

# 海水微量金属種回収のための大腸菌吸着剤の開発

梅野 太輔

早稲田大学大学院先進理工学研究科応用化学専攻

## 概要

海水には多様な有価金属イオンが含まれ、その総量は鉱山資源をはるかに凌ぐ。しかし、既存の吸着材は結合選択性に課題があり、実用化には至っていない。一方、タンパク質やペプチドには特定の金属に極めて高い選択性を示すものが存在する。たとえば、最近発見された「ランモジュリン」は、Ca(II)に対し1億倍の選択性をもってランタノイドに特異的に結合し、同族元素間の分離にも有用である。

私たちは以前、膜タンパク質を介してペリプラズム空間側に任意のタンパク質を提示(ディスプレイ)する技術を着想した(2022年度一般助成研究202201)。この大腸菌は、生きたまま、ペリプラズム空間で標的金属を感知し、その標的金属のあるときだけ(仕事があるときだけ)増殖する「生きた吸着剤」である。かつ、「増殖する」という最も基本的な生物機能を指標として、金属結合性能に進化的淘汰がおよぼせる「進化する吸着剤」でもある。

本研究では、大腸菌の膜タンパク質 TetA を利用し、任意のタンパク質をペリプラズム空間に提示するシステムを構築した。この TetA システムを用いて、ランモジュリンの一部をランダム変異させたライブラリを作成し、変異体が大腸菌に発現させた。TetA の膜貫通構造により、変異タンパク質はペリプラズム側に提示され、金属存在下で選択的に増殖する細胞をスクリーニングできる。進化設計が求められる金属結合は、サブ Å 精度の多体的相互作用に支配され、合理的設計が困難な領域であるため、スクリーニングによる最適化が極めて有効である。実際、金属濃度を段階的に下げたり、キレート剤の濃度を上げたりしながら繰り返し選抜を行い、高親和性の変異体を多世代にわたって取得することに成功した。

## 1. 研究目的

海水にはさまざまな有価金属イオンが溶け込んでおり、それらの総量は、鉱山が産する資源量をはるかに凌駕するほど莫大なものとなる。これらを吸着回収するために、さまざまな化学素材が試作されているが、いずれも結合選択性や再生コストがかかる点が難点である<sup>1</sup>。

一方で、タンパク質・ペプチドモチーフの中には、驚くほど標的金属への選択性の高いものが知られる。たとえば、最近微生物から発見された「Lanmodulin (LanM)」は、文字通りランタノイドに選択的に結合するタンパク質であるが、同族イオン Ca(II)の1億倍<sup>2</sup>という破格の選択性を示すうえ、超困難といわれるランタノイドどうしの分離にも使える驚くべき性能をほこる<sup>3</sup>。

本研究では、タンパク質素材の特権である「進化する」という特質を活かした超高性能な金属吸着タンパク質のシリーズ開発技術の確立、および生物の「生き続ける」という特質を活かした、実用海水金属イオンの吸着システムの製作(図1.1)に挑んだ。

海水成分回収などにおける生体高分子の利用は、実用上「ミスコンセプト」とされてきた。それは、これらの分子は、材料として使うにはあまりに高価かつ微量だからである。また、そもそも金属イオンが細胞膜を通過できないため、細胞内には金属イオンは届かない。そして、たとえ届いたとしても、細胞内の金属イオン濃度は、生物の持つ堅牢な監視システムの制御下にあるため、細胞外環境に関わらずほぼ一定に保たれて「しまう」。

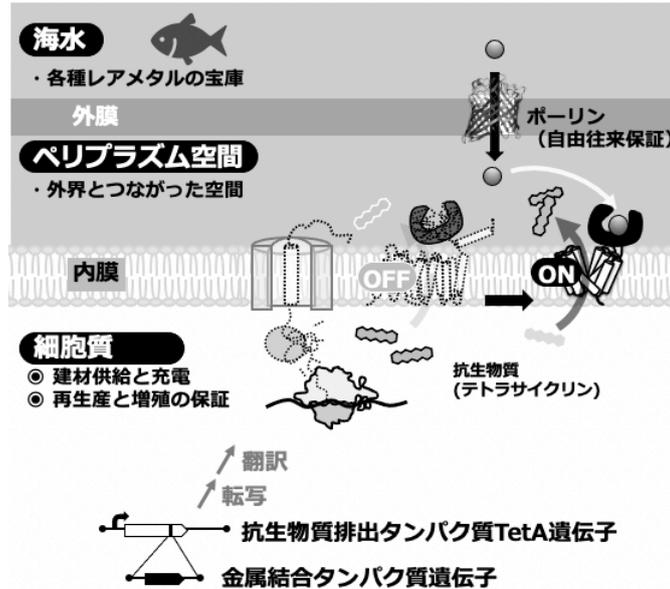


図 1.1 ペリプラズムディスプレイを用いた海水金属イオンの回収

そこで我々は、膜タンパク質を介してペリプラズム空間側に任意のタンパク質を提示(ディスプレイ)する技術に着想した(2022 年度一般助成研究 202201)。この空間は細胞の代謝ネットワークの治外法権といえる。ポーチンという外膜タンパク質の存在によって、分子量 1000 を切る分子・原子は自由にペリプラズム空間に拡散してくるため、この空間は、ほぼ完全に外界(海水)と繋がっている。我々は、抗生物質耐性遺伝子 TetA という膜タンパク質を介して金属結合タンパク質をこのペリプラズム側に提示することに成功し、「その金属があるときだけ抗生物質テトラサイクリンへの耐性をもつ」大腸菌をつくることに成功した。この大腸菌は、いきのまま、ペリプラズム空間で標的金属を感知し、その標的金属のあるときだけ(仕事があるときだけ)増殖する「生きた吸着剤」である。化学素材の吸着材は、飽和により吸着能を失い再生処理が必要となるため、エネルギーコストや材料寿命に難点があるが、「生きた吸着材」はこの「再生」という過程を「増殖」により克服した、吸着システムである。

