

## 2025年度 JKA補助事業 (機械振興・研究補助)

### 研究成果概要

(※本研究は、競輪の補助を受けて実施しました)

補助事業番号 2025M-319

補助事業名 2025年度 光駆動型重金属回収ナノマシンの開発 補助事業

補助事業者名 北海道大学 大学院先端生命科学研究院 菊川 峰志

#### 1 研究の概要

異なる機能を持つ2種類の蛋白質を脂質膜小胞(リポソーム)に組み込み、光をエネルギー源として環境中の重金属を内部に蓄積するリポソームの開発を目指した。本研究で開発を目指す「ナノマシン」とは、このリポソームのことである。使用する蛋白質の一つは、光をエネルギー源としてH<sup>+</sup>を内側へ輸送し、脂質膜を隔てたH<sup>+</sup>の電気化学ポテンシャル勾配を形成するH<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシン(以下、H<sup>+</sup>ポンプ蛋白質と記す)である。もう一つは、H<sup>+</sup>の電気化学ポテンシャル勾配をエネルギー源として重金属をリポソーム内部へ取り込む重金属輸送蛋白質である。本研究では、最適な重金属輸送蛋白質の決定と、その大腸菌を利用した発現・精製系の確立、さらにリポソーム作製条件の決定を行い、最終的にナノマシンのプロトタイプ of 作製に成功した。

#### 2 研究の目的と背景

Cd<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>等の重金属イオンは、過剰曝露により生体に有害作用を及ぼすため、土壌や地下水、産業排水において厳格な管理・除去が求められている。従来、重金属イオンの回収方法としては、硫化物沈殿法や水酸化物沈殿法などの化学的沈殿法、活性炭やイオン交換樹脂を用いた吸着法、逆浸透膜や電気透析等の膜分離法、電気化学的手法などが広く利用されてきた。これらの方法は、多量の化学薬品を必要とすることによる環境負荷や二次廃棄物の発生、装置や運転コストの高さ、低濃度重金属イオンに対する回収効率の低さといった問題がある。本研究では、2種類の膜蛋白質を用いて、重金属を特異的に回収する新しい手法の開発を目指した。

生物の細胞膜上では、複数の膜輸送蛋白質が共役して働く高度なシステムが構築されている(図1A)。細菌では、栄養物の代謝で得たエネルギーを電子伝達系の膜蛋白質が細胞膜を隔てたH<sup>+</sup>の電気化学ポテンシャル勾配へと変換する。この勾配は、栄養物を取り込む膜輸送蛋白質や毒物を排出する膜輸送蛋白質のエネルギー源として活用される。

本研究では、この手法を模倣し、膜輸送蛋白質の光エネルギー共役系を脂質小胞の膜上に構築する(図1B)。前述した通り、使用する蛋白質の一つは、H<sup>+</sup>ポンプ蛋白質である。この蛋白質は単細胞微生物に広く見出される蛋白質であり、それらの細胞膜中ではH<sup>+</sup>を細胞外へ輸送する。しかし、古細菌由来のH<sup>+</sup>ポンプ蛋白質はリポソームに再構成すると細胞膜中とは逆方向に挿入され、リポソームの内側へH<sup>+</sup>を輸送することが知られている(Klausner et al., *Biochemistry* 1982,

21, 3643-3650)。もう一つの蛋白質である重金属輸送蛋白質にも微生物由来のものを用いた。これらは $H^+$ との対向輸送によって2価の重金属を輸送する。通常、微生物の細胞膜では図1Aに示すように外部から内部へ向かう $H^+$ 勾配が形成されているため、重金属輸送蛋白質は重金属を細胞外へ排出し、その細胞毒性を軽減する働きを持つ。先行研究より、重金属輸送蛋白質をリポソームに再構成すると、 $H^+$ の電気化学ポテンシャル勾配の向きに応じて重金属の排出と取り込みの両方が観測されるため、この蛋白質は細胞膜中と同じ配向と逆向きの配向の2通りの状態で再構成されると考えられている(Chao & Fu, *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 12043-12050)。したがって、古細菌由来の $H^+$ ポンプ蛋白質とともに再構成すれば、光照射下において環境中の重金属をリポソーム内部へ輸送できると期待される。

