

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19880028  
 研究課題名（和文） 微生物を用いた工業排水からの有用物質の回収とそのリサイクル法の開発に関する研究  
 研究課題名（英文） Probing chromium-binding proteins with *Paramecium bursaria*.  
 研究代表者  
 高橋 利幸（TAKAHASHI TOSHIYUKI）  
 慶應義塾大学・商学部・助教  
 研究者番号：50453535

研究成果の概要：クロムは耐摩耗性、強酸化性など優れた特徴を有し、代替のできない必要不可欠な機能性材料として多くの産業に利用されている。本研究では、生物由来（体内にクロムを集積する性質をもつ原生生物ミドリゾウリムシ）のクロム吸着性物質を同定および精製する事を目的とした。本研究の成果として、クロム未処理と処理ミドリゾウリムシから各々抽出したタンパク質を電気泳動法により比較した結果、両者の泳動パターンに相違が見られた。今後、発現量に差のあるタンパク質のアミノ酸配列・遺伝子配列の解析を行う必要がある。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,360,000	0	1,360,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,360,000	300,000	2,660,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：微生物、環境汚染、環境浄化、バイオアッセイ

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) クロムの有用性と有害性

クロムは耐摩耗性、強酸化性など優れた特徴を有し、必要不可欠な機能性材料として多くの産業に利用されている。自然界でクロムは複数の電価状態で存在するが、その中でも6価クロムはガンや肝機能障害を誘発するという毒性をもつ。産業利用されたクロムは、排水処理の過程で、クロムを含む大量の廃棄物（スラッジ）を生じる。さらに、クロムメッキに使用された6価クロムが、酸性雨により環境中に漏出する事も報告されており、環境保全の面から大きな問題となっている。

一方、現在、本国のクロムの需要を本国だけで完全供給できておらず、そのほとんどを輸入

に頼っている。また、近年、新興国の経済成長に伴い、今後、クロムの需要増加が予想されるため、クロムは、タングステン・コバルト・バナジウムなどと同様にレアメタルとして国家備蓄の対象となっている。

## (2) 研究開始当初までの研究成果と本実施研究の着想に至った経緯

我々は、河川や湖などの環境水の汚染や各種毒性物質の生物への影響を評価する有効な方法である『指標生物を用いた生物検定法』の開発を行ってきた（Miyoshi *et al.*, *Journal of Health Science*, 2003; Tanaka *et al.*, *In: Environmental Chemistry*, 2005; Kawano *et al.*, *In: Environmental Chemistry*, 2005;

Takahashi (本研究代表者) *et al.*, *Toxicology in Vitro*, 2005; Takahashi (本研究代表者) *et al.*, *ITE Letters on Batteries, New Technologies & Medicine*, 2005; 高橋 (本研究代表者) 他, *原生動物学雑誌*, 2006)。この研究過程で、原生動物ミドリゾウリムシを用いて6価クロムに対する影響を調べた結果、ミドリゾウリムシが体内にクロムを集積するという興味深い現象を発見した。この事は、ミドリゾウリムシが単に環境中のクロムを検出する目的だけでなく、ミドリゾウリムシに吸着させる事で環境中のクロムを除去し、環境浄化にも貢献できる事を示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究では、クロムを体内に集積する事ができる原生生物ミドリゾウリムシからクロム吸着性のタンパク質フィルターを作製し、6価クロムを回収し、さらにリサイクル可能なシステムの構築を目標とした。特に、今回の実施研究期間では、最も重要となるミドリゾウリムシ由来のクロム吸着性タンパク質の同定および精製を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 6価クロムのバイオアッセイ:

ミドリゾウリムシへのクロム吸着量が最も多く、かつ、ミドリゾウリムシの生存個体数が多い条件を検討した。

### (2) 細胞内クロムの局在の解析:

金属イオン依存的に蛍光を消失する金属プローブを用いて、ミドリゾウリムシ内のクロム吸着部位の可視化を蛍光顕微鏡解析により試みた。

### (3) クロム吸着性タンパク質の探索:

クロム未処理と処理サンプルから各々タンパク質を抽出し、電気泳動法により、その泳動パターンを比較した。

## 4. 研究成果

### (1) 6価クロムのバイオアッセイ:

ミドリゾウリムシに7日間6価クロム( $K_2Cr_2O_7$ )処理を行い(処理開始時のミドリゾウリムシ個体数密度: 1000 cells/ml)、その形態的な変化や細胞増殖への影響を解析した。その結果、6価クロムが図1の赤色の濃度幅の時、ミドリゾウリムシの増殖も致死も起こらなかった。また、細胞増殖への影響が見られなかった濃度でも、クロム未処理のコントロールよりも有意に体長の減少した個体が現れるなど、形態的な影響も観察された。一方、上記濃度で、クロムの集積が起

