、0.3 M 塩化ナトリウム、0.5 % Tween 80] を用いて、作製したタンパク質 (50 nM) とアモサイト (0.2 mg/ml) を 1.5 ml マイクロチューブで 10 分間混合した。その後、遠心分離 (12,000 ×g, 3 分) して沈殿させ、結合緩衝液で洗浄を 3 回行なった。洗浄後、アモサイトに結合したタンパク質量を蛍光プレートリーダーで測定した。特異性の評価は、一般社団法人日本繊維状物質研究協会 (JFM) の標準繊維を用いた。具体的にはロックウール (RW1)、ガラスウール (GW1)、微細ガラス繊維 (MG1)、3 種類のケイ酸アルミ繊維 (RF1、RF2、RF3)、チタン酸カリウムウィスカー (PT1)、酸化チタンウィスカー (TO1)、炭化ケイ素ウィスカー (SC1)、ワラストナイト (WO1) の計 10 種類の繊維を用いた。結合緩衝液を用いて、作製したタンパク質 (75 nM) とアモサイトまたは JFM 標準繊維 (0.5 mg/ml) を混合した後、一部をスライドガラスに滴下し、カバーガラスを被せて蛍光顕微鏡 (Primo Star、カールツァイス社) にて観察を行なった。

#### 4. 研究成果

(1) ランダム化した変異ユニットライブラリーからのアスベスト結合ユニットのスクリーニング アンチフリーズタンパク質として *Tenebrio molitor* の antifreeze protein (TmAFP) を用いた。TmAFP には、氷との結合に関わるスレオニン残基が 12 個存在する。12 箇所のスレオニン残基を 20 種類の任意のアミノ酸に変異させると、ライブラリーサイズ (20<sup>12</sup> ≈ 10<sup>15</sup>) が大きすぎるため、まず、4 個のスレオニン残基を 1 つユニットとして用いた変異ライブラリーの構築を行なった (図 2A)。具体的には、TmAFP の第 37-61 番目のアミノ酸領域 (N 末端から第 39、41、51、53 番目のスレオニン残基をランダムなアミノ酸に置換した変異ユニット) を提示したファージライブラリーを作製した。作製した変異ユニットライブラリーを用いて、角閃石系アスベストであるアモサイトに対してスクリーニングを行なった。アモサイトと変異ユニットライブラリーを結合、洗浄、ファージの増幅の一連の操作 (バイオパニング) を 6 回繰り返して、アモサイトに強く結合するファージを取得した。取得したファージの提示する変異ユニットの遺伝子配列をシーケンス解析により同定した (図 2B)。そのうち 14 個体が AKVC (左から順に第 39、41、51、53 番目のアミノ酸が変異) という配列で、2 個体が NKRK という配列、残りは KVKK、KKEK、KHKR という配列が 1 個体ずつ得られた。最も多く得られた AKVC という配列は、第 38 番目のアミノ酸 N が K に変異していた (第 38 番目のアミノ酸はランダム化しておらず、バイオパニングの過程で変異が入ったものと考えられる)。しかしながら、この配列はタンパク質の発現が難しい問題があった。一方、2 個体得られた NKRK という配列はタンパク質の発現が容易であったため、この配列をアスベスト結合ユニット (NKRK) として用いて結合評価を行うこととした。

