

助成番号 9901

## 生物機能を応用した海水中のレアメタルの高選択的分取

助成研究者：道端 齊 (広島大学大学院理学研究科附属臨海実験所)  
 共同研究者：宇山 太郎 (広島大学大学院理学研究科附属臨海実験所)  
 植木 龍也 (広島大学大学院理学研究科附属臨海実験所)  
 福光 孝巳 (広島大学大学院理学研究科附属臨海実験所)  
 川野 園子 (広島大学大学院理学研究科附属臨海実験所)

海水中にはバナジウムやクロム等わが国ではほとんど産出しない希少金属(レアメタル)が溶解している。それらの資源量は陸上での確認埋蔵量を大幅に上回る。レアメタルは半導体、超伝導体、磁性体やエネルギー蓄積素材等の次世代の産業技術を支える機能材料として欠かせない金属である。

研究代表者のグループは海産無脊椎動物のホヤが海水のバナジウム濃度の1,000万倍( $10^7$ )ものバナジウムを高選択的に濃縮することに着目し、その濃縮機構を解明する研究を20年来に亘って行ってきた。その結果、最近バナジウムと高選択的に結合する12.5kDa および15kDaのバナジウム結合タンパク質(VAPs)の抽出・精製とそれらをコードする遺伝子のクローニングに成功した。

そこで平成11年度は、このバナジウムと高選択的に結合するホヤ由来のVAPs 遺伝子に基づいて、金属結合能を持つ人工タンパク質の合成を行うとともに金属イオン結合能の解析を行った。

ホヤ由来のバナジウム結合タンパク質(VAPs)をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを大腸菌に形質転換し、発現誘導を行った。その結果、マルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質を大腸菌に発現させることに成功した。さらにその融合タンパク質のみをMBPと親和性を有するアミロースレジンをを用いて精製し、この精製された融合タンパク質とバナジウムイオンとの結合能を平衡透析法で解析したところ、予備的な結果ではあるが、タンパク質1モル当たり10ないし15モル程度のバナジウムイオンと結合することを見出した。

ホヤの生理機能を応用して作製した組み換えタンパク質のバナジウムイオン結合能を初めて明らかにすることができた。今後、さらに検討を進め、VAPsとバナジウムイオンの結合定数を明らかにするとともに、金属イオンの結合部位を特定したい。



助成番号 9901

## 生物機能を応用した海水中のレアメタルの高選択的分取

助成研究者：道端 齊 (広島大学大学院理学研究科 附属臨海実験所)  
 共同研究者：宇山 太郎 (広島大学大学院理学研究科 附属臨海実験所)  
 植木 龍也 (広島大学大学院理学研究科 附属臨海実験所)  
 福光 孝巳 (広島大学大学院理学研究科 附属臨海実験所)  
 川野 園子 (広島大学大学院理学研究科 附属臨海実験所)

## 【目的】

海水中にはバナジウムやクロム等わが国ではほとんど産出しない希少金属(レアメタル)が溶解している。それらの資源量は陸上での確認埋蔵量を大幅に上回る。レアメタルは半導体、超伝導体、磁性体やエネルギー蓄積素材等の次世代の産業技術を支える機能材料として欠かせない金属である。

研究代表者のグループは海産無脊椎動物のホヤが海水のバナジウム濃度の 1,000 万倍 ( $10^7$ )ものバナジウムを高選択的に濃縮することに着目し、その濃縮機構を解明する研究を 20 年来に亘って行ってきた。その結果、最近バナジウムと高選択的に結合する 12.5kDa および 15kDa のバナジウム結合タンパク質(VAPs)の抽出・精製とそれらをコードする遺伝子のクローニングに成功した。

そこで平成 11 年度は、このバナジウムと高選択的に結合するホヤ由来の VAPs 遺伝子に基づいて、金属結合能を持つ人工タンパク質の合成を行うとともに金属イオン結合能の解析を行ったので報告する。

