

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12232

研究課題名（和文）標的金属をインプリントした選択的金属認識能を有するペプチド-シリカ吸着担体の創製

研究課題名（英文）Creation of peptide-silica adsorption carriers with selective metal recognition ability imprinted with target metal

研究代表者

後藤 猛（Gotoh, Takeshi）

秋田大学・本部・理事

研究者番号：10215494

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、標的とする金属をペプチドとシリカで分子インプリントした選択的金属吸着担体を生体機能の利用により開発することを目指した基礎検討である。ペプチドとして、珪藻由来のシリカ形成誘起ペプチド（R5）、金属配位能を有するヒスチジン6残基を組み合わせたR5H6を設計して、そのcDNAを有する組換え微生物を構築し、R5H6生産ならびにシリカ形成活性を調べた。さらに、シリカ結晶の成長を促進させるため、シリカ形成酵素シリカテインを発現する組換え大腸菌を構築し、リフォールディング操作によって大量生産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

本研究は生体機能および生体材料に着想を得てこれを模倣・利用し、ペプチドとシリカを融合させる全く新しい手法により選択的な分子インプリント担体のグリーン合成を目指す点に本研究の特色がある。特にシリカ粒子への分子インプリントは、環境にやさしい穏和な条件でシリカ結晶生成を誘起するペプチドやシリカ重合酵素を利用するものとして、従来法とは異なる独創的なものである。さらに、標的分子の吸脱着も中性pH領域で行われることから、環境にやさしい分離プロセスの構築も期待できる。本研究は、その基礎となるペプチドおよびシリカ重合酵素の遺伝子組換え微生物による大量合成の可能性を示したものである。

研究成果の概要（英文）：This study is a basic investigation aimed at developing selective metal adsorption carriers with molecular imprinting of targeted metals with peptides and silica through the use of biological functions. R5H6 was designed as a peptide to be used, which consists of a silica-forming peptide (R5) from diatom and six histidine residues with metal-coordination ability, and a recombinant microorganisms carrying the cDNA were constructed to examine R5H6 production and silica-forming activity. Furthermore, to promote the growth of silica crystals, we constructed a recombinant *E. coli* expressing the silica-forming enzyme silicatein and demonstrated that it can be mass-produced by refolding operation.

研究分野：生物化学工学

キーワード：分子インプリント バイオシリカ ペプチド 金属回収

1. 研究開始当初の背景

(1) 海棲生物であるイガイ (*Mytilus coruscus*) は足糸と呼ばれる器官によって岩礁などに強力に張り付き生育している。足糸の接着能はその構成要素の 1 つである接着性タンパク質によることが知られており、水中のガラス、プラスチック、テフロンなどの様々な物質の表面に対しても有効である。その化学的接着機構は未解明だが、近年、この接着性タンパク質に dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA) とリシンが豊富に含まれることが明らかになった。¹⁾

(2) 著者らは、Lys および DOPA と金属結合性アミノ酸であるヒスチジン (His) を組み合わせた人工ペプチドを合成し、これが高選択的な金属吸着担体の開発に利用できることを見出した (Fig. 1)。²⁾ これは、ペプチド中のヒスチジンのイミダゾール基が標的的金属イオンと配位結合し、そのペプチドの立体構造を維持したまま多孔性シリカ粒子細孔内キャビティに接着・固定化して金属イオンの鋳型を取るものであり、その後の金属イオンの脱離により得られた分子インプリント担体は標的的金属に対して高い選択性を示した。しかし、この方法では既製のシリカ細孔内キャビティに金属配位ペプチドを接着させるため、ペプチドの立体構造に十分適合しないキャビティに接着した場合、金属脱離後に分子インプリント空孔が歪んでしまう可能性もあり、これは吸着担体の吸着容量や選択性の低下に繋がる。これに対して、ペプチドの立体構造を保持したまま、その周りをシリカで固定化することができれば吸着容量および選択性がさらに向上する可能性がある。