さらにこのディスプレイ技術は、「増殖する」という最も基本的な生物機能を指標として、金属結合性能に進化的淘汰がおよぼせる「進化する吸着剤」でもある。タンパク質と金属の相互作用デザインは、サブ Å レベルで芸術的に空間配置された配位子群によって実現する典型的な「多体問題」である。つまり合理的設計は不可能で

あり、スクリーニングに立脚する進化デザインが唯一の希望である。本研究では、この生物の「進化する」という特徴を用いて、金属結合タンパク質の金属結合特異性を変更することを目指した。

本報告ではランタノイド結合タンパク質 Lanmoduline (LanM) の結合特異性を再デザインしたことを報告する。LanM は、真核生物の Calmodulin に代表されるカルシウム結合タンパク質から分独進化したタンパク質である(図 1.2)。そして、進化の過程で Ln(III)に対する結合親和性を  $10^3$  倍上昇させるとともに、Ca(II)に対する結合親和性を  $10^2$  倍低下させ正味 8 桁の選択性をもって Ln(III)を捕獲する能力を発揮する<sup>2</sup>。Ca(II)と Y(III)のイオン半径の差はわずか  $0.02 \text{ \AA}$  程度であり、これを見分ける精妙な結合部位のデザインを自然進化により獲得したと考えられている。

この自然進化によって獲得した精妙なランタノイド結合部位を、我々が開発した TetA を用いたペリプラズムディスプレイによる高速進化技術により、再びカルシウム特異性結合部位へとリデザインする。ランタノイドとカルシウムという、サブ Å レベルの金属イオン半径の差を見分ける精妙な特異性の決定機構が我々の技術によりハイスループットに決定できれば、この技術を用いて、あらゆるタンパク質-金属相互作用の進化デザインが容易に達成できるはずだ。

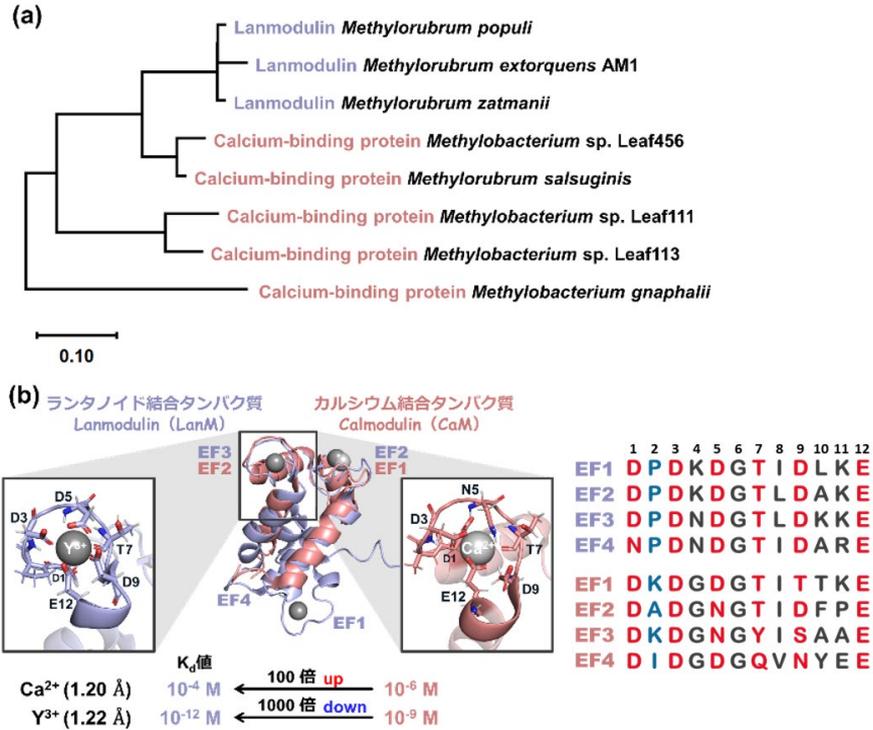


図 1.2 LanM と CaM の系統的關係と金属捕獲部位の配列の相違

## 2. 研究方法

我々が構築したペリプラズムディスプレイ技術は、テトラサイクリン排出能を持つ膜タンパク質 TetA と金属結合タンパク質を遺伝的に融合することによって、金属結合タンパク質をペリプラズム側にディスプレイする。ペリプラズム空間において金属結合タンパク質が金属イオンと相互作用した時、その結合エネルギーにより安定化することで folding し、それにより融合パートナーである TetA も安定化し機能発現可能になる。これにより、テトラサイクリン存在下での大腸菌の生死を指標として、金属結合タンパク質の金属イオン結合能を読み出すことができる。

この技術を利用して、以下のワークフローを行う(図 2.1)。

① TetA::ランタノイド結合モチーフ融合遺伝子へのランダム変異導入: TetA とランタノイド結合モチーフの融合遺伝子のアミノ酸をランダム化したライブラリーを作製する。このライブラリーの中には、①Ca 結合特異的変異体(Ca(II)との結合により TetA が機能)・②Nd 結合特異的変異体(Nd(III)

との結合により TetA が機能)・③非特異的変異体(Nd(III)/Ca(II)両方と結合、もしくは常に TetA が機能)・④失活体(金属と結合しない、もしくは常に TetA が失活)が含まれている。なお、親や親ライクな変異体も④失活体に含まれる。これらは金属結合親和性が低いため、Ca(II)や Nd(III)の添加に依存した TetA の機能発現は起こらない。

② ON selection: ライブラリーを導入した大腸菌を、抗生物質テトラサイクリンおよび Ca(II)添加培地に植菌・培養する。これにより、Ca(II)存在下で TetA 機能を持つ変異体、つまり、①Ca 結合特異的変異体(Ca(II)との結合により TetA が機能)・③非特異的変異体(Nd/Ca 両方と結合、もしくは常に TetA が機能)のみを選出することができる。

③ 機能選抜: ON selection した変異体を、Nd(III)添加、および Ca(II)添加培地にそれぞれ植菌し、抗生物質耐性能を評価する。Nd(III)添加時に比べ Ca(II)添加時の抗生物質耐性能が高い変異体を選出すれば、①Ca 結合特異的変異体(Ca(II)との結合により TetA が機能)を獲得できる。

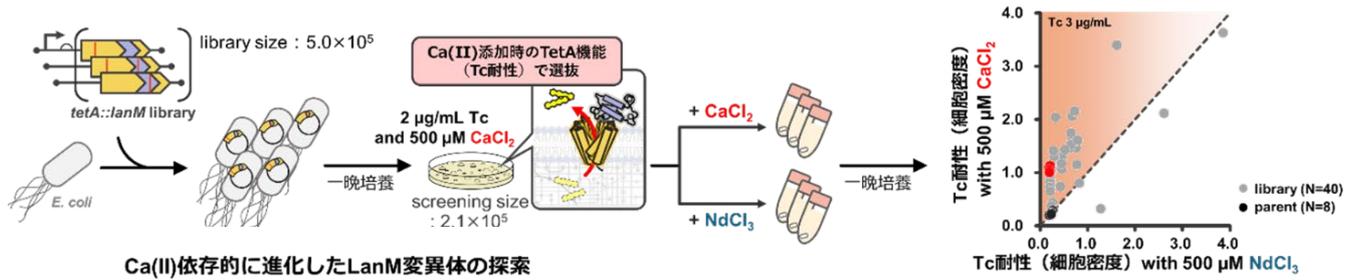


図 2.1 Ca(II)依存性を増した LanM 変異体の進化工学ワークフロー

### 3. 研究結果

#### 3.1 ペリプラズムディスプレイ技術を用いた金属結合親和性の読み出し

LanM および CaM は、2 つの  $\alpha$ -ヘリックスに挟まれた金属結合 loop から構成される構造モチーフ EF-hand を 4 つ持ち、その中の金属結合 loop (EF-loop) のアミノ酸配列は高度に保存されている (図 3.1a)。その EF-loop のアミノ酸のうち 1 位の残基に着目すると、CaM では 4 つ全ての loop でアスパラギン酸 (D) なのに対し、LanM は 4 番目の EF-loop である EF-loop4 のみ、アスパラギン酸ではなく、アスパラギン (N) となっている。そして、LanM の EF-loop1, 2, 3 に Ln(III) は pM オーダーで結合するが、EF-loop4 には  $\mu$ M オーダーで結合し、EF-loop4 は金属親和性が低い<sup>2</sup>。これは EF-loop4 の 1 位アスパラギン残基が EF ハンド構造を不安定化することで金属結合を阻害すると考えられている<sup>4</sup>。この EF-loop4 の 1 位をアスパラギン酸に置換した変異体 LanND は、ランタノイドである Gd(III) に対する Kd 測定の結果、LanM と比較して金属結合親和性が 4.3 倍向上していることが知られている<sup>5</sup>。

本項目では、LanM の EF-loop4 の 1 位残基がアスパラギン酸に変異した LanND では金属イオン結合親和性が向上するという知見を基に、LanM と LanND の結合親和性の違いを、TetA の機能を指標に読み出すことを目指した。

TetA に融合した LanM の、EF-loop4 の 1 位の残基をランダム化したライブラリーを作製し、ペリプラズムディスプレイ技術によってテトラサイクリン (Tc) 添加培地での細胞濁度 OD600 (=Tc 耐性) の形で、金属との結合親和性の強さを評価した。その結果、結合親和性が高いことで知られるアスパラギン酸への既知の変異体 (LanND) が、Ca (II) および Nd (II) 添加の両条件に置いて、Tc 耐性が高い変異体として出現した (図 3.1b)。この TetA::LanM EF4-N1D 変異体 (LanND) について詳細に用量依存性を評価したところ、野生型よりも低濃度の CaCl<sub>2</sub> および NdCl<sub>3</sub> で応答し、結合親和性が向上していた (図 3.1c)。つまり、結合親和性の差異を Tc 耐性の違いで見分けることができ、TetA を用いたペリプラズムディスプレイ技術が、LanM の金属結合を適切に読み出せていることを示している。

