

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K11691  
研究課題名(和文) 酵素内包タンパク質ナノカプセルを利用した大気汚染物質硫化カルボニル除去法の開発  
  
研究課題名(英文) Development of removal method of carbonyl sulfide using an enzyme-encapsulated protein nanocapsule  
  
研究代表者  
小川 信明 (Ogawa, Nobuaki)  
  
秋田大学・名誉教授・名誉教授  
  
研究者番号：80169193  
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)：硫化カルボニル加水分解酵素(COSase)は、大気汚染物質として危惧されている硫化カルボニル(COS)を硫化水素(H<sub>2</sub>S)とCO<sub>2</sub>に加水分解する反応を触媒する。気体を基質とするため反応効率が良くないCOSaseの酵素反応の改善を目的として、好熱菌*Thermotoga maritima*由来エンカプスリン(Tmエンカプスリン)の中空のナノカプセル状構造体を利用した酵素反応系の構築を行った。Tmエンカプスリンの内包化ペプチド配列を外来タンパク質に付加することで、Tmエンカプスリンへの内包に成功した。また、Tmエンカプスリンに内包化した酵素の触媒活性が維持できることを明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

エンカプスリンは内包したタンパク質をプロテアーゼ等の分解酵素から保護できることから、マイクロリアクターの反応場として応用が期待されている。本研究により、外来タンパク質のTmエンカプスリンへの内包が可能であることが示唆された。また、Tmエンカプスリンのナノカプセル状構造体内において、外来タンパク質の活性は維持されることが明らかになった。本成果は、COSaseによる効率的なCOS分解反応を可能とするために、反応場としてTmエンカプスリンのナノカプセル状構造体を利用する手法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Carbonyl sulfide hydrolases (COSase) catalyze the degradation of carbonyl sulfide (COS), a hazardous air pollutant, to hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and CO<sub>2</sub>. The catalytic efficiency of enzymes toward gaseous substrates such as COSase is usually considered to be significantly low. In this study, to develop the catalytic efficiency of COSase, we employed encapsulin, a protein cage nanoparticle isolated from thermophile *Thermotoga maritima*. We showed encapsulation of heterogeneous guest proteins into the encapsulin nanoparticle by fusing the C-terminal signal peptide sequence and the encapsulated guest proteins maintained their catalytic activities. Encapsulin has the potential to encapsulate COSase in its internal cavity, making it a feasible microreactor for biodegradation of COS.

研究分野：分析化学

キーワード：タンパク質ナノカプセル エンカプスリン フェリチン様プロテイン 硫化カルボニル加水分解酵素

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

硫化カルボニル (COS) は、大気中に最も多量に存在しているガス状硫黄化合物である。他の気体状硫黄化合物は大気中では比較的短い期間で酸化され、雨水等に溶解することで大気から除去される。COS は、他のガス状硫黄化合物と比較すると、化学的に安定であり長期間大気圏に留まるため、対流圏で酸化されて酸性雨の一因となるだけでなく、成層圏に移行して硫酸エアロゾル形成の前駆物質になると考えられている。COS はオゾン層破壊の原因物質の一つに数えられ、CO<sub>2</sub> の 1000 倍以上の温室効果を示す温暖化ガスである。また、COS は気候変動に関わる大気微量ガスであると共に、2000-3000 ppm といった濃度では大型動物にとって致死作用を示す有毒な化合物である。大気へ放出される COS の 1/3 は化石燃料の燃焼や生物系廃棄物の微生物処理など人為的プロセスを起源とすると見積られ、20 世紀以降、人類の活動とともに大気中の COS 濃度は増大し続けている。そのため、発生源において効率的に COS を分解除去し、大気移行を抑制する方法の開発は危急の課題となっている。従来、工業的には酸化チタンやアルミナ等の無機触媒が利用されているが、反応性、コスト、環境負荷等の問題から十分な方法ではない。環境中の COS 除去や今後の産業利用を考えると、環境負荷の少ない酵素によるバイオレメディエーションが理想的である。申請者らはこれまでに、硫黄酸化細菌 *Thiobacillus thioparus* strain THI115 から硫化カルボニル加水分解酵素 (COSase) の単離精製に初めて成功し、生化学的特性ならびに結晶構造を明らかにしている [T. Ogawa *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 3818 (2013)]. COSase は COS を H<sub>2</sub>S と CO<sub>2</sub> に分解する反応を触媒し、大気濃度 (500 pptv) 以下の希薄な COS も分解可能なことから、COS 除去技術への応用が期待されている。しかしながら、大気中の希薄な濃度の COS を水溶液中の酵素で迅速に分解する気液酵素反応は容易ではなく、既知の酵素の中で最も COS 分解活性をもつ COSase においても、大気中の濃度における COS 分解活性は 69  $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  に過ぎない。そのため、酵素を利用した COS 分解技術の開発は未だ行われていなかった。