こる事を既に明らかにしている(図2)。以上の事から、上記濃度幅でクロムを処理する事により、ミドリゾウリムシの個体数を減らすことなく、効率的に目的タンパク質を得られる可能性がある。

### (2) 細胞内クロムの局在の解析:

金属イオン依存的に蛍光を消失する金属プローブを用いて、ミドリゾウリムシ内のクロム吸着部位の可視化を蛍光顕微鏡解析により試みた。今回、金属プローブとしてカルセインブルー(図3)を用い、クロム処理は、図1の結果からミドリゾウリムシの死滅を避け、かつ、十分なミドリゾウリムシ個体数の解析を可能とする40  $\mu M$ の $K_2Cr_2O_7$ で7日間行った。その結果、クロム処理特異的な蛍光

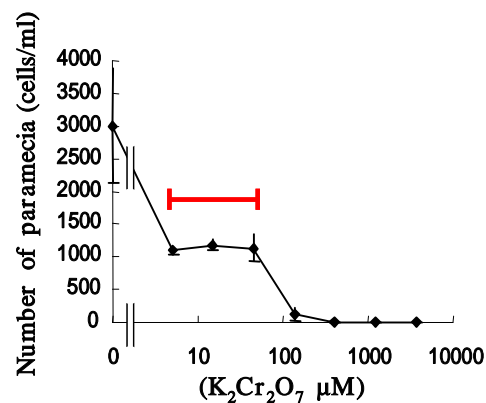


図1: ミドリゾウリムシに対する6価クロムの感受性

ミドリゾウリムシに6価クロム( $K_2Cr_2O_7$ )を明暗条件下で処理し、7日後の生存個体数を実体顕微鏡下で計測した。クロム未処理のコントロールでは、7日後までにミドリゾウリムシ数が約3倍に増加しているが、低濃度の6価クロム存在下では、ミドリゾウリムシの増殖が抑制された。一方で、100  $\mu M$ 以上の6価クロム存在下では、ミドリゾウリムシが死滅した。

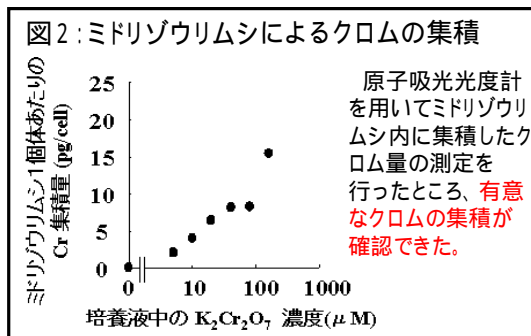
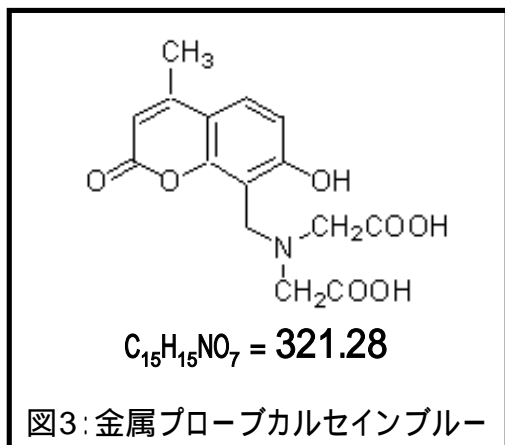


図2: ミドリゾウリムシによるクロムの集積

局在は観察されなかった。この理由として、金属プローブとして用いたカルセインブルーは、必ずしもクロム特異的ではないため、有意な結果を得ることが出来なかった可能性がある。