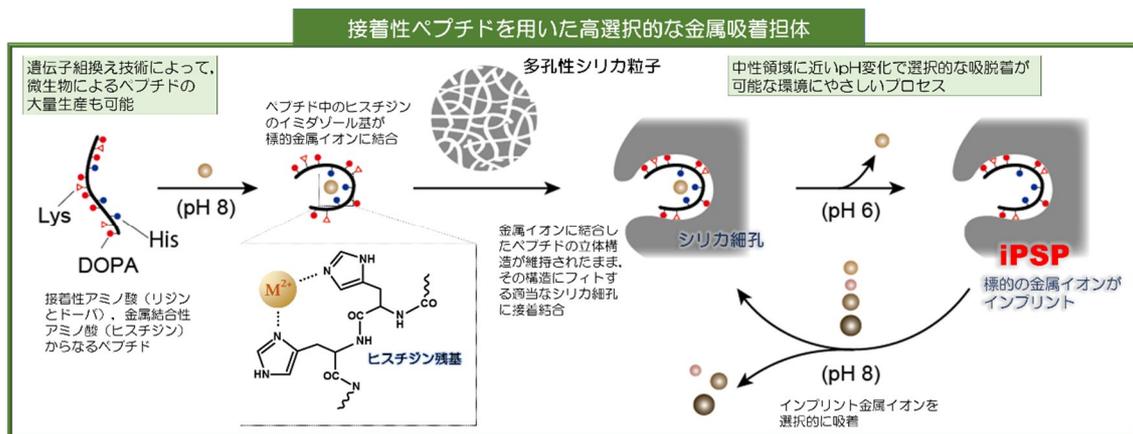


Fig. 1 ペプチドを用いた分子インプリント技術による高選択的金属吸着担体

3) 珪藻表面のバイオシリカの形成に関与する塩基性ポリペプチド、シラフィン弱酸性下でケイ酸からナノスケールでシリカ結晶を形成する。³⁾ また、シラフィンの塩基性アミノ酸から成る部分配列 (R5 ペプチド) は、中性条件下においてテトラエトキシシラン (TEOS) から室温で数分以内にシリカ結晶の形成を誘起することが報告されている。⁴⁾ 一方、海綿動物が有する酵素シリカチンは、生理的条件下でシリカ重合反応を触媒することが報告されている。⁵⁾

2. 研究の目的

本研究は生体機能を模倣・活用し、シリカ結晶生成を誘起する塩基性配列と金属配位結合性配列を併せ持つ人工ペプチドを介して標的的金属イオンを分子インプリントして選択的金属吸着担体を創製 (Fig. 2) するための基礎検討を行うことを目的とするものであり、次の到達目標を設定した。

- (1) R5 配列と His 配列を融合した人工ペプチドを設計し、その cDNA を有する遺伝子組換え微生物を構築する。
- (2) 遺伝子組換え大腸菌による人工ペプチドの発現挙動を調べ、その生産方法およびシリカ結晶生成活性を明らかにする。
- (3) 組換え大腸菌による結晶性シリカ生成酵素シリカチンの大量生産方法を検討する。

3. 研究の方法

(1) 組換え大腸菌によるシリカチンの生産

pColdProS2 ベクターを線状化した後、その両末端と相同な配列を付加したインサート DNA (シリカチン a の cDNA) を In-Fusion 法により連結して発現ベクターを構築した。これを用いて大腸菌 BL21(DE3) を形質転換し、アンピシリン含有 LB 培地を用い 37°C で培養した後、培養温度を 15°C とし、IPTG により ProS2 タグ付加シリカチンの発現誘導を行った。菌体を超音波破碎して得られた不溶性画分を十分洗浄し、6 M 尿素で変性・可溶化した。その後、リフォー