## 【方法】

## (1)発現ベクターの構築

ミニプレップ法により抽出した VAP の cDNA の全長をインサートに含むプラスミド DNA 0.5  $\mu$ g を鋳型として合成プライマーによって PCR 増幅を行った。反応は、まず 94°C で 2 分の反応を行った。そして、94°C で 30 秒、42°C で 45 秒、72°C で 45 秒の反応サイクルを 30 サイクル行い、最後に 72°C で 5 分の反応を行った。1.5%低融点アガロースゲル電気泳動によって精製した後、100ng/ $\mu$ l の TA ベクターとライゲーションした。インサートが挿入されていることを確認したクローンからプラスミドを調製し、ダイ・プライマー法によって塩基配列の確認を行った。

シーケンスを確認したプラスミドを少量調製し、制限酵素 *EcoRI* および *SaI* 切断し、

低融点アガロースゲル電気泳動により精製した。精製した DNA 断片と別に制限酵素 *EcoRI* と *SaII* で切断した pMAL-c2 ベクター 0.1 $\mu$ g とを、ライゲーションした後、大腸菌 TB1 株に形質転換した。上と同様に塩基配列の確認を行った。

## (2)組み換えタンパク質の大量調製と精製

得られた形質転換体を 300ml LB-amp 液体培地中で 37 $^{\circ}$ C、16 時間振とう培養を行った。ジャーファーマンター中の 3l LB-amp 液体培地に培養液を移し、終濃度 1mM の IPTG を添加し、37 $^{\circ}$ C で 6 時間培養した。

菌体を 5000rpm、20 分の遠心で沈殿し、120ml lysis buffer(10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM EGTA, 10mM  $\beta$ -ME, 0.25% Tween20, pH7.0)に懸濁した後、超音波破碎を行った。15000rpm、30 分の遠心で分離し、上清(可溶性タンパク質画分)を回収した。

5 倍容の column buffer(10mM sodium phosphate, 30mM NaCl, 1mM sodium azide, pH7.0)で平衡化したアミロースレジンカラムに対して、上記の可溶性タンパク質画分を column buffer で希釈して 1mg/ml の濃度にしたものと混合した。氷中で 1 時間放置し、溶液を取り除いた。アミロースレジンの 10 倍容の column buffer を加え、懸濁した。氷中で 30 分間放置し、溶液を取り除いた。10mM マルトースを含む column buffer にアミロースレジン懸濁した。氷中で 1 時間放置し、溶液を回収した。

組み換えタンパク質の発現、精製の具合を確認するために、精製段階の各試料をポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、CBB 染色により検出した。

## (3)組み換えタンパク質とバナジウムとの親和性の解析

(2)で精製した組み換えタンパク質を Viskase Sales 社の Dialysis Membrane, Size20 の透析膜に入れた。この透析膜をキレート用バッファー(50mM Tris-HCl, 25mM EDTA, pH7.4)2l 中に浸し、24 時間放置しておいた。

キレート透析後の組み換えタンパク質を濃縮するために、凍結乾燥を行った。粉末状になったタンパク質を 50mM MES-NaOH, pH6.0 に懸濁した

濃縮した組み換えタンパク質溶液を再び Viskase Sales 社の Dialysis Membrane, Size20 の透析膜にいれ、透析用バッファー(50mM MES-NaOH, pH6.0)2l 中に浸し、24 時間放置した。

平衡透析用のチャンパーの内側のセルにタンパク質溶液を、外側の 2 つのセルに各濃度のバナジウム溶液をそれぞれいれ、ローターで 48 時間回転させ平衡透析を行った。タンパク質溶液は 134 $\mu$ g/ml の濃度で、600 $\mu$ l 使用した。バナジウム溶液は 5~500\_ M

の濃度で各 1ml 使用した。

48 時間の平衡透析が終了した後、内液・外液それぞれの試料を 10 $\mu$ l 使用して、フレイムレス原子吸光分光分析法により、吸収波長 318.4nm でバナジウムの濃度測定を行った。標準試料として、原子吸光分析用バナジウム標準液(Wako)を用いた。原子吸光分光光度計はセイコー電子工業株式会社の SAS7500 原子吸光分光光度計を使用した。

