

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14922

研究課題名(和文)好塩菌と「変性しない蛋白質」好塩性蛋白質を用いた塩害地域からの重金属捕集と再利用

研究課題名(英文) Recovery of heavy metal ions from brine-damaged area with denaturation-resistant halophilic proteins and halophiles.

研究代表者

徳永 正雄 (TOKUNAGA, MASAO)

鹿児島大学・農学部・プロジェクト研究員

研究者番号：20112782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：好塩性タンパク質は、高い水可溶性を示し、強い塩析条件化でも凝集せず、そのため厳しい環境下でも高い変性耐性能を示す。好塩性高ヒスチジン含有金属結合タンパク質(HP)は、多くの重金属に高い結合性を示し、大腸菌で大量に発現・生産できた。このHPとそのHigh-His領域を用いて、塩害地方からの重金属回収を目的として、結合能を評価した。HPは高いNiイオン結合性を示し、HPを発現させた大腸菌菌体は、1リッター培養あたり、～9.6 mgのNiイオンを結合した。

研究成果の概要(英文)：Halophilic proteins are highly water soluble and resistant to aggregation under even strong salting-out conditions, resulting in exhibiting denaturation-resistant characteristics under harsh conditions. Halophilic histidine-rich metal binding protein (HP) has been found to have high binding capacity to several heavy metal ions and to be expressed in Escherichia coli cytoplasm as soluble form in large amount. We attempted to employ this HP protein and its High-His region to recover heavy metal ions from brine-damaged area. HP was found to bind high amount of Ni ion, and fixed Escherichia coli cells, expressing His-HP protein, from 1 liter culture was found to bind ~9.6 mg Ni ion.

研究分野：応用分子細胞生物学・応用微生物学

キーワード：応用微生物 好塩性タンパク質 極限環境微生物 バイオテクノロジー バイオリジクス

## 1. 研究開始当初の背景

21世紀は生命科学の時代であり、生物由来物質を活用したバイオロジクス研究がバイオ医薬品のみならず様々な分野で「環境にやさしいものづくり」として注目されている。

厳しい環境で生き抜く「極限能力」を持った「極限環境生物」は、通常生物が生きてゆけない特殊な環境で生息できる。その一種である高い塩分濃度を好む好塩菌は、塩蔵食品加工など食品産業において重要であり、塩湖など自然界にも広く分布し、「人類に身近な極限環境微生物」である。中度好塩菌は、0.2M～飽和塩濃度という広範囲の塩濃度に適応して生育できる。この菌の分泌型タンパク質は、外界の塩濃度に対応して、低濃度～高濃度の幅広い塩存在下で良く働き、産業的利用には最適である。このような好塩性タンパク質は、酸性アミノ酸に富み、総荷電が極端にマイナスに偏っているのが大きな特徴である。これは、広い pH 条件で荷電をもつことで、高濃度の塩による「塩析効果」に対抗して機能できるように、高い水可溶性を維持するためである。また、この高い水可溶性は、好塩性タンパク質が高い「非凝集性」を持っていることを意味し、これは「一旦変性しても不可逆的に凝集しないで可逆的に活性・構造を回復する」というすぐれた性質の原因となっている。

無機材料に比べて、高い機能性と特異性を持ったタンパク質分子は、その構造の複雑さからくる「不安定性」が、応用のネックである。過酷な条件にも強いとされている超好熱性の蛋白質でさえ、堅い構造が一旦壊れてしまうと不可逆的にその機能を失ってしまう。本研究で使用した「好塩性タンパク質」は、その構造的特徴から、過酷な条件に曝されても不可逆的に変性せず容易に構造と機能を回復する「タフなタンパク質」であり、タンパク質が持つ高い機能と特異性を持ち、加えてその不安定性という弱点を克服できると期待されるものである。震災による津波に襲われた広範囲な塩害地域は、海水中の食塩のみならず様々なところから排出された重金属に汚染されている。一方、鉱業資源に乏しい日本にとって、汚染物質として被災地域の生活環境に放出された  $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  などの重金属を捕集・回収すれば有用な資源となりうる。タンパク質は分子内に金属を特異的に配位することが知られ、重金属の回収への応用が期待されてきた。しかし、タンパク質の安定性が低いという問題により、現在までその適用が広がっているとは言い難い。本研究は、このような社会的背景のもとに、好塩性菌と好塩性タンパク質による新しい環境修復と重金属回収法の開発をめざしてスタートした。

## 2. 研究の目的

高い塩濃度環境を好んで生育する「好塩菌」が生産するタンパク質は、熱や有機溶媒等の変性作用に耐性で、通常のタンパク質では不可逆的に凝集し変性してしまう状況でも、高い可溶性を示し、凝集せず、可逆的に活性と構造を回復するという産業利用にとって極めて有用な特徴を持っている。また、当研究室の研究により、好塩性菌はより高い重金属耐性を持っていることが示されているので、未曾有の災害により環境中に放出された重金属を、これら好塩性タンパク質を用いて効率よく捕集し、資源として利用することを目的とした。

## 3. 研究の方法

我々が発見して解析を進めてきた好塩性細菌のペリプラズムに局在する好塩性重金属結合タンパク質 (Histidine-rich metal binding protein, HP) は、多量の重金属を結合回収できると考えられるので、HP タンパク質を用いた固定化カラムを作成し、効率の良い重金属の回収をめざす。また、HP タンパク質の金属結合部位は、 $\text{Zn}^{2+}$  に高い特異性を示す「 $\text{Zn}^{2+}$  結合ポケット」と  $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  など複数の重金属を結合する「高ヒスチジン領域 (High-His)」の 2 箇所からなっていると推定できるので、特に重金属の総結合量から考えると主要な役割を果たすと考えられる High-His 領域について解析する。

また研究背景にも記したように好塩性菌が生産するタンパク質の荷電は大きくマイナスに偏っているため、好塩性細菌菌体全体の荷電も通常細菌と比較して、大きくマイナスに偏っていると考えられる。このため、技術的によりシンプルで安価な系として、好塩性菌菌体を固定化し、その重金属結合能力を評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 重金属結合タンパク質 HP が持つ High-His 領域の重金属結合活性の評価

好塩性海洋細菌 *Chromohalobacter salexigens* は、重金属結合タンパク質 HP をコードする遺伝子を持っている。この遺伝子の塩基配列から予測される HP タンパク質の一次配列を図 1 に示した。黒丸を付した His 残基が金属結合ポケットを形成し、High-His 領域はアンダーラインで示した。黒丸で示した金属結合ポケットは、他種細菌の同属タンパク質にも強く保存された配列であるが、46 残基からなる High-His 領域は、好塩性細菌由来の重金属結合タンパク質に特徴的な配列であり、特異的機能を持った「挿入配列」であると考えられる。46 残基のうちその約

1/3 が His 残基であり、さらに 11 残基の Asp と 7 残基の Glu 残基を含み、この 46 残基から成る挿入配列の 72% がこの 3 種のアミノ酸残基が占めているという特徴的な構造である。ちなみにこの挿入配列の等電点は多くの His 残基を含んでいるにも関わらず 4.8 と計算される全体として酸性の配列である。

EGPMSVVASPF	S ILGDMVEEV	GGEHVDVITL	VGPDGDAHVF	40
SPSPDARAV	GEADLFVVG	LHFEGWLDRL	VEASGYEGPV	80
VVASRGIDAL	SFDEEREEMS	SDHEGDMHAT	GHDHMDHMH	120
<u>DMDHDSSEHA</u>	<u>GHDHGFDPH</u>	AWQDLQNGKQ	YVANIRDALV	160
AADPEHAADY	RRNAEQYVEA	MDTLDAEVHR	RIGAIPEANR	200
VLI TNSDAFG	YFANAYGLDV	LSPVGLSTAA	EPSAAGMAKL	240
IEQIQARNVR	ALFLENMTSP	ALLEQLADET	GVTIGOTLYA	280
GALAAEGEAS	TYLGMFRINV	DTLLEALKD		309

