

重金属吸着ドメインの微生物細胞表層への ターゲッティング

中島 春紫・北本勝ひこ*

工業化の発展に伴って地球上に徐々に進行している環境汚染のなかでも、重金属による汚染はきわめて深刻なものの一つである。我が国では、熊本県水俣湾と新潟県阿賀野川流域で発生したメチル水銀による水俣病と富山県神通川流域で発生したカドミウムによるイタイイタイ病が重大な社会問題となった重金属汚染による中毒症として代表的であるが、その他にも6価クロムによる鼻中隔穿孔症、ニッケルによるアレルギー、環境ホルモンとしての影響が指摘されている有機スズなど枚挙にいとまがない。ひとたび環境に拡散してしまった重金属を回収するのは至難の業であるが、生物を用いた環境修復(Bioremediation)の一環として微生物を吸着剤として利用し水圏から重金属を回収するバイオソルベント(Biosolvent)の開発は、大規模な設備やエネルギーを必要としない「環境にやさしい」技術として注目され研究が進められている。

ほとんどの微生物の表層は陰荷電を帯びていて、非特異的に陽イオンを吸着する傾向がある。¹⁾しかし、工業的には少量だが毒性の強い金属イオンを分離する、または高価な希少金属を回収するなどの目的で、さまざまな金属イオンの混ざり合った溶液から特定の金属イオンを吸着する能力を有する微生物が望まれる。さまざまな金属イオンを吸着する微生物は広範囲にスクリーニングされており、金・銀・水銀・カドミウム・ウランなどを吸蔵する真菌類およびバクテリアが多数発見されている。²⁾重金属汚染された地域からスクリーニングされたものは、同種の微生物でも汚染重金属の吸蔵能が高い傾向にある。微生物の重金属吸蔵能はさまざまで、カドミウムについては菌体重量の20%以上、³⁾ウランでは60%⁴⁾もの吸蔵を示す微生物が発見されており、工業化されていないが海水からのウランの濃縮にも成功している。

一方、金属吸着能を有する微生物を得るために、遺伝子工学的手法を用いた育種が試みられるようになってきた。この場合、重金属イオンを包み込む能力を有するペプチドを、*in vivo*で菌体の表面に発現させるという戦略が有効である。細胞表層に目的のペプチドを発現させるために、グラム陰性細菌の外膜タンパク質・リポタンパク質・鞭毛タンパク質などを細胞表層アンカーとして利

用し、酵素や抗体タンパク質を発現させるシステムがここ数年の間に報告されている。^{5,6)}

1. 大腸菌細胞表層への His クラスターの ターゲッティング

大腸菌の LamB タンパク質は、外膜に局在するホモ 3 量体のマルトース受容体であり λ フェージ感染の標的となることが知られている。また、非常に柔軟で外来ポリペプチドのキャリアーとして最も良く研究されている。単量体の LamB タンパク質は膜貫通ドメインを 5 つ有しており、膜貫通ドメイン間の外界に接触している領域に外来ポリペプチドを挿入すれば、この外来ドメインは N 末端と C 末端の両方を外膜にアンカーされた形で外界に接触することになる。LamB タンパク質のアミノ酸 153-154 間と 253-254 間の 2 ヶ所は、タンパク質の全体構造や 3 量体形成に悪影響を与えることなく、長鎖のポリペプチドを挿入することのできる領域として利用可能である。⁷⁾ヒスチジン残基が連続した His クラスターは、2 価の金属イオンと安定な共同体を形成するために、タンパク質に金属イオンアフィニティーカラムへの親和性を与える His タグとしてよく利用される。Sousa ら⁸⁾は、1 組または 2 組の 6 連続 His クラスター (His⁺) を LamB タンパク質の 153-154 位アミノ酸部位に挿入した融合遺伝子 (LamB153-1His⁺, LamB153-2His⁺) を作製し、大腸菌へ導入した。His クラスターをもつ融合タンパク質が外膜画分に安定に発現されていることを認めた。この融合タンパク質の発現により宿主菌株が λ フェージに対して感受性になったことから、挿入された His クラスターは LamB の構造および外膜への局在性に影響を与えないことが示された (Fig. 1)。