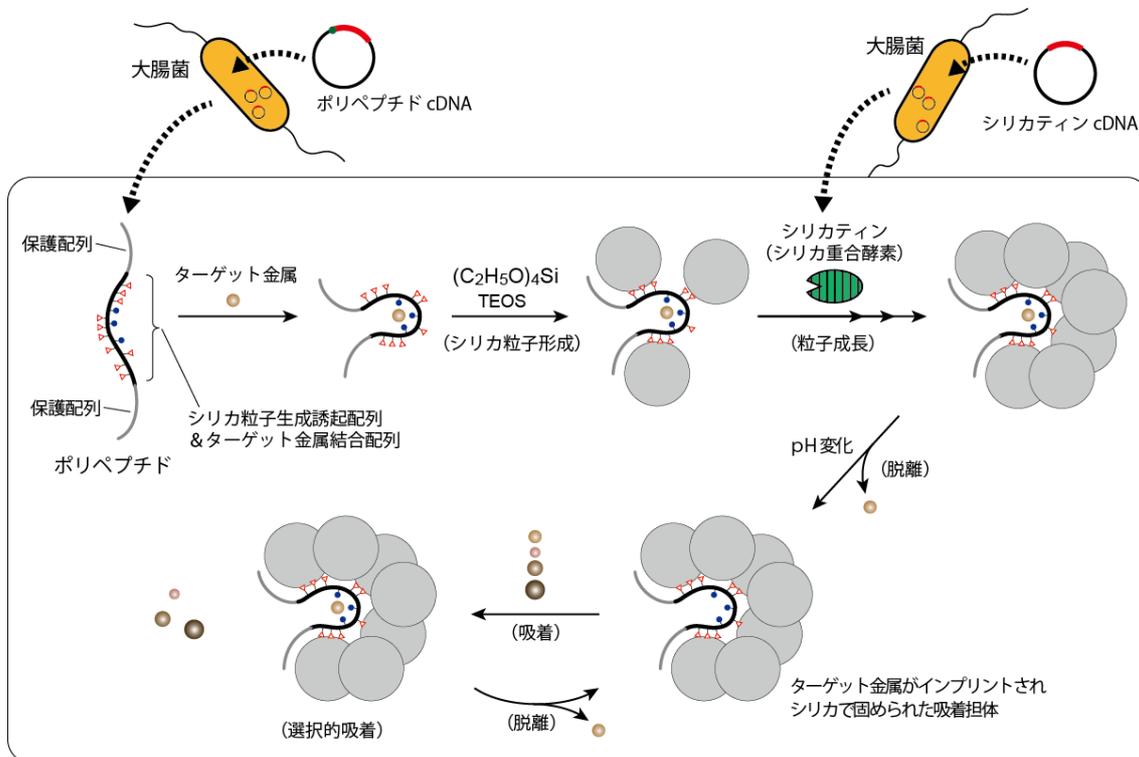


Fig. 2 分子インプリント法によるポリペプチド - シリカから成る選択的金属吸着体のグリーン生成スキーム

ルディングバッファー(50 mM Tris/HCl ,0.5 M L-arginine ,9 mM red/glutathione ,1 mM ox/glutathione , 0.3 M NaCl , 1 mM KCl) で透析し , 得られた可溶性画分と不溶性画分は SDS-PAGE により分析した。

(2) シリカテインによるシリカ結晶形成

可溶性シリカテインの溶液 1 mL に 50 mM TEOS/10 mM HCl 溶液 40 μ L を加え , pH 7 で 24 h インキュベートした。遠心分離後に沈殿物を回収し , 凍結乾燥した後に得られた固形物を SEM および SEM-EDX で分析した。

(3) 組換え大腸菌による R5His6 および 3 \times R5His6 の生産

金属イオンに配位しながらその周囲にシリカ結晶生成を誘起するペプチドとして , 珪藻由来の塩基性ペプチド (R5) と金属配位能を有するヒスチジン 6 残基を連結させたペプチド (R5His6) を設計した。pCOLADuet-1 ベクターを線状化し , R5His6 をコードする cDNA を In-Fusion 法により連結して発現ベクター pCOLADuet-1-R5His6 を構築した。大腸菌 BL21(DE3) を形質転換してカナマイシン含有 LB 培地で培養し , IPTG により発現を誘導した。回収した菌体を超音波破碎し , 得られた可溶性画分と不溶性画分を SDS-PAGE および anti-His タグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより分析した。R5His6 を 3 つ連結した 3 \times R5His6 についても同様の操作によりその組換え大腸菌を構築した。

(4) R5His6 によるシリカ結晶形成

組換え大腸菌の可溶性画分 1 mL に 0.25 M HCl を 40 μ L 加えてプレインキュベートし , 雑タンパク質を変性除去した。得られた上清に TEOS/HCl 混合溶液を所定濃度で加え , 25 $^{\circ}$ C で 24 h インキュベートした後 , 遠心分離により沈殿物を回収し , 超純水で十分洗浄した後に凍結乾燥した。