### (3) クロム吸着性タンパク質の探索:

クロム未処理と処理サンプルから各々タンパク質を抽出し、電気泳動法により、その泳動パターンを比較した。クロム未処理と処理サンプルを電気泳動法により比較した結果、両者の泳動パターンに相違が見られた。しかし、今回は、特異的なバンドの検出を重視したため、既知のタンパク質染色法の中で最もタンパク質の検出感度が高い銀染色法で染色を行った。したがって、両者の電気泳動像を定量的に解析するには十分なデータとはいえない。今後、検出感度のみならず、タンパク質の定量比較も可能な染色法を用いて再度解析する必要がある。その上で、発現量に差のあるタンパク質のアミノ酸配列・遺伝子配列の同定を行う必要がある。

以上研究成果(1)~(3)より、本実施研究期間において、クロム特異的なタンパク質解析のための培養条件を確立した。目的としていたクロム吸着性タンパク質の同定と精製までには至らなかったものの、クロム処理により、コントロールとは異なるタンパク質発現が起きている事が示唆され、今後のクロム吸着性タンパク質の同定・精製への展望が十分に期待できる結果を得られたと考えている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

高橋利幸、白井洋司、小阪敏和、細谷浩史、ミドリゾウリムシの原形質流動が共生藻の細胞増殖を制御する、原生動物学雑誌、第42巻、第1号、p. 39-40、2009年

高橋利幸、小阪敏和、細谷浩史、アクリルアミドの毒性検出 原生物ミドリゾウリムシを用いた方法(総説)、Foods & Food Ingredients J. Jpn.(食品・食品添加物研究誌 FFI ジャーナル)、第2巻、p. 929-935、2008年(査読有り)

[学会発表](計 6件)

高橋利幸、白井洋司、小阪敏和、細谷浩史、ミドリゾウリムシの原形質流動が共生藻の細胞増殖を制御する、日本原生動物学会 第41回大会、筑波、2008年11月2日(ポスター発表)

高橋利幸、白井洋司、下村亜裕美、小阪敏和、細谷浩史、原形質流動の停止はミドリゾウリムシ体内の共生藻の増殖を誘導する、日本細胞生物学会 第60回大会、横浜、2008年6月30日(ポスター発表)

T. Takahashi, Y. Shirai, T. Kosaka, H. Hosoya. Function of cytoplasmic streaming as a controller of endosymbiosis. International Symposium on Protist Biology: Cellular Function, Evolution, and Environmental Impact, Japan, 2008年3月25日(ポスター発表)

中島陽子、鈴木忠、高橋利幸、有川智己、慶應義塾大学からの『知』の発信 - サイエンス・カフェ 極東証券寄附講座「生命の教養学」一般公開ゼミ -、サイエンスアゴラ2007、東京、2007年11月23-25日(ポスター発表)

T. Takahashi, T. Kosaka, H. Hosoya. A New Bioassay For Acrylamide Toxicity Using Protozoa, Paramecium bursaria. 日本微生物生態学会 第23回大会(International Symposium on Microbial Ecology Asia 2007と共同開催), Japan, 2007年9月16日(ポスター発表)

T. Takahashi, T. Kosaka, H. Hosoya. A NEW BIOASSAY FOR ACRYLAMIDE TOXICITY USING A GREEN PARAMECIUM. 13th International Symposium on Toxicity Assessment,

Japan, 2007年8月20日(口頭発表)

〔その他〕

(1)招待講演など(計 2件)

高橋利幸 「微生物研究からみえてきたもの～環境問題やヒト織毛病から若返りの秘術まで～」、慶應義塾大学通信教育部 講演会(長野県 松本)(2009年1月25日)

高橋利幸 「『若返り』の秘密と可能性をさぐる」、慶應義塾大学教養教育センター 極東証券寄附講座「生命の教養学」一般公開ゼミサイエンス・カフェ(神奈川県 横浜)(2008年5月17日)

(2)報道(計 1件)

細谷浩史、高橋利幸、科学新聞「原生動物の原形質流動の役割 細胞内部共生藻の増殖を制御」(2008年3月14日 第3186号)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 利幸 (TAKAHASHI TOSHIYUKI)

慶應義塾大学・商学部・助教

研究者番号：50453535

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし