

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月 31日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780085

研究課題名（和文） シリカ微粒子を用いたワンステップなタンパク質発現・精製システムの創成

研究課題名（英文） Development of one-step protein expression and purification system Using silica particles

研究代表者

藤野 泰寛 (FUJINO YASUHIRO)

九州大学・基幹教育院・助教

研究者番号：70582659

研究成果の概要（和文）：本研究では、*Thermus* 属細菌に見出されたシリカ誘導性プロモーター及びシリカ結合ドメインを組み合わせ、発現と精製を同時に行える新規タンパク質発現・精製システムの構築を目指した。転写機構の解析の結果、シリカ誘導性プロモーターは、コロイドシリカによる培地中の鉄濃度減少に起因し、鉄濃度応答性の制御因子である Fur(TTHA0255)によって制御されることが明らかとなった。同様の機構は大腸菌にも存在することを見出し、シリカ誘導性の発現ベクターを構築することに成功したが、発現・精製のワンステップ化の条件検討までは完了しなかった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to develop novel protein expression and purification system using silica-inducible promoter and silica-binding domain. Transcriptional analysis revealed that iron deficient caused by colloidal silica activated this promoter and ferric uptake regulator (Fur: TTHA0255) regulated this promoter. Almost the same phenomenon was seen in *E. coli*, and we have succeeded in the construction of silica-inducible expression vector. However, conditions for one-step expression and purification have not completed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：シリカ、タンパク質発現

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の構造・機能の解明はポストゲノムの重要な研究対象で、効率のよいタンパク質生産システムは必須の基盤技術である。組換えタンパク質の生産には、大腸菌を宿主とする発現系が広く利用されているが、発現誘導に IPTG 等の比較的高価な試薬を必要とする上、発現タンパク質及びアフィニティ精製に用いる Tag 配列に応じた様々な精製方法を検討する必要があり、結果としてそれほど安価・簡便とは言えないのが現状である。これらの問題点を克服するには安価な誘導開

始剤、精製担体を使用し、できる限り精製のステップをシンプルにすることが求められる。申請者はこれまでシリカ(SiO<sub>2</sub>)と高度好熱菌の関わりについて研究を行ってきたが、その中で(1)シリカ刺激に应答するプロモーター、及び(2)シリカ特異的に吸着するタンパク質の存在を見出した。シリカは地球上に普遍的に存在する元素で、価格も安価な材料である。そこで、これらの特性を統合すれば非常に安価で簡便なタンパク質発現・精製システムが構築できるのではないかと発想に至った。以下にこれまでの研究背景について

て概説する。  
(シリカ誘導性プロモーター)

申請者はこれまでの研究において、*Thermus* 属細菌を過飽和シリカを含有培地で培養すると、該菌菌体表層に特異的なタンパク質 Silica-induced Protein (Sip) が産生されることを見出した。Sip は過飽和シリカ存在下、即ちシリカコロイド存在下でのみ特異的に発現し、その内部アミノ酸配列は鉄結合性 ABC transporter の solute-binding protein と有意の相同性を示した。Sip の発現は過飽和シリカ添加後約 1 時間以内に開始され、シリカ無添加時に比べて 20 倍以上の生産量が認められた (図 1)。従って、Sip は過飽和シリカによって転写が誘導される強力なプロモーターの制御下にあることが推察された。そこで sip 遺伝子の転写解析を行ったところ、sip 上流には *T. thermophilus* で既に報告されている  $\sigma^A$  type プロモーターと相同性を示す領域があり、リアルタイム PCR による sip 転写産物の定量解析から、本転写産物がシリカ添加時に凡そ 20 倍増大していることが明らかとなった。このことから、本プロモーター領域はシリカ刺激により活性化される誘導型のプロモーターであると推察した。他方、鉄結合性 ABC transporter 上流には Fur (Ferric iron regulator) box と呼ばれる制御領域が存在し、Fur タンパク質によって負の制御を受けている。細胞が鉄飢餓状態に陥ると、Fur タンパク質が Fur box より解離し、プロモーターから転写が開始される。*T. thermophilus* HB8 ゲノム上には