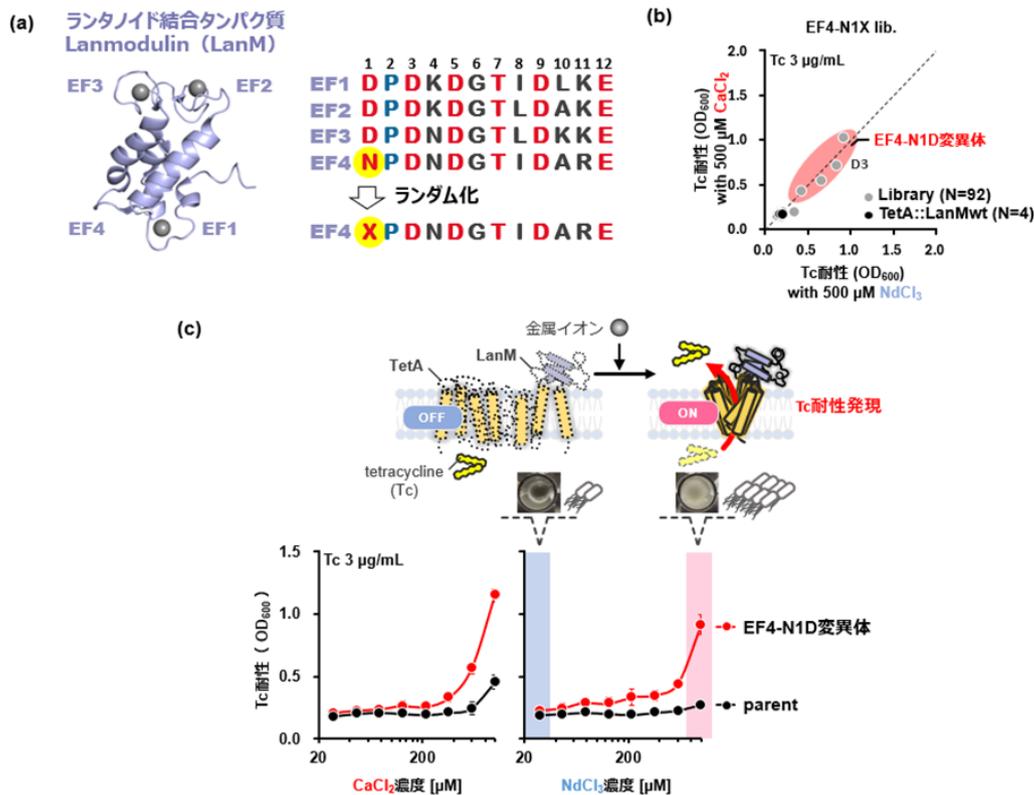


図 3.1 TetA::LanM(EF4)とその変異体の TetA 活性

### 3. 2 金属結合モチーフ改変による金属特異性変化の試み

TetA の活性によって、ペリプラズムにディスプレイした金属結合タンパク質の結合親和性を読み出せることが確認できたため、この系を利用して LanM の金属特異性を Ca(II) 特異的に改変し、Ln(III)と Ca(II)を見分ける要件の抽出を試みた。

LanMは、4つのEF-loopのうち3つがLn(III)と結合する。そしてLanMのEF-loopで保存度の高い残基でも、CaMのEF-loopで保存度が低いものもある。例えば、EF-loopの2番目の残基はLanMではすべてプロリン(P)であるが、CaMでは異なるアミノ酸となっている(図3.2a)。この2位のプロリン残基は、Ca(II)結合による構造変化を抑制する役割を持つ<sup>6</sup>。2位のプロリン残基をアラニン残基へ置換すると、EFハンドの構造自由度が大きくなり、300倍低濃度のCa(II)と結合する。このようなLanMとCaMのEF-loopを構成するアミノ酸の相違が、金属結合特異性に影響していると考えた。

そこで、130残基以上のアミノ酸から構成されるLanMまたはCaM全長のタンパク質から、12アミノ酸残基から構

成されるEF-loopを1つ切り出し、金属結合部位にのみ改変を加えることで、容易にLanMの金属依存性に重要なアミノ酸残基を抽出できるはずだと考えた。そこで、まず、12のアルファヘリックスを持つ12回貫通型膜タンパク質TetAの細胞外ループを、LanMおよびCaMのEF-loopへ置換し、その金属依存性を調査した。

まず、12個のα-ヘリックスを持つ12回貫通型膜タンパク質TetAのN末端側から数えて2番目の細胞外ループをLanMおよびCaMの1~3番目のEF-loopに置換し、そのリンカーを調節した。その中から最もTetAのテトラサイクリン排出活性が大きい、TetA::LanM-EF handおよびTetA::CaM-EF hand変異体を1つずつ選定した。そして、LanMおよびCaMのEFハンド間の金属依存性の違いを確認するため、各変異体のNd(III)およびCa(II)用量依存性を調べた結果、LanMおよびCaMのどちらのEFハンドモチーフでもCa(II)・Nd(III)の濃度に応じてTetA活性が向上するという似た挙動を示した(図3.2b)。この結果より、LanMとCaMの金属依存性の違いが金属結合モチーフ(EF-loop)だけに由来するものではないことが示唆された。

