

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号： 11401  
研究種目： 奨励研究  
研究期間： 2020～2020  
課題番号： 20H00947  
研究課題名 大腸菌による無機物質接着性と金属吸着性を併せ持つペプチドの発現方法の検討

## 研究代表者

佐藤 幸保 (SATO, Yukiyasu)

秋田大学・理工学研究科・総括技術長

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 480,000円

研究成果の概要： 筆者の所属研究室では、無機物質接着性と金属結合性を併せ持つペプチド(MBP)と多孔性シリカ粒子を素材とした高い選択性を有する金属吸着材を開発した。本研究では遺伝子組換え大腸菌を用いてMBPを安価に発現・生産する方法を検討した。

はじめに組換え大腸菌によるMBP生産を試行したがMBPの発現を確認することができなかった。次に、オルトケイ酸テトラエチル(TEOS)の存在下で組換え大腸菌を培養することにより、MBPの発現と同時にペプチドの周りにシリカ微粒子を生成する方法を検討した。その結果、大腸菌のMBP発現株の培養においてのみシリカの生成が認められ、組換え大腸菌によるMBPの生成が示唆された。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

金属吸着材は、資源の有効利用や有害物質の除去など広い範囲で使用されているが、高性能な金属吸着材は高コストであることが多く、高性能かつ安価に大量生産可能な金属吸着材の開発が望まれる。

本研究成果は、微生物培養によって高選択性を有する金属吸着材を直接生産できる可能性を明らかにしたものであり、社会的な意義が高いと考える。

研究分野： バイオプロセス工学

キーワード： 金属吸着性ペプチド シリカ微粒子形成能 遺伝子組換え大腸菌

1. 研究の目的

筆者の所属研究室では、無機物質接着性ペプチドと金属結合性アミノ酸からなるペプチド (Metal Binding Peptide;MBP)を種々のターゲット金属と結合させた後に多孔性シリカ粒子と混合すると、このペプチドは多孔性シリカ粒子の細孔内に安定的に接着し、金属脱離後に残ったインプリント空孔はターゲット金属に対して高い選択性を有することを明らかにした (図1)。しかし、化学合成法によるペプチドの生産は高コストであるため、実用化のためには MBP の安価な製造法が求められる。

そこで本研究では、遺伝子組換え大腸菌を用いて安価に発現・生産する方法を検討した。

2. 研究成果

(1) 実験方法

MBP の遺伝子を有する発現ベクターpCOLADuet-1-MBP を用いて大腸菌 BL21(DE3) を形質転換した。

得られた組換え体をカナマイシン含有 LB 培地で OD600 値が 0.6 から 0.9 になるまで 37 で培養した後 1 mM IPTG を添加し、あらかじめ調製した TEOS/HCl 混合溶液を加えて 37 で 24 h 培養した。

培養によって生じた固形分を回収し、真空凍結乾燥した。フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) ならびに走査型電子顕微鏡エネルギー分散型 X 線分光法 (SEM-EDS) により分析した。

MBP ペプチドは SDS-PAGE および anti-His-Taq 抗体を用いた Western Blot により分析した。

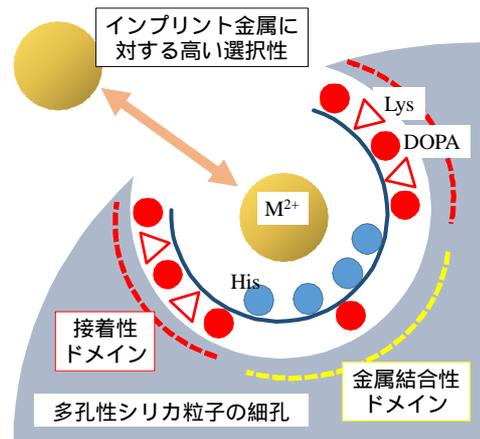


図1 接着性ペプチドを用いた高選択的な金属吸着担体

(2) 結果と考察

組換え大腸菌による金属結合性ペプチドの生産

MBP の cDNA を有する発現ベクター pCOLADuet-1-MBP を構築し、これにより形質転換した大腸菌 BL21(DE3) を用いて MBP 生産を試行したが、MBP の発現を確認することができなかった。この原因として、短鎖ペプチドは大腸菌内で異物と認識され、プロテアーゼによって加水分解され易い可能性が考えられた。