図 1 . 重金属結合タンパク質 HP の一次構造  
黒丸を付けた His 残基が金属結合ポケットを形成し、High-His 領域はアンダーラインで示した。

この HP 遺伝子を PCR で増幅し、pET3a 発現ベクターにクローニングして、大腸菌 BL21(DE3)株を宿主にして発現させた。

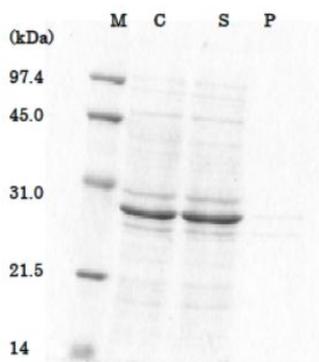


図 2 . pET3a ベクターにクローニングして、大腸菌 BL21(DE3)で発現させた HP タンパク質の電気泳動図。M, 分子量マーカー; C, 細胞粗抽出液; S, 可溶性画分; P, 不溶性画分

図 2 にその結果を示したが、全て可溶性画分に大量に発現した。これを Ni-NTA カラムに掛け、イミダゾールで溶出したところ、カラムに結合し、主に 100 mM のイミダゾールで溶出され、Ni に対して結合能があることが証明できた (図 3)。

次に、この Ni 吸着能が、46 アミノ酸残基から成る挿入配列 (図 1 のアンダーライン部分) にあることを証明するために、「Met-Gly-Ser-Ser-挿入配列部分」をコードした遺伝子領域を PCR で増幅し、すでに構築済みであった好塩性  $\alpha$ -アミラーゼの  $\alpha$ -ドメイン結合領域 (SBD12) の発現ベクター pET15b-SBD12 の NcoI/NdeI サイトにクローニングした (His-tag を挿入配列で置き換えた)。

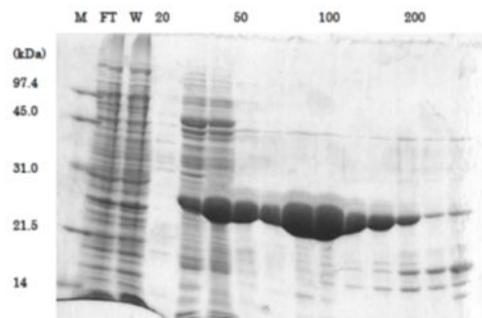


図 3 . Ni-NTA カラムからの溶出画分の電気泳動図。  
M, 分子量マーカー; FT, 非吸着画分; W, 洗浄画分; 20-200, 溶出画分のイミダゾール濃度

これを大腸菌で発現させると「挿入配列 (全長 50 残基のアミノ酸配列から成り、His-Asp の特徴的な繰り返し配列を持つので HD50 と命名した) + SBD12」という融合タンパク質が可溶性画分に大量に発現した (図 4 左図)。

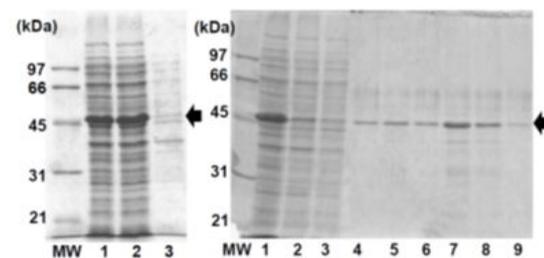


図 4 . HD50-SBD12 融合タンパク質の可溶性発現と Ni-NTA カラムへの吸着と溶出  
(左図) MW, 分子量マーカー; 1, 細胞粗抽出液; 2, 可溶性画分; 3, 不溶性画分。  
(右図) MW, 分子量マーカー; 1, 発現サンプル; 2, 非吸着画分; 3, 洗浄画分; 4-9, イミダゾール溶出画分 (4-6 が 20 mM, 7-9 が 50 mM イミダゾール画分); HD50-SBD12 融合タンパク質を矢印で示した。

