

研究報告書

「藻類由来フェリチンの機能強化によるナノマテリアル生産システムの創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 岩堀 健治

1. 研究のねらい

コバルト(Co), チタン(Ti), 金(Au), 白金(Pt) 等のレアメタルや貴金属は日本の産業にとって非常に重要な材料であるが、その産出地は中国、ロシア、オーストラリア、南アフリカ等に偏在しており日本ではほとんど産出しない。日本ではこれらの有用金属はほとんど輸入に頼っているため、多くの産業で国際価格の変動に大変影響を受けやすくなっている。一方、我が国における鉱山廃水、工場排水、都市鉱山、海洋中などの様々な環境中には極低濃度ではあるが大量の未利用有用金属資源が存在している。本研究は、貧鉄海洋環境という極限環境中で生育している海洋性ケイ藻類の細胞中に存在している金属蓄積タンパク質、フェリチンの低濃度金属取り込み機能に着目するとともに、そのバイオミネラリゼーション機構の解明と制御及び改良を行う事で、日本の様々な環境に存在している低濃度有用金属を選択的、効率的に回収するだけでなく、産業利用可能なバイオナノマテリアルの作製とそれを直接利用したナノ電子デバイスの作製を行うことで最終的にタンパク質の特徴を有効利用した“ナノマテリアル生産システム”の創成を目的としている。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、2009 年に世界で初めて発見された海洋性ケイ藻由来の金属貯蔵タンパク質であるフェリチンタンパク質のバイオミネラリゼーション機構解明を詳細に行うことで、本フェリチンタンパク質の大きな特徴である極低濃度の鉄イオンをフェリチン内部空洞へ取り込み、酸化鉄ナノ粒子を作製することができる理由を解明するとともに、本フェリチンを改良・強化することで鉱山廃水や工場排水となどの非常に低濃度ではあるが有用金属が多量に存在する環境中から目的金属を効率的に回収し産業利用可能なバイオマテリアル作製を実現するものである。

本さがけ研究の遂行により、多数のケイ藻由来リコンビナントフェリチンによるナノ粒子形成試験、タンパク質立体構造解析による金属イオンの結合部位探索などの実施により、本フェリチンにおけるマイナス電荷金属イオンの取り込む経路やなぜ低濃度の金属が空洞内部に取り込まれるのかという原因を明らかにするとともに、今まで全く不明であった海洋性ケイ藻由来フェリチンの様々な性質を明らかにすることができた。

また、実際の鉱山廃水や工場排水等から低濃度有用金属を回収するために、本ケイ藻由来フェリチンをベースとして遺伝子工学的手法を中心にフェリチンの改良・強化を行った。その結果、本フェリチンにおける改良・強化に効果的なアミノ酸種、変異部位の特定が行われ、さらにフェリチン空洞内部への各種金属結合ペプチドの修飾により、それぞれの金属に特化したオーダーメイドフェリチンの作製に成功し、特に金イオン、カドミウムイオン、リン酸イオン等の回収とそのナノ粒子化に成功した(図 1)。

本研究の推進により、今まで全く不明だった藻類由来フェリチンの一つであるケイ藻由来フェリチンの様々な特徴と低濃度金属に対する挙動が明らかになるとともに、藻類細胞が保持するフェリチンタンパク質の多様性の一端も解明することができた。また、本研究成果により鉱山排水や工場排水を原料とし、バイオマテリアル生産からバイオデバイス生産を通したバイオデバイス作製まで一貫して行うナノマテリアル生産システム創成の実現に近づいた。

(2) 詳細

研究テーマ A「ケイ藻由来フェリチンの発現と性質検討及び大量発現、精製法の確立」

海洋性ケイ藻由来フェリチンの全遺伝子を pET30a プラスミドに融合し、大腸菌にクローニングすることで大量発現系の構築を行った。特に IPTG 誘導剤の添加後培養温度を 37°C から 26°C に低下させることで、他のタンパク質の生産を抑えながらフェリチンタンパク質の生産量増加を達成した。さらに、フェリチンの大量精製ステップの構築も行い、今回新規に開発した 60°C 熱処理法とカラムクロマトグラフィーを併用する連続精製法により、誰でも簡単にフェリチンの精製が可能となるフェリチン簡便精製法の構築に成功した。これらの最適培養条件の検討とフェリチン簡便精製法の確立により最終的に 3 L の LB 培地を用いた培養から 300 mg 以上の精製ケイ藻由来リコンビナントフェリチン(FerA)を得ることが可能となった。