この融合 LamB を発現する大腸菌株を、20 μ M Cd²⁺ を含む培地で 4 時間生育させたのち、集菌し菌体に吸着された Cd²⁺ を定量したところ、野生型 LamB を発現する株に比べて、LamB153-1His⁺ 株は 5 倍に、LamB153-2His⁺ 株では 11 倍に増加した。しかし、宿主菌株の Cd²⁺ への耐性は増加していないことから、重金属存在下での生存と重金属の吸着とは独立の現象であることも明らかとなった。⁸⁾

*著者紹介 (代表) 東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 (教授)

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1 TEL. 03-3812-2111 (5161) FAX. 03-5689-7294 E-mail: akitamo@hongo.ecc.u-tokyo.ac.jp

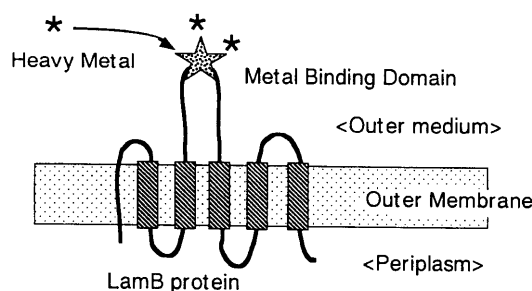


Fig. 1. Expression of metal absorption protein on bacterial cell surface. Metal binding polypeptides are inserted into the outer surface loop of the LamB, *E. coli* outer membrane protein. The hybrid protein is secreted to the outer membrane of *E. coli* with proper topology. Striped bars indicate membrane spanning domain in LamB protein. Hatched star indicates metal binding domain; His cluster and metallothionein.

LamB タンパク質上の His クラスターが細胞の最外層で 2 価金属イオンと結合する機能を発揮するのであれば、その大腸菌の菌体そのものが 2 価金属イオンを含む固体のマトリックスに結合するはずである。そこで、ニッケルなどの 2 価の遷移金属イオンに対する強力なキレーターであるニトリロ 3 酢酸 (NTA) を結合したアガロースビーズを Ni^{2+} イオンで処理して NTA 基を飽和させた Ni^{2+} -NTA アフィニティレジンを作製した。予想通り、LamB-His 融合タンパク質を発現する大腸菌細胞はこの Ni^{2+} -NTA マトリックスに吸着したが、野生型 LamB を発現する大腸菌は吸着しなかった。吸着した大腸菌細胞は His- Ni^{2+} 結合を特異的に阻害するイミダゾールを添加することにより生きのまま遊離したことから、 Ni^{2+} -NTA への吸着と解離により大腸菌細胞が破壊されることはない。 Ni^{2+} 前処理をしない NTA アガロースレジンには大腸菌細胞の吸着は起こらなかったことから、細胞表層に発現した融合タンパク質の His 残基と Ni^{2+} イオンとが直接結合していることが確認された。

2. 大腸菌細胞表層へのメタロチオネインのターゲッティング

細胞表層に発現させる金属吸着ドメインを選択することにより、吸着する金属イオンの選択性を得ることが可能となる。その有力な候補の一つがメタロチオネインであり、真核生物のほとんどは、 Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{+} などの遷移金属イオンに対して強力な結合能を持つ小分子量のタンパク質メタロチオネインを生産する。分子内に多数のシステイン残基を有するメタロチオネインは生物間で非常に良く保存されているが、2 つのクラスに大別される。動物細胞の生産する Class 1 メタロチ

オネインは通常 20 個のシステインを含む 61 アミノ酸からなり、7 個の 2 価金属イオンまたは 12 個の 1 価金属イオンと結合する。菌類の生産する Class 2 メタロチオネインの中で、最もよく研究されている酵母のメタロチオネインは酵母の銅耐性に関与する遺伝子 *CUP1* にコードされ、12 個のシステインを含む 53 アミノ酸よりなり、4 個の 2 価金属イオンもしくは 8 個の 1 価金属イオンと結合する。

