

好塩菌由来タンパク質を用いた金属回収タンパク質の創製

石橋 松二郎

鹿児島大学農学部 生物資源化学科

〒890-0065 鹿児島市郡元 1 丁目 21 番 24 号

e-mail: matu@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

要旨

好塩性タンパク質はタンパク質表面に酸性アミノ酸を多く含有しているため、タンパク質表面に大量の金属イオンを結合することが出来る。また、可溶性が高く凝集しにくい性質を持っている。我々はこの好塩性タンパク質の特徴を利用して、重金属による土壌汚染の除染や貴重な資源であるレアメタルの回収に有用な金属タンパク質の創製を目指した。*Halomonas* 由来好塩性アルカリフォスファターゼ (HaALP) は Na イオン特異的に安定化される酵素である。今回この Na イオンが特異的に結合する部位の特徴を明らかにするために、Na イオン非要求性 HaALP 変異体の取得を試みた。ランダムに HaALP 遺伝子に変異を導入したライブラリーを作成し、そのスクリーニングを行った結果、2 つの変異体を取得することに成功した。1 つは残念ながら Na イオン要求性であったが、比活性が上昇していた。もう一つは大腸菌での発現時に、生育を著しく阻害したが、Na イオン非要求性の可能性を示した。

1 緒言

タンパク質はその複雑な構造と機能を制御することにより、目的に合致した新機能素材として利用することが可能である。一般にタンパク質は、高分子素材に比較すると安定性に乏しいといわれるが、天然材料で作られているため、その生分解は容易であり環境への負荷も著しく低い。もちろん必要が無くなれば微生物を用いて分解が可能であるし、必要となれば微生物を発酵させて大量安価に製造が可能である。そこで我々は、様々な金属イオンと相互作用するタンパク質を利用して、希少な金属を効果的に回収する新機能材料の研究開発をめざしている。

そのような新機能材料の素材として我々が目をつけたのは、極限環境微生物の一つである好塩菌由来のタンパク質群である。好塩菌由来タンパク質は、タンパク質表面に多くの酸性アミノ酸が存在している為、タンパク質表面にはナトリウムやカリウムなどの金属イオンが多量に結合している。最近の研究では、この様な金属イオンとの非特異的な結合だけでなく、特異的な金属イオンが結合して好塩菌由来タンパク質の安定化に寄与していると言われている^(1,2)。さらに我々が好塩性タンパク質で注目している点は、非常に高い構造可逆性を有し「変性しないタンパク質」という特徴を持つ点である³⁾。

このメカニズムも先ほど述べた好塩性タンパク質の1次構造の特徴である酸性アミノ酸含量が多い事に起因しており、我々はネットの電荷が大きく負に偏っていることが電荷の反発によるタンパク質の非凝集性を生み出し、その結果、高い可溶性と高い可逆的構造再形成能力を持っているという全体像を明らかにした。実際我々は、非好塩性モデルタンパク質に好塩性を付与し、高い構造可逆性を付加することにも成功した⁽⁴⁾。

最近、我々は中度好塩菌 *Halomonas* 属由来アルカリフォスファターゼ (HaALP) (Fig. 1) がナトリウムイオン特異的に安定化されることを見出した⁽³⁾。これはナトリウムイオンが特異的に結合し、2量体の安定化に寄与しているためだと推察した。このナトリウムイオン結合部位が特定できれば、分子設計により1価の金属に特異的に結合できる金属回収タンパク質に改変できると考えられる。そこで今回は HaALP 表面に結合するナトリウムイオン結合部位の特徴を明らかにするために、ナトリウムイオン非依存性 HaALP 変異体の取得を目指した。

