

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780180

研究課題名(和文)無機材料結合性ペプチドを用いたCCA処理木材判別法の開発に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Basic Research on Creation of Inorganic Material-Binding Peptide for Development of CCA-Treated Wood Discriminating Method

研究代表者

吉田 誠(Makoto, Yoshida)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30447510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：廃棄物として問題視されている建築廃材中のクロム銅ヒ素系(CCA)木材保存剤処理木材を判別する手法を開発する為の基盤技術として、CCA結合性のペプチドを作成することを試みた。ペプチドの選抜にはペプチド提示ファージシステムを用いた。その結果、CCA処理したスギ木紛に高い結合性を有するペプチドを提示したファージが選抜された。このペプチドにFITCを付加したものを合成し、それを用いてCCA処理材への吸着試験を行ったところ、本ペプチドは未処理材への結合量と比べてCCA処理材への結合量が明らかに高く、実際に現場で使用される注入量である1%程度の注入量のCCA処理材でもよく吸着することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, I tried to create the peptide which can bind to CCA-treated wood by using phage display library system as a first step for development of CCA-treated wood discriminating method. In the screening of the candidate peptide, the phage which has an ability to bind to CCA-treated wood was obtained. Based on the deduced amino acid sequence, the peptide attached FITC at C-terminal was synthesized chemically, and used for binding assay using CCA-treated and non-treated wood as target substances. As a result, the amount of the peptide bound to CCA-treated wood was significantly larger than that to non-treated wood. Moreover, the peptide was able to bind efficiently to CCA-treated wood, even when 1% CCA-treated wood, which is the concentration of use for building timber, was used. The results clearly suggest that the peptide could be used for the detection of CCA component in wood.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：CCA処理材 無機材料結合性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

平成 14 年に施行された建設リサイクル法により、建築資材として利用された木材の再資源化が義務付けられた。これにより、大きく問題視されているのが、ヒ素などの有害化学物質を含むクロム銅ヒ素系 (CCA) 保存剤処理された木材が大量に廃棄されることである。したがって、これを分別し適切に処理することが求められている。この分別・回収を効率的に行うには、解体現場において CCA 処理木材と未処理材 (もしくはその他の保存剤で処理された木材) を正確に判別する必要がある。多くの場合、CCA 処理木材の判別は目視 (CCA は暗緑色～褐色を呈するので、目視でもある程度判別できる) に頼らざるを得ない現状であるが、汚れや濡れ、変色などにより判別が困難な場合も多く、解体現場における CCA 処理木材の確実な判別方法の開発が期待されている。

これまでに試みられてきている CCA 処理木材の判別法としては、近赤外線、蛍光 X 線、レーザー励起ブレイクダウンなどを利用した分光学的な手法や化学的呈色反応を利用した手法が挙げられる。前者の多くは大型機器によるものであるため、解体現場というよりもチップ製造工場などでの使用を想定したものである。近年、現場でも使用可能となるよう小型化された機器も開発されているが、導入コスト等の点で問題がある。一方、後者は現場での判別に適した手法であることが示唆されているものの、薬品の安定性が低いことや、多くの場合、呈色反応の対象となる物質は銅化合物であることから、CCA のみならず、現在主流の木材防腐剤である銅系薬剤処理された木材をも検出してしまうといった問題点が存在する。したがって、解体現場で使用可能なより特異性の高い判別方法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

上述した通り、木材保存学分野において、CCA 処理木材の判別法の開発は極めて重要な課題であり、近年大きな注目を浴びている。上記のように、これまでに分光学的な手法や化学的手法などの種々のアプローチによる判別法に関する研究がなされてきているが、いずれの手法も、現時点ではさらなる改良を必要とする段階である。

ところで、ナノデバイス開発を目指したバイオテクノロジー分野においては、無機材料結合性ペプチド分子を人工的に創出する技術が注目されている。これらのペプチドのほとんどは数個から数十個のアミノ酸からなり、それぞれのペプチドが特定の無機材料の表面に特異的に結合する。これまでに、ガリウムヒ素やイリジウム燐などの半導体材料をはじめ金、銀、プラチナ、シリカ、酸化亜鉛、酸化マンガン、炭酸カルシウム、酸化クロムなど様々な無機材料表面に特異的に結合するペプチドが報告されている。そこで、

この技術を応用することで、廃材中に存在する CCA に由来する無機化合物粒子を特異的に認識するペプチドを創出することが可能ではないかと考えた。すなわち、CCA 薬剤に由来する金属元素に特異的に結合するペプチドが創出されれば、その無機化合物結合性ペプチドを抗原とした抗原抗体反応を利用することで、将来的には木材中の CCA を検出する技術、つまり、CCA 処理された木材を生化学的に判別する技術を開発することが可能ではないかと考えた。

このような背景のもと、本研究ではペプチド提示ファージシステムを用いて CCA 処理された木材を特異的に検出可能なペプチドを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

廃材中に存在する CCA に由来する無機化合物粒子を特異的に認識するペプチドを創出するために、本研究ではペプチド提示ファージシステムを用いた。このシステムは様々なアミノ酸配列を有するペプチドを表面に提示させたファージのライブラリーを用いるものであり、このファージ集団を標的分子 (無機材料) と共にインキュベートし、浮遊しているファージを除去することで粒子に結合するペプチドを提示したファージのみを得ることができる (図 1)。このファージを大腸菌に感染させることで目的のファージを増殖させる。この時点ではバックグラウンドも大きく、目的のもの以外のファージも多数存在する。よって、この一連の操作を数度繰り返し、結合能力が強いペプチドを提示したファージが全体のファージ集団に占める割合を高める。この割合は、インキュベートするファージの数 (A 個) と回収されるファージの数 (B 個) の比で示されることから、B/A の割合をモニターすることで、ペプチドの特異性を評価することが可能である。上記の操作によって、最終的に標的分子表面に結合する機能ペプチドが大多数を占めるライブラリーを作成し、その後、ライブラリー中の複数のクローンの塩基配列をランダムに解析することで、結合能を持つペプチドのアミノ酸配列を明らかにすることができる。