発現した「挿入配列 (HD50) -SBD12 融合タンパク質」を Ni-NTA カラムに掛け、もし、この融合タンパク質がカラムに結合すれば、SBD12 は Ni-カラムに結合活性は持っていないことが分かっているので、HD50 領域が Ni-カラムへの結合活性を持っていることになる。予想通りこの融合タンパク質は Ni-カラムに結合し、イミダゾールで溶出されたことより、His-Asp 繰り返し配列を含む挿入配列が Ni 結合活性を持つことが証明された (図 4、右図)。

挿入配列が金属結合能を持っていることが証明されたので、この領域を大量精製する

ことを試みた。HP タンパク質の配列を見ると HP タンパク質をトリプシンで完全消化することが出来れば、この挿入配列を含む 53 アミノ酸残基からなるペプチド (Glu97-Lys149) を分離できることが期待できた。そこで精製タンパク質を 20 mM Tris-HCl, pH8.0, 2.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% SDS 存在下、熱処理による変性後トリプシンを加えて、37、20 時間消化した。目的のペプチドは Ni-カラムに結合すると考えられるので、消化画分を His-Trap FF カラムに掛け、イミダゾールで溶出して精製した。

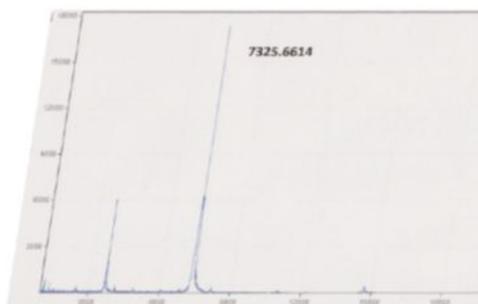


図 5 . 精製ペプチドの質量分析  
Molecular Mass 7326 のピークが検出された。

図 5 に示したように、得られた精製ペプチドの質量を測定したところ 7326 となり、目的の 53 個のアミノ酸から成るペプチドを含み、さらにその N 末端側の 11 個のアミノ酸残基を含む 64 アミノ酸から成るペプチド (Gly86-Lys149, HD64 と名付けた) であることが判明した。この結果は、本来トリプシンで切断されるはずの Arg96-Glu97 間のペプチド結合が今回の条件では切断されなかったことを示している。その原因は不明であるが、複数回の実験で再現性が認められたので、このペプチドを以下の実験に使用することにした。またこの結果より His-Asp 繰り返し配列を含む挿入配列が、金属結合活性を持っていることが明らかになった。

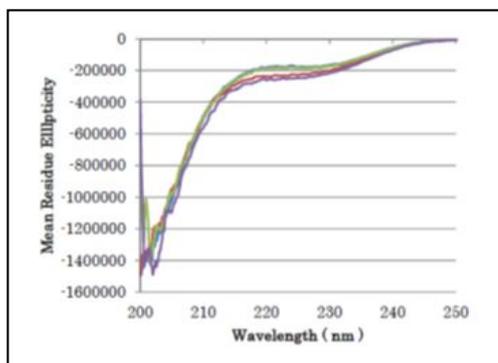


図 6 . HD64 の円偏光二色性測定  
青, 0.15 M NaCl; 赤, 0.15 M NaCl+重金属  
緑, 1.5 M NaCl; 紫, 1.5 M NaCl+重金属

HD64 は、64 個のアミノ酸から成るペプチドであることから、何らかの二次構造をとっているかどうかに興味を持たれたので、HD64 ペプチドの円偏光二色性測定を行った。この時、塩濃度の影響や重金属 (Zn) 共存の影響を調べるために、0.15 M もしくは 1.5 M NaCl の両条件とさらに重金属の添加・未添加の 4 条件で測定した。その結果、いずれの条件でも明解な二次構造は検出されなかった。これは、Ni に結合力がある His 残基を 6 個連続でもった人工配列である His-tag の二次構造と類似しており、HD64 ペプチドの Ni 結合活性も His タグと同様に His 残基の繰り返しが主な要因になっていると考えられる。