Sousa ら⁹⁾は、酵母のメタロチオネイン (YMT) 遺伝子を、大腸菌外膜タンパク質 LamB の外界に露出したループ上の 153-154 位に挿入した融合遺伝子を作製して大腸菌に導入した。形質転換株は、野生型の LamB タンパク質とほぼ同じ量の LamB154-YMT⁺ 融合タンパク質を安定に外膜画分に発現した。また、この菌株が λ ファージに感受性を示したことから融合タンパク質は野生型 LamB と同様の構造を維持していることも確認された。また、金属吸着容量の多い Class 1 のヒトのメタロチオネイン (HMT) 遺伝子を同様に LamB の 153-154 位に挿入したところ、融合タンパク質 LamB154-HMT は LamB154-YMT⁺ と同様に発現し、宿主菌株を λ ファージ感受性にした。

融合タンパク質を発現する大腸菌株を希薄な Cd^{2+} を含む培地で培養したところ、野生型の LamB を発現する株に比較して、LamB154-His⁺ は 5 倍、LamB154-YMT⁺ は 15 倍、LamB154-HMT は 20 倍の Cd^{2+} を吸着した。最高の吸着能を示した LamB154-HMT では、 Cd^{2+} の吸着量は乾燥菌体 1 mg あたり 30 nmol に達した。また、 Cu^{2+} および Zn^{2+} の吸着量も野生型 LamB の発現株に比較して 2 倍から 4 倍に増加した。

しかし、 Cd^{2+} を吸着した細胞を EDTA で処理したとき、吸着量の約 40% しか解離しなかったことから、細胞表層のメタロチオネインに結合している Cd^{2+} は全体の半分程度で、残りは細胞表層の他の成分に結合していると考えられる。興味深いことに、発現したメタロチオネイン分子に対する理論的な重金属イオンの結合量よりも、1 桁多い Cd^{2+} 吸着が観察されている。すなわち、融合タンパク質は細胞表層周辺の金属イオン濃度を上昇させることにより、メタロチオネイン分子に直接結合する金属イオンに加えて、他の細胞表層成分への金属イオンの吸着を促進していると考えられる。

3. 酵母の細胞表層へ His クラスターのターゲッティング

酵母は運動性を持たないうえに、大腸菌と比較して数

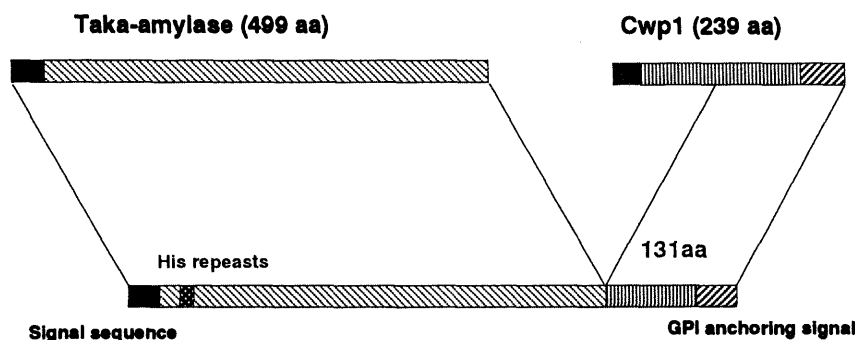


Fig. 2. The structure of the plasmid pYTA-CH for expression of histidine repeat on the cell wall of *S. cerevisiae*.

百倍から千倍もの体積を有するため、自然沈降もしくは遠心分離により簡便に菌体を培養液から回収することが可能である。汚染水から重金属を効率よく回収除去することを考えたとき、酵母はこのような点からバイオソルベントとしてすぐれている。一方、酵母などの真菌の細胞壁に局在するタンパク質の多くはグリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) を介して結合することにより、細胞表層に提示されている。そこで筆者らは、酵母の GPI アンカータンパク質である CWP1 (cell wall protein)¹⁰⁾ と His クラスターとの融合タンパク質を作製し、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) で発現させた。¹¹⁾ 具体的には、まず麹菌タカアミラーゼ (TAA) cDNA の C 末端に CWP1 の GPI アンカー領域 (C 末端部131アミノ酸) を結合した融合遺伝子を作製し、*S. cerevisiae* YPH500 株に導入して発現させた。本来、TAA は培地中に分泌されるが、TAA-CWP は細胞壁に局在することを確認した。TAA はその立体構造が詳細に解明されており、そのコンフォメーションに影響を与えないと考えられる成熟酵

