

ターゲット鉱物を選択的に凝集できる多機能性タンパク質の開発

北海道大学 大学院工学研究院 環境循環システム部門

中島 一紀

1. はじめに

電子機器、エネルギー貯蔵、触媒などに不可欠なベースメタル・レアメタルは、今後の低エネルギーで持続可能な低炭素社会の構築において不可欠な元素である。金属は鉱物資源として、地中から鉱石として採掘されるが、鉱石は有用鉱物（例えば硫化銅）と脈石（例えば、シリカ）から構成されるため、有用鉱物と脈石を分ける「選鉱」というプロセスが必要になる。選鉱には様々な種類があるが、多くの金属（銅、亜鉛、ニッケル、白金族金属など）に用いられる代表的な選鉱法として、気泡を使った浮遊選鉱（浮選）がある。これは、一般的に疎水性が高い鉱物（主に硫化鉱物）を気泡剤によって作った泡に付着させて浮かせ、一方で、親水性の表面をもつ脈石（シリカ成分）は沈降させて分離する方法である。ところが、50~100 μm 程度の鉱物微粒子は効率的に泡に付着するが、ごく小さな 2-3 μm 程度の鉱物微粒子は泡に付着せずに、浮選過程で落ちてロスしてしまう（図 1）。実際の浮選の現場において、この経済的損失は非常に大きく、しかも回収されない鉱物は尾鉱として処理しなければならず、環境負荷も極めて大きい。したがって、微小な鉱物粒子を選択的に凝集させて、見かけのサイズを大きくすることができれば、これまで浮選において損失していた有価鉱物を効率的に回収できる。

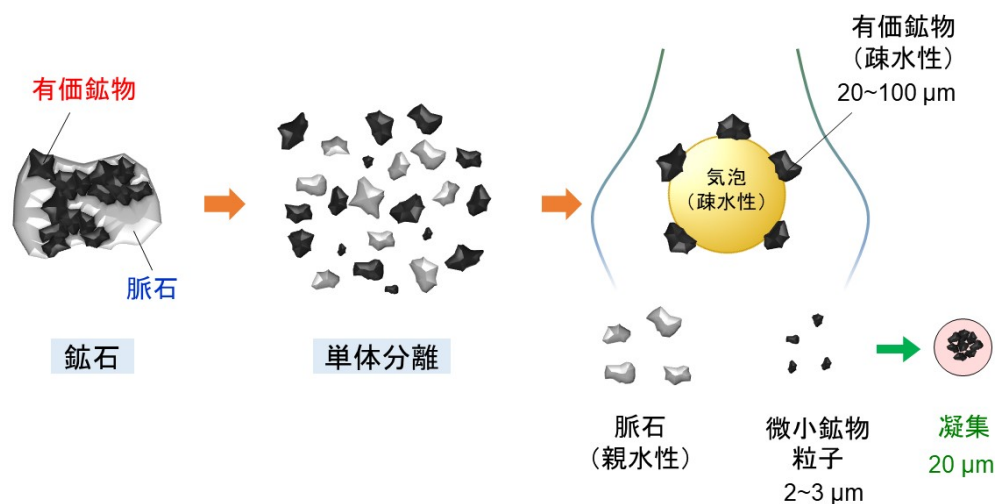


図 1 鉱物の浮遊選鉱と微小鉱物ロスの問題

2. 金属/鉱物に結合する生体分子

ファージディスプレイ法は、特定のターゲットに結合するペプチドを獲得することができる進化分子工学的手法であり（この技術を開発した Smith らは 2018 年ノーベル化学賞を受賞）、これまでに様々な金属結合ペプチドがファージディスプレイ法（図 2）を用いて報告されている¹⁾。したがって、このような金属結合ペプチドの分子認識能をターゲット鉱物の選択的凝集

に利用できると考えた。しかし、金属結合ペプチドは、自身が金属（イオン）と選択的に「結合」することは可能であるが、金属微粒子どうしを「凝集」させる力はない。ここで、水中で微粒子を凝集させるための駆動力として疎水性相互作用を利用する。タンパク質の中には高い疎水性を示すものも存在し、「疎水性の物質」である空気に結合する（つまり、気-液界面に配向する）疎水性タンパク質が報告されている²⁾。したがって、金属結合ペプチドにこのような疎水性タンパク質を分子レベルで融合させることで、金属に結合し、かつ疎水性相互作用により水中で微粒子を凝集させる人工タンパク質を作ることができると考えられる。