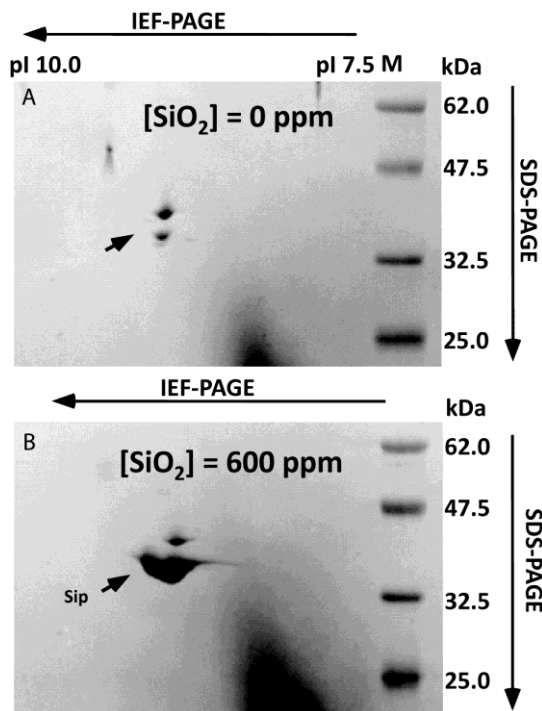


図 1 *T. thermophilus* の産生する Silica-induced protein の 2D-PAGE。上段は silica 濃度 0 ppm、下段は 600 ppm。

Fur に相当するタンパク質ホモログが 3 つ存在しており、シリカ存在の刺激が Fur に伝達され、これがプロモーター領域から解離することで転写が開始されるものと考察した。

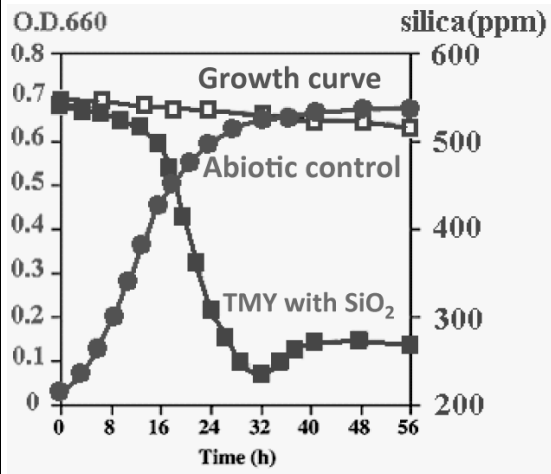


図 2 *Thermus* 属細菌によるシリカ沈殿促進

シリカ 600 ppm を含む TM 培地で培養すると溶存シリカ濃度が対数増殖期中期より減少する。●=増殖曲線、■=溶存シリカ濃度(菌体存在下)、□=溶存シリカ濃度(無菌)。

(シリカ結合性タンパク質; Silica-Binding Protein; SBP)

申請者らの研究グループでは *T. thermophilus* が過飽和シリカを含む培地中から、過飽和分に相当するシリカを速やかに沈降させることを見出している。そこで申請者は、菌体回収後、超音波により菌体を破碎し、その後回収された水溶性画分に対し、予め粒径を揃えたシリカ微粒子を添加することでシリカ結合性タンパク質の分離(SBP)に成功した。このようなシリカ結合性は、大腸菌由来リボソーム L2 タンパク質でも報告されており、シリコン基板上への酵素の配置やアスベストの検出など、その応用展開が期待されている。申請者の見出した SBP は約 44kDa であり、*T. thermophilus* ゲノム上に推定されているリボソーム L2 タンパク質(30.4 kDa)より大きく、大腸菌の SBP と異なる機構でシリカ粒子と結合していることが推察され、その学術的意義にも興味を持たれる。

## 2. 研究の目的

上記の研究背景を基に、シリカ微粒子を用いることでシリカ誘導性プロモーターにより転写を開始させ、発現対象のタンパク質に SBP のシリカ結合ドメイン(Silica-Binding Tag; SB-Tag)を融合して発現させることで、誘導に用いたシリカ微粒子をそのまま精製の際のアフィニティ担体として利用できるのではないかとの発想に至った。その概念図を図 3 に示す。つまり、シリカ微粒子を培養液

中に添加すると、発現ベクターに組み込まれたシリカ誘導性プロモーターが活性化され、転写が開始される。本発現ベクターの目的遺伝子の下流に SB-Tag を挿入し、融合タンパク質として発現させる。適切な誘導時間を経て、菌体を回収・破碎すると、目的タンパク質は SB-Tag を介して誘導のため添加されたシリカ微粒子に吸着される。シリカ微粒子はある程度の大きさ(数~数百 $\mu\text{m}$ )を持つので、遠心またはメンブランフィルターを通過させて、夾雑タンパク質を簡単に分離できる。つまり、発現と精製が同一チューブ内で可能となる。このように発現・精製を同時に行うシステムは従来無く、微生物生産分野に大きな貢献ができると考えた。

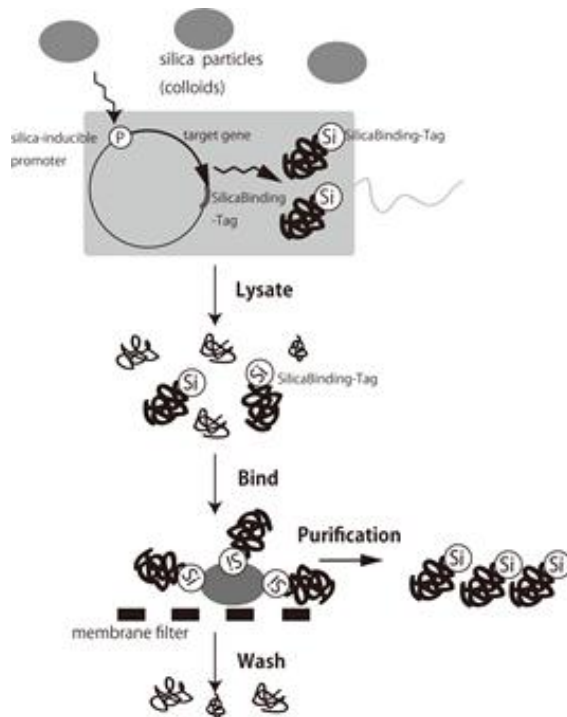


図3 新規タンパク質発現・精製システムの概念図

### 3. 研究の方法

#### ○シリカ誘導性プロモーターの作用機序

背景で概説したように、シリカ誘導性プロモーターは鉄飢餓に起因していることが考えられた。そこで、シリカ添加時及び鉄欠乏時に細胞に起こる変化を網羅的に解析するため、DNA microarray 解析を行った。シリカ添加培地には、TM 培地に 600 ppm のシリカを添加し、鉄欠乏培地は TM 培地より Chelex 100 resin を用いて金属イオンを除去した後、鉄以外の金属イオンを相補することで調製した。これらの培地に菌体を 1 時間暴露した後、RNA を抽出し、通常培養時の転写プロファイルと比較した。また、ICP 発光分析法による培地中の鉄濃度の測定を行った。シリカ添加培地を調製し、これをそのままサンプル

とした場合の鉄濃度を総鉄濃度、シリカ添加培地を 0.2  $\mu\text{m}$  メンブランフィルターに通し、コロイドシリカを除いた後のろ液中の鉄濃度を free の鉄濃度と定義した。

#### ○シリカ誘導性プロモーターの Fur による制御

*Thermus thermophilus* HB8 ゲノム上には 3 つの Fur ホモログが座乗していたため、3 つ全ての Fur ホモログの大量発現系を構築し、*sip* 上流の推定プロモーター領域をプローブとしたゲルシフトアッセイを行った。3 つのホモログ: TTHA0255, TTHA0344, TTHA1292 は HB8 ゲノムより PCR によって増幅し、pTXB1(New England Bio Lab.)にクローニングし、キチン結合カラムによるアフィニティ精製により調製した。ゲルシフトアッセイは、DIG Gel shift Kit, 2<sup>nd</sup> generation (Roche) を使用して行い、プローブは *sip* 上流の推定プロモーター領域を挟む約 200 bp の領域を PCR によって増幅し、DIG ラベルして使用した。常温下、30 分で DNA-タンパク質の結合反応を行った後、8% Native PAGE で、8 V/cm、120 分の泳動を行った後、Hybond-N+に転写後、抗 DIG 抗体を用いて X 線フィルムに露光した。