素の N 末端部分に 6 個の His を挿入するようにデザインして新たな融合遺伝子を作製し、酵母 YPH500 株に導入した (Fig. 2)。

こうして得られた形質転換体が、細胞表層に本融合タンパク質を発現していることを、TAA の酵素活性および抗 TAA 抗体により確認した。CWP1 タンパク質は、細胞壁溶解酵素 β -1,3-グルカナーゼ、 β -1,6-グルカナーゼ、ホスホジエステラーゼにより遊離してくることから、GPI アンカー中のマンノースと細胞壁の β -1,6 グルカンに結合していると考えられる。以上の知見から、この形質転換株では細胞表層に Fig. 3 に示すような構造で TAA-His-CWP 融合タンパク質が発現していると想定される。

次に TAA-His-CWP 融合タンパク質を発現している酵母細胞を、2 ppm の金属溶液 (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) に懸濁して 2 時間振盪培養し、酵母菌体に吸着された Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} を原子吸光法により定量した。His クラスターを持たない TAA-CWP 発現株に比較して、 Cu^{2+} は

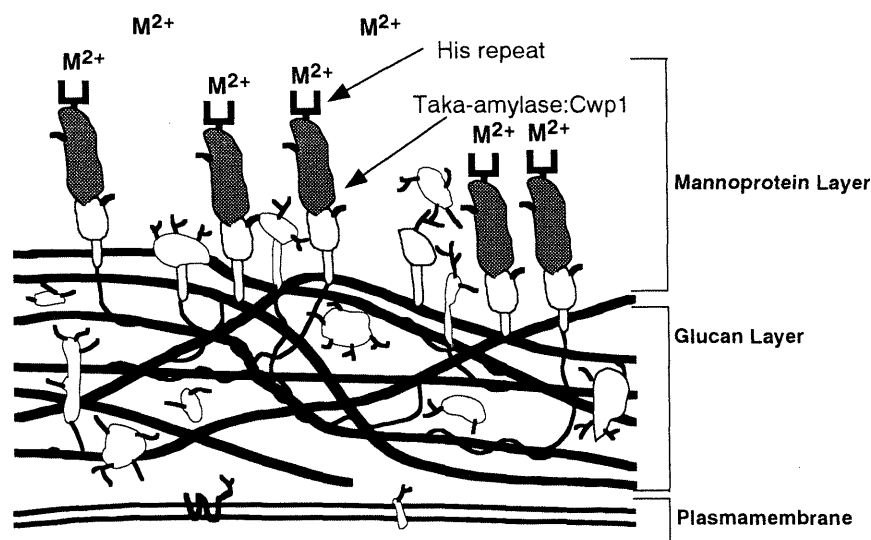


Fig. 3. The presentation to the external medium of a histidine repeat with an ability to chelate metal ions (M^{2+}).

約3倍、 Ni^{2+} は約2倍の吸着能が認められた。吸着量としては上記の大腸菌の報告に及ばないが、環境からの重金属の回収除去を想定した場合、酵母などの真菌類を用いた育種の可能性を示していると考えている。

おわりに

微生物細胞表層に重金属吸着ドメインをターゲティングさせる試みは、まだ多くはない。しかし現在、細胞表層へのターゲティングのためのさまざまな技法の開発が精力的に進んでいる。また、メタロチオネインの他にもフィトケラチンなど重金属吸着タンパク質として知られているものの遺伝子も多数が報告されている。

筆者らは、重金属としてニッケルを対象として、吸着能力の高い微生物のスクリーニングを行い、多数の野生酵母コレクションから乾燥菌体1gあたり43mgと多量のニッケルを吸着除去する酵母の単離に成功し、*Candida lusitanae*と同定した。¹²⁾このニッケル吸着機構を解析し、ニッケル吸着ドメインを細胞表層にターゲティングすることにより、より強力な重金属吸着微生物の育種が可能かもしれない。

