

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22760606
 研究課題名（和文）
 タンパク質の金属認識デザインによる次世代型レアメタルバイオキャッチャーの創製
 研究課題名（英文）
 Construction of next generation of rare metal biocatcher by designing metal recognition of proteins
 研究代表者
 黒田 浩一 (KURODA KOUICHI)
 京都大学・大学院農学研究科・准教授
 研究者番号：30432339

研究成果の概要（和文）：次世代型のレアメタル選択的バイオキャッチャーの創製をめざし、細胞表面工学により創製してきたレアメタルバイオキャッチャーを基盤とし、これに選択性を付与することを試みた。大腸菌由来モリブデン結合タンパク質（ModE）の金属結合に関わる6つのアミノ酸残基に着目し、変異を導入した ModE 変異体の細胞表面提示を行った。構築した ModE 変異体提示酵母の中で、T163Y の変異を導入した株はタングステン選択的吸着能を示した。また、リチウムイオン吸着酵母を創製するため、リチウムイオン結合タンパク質の細胞表面提示やリチウムイオン吸着ペプチドのスクリーニングを試みた。25 アミノ酸からなるランダムペプチドライブラリーの中から、リチウムイオン耐性を指標に選抜を行ったところ、リチウムイオン耐性酵母が得られ、細胞表面提示したペプチドによりリチウムイオンを吸着していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：To construct next generation of biocatcher specific for rare metal, we attempted to endow adsorption selectivity with biocatcher constructed by cell surface engineering. Six amino acid residues involving metal binding in the ModE, molybdate-binding protein from *Escherichia coli*, were substituted with other amino acids, and the ModE mutants were displayed on yeast cell surface. Among the ModE mutant-displaying yeasts, T163Y mutant-displaying yeast showed the selective adsorption of tungstate. In addition, to construct Li⁺-adsorbing yeast, cell surface display of Li⁺-binding proteins and screening of Li⁺-binding peptides from random peptide library were attempted. Screening of Li⁺-binding peptides from yeast library displaying combinatorial random peptides, which consisted of 25 amino acid residues, was performed on the basis of Li⁺ tolerance. As a result, Li⁺ tolerant yeast was acquired, and there is the possibility that tolerant yeast could adsorb Li⁺ by the displayed peptide.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総 計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能、バイオプロセス

キーワード：レアメタル、金属認識、バイオキャッチャー、応用微生物、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 金属は、私たちの日常生活に様々な意味で密接に関わりあっている重要な物質である。環境汚染重金属だけでなく、近年、産業のビタミンとしてレアメタルの重要性が高まりつつある。レアメタルは様々なハイテク製品に欠かせない金属であり、国際価格が高騰しているため、その安定供給が求められている。日本においては携帯電話などのハイテク製品や排水中などから効率良くレアメタルを回収するといった資源有用利用のための新しい技術開発が求められている。中でも生物のもつ金属認識・結合能には大きな可能性があり、様々な金属が混在する系から目的のレアメタルのみを吸着・回収するといった、選択的吸着が可能な次世代型バイオキャッチャーへの期待が高まりつつある。

(2) バイオ技術による金属吸着では、生物が元来備えている金属吸着能を強化させる試みがなされている。特に、水圏中の金属に対しては微生物を吸着剤とするバイオアドソorbentが有望である。微生物による金属吸着は(i)細胞内への取り込みと蓄積、(ii)細胞表面層での吸着といった2つの様式に大別される。特に細胞表面層での吸着は、表面積/体積比から環境中の金属イオンとの大きな接触面積が得られ、吸着に要する時間も短く、吸着後の脱着を細胞非破壊的に行うことができる。細胞表面層に吸着能を付与する技術はこれまで存在せず事実上困難であったが、細胞表面層に様々な機能性タンパク質・ペプチドを提示する「細胞表面層工学」という新しいバイオ技術の確立によって実現可能となっている。実際に細胞表面層工学技術により、酵母の細胞表面層に重金属イオン吸着タンパク質・ペプチドを提示することによって、細胞表面層上で重金属イオンを吸着し容易に回収することのできる環境浄化酵母の創製に成功してきた。

2. 研究の目的

ハイテク産業に欠かせない素材として近年注目を集めている、レアメタルの選択的吸着・回収が可能なバイオアドソorbent（微生物吸着剤）の開発を目的とする。従来の細胞内蓄積型とは異なり、細胞表面層をレアメタル吸着の足場としてデザインすることによって、吸着だけでなく容易な回収も可能な系を実現する。さらにこれまでに創製してきたレアメタルバイオキャッチャーでは、目的のレアメタルを吸着・回収することは可能であったが、選択性については十分でなく、周期

表の同族のレアメタルを区別することができず一緒に吸着してしまう。実際の水圏中からレアメタルの吸着・回収を行う際、目的のレアメタル以外の様々な金属が混在している場合が多く、様々な金属が混在する系から目的のレアメタルのみを吸着・回収するといった選択的吸着が次の重要な課題である。そこで本研究では、レアメタルの選択的吸着・回収という、より実用的な次世代型レアメタルバイオキャッチャーにするため、レアメタル吸着タンパク質の金属認識部位を改変していくことによって金属選択性を付与する。また、ランダムなアミノ酸配列からなるランダムペプチドライブラリーからのスクリーニングにより、新規レアメタル選択的吸着ペプチドを創製することによって、レアメタル選択的吸着が可能な新規バイオキャッチャーのデザインと創製を行う。

3. 研究の方法

(1) レアメタルを含めた微量元素の中には生体内で補因子として様々な酵素反応に欠くことのできない必須微量元素が存在する。微量元素を含む金属タンパク質は金属を特異的に認識して結合することによって正常な機能を発揮しており、このような金属タンパク質のもつ金属認識・結合能力を利用した。大腸菌由来のModEタンパク質は環境中のモリブデンを取り込むトランスポーターの発現制御を行う転写因子であり、モリブデン酸イオン (MoO_4^{2-}) 結合能をもつことが知られている。ModEはN末端にDNA結合ドメイン、C末端に MoO_4^{2-} 結合ドメインをもち、1分子につき1個の MoO_4^{2-} を結合することができる。しかしModEは同族元素であるタングステン酸イオン (WO_4^{2-}) にも吸着能を示す。そのためModEの金属認識に関わる6つのアミノ酸残基に着目し、アミノ酸変異の導入により金属結合ポケットのサイズを改変し、結合選択性の付与を試みた。ModE細胞表面層提示プラスミドを基に、site directed mutagenesisによってModEの金属認識に関わるアミノ酸残基に変異を導入した。ModE細胞表面層提示プラスミドには、グルコース存在下で構成的に働くGAPDHプロモーターの下流に5'から順に、分泌シグナルをコードする配列、ModEをコードする配列、抗体反応のためのFLAGタグ配列、細胞壁アンカリングドメインとして機能する α -アグルチニンのC末端側320アミノ酸残基をコードする配列をつないで構築した融合遺伝子をもつ。具体的に行う変異導入としては、水素結合に寄与す

る側鎖の OH 基を同様にもちながら側鎖の長さが異なるアミノ酸への置換、例えばセリンからトレオニンやチロシンのような置換変異を試みた。ModE の金属認識部位に変異導入した融合遺伝子をマルチコピープラスミドによって酵母細胞に導入・発現し、ModE 変異体の細胞表面提示を行った。ModE 変異体の細胞表面提示は、あらかじめ入れておいた FLAG タグに対する抗体を用いた蛍光抗体染色を行い、蛍光顕微鏡下での観察により提示確認を行った。モリブデンおよびタングステン含有溶液中に構築した変異導入 ModE 提示酵母を加えて吸着試験を行い、ICP-MS

(Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer) を用いて溶液中に残存するレアメタルイオンを定量することによって吸着能を評価した。

(2) リチウムは近年開発が進んでいる電気自動車など、今後大きな需要が見込まれる重要なレアメタルの 1 つであり、かん水中からの回収が行われている。そこで、データベース上からリチウム結合タンパク質を探索するとともに、新規リチウム結合ペプチドの創製を試みた。細胞表面工学は細胞機能の変換だけでなく、タンパク質改変の分子ツールとしても有用であるため、全くランダムなアミノ酸配列をもつランダムペプチドライブラリーを構築し、これを酵母の細胞表面に提示した酵母ライブラリーからリチウムイオン吸着能を示すもののスクリーニングを試みた。ランダムペプチドライブラリーは 20 種の全てのアミノ酸をカバーする NNK コドン

(N: A,T,G,C 等量混合物, K: G,T 等量混合物) の 25 回リピート配列を DNA 合成し、これをプライマーと Klenow fragment により 2 本鎖とした後、細胞表面提示用ベクターに挿入することによって作製した。次に、構築したランダムペプチドライブラリー提示プラスミドを酵母に導入して発現させ、酵母ライブラリーとした。酵母ライブラリーからのスクリーニングは以下のように金属耐性を指標として行った。これまでの研究において、酵母細胞表面での重金属イオン吸着能を増大させることにより、野生株では生育することのできない濃度の重金属イオン存在下でも生育可能となった。したがって、構築した酵母ライブラリーを野生株では生育できない 10 mM の LiCO_3 含有寒天培地上にて生育させ、ここで耐性を示して生育する細胞を選抜した。

また、酵母 *S.cerevisiae* 由来のイノシトールモノフォスファターゼ (IMPase) はイノシト

ール合成に関わり、酵素活性に Mg^{2+} を必要とするが、 Li^+ が金属認識ポケットの 1 つに結合することによって活性阻害を引き起こすことが知られている。そこで α -グルチニンをアンカータンパク質とした細胞表面提示用発現ベクター pULD1 に IMPase をコードする配列を挿入し、酵母細胞表面提示を行った。

4. 研究成果

(1) ModE 細胞表面提示プラスミドを基に、水素結合に寄与する側鎖の OH 基を同様にもちながら側鎖の長さが異なるアミノ酸への置換 (S126T, T163S, T163Y) やアミノ酸の酸性・塩基性の効果を見るための変異 (R128E) といった 4 種類の置換変異を導入した (図 1)。

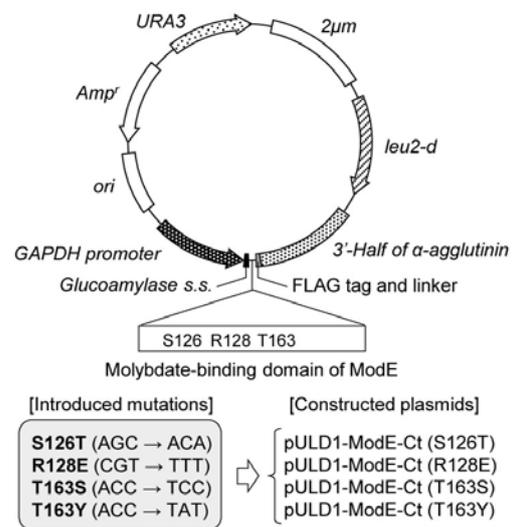


図 1. ModE 変異体細胞表面提示用プラスミド

変異導入した発現プラスミドを酵母細胞に導入・発現し、蛍光抗体染色を行った後、蛍光顕微鏡により細胞を観察した (図 2)。その結果、細胞表面部分に 2 次抗体による蛍光が観察され、細胞表面提示を確認することができた。

