

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06581

研究課題名(和文) 環境調和型材料創成を志向したシリカ重合促進タンパク質グラシン利用の基盤技術

研究課題名(英文) Technology with glassin, a protein accelerating silica polycondensation, for development of environmentally benign routes to material synthesis

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・准教授

研究者番号：90326877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では六放海綿類カイロドウケツのシリカ骨格から単離されたシリカ形成促進タンパク質グラシンについて、このタンパク質のうち、シリカ形成促進に関わる領域を特定した。また、グラシンをタグとして組換えタンパク質を作製することにより、活性を保持したまま当該タンパク質をシリカに固定する技術を確立した。この成果は、当初の目的を達成したものであり、グラシンの産業利用に道を拓くこととなった。さらに、グラシンが金属イオンに強く結合するという新たな機能が見出された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified the active region in silica formation accelerating protein glassin isolated from the silica skeleton of the hexactinellid sponge Euplectella. We also established a technique to immobilize useful proteins on silica with maintaining their activity by preparing recombinant proteins using glassin as a tag. This achievement meets the original objective, which open a new route for the industrial use of glassin. In addition, we uncovered a new function of glassin which binds strongly to metal ions.

研究分野：海洋生物学

キーワード：バイオミネラリゼーション 海綿動物 シリカ 環境調和型 生物模倣

1. 研究開始当初の背景

生物が作る無機材料“バイオミネラル”は、人工材料を凌ぐ特性を備えるとともに、生命活動の一環として室温・中性付近のpHといった環境への負荷が極めて小さい条件下で生産される。バイオミネラルの形成メカニズムを解明することは、その情報を基にして新たな環境低負荷型の材料製法の創出につながると期待されている。特に、バイオミネラルに含まれる微量の有機分子がバイオミネラルの特性や製法のカギを握ると考えられ、このような有機分子に注目が集まっている。

六放海綿類カイロウドウケツ *Euplectella aspergillum* は、シリカガラスを主成分とする骨格を形成する(図1)。カイロウドウケツのシリカ骨格は、nmから肉眼レベルのスケールにおいて階層的に規則性のある構造を有しており、工業的に合成されるガラスと比較して機械的強度に優れ、光ファイバーとしての性質を備えていることが明らかにされ、注目されている材料である(引用文献)。

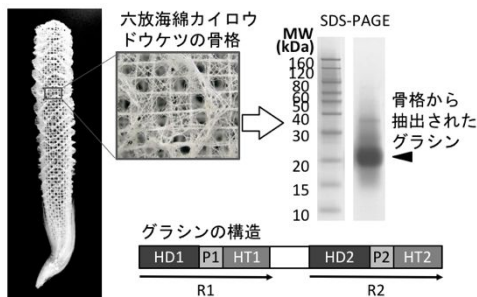


図1. 六放海綿カイロウドウケツの骨格とグラシンの構造

その際立った性質には、有機分子の関与が指摘されてきた。研究代表者らは、カイロウドウケツのシリカ骨格に含まれる有機分子として水溶性タンパク質を見出し、グラシン(glassin)と命名した。グラシンは、既知のタンパク質との相同性が全く見られない新規タンパク質である。その配列は、ヒスチジン・アスパラギン酸リッチ領域(HD領域)、プロリンリッチ領域(P領域)、ヒスチジン・スレオニンリッチ領域(HT領域)を一つのユニットとしてこのユニットが2回繰り返された構造から構成される。グラシンを室温、中性pH(6-8)においてケイ酸溶液に添加すると速やかにシリカが形成されることから、グラシンは生体内においてシリカ骨格の形成に関与していると考えられる。

研究代表者は、グラシンの発見に先立ち、世界で初めてシリカバイオミネラルの形成に関与するタンパク質シリカチンと同定し、その機能を示した(引用文献)。シリカチンを利用してシリカや酸化チタンなどの金属酸化物の低温合成方法が開発されている(引用文献)。シリカチンの欠点は、難水溶性で、容易に変性することにある。グラシンは、水溶性であり、熱処理しても失活しない、扱いやすいタンパク質である。シリカバイオミネラルの研究では珪藻を材料とした研究が多いが、珪藻のシリカ形成に関わる有

