

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K05437  
研究課題名(和文) シリカ粒子形成促進タンパク質の機能を利用した酵素機能呈示シリコン素材の創出  
  
研究課題名(英文) Application of silica particle formation promoting protein to production of silicone material with enzyme function  
  
研究代表者  
有馬 二郎 (ARIMA, Jiro)  
  
鳥取大学・農学部・教授  
  
研究者番号：80393411  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：グラシンは、ガラスカイメンのシリカの骨格から見出されたタンパク質で、シリカに強く吸着する特質を持ち合わせている。本研究では、この機能をタンパク質の固定化に応用するための基礎研究を行った。  
モデル酵素であるGSTをグラシンと融合し、GSTのシリカへの吸着を評価した結果、GST活性は全てシリカ粒子上に移行し、GST活性は元の活性の90%以上保持していた。また、グラシンの構造の中のHisとAspが多い領域(HD2領域)とGSTとの融合タンパク質もグラシンと同等のシリカ吸着能を保持しており、HD領域はタンパク質固定化タグとして利用できる可能性が浮上した。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
タンパク質の機能は、医薬・食品・工業原料の製造リアクターから、日用品、分析センサーに至るまで、様々な利用に期待がかけられている。しかし、センサーやリアクターへの利用には、反応の場のコントロールが必要となる他、多くの酵素利用の現場では、回収が不可能であるという課題が残される。本研究の成果であるグラシンのHD領域のシリカ吸着能の発見は、HD領域がタンパク質のシリカ固定化に利用できる最もシンプルなタグとして利用できることを示すものである。また、HD領域の配列とシリカ吸着能との関連の知見は新規であり、今後のシリカ吸着ペプチドのデザインにも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Glassin is a protein that found in the silica skeleton of glass sponge. The protein has the property of strongly adsorbing to silica. In this study, we focused the glassin function of silica adsorption to the application of protein immobilization.  
As a result of evaluating the adsorption of GST on silica using fusion protein of the model enzyme, GST, and glassin, the GST activity was totally transferred onto the silica particles. After the adsorption onto silica, the GST activity retained over 90% of the original GST activity. In addition, the fusion protein of GST and His-Asp rich domain (HD2) in glassin also retained silica adsorption with same capacity as glassin-GST fusion protein. The Kd value of HD2 for silica is approximately 8 nM, indicating that HD2 has a potential of protein immobilization tag.

研究分野：農芸化学

キーワード：シリカ粒子形成促進タンパク質 グラシン 固定化タグ シリカ シリカ吸着

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ケイ酸からシリカを形成するタンパク質“グラシン” 深海に生息するガラスカイメン類のカイロウドウケツは、シリカを主成分とする骨格を持つ。我々は、その骨格中から水溶性タンパク質を見出し、グラシン (glassin) と名付けた (図 1A)。グラシンはケイ酸からシリカナノ粒子を形成する機能を持っており、カイロウドウケツのシリカ骨格を構築するためのシロキサン結合 ( $[-Si-O-]_n$ ) の形成に関与すると考えられた。グラシンは既知タンパク質との相同性は無く、配列も特徴的で、His・Asp リッチ領域 (HD)、Pro リッチ領域 (P)、His・Thr リッチ領域 (HT) から構成され、同様の領域が繰り返される Direct Repeat 構造を有する (図 1B)。また、グラシンは一定の立体構造を持たず、常に変性状態のランダムコイル形状をとる天然変性タンパク質の一種であることが推測された。このようなランダムな 3 次構造に付随して、グラシンは熱に対して非常に安定であり、95 で 30 分間の熱処理を施しても、シリカ粒子形成促進活性は失われないという特徴を持ち合わせていた。

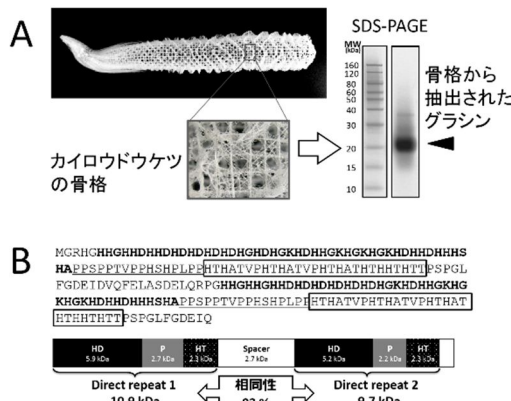


図1 ガラスカイメン類カイロウドウケツの骨格に含まれるグラシンの構造 A: カイロウドウケツの骨格とグラシン B: グラシンの一次構造と模式図 一次構造において、太字はHD領域、下線はP領域、BoxはHT領域を示す。