(5) 組換え *Brevibacillus* の構築と R5His6 の生産

pBIC3 線状化ベクターとその両末端に相同な配列とエントロキナーゼ認識配列を付加した R5His6 インサート DNA をそれぞれ PCR で調製し , これらを *Brevibacillus* In vivo Cloning 法 (BIC 法) により枯草菌 *B. choshinensis* を形質転換して発現ベクター pBIC3-R5His6 を有する組換え体を構築した。ネオマイシン含有 2SY 培地または TM 培地で 48 ~ 64 時間培養し , 培養上清および沈殿画分を SDS-PAGE ならびに anti-Hi タグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより分析した。

4 . 研究成果

(1) 組換え大腸菌によるシリカテインの生産

pColdProS2-Sil を有する組換え大腸菌を培養し , シリカテインの発現を調べた。組換え大腸菌の培養液から菌体を回収し , SDS-PAGE および anti-His タグ抗体を用いたウェスタンブロッティングを行ったところ , 不溶性画分の方で目的の分子量 (47.3 kDa) 付近に太いバンドが見られ , シリカテインは封入体として大量発現することが分かった。そこで透析により不溶性画分のリフォールディングを行い , その後 SDS-PAGE を行ったところ , 可溶性画分の 47.3 kDa 付近に太いバンドが見られ (Fig. 3A) , 可溶化タグを付加したシリカテイン封入体は透析法により容易に

リフォールディングできることが分かった。

(2) シリカテインによるシリカ結晶形成

可溶性シリカテイン溶液および大腸菌抽出液と TEOS/HCl 混合溶液を混合し 24 時間インキュベートしたところ、どちらにおいても白色沈殿が形成され、それらの SEM-EDX 分析で Si のピークが認められたことから、シリカ結晶が形成されたことが確認された (Fig. 3B, C)。しかしながら、これらの沈殿は異なる表面構造を有していた (Fig. 3D)。また、HCl 無添加の TEOS 溶液を用いた場合においてもシリカテイン溶液との混合で白色沈殿が生じたが、その量は大きく減少していた。したがって、シリカテインによるシリカ結晶の生成と成長には、基質 TEOS の溶解性が大きく影響すると思われる。

(3) 組換え大腸菌による R5His6 の生産

組換え大腸菌を培養して IPTG 添加による R5His6 の発現誘導を試み、SDS-PAGE および anti-His タグ抗体によるウェスタンブロッティングを行ったが、R5His6 の生産はほとんど確認できなかった。これは R5His6 が 6.7 kDa の短鎖ペプチドであるため大腸菌内でプロテアーゼ分解を受け易いためと考えられ、大腸菌による R5His6 の大量生産は困難と思われる。一方、この組換え大腸菌の可溶性画分に TEOS/HCl 混合溶液を加え 24 時間インキュベートしたところ白色沈殿が認められ、SEM-EDX で Si のピークが確認された。さらに、この沈殿量は TEOS/HCl の濃度の増加に伴い増加した。しかし、大腸菌の可溶性画分に替えて PBS を用いた場合には一部がゲル化し、白色沈殿の形成は認められなかった。以上より、組換え大腸菌内には R5His6 ペプチドは僅かながら残存していたこと、または R5His6 の分解物もまたシリカ結晶形成能を有していることが示唆された。