機分子も複雑であることから、その実用的な利用には限界がある(引用文献)。シリカ形成におけるグラシンの分子機構を解明し、その有用性を示すことができれば、シリカチンや珪藻の有機分子以上に幅広い分野でのグラシンの活用がすすむと期待される。

2. 研究の目的

本課題ではグラシンの構造と機能の関係を解析して生物におけるシリカ形成機構を明らかにすると共に、グラシンがタンパク質固定化用タグとして応用可能であることを示すことにより、グラシンの産業利用に道を拓くことを目的とした。

入手困難な深海生物を材料として利用したことで、見いだすことができたこれまでに例のない新たなタンパク質を用いる本研究は、優位性、独創性、新規性を備えている。本研究の成果は、「バイオミネラルの形成機構に学ぶ、環境調和型でありふれた元素から新たな製法を創出すること」につながり、二酸化炭素の排出抑制や過度の鉱物資源採掘といった地球上の課題解決に寄与する。シリカは、先端材料から我々の身の回りに至るまで広く利用される材料であり、シリカバイオミネラルに学ぶ材料や製法は、産業上有用であると予想される。特に、鉱物資源やエネルギー資源の乏しい我が国においては、このような材料や製法の開発は不可欠である。

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は、人工遺伝子を作製した(図2)。これらグラシンおよび部分ペプチド遺伝子を大腸

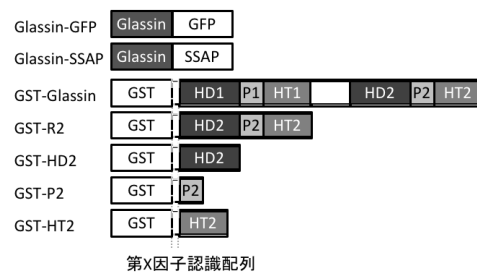


図2. 作製したコンストラクトの模式図

菌発現ベクターに挿入し、その塩基配列が正しいことを確認した。また、グラシンおよび部分ペプチド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)、Streptomyces septatus TH-2 アミノペプチダーゼ(SSAP) 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。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調製した。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および抗グラシン抗体を用い

たイムノプロット法により確認した。グラシンは、Ni-ニトリルトリ酢酸 (NTA) カラムにより精製を行なった。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 法または BCA 法により定量した。GST 融合タンパク質は、第 X 因子認識配列を有しており、当該融合タンパク質を第 X 因子で処理することにより GST とグラシンまたは部分ペプチドを切り離した。GST の活性は、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た。SSAP の活性は、L-ロイシンパラニトロアニリドを基質として、加水分解産物の吸光度を測定した。GST および SSAP 活性の測定は定法により行った。GFP の蛍光は青色 LED 照射により観察した。

(2) グラシンおよび部分ペプチドによるシリカ形成実験

(1) で調製したグラシン、部分ペプチドを用いてシリカ形成実験を実施した。シリカ形成実験は Kröger ら (引用文献) の方法に従った。形成されたシリカを 0.1 M NaOH で溶解し、ケイモリブデン酸比色法で定量した (引用文献)。また、形成されたシリカの形態を走査型および透過型電子顕微鏡で観察した。

(3) 組換えグラシン付加タンパク質の固定化・精製条件の検討

精製した組換え融合タンパク質を用いて、(2) に示す方法でシリカ形成を行い、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。シリカ形成や洗浄の条件を詳細に検討して活性を損なわずに高収率、高純度となる条件を決定した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌タンパク質発現系を用いた組換えグラシンの生産

グラシン遺伝子は、これまでの研究によりカイロウドウケツの近縁種である *E.*

curvistellata RNA からクローニングした cDNA として得ている。当初研究材料とした *E. aspergillum* の生体試料を得るのがこんなであることによる。グラシン cDNA を使用してサブクローニングやタンパク質発現を試みたものの、その結果が不良であったことから、コドンユースージを変更して人工遺伝子を構築した。人工グラシン遺伝子の使用により、形質転換効率が上昇した。また、組換えグラシンは大腸菌体内で良好に発現したことを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法および抗グラシン抗体を用いたイムノプロット法により確認した。