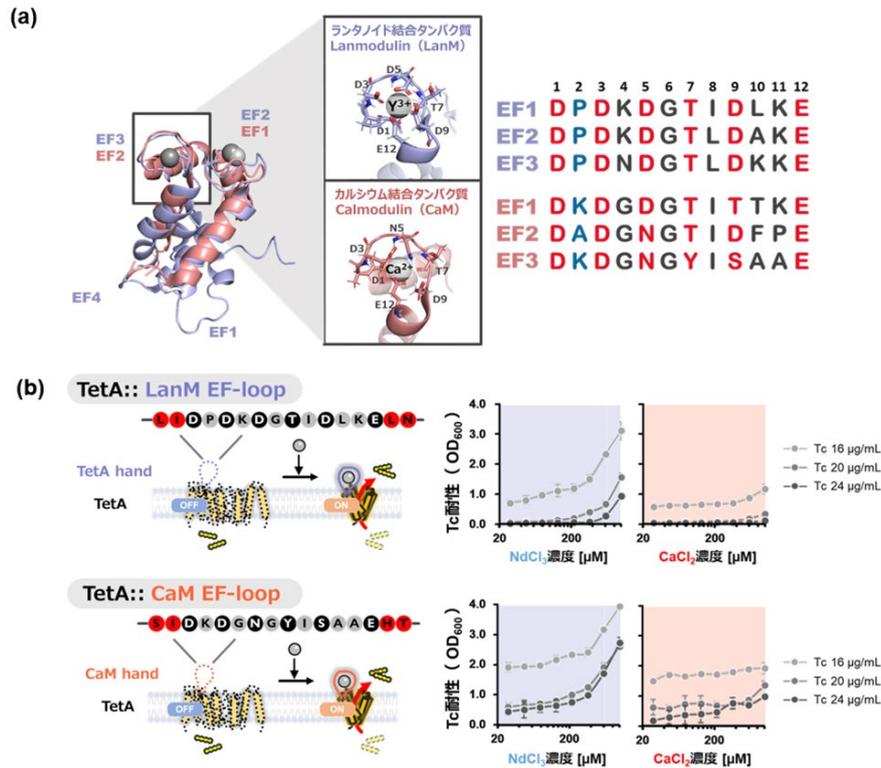


図 3.2 LanM 型および CaM 型 EF-loop を付加した TetA 機能の Nd(III)・Ca(II)依存性

### 3. 3 TetA 機能を指標とした金属結合タンパク質の金属結合親和性の評価

LanM と CaM の EF-loop 金属依存性の違いが確認できなかったことから、EF-loop のアミノ酸配列だけが金属特異性を決定しているのではないことが示唆された。その要因として、タンパク質として立体構造形成における協働性が LanM と CaM の異なる金属依存性を生み出すために重要であると考えた。

LanM や CaM などのタンパク質において、2 つの EF ハンドは 1 組で機能する。一方の EF ハンドが金属イオンと結合すると、隣接するもう一方の EF ハンドの金属結合親和性が高まり、Ca(II)などの金属イオンに対して正の協働性を示すことが知られている<sup>7</sup>。この協働性には、EF ハンド同士をつなぐ  $\beta$  シートやヘリックス間の構造的な相互作用が関与しており、結合による構造変化が他方の結合サイトに伝わるのがこの協働性の鍵となっている。LanM においても同様に、4 つの EF ハンド間での相互作用が金属結合の選択性や高親和性に寄与している。特に EF2 および EF3 のペアは、結合に際して大きな構造変化を伴い、協働的に働くことで高いランタノイ

ド選択性を発揮する点が特徴的である<sup>8,9</sup>。つまり、LanM は、EF ハンドを構成するアミノ酸配列に加え、タンパク質としての協働性効果が働き、CaM とは異なる金属特異性を発現しているのではないかと考えた。

そこで、TetA の細胞外ループに LanM の全長を挿入した融合タンパク質 TetA::LanM を作製し、その遺伝子全域へのランダムな変異の導入、および TetA 機能を指標とした選抜を行った。具体的には、図 3.3a に示す実験手順に従い、TetA::LanM 遺伝子全域にランダム変異を導入し、Ca(II)添加時の Tc 耐性の高い変異体を選抜した。選抜された~40 の変異体を無作為に選び、Ca(II)/Nd(III)添加条件での Tc 耐性比較を行った(図 3.3b)。多くの変異体が Ca(II)に対して親和性を増しており、Ca(II)と結合することにより TetA 機能が増していた。さらに、TetA::LanM を構成する 513 アミノ酸全体に対しランダム変異を加えたにもかかわらず、その変異箇所は LanM に特徴的な 2 位のプロリン残基(EF-1, P379)集中していた。この結果から EF-loop1 の 2 番目のプロリン残基が LanM における Ca(II)親和性の低下に重要な役割を担っていることが確認された。