精製された FerA は種々の分析により哺乳類のウマ由来フェリチン (HsAFr)と同じく分子量約 480 kDa、外径 12 nm で直径 7 nm の内部空洞を持つ球殻状タンパク質であることが確認された。さらにウマ由来フェリチンの 10 倍以上の二価鉄イオンの取り込み活性を保持する事や 1/20 の低濃度鉄イオンも FerA 空洞内部に取り込むことが明らかになった。この原因を究明したところ FerA の空洞内部表面の結晶核形成部位や酸化活性部位と呼ばれる部位近辺に存在しているグルタミン酸 (Glu) が強い影響を与えていることが一つの大きな原因である事が明らかになった。

研究テーマ B「ケイ藻由来フェリチンによるナノ粒子作製と改良ウマフェリチンの構築」

研究テーマ A で得られた知見を元に、元々、低濃度鉄イオンが取り込むことができないウマ由来フェリチン (HsAFr) の核形成部位や酸化活性部位と呼ばれている部分に 1 サブユニット当たり 1~3 個の Glu を導入して作製した改良ウマフェリチンは従来の 3.5 倍以上の鉄イオンの取り込みと鉄酸化活性の増大を示した。この結果より、フェリチンの内部空洞表面の Glu 増強は正電荷を持つ鉄イオンの取り込み促進に非常に重要であることが明らかになった。また、ケイ藻由来リコンビナントフェリチン (FerA) において、種々の低濃度金属に対する取り込みと有用ナノ粒子形成について検討した結果、現在までに Fe だけではなく Co, CdSe, ZnSe, リン酸塩等のナノ粒子を低濃度の金属イオン源より作製することに成功した。さらに、FerA 変異フェリチンを用いた金属取り込み実験やフェリチンの立体構造解析などによる FerA の詳細なバイオミネラリゼーション機構解明を行い、

- (1) リン酸イオン等のマイナス電荷を持つイオンは 4 回対称チャネルから空洞内部に取り込まれる。
- (2) CdSe ナノ粒子作製時の Cd イオンはフェリチン内部に人工的に作製した Glu 残基に結合し、この部分が核形成部位となっている。

等のケイ藻由来フェリチン FerA に関する新しい特徴が解明されるとともに、詳細なバイオミネラルゼーション機構の解明に成功した。

研究テーマC「バイオミネラルゼーション機構の強化と金属回収」

ケイ藻由来フェリチンを有効活用し鉱山廃水等の混合金属溶液中から産業に有用な金属のみを回収するため Au, ZnO, SiO₂ 等に特異的に結合しミネラルゼーションを行う新規金属結合ペプチドの取得に成功し、その性質検討を行った。さらに廃水中から Au を回収するために FerA の空洞内部に Au 結合ペプチドを融合したオーダーメイド FerA フェリチン (FerA-dCys-Au) を作製と Au ナノ粒子形成条件の検討を行い、フェリチン空洞内に Au イオンの取り込みと Au ナノ粒子の作製に成功した。

本研究においてケイ藻由来フェリチン(FerA) における低濃度金属取り込み機構が明らかになり、鉄だけでなくその他の金属イオンも低濃度で内部に取り込み、ナノ粒子化をすることが可能となった。またプラス電荷をもつ低濃度金属イオンを回収するためには、フェリチンの核形成部位に人工的にマイナス電荷増加させると効果的である。また金属を特異的に吸収しナノ粒子を作製するためには、目的金属に特異的に結合する金属結合ペプチドをフェリチン内部に融合することが非常に有効な手段の一つになることが明らかになった。