#### ○*Thermus* 属細菌由来シリカ誘導性プロモーターの活性評価

次いで、*Thermus* 属細菌におけるシリカ誘導性プロモーターのプロモーター強度を測定するため、プロモーターアッセイを試みた。*Thermus* ゲノムより、*sip* 上流の遺伝子断片を増幅し、GFP 発現ベクターである pAcGFP1-1 にクローニングした。これらのベクターより様々な長さを持つシリカ誘導性プロモーターと GFP を連結させた遺伝子断片を、*Thermus* 用ベクター pYK596 のマルチクローニングサイトに挿入した。これらのプラスミドを用いて *T. thermophilus* HB27 を形質転換し、pYK596 に座乗するハイグロマイシン耐性遺伝子を用いて形質転換体の選別を行った。次いで転換体の蛍光強度を蛍光光度計で測定した。

#### ○大腸菌におけるシリカ誘導性プロモーターの探索

後述の通り、*Thermus* 属のシリカ誘導性プロモーターの強度評価が困難であったため、大腸菌においてシリカ誘導性プロモーターを探索した。*Thermus* におけるシリカ誘導性プロモーターは、コロイドシリカによる鉄飢餓を引き金としていることが示唆されたため、大腸菌において、鉄応答性の遺伝子群がシリカによって誘導されるかどうかを追跡した。既報の鉄応答性の遺伝子群特異的なプライマーを設計し、シリカ暴露後の Total

RNA を抽出し、定量的 RT-PCR によってその転写量を評価した。

#### 4. 研究成果

##### ○シリカ誘導性プロモーターの作用機序

DNA microarray 解析の結果、シリカ添加時には *sip* に相当する TTHA1628 の鉄取込 ABC transporter が 5 倍程度転写増大していたほか、HB8 株の保持するプラスミド pTT8 上に座乗する鉄取込関連の遺伝子が 20 倍近く転写増大しており、シリカの添加によって鉄飢餓が起こっていることが強く示唆された。この転写プロファイルは、鉄欠乏時の転写プロファイルと酷似しており、このこともまたシリカ添加によって鉄欠乏が引き起こされていることを支持している。これはおそらく、添加したシリカ濃度が過飽和に達しているため、コロイドシリカが溶液内に形成され、負に帯電したコロイドシリカ表面上に鉄をはじめとする金属イオンがトラップされているためだと考えられる。本仮説を実証するため、ICP 発光分析法による培地中の鉄濃度の測定を行ったところ、シリカ添加培地において総鉄濃度は約 0.2 ppm であるのに対して、free の鉄濃度は 0.1 ppm 以下に減少していた。このことから、シリカ誘導性プロモーターは、コロイドシリカに起因する鉄欠乏に由来するものであり、Fur によって制御されていることが強く示唆された。

また、興味深いことに、特に強く転写誘導が見られた 2 つの遺伝子クラスターの上流領域を比較してみると、高度に保存された領域が見出された。この領域が Fur の認識部位として機能していることが考えられたが、既存の Fur 認識配列との相同性はなかった。このことから *Thermus* 属細菌における Fur 認識配列は、他の微生物とは全く異なっていることが考えられる。

##### ○シリカ誘導性プロモーターの Fur による制御

*Thermus thermophilus* HB8 ゲノム上には 3 つの Fur ホモログが座乗していた。*Bacillus subtilis* でも同様に 3 つの Fur ホモログが存在しているが、そのうち 1 つのみが Fur として機能し、残りの 2 つは Zn 応答性の制御因子、及び酸化ストレス応答性の制御因子であると報告されている。*Thermus* でも同様に、3 つのホモログのうち 1 つが Fur として機能するものと考えられたため、全ての Fur ホモログの大量発現系を構築し、*sip* 上流の推定プロモーター領域をプローブとしたゲルシフトアッセイを行った結果、TTHA0255 産物のみ、Fur 濃度依存的なバンドの上昇が確認され、また、非ラベル DNA による競合試験の結果、バンドのシフトが確認されなくなったため、TTHA0255 が HB8 株において Fur として機能