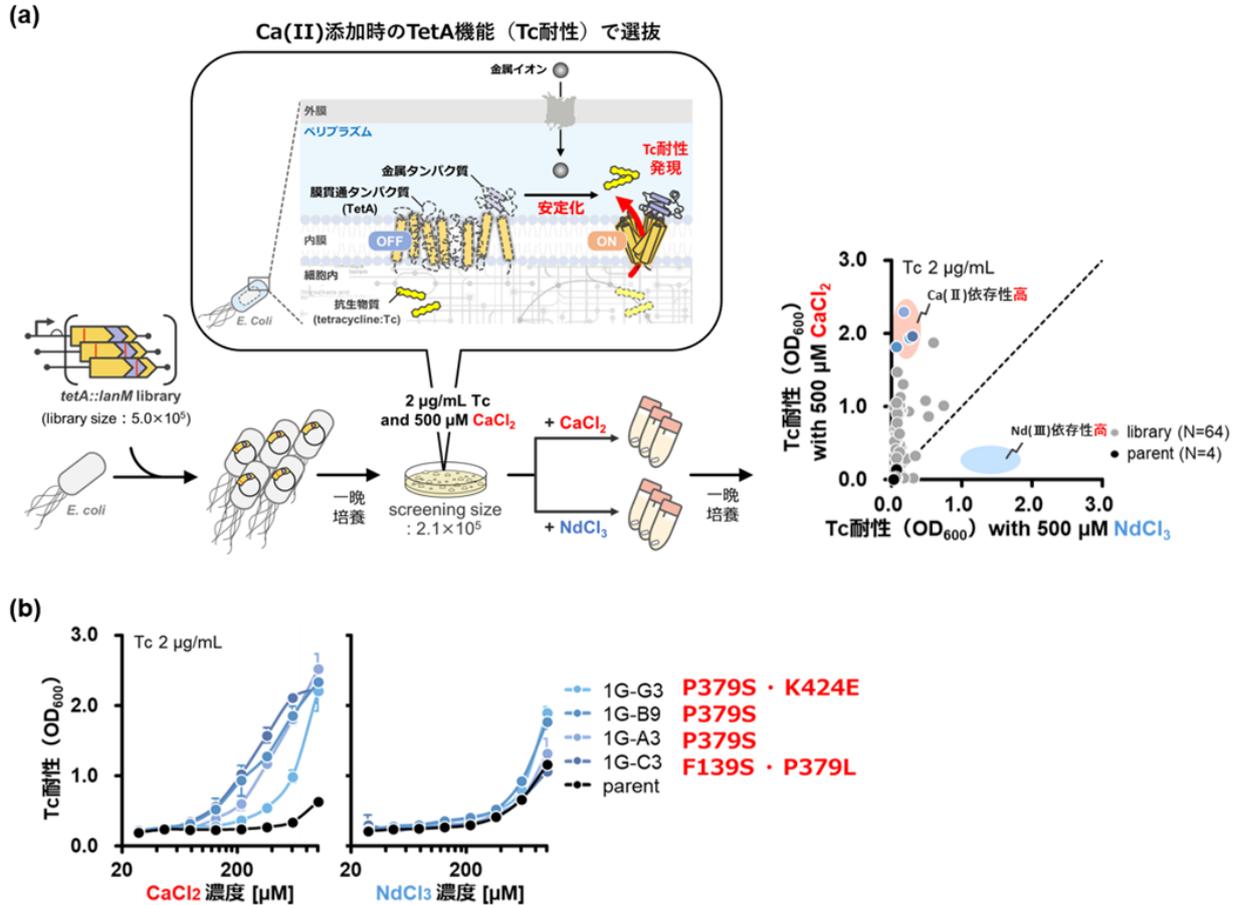
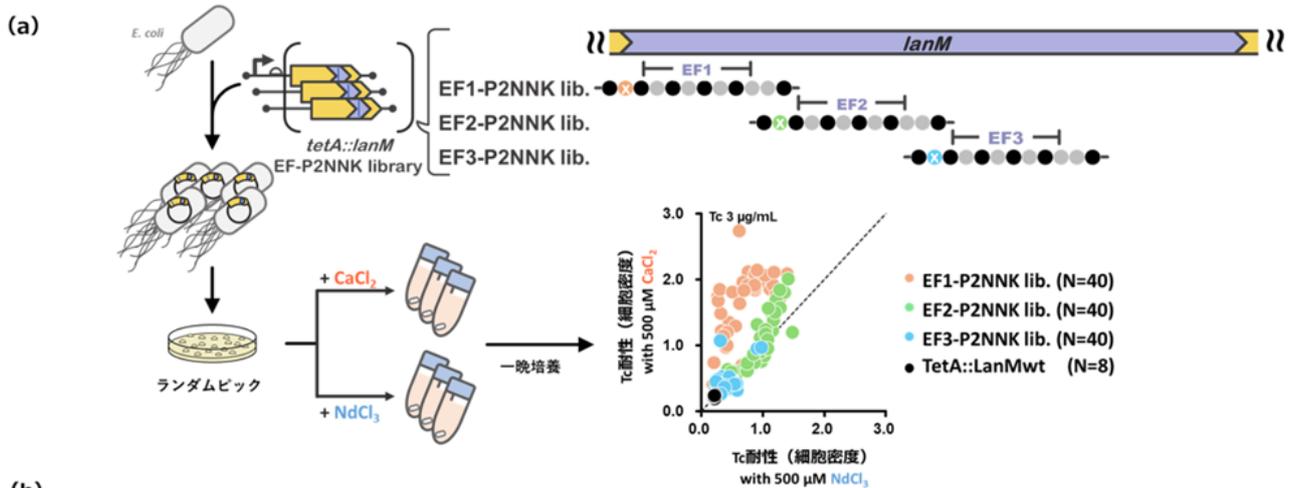