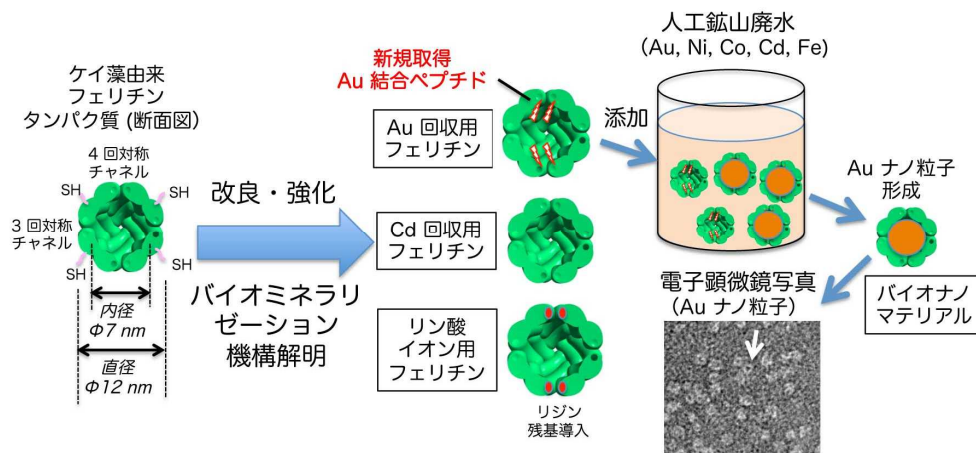


図1,フェリチンタンパク質による有用金属回収と Au ナノ粒子作製

3. 今後の展開

現在までのさきがけ研究の遂行により、今まで全く不明だったケイ藻由来フェリチンの特徴と低濃度金属に対する挙動が明らかになるとともに、ほとんど解明されていない、藻類由来フェリチンの多様性の一端が解明できた。また、ケイ藻由来フェリチン (FerA) の金属取り込み機構の解明により、フェリチンの金属の取り込み速度上昇や目的金属を取り込むために利用すべき金属結合ペプチドの修飾位置や改良・強化のための重要なアミノ酸部位を理解することができた。特に、鉱山廃水や工業廃水から有用金属を回収するために Au 結合ペプチドを 4 回対称部位に修飾して作製したオーダーメイドフェリチン (FerA-dCys-Au) は Au イオンを選択的にミネラルゼーションすることが確認されており、有用金属の回収のための重要なバイオ素子として十分活用できる。

今後は、改良した FerA と世界的に研究が進んでいる金属結合ペプチドを効果的に組み

合わせる事で、実際の種々の鉱山廃水から産業利用可能な金属を効率良く回収し、バイオナノ材料作製を行う。さらに、それに連動する電子デバイス作製を行うことで、総合的なバイオ材料生産システムの創成を目指す。また、多種多様な藻類由来フェリチンの新規取得と機能開発・強化をさらに続けることで、藻類由来フェリチンの優れた機能をバイオ、化学、医療、環境等の分野において応用展開する予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本さがけ研究では、今まで全く不明であった海洋性ケイ藻由来の金属貯蔵タンパク質であるフェリチンタンパク質について、その特徴とバイオミネラリゼーション機構を解明した。ケイ藻由来フェリチンの空洞内部表面にあるグルタミン酸残基の影響によりプラス電荷を持つイオンが空洞内部に流入しやすくなっていることや、マイナス電荷イオンは4回対称チャネルから空洞内部に流入していることなどを突き止め、今までの様々なフェリチンと比較して極低濃度の金属イオンをタンパク質内部に取り込むことができる原因とバイオミネラリゼーション機構解明に成功したことは、藻類の細胞機能やタンパク質科学の面からも非常に評価されるものである。本研究における藻類細胞由来のフェリチンの機能解析結果は藻類細胞が水陸環境中の鉄イオン等の金属の循環に重要な役割を演じていることを示唆しており、さらにフェリチンの生物における多様性の解明に繋がる知見が得られたことは非常に有意義な成果であると考えられる。

また“バイオ材料生産システムの創成”という目的を達成するために Au 結合ペプチドとケイ藻由来フェリチンの融合によって作製したオーダーメイドフェリチン(FerA-dCys-Au)は、人工混合金属中から金(Au)イオンを選択的に還元しナノ粒子化する能力があり、本フェリチンをさらに発展させることで、鉱山廃水等の混合金属廃水から有用ナノ粒子を作製できるプロセス構築へ重要な基礎的知見が得られ、様々な分野における応用展開が約束されたと考えられる。

本研究の推進にあたり技術員1名を長期間雇用し、戦略的に腰をすえて時間のかかるバイオ関連の基礎的実験部分を進めた結果、藻類フェリチンに関する遺伝子工学手法、大量培養方法、大量精製方法などの構築や藻類由来フェリチンの結晶作製や構造解析等の様々な基礎研究を行うことができ、その後の研究発展や応用戦略への橋渡しのための基礎的な知見とスキルを積み上げる事ができた。さらにさがけ研究費の予算で購入した HPLC の自動分析システムや新型タンパク質精製装置 (AKTA, pure) 等の効果的な導入により本研究スピードが非常に促進され、非常に効率的、効果的に研究予算を活用することができたと思われる。また、本研究では高価な合成ペプチドを多種類、大量に利用することができたことにより、新規の Au 結合ペプチドの発見と結合機構の解明を迅速に行う事ができ、非常に効率的かつ有効に研究費の執行を行うことができた。