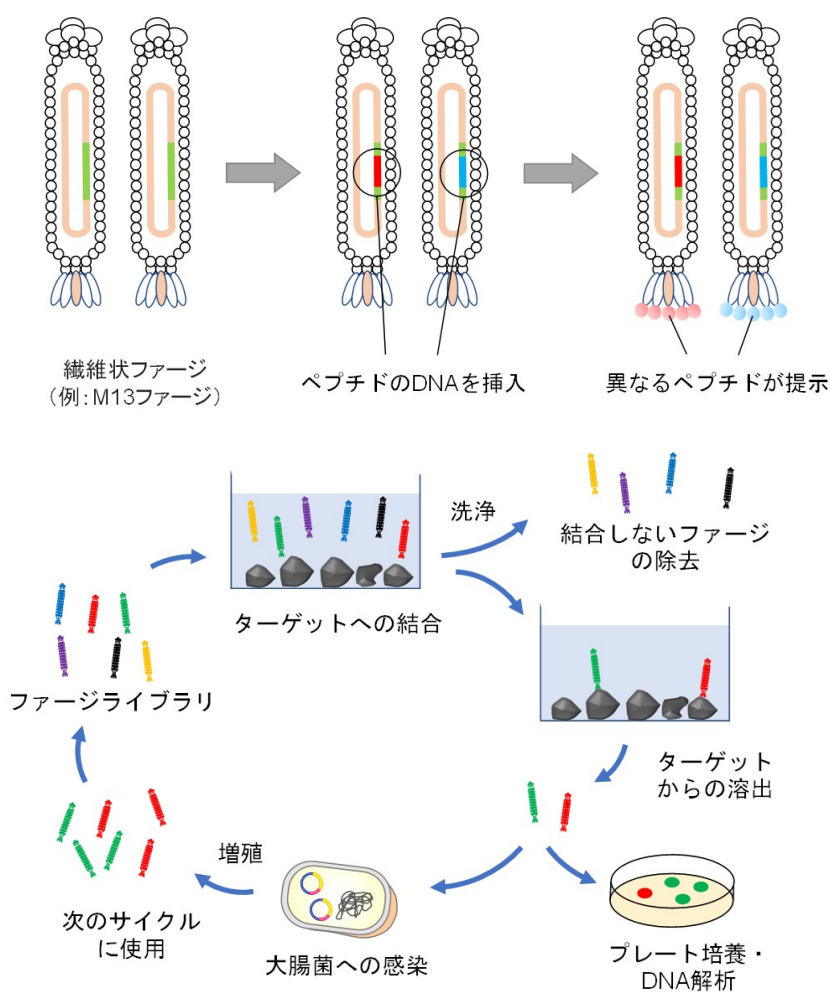


図2 ファージディスプレイ法によるターゲット結合ペプチドの探索

3. 鉱物凝集が可能な融合タンパク質のデザイン

本研究では生物機能を用いた選択的鉱物凝集システムの構築を目的とする。ターゲット鉱物への結合力と凝集力をもつタンパク質であれば目的を達成できるはずであるが、実際にはこのような融合タンパク質を作製すると、高い疎水性のため水溶液中で自己凝集が生じ、タンパク質が沈殿する。これまでに我々は *Pseudomonas* 属由来の親水性タンパク質を融合することで疎水性タンパク質の水溶性を向上させ、水溶液中での安定性を飛躍的に向上できることを報告している³⁾。そこで、本研究においても融合タンパク質の自己凝集性の抑制と、水溶性の付与のために、親水性のタンパク質を融合する。ただし、この親水性タンパク質は凝集力の障害に

もなるため、タンパク質がターゲット鉱物に結合した後は除去する必要がある。そこで、任意のタイミングで切断酵素によって親水性タンパク質を切断・除去するための配列を連結部に組み込む。以上より、下記 A～C の機能をもつ融合タンパク質の開発を行う（図 3）。