この研究は、放射性セシウム等による土壤汚染の除染や、様々な金属を回収する技術に繋がり、鹿児島県海洋下に眠る稀少金属の捕集に貢献出来る可能性がある。

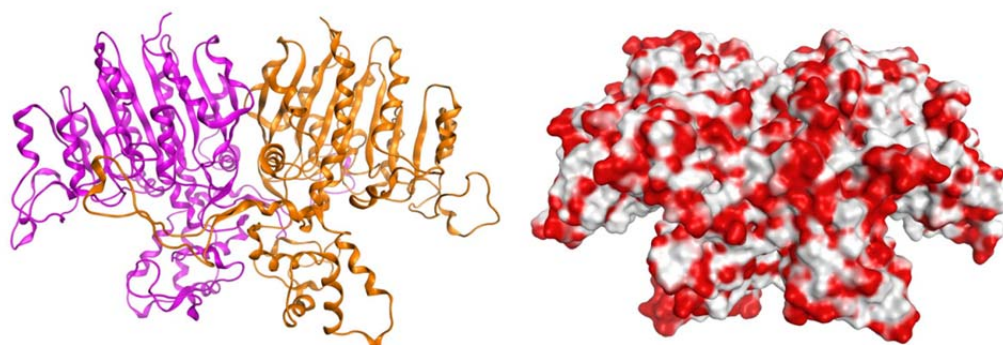


Fig.1 Modeling of HaALP structure

Left : ribbon model. Right : electrostatic potential map of the protein surface (negative charge is presented by red) .

2 実験

2-1 HaALP 遺伝子へのランダム変異導入

HaALP 塩基配列 (1584bp) の中から二量体の接触部分と予測される領域を α 領域 (110 から 387) と β 領域 (998 から 1566) とした (Fig. 2)。今回はこの α 領域と β 領域にランダムに変異を導入した。変異導入方法は error-prone PCR 法により行われた。すなわち HaALP をコードしている pH4 40ng、 α 領域もしくは β 領域両端のプライマー 50 ng、dNTP 0.2 mM、 $MnCl_2$ 0.6 mM、 $MgCl_2$ 1 mM、DMSO 5%、Gene Taq (NIPPON GENE) 0.5 U、10× Gene Taq Universal Buffer (Mg^{2+} free) 2 μ l を加え PCR した。得られた断片配列のライブ