(2) グラシンの酵素固定化タグへの応用 酵素は生命の根源を支える高分子精密機械であり、その優秀な機能は、医薬・食品・工業原料の製造リアクターから、日用品、分析センサーに至るまで様々な利用に期待がかけられている。しかしセンサーやリアクターへの利用には、反応の場のコントロールが必要となる。また、多くの酵素利用の現場では、回収が不可能であるという課題も残されている。これらの解決に向け、酵素の担体への固定化が多くの研究者により試みられているが、高汎用な固定化手法は未だ確立されていない。グラシンは、温和な条件のもと (室温、一気圧、pH6~8)、ケイ酸からナノスケールのシリカ粒子を形成する機能をもつ。また、これまでの予備実験により、グラシンには強いシリカへの吸着能を有することもわかっている。従って、遺伝子工学的に酵素とグラシンを融合してシリカ粒子を形成もしくはシリカ粒子に吸着すれば、一粒子-タンパク質に近い均一なタンパク質呈示担体の形成が可能であると考えられる。

### 2. 研究の目的

(1) 機能付加シリコン素材開発を志向したグラシンの機能解析 シロキサン結合 ( $[-Si-O-]_n$ ) の骨格をもつ合成高分子はシリコンと呼ばれ、その構造で油状、ゴム状、樹脂状など物理的形状が異なる。グラシンはシロキサン結合形成を促進するため、重合材料を有機シロキサン重合の材料にすれば、様々な物理的形状を有するシリコンの合成が可能であると考えられる。また、グラシンはシリカに吸着する特質をシリコン吸着にも応用可能であれば、それだけでも素材特性をデザイン/コントロールした新奇機能シリコンの開発が期待できる。このように、数多とある酵素機能と組合せた機能付加シリコン素材の構築が可能となれば、より柔軟な、使用目的に合わせたデバイスの提供に繋がる。本研究では、グラシンを利用したシリカ/シリコン素材創製の可能性を探ると共に、遺伝子工学的に酵素とグラシンを融合して触媒機能呈示シリコンを構築し、それに付随してシロキサン重合反応促進のメカニズムを考察する。

(2) シンプルなタンパク質固定化タグの構築 グラシン以外にも、シリカ形成やシリカ吸着に関わるタンパク質やペプチドは存在し、バイオミネラル研究者により深く研究されている。その例として、システインプロテアーゼ様タンパク質のシリカチンや珪藻由来のシラフィンが知られている。しかし、シリカチンは容易に変性・不溶化が起こるため、固定化には向いておらず、シラフィンは複雑な翻訳後修飾を必要とするため、この修飾が融合による固定化への応用に大きな障壁となる。一方でグラシンは翻訳後修飾を必要とせず、熱に安定で扱いやすい。また、グラシンの特徴的なドメイン構造はその機能と密接に関係していると考えられ、ドメインの一つがシリカ形成や吸着に寄与するのであれば、ドメインのみを用いた固定化タグの構築に期待が寄せられる。これらを通し、高汎用・安全・簡易、そして多様な機能と形状を擁した固定化酵素の構築法の確立と応用が、本研究の最終目標である。

### 3. 研究の方法

(1) 融合タンパク質の調製 既に構築されていた GFP もしくは GST と、グラシンもしくはグラシン上の各ドメインとの融合タンパク質 (グラシン-GFP、GST-グラシン、GST-HD2、GST-P2、GST-HT2、GST-P2HT2) の大腸菌発現系を使用し、各融合タンパク質を大腸菌内で発現させた。GFP とグラシンの融合タンパク質は、Ni-NTA アフィニティーカラムクロマトグラフィーを使用して