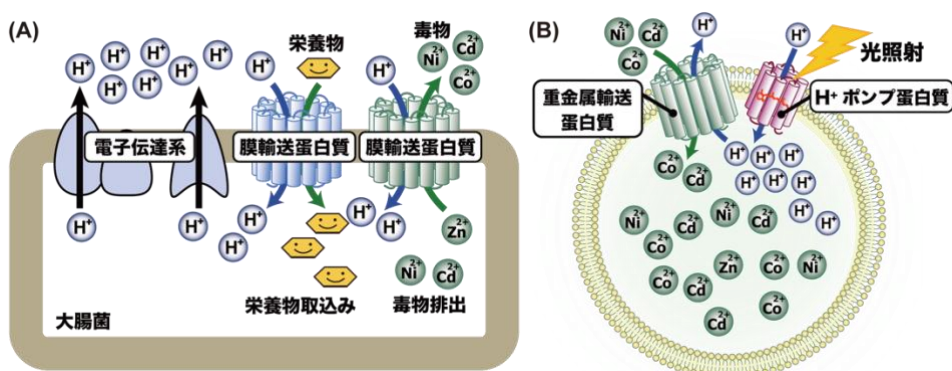


図 1. (A)大腸菌の細胞膜上に存在する膜輸送蛋白質間の協力関係、  
(B)光で駆動される重金属回収ナノマシン

### 3 研究内容

#### (1)最適な重金属輸送蛋白質の決定および発現・精製系の確立

大腸菌由来のZitBおよびFieF、さらに重金属耐性菌 *Cupriavidus metallidurans* 由来のCzcAおよびCzcDを候補とし、本研究に最適な重金属輸送蛋白質の選定を行った。各輸送蛋白質の遺伝子をtacプロモーターを有する大腸菌用発現プラスミドに挿入し、このプラスミドを用いて大腸菌の細胞膜に蛋白質を発現させ、それぞれの排出活性を評価した。これらの重金属輸送蛋白質はいずれも、 $H^+$ との対向輸送によって重金属を膜輸送する。そこで、大腸菌懸濁液に $Cd^{2+}$ を添加して $Cd^{2+}$ の受動的な細胞内蓄積を起こさせた後、大腸菌の代謝基質であるグルコースおよび乳酸を加え、電子伝達系を駆動することで $H^+$ の電気化学ポテンシャル勾配を形成させた(図2)。重金属輸送蛋白質の輸送活性が強いほど $Cd^{2+}$ が細胞外へ排出されるため、細胞内に残存する $Cd^{2+}$ は減少することが期待される。この細胞内 $Cd^{2+}$ 量を原子吸光法により定量した。その結果、ZitBとFieF、及び、CzcDが同程度の排出活性を示し、 $Cd^{2+}$ 蓄積量は代謝基質を加えなかった細胞に比べて

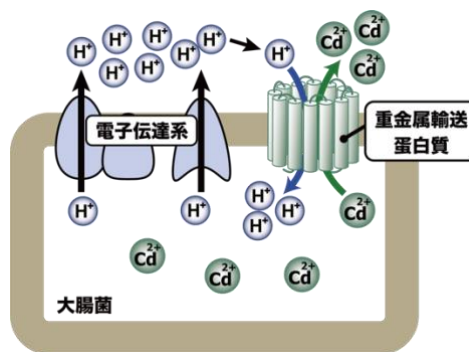


図 2. 重金属輸送蛋白質の輸送活性測定

15-40%にまで減少した。以上より、これら3種がリポソームに組み込む候補蛋白質であると考えられたが、後続の実験ではZn<sup>2+</sup>も輸送基質として用いる可能性があるため、Zn<sup>2+</sup>に対して高い活性を示すことが報告されているZitBを採用することとした(Grass et al., *J. Bacteriol.* 2001, 183, 4664-4667)。

続いて、ZitBの大腸菌細胞膜からの高純度精製を試みた。大腸菌細胞膜への発現量を向上させるため、上述のプラスミドに加えて、araBADプロモーターを有するプラスミドも構築し、種々の大腸菌株と発現条件を試した。その結果、大腸菌1 L培地あたり、0.8 mgのZitBを高純度で得ることに成功した。