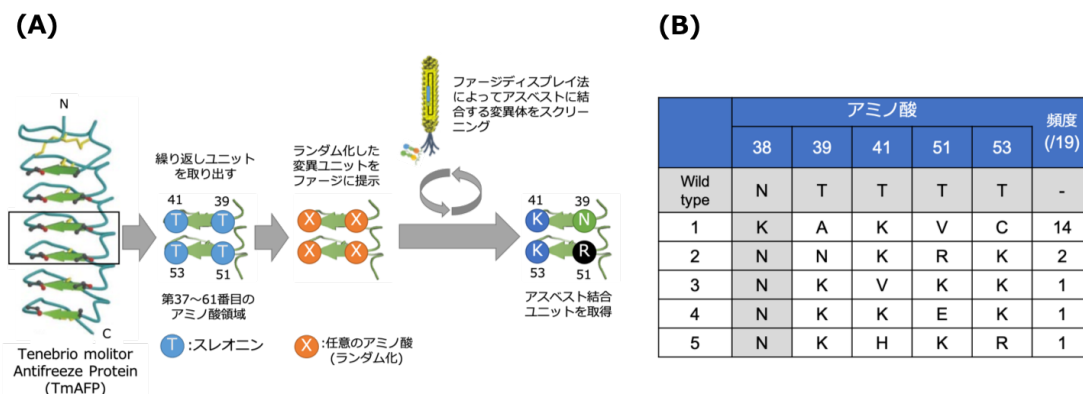


図 2、変異ユニットライブラリーからのアスベスト結合ユニットのスクリーニング。本研究の基本戦略 (A)、スクリーニングにより得られた結合ユニットの配列 (B)。

(2) アスベスト結合ユニットの作製とアスベストへの結合評価 アスベスト結合ユニット (NKRK) を再構成した TmAFP のアスベストへの結合を評価するため、GFP で標識した融合タンパク質を作製した (図 3A)。具体的には、図 3A のように野生型 TmAFP またはアスベスト結合ユニット (NKRK) を 1、2、3 つ提示した TmAFP を GFP で標識した融合タンパク質を作製した [順に、GFP-TmAFP-wild、GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>1</sub>、GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>2</sub>、GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>3</sub> と名付けた]。これら

のタンパク質は、大腸菌 SHuffle 株で発現させ、HisTag を利用したアフィニティカラムで精製した (SDS-PAGE 解析で 90%以上の純度)。作製した GFP-TmAFP-wild、GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>1</sub>、GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>2</sub>、GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>3</sub> とアモサイトを結合緩衝液中で結合させ、洗浄後、アモサイトへの結合量について、蛍光プレートリーダーで測定を行なった (図 3B)。その結果、アスベスト結合ユニットの数が増えるにつれて、アモサイトへの結合量が増加することがわかった。さらに、アスベスト結合ユニット (NKRK) を 3 つ提示した GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>3</sub> は、1 つ提示した GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>1</sub> に比べて、アスベストへの結合量が約 9 倍も多く、強い結合性を有することが分かった。