## 【結果】

### (1)12.5kDa および 15kDa VAP の組み換えタンパク質を発現するベクターの作製

12.5kDa および 15 kDa VAP を発現するプラスミドを構築するために、プライマーを設計して各々の VAP の cDNA のコード領域を増幅した。このプライマーによって増幅される cDNA 断片はそれぞれ 88 アミノ酸および 91 アミノ酸をコードしていた。これはエドマン分解により決定された N 末端からの、cDNA から予想される C 末端までの領域である。なお、この増幅された cDNA のコードするタンパク質の分子量は 9kDa および 10kDa である。

増幅に用いた 5'側のプライマーには *EcoRI* 部位を、3'側のプライマーには *SalI* 部位を付加し、この cDNA 断片を *EcoRI* と *SalI* 部位で切断した pMAL-c ベクターに挿入した。完成したプラスミドでは、マルトース結合タンパク質(MBP、41kDa)と VAP の融合タンパク質が合成されるように蛋白質の読み枠を合わせた(図 1)。

### (2)組み換えタンパク質の発現と精製

このプラスミドを大腸菌 TB1 株に形質転換し、発現誘導実験を行なった。1mM IPTG を加えて誘導をかけた 3 時間と 6 時間培養後の大腸菌ホモジネートには、50kDa 付近に組み換えタンパク質の発現が見られた(図 2)。これは MBP に今回組み換えた VAP の分子量を加えた物に等しい。そして、これは 1mM IPTG を加えなかった 3 時間と 6 時間培養後の大腸菌ホモジネートには見られなかった。また、培養時間が長くなるごとに発現量が多くなっていることが分かった。

次に 3l の LB 培地で 1mM IPTG を加えて誘導をかけた 6 時間培養後の大腸菌ホモジネートから、MBP と親和性を持つアミロースレジンを使用して、組み換えタンパク質を精製することを試みた。SDS-PAGE により精製過程の各段階の組み換えタンパク質の状態を確認した(図 4)。平均すると、培養液 1 リットルあたり、12.kDaVAP は 17.0mg、15kDa VAP は 29.0mg の組み換えタンパク質を回収することができた。これは可溶性タンパク質画分

の蛋白質量のそれぞれ6.2%および8.7%であった(図5)。

### (3)組み換えタンパク質のバナジウム結合能の解析

この VAP のバナジウム結合能を平衡透析法によって調べた。バナジウムには一般に水溶液中では 5 価と 4 価、3 価の化学種として存在しうが、生理的条件下での存在が確認されている 5 価と 4 価について実験を行った。予備的実験結果ではあるが、いずれも 10 ないし 15 モル程度のバナジウムイオンと結合することがわかった。

#### 【考察】

今回、ホヤ由来のバナジウム結合タンパク質(VAPs)をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを大腸菌に形質転換し、発現誘導を行った。その結果、マルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質を大腸菌に発現させることに成功した。さらにその融合タンパク質のみを MBP と親和性を有するアミロースレジンを用いて精製し、この精製された融合タンパク質とバナジウムイオンとの結合能を平衡透析法で解析したところ、予備的な結果ではあるが、タンパク質 1 モル当たり 10 ないし 15 モル程度のバナジウムイオンと結合することを見出した。

海産無脊椎動物のホヤが海水のバナジウム濃度の 1,000 万倍( $10^7$ )ものバナジウムを高選択的に濃縮することは良く知られているが、その生理機能を応用して作製した組み換えタンパク質のバナジウムイオン結合能を初めて明らかにすることができた。今後、さらに検討を進め、VAPs とバナジウムイオンの結合定数を明らかにするとともに、金属イオンの結合部位を特定したい。