- A： 鉱物に選択的に結合するための金属結合ペプチド
- B： 鉱物を凝集させるための疎水性タンパク質
- C： 安定化のための親水性タンパク質

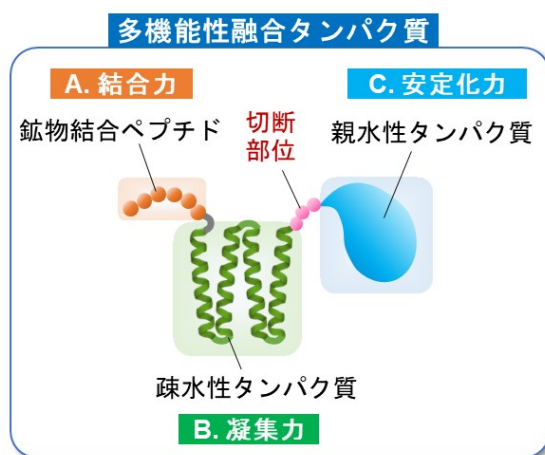


図 3 鉱物微粒子を凝集するための融合タンパク質デザイン

融合タンパク質を用いたターゲット鉱物微粒子の凝集アプローチを図 4 に示す。まず、融合タンパク質がターゲット鉱物に選択的に結合する。その後、切断酵素により親水性タンパク質部分が切断・除去される。これにより、融合タンパク質の疎水性タンパク質が露出し、ターゲット微粒子のみが疎水性相互作用により凝集するという戦略である。これにより、生物の認識・切断・凝集機能を巧みに利用した全く新しい概念のインテリジェント微粒子凝集システムを開発する。

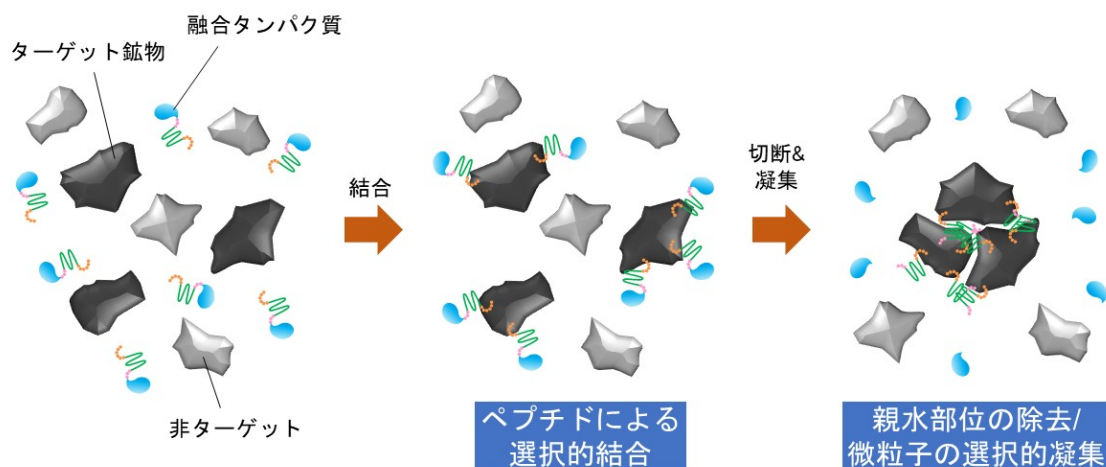


図 4 融合タンパク質を用いたターゲット鉱物微粒子の凝集アプローチ

4. 融合タンパク質の作製と鉱物への結合性評価

本研究では、図4に示した凝集アプローチの有用性を検証するためにターゲット鉱物として黄銅鉱を用いた。すでに報告されている黄銅鉱結合ペプチドを鉱物結合ペプチドとして採用した⁴⁾。また、疎水性タンパク質として気-液界面に配向することが知られているDAMP4²⁾、親水性タンパク質として我々の研究室で開発したInaKC³⁾を用いた。これらのコンポーネントからなる融合タンパク質を作製した。オーバーラップPCR法により、融合タンパク質遺伝子を作製し、その遺伝子を発現用ベクターに挿入した。融合遺伝子発現用ベクターで大腸菌BL21(DE3)株を形質転換し、タンパク質の発現を行った。タンパク質発現の経時変化（ゲル電気泳動）を図5に示す。目的の融合タンパク質（図5の矢印部分）は主に可溶性画分に発現し、また誘導後8時間で十分な発現が得られることが分かった。融合タンパク質は疎水性タンパク質ドメインを含むため、水溶液中で疎水性相互作用により自己凝集し、沈殿として不溶性画分に発現することも懸念されたが、導入した親水性タンパク質の効果により、水溶液中での安定性が増加し、可溶性として発現できたと考えられる。したがって、融合タンパク質のデザインが戦略通りに機能したことが証明された。

作製した融合タンパク質が黄銅鉱に結合するか検討した。図6に、BSA（ウシ血清タンパク質、コントロールタンパク質）、および融合タンパク質の黄銅鉱への結合実験の結果を示す。BSAはほとんど黄銅鉱への結合性を示さないのに対し、融合タンパク質は高い結合性を示した。以上より、融合タンパク質中の黄銅鉱結合ペプチドが本来の結合機能を維持していることが明らかとなった。