ラリーを作るために PCR 増幅断片を直接プライマーとしたメガプライマー法で再び鑄型 pHA を用い PCR 増幅した。つまり pHA 40ng、PCR 増幅断片 50ng、dNTP 0.2 mM、Phusion DNA Polymerase (NEB) 0.5 U、5X Phusion HF Buffer 10 μ l を加えベクター全体を PCR 増幅した。その後 DpnI で処理し、メチル化した鑄型ベクターを分解した。この様にして得られたライブラリーはエレクトロポレーション法で大腸菌 BL21 Star (DE3) pLysS に導入された。

```

10      20      30      40      50      60
M T F C M K Q K T A V G S L V G G M L L
ATGACATTTT GCATGAAGCA AAAGACGGCA GTCCGCTCTC TGGTGGGGGG GATGTTGCTT
70      80      90      100     110     120
A S V A V P A S A A E V K N V I L M I G
GCCTCGCTCG CGGTGGGGGC CAGTGGGGCC GAGGTCAAGA ACGTGATGCT GATGATCGGG
130     140     150     160     170     180
D G M G P Q Q V G L L E T Y A N Q A P D
GACGGCATGG GGGCCAGCA GGTGGGGCTA TTGAAACCT ATGCCAACCA GGCTCCCGAT
190     200     210     220     230     240
S I Y D G E P T A F H Q L A K E G V V G
TCCATCTACG ATGGCGAGCC GACGCGCTTT CACCAATTGG CCAAGGARGG CCTCCTCGGT
250     260     270     280     290     300
F S L T H P E D A V V V D S A C S A T Q
TTTTCCCTGA CGCATCCCGA GGATCGCGTC GTCTGGATT CCGCCTGTTC CGCCACG CAG
310     320     330     340     350     360
L A S G I Y S G S E V I G I D A E G N P
TTGGGAGTGG GCATCTACTC CGGTAGCGAG GTGATCGGTA TCGATGCCGA GGGCAATCCC
370     380     390     400     410     420
V E T V L E L A Q A R G K A T G L V S D
GTGGAGACGG TACTCGAGCT TGCCGAGGCC CGGGGCAAGG CGACCGGTCT GGTTCGGGAC
430     440     450     460     470     480
T R L T H A T P A A F A A H Q P H R S L
ACTCGCTGGA CCGATGCCAC GGGCGAGGCC TTCCCGCCCC ACCAGGCCCA TCGTTCGCTG
490     500     510     520     530     540
E N E I A V D M L E V G P D V M L S G G
GGAAACGAGA TCGCCCTGGA CATGCTGGAA GTAGGGCCCG ACGTCACTCT CTCGGGCGGG
550     560     570     580     590     600
L R H W V P Q S A S E D A E V T S L M D
CTGGCCCATT CGGTGGCGCA ATCGCGGAGC GAGGATCGCG AGGTCAAGGAG CCTGATGGAT
610     620     630     640     650     660
G A Y E P A S K R Q D D R N L L A E A V
GGCGTTATG AGCCGCGGTC CAAGCGTCCG GACGATCGGA ACGTCTCGGC GGAAGCCCTC
670     680     690     700     710     720
E K G Y G L A F S R E Q L E A D Q S D K
GAAAAGGGCT ATGGCCCTGGC GTTCAGCGCG GAGCAACTCG AGGCGGATCA GAGCGACAAG
730     740     750     760     770     780
L L G L F A N S G M A D G I E Y R N T R
CTACTGGGTC TGTTTGGCAA CTCCGGCATG GCGCATGGTA TCGAGTATCG CAATACCAGG
790     800     810     820     830     840
D D A D R R E P T L H E M T Q A A L N R
GACGACGGCG ACCGCGCCGA GCGGACCCCTG CACGAGATGA CGCAGGCGCG GCTGAACAGG
850     860     870     880     890     900
L E Q D E D G F F L M V E G G Q I D W A
CTCGAGCAGG ACERAGCAGG TTTCCTCTCG ATGCTCGAAG GCGGCGAGAT CCAATTGGGG
910     920     930     940     950     960
G H S N D A G T M L N E M V K F E E A V
GGGCACTGGA ACGATGCCCG CACCATGCTT AACGAGTGG TCAAGTTCGA GGAAGCGGTT
970     980     990     1000    1010    1020
Q G V Y D W A K G R E D T V I L V T A D
CAAGGTGTCT ACGACTGGGC CAAGGGAGCC GAGGACACCG TGATCTCTGT TACCGCGGAT
1030    1040    1050    1060    1070    1080
H E T G A F G L S Y S S A D L P E P Q S
CATGAACCGG CGCGGTTGCG GCTCAGTTAT TCAATGGCCC ACGTGGCGGA GCGGAGTGG
1090    1100    1110    1120    1130    1140
K S G P A F A E R D Y A P N F N F G D F
AAGTGGGGCC CTGCGCTCGC GGAAAGGGAC TATCGGCGCA ACTTCAACTT CCGGCACTTC
1150    1160    1170    1180    1190    1200
A L L D S L Y H Q K A S F S T L L S E F
GGGTTCTCG ATTCCTCTTA TCACGAGAAG GCGAGCTTTT CGACCGTCTG GATGAGTTTC
1210    1220    1230    1240    1250    1260
G A L E E E Q R T P A R L M E M V N A N
GGGGCACTCG AAGAGAACCA GAGAAGCGCG GCTCGTCTGA TGGAAATGGT CAATGCCAAC
1270    1280    1290    1300    1310    1320
S D F Q I D E E Q A E A V L A D K P N P
AGCGATTTCC AGATCGACGA AGAGCAGGCG GAGCGGTTCC TGGCGGATAA GCGGAACCCC
1330    1340    1350    1360    1370    1380
Y H V E G H S Y L E A E E V P A I Q D F
TACCACGTGG AGGCTCACAG CTATCTCGAA GCGGAGGAGG TCCCGGCCAT CCGGACTTTT
1390    1400    1410    1420    1430    1440
D A F Y P Y N D R G N V L G R V L G T A
GATGCGTTCT ACCCGTATAA CGATCGGGCC AATCTACTGG GCGGTGTTCT GGCTACTGCA
1450    1460    1470    1480    1490    1500
Q N V V W G T G T H T H T P V N V F A W
CAGAAATGTC TCTGGGGCAC CGGTACCCAT ACCACACTC CGGTGAATGT CTTCCGCTGG
1510    1520    1530    1540    1550    1560
G P A E T I L P V S S I Q H H S E V G Q
GGGCGGGCCG AGACCATCTT GCGGATATCC TCGATCCAGC ATCAATCCGA GGTCCGGT CAG
1570    1580    1590    1600    1610    1620
Y L K S L V E *
TACCTCAAGT CGGTGGTCCA CTGA

```

Fig.2 The base sequence and the amino acid sequence of HaALP. Blue, orange and light blue line shows signal sequence, α area and β area, respectively.