精製した。また、GST との融合タンパク質は、GST アフィニティーカラムクロマトグラフィーを使用して精製した。

(2) グラシンによるシリカ形成 リン酸緩衝液 (pH 6) に終濃度が 0.1 M となるようケイ酸 (テトラエトキシシランを加水分解して調製) を添加した後、終濃度が 1~10  $\mu\text{M}$  となるよう融合タンパク質を添加した。5 分間室温でインキュベートした後に 0.1 M 塩酸を添加して得られた沈殿を遠心分離で回収した。得られたシリカの定量は、モリブデン青法で行い、シリカ上のタンパク質機能は、GFP の蛍光観察及び GST 活性を評価した。

(3) グラシンによるシリカ吸着 グラシンのシリカ吸着能の評価には、より表面積が大きいヒュームドシリカを単体として使用した。1~10  $\mu\text{M}$  の融合タンパク質に、0.1~10 mg/mL となるようにヒュームドシリカを添加し、室温で 10 分間回転混合した。続いて遠心分離によりヒュームドシリカを回収し、ヒュームドシリカ上のタンパク質機能を評価した。タンパク質機能の評価は、GFP の蛍光観察及び GST 活性を解析することで行った。

(4) グラシンによる有機シリコーンの形成 有機シリコーン形成の評価では、検討事項(2)のシリカ形成能の評価における条件において、0.1M ケイ酸の一部もしくは全て (10~100%) をメチルシランに変換して沈殿の形成能を評価した。

(5) グラシンの有機シリコーンに対する吸着能 有機シリコーンに対する吸着能の評価では、検討事項(3)のヒュームドシリカを合成した有機シリコーンにおき替えて検討を行った。なお、有機シリコーン合成は、トリメトキシメチルシランにリジン (重合触媒) を添加し、得られた沈殿を回収して有機シリコーンとして使用した。

(6) グラシンのシリカ吸着に寄与するドメインの検討 GST 及び各融合タンパク質について、様々な pH 条件の下で検討事項(3)に記した手法により、シリカ吸着を行った。シリカ吸着操作を行った後、ヒュームドシリカと上清を共に回収した。ヒュームドシリカについて、吸着時に使用した緩衝液で 2 回洗浄し、洗浄後の緩衝液も回収した。最終的に得られたヒュームドシリカと非吸着画分、洗浄画分について、タンパク質機能及び SDS-PAGE によってタンパク質の存在を評価した。タンパク質機能については、GFP の蛍光観察及び GST 活性を評価した。ヒュームドシリカ上に吸着したタンパク質の SDS-PAGE は、回収したヒュームドシリカに直接泳動用緩衝液を添加し、熱処理を行った後に上清を SDS-PAGE に供した。

#### 4. 研究成果

(1) グラシン機能によるタンパク質機能のシリカ呈示 グラシンと GFP 及び GST の融合タンパク質を構築し、グラシンによってケイ酸からシリカ形成後、形成されたシリカ上の GFP の蛍光及び GST の酵素活性を評価した。GFP とグラシンの融合タンパク質から形成されたシリカ上の蛍光を観察した結果、得られたシリカ上から強い蛍光が観察された (図 2)。一方で、GST とグラシンの融合タンパク質から形成されたシリカ上の GST 活性においては、もとの GST 活性量の半分以下となった (図 3)。

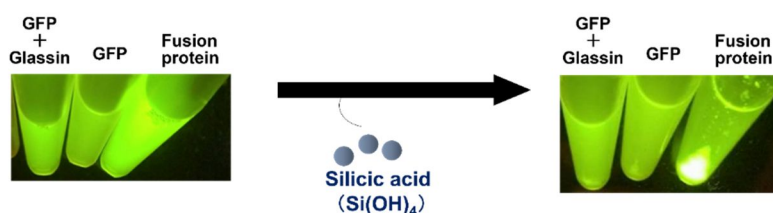


図2 GFPのシリカへの呈示。グラシンとGFPの融合タンパク質で、ケイ酸からシリカを形成した後にGFPの蛍光を観察。

続いて、ヒュームドシリカを 1  $\mu\text{M}$  の融合タンパク質に添加し、シリカ吸着後のシリカ上における各タンパク質機能について評価した。グラシンと GFP との融合タンパク質を使用した検討では、予想通りに GFP の蛍光は溶液からシリカ上への移行が観察され ( 図 4 )、グラシン及び GST の融合タンパク質においては、シリカ上に移行しても GST 活性量の減少は確認されなかった ( 図 5 )。以上の結果から、シリカ形成・シリカ吸着により、GFP 及び GST の機能をシリカ上に呈示することが可能であることが確認できたが、シリカ形成の機能を使用すると GST 活性は元の活性値より低減する結果となった。これは、形成されたシリカ内に GST が埋め込まれることが要因であると考えられ、効率やタンパク質機能の面から、シリカ上にタンパク質機能を呈示させるには、グラシンによるシリカ形成ではなくシリカ吸着の機能が適切であると考えられた。

