



Application of volcanic ash particles for protein affinity purification with a minimized silica-binding tag

7残基のシリカ結合タグの開発と火山灰粒子を担体としたタンパク質アフィニティー精製法への応用

(JBB, Vol. 122, No. 5, 633–638, 2016)

Mohamed A. A. Abdelhamid^{1,2,a}・池田 丈^{1*}・本村 圭¹・田中 達也¹
石田 丈典¹・廣田 隆一¹・黒田 章夫¹

His-tagに代表されるアフィニティー精製法は、目的タンパク質を簡便に精製するために、いまや研究になくてはならない手法である。しかし、アフィニティー精製の担体は一般的に高価であり、精製にかかるコストが高いという問題がある。そこで本研究では、安価なシリカ(SiO₂)粒子の表面に結合するペプチドをタグ配列として利用することで、低コストのアフィニティー精製法の開発を試みた。

筆者らはこれまでにグラム陽性細菌 *Bacillus cereus* ならびにその近縁種が孢子形成期に可溶性のケイ酸(Si[OH]₄)を取り込み、細胞内で重合してシリカを形成することを発見した¹⁾。また、本菌のシリカ蓄積メカニズムの解析を行い、孢子殻タンパク質の一つである CotB1 がシリカの蓄積に関与しており、特にそのC末端領域に存在する14残基の塩基性領域(以下CotB1p領域)がシリカに対する親和性を有していることを明らかにした^{2,3)}。このCotB1p領域を他のタンパク質に融合した場合もシリカへの親和性を発揮することから、この配列を基に精製法の開発を進めた。

まず、タグのサイズをHis-tag(6–10残基)と同程度まで小型化するため、14残基のCotB1p領域をさらに小さくした複数の欠失変異体を作製し、シリカに対する親和性を比較した。その結果、CotB1p領域の後半7残基に相当する配列(以下SB7タグ:RQSSRGR)だけでも、元のCotB1p領域と比べて遜色のない親和性を示すことが明らかとなった。

SB7タグを用いたアフィニティー精製法の開発のためには、シリカに結合した状態のSB7タグをシリカから解離させ、目的タンパク質を溶出させる方法を確認する必要がある。解離に適した条件を調べるためには、結合メカニズムに関する知見が役立つと考え、アラニンスクランニング法によりSB7タグとシリカとの結合に重要なアミノ酸残基の同定を試みた。その結果、SB7タグ中に存在する三つのアルギニン残基が、シリカへの結合に重要であることが示された。このことから、モノマーの

L-アルギニンを含む溶液を添加することで、シリカに結合したSB7タグを競合的に溶出できるのではないかと考えた。実際に検討したところ、0.5 M程度のL-アルギニン溶液(pH 8.0)を添加することで、予想通りSB7タグ融合タンパク質をシリカから溶出できることを見いだした。

これらの結果を基に、シリカ粒子を精製用担体として、また、L-アルギニンを溶出剤として用いたSB7タグ融合タンパク質のアフィニティー精製法を確立した。C末端にSB7タグを融合したGFPをモデルとして評価を行ったところ、本手法により精製された目的タンパク質の純度は約90%、収率は約80%であり、既存のアフィニティー精製法に匹敵する純度・収率を達成することができた。なお、SB7タグをN末端に融合した場合でも、同様に精製することが可能であった。

本手法のさらなるコスト低減を目指して、化学合成された純粋なシリカ粒子ではなく、天然のシリカ含有鉱物を担体として利用することを試みた。そのモデルとして、九州南部に広く分布する火山灰である『シラス』[主成分はシリカ(約70%)と酸化アルミニウム(約14%)]を担体として用いた場合でも、シリカ粒子を用いた場合と同様に高純度(約90%)・高収率(約90%)でSB7タグ融合タンパク質の精製に成功した。

本技術では、安価なシリカ粒子や天然鉱物をそのまま精製用担体として利用するという戦略により、従来法に比べ大幅な低コスト化を実現できる。また、溶出に用いるL-アルギニンにはタンパク質の凝集を抑制する効果が報告されており⁴⁾、凝集しやすい不安定なタンパク質の精製にも有効であることが期待される。現在、本技術の実用化に向けて、さらなる研究を進めている。

- 1) Hirota, R. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **192**, 111 (2010).
- 2) Motomura, K. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **198**, 276 (2016).
- 3) Abdelhamid, M. A. A. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 5677 (2014).
- 4) Tsumoto, K. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **20**, 1301 (2004).

*著者紹介 広島大学大学院先端物質研究科分子生命機能科学専攻(助教) E-mail: ikedakeshi@hiroshima-u.ac.jp

¹広島大学, ²Minia University, Egypt, ^a現 Korea University, Korea
生物工学 第96巻 第2号 (2018)