しているものと考えられた(図 4)。Fur の作用領域については現在 DNaseI footprint 法を用いて解析中である。

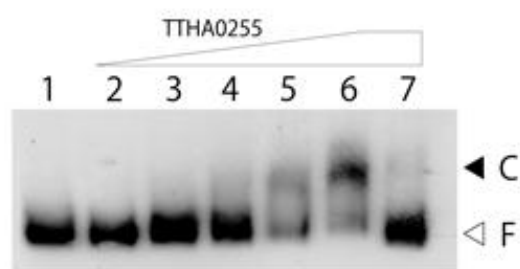


図 4 TTHA0255 産物を用いたゲルシフトアッセイ。Lane 1: 0 nM, 2: 50 nM, 3: 100 nM, 4: 250 nM, 5: 500 nM, 6,7: 1000 nM (Fur 濃度)。C: DNA-protein Complex, F: Free probe. Lane 7 には 125 倍の非ラベル DNA を含む。

##### ○*Thermus* 属細菌由来シリカ誘導性プロモーターの活性評価

次いで、*Thermus* 属細菌におけるシリカ誘導性プロモーターのプロモーター強度を測定するため、プロモーターアッセイを試みた。しかしながら、これまでのところ、当該遺伝子の挿入されたプラスミドを持つ形質転換体を取得するには至っていない。原因は定かではないが、*sip* のプロモーター領域が HB8 株と HB27 株で類似しているため、相同組換えが起こっており、目的のプラスミドが得られないことも考えられる。

##### ○大腸菌におけるシリカ誘導性プロモーターの探索

上記の通り、*Thermus* 属のシリカ誘導性プロモーターの強度評価が困難であったため、大腸菌においてシリカ誘導性プロモーターを探索した。*Thermus* におけるシリカ誘導性プロモーターは、コロイドシリカによる鉄飢餓を引き金としていることが示唆されたため、大腸菌において、鉄応答性の遺伝子群がシリカによって誘導されるかどうかを追跡した。既報の鉄応答性の遺伝子群について定量的 RT-PCR によってその転写量を評価した結果、ほとんどすべての鉄応答性遺伝子群がシリカ添加によっても転写増大することが認められた。特に、FhuA 遺伝子は転写量が多く、シリカ添加によって最大 20 倍の転写増大が認められた(図 5)。そこで、*Thermus* 由来のプロモーターではなく、大腸菌由来の FhuA プロモーターを利用した発現ベクターを構築することとした。FhuA 推定プロモーター領域には、大腸菌における Fur 結合サイトが見出され、本遺伝子が *Thermus* 属と同様の機構で制御されていることが示唆された。当該プロモーターを GFP 上流に組み込み、大腸

## Relative quantification of *fhuA* transcripts

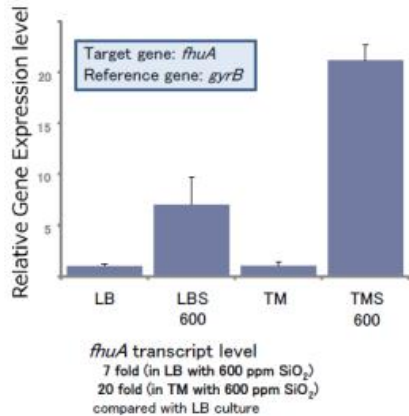


図5 FhuA のシリカによる転写量変化

LB: LB 培地による通常培養、LBS600: LB 培地+600 ppm シリカ、TM: TM 培地、TMS600: TM 培地+600 ppm シリカ。転写量は *gyrB* 遺伝子の転写量で補正後、LB 培地での通常培養時を 1 とした相対量で表している。

菌を形質転換し、シリカ添加・非添加の培地で培養した後、GFP の蛍光強度を測定したところ、シリカ添加時にタンパク質の発現誘導がかかっていることが確認された。発現量の定量及び発現と精製をワンステップで行う条件検討までは期間内に完了しなかったが、本研究の目的の基礎は確立されたため、今後条件を詰めていくことで最終目標に到達できると考えている。

## 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 1 件)

藤野 泰寛、横山 拓史、土居 克実、環境応答とバイオミネラリゼーション、化学と生物、査読無、50 巻、175-181、(2012)

〔学会発表〕(計 1 件)

藤野 泰寛、岩瀬 真、大島 敏久、土居 克実、*Thermus* 属細菌及び大腸菌におけるシリカ誘導性遺伝子の発現解析、日本農芸化学会平成 25 年度大会、2013 年 3 月 27 日、東北大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 泰寛 (FUJINO YASUHIRO)

九州大学・基幹教育院・助教

研究者番号：70582659