

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

好塩菌由来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する特徴を持っており、その結果、可溶性が高く凝集しにくい。さらに、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。我々はこの好塩性タンパク質の特徴を利用して、重金属による土壤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す。*Halomonas* 属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、新しい宿主 *Brevibacillus choshinensis* による大量発現系を構築した。陰イオン交換カラムの精製により単一に精製することが出来、諸性質を検討したところ、構造形成は高い pH で起こり、Na イオンが必須である事が分かった。また、X線構造解析により 2.1 Å の分解能で HaALP の構造を明らかにすることが出来た。

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、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し、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。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中度好塩菌由来の好塩性タンパク質群である。中度好塩菌由来タンパク質は、幅広い塩濃度下で安定であり、産業利用に適している。また、タンパク質表面には多くの酸性アミノ酸が存在している為、表面には大量のナトリウムやカリウムイオンなどが非特異的に結合しているだけでなく、特異的な金属イオンが結合して好塩性タンパク質の安定化に寄与している^(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「凝集しないタンパク質」という特徴を持つ点である³⁾。このメカニズムも酸性アミノ酸含量が高いという好塩性タンパク質の特徴に起因しており、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。

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) を大腸菌で発現させたところ、活性をほぼ保持しなかったが、*in vitro* でナトリウムイオンを加えると特異的に活性化することを見出した⁽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。しかし、大腸菌での発現系ではHaALPの活性が非常に低く、大腸菌の生育を阻害するため詳細な実験をするのは困難であった。そこで今回は新しいホストである *Brevibacillus choshinensis* の発現系の開発を目指した。この研究の最終目標は、好塩性タンパク質を用いた重金属や放射性セシウム等による環境汚染の除染や、様々な金属を回収する技術の開発であり、この技術は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。

2 実験

2.1 HaALP の構造解析

結晶化の条件の検討には Hydra II Plus One crystallization workstation (Matrix Technology) を用いて 25°C 条件下の蒸気拡散法で行った。沈殿剤は Crystal Screen I と II (Hampton Research)、Wizard Screen I と II (EmeraldBio) を用いた。条件検討後、沈殿剤を 0.2 M MgCl₂, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 30%(w/v) PEG 4000 とし、タンパク質濃度を 15 mg/ml とした。

X 線回折はビームライン BL5A と NW12A (Photon Factory, Tsukuba) とビームライン BL38B1 と BL41XU (SPring-8, Hyogo) で行った。

2.2 *B. choshinensis* を用いた HaALP の発現と精製

プラスミドの構築をブレヴィバチルス分泌発現システム (BIC 法) (TAKARA BIO INC.) を用いて行った。BIC 法は目的遺伝子の両端に直鎖上の発現ベクターの両末端と相同な 15 塩基対の配列を付加した DNA を、ベクターと混合してコンピテントセルに導入すると、菌体内において相同配列同士で組み換え反応が起こり、発現プラスミドが自動的に形成されるものである。ベクターに pBIC3 (TAKARA BIO INC.) を用い、HaALP を菌体内もしくは菌体外分泌発現させるために目的の HaALP をコードする遺伝子上流に分泌シグナルがないもの、もしくはあるものを構築した。形質転換は NTP 法 (TAKARA BIO INC.) で行ない、MTNm 培地で 37°C 一晩培養した。構築したプラスミドは AccuPrep™ Plasmid Extraction Kit (Bioneer) で抽出し、塩基配列の確認を ABI PRISM 3500x1 Genetic Analyzer (ABI) で確認した。

塩基配列が確認できたプラスミドを形質転換し、得られたコロニーを前培養し、100 ml TMNm 培地で培養した。その培地を HiTrap Q HP (1.6×2.5 cm, GE Healthcare) にアプラ

いし、Akta prime chromatography system (GE Healthcare)で NaCl 濃度 0.2 M から 0.7 M のグラジエントをかけ、目的のタンパク質を溶出した。Q カラムを用いた精製は同じ操作を2回繰り返した。精製したタンパク質量は、BCA 法⁴⁾を用い測定した。精製の純度を確かめるために Laemmli⁵⁾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。

2.3 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 MgCl_2) 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。

2.4 構造形成実験

精製標品 (0.1 mg/ml) を 8M Urea で変性させた後、50 mM Tris-HCl buffer に透析して完全に Urea を取り除いた後、0, 1 もしくは 3 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl もしくは 100 mM Diethanolamine buffer (pH 8.0~10.25) に透析し、構造形成の指標として活性を測定した。

