

B-51 HRP表層提示酵母を用いた金属回収技術の開発

○池田直生^{1*}・久保田健吾¹・原田秀樹¹

¹東北大学大学院工学研究科土木工学専攻（〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06）

* E-mail: ikeda@water.civil.tohoku.ac.jp

1. はじめに

世界的な工業化や人口増加を背景に金属資源の需要が高まり、将来的に金属資源の枯渇に陥ることが懸念されている。これを受けて、廃水、廃棄物に含まれる再生可能な金属資源、いわゆる「都市鉱山」に注目が集まっている。廃水からの金属除去・回収技術には安定性と効率性の観点から主に物理化学的技術が適用されている。しかしながら、観点を経済性や環境負荷に置き換えると、一概に物理化学的技術が望ましいとは言えない。特に枯渇が懸念されるレアメタル等は、廃水中の濃度が比較的希薄であることが予想され、従来の物理化学的技術では効率的かつ経済的な金属資源の回収は難しいと言われている。そのため、安価で、かつ低濃度の金属含有廃水にも適応が可能であるとされる生物工学的金属回収技術への期待が高まっている。

生物工学的金属回収技術とは、微生物や植物といった生物材料およびその代謝機能、代謝産物を用いて金属を回収する技術である。そのうちの一つに西洋わさびペルオキシダーゼ（Horseradish peroxidase : HRP）を用いた金属回収技術が報告されている¹⁾。HRPは活性部にヘム構造を保持することで、過酸化水素（ H_2O_2 ）の存在下で特有の酸化還元反応を引き起こし、酵素抗体法やELISA法などに応用されてる。既報では、HRPによりフェノール誘導体を重合化し、それを金属回収に適用している。この方法は、金イオンの回収に高い選択性と特異性を有し、さらに、フェノール誘導体としてチラミンを使用することで、バナジウムイオンや白金イオンの回収効率が高まることが報告されている。しかしながら、フェノール誘導体の重合化と金属の回収には異なる反応液を必要とする点や、精製されたHRPは決して安価ではないにも関わらず、フェノール誘導体の重合化には高濃度のHRPを必要とする点が実用化に向けた課題と考えられる。

近年、細胞表層提示技術を応用した新たな生物工学的金属回収技術バイオアミッシングが注目を集めている。細胞表層提示とは、細胞表層に目的タンパク質を提示することで細胞に新たな機能を付加する技術である。Kuroda

らは、特異的にモリブデン酸イオンを吸着するタンパク質Mod-Eを酵母の細胞表層に提示させることで酵母のモリブデン酸イオン回収効率の向上に繋げている²⁾。

本研究ではこのHRPを利用した金属イオン回収技術と細胞表層提示技術に注目した。細胞表層提示技術を用いて細胞表層にHRPを提示させ、このHRPを介してその近傍にフェノール誘導体の重合体を形成させ、そしてこの重合体が金属イオンの回収を誘引すると想定した（図-1）。この方法ではHRPを精製することなく、その発現を細胞の内部生成に依存することでコスト低減に直結する点が大きなメリットになる。まず、HRPをの細胞表層提示させる遺伝子組換え酵母を創成し、酵母培養によるHRPの大量発現および細胞表層への提示を試みた。さらに、HRPの細胞表層提示を施した酵母を用いてAgイオンを標的とした金属回収実験を行った。

2. 実験方法

(1) HRP表層提示酵母の創成

HRPの発現するための遺伝子および酵母の細胞表層へのタンパク質提示を行うためのAga2が組み込まれたプラスミドpCT2-HRP³⁾を出芽酵母*Sacharomyces cerevisiae* EBY100株に挿入し、形質転換を施した出芽酵母（EBY100-HRP株）を創成した。EBY100-HRP株は、SD(-tp)培地で選択的に培養（12h, 30℃, 250rpm）し、さらにSG(-tp)培地で選択的に培養（48h, 30℃, 250rpm）を行った。ガラクトースを炭素源とするSG(-tp)培地にお

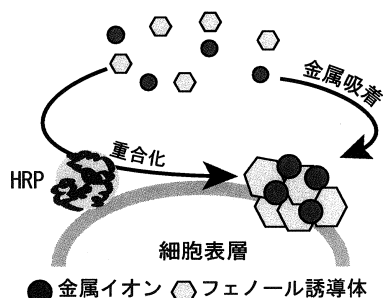


図-1 HRP表層提示酵母を用いた金属回収機構

ける増殖の過程で、EBY100-HRP株はpCT2-HRPに組み込まれた構成型プロモーターGal1を起点に、HRPを細胞内生成し、細胞表層への提示が誘引された。

(2) HRP表層提示酵母の評価

Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (life technologies) を用いてHRP活性の測定をした。検量線にはキットに付随されたHRP活性の標準溶液を使用した。