グラシンはヒスチジンを多く含むことから、His-tag のように Ni-NTA カラムへの結合が予想された。大腸菌抽出液を Ni-NTA カラムに添加すると、組換えグラシンは予想通り Ni-NTA カラムに強力に結合し、精製を行

うことができた。グラシン-GFP 融合タンパク質も同様に Ni-NTA カラムで精製した。

組換えグラシンは、pH6 においてケイ酸と混合することにより、速やかにシリカが形成された。すなわち、組換えグラシンは、天然型グラシン同様の活性を保持していると言える。SSAP、GFP 両融合タンパク質について、その発現を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法および抗グラシン抗体を用いたイムノプロット法で確認した。両タンパク質とも良好に発現し、精製されたことを確認した。GFP 融合タンパク質は、蛍光灯照明下でも十分強い緑色を呈するほど大量に発現し、精製された。SSAP については、アミノペプチダーゼ活性を測定し、活性を有する組換えタンパク質が発現したことを確認した。

(2) 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部分ペプチドの機能

HD2, P2, HT2 の各領域、繰り返しのユニット R2 も人工遺伝子を作製して組換えタンパク質として発現させたが、低分子のため精製が困難であった。そこで、GST との融合タンパク質として組換えタンパク質を発現させ、グルタチオンアフィニティクロマトグラフィーを使用して精製を行った。

精製した GST との融合タンパク質を pH6 においてケイ酸水溶液と混合し、シリカ形成活性を調べた。GST-G (GST とグラシンの融合体)、GST-R2、GST-HD2 については速やかなシリカ形成が見られたが、GST-P2、GST-HT2 には見られなかったことから、シリカ形成促進活性には HD 領域が重要であることが示された (図 3)。ただし、グラシン全長に比べ、R2 および HD2 の活性は有意に低かったことから、HD 領域は、P 領域や HT 領域と相互作用することにより、より強力なシリカ形成促進を發揮するものと考えられる。または、シリカ形成活性にはタンデムリピートの重要性も浮上した。第 X 因子を用いて、GST との融合タンパク質から GST を切り離した試料においても、GST との融合タンパク質同様の結果を得たことから、GST との融合がシリカ形成促進活性に影響がないことを確認した。

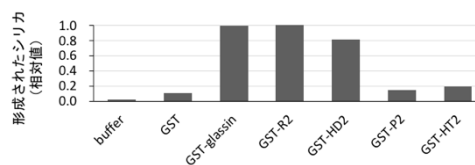


図3. glassinおよび部分ペプチドのシリカ形成促進活性

(3) 有用タンパク質の固定化

グラシンとの融合タンパク質として、GFP、SSAP、GST 融合タンパク質を作製した。ケイ酸中性水溶液にグラシンを添加すると速やかにシリカが形成されるように、これらグラシンとの融合タンパク質もケイ酸水溶液への添加により速やかにシリカが形成され、グラシ

ンが GFP, SSAP, GST との融合にかかわらず機能を保持していることが示された。

GFP 融合タンパク質の場合は、タンパク質濃度が十分高いことから、蛍光灯照明下でも十分強い緑色蛍光を目視により確認することができる。ケイ酸水溶液への添加によるシリカ形成に伴い、GFP の緑色は沈殿に局在した(図4)。すなわち GFP はその活性を保持しながらシリカに固定されたことが確認された。SSAP および GST 融合タンパク質については、それぞれシリカ形成後にもペプチダーゼ活性およびグルタチオン還元活性が残存したことを確認した。

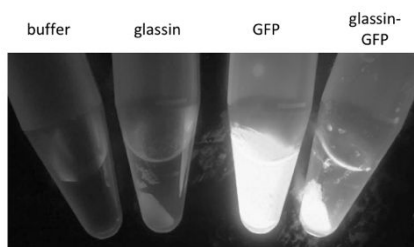


図4. glassin-GFPのシリカへの固定化

以上の結果から、当初の目的を達成することができた。すなわち、グラシンのシリカ形成促進に関わる領域を特定することができ、また、グラシンをタグとして有用タンパク質をシリカに固定する技術を確認することができた。今後はさらに多種のタンパク質に広く適用可能かどうか実証する予定である。また、融合タンパク質のグラシンと有用タンパク質の配列の間にリンカーを挿入する、グラシンの配置(アミノ末端またはカルボキシル末端)を検討するなど、実用化に向けて最適化することが必要となる。