図 3.3 TetA 機能選抜による Ca(II)依存的な LanM 変異体の探索

### 3. 4 金属特異性変化残基の網羅的探索

本系においても, LanM の EF-loop1 の P2 残基が Ln(III)/Ca(II)の結合特異性に大きくかかわっていることが確認されたため, この EF-loop の 2 番目の位置に導入されるアミノ酸が金属特異性に与える影響を網羅的に調査した。LanM の 4 つの EF-loop に保存される P2 残基をそれぞれランダム化し, Ca(II)および Nd(III)依存性を Tc 耐性によって評価したところ, EF-loop によってテトラサイクリン耐性の分布が異なっていた (図 3.4a)。特に, EF2-P2NNK ライブラリーおよび EF3-P2NNK ライブラリーからは, Ca(II)もしくは Nd(III)特異的な変異体は出現しなかったのに対し, EF1-P2NNK ライブラリーの変異体は多くが Ca(II)依存的となっていた。これらの結果は, 各 EF ハンドの 2 位のプロリン残基が全長 LanM に与える影響が等価ではないことを示唆している。

上記の結果から, EF-loop1 が LanM の Ca(II)/Nd(III)依存性に影響を与えている可能性が高いと考え, EF-loop1 を構成する 12 個の各アミノ酸残基が TetA::LanM の Ca(II)/Nd(III)依存性にもたらす影響を評価することにした。12 個のアミノ酸残基をそれぞれランダム化し, Ca(II)および Nd(III)添加により TetA 機能が向上したアミノ酸残基のプロファイリングを行った (図 3.4b)。その結果, EF1-P2, D5, T7, D9NNK ライブラリーの中から, 点群から大きく Tc 耐性が向上した変異体が確認され, EF ハンドの中の P2 以外部位も金属特異性に影響を与えることを見出すことができた。この結果から, 本技術によってイオン半径の差がサブ Å 単位しかない金属イオンの結合特異性を決定づけるアミノ酸残基が探索可能であることが分かった。



(b)

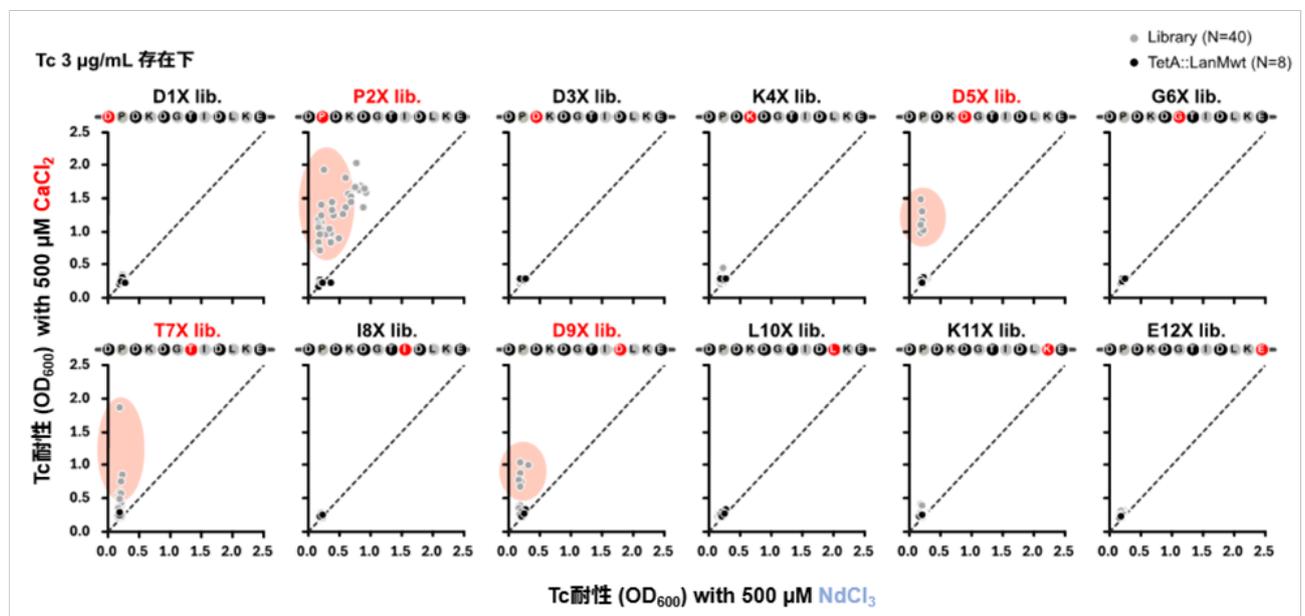


図 3.4 LanM の金属特異性変化残基の網羅的探索

#### 4. 考察

海水に含まれるランタノイドや貴金属、ウランなどの希少資源を回収するには、金属特異性が極めて重要である。しかし化学素材の吸着材は金属特異性が低く、また生体高分子を用いた吸着材は金属特異性が高いものの、それを任意の金属に結合するよう結合部位をリデザインすることは困難である。