MBP 生産とシリカ微粒子形成条件の検討

珪藻の天然バイオシリカは塩基性ポリペプチド・シラフィンがケイ酸を沈着させることで形成されるが、シラフィンの塩基性の部分配列はオルトケイ酸テトラエチル (TEOS) の存在下でシリカ微粒子の形成を誘起することが知られている。そこで、培養中に TEOS を加え MBP の発現と同時にその周りにシリカを形成させる方法について検討した。

TEOS の存在下、振とうフラスコで組換え大腸菌を培養したところ、フラスコ壁面に白色の固形物の生成が認められた。得られた固形物 MBP-シリカを分析した。FT-IR では 1080 cm<sup>-1</sup> 付近に Si-O 伸縮振動に由来するピークが見られた (図2)。また、SEM-EDS により Si を主成分とすることが分かった (図3)。一方、組換えプラスミドを導入していない大腸菌では同様に培養してもフラスコに固形物の付着が見られなかった。以上のことから、遺伝子組換え大腸菌の培養において、MBP が生成していることが示

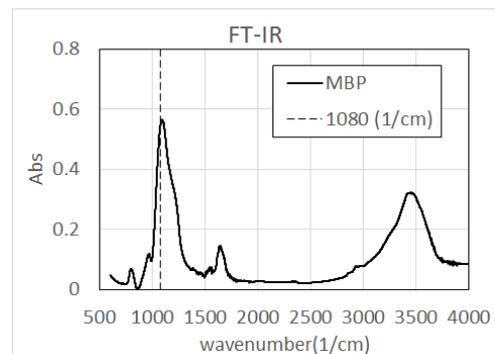


図2 FT-IR 測定結果

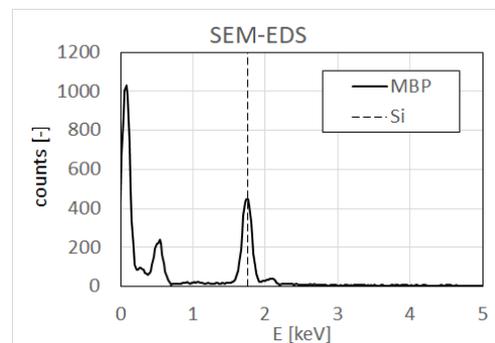


図3 SEM-EDS 測定結果

唆された。そこで、固形物から中性リン酸緩衝液によるペプチドの抽出を試み、SDS-PAGE による CBB 染色および His タグ抗体による Western Blot を行った。しかし、MBP の明確なバンドを検出することができなかった。今後、ペプチドの抽出方法を検討する必要がある。

### (3) 結言

はじめに組換え大腸菌を培養して MBP 発現を試みたが、MBP を確認することができなかった。これは外来ペプチドである MBP が大腸菌によって異物と認識されてプロテアーゼ分解された可能性が考えられる。

次に、TEOS を加えて組換え大腸菌の培養を行ったところ、シリカ固形物がフラスコ内表面に生成された。このことから、組換え大腸菌の培養により MBP は発現され、TEOS 存在下で形成されたシリカによりプロテアーゼ分解から保護されたものと推察される。

これらの結果より、MBP の遺伝子を導入した組換え大腸菌を、TEOS と鑄型の金属イオンの存在下で培養することにより、この金属イオンをインプリントしたシリカ粒子を直接生産できる可能性が示された。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
後藤 猛	(GOTOH Takeshi)
横田 早希	(YOKOTA Saki)
田牧 茜	(TAMAKI Akane)