

ホヤのバナジウム結合蛋白質の金属結合能の解析

Analysis of the Metal-Binding Activities of Vanadium-Associated Proteins of the Ascidian

研究代表者 広島大学大学院理学研究科附属臨海実験所 助手
Research Associate, Marine Biological laboratory,
Graduate School of Science, Hiroshima University.

植木 龍也
Tatsuya Ueki

Ascidians, known as sea squirts, accumulate vanadium metal from sea water. The concentration of vanadium in vanadium-accumulating cells, named as vanadocytes, reaches 350 mM which is 10^7 times higher than that in sea water. We have previously identified and cloned several cDNAs encoding vanadium-associated proteins, VAPs. Recently we have shown that these proteins bind to vanadium ions in vitro. In this study, by using two assay systems to examine metal binding activity of the VAPs, of an ascidian *Ascidia sydneiensis samea*, we found that about twenty vanadium (IV) ions or vanadium (V) ions bind to 15-kDa VAPs. In addition, copper(II) ions bind to 15-kDa VAP, but ferric(II) ions do not bind to the VAP.

1. 研究目的

海産の無脊椎動物であるホヤは、特定の血球(バナドサイト)の液胞中に稀少金属バナジウムを高濃度に濃縮している。その濃度はホヤの種によって異なるが、最も高濃度にバナジウムを濃縮している種では 350mM に達する。 10^7 倍に相当するこの濃度勾配は他の生物に例を見ないものである。さらに、ホヤにおけるバナジウムの濃縮は、イオン選択性が高いことと酸化還元が特異であることから、きわめて興味深い。このバナジウムの特異的濃縮機構を解明することは、基礎生物学の分野において生命体による金属イオンの選択的利用機構の恰好のモデルとなるのみならず、海水中に大量に存在する稀少金属の選択的分取へと応用できる可能性を秘めている。

我々の研究室では過去 20 年にわたってこの現象に関する基礎的研究を進めてきた。その一連の研究の中で、世界に先駆けてバナジウム結合タンパク質(Vanadium-Associated Protein: VAP)を同定し、12.5kDa, 15kDa, 16kDa の 3 種類の VAP を精製することに成功した。その

内、12.5kDa と 15kDa の二つの VAP については、既に遺伝子を単離し一次構造を明らかにした。これらはいずれもアミノ酸組成の約 20%がシステインから成り、 $\{C\}-\{x(2-4)\}-\{C\}$ という特徴的なモチーフの繰り返しを持つ新規のタンパク質である。

VAP はバナドサイトの細胞質に特異的に存在する可溶性タンパク質で、バナジウムの濃縮に直接関与するタンパク質と考えられる。しかしながら、バナジウム等の金属に対する結合能力については、いまだ詳細な解析がなされていない。そこで、本研究では VAP 組み換えタンパク質の大量合成と金属結合能の解析と、VAP の欠失変異型組み換えタンパク質の作成を行った。

2. 研究経過

2.1. 方法

2.1.1 組み換えタンパク質の大量合成

12.5kDa および 15 kDa VAP のコード領域を PCR によって増幅し、大腸菌用の発現ベクター pMAL-c(NEB 社)に挿入した後、大腸菌 TB1

株に導入した。ジャーファーメンターを用いて 2.0 リットルの LB-Amp 培地中で、0.5mM IPTG を添加して 37℃ で 6 時間培養した。遠心で菌体を回収し、4M 尿素を含む溶菌バッファーに懸濁した後、超音波で菌体を破碎した。カラムバッファーに対して透析をした後、アミロースレジンカラムを用いて融合タンパク質を精製した。200 分の 1 量の FactorXa と混合し、30℃ で 16 時間反応した。50mM Tris-Cl (pH7.4) に対して透析した後、DEAE-Sephacel(アマシャム社)を用いたイオン交換クロマトグラフィーによって VAP を精製した。

2.1.2 平衡透析法による金属結合能の解析

精製した VAP を、25mM EDTA を含む 50mM Tris-Cl (pH7.4) に対して透析した。その後、50mM Tris-Cl (pH7.4) に対して透析した。タンパク質濃度は 100µg/ml 程度に調製した。多検体平衡透析セル(サンプラテック社)の内側に 0.6ml の VAP 溶液、外側に 2.0ml の金属溶液を入れ、その間に分子量 6000-8000 でカットする再生セルロース製透析膜を挟んだ。4℃ で回転しながら 48 時間おいた後、内側、外側の金属濃度を原子吸光分光法によって定量した。

2.1.3 Hummel-Dreyer 法による金属結合能の解析

精製した VAP を、25mM EDTA を含む 50mM Tris-Cl (pH7.4) に対して透析した。その後、1mM HEPES (pH7.4) に対して透析した。タンパク質濃度は 100µg/ml 程度に調製した。金属イオンと 20mM NaCl を含む 10mM HEPES (pH7.4) バッファーで平衡化した P6-DG ゲル濾過カラム(BioRad 社、0.7×20cm)に、同濃度の金属イオンを含むタンパク質溶液 200µl をロードし、流速 0.25ml/min で 1min 毎にフラクションを回収した。各フラクションに含まれる金属及びタンパク質濃度を、原子吸光分光法およびブラッドフォード法によって定量した。