今後は、本さがけ研究で得られた基礎的知識と数々のオーダーメイドフェリチンを有効に利用し、実際の鉱山廃水、工業廃水や重金属汚染土壌といった環境に適応させ、様々な環境下における金属回収システムの作製を目指すことで、廃棄物を源とした有用金属回収、鉱害(公害)防止、バイオ材料作製の同時達成が可能な“藻類フェリチンによるナノマ

テリアル生産システムの創成”の完成を目指すと共に、環境に配慮したバイオマテリアル作製を行う分野、「環境バイオマテリアル分野の構築」を目指していきたい。また、廃棄物より作製したバイオナノマテリアルは、現在、応用展開を推進しているデバイス分野のみならず、バイオ、化学、医療、環境等の多くの分野に波及していくような製品作りも念頭にいれ並行して進めていく予定である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。)

(研究総括)

本課題研究は、藻類フェリチンの特徴を解明し、それを改良・強化することで様々な環境に存在する低濃度の有用金属を回収しようというものである。研究初期は非常に基礎的な研究であり、実験の進捗具合が少々心配されたが着実に基礎実験を積み重ね、ケイ藻由来フェリチンの数々の特徴を発見し、バイオミネラリゼーション機構の解明したことは非常に評価できる。研究費も適切に使用しており、研究を迅速に進めるため新しい装置や新しい技術の導入を率先して行っている。また、領域内で多くの研究者と共同研究をすすめ、まだ成果は途中のものが多いが、新規フェリチンの探索や性質検討、応用展開などを積極的に進めている点も今後の発展に期待できる。

本課題研究者はほとんど研究されていない藻類細胞由来の新規フェリチンの単離と特殊機能解明を進め、藻類細胞におけるフェリチンの役割の探索、さらに多様性についても研究を広めていこうとしており、基礎科学的にも非常に興味深い研究に発展する多くの要素を持っている。

本研究で得られた基礎的知見やそれぞれの金属に対応したケイ藻由来改良フェリチンを利用することで、本研究の最終目的である「藻類由来フェリチンの機能強化によるナノマテリアル生産システムの創成」は実現間近であると考えられる。さらに本プロセスを改良することで発展途上国における重金属汚染浄化や温泉や都市鉱山からもナノマテリアルを作製することが可能となるはずである。今後、さらに多くの藻類由来の特殊なタンパク質の機能開発と有効利用を進めることで、有用金属資源における藻類細胞の利用と有用金属の省資源、有効活用が達成できる社会の実現に期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. <u>Kenji Iwahori</u> , Midori Yamane, Sakiko Fujita, Ichiro Iwahori,
“Synthesizing CdSe nanoparticles by using a low concentration of cadmium ions and the apoferritin protein cage of marine pennate diatoms”
<i>Materials Letters</i> , 2015, 160 ,154–157 |
| 2. Koichiro Uto, kazuya Yamamoto, <u>Kenji Iwahori</u> , Takao Aoyagi, Ichiro Yamashita,,
“Solid-phase PEGylation of an immobilized protein cage on polyelectrolyte multilayer”
<i>Colloids and Surfaces B-Biointerfaces</i> , 2014, 113 , 338–345 |

(2)特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 岩堀健治、山下一郎

「タンパク質ナノテンプレートを用いた蛍光発光ナノ粒子の作製と特徴」
バイオテクノロジーシリーズ メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回
収, シーエムシー出版,(2015), pp.166-174

2. 岩堀健治

「生物に学ぶ・高次自己組織化を生かしたバイオナノプロセス」
日本農芸化学会 化学と生物(2014), 52 (4) pp.233-240

3. Kenji Iwahori, Ichiro Yamashita,

“Nanoparticle Synthesis: Biological Path”
Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology,third Edition,
CRC Press: New York,(2014), pp. 3144-3151

4. 岩堀健治、山下一郎

「バイオテンプレートによるナノマテリアル作製技術と電子デバイス作製」
生物模倣技術と新材料・新製品開発への応用、(株)技術情報協会,(2014),
pp.607-618

5. 岩堀健治

「第3章 メタルバイオテクノロジーの応用 3,3,4 バイオナノ分子材料」
地球を救うメタルバイオテクノロジー、成山堂書店,(2014), pp.171-182

6. 岩堀健治、山下一郎

「バイオテンプレートを用いたナノマテリアル作製と応用展開」
高分子, (2013), 62(2),pp73-75