### 2. 研究の目的

気液酵素反応を効率化させる方法の一つとして、酵素溶液を微小な液滴とし、気体と接する表面積を増大させることが考えられる。しかし、単に酵素溶液を液滴として噴霧するだけでは、急速に水が乾燥してしまい、酵素の立体構造が不安定化し酵素活性が失われるという問題が生じる。近年、申請者らはバイオナノ材料として、ナノカプセル構造体を形成するタンパク質であるエンカプスリンに着目して研究を進めている。エンカプスリンは、分子量約 30 kDa のサブユニットのホモ 60 量体から成る粒径約 25 nm の正二十面体構造の中空ナノカプセル状タンパク質であり、真正細菌から古細菌までに広く存在している。エンカプスリンの生体内での役割は、C 末端に内包化ペプチド配列を有している酵素を内包することで、プロテアーゼ等の分解酵素から保護することと考えられているが、その詳細は不明である。申請者らはこれまでに、蛍光強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP) やルシフェラーゼなどの外来タンパク質の C 末端に内包化ペプチド配列を付加することで、放線菌 *Rhodococcus erythropolis* N771 由来エンカプスリンのナノカプセル構造体内に、機能を維持させたまま、外来タンパク質を包括できることを明らかにしている [A. Tamura, *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, **112**, 13 (2015)]. 本研究では、COSase をエンカプスリンのナノカプセル構造体内に内包させエアロゾル化することで、気体基質である COS の効率的な分解除去法を開発することを研究目的として、優れた安定性を示す好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来エンカプスリン (*Tm*エンカプスリン) への外来タンパク質の内包化方法の検討及び内包したタンパク質の活性評価を行った。

### 3. 研究の方法

単一精製した *Tm*エンカプスリン組換え体のナノカプセル状構造体の形成、熱安定性、プロテアーゼに対する耐性について、動的光散乱法、透過型電子顕微鏡、UV-vis 吸収スペクトル法を用いて確認した。エンカプスリンのナノカプセル状構造体は、酸性 pH 条件下でモノマーもしくはオリゴマーに解離させることができ、中性 pH に戻すことで再会合できると考えられる。*Tm*エンカプスリンを揮発性酸性溶液で解離させた後、凍結乾燥した。凍結乾燥した *Tm*エンカプスリンの粉末と外来タンパク質を中性緩衝液中で混合することで、*Tm*エンカプスリンのナノカプセル状構造体の再会合と共に、外来タンパク質の内包を行った。また、*R. erythropolis* N771 由来エンカプスリンで成功しているエンカプスリン内包化ペプチド配列を、外来タンパク質の C 末端に付加することによる内包化法を検討した。まず、大腸菌発現系で、*Tm*エンカプスリンへの内包が可能であるか確かめるために、*Tm*エンカプスリンと天然の内包タンパク質であるフェリチン様プロテインの共発現を行った。*T. maritima* 由来フェリチン様プロテイン遺伝子は、*T. maritima* のゲノム DNA からクローニングした。次に、内包化ペプチド配列付加による外来タンパク質の内包について検討した。天然において、*Tm*エンカプスリンに内包されるフェリチン様プロテイン遺伝子は、*Tm*エンカプスリン遺伝子のすぐ上流にコードされており、その C 末端 34 残基が *Tm*エンカプスリンへの内包に関与していると考えられている。そこで、34 残基の内包化ペプチド配列を遺伝子合成し EGFP の C 末端に付加した。大腸菌により、内包化ペプチド配列を付加した EGFP と *Tm*エンカプスリンの共発現を行った。