2-2 ライブラリーからのスクリーニング

ライブラリーを含む大腸菌はALPの基質である5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium salt (BCIP)と発現誘導物質ラクトースを含んだNaClを加えていないLBアンピシリン培地で37°Cで培養した。1日培養後、基質が分解されコロニーが青くなったものをピックアップした。ピックアップしたコロニーは0.4%グルコースを含むLBアンピシリン液体培地10 mlで培養し、Plasmid Mini Extraction Kit(BIO NEER)を用いプラスミドを回収した。回収したプラスミドはBig Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)で処理し、HaALP遺伝子がコードされている領域をABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。

2-3 精製

得られたプラスミドで形質転換した大腸菌を0.4%グルコースを含む5 ml LBアンピシリン-クロラムフェニコール培地で37°C、一晩前培養した。その1 mlを0.4%グルコースを含む100 ml LBアンピシリン培地で18°C培養し、OD₆₀₀が0.8に達した時、12000×g、5分間4°Cで遠心分離し培地を取り除き、新たに0.4%ラクトースを含む100 ml LBアンピシリン培地で8時間18°Cで培養した。培養後、12000×g、5分間4°Cで遠心分離し、沈殿に5 ml Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)を加え超音波で菌体を破碎した。破碎されたサンプルは12000×g、20分間4°Cで遠心分離し、その上清を0.45 μmのフィルターにかけた。精製にはHiTrap Q HP カラム (1.6 cm X 2.5 cm, GE Healthcare)を用い、Akta prime chromatography system (GE Healthcare)でNaCl濃度0.2 Mから0.7 Mのグラジエントで溶出した。精製したタンパク質量は、BCA法⁵⁾を用い測定した。精製の純度確かめるためにLaemmli⁶⁾の方法に従い10%ゲル濃度のSDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後、ゲルをクマシーブリリアントブルーで染色した。

2-4 活性測定

反応溶液 (0.97 M ジエタノールアミン (pH10.25)、10 mM ρ-ニトロフェニルリン酸 (ρ-NPP)、0.25 mM MgCl₂) にALPを加え37°Cで反応させた。基質ρ-NPPから生成するρ-ニトロフェノールを405 nmで測定し、1分間で1 μmol生成する酵素量を1 Uとした。

3 結果、考察

3-1 Naイオン非要求性HaALP変異体のスクリーニング

Error-prone PCRでランダムに変異が導入されたHaALP遺伝子をメガプライマー法によりpHAベクターに組み込んだ。このベクターを大腸菌BL21 Star (DE3) pLysSに導入し、この形質転換した大腸菌をNaイオンを含まない基質BCIPが加えられたLB基本培地で37°C1日培養した。変異していないHaALPが導入されたコントロールの大腸菌も若干の薄い青色を呈したが、変異したHaALPが導入された大腸菌の中には濃い青色を呈す

るものが見られた。我々はこの中から2つのコロニーをピックアップすることが出来た (Fig. 3)。

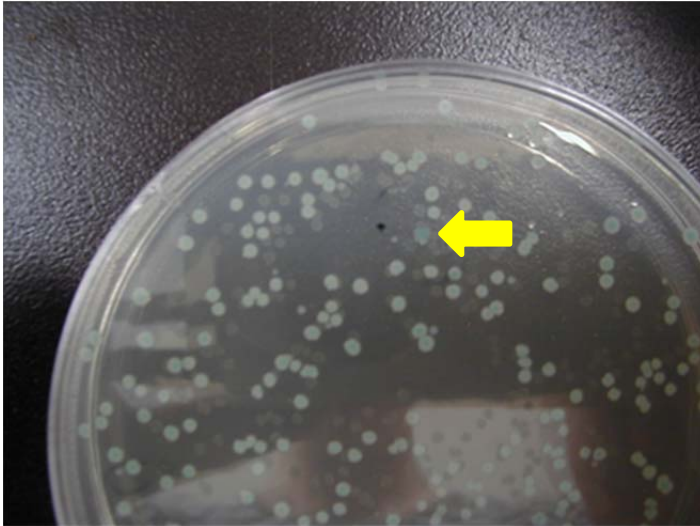


Fig.3 Screening of Na-independent HaALP mutants

The arrow shows a blue colony.

