

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：34428

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651078

研究課題名(和文)環境浄化に資するバイオ凝集・沈殿剤および無機捕捉バイオ素材の創成

研究課題名(英文)Creation of the biological flocculant and inorganic capture protein for environmental purification

研究代表者

尾山 廣(Hiroshi, Oyama)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：50221700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯資源植物、モリンガ樹の種子に含まれる濁水浄化タンパク質の構造遺伝子の塩基配列を明らかにした。このタンパク質は微細な土壌粒子を沈澱させ、濁水を浄化させる機能がある。推定されたアミノ酸配列と、SサブユニットとLサブユニットのアミノ酸配列を比較して、濁水浄化タンパク質はシグナルペプチド、プロペプチド、Sサブユニット、リンカーペプチド、Lサブユニットから成ることが予想された。Lサブユニット遺伝子とSサブユニット遺伝子+リンカーペプチド+Lサブユニット遺伝子は大腸菌で発現させることに成功した。この成果を基に、濁水浄化システムの構築や金属捕捉タンパク質の創製が可能となった。

研究成果の概要(英文)：We determined the nucleotide sequence of the structural gene of the protein having an excellent flocculation capacity contained in the seed of a tropical tree, the *Moringa oleifera*. The protein coagulates soil particle and purifies turbid water. Compared with its deduced amino acid sequence and protein sequences of S and L subunits, we predicted that the *Moringa* flocculation protein is composed of signal peptide, propeptide, S subunit and linker peptide. We succeeded in the gene expression of S subunit and of the S and L subunits including linker peptide. Based on this result, the construction of the purification system of turbid water and the development of metal capture protein may be enabled.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学(環境技術・環境材料)

キーワード：濁水浄化 タンパク質 モリンガ 凝集 組換え

1. 研究開始当初の背景

(1) 水資源の劣悪化と減少は世界的な問題であり、乾燥地や熱帯乾季における水資源の質的及び量的な確保は深刻である。先進国の浄水場では、アルミニウムや合成高分子を用いて河川水に含まれる微細な土壌粒子やゴミ等を凝集、沈殿させているが、アルミニウムはアルツハイマー病との因果関係が報告されており、合成高分子は一般に難分解性である。人体への影響や環境負荷を考慮すると、生分解性に優れた天然起源の凝集沈殿剤の開発が望まれる。

(2) モリンガ樹(*Moringa oleifera*)は熱帯などに広く分布し、古くからその地域の生活に密着したmulti-purpose treeである。葉にはビタミン、カルシウム、タンパク質が豊富に存在し、種子の油分は食用油や化粧品基材として利用されている。花、葉、根には薬用成分の存在が知られているが、それらのほとんどが民間伝承的で科学的な根拠に乏しく実用化に至っていない。このような背景のもと、申請者らは、微細な土壌粒子を沈殿させる濁水浄化能をモリンガ種子に見出し、その科学的実体の一部を解明した。

(a) モリンガ種子には6種類の同族濁水浄化タンパク質が存在する。最も濁水浄化能が高いものはSおよびLサブユニットからなるヘテロダイマー構造の塩基性タンパク質(pI=10)であり、耐熱性や溶剤耐性を有する。微細土壌粒子の沈降を引き起こす濃度は10-50 µg/mlであった。

(b) 両サブユニットのアミノ酸配列をマニュアルエドマン法で決定した。

(c) SサブユニットおよびLサブユニットの遺伝子の一部をPCR法でクローニングした。

(3) (1)および(2)の助走的研究から、濁水浄化に関わる物質は種子に蓄積しているタンパク質であることを実証した。

しかし、「なぜ、濁水浄化タンパク質が土壌コロイドを崩壊させ、土壌粒子を沈殿させるのか?」、「土壌粒子を沈殿させるのに必須のアミノ酸モチーフは何か?」、「土壌コロイド系を破壊する初期の相互作用は何か?」などの疑問が生じ、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