#### 4. 研究成果

大腸菌で発現させた *Tm* エンカプスリン組換え体を単一精製し、動的散乱測定と透過型電子顕微鏡観察により形状を確認したところ、粒径約 30 nm のカプセル状構造を形成していることが明らかになった。次に、*Tm* エンカプスリンの熱安定性について検討した。40~90 °C の各温度で 15 分間の熱処理を行い、遠心分離後、UV-vis 吸収スペクトル法を用いて、280 nm のタンパク質由来の吸収ピークを指標に、上清に残存するタンパク質量を測定した。その結果、90 °C の熱処理後においても、95%以上の *Tm* エンカプスリンが変性せずに上清に確認された。このことから、*Tm* エンカプスリンは高い熱安定性を有することが明らかになった。また、*Tm* エンカプスリンのプロテアーゼに対する耐性について検討した。*Tm* エンカプスリンをトリプシン溶液と混合して 37 °C で一晩反応させた後、15% SDS-PAGE により解析を行った。トリプシン無添加の条件とバンド位置を比較したところ、大きな変化は見られなかった (図 1)。このことから、*Tm* エンカプスリンは、プロテアーゼに対する高い耐性を有することが明らかになった。以上の結果より、*Tm* エンカプスリン組換え体はナノカプセル状構造体を形成し、優れた熱安定性とプロテアーゼに対する高い耐性を有していることから、産業利用に適していることが示唆された。

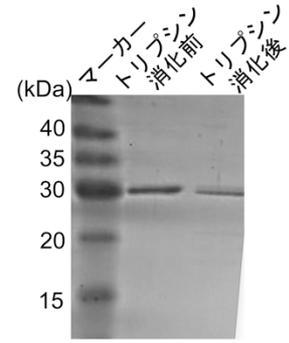


図 1. トリプシン消化前後の *Tm* エンカプスリンの SDS-PAGE.

外来タンパク質の *Tm* エンカプスリンへの内包を行うために、pH 変化によって *Tm* エンカプスリンのナノカプセル状構造体の解離と再会合が可能であるか検討した。*Tm* エンカプスリンを酢酸ナトリウム緩衝液 (100 mM, pH 3.0) で一晩透析した後、動的散乱測定と透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、ナノカプセル状構造体からモノマーもしくはオリゴマーへの解離が観測された。その後、解離させた *Tm* エンカプスリンをリン酸ナトリウム緩衝液 (100 mM, pH 7.0) で一晩透析したところ、ナノカプセル状構造体の形成が観測された (図 2(A) と (B))。この結果により、pH 変化によって、可逆的に *Tm* エンカプスリンのナノカプセル状構造体の解離と再会合をさせることが可能であることが示唆された。そこで、*Tm* エンカプスリンのナノカプセル状構造体を揮発性酸性溶液であるトリクロロ酢酸で解離させた後、凍結乾燥を行い、その凍結乾燥させた *Tm* エンカプスリンの粉末と外来タンパク質を中性緩衝液中で混合することで、*Tm* エンカプスリンのナノカプセル状構造体の再会合と同時に、外来タンパク質の内包を行った。しかしながら、外来タンパク質の *Tm* エンカプスリンへの内包は観測されず、またナノカプセル状構造体の再会合効率も著しく低かった。これは、モノマーもしくはオリゴマーまで解離した *Tm* エンカプスリンの安定性が低く、凍結乾燥中に凝集、変性が起こったためであると考えられる。