本研究では、グラシンにみられるポリヒスチジン配列が、Ni イオンに親和性を有し、His-tag のように Ni-NTA で精製することが可能であることを示すことができた。この発見は、グラシンのバイオテクノロジー分野における有用性をさらに高める意義がある。今後はグラシンと金属イオンとの相互作用についても、興味を持たれる。

<引用文献>

- Aizenberg J, et al (2005) Science 309, 275; Sundar VC, et al (2003) Nature 424, 899.
Shimizu K, et al (1998) Proc Natl Acad Sci USA, 95, 6234; Cha JN, et al (1999) Proc Natl Acad Sci USA, 96, 361.
Brutcher RL, Morse DE (2008) Chem Rev 108, 4915.
Kröger N, et al (1999) Science 286, 1129.
Iler RK (1979) The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Bio-

chemistry (Wiley, New York), 866 pp.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

Shota Tokai, Tomohiro Bito, Katsuhiko Shimizu, Jiro Arima, Methionine residues lining the substrate pathway in prolyl oligopeptidase from *Pleurotus eryngii* play an important role in substrate recognition. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有, 2018, doi/10.1080/09168451.2018.1459177

Yasmeen Yousif Ahmed Elyas, Kazusa Miyatani, Tomohiro Bito, Misugi Uraji, Tadashi Hatanaka, Katsuhiko Shimizu, Jiro Arima, Active site pocket of *Streptomyces* D-stereospecific amidohydrolase has functional roles in aminolysis activity, Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 査読有, 2018, doi/10.1016/j.jbiosc.2018.03.004

Shota Tokai, Tomohiro Bito, Katsuhiko Shimizu, Jiro Arima, Effect of oxidation of the non-catalytic propeller domain on the substrate specificity of prolyl oligopeptidase from *Pleurotus eryngii*, Biochemical and biophysical research communications, 査読有, Vol. 487, No. 2, 2017, pp. 356-361, doi/10.1016/j.bbrc.2017.04.064

Tomomi Hoshino, Kanako Sato, Yuya Oaki, Ayae Sugawara-Narutaki, Katsuhiko Shimizu, Noriaki Ozaki Hiroaki Imai, Plant opal-mimetic bunching silica nanoparticles mediated by long-chain polyethyleneimine, RSC Advances, 査読有, vol. 6, 2016, 1301-1306, doi/10.1039/c5ra25742e

Katsuhiko Shimizu, Taro Amano, Md. Rezaul Bari, James C. Weaver, Jiro Arima, Nobuhiro Mori, 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, 査読有, Vol. 112, No. 37, 2015, pp. 11449-11454, doi/10.1073/pnas.1506968112

[学会発表] (計18件)

西美智佳, 小林大起, 美藤友博, 有馬二郎, 清水克彦, シリカ粒子形成促進タンパク質“グラシン”の構造と性質, 2018

年度日本農芸化学会中四国支部例会,
2018

Hiroshi Kobayashi, Michika Nishi,
Tomohiro Bito, Katsuhiko Shimizu, Ji-
ro Arima, Development of method for
protein Immobilization on silica for
use in food processing industry. The
International Joint Symposium between
Japan and Korea (AFELiSA) 2017, 2017,
(国際学会)

清水克彦, 着生とバイオミネラリゼー
ション, 日本付着生物学会シンポジウム,
2017, (招待講演)

Katsuhiko Shimizu, Hiroki Kobayashi,
Taro Amano, Michika Nishi, Masatoshi
Tsukahara, Tomohiro Bito, Jiro Arima,
Exploration of genes associated with
sponge silicon biominerals in the
whole genome sequence of the hexacti-
nellid *Euplectella curvistellata*,
14th International Symposium on Bio-
mineralization, 2017, (国際学会)