チラミドシグナル増幅反応 (Tyramide signal amplification : TSA反応) を用いた顕微鏡観察より創成されたHRP表層提示酵母の評価を行った。TSA反応とは、 H_2O_2 存在下でHRPを介してフェノール環を有するチラミドがラジカル化し、その近傍に集積する反応である。この時、チラミドには蛍光標識が付加され、蛍光顕微鏡でチラミドの集積状況を観察することが可能となる。本研究では、培養した酵母を洗浄後スライドガラスに固定し、蛍光標識チラミドと H_2O_2 (0.015 %) を含む反応溶液をアプラインした。その後37℃で20分間反応させ蛍光顕微鏡観察による評価を行った。また、顕微鏡観察で得られた画像は画像処理ソフトウェアimageJを用いて蛍光強度を算出し、比較検定をした。なお、上記した2つの評価のControl系には形質転換を施していないEBY100株をYPED培地で培養 (48h, 30℃, 250rpm) したものをを使用した。

(3) Agイオンを標的とした金属回収実験

EBY100-HRP株およびEBY100株を培養後PBSで洗浄し、Agイオン (Ag^+)、フェノール誘導体としてヒドロキノン、そして H_2O_2 を0.1M HEPES Bufferに溶解させた溶液を投入した。反応溶液中の酵母、 Ag^+ 、ヒドロキノン、 H_2O_2 は $OD_{600}=1$, 5.0 mM, 0.025 %, 0.006 %にそれぞれ調整し、30℃で24時間振盪 (150 rpm) させた。反応後の溶液を遠心分離 (2200G, 10分) した後、その上澄み液を回収しICP-AESで金属イオン濃度を測定するとともに顕微鏡観察を行った。

3. 結果と考察

(1) HRP表層提示酵母の評価

図-2にAmplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kitを用いて測定した酵母 $OD_{600}=1$ あたりのHRP活性の結果を示す。形質転換を施していないEBY100株のHRP活性が0.995 mU/Lであったのに対して、EBY100-HRP株のHRP活性は 1.845×10^2 mU/Lと約200倍に増加した。これより、形質転換されたEBY100-HRP株でHRPが生成されたことが示された。次に、PBSで細胞を洗浄し、その細胞のHRP活性を測定した。これは、本研究のアプローチでは、酵母の表層にHRPが提示され、活性を持つことが重要である。形質転換酵母で、HRPが細胞内部で正常に生成されたとしても、HRPの細胞表層提示を担うアンカーが正常に機能しなければ、HRPの細胞表層に提示されず、結果としてHRPが培地中に溶け出していることが考えられ

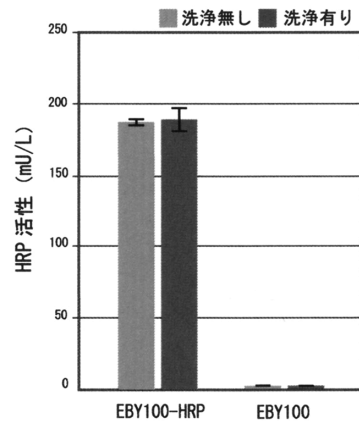


図-2 酵母 $OD_{600}=1$ あたり HRP 活性 (エラーバー：標準偏差)

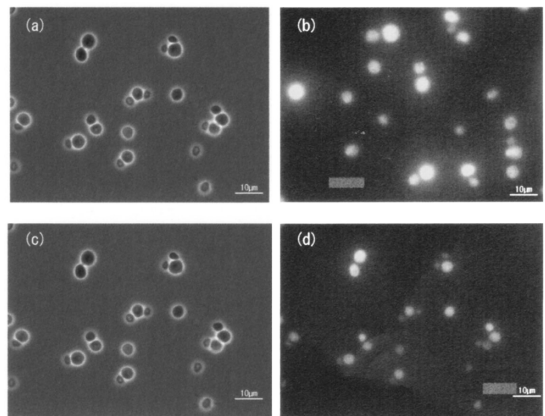


図-3 TSA 反応を用いた HRP 活性の有無の評価

(a) (b) EBY100-HRP 株, (c) (d) EBY100 株
(a) と (c) は明視野, (b) と (d) は蛍光観察,
(a) と (b), (c) と (d) はそれぞれ同一視野を示す。

ためである。洗浄後のEBY100-HRP株が保持するHRP活性を測定したところ、未洗浄のものと比較して大きな差は確認されなかった。このため、EBY100-HRP株の菌体内部で生成されたHRPは細胞表層もしくは内部に存在することで高いHRP活性をEBY100-HRP株に付加することができたと判断した。

また、TSA反応を用いた評価でも、EBY100-HRP株の蛍光強度はEBY100株のものと比較して明らかに高いことが観察された (図-3)。またimageJによる画像の蛍光強度を測定したところ、EBY100-HRP株とEBY100株の結果には有為差0.05%の下で有為な差が存在した。このことから、形質転換を施すことでEBY100-HRP株はEBY100株と比較して高いHRP活性を持つことが確認された。