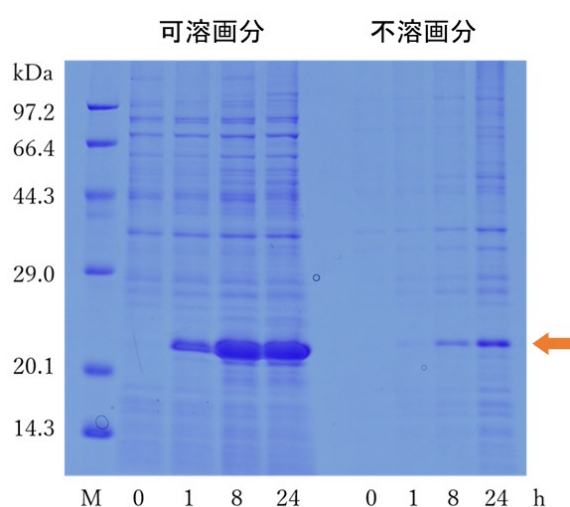


図5 融合タンパク質の発現

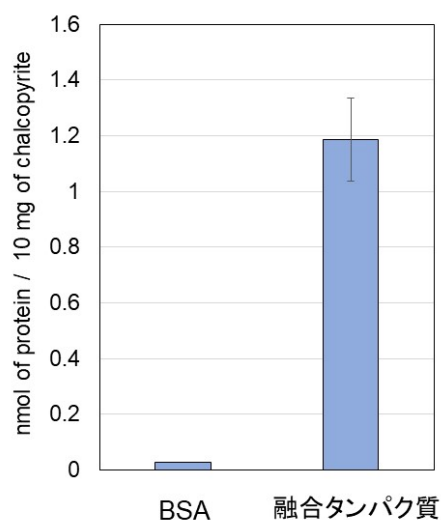


図6 黄銅鉱への結合性

4. 鉱物の凝集実験

黄銅鉱の微小粒子（2-3 μm ）を用いて、融合タンパク質による凝集実験を行った。黄銅鉱の微小粒子は非常に細かいため、水溶液中で安定的に分散し、黒い懸濁溶液が観察された（図7左：タンパク質なし）。一方、融合タンパク質を添加し、切断酵素により親水性タンパク質を切断・除去した系では黄銅鉱微小粒子の凝集・沈殿が見られた（図7右：タンパク質添加 2.5 μM ）。また、タンパク質濃度を下げた条件（1.25 μM ）でも同様の凝集・沈殿が見られた。

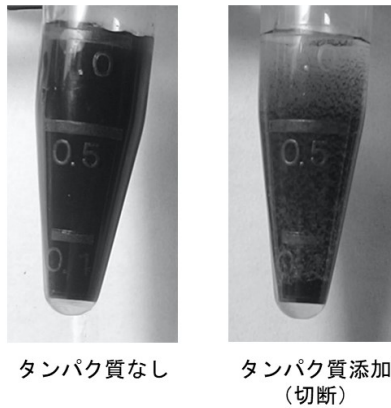


図 7 黄銅鋳微粒子分散液への融合タンパク質の添加

そこで、水溶性タンパク質の切断・除去、および融合タンパク質濃度が凝集に及ぼす影響を調べるために、沈殿物の顕微鏡観察（明視野）を行った（図 8）。コントロール（タンパク質なし、図 8 (a)）では、黄銅鋳微粒子は安定に分散しており、もともとの鋳物サイズである数 μm 程度の微粒子が確認された。一方、融合タンパク質添加系（親水性タンパク質非切断、図 8 (b)および(c)）では、いくらか鋳物微粒子が凝集した様子が観察され、親水性タンパク質を切断・除去した系（図 8 (d)および(e)）では凝集体サイズの増大が見られた。特に、高濃度タンパク質の系 ($2.5 \mu\text{M}$) でより顕著な凝集体が確認された。つまり、親水性タンパク質が融合した状態でも疎水性タンパク質の凝集力により、若干の凝集体が形成されるが（図 8 (b)および(c)）、親水性タンパク質を切断・除去することにより、鋳物表面が疎水的となり（図 4）、大きな凝集体が形成された（図 8 (d)および(e)）と考えられる。