3-2 Na イオン非要求性 HaALP 変異体の精製と性質検討

Na イオン非要求性 HaALP 変異体を2つピックアップすることが出来たので、この大腸菌を再び 0.4% グルコースを含む 10 ml の LB アンピシリン培地で培養後、そのプラスミドが抽出された。抽出されたプラスミドは HaALP 遺伝子領域の塩基配列が決められた。その結果、 α 領域に塩基配列 1 箇所に変異が入り、アミノ酸配列にも 1 箇所変異が入ったサンプルと偶然 $\alpha \cdot \beta$ 領域以外に変異が入ったサンプルであることが分かった。これをそれぞれ pHAK と pHAJ とした。この pHAK と pHAJ で形質転換した大腸菌を 0.4% グルコースを含む 5 ml LB アンピシリン-クロラムフェニコール培地で一晚培養後、発現を抑制するために 0.4% グルコースを含む 100 ml LB アンピシリン培地で培養後、OD₆₀₀ が 0.8 に達した時に 0.4% ラクトースを含む 100 ml LB アンピシリン培地に替え発現を誘導した。野生型 HaALP において、一般的に用いられる強い誘導物質 IPTG では発現量が減少したので、今回は誘導物質をラクトースとした。この事は強い HaALP 発現は、大腸菌の生育阻害を起こすことが示唆される。ラクトースで誘導された菌体は集菌され、菌体破碎し、その上澄みを Q カラムで精製した。残念なことに pHAK で形質転換した大腸菌はほとんど HaALP の発現が確認されず、精製できなかった (データ非掲載)。pHAK で形質転換したコロニーはとても濃い青色を呈したが、非常に小さかった。この事から発現した HaALP 変異体は Na イオン非存在下でも高い活性を保持しているが、その為大腸菌の生育が著しく阻害され、その結果発現タンパク質を回収できなかったと考えられる。pHAJ で形質転換した大腸菌は発現が確認され、精製することが出来た (Fig. 4)。レー

ン10から14までの画分が回収され以後の実験に用いられた。培地100 mlの培養で13.8 mg HaALPを得ることが出来た。この精製したサンプルの比活性を測定したところ65.8 U/mgでネイティブなHaALPの比活性6679.0 U/mgと比較すると約100倍低いことが分かった。この事はHaALP変異体がきちんと構造形成していないことを示している。

そこで3 M NaCl、2 mM MgCl₂を含む50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)に1晩透析し、活性測定を行ったところ15134 U/mgであった。これはネイティブな比活性より約2倍高かった。この結果はこの変異体がNaイオン非要求性に変化していないことを示しており、比活性が高くなることによりNaイオン非存在下でもコロニーが青くなったと考えられる。

今回我々は2つのHaALP変異体をコードするプラスミドpHAK, pHAJを獲得した。pHAKで形質転換した大腸菌はNaイオン非存在下でも基質BCIPを含む培地で濃い青色を呈したコロニーを形成したが、非常に小さく、HaALP変異体の精製は非常に困難だった。これはHaALP変異体が大腸菌の生育を著しく阻害していると推察される。また、pHAJで形質転換した大腸菌はHaALP変異体を大量に発現した。この変異体は比活性が2倍に上昇したが、活性化にはNaイオンを必要とした。Naイオン非存在下でコロニーが青色を呈したのは、Naイオン非要求性になったのではなく、比活性が上昇したためだと推察される。今回結果からHaALPの発現は大腸菌の生育を阻害することが分かった。またさらに、Naイオン非依存性になりHaALP活性が上昇すると大腸菌の生育を著しく阻害する事が推察された。今後、Naイオン非依存性HaALPを効率よくスクリーニングするには、新しい宿主でのスクリーニング系を開発する必要がある。