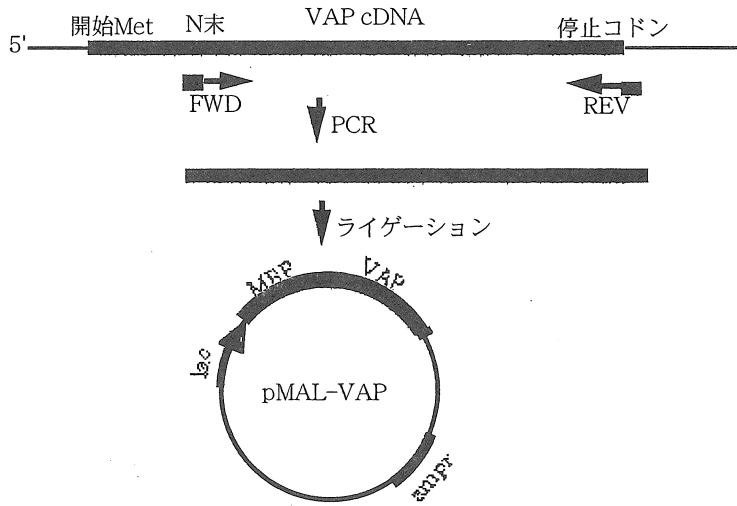


図1. 融合蛋白質を発現するベクターの作製

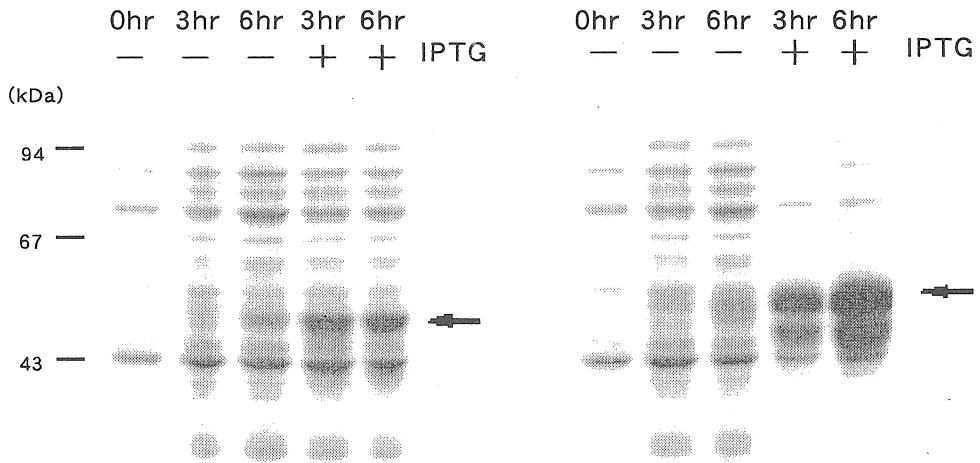


図2. 12.5kDa VAP(左)および15kDa VA(右)Pの組み換えタンパク質の発現。1mM IPTGを加えた場合(+)と加えない場合(-)の大腸菌培養液から回収した総蛋白質をSDS-PAGEとCBB染色によって解析した。いずれのVAPの場合にも、培養開始(0hr)後、3時間(3hr)および6時間(6hr)を経過した大腸菌には矢印で示した組み換え蛋白質の発現が認められる。