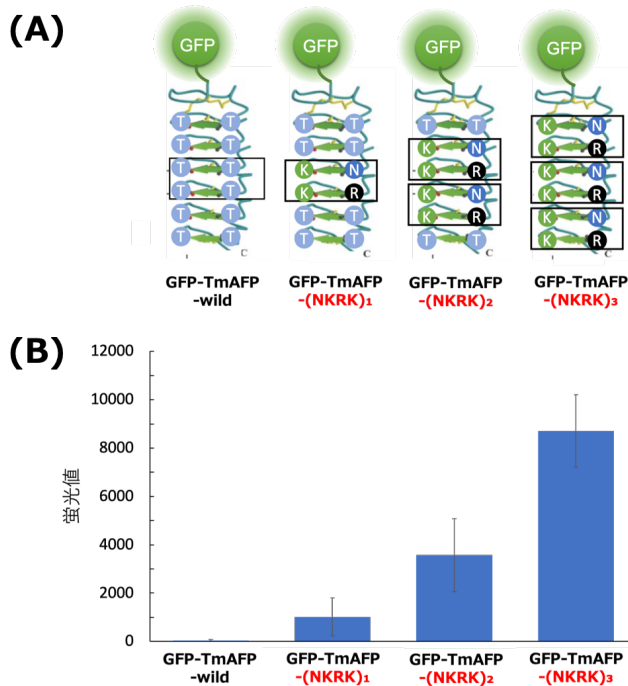


図 3、作製したアスベスト結合ユニットと GFP の融合タンパク質(A)とアモサイトへの結合定量評価(B)。

**(3) アスベスト結合ユニットの特異性の評価** アスベスト結合ユニット (NKRK) を 3 つ提示した GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>3</sub> は、角閃石系アスベストであるアモサイトに最も強く結合した。さらに、このタンパク質の特異性を評価するために、非アスベスト繊維として JFM 標準繊維 (10 種類) を用いて検討を行なった。GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>3</sub> と繊維を結合緩衝液中で混合したのち、蛍光顕微鏡で観察を行なった (図 4)。GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>3</sub> は、角閃石系アスベストであるアモサイトに結合し蛍光が観察された (図 4)。また、非アスベスト繊維である炭化ケイ素ウイスキー (SC1) には結合がみられたが、ロックウール (RW1) やケイ酸アルミ繊維 (RF3) など 9 種類の非アスベスト繊維には結合が見られなかった。炭化ケイ素ウイスキーは、現在一般建材には使用されていないため、アスベスト検査には影響は少ないと考えている。また、GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>3</sub> は、同じ角閃石系アスベストであるクロシドライトには結合することが分かり、アモサイトとクロシドライトの区別することはできなかった。従来のアスベスト結合タンパク質ではケイ酸アルミ繊維 (RF3) の一部に結合してしまうが、GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>3</sub> は全く結合しなかったことから高い特異性を持つことが分かった。今後このタンパク質を利用することでアスベスト検査法の精度の向上が期待できると考えている。

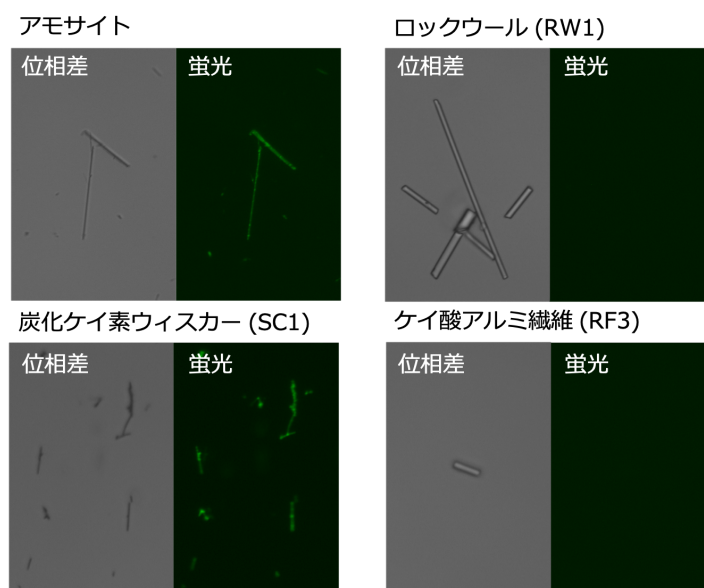


図 4、GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>3</sub> の結合特異性の評価。ここには示さなかったが、GFP-TmAFP-(NKRK)<sub>3</sub> はガラスウール (GW1)、微細ガラス繊維 (MG1)、2 種類のケイ酸アルミ繊維 (RF1、RF2)、チタン酸カリウムウイスキー (PT1)、酸化チタンウイスキー (TO1)、ワラストナイト (WO1) に対して結合しなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 黒田章夫、西村智基、石田丈典	4. 巻 7
2. 論文標題 携帯型蛍光顕微鏡によるアスベスト検査とその精度検証	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 繊維状物質研究	6. 最初と最後の頁 56-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 黒田章夫、石田丈典、西村智基	4. 巻 31(5)
2. 論文標題 大気アスベストを迅速検査するための蛍光顕微鏡法の開発と自動化の試み	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 廃棄物資源循環学会誌	6. 最初と最後の頁 345-351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------