本研究は TetA を用いたペリプラズムディスプレイ技術により、自然界に存在するタンパク質 LanM の金属結合特異性を、金属イオン半径がわずかさば Å 単位しか変わらない金属へと変更することを可能にした。金属結合特

異性を変更するにあたり、当初は数アミノ酸から構成される結合部位のみをリデザインしようと試みたが、金属特異性を変更する残基は発見できなかった。そこで、LanM の Ln(III)特異的な結合はタンパク質としての協働性により決定づけられていると仮説を立て、100 アミノ酸を超えるタンパク質全体にランダム変異を加えることで、金属結合特異性が変わった変異体を獲得できた。これは、金属特異性が変化したタンパク質の濃縮を可能にするペリプラズムディスプレイ技術が、ハイスループットな探索を可能にした成果である。

## 5. 今後の課題

本研究で開発した TetA ディスプレイ系を用いれば、ペリプラズムに提示した金属結合タンパク質に、ランダム変異を加え、任意の金属との結合する変異体を獲得すれば、様々な金属種に対応した特異性の高い吸着材が開発可能だと期待される。

## 6. 文献

1. Chai, W. S. *et al.* A review on conventional and novel materials towards heavy metal adsorption in wastewater treatment application. *Journal of Cleaner Production* **296**, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126589> (2021).
2. Cotruvo, J. A., Featherston, E. R., Mattocks, J. A., Ho, J. V. & Laremore, T. N. Lanmodulin: A Highly Selective Lanthanide-Binding Protein from a Lanthanide-Utilizing Bacterium. *J Am Chem Soc* **140**, 15056–15061 (2018).
3. Mattocks, J. A. *et al.* Enhanced rare-earth separation with a metal-sensitive lanmodulin dimer. *Nature* **618**, 87–93 (2023).
4. Cook, E. C., Featherston, E. R., Showalter, S. A. & Cotruvo, J. A. Structural Basis for Rare Earth Element Recognition by *Methylobacterium extorquens* Lanmodulin. *Biochemistry* **58**, 120–125 (2019).
5. Liu, Y. *et al.* Single-point mutated lanmodulin as a high-performance MRI contrast agent for vascular and kidney imaging. *Nature Communications* **15**, (2024).
6. Cotruvo, J. A., Featherston, E. R., Mattocks, J. A., Ho, J. V. & Laremore, T. N. Lanmodulin: A Highly Selective Lanthanide-Binding Protein from a Lanthanide-Utilizing Bacterium. *J Am Chem Soc* **140**, 15056–15061 (2018).
7. Ishida, H. *et al.* The solution structure of apocalmodulin from *Saccharomyces cerevisiae* implies a mechanism for its unique Ca<sup>2+</sup> binding property. *Biochemistry* **41**, 15536–15542 (2002).
8. Alasadi, E. A., Choi, W., Chen, X., Cotruvo, J. A. & Baiz, C. R. Lanmodulin's EF 2-3 Domain: Insights from Infrared Spectroscopy and Simulations. *ACS Chem Biol* **19**, 1056–1065 (2024).
9. Featherston, E. R., Issertell, E. J. & Cotruvo, J. A. Probing Lanmodulin's Lanthanide Recognition via Sensitized Luminescence Yields a Platform for Quantification of Terbium in Acid Mine Drainage. *J Am Chem Soc* **143**, 14287–14299 (2021).

## Bacterial Adsorbent for Recovery of Rare Metals from Seawater

Daisuke Umeno

Department of applied chemistry, Waseda University

### Summary

Seawater contains a variety of valuable metal ions, the total amount of which far exceeds that of mine resources. However, existing adsorbents have issues with binding selectivity, and have not yet been put to practical use. On the other hand, there are proteins and peptides that show extremely high selectivity for certain metals. For example, the recently discovered "lanmodulin" specifically binds to lanthanides with 100 million times the selectivity as Ca(II), and is also useful for separating homologous elements.

We previously developed a technology to present (display) any protein on the periplasmic space side via a membrane protein (General Grant Research 001, 2021). This *E. coli* is a "living adsorbent" that senses target metals in the periplasmic space while remaining alive and grows only when the target metal is present (only when there is work to do). It is also an "evolving adsorbent" whose metal-binding ability can be subject to evolutionary selection, using the most basic biological function of "growing" as an indicator. In this study, we constructed a system to present any protein on the periplasmic space using the *E. coli* membrane protein TetA. Using this TetA system, we created a library of randomly mutated parts of lanmodulin and expressed the mutants in *E. coli*. The transmembrane structure of TetA allows the mutant proteins to be presented on the periplasmic side, allowing us to screen for cells that selectively grow in the presence of metals. Metal binding, which requires evolutionary design, is governed by multi-body interactions with sub-Å precision and is a difficult area to rationally design, so optimization by screening is extremely effective. In fact, by repeatedly selecting while gradually decreasing the metal concentration and increasing the concentration of the chelating agent, we succeeded in obtaining high-affinity metal binding proteins.