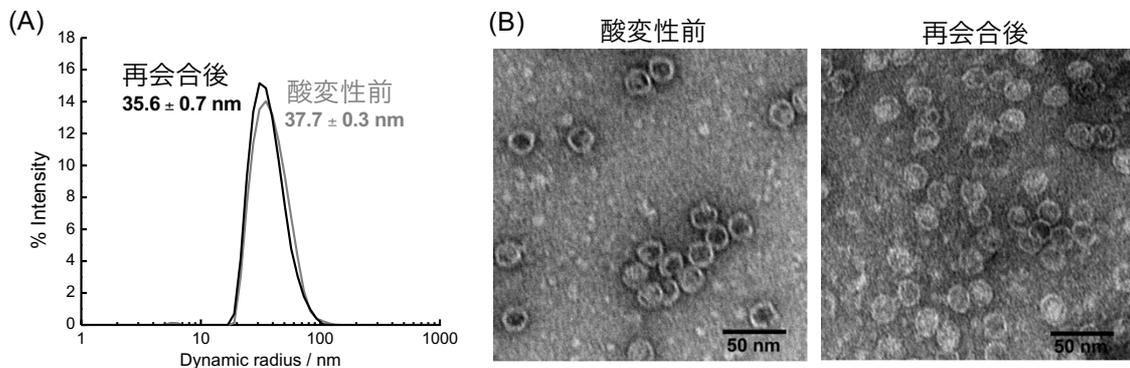


図 2. (A) 動的散乱法による *Tm* エンカプスリンの粒子径測定、(B) ネガティブ染色による *Tm* エンカプスリンの透過型電子顕微鏡画像。酸変性前、再会合後において、*Tm* エンカプスリンの粒子径ならびに形状に大きな変化はみられなかった。

別の内包化手法として、天然の *Tm* エンカプスリンに内包されるフェリチン様プロテインが有する C 末端のエンカプスリン内包化ペプチド配列を利用する方法を試みた。まず、異種宿主発現系による共発現で、*Tm* エンカプスリンへの内包が可能であるか確かめるために、フェリチン様プロテインのクローニングを行い、大腸菌発現ベクターを構築した。*Tm* エンカプスリンとフェリチン様プロテインを大腸菌で共発現させ、15% SDS-PAGE により発現確認を行ったところ、*Tm* エンカプスリンとフェリチン様プロテインの分子量に対応する約 30 kDa と 15 kDa に、それぞれバンドがみられた。フェリチン様プロテインを内包した *Tm* エンカプスリンを精製し、透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、*Tm* エンカプスリンの粒径約 30 nm のナノカプセル状構造体が確認された。また、ナノカプセル状構造体の内部は、ネガティブ染色で染まっていなかったこと

から、フェリチン様プロテインが内包されていることが示唆された。次に、基質に  $\text{Fe(II)SO}_4$  を用いて、*Tm* エンカプスリンに内包されたフェリチン様プロテインのフェロキシダーゼ活性を UV-vis 吸収スペクトル法により経時測定したところ、基質の添加により、 $\text{Fe(III)}$  由来の 315 nm の吸収の増大が観測された。このことから、*Tm* エンカプスリンへの内包による酵素活性への影響はないことが示された。

異種宿主発現系による共発現で、*Tm* エンカプスリンへの内包が可能であることが明らかになったので、外来タンパク質の内包について検討した。*Tm* エンカプスリン内包化ペプチド配列と予想されているフェリチン様プロテインの C 末端 34 残基を EGFP の C 末端に付加し、*Tm* エンカプスリンと共発現を行った。15% SDS-PAGE により発現確認を行ったところ、可溶性画分において、*Tm* エンカプスリンと EGFP の分子量に対応する約 30 kDa と 32 kDa の位置にバンドは確認されたものの、大部分は不溶性画分にみられた。*Tm* エンカプスリンと EGFP は、個々に大腸菌で発現させると可溶性画分に発現することから、C 末端 34 残基の内包化ペプチド配列が、EGFP と *Tm* エンカプスリンのフォールディングの妨げになっていることが考えられる。

本研究により、*Tm* エンカプスリンは、耐熱性とプロテアーゼに対する高い耐性を有しており、産業用利用に適していることが示された。また、大腸菌発現系による共発現で、外来タンパク質の *Tm* エンカプスリンへの内包が可能であり、内包された外来タンパク質の活性は維持されることが示された。今後、より安定かつ効率的な内包を行うために、*Tm* エンカプスリン内包化ペプチド配列と *Tm* エンカプスリンの相互作用部位を明らかにする必要があると考え、現在、フェリチン様プロテイン及びフェリチン様プロテインを内包した *Tm* エンカプスリンの結晶構造解析を進めている。安定な *Tm* エンカプスリンへの内包が達成された後、実際に COSase の *Tm* エンカプスリンへの内包を行い、COS 分解活性の評価を行いたいと考えている。