3 結果、考察

3.1 HaALP の立体構造

構造解析の結果 2.1 Å の分解能で HaALP の立体構造を決定することが出来た⁶⁾。HaALP は 2 量体を形成しており、そのモノマー構造のコアには 11 本の β シートが並行に配置され、その周りに 19 本の α ヘリックスが囲んでいた。これは他の生物由来の ALP の構造と類似していたが、基質結合部位の入り口で疎水性のクラスターを形成しているクラウンドメインが存在した (Fig. 1)。タンパク質表面には他の生物由来の ALP よりも酸性アミノ酸が多く配置されており、これは高塩濃度下での可溶性を高めていることが予測された。一方で、モノマー構造の内部は非常に疎水性が高く、これは低塩濃度下での安定化に寄与しているものだと考えられる。

基質結合部位近傍には他の生物由来の ALP にもほとんど保存されている Zn 結合サイト、Mg 結合サイト、アルギニンが存在した。しかし、基質入り口近傍の M1 site (Zn 結合サイト) の構造は大きく違っていた。主に M1 サイト近くのリン酸結合部位を疎水性クラスターが覆っている事によるものだと考えられる。また、HaALP には他にも 2 つの Mg 結合サイトが存在することが明らかになった。

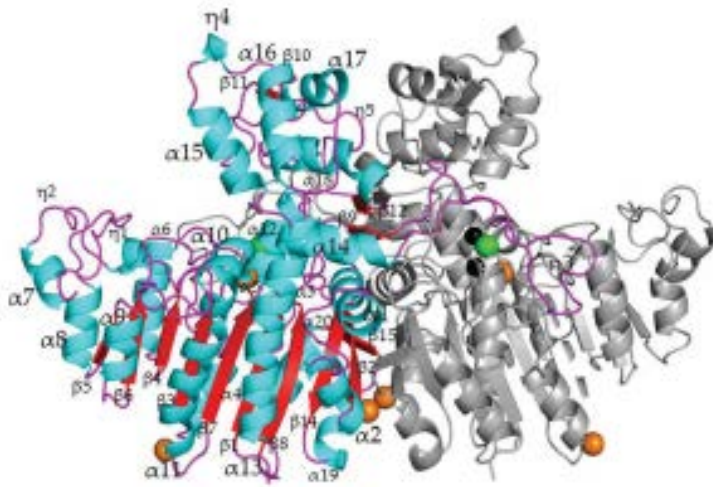


Fig. 1

3D structure of HaALP. The crown domain is located at the top of the figure. One monomer of the dimeric unit is coloured as follows; cyan, helix; red, β -strand; purple, loop. Zn^{2+} , Mg^{2+} and Cl^- ions are shown by spheres coloured black, orange and green, respectively.

3.2 HaALP の発現と精製

B. choshinensis による HaALP の菌体内生産を試みた形質転換体は、寒天培地上ではほとんど得られず、得られたコロニーも非常に小さかった。さらに得られたコロニーを液体培地に移して培養を試みても全く生育しなかった。このコロニーを用いたコロニー PCR では、目的の遺伝子が導入されていることが確認できたので、この結果から菌体内で発現させることにより、HaALP が *B. choshinensis* の生育に対して何らかの阻害をしていることが分かった。

そこで次に菌体外分泌を試みたところ、多くのコロニーを得ることが出来たので、寒天培地に含まれているアルカリフォスファターゼの基質 BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) の分解によって青く染まったコロニーを 5ml TMNm 培地で前培養し、その 1%を 100ml TMNm 培地に加え 30°C72 時間培養を行った。その培地を HiTrap Q HP カラムを用い 2 回操作を繰り返したところ、HaALP を高い純度で精製することに成功した (Fig. 2)。精製収率は表 1 に示す。*B. choshinensis* から分泌された HaALP の比活性は約 10 U/ml であり、これは本来の活性の約 1%程度であった。

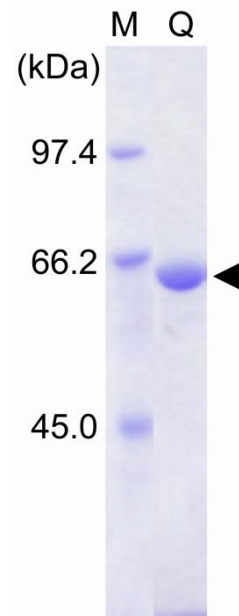


Fig. 2

SDS-PAGE of HaALP purified by HiTrap Q HP column.

M, marker; Q, HaALP fraction purified by HiTrap Q HP column. Filled triangle

shown next to the far right lane indicates the mobility in SDS-PAGE of HaALP.

Table 1 Purification of HaALP.