## (2) HP タンパク質および His-Asp 繰り返し配列を含むペプチドを用いた固定化カラムの作成と重金属の結合

HP タンパク質、HD50 領域、HD64 ペプチドが、Ni<sup>2+</sup>吸着力を持っていることが分かったので、これらを固定化したカラムの作成を検討した。固定化カラムとしては、N-hydroxysuccinimide (NHS) で活性化された Sepharose ゲルを充填したカラムを用いた。これは、1 ml ゲルあたり 10 μmole の NHS 反応基を含んでいる。精製した HD64 ペプチドサンプルを含むイミダゾール-リン酸緩衝液を脱塩カラム処理によってカップリング緩衝液 (0.2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl, pH8.3) に交換し、NHS カラムに充填し、定法によってカラムに固定した。カラムへの固定効率は約 60%であった。HD64 ペプチド固定化カラムに、NiSO<sub>4</sub> 溶液を添加し、よく洗浄後、pH2 の酸性緩衝液で結合した Ni<sup>2+</sup>イオンを溶出し、結合量を測定した。1 分子の HD64 ペプチドに平均 2.1 個の Ni<sup>2+</sup>イオンが結合していることが分かった。

同様に大腸菌を用いて大量発現させて精製した His-HP タンパク質を定法どおりの操作で NHS カラムに結合させた。結合効率は約 67%で、HD64 ペプチドよりも効率が高かった。この His-HP 固定化カラムに NiSO<sub>4</sub> 溶液を流し、良く洗浄後、pH2 の緩衝液で結合した Ni<sup>2+</sup>イオンを溶出し、結合量を定量した。平均値で、His-HP 1 分子あたり 9.5 個の Ni<sup>2+</sup>イオンが結合していることが判明した。モデル実験として、HDHDHDHDHDHDHSEHKK (HD20 ペプチド) という配列をもつペプチド鎖を化学合成し、これを NHS カラムに固定化することを試みた。確かに Ni<sup>2+</sup>をロードすると HD20 ペプチド固定化カラムに結合したが、カラムに固定化された HD20 ペプチド量の計算にばらつきがあり、残念ながら正確な結合量は算出できなかった。以上の実験から、Ni<sup>2+</sup>の結合量は、固定化ペプチド・タンパク質の鎖長が長くなる方が、安定的に効率よく結合するという傾向が見られた。

### (3) 好塩性菌および HP を高発現させた大腸菌菌体を用いた重金属の回収方法の開発

精製タンパク質やペプチドを用いる方法は、結合の特異性や高い結合効率が期待できる点など有利な点が多いが、タンパク質を調製する時間とコストが必要である。これに比べて、もし金属回収が可能な固定化菌体の調製が可能であるとすれば、培養して菌体を簡単な方法で固定するだけの工程で済み、技術的によりシンプルで安価な系として利用できる。好塩性菌はオープンな環境でも他の非好塩性菌の混入なく大量培養も簡単に実施できると考えられるので、これもコスト削減に資すると考えられる。好塩性菌菌体を固定化し、その重金属結合能力を評価した。また、HP を大量発現させた大腸菌菌体も固定化し、結合活性を評価した。