2.1.4 欠失変異型 VAP の作製

各々の VAP の特定の領域をはさんで特異的なプライマーを設計し、PCR によって増幅した。制限酵素消化した後、全長の VAP と同様に発現ベクターに挿入し大腸菌に導入した。

2.2. 結果と考察

2.2.1. 組み換え VAP の大量合成

まず、マルトース結合タンパク質(MBP)とバナジウム結合タンパク質(VAP)との融合タンパク質を合成した(図 1)。融合蛋白質の分子量は、12.5kDa VAP の場合は 52.1kDa、15kDa VAP の場合は 53.2kDa であり、期待通りであった。1 リットルの培養から、それぞれ平均 17.0mg および 29.3mg の融合蛋白質が得られた。

次に、この融合蛋白質を特異的プロテアーゼ FactorXa によって切断した。切断後、イオン交換カラムによって VAP と MBP を分離した(図 2)。

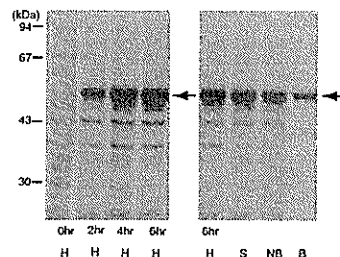


図 1. 15kDa VAP の合成と精製。左：培養開始後 0 時間、2 時間、4 時間、6 時間の時点での大腸菌抽出物(H)の電気泳動の結果。右：6 時間の培養液に由来する総タンパク質(H)、可溶性タンパク質(S)、非吸着画分(NB)、精製された融合蛋白質(B)。矢印が 53.2kDa の融合蛋白質を示す。

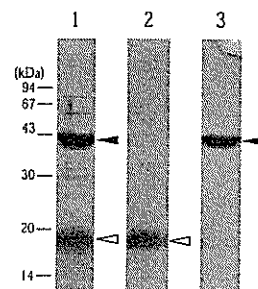


図 2. 15kDa VAP の FactorXa による切断と分離。レーン 1：切断後でカラム分離前のタンパク質、レーン 2：非吸着画分、すなわち VAP(白三角)、レーン 3：400mM NaCl 溶出画分すなわち MBP(黒三角)。

2.2.2. 組み換え VAP の金属結合能

得られた組み換え VAP から金属を除去した後、金属結合実験を行った。

本研究ではまず多検体平衡透析セルを用いて金属結合実験を行った。50mM Tris-Cl (pH7.4) 中で結合実験を行った結果、その結果、12.5kDaVAP には 25-30 個の 4 価のバナジウムが、15kDa VAP には 10-12 個の 4 価のバナジウムが結合することがわかった(図 3)。一方、5 価のバナジウムイオンは非常に大きな結合数を示した。その理由として、イオン結合等の非特異的な結合によるものと考えられたため、それを抑制するために以後の実験では 20mM NaCl を添加した 10mM HEPES (pH7.2) を用いることとした。また、多検体透析セルを用いた実験では、金属濃度が低いところで結合数が小さい傾向を示した。その理由は、内液と外液の量比が小さい(蛋白質溶液の 3 倍程度)ことが考えられた。

次にゲルろ過カラムを用いた Hummel-Dreyer 法による結合実験を行った。本手法では金属の供給が十分に(蛋白質溶液の 10 倍程度)行われる。その結果、15kDa VAP は 20mM NaCl を含む 10mM HEPES バッファー中で約 20 個の 4 価および 5 価のバナジウムと結合した(図 4A)。

一方、われわれは最近核磁気共鳴(NMR)による VAP の立体構造の解析を開始したが、NMR の溶媒である 20mM リン酸ナトリウムバッファー中では、15kDaVAP は 7 個の 4 価のバナジウムと結合したが、5 価のバナジウムとはほとんど結合しなかった(図 4B)。その理由として、5 価のバナジウムイオンとリン酸イオンの立体構造が似ているため競合阻害が起こった可能性が考えられる。また 4 価のバナジウムイオンの結合数が減少したのは、4 価と 5 価のイオンの結合部位が共通してある程度の競合阻害が起こったためであると考えられる。

次に、バナジウム以外の金属イオンとの結合実験を行った。本実験では、銅および鉄を用いて実験を行った。各金属を 10 μ M 含む 20mM NaCl,10mM HEPES バッファー中で結合実験

を行ったところ、15kDaVAP に対して鉄とはほとんど結合しなかったが、銅は約 5 個結合した。

一方、12.5kDa VAP については溶解度の問題から解析が困難であり、手法の改善が必要である。

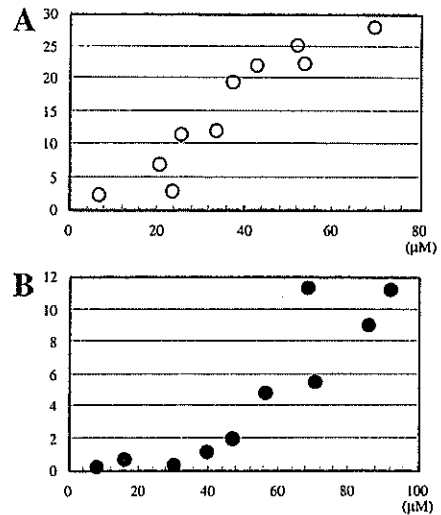


図 3. A:12.5kDa VAP、および B: 15kDa VAP と 4 価のバナジウムイオンとの結合。横軸は外液のバナジウム濃度、縦軸はタンパク質 1 分子あたりのバナジウム結合数を示す。