	総タンパク量 (mg)	総酵素活性 (U)	比活性 (U/mg)	精製度 (fold)	収率 (%)
上清	1267.66	909.92	0.72	1.00	100
HiTrap Q HP (1)	8.19	79.35	9.69	13.46	0.64
HiTrap Q HP (2)	7.82	78.36	10.02	13.92	0.62
3M NaCl 透析	7.42	57876	7800	—	0.59

3.3 金属イオン要求性と pH に依存した構造形成

精製した HaALP を 6 M 尿素で 1 晩変性させ、それを 3 M NaCl もしくは 3 M KCl を含むバッファーで透析したところ、3 M NaCl を含むものだけが活性を回復した。HaALP の活性化にはナトリウムイオンが必要であるというこの結果は、大腸菌で発現させた HaALP の結果と一致した²⁾。次に 3 M NaCl を含むバッファーの pH を中性からアルカリ性領域で構造形成を行ったところ、アルカリ性領域 pH9.8 以上で構造が回復した (Fig. 3)。この結果は塩基性アミノ酸の解離が HaALP の構造形成に影響していると推察される。また、HaALP は最大活性を得るまでに 120 時間以上の非常に長い構造形成時間を要した。一部の好塩性タンパク質の中には構造形成に長い時間を費やすものが見出されている⁷⁾。この様なゆっくりとした構造形成のメカニズムは、高塩濃度という極限環境においてタンパク質が正しくフォールディングするためのメカニズムの一つかもしれない。今後さらなる検討により、明らかにしていきたいと考えている。

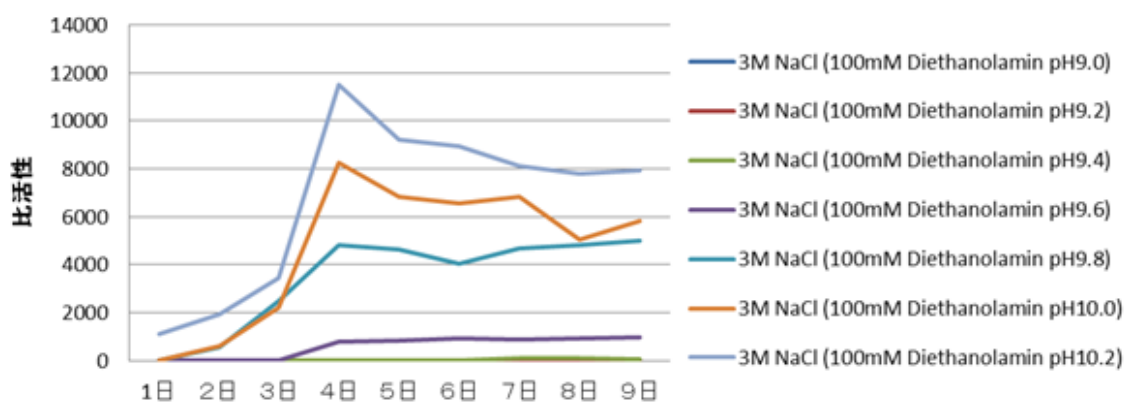


Fig. 3

The effect of different pH on activation of HaALP. Purified HaALP was dialyzed against 100 mM diethanolamine/2 mM MgCl₂ buffer containing 3 M NaCl. The activity was measured for 4 days.

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) 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.
- 5) U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- 6) S. Arai, Y. Yonezawa, M. Ishibashi, F. Matsumoto, M. Adachi, T. Tamada, H. Tokunaga, M. Blaber, M. Tokunaga, R. Kuroki, Structural characteristics of alkaline phosphatase from the moderately halophilic bacterium *Halomonas* sp. 593. *Acta Crystallogr. D-Biol. Crystallogr.*, 70 (2014) 811-820.
- 7) M. Ishibashi, T. Arakawa, M. Tokunaga, Facilitated folding and subunit assembly in *Escherichia coli* and in vitro of nucleoside diphosphate kinase from extremely halophilic archaeon conferred by amino-terminal extension containing hexa-His-tag. *FEBS Lett.*, 570 (2004) 87-92.

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 have unique characterizations such as high solubility and hardly to perform aggregation due to high number of acidic amino acids on the surface. In addition, they can bind metal ions abundantly on the surface. 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. To identify

the essential amino acid in Na-binding site of the HaALP, we attempted to express it using novel host, *Brevibacillus choshinensis*. This information can be applied to engineer metal-recovery protein. HaALP was successfully purified using anion-exchange chromatography and characterized. We found that refolding of HaALP from urea-denaturation occurred at high pH and required Na ion. Furthermore, the tertiary structure of HaALP was determined by X-ray crystallography to 2.1 Å resolution.