好塩性菌 *Chromohalobacter salexigens* を 2 M NaCl を含む NB 培地で培養後、集菌した。100 ml の培養液から湿重量約 0.61 g の菌体を得られた。集菌直後に 10 ml の 1% グルタルアルデヒドを加えて、攪拌、振とうして固定した。さらに、等量の 1% グルタルアルデヒドを加えて同様に固定化し、その後さらに 1 夜、4℃ でインキュベーションした。この固定化菌体溶液 2 ml を用いて、終濃度 0.87 mM の  $\text{NiSO}_4$  を加え、15 分静置後 14,000 rpm x 5 分間遠心し、上清を取って、この上清中の Ni イオン濃度を原子吸光計もしくはデジタルパックテスト水質検査計を用いて測定した。その結果、この上清は 9.9  $\mu\text{g/ml}$  の Ni イオンを含有し、固定化菌体に結合した Ni 量は、1 ml の固定化菌体溶液あたり 41.1  $\mu\text{g}$  であることが分かった。これは添加したうちの 82% の Ni が吸着されたことになり、高い吸着効率であった。培養液 1 リッター当りに換算すると Ni の結合量は 8.2 mg となる。

計算量の Ni が実際に固定化菌体に結合していることを確認するために、Ni を結合した菌体を、2 mM HCl で洗浄し、回収された Ni 量を定量したところ、結合計算値の ~90% が回収され、回収工程が定量的に進行していることが証明できた。

ちなみに、コントロールとして大腸菌 B 株を用いて同様の実験を行ったところ、1 ml の大腸菌固定化菌体溶液あたり 7.5  $\mu\text{g}$  の Ni が結合し、好塩性菌は、約 5.5 倍の Ni を結合できることが判明した。この結果は当初予想した通りの結果であり、マイナス荷電で覆われているであろう好塩性菌の菌体が高い重金属結合活性を持っていることが明らかになった。

次に、HP タンパク質を大量発現させた大腸菌菌体を用いて、同様の実験を行った。この実験では、HP タンパク質をできるだけ大量に発現させるため、pET15b-HP プラスミドを用いて、His-HP タンパク質を発現させた。N 末端に付加した His タグは、菌体内発現量を増

大させるだけでなく、His タグ自身も Ni イオンを結合するので、総結合量が増加し、より高い回収率が望めるはずである。

上記と同様の実験を行い His-HP タンパク質を大量発現した大腸菌固定化菌体に結合する Ni 量を測定したところ、1 ml の固定化菌体溶液あたり 48  $\mu\text{g/ml}$  となり、好塩性菌菌体よりさらに高い結合活性を示した。1 リッター培養当たりでは、9.6 mg の Ni を結合することになる。

走査電子顕微鏡を用いて、この His-HP タンパク質を大量発現した固定化菌体を調べたところ、図 7 に示したような像を観察することが出来た。それぞれ、菌体が小さな塊を形成している部分と、大きな塊を形成している部分が観察できた。

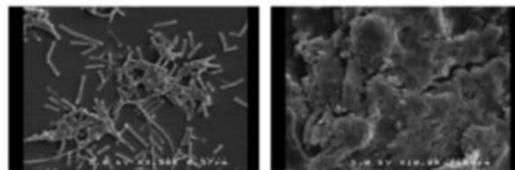


図 7 . 固定化菌体の走査電子顕微鏡画像

最後に平衡透析法を用いて、HP タンパク質、HD64 ペプチド、固定化菌体の Ni に対する結合定数を求めることを試みた。HP タンパク質の場合、最大結合量の 1/2 量の Ni を結合する Ni 濃度は、0.03 mM であり、他の重金属もほぼ同レベルであった。固定化菌体、HD64 に関しては、サンプル量や方法論の問題で正確な値を測定できず、今後の課題である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Halophilic metal binding protein and its His-Asp repeating peptides as fusion partners for high solubility and affinity-purification of fusion proteins. Yamaguchi R., Otsuji D., Tokunaga H., Ishibashi M., Arakawa T., and Tokunaga M. Bull. Soc. Sea. Water Sci., Jpn., 2016, 70, 51-52. (査読有)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ace1.agri.kagoshima-u.ac.jp/agri0029/information/2014/03/oubi-home.html>

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

徳永 正雄 (TOKUNAGA Masao)

鹿児島大学・農学部・プロジェクト研究員

研究者番号 : 20112782