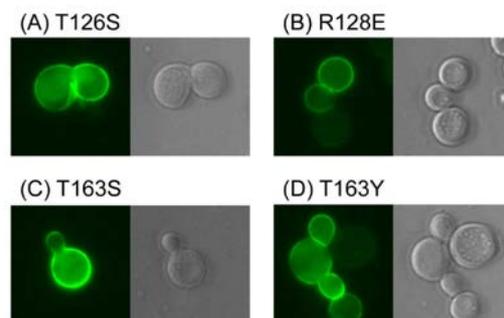


図 2. 蛍光抗体染色による提示確認

それぞれの ModE 変異体を細胞表面提示することができたので、100 μ M モリブデンおよび 100 μ M タングステン含有水溶液 (pH5.4) に構築した ModE 変異体提示酵母を加えて 2 時間吸着反応を行い、遠心分離を行った後、上清を回収し、ICP-MS を用いて溶液中に残存する金属イオンを定量することによって吸着能を評価した (図 3)。その結果、S126T、R128E、T163S 変異体提示酵母ではタングステン、モリブデン両方に対する吸着能が失われたが、T163Y の変異を導入した ModE 変異体提示酵母はタングステンに対する吸着能を保持したまま、モリブデンに対する吸着能が大きく低下するといった選択的吸着能を示した。したがって、ModE の金属認識に関与するアミノ酸残基に変異を導入することによって、選択的吸着を達成することができた。実際の回収ターゲットとなる金属溶液中には目的の金属以外の様々な金属が混在している場合が多く、このような選択的吸着は今後非常に重要となると考えられる。

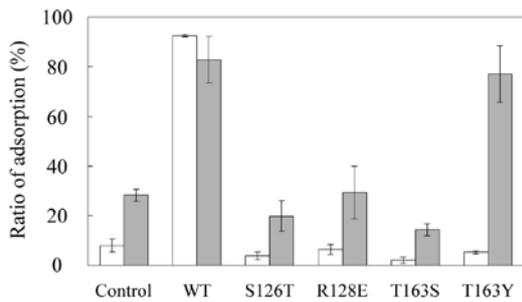


図 3 ModE 変異体提示酵母の吸着能評価
白:モリブデン, 灰色:タングステン

さらに T163Y 変異体提示酵母による吸着反応時の溶液の pH を変化させ、吸着選択性に与える影響を調べた。pH5.4 以外に pH3.4 と pH7.6 を設定し吸着試験を行った (図 4)。その結果、pH5.4 での吸着と比べて選択性が大きく低下した。T163Y 提示酵母は pH5.4 において最も良いタングステン選択性を示し、野生型 ModE 提示酵母と比較して選択性が 9.3 倍に上昇した。

(2) 25 アミノ酸からなるペプチドのアミノ酸配列を全くランダムにしたランダムペプチドライブラリーを提示するためのプラスミドライブラリーを構築した (図 5)。NNK コドンの 25 回リピート配列を含む 1 本鎖 DNA を合成し、さらにその 3' 末端側にアニーリングするプライマーを用い、Klenow

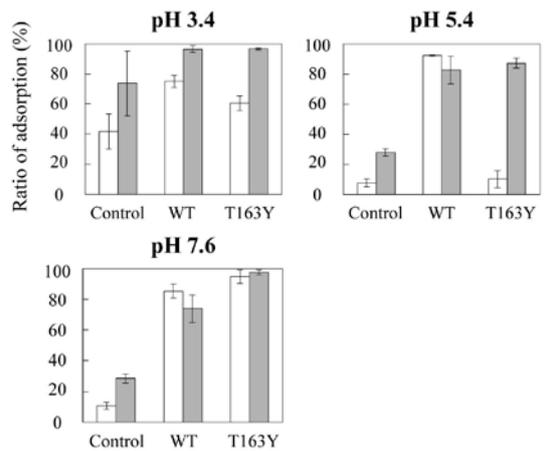


図 4. 吸着時の pH が吸着選択性に与える影響
白:モリブデン, 灰色:タングステン

fragment により 2 本鎖 DNA とした。その後、あらかじめ入れておいた制限酵素サイトにより切断し、Ligation 反応により細胞表面提示用プラスミドのマルチクローニングサイトに挿入した。Ligation 後、大腸菌に導入して形質転換を行い、得られた各コロニーが保持するプラスミドを抽出して、挿入した部位の DNA 配列を調べた。その結果、各コロニーから抽出したプラスミドはそれぞれ全く異なった配列を有しており、目的通りのランダム配列となっていることを確認した。