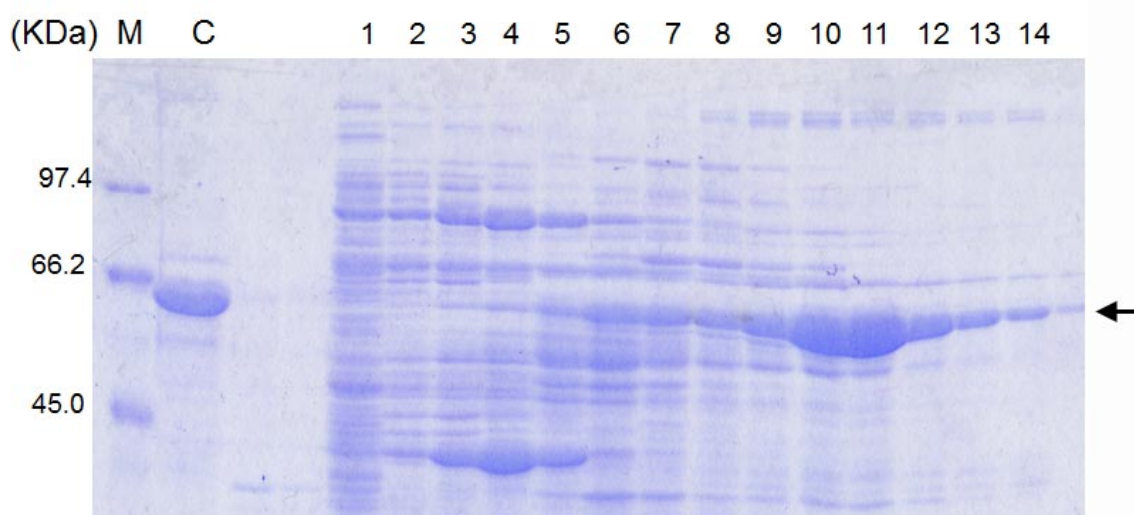


Fig.4 Purification by HiTrap Q HP column

The c lane shows purified wild type HaALP. The number lane shows eluted fractions. The arrow shows next to the far right lane indicates the mobility in SDS-PAGE using 10% acrylamide gel of HaALP.

4 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をして頂いた公益財団法人サンケイ科学振興財団に深く感謝致します。

5 引用文献

- 1) D. Madern, C. Ebel, Influence of an anion-binding site in the stabilization of halophilic malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*, *Biochimie* 89 (2007) 981–987.
- 2) M. Ishibashi, K. Oda, T. Arakawa, M. Tokunaga, Cloning, expression, purification and activation by Na ion of halophilic alkaline phosphatase from moderate halophile *Halomonas* sp. 593, *Protein Expr. Purif.*, 76 (2011) 97–102.
- 3) H. Tokunaga, M. Ishibashi, T. Arakawa, M. Tokunaga, Highly efficient renaturation of beta-lactamase isolated from moderately halophilic bacteria, *FEBS Lett.* 558 (2004) 7–12.
- 4) H. Tokunaga, M. Ishibashi, F. Arisaka, S. Arai, R. Kuroki, T. Arakawa, M. Tokunaga, Residue 134 determines the dimer-tetramer assembly of nucleoside diphosphate kinase from moderately halophilic bacteria, *FEBS Lett.* 582 (2008) 1049-1054.
- 5) P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- 6) U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.

Engineering of metal-recovery protein using halophilic protein

Matsujiro Ishibashi

Biochemistry & Biotechnology Faculty of Agriculture Kagoshima University

21-24 Korimoto 1, Kagoshima, 890-0065, Japan

e-mail: matu@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

Halophilic proteins can bind abundantly metal ions on their surface due to high number of acidic amino acids on the surface. In addition, they have unique characterizations such as high solubility and hardly to perform aggregation. We attempted to engineer metal-binding protein for decontaminating of soil pollution caused by heavy metal and salvage of rare metal as vital resources, using a halophilic protein. Halophilic alkaline phosphatase from *Halomonas* (HaALP) is the enzyme which is stabilized by specific Na-binding. Our purpose is performing Na-independent HaALP mutant. By the performing mutant,

we are able to identify the essential amino acid in Na-binding site. This information can be applied to engineer metal-recovery protein. We prepared HaALP gene library obtained from random mutation and screened Na-independent HaALP mutant. As a result, we obtained two mutants successfully. One was Na-dependent mutant with higher specific activity. Another could not be purified due to low level expression since it become inhibitor of the host *E. coli*. However, it indicated a possibility of Na-independent mutant. Further study must solve the problems and clarify the characteristics.