### (2)リポソーム作製条件の決定

膜蛋白質をリポソームへ再構成する主要な方法である、(1)組み込み法、(2)不安定化リポソーム法、(3)透析法を、輸送活性の評価が容易なH<sup>+</sup>ポンプ蛋白質の再構成に適用し、どの方法で強いH<sup>+</sup>ポンプ活性が得られるかを調べた。脂質としては卵黄レシチンおよび大腸菌脂質を使用した。

これらのリポソーム懸濁液を光照射し、H<sup>+</sup>ポンプ蛋白質のH<sup>+</sup>輸送活性を、pH変化として検出を試みたところ、透析法でのみ明瞭なpH上昇が観測され(図3)、期待していた通り、H<sup>+</sup>ポンプ蛋白質がリポソームの内側に向かってH<sup>+</sup>を輸送することがわかった。以上により、ナノマシンの作製には、透析法を採用することとした。

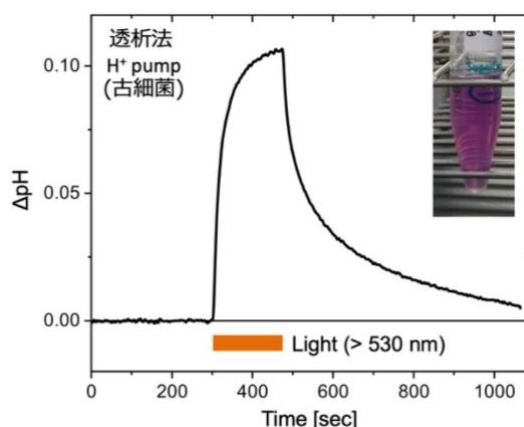


図 3. 透析法によりリポソームへ再構成したH<sup>+</sup>ポンプ蛋白質のH<sup>+</sup>輸送活性

### (3)ナノマシンのプロトタイプ作製

H<sup>+</sup>ポンプ蛋白質として、古細菌*Halobacterium salinarum*由来のbacteriorhodopsin (BR)を用いて、BRとZitBを再構成したリポソームを透析法によって作製した。また、比較対象として、BRのみを再構成したリポソームも作製した。脂質には大腸菌由来脂質、界面活性剤にはコール酸を用いた。

リポソーム懸濁液に終濃度540 ng/mLのZn<sup>2+</sup>を添加し、光照射下または暗所で静置した。その後、Sephadex G-50を充填したスピナラムで処理し、リポソーム外部のZn<sup>2+</sup>を除去した。溶出したリポソームを界面活性剤(n-Dodecyl-β-D-maltoside)で可溶化し、続いて蛋白質を塩酸によって変性させた後、内部に蓄積されていたZn<sup>2+</sup>を比色試薬5-Br-