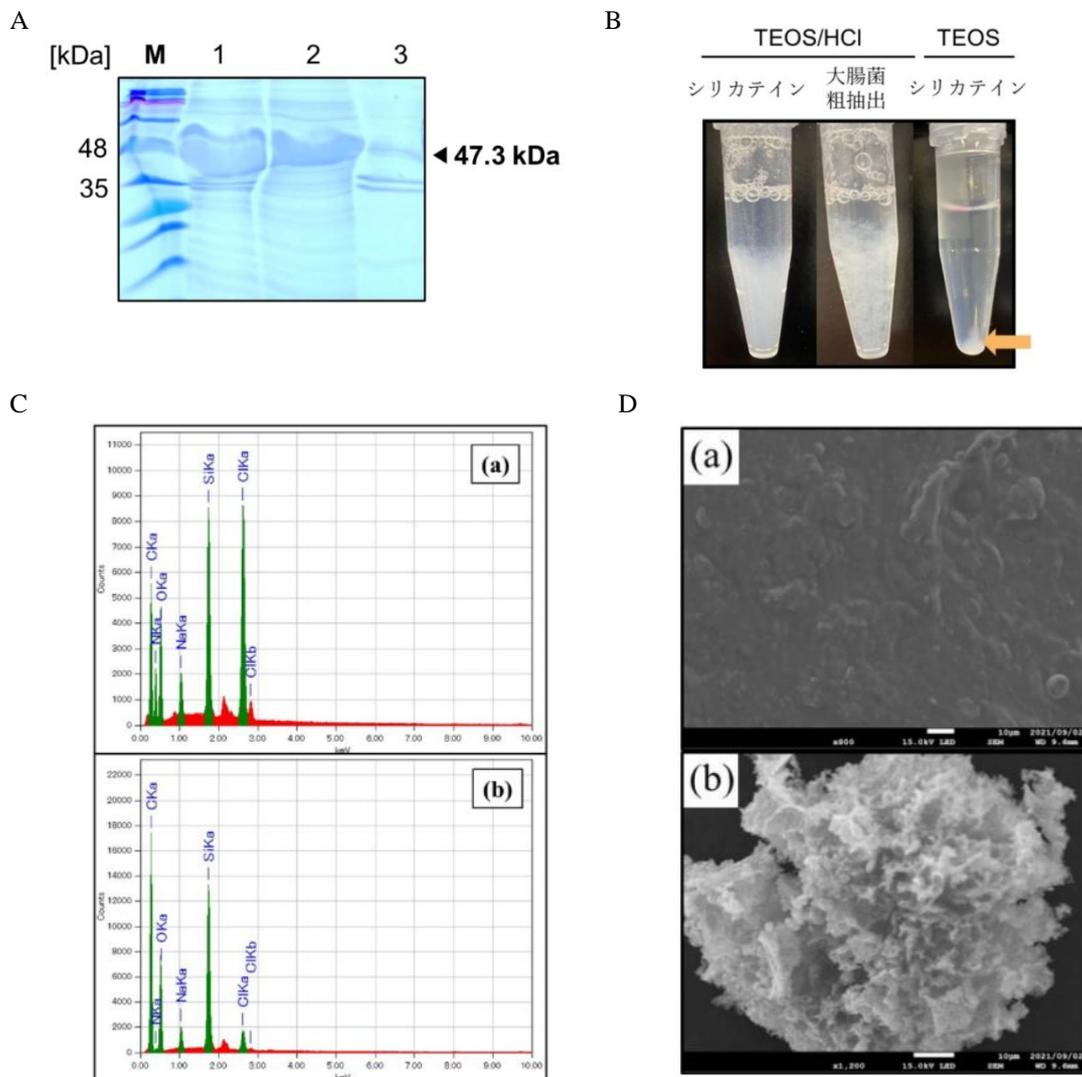


Fig. 3 発現シリカテインのリフォールディングとシリカ結晶生成活性

A リフォールディング前後のタンパク質の SDS-PAGE .

1, 透析前の不溶性画分 ; 2, 透析後の可溶性画分 ; 3, 透析後の不溶性画分

B シリカテインと TEOS の混合による沈殿生成

C 白色沈殿の SEM-EDX . (a) 可溶性シリカテイン , (b) 大腸菌粗抽出液

D 白色沈殿の SEM 画像 . (a) 可溶性シリカテイン , (b) 大腸菌粗抽出液

(4) 組換え大腸菌による 3×R5His6 の生産

短鎖ペプチドである R5His6 は大腸菌のプロテアーゼ分解の標的になりやすいことが危惧されたため、R5His6 配列を 3 ユニット分連結した 3×R5His6 の cDNA を有する組換え大腸菌を新たに構築した。しかし、培養液の不溶性画分と可溶性画分のいずれにも SDS-PAGE およびウェスタンブロットングで明確なバンドは検出されなかった。さらに、培養後に細胞内 DNA の PCR 検査を行ったところ、3×R5His6 の cDNA が抜け落ちていることが分かった。この理由として 3×R5His6 の塩基性が非常に高いことによる細胞毒性の可能性が考えられ、大腸菌培養による 3×R5His6 の生産は困難と思われた。