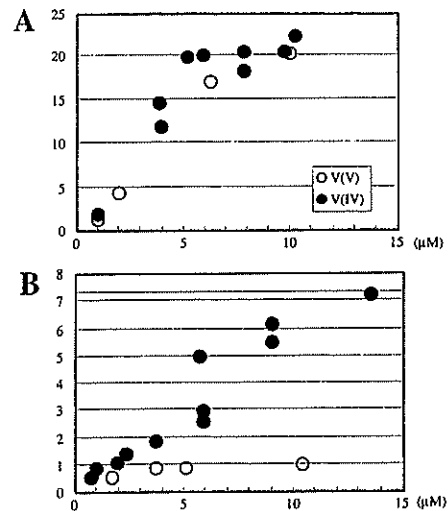


図 4. A: 20mM NaCl を含む 10mM HEPES バッファー、および B: 20mM NaPi バッファー中での、15kDa VAP と 4 価(黒丸)および 5 価(白丸)バナジウムイオンとの結合。横軸は外液のバナジウム濃度、縦軸はタンパク質 1 分子あたりのバナジウム結合数を示す。

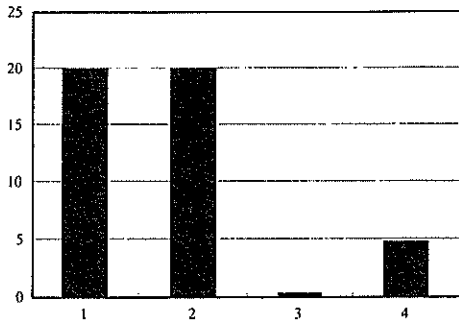


図5. 20mM NaClを含む10mM HEPESバッファー中での、15kDa VAPに対する各種金属の結合数。1: 4価バナジウム、2: 5価バナジウム、3: 鉄、4: 銅。いずれも金属の濃度は10 μ Mとした。

2.2.3. 変異型組み換え VAP の作成

12.5kDa および 15 kDa VAP のコード領域をいくつか断片化した組み換えタンパク質、すなわち欠失突然変異型 VAP を産生する発現ベクターを構築した。当初の計画にあった部位特異的変異については、現在進行中の NMR による構造解析の結果が得られてから開始することとした。

欠失突然変異型 VAP について、今後ゲル濾過法を用いた金属結合能の解析を行い、VAP のどの領域に金属結合能があるのかを調べる。

3. 研究成果

本研究ではまずホヤのバナジウム結合タンパク質(VAP)の大量合成系を確立し、得られた組み換えタンパク質を用いて金属結合能を解析した。その結果、15kDa VAP は約 20 個の 4 価および 5 価のバナジウムイオンと結合することがわかった。また、この VAP は銅と結合能を有するが鉄とは結合しないことがわかった。

4. 今後の課題と発展

本研究で扱ったバナジウム結合蛋白質(VAP)遺伝子はこれまでにない新規の金属結合タンバ

ク質であり、本研究期間中に新たに見つかったものを含めて少なくとも 4 種類の類似する蛋白質からなるファミリーを形成していると考えられる。そこでわれわれはこれらのタンパク質を、Vanabin (Vanadium-Binding Protein の略称)と命名した。

本研究では主として 15kDa Vanabin の金属との結合に関するデータが得られた。今後は 15.2kDa Vanabin について合成条件の再検討を行った後に、同様に金属結合能の詳細な解析を行いたい。さらに新規の Vanabin についても遺伝子クローニング等を行った後、同様の解析を行いたい。同時にそれらの相互関係の解析も進めたい。

一方われわれは、組み換え Vanabin を用いて X 線構造解析や NMR 解析等によってその三次元構造を明らかにすることも目指す。それらの解析から、特定の金属と選択的に結合する新たなタンパク質ドメインの発見に至る可能性が非常に高い。

また、本研究で得られたバナジウム結合タンパク質は、海水からのバナジウムの大量分取に応用できる可能性がある。バナジウムは次世代の産業を支える重要な希少金属であるが、わが国にはほとんど産出しない。海水中から効率的にかつ高選択的に回収することが出来れば、工業的に非常に有益である。本研究の成果をそのような応用の基盤として活用したい。

5. 発表論文リスト

Michibata, H., Uyama, T., Ueki, T. and Kanaomori, K. (2001). The mechanism of accumulation and reduction of vanadium by ascidians. In "The Biology of Ascidian", Sawada, H., Yokosawa, H. and Lambert, C. C., eds.: Springer-Verlag Tokyo), pp. 363-373.