申請者らは熱帯資源植物のモリンガ樹の種子に含まれる12-kDaの塩基性タンパク質が、微細な土壌粒子を沈殿させ、濁水を浄化させる機能があることを見出した。濁水浄化の発現には、ある特定のペプチド鎖(モチーフ)とアミノ酸残基が関係する。即ち、無機土壌との相互作用を引き起こすための構造と凝集に関与するアミノ酸残基が存在する。

本研究では、タンパク工学的な手法を用いて、機能発現に必要最小限のモチーフと必須のアミノ酸残基を同定する。これにより、タンパク質-無機物の相互作用における新しい知見が得られる。これらのデータを基に、高

い浄化能の付加、あるいは、重金属結合性の発現など、環境浄化に資するバイオ凝集剤および無機捕捉バイオ素材を創成することが目的である。

当初の計画では土壌粒子を凝集・沈殿させ、水質を浄化するモリンガ種子タンパク質の機能と構造に関する知見を基に、以下の2つの研究アプローチの展開を予定していた。

(1) 高浄化タンパク質の創成: モリンガ種子に含まれる浄化タンパク質を親タンパク質として、組換えDNA実験によりさまざまな変異タンパク質を創出し、その中から凝集に関わるペプチド鎖(モチーフ)とアミノ酸残基を見出す。モチーフを並列に複数個連結する、あるいは、沈殿に関与するアミノ酸残基を別のアミノ酸に置換するなど、タンパク工学的な手法により、高浄化タンパク質を創成する。一方では、酵母菌の分泌系を用いて、高浄化タンパク質の大量生産系を構築し、安定的な供給系の構築を目指す。これまでに、タンパク質工学をベースにした水処理剤の開発研究はほとんどなく、得られた処理剤は環境に対する安全性が高いことから、さまざまな水質浄化場面(浄水場、湖沼、河川・池)において利用できる。

(2) 無機捕捉タンパク質の創成: 土壌粒子は一般にマイナスに荷電しており、反発しあってコロイド粒子となっている。粒子表面が電氣的に中和されると、凝集・沈殿が起こるものと考えられる。このことから、濁水浄化タンパク質の活性発現に関与するモチーフには、無機物と親和性の高い構造と、電荷を中和する機能の両方を有することが示唆される。タンパク工学的な手法により、電荷に関わる部分を土壌構成無機成分や鉱物粒子由来の金属を捕捉できるように変えると、新規なタンパク質・無機ハイブリッド素材を創成することができる。

3. 研究の方法

(1) モリンガ樹の葉および種子からDNAを抽出する。濁水浄化タンパク質のSサブユニットとLサブユニットのアミノ酸配列を基に2種類のプライマーを設計し、PCR法で両遺伝子を含む遺伝子断片をクローニングし、その塩基配列を決定する。この塩基配列を基にプライマーを設計し、inverted PCR法によりSサブユニットおよびLサブユニットの上流側および下流側の遺伝子断片をクローニングし、5'側及び3'側領域の塩基配列を決定する。この塩基配列を基に、5'側と3'側のプライマーを設計し、構造遺伝子断片をクローニングし、塩基配列を決定する。

(2) 両サブユニットのアミノ酸配列とPCR産物の解析結果に基づき、[Sサブユニット(102-bp)]-[linker配列(57-bp)]-[Lサブユニット(213-bp)]の順に遺伝子を化学合成する。このとき、酵母菌のcodon usageに従って配列を最適化する。

(3) 化学合成DNAを鋳型に、Sサブユニット、

LサブユニットおよびS+リンカーペプチド+Lサブユニット(S+Lサブユニット)の遺伝子をPCR法で増幅し、菌体外分泌シグナル(-mating factor)を持つ酵母の発現ベクター、pKLAC1に各断片を挿入する。*Kluyveromyces lactis*を宿主に発現後、培養上清よりSDS-PAGEのバンドパターンの変化を指標に、組換えタンパク質の発現を確認する。大腸菌の発現ベクター、pET25bとpColdに各断片を挿入し、*Escherichia coli*を宿主に発現後、菌体の超音波破碎上清及び残渣のSDS-PAGEとウエスタン分析により組換えタンパク質の発現を確認する。なお、相同性検索の結果から、Lサブユニットに強い濁水浄化活性があるものと予想している。なお、組換えタンパク質の精製は、硫酸アンモニウム沈殿、CM-Sepharoseカラムクロマトグラフィー、MonoSのFPLCで行う予定である。