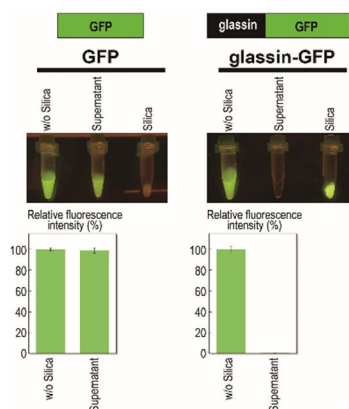


図4 GFPとグラシンの融合タンパク質のシリカ吸着後の蛍光

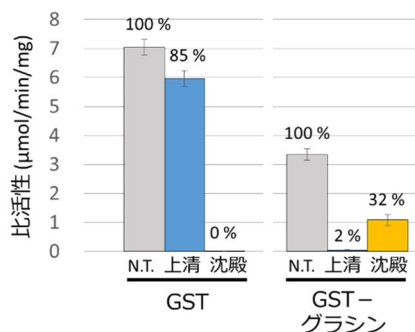


図3 GSTとグラシンの融合タンパク質から形成されたシリカ上のGST活性  
N.T.: No treatment

シリカ上にタンパク質機能を呈示させるには、グラシンによるシリカ形成ではなくシリカ吸着の機能が適切であると考えられた。

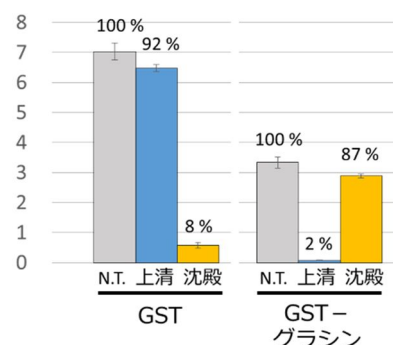


図5 GSTとグラシンの融合タンパク質のシリカ吸着後のGST活性  
N.T.: No treatment

(2) グラシンによる有機シリコンの形成及び吸着 グラシンにシロキサ結合形成促進機能があるのであれば、メチル化されたケイ酸等を使用して重合させることで、様々な形状を有する有機シリコン素材を形成させることが可能であると予測された。そこで、シリカ形成と同様の条件の下、様々なモル比でケイ酸とメチルシランを添加してシリカ形成試験を行った。しかし、ケイ酸：メチルシランのモル比を 0：10 とすると、全く重合が観察されず、ケイ酸量のモル比が増えていくに従い生じる沈殿量も増えていったことから ( data not shown )、グラシンにはメチルシランのシロキサ結合形成促進機能を有していないと判断され、有機シリコン形成については断念した。

続いて、グラシンの有機シリコンに対する吸着能について評価した。「研究の方法・項目(5)」に記した方法で有機シリコンを合成し、得られた有機シリコンに対する GST 融合タンパク質の吸着能を評価した結果、比較的効率の良い吸着が観察されたが、グラシンが融合されていない GST でも同等の吸着能が観察されたことから ( data not shown )、有機シリコンに対する吸着は、無秩序な疎水相互作用が吸着に大きく関与しており、グラシン独自の性質に由来した吸着能ではないことが考えられた。