細胞表層というこれまであまり利用されていない空間に、重金属吸着のような機能ドメインを発現させて、新

たな環境修復機能をもつ微生物を育種する研究が、今後発展することが期待される。

文 献

- 1) Lovely, D. R., Phillips, E. J. P., Gorby, Y. A., and Landa, E. R.: *Nature*, **350**, 413-416 (1991).
- 2) Gadd, G. M.: *Chemistry & Industry*, **13**, 421-426 (1990).
- 3) Holan, Z. R. and Volesky, B.: *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 819-825 (1993).
- 4) Nakajima, A. and Sakaguchi, T.: *Appl. Microb. Biotech.*, **24**, 59-64 (1986).
- 5) Hofnung, M.: *Methods Cell Biol.*, **4**, 77-105 (1991).
- 6) Georgiou, G., Poetschke, H., Stathopoulos, C., and Francisco, J. A.: *Trends Biotech.* **11**, 6-10 (1993).
- 7) Charbit, A., Ronco, J., Michel, V., Werts, C., and Hofnung, M.: *J. Bacteriol.*, **173**, 262-275 (1991).
- 8) Sousa, C., Cebolla, A., and de Lorenzo, V.: *Nature Biotechnol.*, **14**, 1017-1020 (1996).
- 9) Sousa, C., Kotrba, P., Ruml, T., Cebolla, A., and de Lorenzo, V.: *J. Bacteriol.*, **180**, 2280-2284 (1998).
- 10) Shimoi, H., Iimura, Y., and Obata, T.: *J. Biochem.*, **118**, 302-311 (1995).
- 11) 大隅恵介, 本條秀子, 下飯 仁, 北本勝ひこ: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 218 (1997).
- 12) Kambe-Honjoh, H., Sugawara, A., Yoda, K., Kitamoto, K., and Yamasaki, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 373-378 (1997).

枯草菌を中心としたグラム陽性細菌の表層工学

関 口 順 一

異種タンパクを酵母や動物細胞表層に局在化させる技術は最近注目されている分野であるが、細菌の表層への局在化もまた細菌の応用範囲を広げるうえで重要である。細菌におけるこの最初の試みは大腸菌の外膜タンパク (LamB, OmpA, PhoE) であったが、¹⁻³⁾その後リポタンパク、鞭毛タンパクなどを用いて異種タンパクの表層への局在化が報告された。^{4,5)}一方グラム陽性細菌においては staphylococci, streptococci で精力的に研究がなされており、⁶⁾アンカー法によりペプチドグリカン層に直接結合させる方法が用いられている (後述)。そして異種タンパクを表層に持つ細菌は、環境汚染物質の除去や微生物生体触媒として、また診断の分野でも有効であろうと思われる。ここではグラム陽性細菌におけるアンカー法について説明するとともに、枯草菌細胞壁溶解酵素の細胞壁結合ドメインを利用した例を示し、さらに表層タンパクのプロテオーム解析、ゲノム解析から明らかとなった種々の細胞壁結合ドメインを持つ細胞壁溶解酵素群

についても触れてみたい。

1. グラム陽性細菌における表層局在化技術

グラム陽性細菌において異種タンパクを表層に局在化させる技術として Schneewind らは staphylococci のプロテイン A に注目し、ペプチドグリカンに直接異種タンパクを結合させる技術を確認した。^{7,8)}プロテイン A はタンパクの N 末端側に IgG 結合ドメインを持ち、C 末端側には細胞壁との相互作用をしめすドメイン、続いて LPXTG モチーフ、疎水性領域、短かい荷電アミノ酸からなる構造を示す (Fig. 1)。この C 末端構造は他にも *Staphylococcus carnosus* のフィブロネクチン結合タンパク B(FnBPB)⁹⁾や *Streptococcus pyogenes* の M6 タンパク¹⁰⁾など、60以上の表層タンパクに認められる。⁷⁾このアンカー法の特徴は、LPXTG モチーフのトレオニンとグリシンの間を sortase が切断した後、細胞壁ペプチドグリカンの架橋構造の Gly₅ (ペンタグリシン) の末端アミノ基