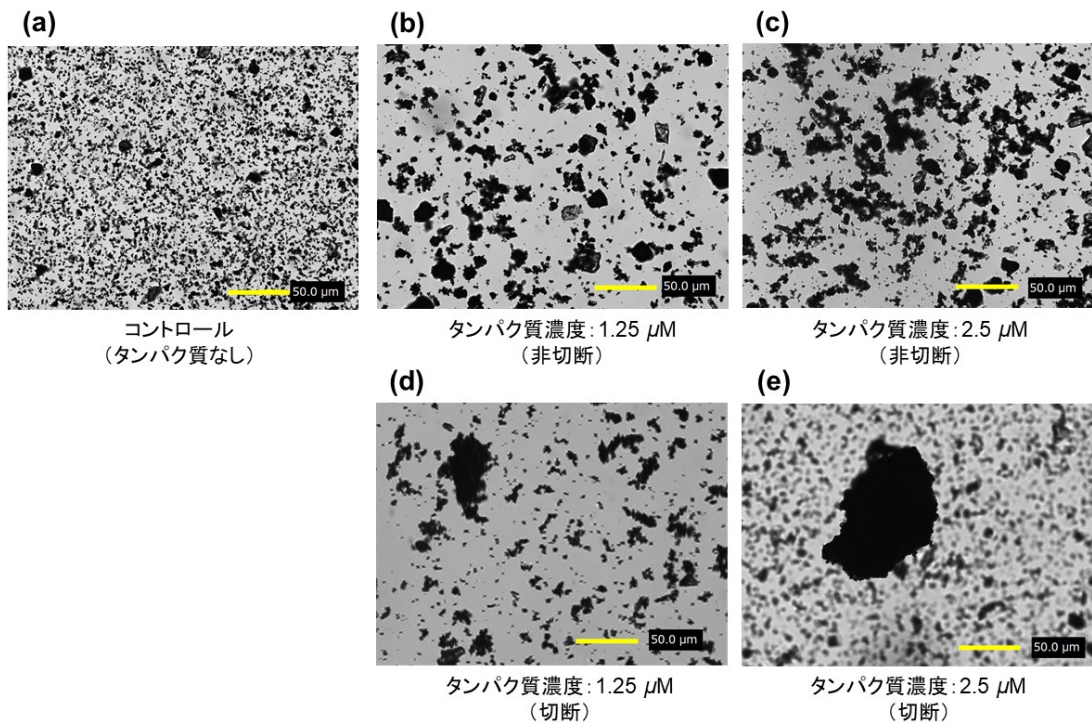


図 8 融合タンパク質によって凝集した黄銅鋳微粒子の顕微鏡観察

(a) コントロール (b) $1.25 \mu\text{M}$ タンパク質添加 (c) $2.5 \mu\text{M}$ タンパク質添加
(d) $1.25 \mu\text{M}$ タンパク質添加後、親水部切断 (e) $2.5 \mu\text{M}$ タンパク質添加後、親水部切断

9. まとめ

本研究では、金属に選択的に結合するペプチドと、水中で凝集する疎水性タンパク質を組み合わせた融合タンパク質をデザインし、選択的な鉱物微粒子の凝集システムを開発した。この技術は、金属結合ペプチドの種類を変えることで様々な金属鉱物をターゲットとすることができ、ペプチドや疎水性タンパク質の数や配置を変えることで、システムの最適化や高機能化が可能なデザインブルでユニバーサルなシステムである。この技術は、既存の尾鉱や鉱滓（鉱山廃棄物）からの有用資源の再回収や、都市鉱山からの有価金属回収にも応用できると期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、天野工業技術研究所研究助成金から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) Andrew Care, Peter L. Bergquist and Anwar Sunna, “Solid-binding peptides: smart tools for nanobiotechnology” *Trends in Biotechnology*, **2015**, 33, 5 259–268.
- 2) David Wibowo, Chun-Xia Zhao, and Anton P. J. Middelberg, “Interfacial Biomimetic Synthesis of Silica Nanocapsules Using a Recombinant Catalytic Modular Protein” *Langmuir*, **2015**, 31, 1999–2007.
- 3) Kasun Godigamuwa, Kazunori Nakashima, Sota Tsujitani, Ryo Naota, Ilham Maulidin and Satoru Kawasaki, “Interfacial biosilica coating of chitosan gel using fusion silicatein to fabricate robust hybrid material for biomolecular applications” *Journal of Materials Chemistry B*, **2023**, 11, 1654–1658.
- 4) Susan B. Curtis, Ross T.A. MacGillivray, W. Scott Dunbar, “Effects of bacteriophage on the surface properties of chalcopyrite (CuFeS_2), and phage-induced flocculation of chalcopyrite, glacial till, and oil sands tailings” *Biotechnology and Bioengineering*, **2011**, 108, 1579–1590.