小林大起, 西美智佳, 天野太郎, 美藤友
博, 清水克彦, 有馬二朗, シリカ粒子形
成促進タンパク質“グラシン”の機能に
よる GST 固定シリカ粒子の構築, 2017 年
度日本生物工学会全国大会, 2017

Katsuhiko Shimizu, Hiroki Kobayashi,
Taro Amano, Michika Nishi, Tomohiro
Bito, Jiro Arima, Silicatein and
glassin: molecular properties of the
proteins occluded in sponge biosilica
and their biotechnological implica-
tions. Silicon, Silica & their Iso-
topes: Biology, Biogeochemistry & Bi-
otechnology 2017, 2017, (国際学会)

Hiroki Kobayashi, Taro Amano, Tomohi-
ro Bito, Jiro Arima, Katsuhiko Shimi-
zu, Immobilization of green fluores-
cent protein to silica using the
function of “glassin”, a silica
particle formation promoting protein
from hexactinellid sponges. Silicon,
Silica & their Isotopes: Biology, Bi-
ogeochemistry & Biotechnology 2017,
2017, (国際学会)

清水克彦, 海綿動物のシリカバイオミ
ネラル形成タンパク質に関する研究, 平成
29 年度マリンバイオテクノロジー学会大
会, 2017, (招待講演)

清水克彦, 海綿動物のシリカバイオミ
ネラル形成タンパク質に関する研究, 第 31
回 海洋生物活性談話会, 2017

清水克彦, 海綿動物に学ぶガラス細工,
日本農芸化学会中四国支部第 25 回若手研
究者シンポジウム, 2017, (招待講演)

清水克彦, バイオシリカとその形成機構,
第 20 回規則性多孔体セミナー, 2016,
(招待講演)

Hiroki Kobayashi, Taro Amano, Tomohi-
ro Bito, Katsuhiko Shimizu, Jiro Ari-
ma, Construction of immobilized pro-
tein by using the function of silica
particle formation promoting protein
“glassin”, The International Joint
Symposium between Japan and Korea
(AFELiSA) 2016, 2016, (国際学会)

小林大起, 天野太郎, 有馬二朗, 清水克
彦, シリカ粒子形成促進タンパク質“グ
ラシン”の機能を利用した GFP のシリカ
への固定化, 2016 年度日本生物工学会全
国大会, 2016

清水克彦, 六放海綿類カイロウドウケツ
のシリカバイオミネラリゼーションに関
わる タンパク質グラシン, 第 11 回化学
生態学研究会, 2016, (招待講演)

清水克彦, 海綿動物のシリコンバイオミ
ネラルに学ぶシリコンマリンバイオテク
ノロジー, 第 18 回マリンバイオテクノ
ロジー学会, 2016, (招待講演)

Katsuhiko Shimizu, Taro Amano, Jiro
Arima, Glassin, a silica polyconden-
sation directing protein from the si-
liceous skeleton of the hexactinellid
sponge *Euplectella*, PacifiChem 2015,
2015, (国際学会)

Taro Amano, Jiro Arima, Katsuhiko
Shimizu, Characterization of recombi-
nant glassin, a protein extracted
from biosilica skeleton of the glass
sponge *Euplectella*, PacifiChem 2015,
2015, (国際学会)

清水克彦, カイロウドウケツシリカ骨格
に含まれるタンパク質の検索, 第 86 回日
本動物学会大会, 2015

[図書] (計 1 件)

Katsuhiko Shimizu, Daniel E. Morse,
Silicatein: A Unique Silica-
Synthesizing Catalytic Triad Hydro-
lase From Marine Sponge Skeletons and

Its Multiple Applications, In “Methods in Enzymology Volume 605. Marine Enzymes and Specialized Metabolism - Part B” 査読有, 2018,
doi/10.1016/bs.mie.2018.02.025

〔その他〕

授賞

マリンバイオテクノロジー学会平成 28 年
度学会賞

6．研究組織

(1)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・准
教授

研究者番号：90326877

(2)研究分担者

有馬二郎 (ARIMA, Jiro)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：80393411