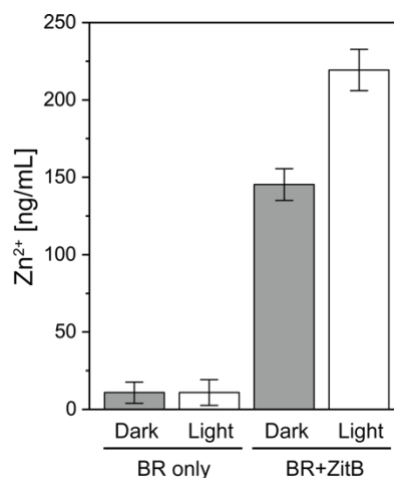


図 4. 光照射によるZn<sup>2+</sup>輸送の検出: 3本の独立サンプルによる平均値と標準偏差を示した。

PAPSを用いて定量した(図4)。縦軸の値は、最終的に得られた試料溶液に含まれる $Zn^{2+}$ 濃度 (ng/mL)を示している。測定の結果、BRのみを再構成したリポソームでは微量の $Zn^{2+}$ しか検出されなかった。一方、ZitBも再構成した場合には、暗所下の試料でも約150 ng/mLの $Zn^{2+}$ が検出された。ZitBには8つの重金属結合サイトが存在することが知られている。そのため、これらの結合サイトに結合した $Zn^{2+}$ が、能動輸送が起こらない暗所下においても検出された可能性がある。また、ZitBを介した受動的輸送により $Zn^{2+}$ が取り込まれた可能性も考えられる。したがって、光照射によって $Zn^{2+}$ 量の増加が起こるかどうか重要となる。定量の結果、光照射した試料では、暗所下の試料に比べて1.5倍に相当する約220 ng/mLの $Zn^{2+}$ が検出された(図4)。リポソームの直径を300 nm、一つのリポソームが $3.2 \times 10^6$ 分子の脂質から構成されていると仮定すると、リポソーム外部および内部の $Zn^{2+}$ 濃度はそれぞれ320 ng/mLおよび2060 ng/mLとなる。したがって、リポソーム内部には外部に比べて約6.4倍の $Zn^{2+}$ が濃縮されたと考えられる。以上の結果から、光をエネルギー源としてリポソーム内部に重金属を蓄積できることが示された。

#### 4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

本研究により、光をエネルギー源として間接的に重金属輸送蛋白質を駆動するというコンセプトが実現可能であることが明らかとなった。ただし、本リポソームの作製には多くの複雑な工程が必要であるため、ナノマシンとしての実用性を高めるためには、まず重金属蓄積量を増大させるという改良が重要である。本研究で得られた結果は、この改良を検討する上での重要な出発点となる。現在のリポソームでは、 $Zn^{2+}$ 蓄積に伴ってリポソーム内部の膜電位および浸透圧が上昇してしまう。これらは $Zn^{2+}$ 蓄積量を低下させる要因となる。膜電位上昇および浸透圧上昇は、 $K^+$ や $Na^+$ などのイオノフォアを用いて $Zn^{2+}$ の取り込みと連動させて $K^+$ や $Na^+$ を流出させることで低減できる可能性がある。重金属蓄積量を向上させ、さらに、自己集合する機能なども付加させれば、新たな重金属回収技術として、環境浄化技術や資源回収技術への応用につながる事が期待される。

#### 5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

蛋白質は、小分子であるアミノ酸が連なった鎖として細胞内で合成され、それが折れ畳まれて完成した蛋白質となる。したがって、個々の蛋白質は微小な空間内に性質の異なるアミノ酸を、それぞれの規則に従って配置しただけの物質である。このように蛋白質は化学的には単純な物質であるが、完成した蛋白質は、精巧に作り上げられた機械のように高度な機能を発現する。代表者は、こういった蛋白質の持つ性質に興味を持ち、その分子機構の解明を目指した研究を行ってきた。主な研究対象としてきたのは、本研究でも用いている微生物界に広く分布するロドプシン、とりわけ無機イオン輸送型ロドプシンである。微生物ロドプシンは光で瞬時に活性化できるため、その後現れる複数の過渡中間体を時間分解的に検出でき、要素反応を詳細に解析できる点に大きな魅力がある。

微生物ロドプシンは研究対象として魅力的なだけでなく、光に反応できるという応用研究にとって有利な性質も持っている。特に、イオン輸送型のロドプシンは、光のエネルギーを当該イオンの電気化学ポテンシャル勾配に変換することができる。そこで、ロドプシンの有用な応用方法の開拓

も、研究テーマの一つとして取り組んできている。本研究はこのテーマに関連した研究課題であり、ロドプシンを介して、他の膜輸送蛋白質を光をエネルギー源として駆動できることを示せた成果は、今後の応用開拓研究において重要な意義がある。

#### 6 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名： 北海道大学 大学院先端生命科学研究院  
(ホッカイドウダイガク ダイガクインセンタンセイメイカガクケンキュウイン)

住 所: 〒060-0810  
札幌市北区北10条西8丁目

担 当 者: 准教授 菊川 峰志(キクカワ タカシ)

担 当 部 署: 光生物学研究室(ヒカリセイブツガクケンキュウシツ)

E - m a i l: kikukawa@sci.hokudai.ac.jp

U R L: <https://altair.sci.hokudai.ac.jp/infana/>