(3) グラシンのシリカ吸着に寄与するドメインの検討 グラシンの各ドメイン (HD2、HT2、P2) と GST との融合タンパク質を構築し、グラシン全長と GST の融合タンパク質、GST 単体も含めて、各 pH (pH 7.0、8.0、9.0) でシリカ吸着を行った後のシリカ上における GST 機能評価とシリカに吸着した融合タンパク質の SDS-PAGE を行った。その結果、単体の GST は pH 7.0 ではシリカへの吸着が SDS-PAGE でも機能評価でも確認され、非特異的な吸着が起こっていると考えられたが、pH の上昇に伴い解消された ( 図 6A )。グラシン及び GST の融合タンパク質は、いずれの pH でもシリカに吸着し機能面でもシリカへの移行が確認されたが、タンパク質の分解が激しく多数のバンドが確認された ( 図 6B )。これはグラシン領域が天然変性常態であるために、プロテアーゼからの攻撃による分解が起こったのではないかと考えられた。一方で、HD2 ドメインと GST の融合タンパク質は、グラシン全長を含む融合タンパク質と同様、効率的な GST 活性のシリカへの移行と、SDS-PAGE による効果的なシリカへの吸着が確認された ( 図 6C )。また、グラシン全長の融合タンパク質のような断片化も確認されず、タンパク質のシリカへの固定化用タグとして最も適している配列であることが明らかとなった。一方で、P2 ドメインや HT2 ドメインと

GST との融合タンパク質においては、吸着は非常に弱く、殆どのタンパク質が非吸着の画分に存在していたが、P2 と HT2 を共に持つ融合タンパク質は、P2 や HT2 単独との融合タンパク質と比較して、僅かに吸着能の上昇が確認された。