以上の結果より、EBY100-HRP株ではフェノール誘導体の重合化反応を担うHRPの発現に成功した。

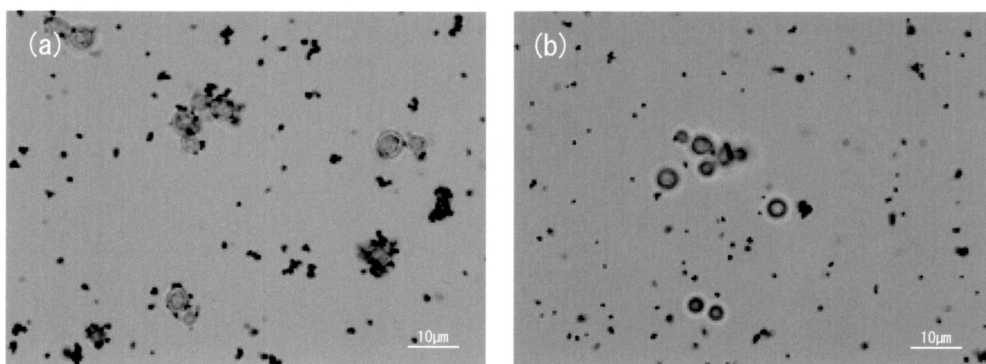


図-4 金属回収実験後の顕微鏡観察結果 (a) EBV100-HRP 株 (b) EBV100 株

(2) Ag^+ を標的とした金属回収実験

図-4に Ag^+ を標的とした金属回収実験のEBV100-HRP株(a)およびEBV100株(b)の顕微鏡観察結果を示す。なお、いずれの図も位相差画像であり、また、図に写し出された黒点は析出した Ag であると考えられる。図-4(a)のEBV100-HRP株の結果からは、細胞表層に Ag が集積していることが確認された一方、形質転換を施していないEBV100株の結果からは細胞表層に隣接した Ag の集積はほとんど見受けられなかった。EBV100-HRP株の細胞表層にHRPが提示されたことで、その近傍でヒドロキノンの重合化が進むことで局所的に還元力が高まり、 Ag^+ が析出し、集積したものと考えられる。しかしながら、この Ag 集積は一部のEBV100-HRP株の菌株でのみで確認された。TSA反応を用いた評価でも、検出された蛍光強度も菌株間で異なっていたことから、多くのEBV100-HRP株菌株は形質転換を行ったにも関わらず、フェノール誘導体の重合化、および金属回収に十分なHRP活性を保持していないことが考えられた。

次に反応後の上澄み液を回収し、ICP-AESにより Ag^+ 濃度を測定したところ、EBV100-HRP株、EBV100株ともに、大部分の Ag^+ は溶液中から析出したと判断される結果が得られた。これは、 Ag^+ がヒドロキノンの還元力により析出したものと考えられる。顕微鏡観察の結果からもEBV100-HRP株、EBV100株ともに酵母には隣接しない箇所に多くの黒点が確認されている。したがって、ICP-AESの結果から、酵母に対してHRP表層提示を施すことで、その Ag^+ の回収性能の向上を示す具体的な結果は得られていない。

先述の Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit を用いた HRP 活性の測定結果では、BY100-HRP 株は EBV100 株と比較して高い HRP 活性を持つことが確認されたが、既報ではフェノール誘導体の重合化反応に 6.0×10^6 mU/L もの HRP を使用している。そのため、EBV100-HRP 株の HRP 活性が低く、金属回収のためのフェノール誘導体の重合化に十分ではなかったことが懸念

された。

以上のことから、本実験において、EBV100-HRP 株の金属回収性能向上に寄与することの確認には至らなかった。しかしながら、形質転換により HRP の細胞表層提示を施した酵母の細胞表層には特異的に Ag の集積が示唆していることが確認されたことから、EBV100-HRP 株の細胞表層に提示された HRP がこの集積に寄与していると考えられた。さらに、既報では異なる反応液を使用しているフェノール誘導体の重合化と金属回収を、単一溶液中で実現できる可能性が示唆された。

4. 総括

酵母に HRP の発現するための遺伝子が組み込まれたプラスミドを挿入し形質転換を施したところ、HRP 活性が酵母野生株 (EBV100 株) と比較して高い HRP 活性を持つ酵母が創成された。また、TSA 反応を用いた評価では、形質転換を施した酵母 (EBV100-HRP 株) からは、より強い蛍光が観察され、細胞に HRP が存在することが明らかになった。

Ag^+ を標的とした金属回収実験では、HRP の表層提示が酵母の金属回収性能向上の確認には至らなかった。しかしながら、顕微鏡観察では EBV100-HRP 株の細胞表層において特異的な Ag の集積を示唆していることが確認された。EBV100-HRP 株の細胞表層に提示された HRP がこの集積に寄与している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Kawakita, H. (2012), Metal Recovery Using Polyphenols Prepared by Enzymatic Reactions of Horseradish Peroxidase. *Science and Technology*, 2(1), 25-29.
- 2) Kuroda, K. *et al.* (2012), Specific adsorption of tungstate by cell surface display of the newly designed ModE mutant. *Appl Microbiol Biotechnol*, 96, 153-159.
- 3) Lipovsek, D. *et al.* (2007), Selection of Horseradish Peroxidase Variants with Enhanced Enantioselectivity by Yeast Surface Display, *Chemistry and Biology*, 14, 1176-1185.