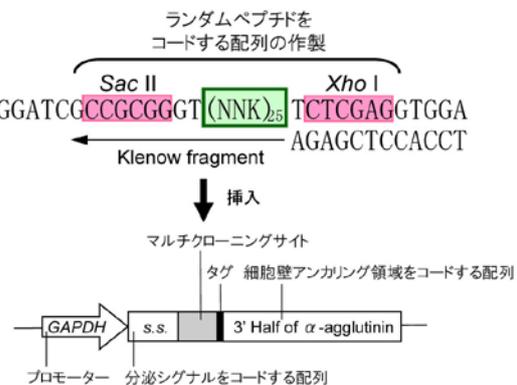


図 5. ランダムペプチドを提示するプラスミドライブラリーの構築

構築したプラスミドライブラリーを酵母に導入して発現させ、ランダムペプチドを提示した酵母ライブラリーとした。酵母ライブラリーを野生株では生育できない 10 mM の LiCO₃ 含有寒天培地上に塗布して培養し、生育するものの選抜を行ったところ、Li⁺含有培地上でも生育可能な酵母を 1 つ得ることができた。選抜した Li⁺耐性細胞は細胞表面提示したペプチドにより Li⁺を吸着していること

が考えられた。また、Li⁺結合能が示唆されている酵母由来イノシトールモノフォスファターゼ (IMPase) に着目し、 α -アグルチニンをアンカータンパク質として細胞表面提示を行い、FLAG タグに対する蛍光抗体染色によってその提示を確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kouichi Kuroda, Takashi Nishitani, Mitsuyoshi Ueda, Specific adsorption of tungstate by cell surface display of the newly designed ModE, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 査読有, 印刷中, DOI: 10.1007/s00253-012-4069-1
- ② Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, Molecular design of the microbial cell surface toward the recovery of metal ions, *Current Opinion in Biotechnology*, 査読有, 22, 427-433 (2011), DOI: 10.1016/j.copbio.2010.12.006
- ③ Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, Cell surface engineering of yeast for applications in white biotechnology, *Biotechnology Letter*, 査読有, 33, 1-9 (2011), DOI: 10.1007/s10529-010-0403-9
- ④ Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, Engineering of microorganism towards recovery of rare metal ions, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 査読有, 87, 53-60 (2010), DOI: 10.1007/s00253-010-2581-8
- ⑤ 黒田浩一, 細胞表面の改良による有害重金属の吸着・回収が可能な環境浄化酵母の創製, *IFO Research Communications*, 査読無, 24, 101-109 (2010)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 黒田浩一, 酵母の細胞表面デザインによる金属イオンの吸着・回収, 日本菌学会関東支部 第 26 回シンポジウム, 2011/12/10, 北里大学
- ② 止原正博, 西谷崇, 黒田浩一, 植田充美, 酵母表面ディスプレイを利用した環境汚染重金属イオンの吸着と排水処理への応用, 第 62 回日本生物工学会大会,

2010/10/28, 宮崎シーガイア

- ③ Kouichi Kuroda, Takashi Nishitani, Katsuya Iida, Mitsuyoshi Ueda, Construction of bioadsorbent for rare metal ion recovery by cell surface design, *American Society for Microbiology*, 2010/5/26, San Diego, USA

[図書] (計 3 件)

- ① Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, Yeast biosorption and recycling of metal ions by cell surface engineering (*Microbial Biosorption of Metals*, Chapter 10), Springer, 235-247 (2011)
- ② Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, Construction of yeast bioadsorbent by cell surface engineering (*Handbook of Metal Biotechnology*, Chapter 8), Pan Stanford Publishing, 88-99 (2011)
- ③ Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, Cell surface design for selective recovery of rare metal ions (*Handbook of Metal Biotechnology*, Chapter 16), Pan Stanford Publishing, 195-205 (2011)

[その他]

ホームページ

<http://www.tenko.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 浩一 (KURODA KOUICHI)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：30432339

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：