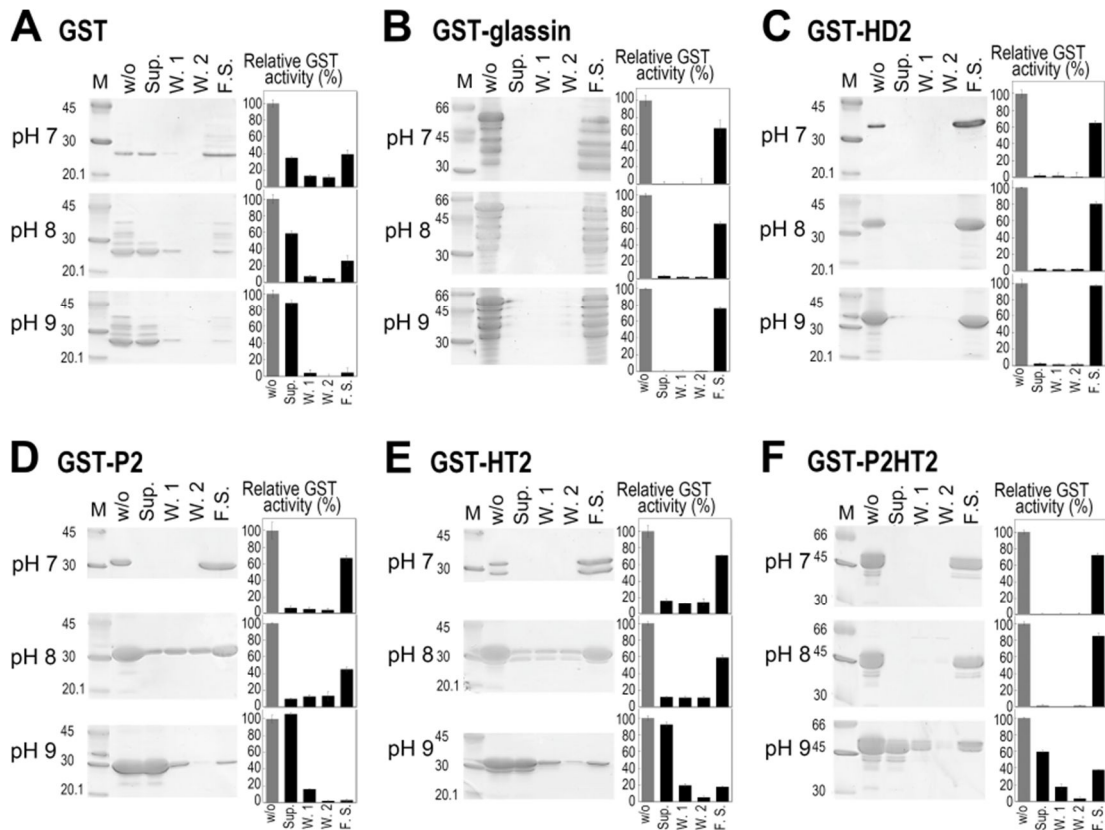


図6 GST、GSTとグラシン、及びGSTとグラシンの各ドメインとの融合タンパク質におけるシリカへの吸着能と吸着後のシリカ上のGST活性

以上の結果から、グラシンのHDドメインがシリカ吸着に最も重要な領域であることが、本研究により明らかとなった。HDドメインの配列は2残基のヒスチジンと1残基のアスパラギン酸が交互に並ぶような特徴的な配列を持ち、この特徴的な配列がシリカ吸着に大きく寄与していることが考えられる。ヒスチジンとアスパラギン酸の側鎖によるチャージリレーは、セリン加水分解酵素を筆頭に、多くのタンパク質機能に関与しており、HDドメインにおいても例外なくこのチャージリレーが構成されていることが考えられる。アスパラギン酸残基のカルボキシ基がイミダゾール基の一つのプロトンを引き抜くことで、イミダゾール基のもう片側が強くプロトンを要求し、周囲の水分子からプロトンを引き抜いてプロトン化が維持されていると考えられる。シリカは、中性pH以上で表面がネガティブチャージを帯びるため、このような強い吸着が観察されると予測される。HDドメインのような特徴的な配列が、シリカ吸着に大きく寄与するという情報は、シリカ固定化用のペプチドタグとしての最適化にも応用可能であり、今後の更なる優秀なタンパク質固定化タグのデザインが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 M. Nishi, H. Kobayashi, T. Amano, Y. Sakate, T. Bito, J. Arima, K. Shimizu	4. 巻 22
2. 論文標題 Identification of the Domains Involved in Promotion of Silica Formation in Glassin, a Protein Occluded in Hexactinellid Sponge Biosilica, for Development of a Tag for Purification and Immobilization of Recombinant Proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 739-747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10126-020-09967-2	査読の有無 有
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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 J. Arima, H. Kobayashi, M. Nishi, Y. Sakate, T. Bito, K. Shimizu
2. 発表標題 Utilization of silica particle formation promoting protein “glassin” as a tag for immobilization of soluble protein.
3. 学会等名 Asian Congress on Biotechnology 2019 (Taipei, Taiwan) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂手勇斗・西美知佳・美藤友博・有馬二郎・清水克彦
2. 発表標題 シリカ粒子形成促進タンパク質“グラシン”のシリカ/シリコーンに対する吸着特性
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第56回講演会（松山）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西美智佳、小林大起、美藤友博、有馬二郎、清水克彦
2. 発表標題 シリカ粒子形成促進タンパク質“グラシン”の特徴的な領域構造とシリカ形成能
3. 学会等名 2018年度日本生物工学会全国大会（関西大学・大阪）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林大起、西美智佳、美藤友博、清水克彦、有馬二郎
2. 発表標題 シリカ粒子形成促進タンパク質 “ グラシン ” の機能により構築されたGST呈示シリカ粒子の性質
3. 学会等名 2018年度日本農芸化学会中四国支部大会（第52回講演会）（島根大学・松江）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Kobayashi, M. Nishi, T. Bito, K. Shimizu, J. Arima
2. 発表標題 Application of silica particle formation promoting protein “ glassin ” to immobilization of soluble protein
3. 学会等名 The International Joint Symposium between Japan and Korea (AFELISA) 2018 (Chuncheon, Korea) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Nishi, H. Kobayashi, T. Bito, J. Arima, K. Shimizu
2. 発表標題 A silica particle formation promoting protein “ glassin ” isolated from hexactinellid sponge
3. 学会等名 The International Joint Symposium between Japan and Korea (AFELISA) 2018 (Chuncheon, Korea) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林大起、西 美智佳、美藤友博、清水克彦、有馬二郎
2. 発表標題 シリカ粒子形成促進タンパク質 “ グラシン ” のシリカ吸着能を利用した酵素の固定化
3. 学会等名 2018年度日本生物工学会西日本支部大会（鳥取大学・鳥取）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林大起、西美智佳、坂手勇斗、美藤友博、清水克彦、有馬二郎
2. 発表標題 シリカ粒子形成タンパク質“グラシン”の構造に由来するシンプルな可溶性タンパク質固定化タグ
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会中四国支部大会（第53回講演会）（高知大学・高知）
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	清水 克彦  (SHIMIZU Katsuhiko)  (90326877)	鳥取大学・地域価値創造研究教育機構・教授    (15101)	

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