(4)浄水機能を有する必要最小限のモチーフを見出し、簡易型浄水システムの試作や金属捕捉タンパク質の創成を試みる。

4. 研究成果

(1)PCRクローニングの結果、モリンガ種子の濁水浄化タンパク質には、SとLのサブユニットの間に57塩基のlinker配列が挿入されており、この前後の配列にイントロン挿入シグナルが認められないことから、sorting signalであるものと推測した。SサブユニットとLサブユニットの一部および両サブユニットの間のリンカー領域(57-bp)の塩基配列を基に、プライマーDNAを設計し、染色体DNAを鋳型にinverted PCRによりモリンガ濁水浄化タンパク質の構造遺伝子の塩基配列を明らかにした。この配列より推定されたアミノ酸配列は、セイヨウアブラナの1.7S種子貯蔵タンパク質(Napin-2)やバビンロウの耐熱性甘味タンパク質(マピンリン)との相同性が認められ、シグナルペプチド、プロペプチド、Sサブユニット、プロペプチド(リンカーペプチド)、Lサブユニットから成ることが推察された。なお、推定アミノ酸配列とプロテインシーケンスとの間に相違点(Q/C、Q/E、Q/R、L/V、G/R、Q/N)が認められた。

(2)*Kluyveromyces lactis*のコドン頻度を基に、SおよびLサブユニットのアミノ酸配列に対応する遺伝子を設計し、リンカー領域を含めて化学合成した。S、L、S+Lサブユニット遺伝子を酵母菌発現ベクター、pKLAC1に挿入し、酵母菌*Kluyveromyces lactis* GG799株と4種類の宿主プロテアーゼ欠損株(YC389、YCT390、YCT569、YCT598)の染色体DNA中に相同組換えで各遺伝子を導入した。各組換え菌をガラクトース含有培地で30、120rpm、22時間振盪培養した。各組換え菌の培養液をSDS-PAGEで分析したところ、S、L、S+Lタンパク質の産生は確認されなかった。S、L、S+Lサブユニット遺伝子を大腸菌発現ベクター、pColdIに挿入し、

Escherichia coli BL21(DE3)株を形質転換した。各組換え菌を(1)と同じ条件で培養後、各組換え菌の超音波破碎後の上清及び残渣を抗His-tag抗体によるウエスタンブロッティングで分析したところ、Lサブユニット遺伝子とS+Lサブユニット遺伝子を導入した各組換え菌の破碎上清と残渣には抗体陽性のシグナルが確認された。Sサブユニット遺伝子を導入した組換え菌はいずれの画分にもシグナルが検出されなかった。

組換え大腸菌及び酵母菌でのS、L、S+Lサブユニットタンパク質の発現量が低かった原因は、発現されたS、L、S+Lサブユニットタンパク質が大腸菌や酵母菌の菌体内プロテアーゼにより分解された。S、L、S+Lサブユニットタンパク質に強い凝集活性があるため、菌体成分と凝集沈殿し検出できなかった可能性が考えられる。

LとS+Lタンパク質は、大腸菌での発現が確認されており、宿主菌や誘導及び培養条件などを検討することにより、引き続き研究を進めることにより、環境浄化に資するバイオ凝集剤および無機捕捉バイオ素材を創成が可能となるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Hisato Katayama, Naoto Banba, Yukio Sugimura, Makoto Tatsumi, Shin-ichi Kusakari, Hiroshi Oyama, Atsushi Nakahira
Subcellular compartmentation of strontium and zinc in mulberry idioblasts in relation to phytoremediation potential. *Environmental and Experimental Botany*, 85, 30-35 (2013).

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾山 廣 (OYAMA Hiroshi)
摂南大学・理工学部・生命科学科・教授
研究者番号：50221700

(2) 研究分担者

杉村 順夫 (SUGIMURA Yukio)
衣笠会繊維研究所・理事
研究者番号：20273542

(3) 連携研究者

()

研究者番号：