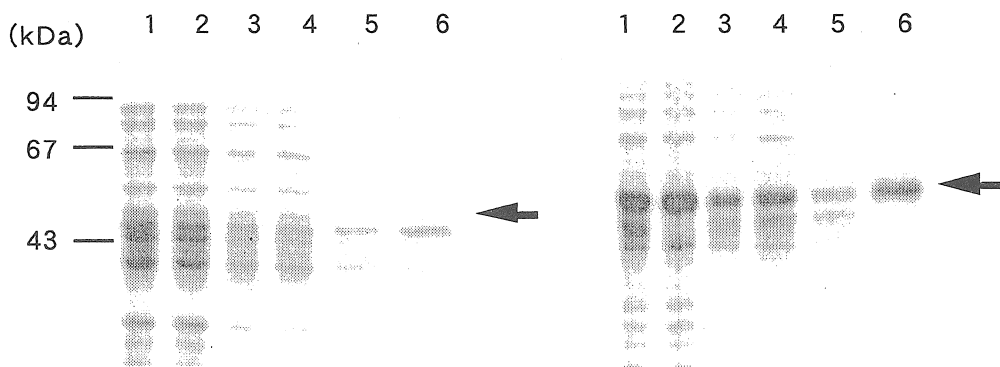


図3. 12.5kDa VAP(左)および15kDa VAP(右)の組み換えタンパク精製成過程。1.大腸菌のホモジネート、2.可溶性画分、3.不溶性画分、4.アミロースレジン非吸着画分、5.洗浄画分、6.吸着画分、をSDS-PAGEとCBB染色によって解析した。いずれのVAPの場合にも、吸着画分に矢印で示した組み換えタンパク質が高い純度で精製される。

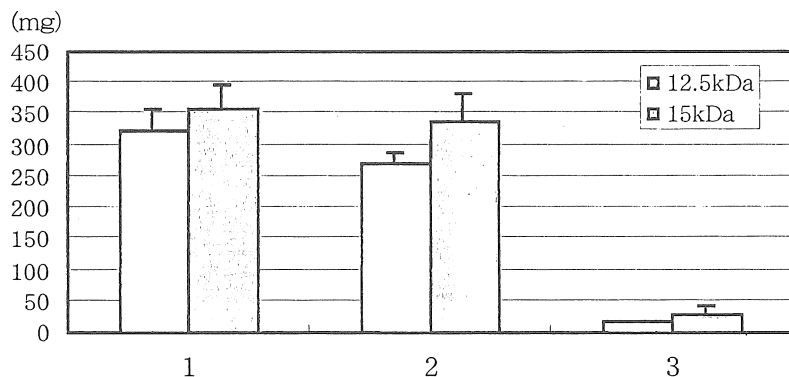


図4. 12.5kDaおよび15kDaVAPの発現と精製の結果。培養液1リットルあたりの、1.総蛋白質量、2.可溶性画分の蛋白質量、3.精製された組み換えタンパク質の量を表す。



## Highly Selective Isolation of a Rare Metal from Sea Water by Mimicking a Biological Function

Hitoshi Michibata, Taro Uyama, Tatsuya Ueki, Takami Fukumitsu  
and Sonoko Kawano

Marine Biological Laboratory, Graduate School of Science, Hiroshima University,  
Mukaishima 2445, Hiroshima 722-0073, Japan

### Summary

In sea water, rare metals including vanadium, cobalt and chromium are dissolved in bulk but at very low concentrations. Total resource of the rare metals in sea water are much more rich than the terrestrial resource of them. The rare metals are necessary for new industries in the next generation as materials for semiconductors, superconducting substances and magnetic substances.

We have focused on an unusual function that some ascidians accumulate high levels of vanadium in their blood cells from sea water and the highest concentration of vanadium in ascidian blood cells, 350mM, corresponds  $10^7$  times the vanadium concentration in sea water.

Recently we found a clue to solve the mechanism of vanadium accumulation. Vanadium-associated proteins (VAPs) have been already extracted from the soluble extracts of blood cells by an anion exchange column chromatography. Now, we have cloned cDNAs encoding two of those proteins, 12.5-kDa and 15-kDa VAPs. These cDNAs encoded about 120 amino-acid proteins in which the content of cysteine residues are very high. A plasmid encoding a fusion protein of a maltose-binding protein (MBP) and each of the two VAPs was transformed into *E. coli* strain BL21. The fusion proteins purified by an amyrose resin column chromatography were analyzed by equilibrium dialysis experiments to have an affinity with vanadium ions. The 12.5 kDa and 15 kDa VAPs bound to roughly 10 molar equivalent of vanadium ions in the +4 or +5 oxidation state, respectively.

Experiments to clarify metal binding sites in VAPs and binding constant with vanadium ions are in progress.