(5) 組換え *Brevibacillus* の構築と R5His6 の生産

細胞外分泌発現が可能な *Brevibacillus* 発現系による R5His6 の分泌生産を試みた。pBIC3 発現ベクターを用い、分泌シグナルを付加した R5His6 (BC-R5His6) の組換え *Brevibacillus* を BIC 法により構築した。組換え *Brevibacillus* を培養し、培地および細胞画分について SDS-PAGE および anti-His タグ抗体を用いたウェスタンブロットングを行った。その結果を Fig. 4 に示す。培地画分において 10.3 kDa 付近に明確なバンドが認められ、BC-R5His6 の分泌発現に成功したことが確認された。しかし一方、細胞画分にもより濃いバンドが見られ、BC-R5His6 ペプチドの多くは分泌されずに細胞内に残っていることが分かった。このことから、*Brevibacillus* は高塩基性ペプチドの R5His6 に対して耐性を有しており、その生産に有用であることが分かる。BC-R5His6 ペプチドの多くが分泌されず細胞内に留まっていたのは、R5His6 の塩基性が高く、細胞膜を透過し難いためと考えられる。

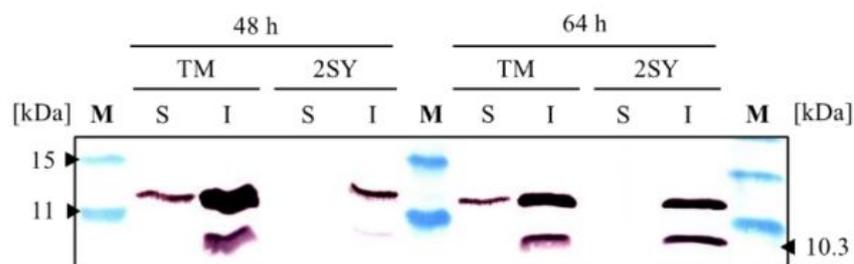


Fig. 4 組換え *Brevibacillus* による R5His6 の生産 . S, 培地画分 ; I, 細胞画分

(6) 結言

本研究では、ペプチドとシリカから成る金属吸着担体のグリーン生成に向けた基礎検討として、His 融合シラフィン R5 ペプチド (R5His6) の設計および組換え微生物による生産と、組換え大腸菌によるシリカテインの生産について検討した。シリカテインについては、組換え大腸菌では不溶化発現したものの、その後のリフォールディング操作により活性体として可溶化可能であった。一方、R5His6 については、組換え大腸菌では発現量が極めて少なく、SDS-PAGE では確認できなかった。また、発現後のプロテアーゼ分解の可能性を考慮して、R5His6 配列を 3 ユニット連結した 3×R5His6 の生産を試みたが、その遺伝子自体が不安定で欠落し易く、高塩基性である R5His6 の細胞毒性の影響が危惧された。そこで、分泌発現可能な *Brevibacillus* の組換え体を構築し、R5His6 の分泌生産を試みたところ、菌体外に加えて菌体内においてもその蓄積が確認された。

以上により、生体機能を利用し、結晶性シリカを用いて標的金属を分子インプリントすることにより高選択的な金属吸着担体を調製するための基礎が得られたと考えられる。

参考文献

- 1) B. Kollbe Ahn et al., High-performance mussel-inspired adhesives of reduced complexity, *Nature Communications*, 6, 8663 (2015)
- 2) M. Stevens GF et al., Preparation of Highly Selective Sorbents Composed of Peptides and Silica Using Novel Molecular Imprinting Technology, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 53(9), 485-497 (2020)
- 3) N. Kroeger et al., Polycationic Peptides from Diatom Biosilica That Direct Silica Nanosphere Formation, *Science*, 286, 1129-1132 (1999)
- 4) Dong Hyun Nam et al., A Novel Route for Immobilization of Proteins to Silica Particles Incorporating Silaffin Domains, *Biotechnol. Prog.*, 25, 1643-1649 (2009)