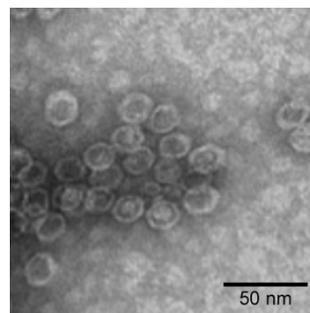


図 3. ネガティブ染色によるフェリチン様プロテイン内包 *Tm* エンカプスリンの透過型電子顕微鏡画像。 *Tm* エンカプスリンの粒子内部にみられる白色部分がフェリチン様プロテイン

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 1件）

1. 著者名 Matsuoka, A., Matsumura, H., Odaka, M., Ogawa, N., Tanno, T.	4. 巻 16
2. 論文標題 The Transitional Transmittance Response of ZIF-8 Gas Adsorption Observed Using Terahertz Waves	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 e-J. Surf. Sci. Nanotech.	6. 最初と最後の頁 142 - 144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1380/ejssnt.2018.142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹原直輝、松村洋寿、小川信明、尾高雅文
2. 発表標題 好熱菌 <i>Thermotoga maritima</i> 由来Encapsulinの機能解明に向けたフェリチン様タンパク質のキャラクタリゼーション
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野中 衛、松村洋寿、小川信明、尾高雅文
2. 発表標題 耐熱性Encapsulinナノカプセルの内包系の構築
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野中 衛、松村洋寿、尾高雅文
2. 発表標題 好熱菌 <i>Thermotoga maritima</i> 由来Encapsulinナノカプセルの新規内包系の構築
3. 学会等名 平成30年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹原直輝、野中 衛、松村洋寿、尾高雅文
2. 発表標題 短鎖抗体を導入したタンパク質ナノカプセルEncapsulinの発現系構築
3. 学会等名 平成30年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹原直輝、野中 衛、松村洋寿、大室有紀、上田 宏、小川信明、尾高雅文
2. 発表標題 短鎖抗体融合タンパク質ナノカプセル Encapsulin の発現系構築
3. 学会等名 酵素工学研究会第80回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野中 衛、松村洋寿、小川信明、尾高雅文
2. 発表標題 好熱菌Thermotoga maritima由来Encapsulinの色素化合物の同定
3. 学会等名 2018年度日本生物工学会北日本支部秋田シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹原直輝、野中 衛、大室有紀、松村洋寿、上田 宏、尾高雅文
2. 発表標題 短鎖抗体融合タンパク質ナノカプセル Encapsulin の発現系構築
3. 学会等名 2018年度日本生物工学会北日本支部秋田シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 文彦、竹原 直輝、松村 洋寿、小川 信明、尾高 雅文
2. 発表標題 Thermotoga maritima由来Encapsulinに結合したリボフラビンの除去と再構成
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 第二回オンラインセミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹原 直輝、松村 洋寿、小川 信明、尾高 雅文
2. 発表標題 Functional and structural characterization of encapsulin-associated ferritin-like protein from Thermotoga maritima
3. 学会等名 令和2年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 文彦、竹原 直輝、松村 洋寿、小川 信明、尾高 雅文
2. 発表標題 Deflavination and reconstitution of Encapsulin from Thermotoga maritima
3. 学会等名 令和2年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹原 直輝、松村 洋寿、小川 信明、尾高 雅文
2. 発表標題 好熱菌Thermotoga maritima 由来Encapsulinに内包されるフェリチン様タンパク質の発現系構築
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 文彦、竹原 直輝、松村 洋寿、小川 信明、尾高 雅文
2. 発表標題 好熱菌Thermotoga maritima由来Encapsulinに結合したリボフラビンの除去と再構成
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

秋田大学 大学院理工学研究科 生命科学専攻 生物分析化学・生物構造化学研究室 <a href="http://www.gipc.akita-u.ac.jp/~bioanal-str-chem/index.html">http://www.gipc.akita-u.ac.jp/~bioanal-str-chem/index.html</a>
---

#### 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	尾高 雅文  (ODAKA Masafumi)  (20224248)	秋田大学・理工学研究科・教授   (11401)	
研究分担者	松村 洋寿  (MATSUMURA Hirotoshi)  (60741824)	秋田大学・理工学研究科・講師   (11401)	

#### 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
---------	---------