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 Morlu Gf Stevens, Saki Yokota, Takeshi Gotoh	4. 巻 53
2. 論文標題 Preparation of Highly Selective Sorbents Composed of Peptides and Silica Using Novel Molecular Imprinting Technology for Target Metal Ions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Engineering of Japan	6. 最初と最後の頁 485-493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1252/jcej.20we068	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18件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 S. Yokota-Imai and T. Gotoh
2. 発表標題 Construction of recombinant yeast for biosynthesis of rubber-like materials
3. 学会等名 The 9th International Conference on Materials Engineering for Resources (ICMR2021 AKITA) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S. Yokota and Takeshi Gotoh
2. 発表標題 Expression of rubber particle proteins modulates lipid metabolism in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Stevens Morlu GF, 横田早希, 李奕, 後藤猛
2. 発表標題 分子インプリント法によるキラル分子認識ペプチドシリカ粒子の調製
3. 学会等名 化学工学会秋田大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長山和寛, Stevens Morlu GF, 横田早希, 後藤 猛
2. 発表標題 金属認識部位にグルタミン酸残基を有する接着性ペプチドを用いた分子インプリント法によるPb(II)選択的吸着担体の調製
3. 学会等名 化学工学会秋田大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤猛, Morlu GF Stevens, 横田早希
2. 発表標題 接着性ペプチドを用いた新規分子インプリント技術の開発と高選択的金属吸着担体の調製
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長山和寛, Morlu GF Stevens, 横田早希, 後藤猛
2. 発表標題 分子認識領域にヒスチジン配列を有する接着性ペプチドを用いた分子インプリント法によるPd選択的吸着体の調製
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹本菜, 横田早希, 後藤猛
2. 発表標題 His融合シラフィンR5 ペプチドの生産とシリカ形成条件の検討
3. 学会等名 秋田応用生命科学研究会第34回 講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤凧紗, 横田早希, 鈴木健裕, 堂前直, 後藤猛
2. 発表標題 TurboID法によるバキュロウイルスレセプター候補タンパク質の同定
3. 学会等名 秋田応用生命科学研究会第34回 講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹本菜, 横田早希, 後藤猛
2. 発表標題 組換え大腸菌による金属結合性シリカ沈殿ペプチドの生産とシリカ形成
3. 学会等名 日本素材物性学会令和3年度年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Stevens Morlu GF, 横田早希, 山崎正貴, 後藤猛
2. 発表標題 多孔性シリカとペプチドとから成るSe(IV)およびSe(VI)認識能を有する吸着担体
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Stevens Morlu GF, 横田早希, 山崎正貴, 後藤猛
2. 発表標題 Preparation of selective sorbents for selenium(IV) and selenium(VI) composed of lysine-peptide and porous silica using molecular imprinting technology
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Maina Irene, 後藤 猛, Batlokwa Bareki
2. 発表標題 Pseudo-Template Molecularly Imprinted Polymer for The Selective Removal of p-Xylene from Aqueous Solutions
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田 早希, 後藤 猛
2. 発表標題 ゴム粒子タンパク質の発現による 酵母脂質代謝への影響
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 佐藤凧紗, 横田早希, 後藤猛
2. 発表標題 TurboID法を用いたバキュロウイルスレセプター候補タンパク質の探索
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い第三回オンラインセミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長山和寛, Stevens Morlu GF, 横田早希, 後藤猛
2. 発表標題 接着性ペプチドを用いた分子インプリント法による Pt(IV)に選択的な吸着担体の調製
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い第三回オンラインセミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田早希, 後藤猛
2. 発表標題 △粒子結合タンパク質発現による酵母の中性脂質蓄積効果
3. 学会等名 秋田応用生命科学研究会第33回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Stevens Morlu GF, 横田早希, 山崎正貴, 後藤猛
2. 発表標題 接着性ペプチドを用いた分子インプリント法によるSe(IV)および Se(VI) 認識吸着担体の創製
3. 学会等名 秋田応用生命科学研究会第33回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李奕, Stevens Morlu GF, 横田早希, 後藤猛
2. 発表標題 分子インプリント法による乳酸キラル分子認識ペプチド-シリカ担体の調製
3. 学会等名 秋田化学技術協会第55回研究技術発表会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 吸着剤、該吸着剤を用いた分離方法、および、該吸着剤の製造方法	発明者 後藤 猛, モルウ ジーエフ スティーブ ンス, 横田 早希	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-186608	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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