CCA は複雑なメカニズムを経て、多様な化学的形態で不溶化し、木材に定着すると考えられており、主要な不溶性無機化合物として

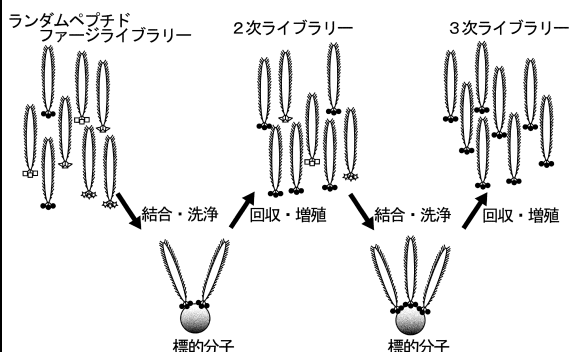


図 1 ペプチド提示ファージシステム

水酸化クロムの存在が示唆されていることから、本研究ではこれを標的物質とした。また、CCA 処理した木材も同様に標的物質として用いた。水酸化クロムに関しては、これを 150 mM NaCl と 0.5% Tween を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) で洗浄した後、ファージライブラリーと混合し、150 mM NaCl と 0.5% Tween を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) 中で水酸化クロムへ吸着させた。遠心分離で標的物質を沈殿させ、上清を除去した後、150 mM NaCl と 0.5% Tween を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) で 10 回洗浄した。0.2 M Glycin-HCl 緩衝液 (pH2.0) で結合したファージを遊離させ、得られたファージを大腸菌に感染させた。この大腸菌を増殖させ、ファージを回収し、それを再度、水酸化クロムに結合させ、同様のサイクルを 4 回繰り返した。CCA 処理した木材をターゲットとした操作では、CCA 注入量 7.2% の木材 (スギ) をサンプルミルで粉碎し、この木紛を用いた。木材表面に非特異的に結合するペプチドを排除するため、ファージライブラリーを未処理木材 (スギ) に吸着させ、未吸着のファージを回収し、それを用いてスクリーニングを行った。具体的には、200 mM NaCl と 0.5% Tween を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) 中で洗浄した CCA 処理木紛に、未処理木材未吸着ファージライブラリーを吸着させた。これを 200 mM NaCl と 0.5% Tween を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) で洗浄し、その後、2 M NaCl と 0.5% Tween を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) でファージの溶出を行った。得られたファージを大腸菌に感染させた後、この大腸菌を増殖させ、ファージを回収し、それを再度、CCA 処理木紛に結合させ、同様のサイクルを 4 回繰り返した。水酸化クロムおよび CCA 処理木紛、いずれの標的物質を用いたスクリーニングにおいても、4 回の繰り返し操作後に、ファージの塩基配列を解析し、それらのファージ表面に提示されたペプチド配列情報を得た。その際、水酸化クロムを標的とした実験では 25 クローン、CCA 処理材を標的とした実験においては 46~48 クローンの塩基配列を解析した。

得られたペプチド配列情報に基づき、ペプチドを合成した。その際、結合挙動を評価することを目的とし、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) を蛍光標識物質として付加した。このペプチドを用いて、水酸化クロムおよび CCA 処理材への吸着試験を試みた。吸着試験は、各種条件下でそれぞれの標的物質にペプチドを結合させた後、遠心分離により得られた上清の蛍光強度を分光蛍光度計にて測定し、これを未吸着ペプチドの量とした。

4. 研究成果

(1) 水酸化クロムに特異的に結合するペプチドの探索

「研究の方法」欄に記述した方法に準じて水酸化クロムに特異的に結合するペプチドの探索を試みた。ペプチド提示ファージライブラリーを用いたペプチドの選抜実験および塩基配列解析により得られた情報をもとにして、表 1 に示すペプチドが水酸化結合性ペプチドの候補として選抜された。

合成されたペプチドのうち、Cr(OH)₃-2 と Cr(OH)₃-3 はいずれも水に十分な溶解性を示さなかった。また、溶解した Cr(OH)₃-1 ペプチドを用いて水酸化クロムへの吸着実験を試みたものの、十分な吸着は観察されなかったことから、本実験では目的とするペプチドを得ることができなかつたと結論付けた。本実験で選抜されたペプチドのほとんどは塩基配列解析において 1 クローンのみが検出されたものがほとんどであり、表 1 に示すものも、25 クローン中に 2~3 クローンが見いだされたのみであった。複数回のスクリーニングを試みたが、その傾向は同じであった。したがって、水酸化クロムに強く吸着するペプチドを探索する為には、さらに選抜操作の回数を増やすなどの工夫が必要であると考えられたが、今回の操作以上に選抜回数を増加させた場合、クローンが全く得られなくなる恐れがあり、実施することができなかった。一般に、本システムを用いて無機材料に吸着するペプチドを選抜する場合には、4 回程度の選抜操作で十分なクローンの濃縮結果が得られる場合が多いが、本研究で濃縮が不十分であったことは、水酸化クロムの表面に多様性がある可能性を示唆している。

いずれにしても、水酸化クロムを対象とした選抜では有効なペプチドが得られないと判断し、実際の CCA 処理材を標的物質としたスクリーニングを実施することとした。

表 1 選抜された水酸化クロムに結合すると予想されたペプチド

ペプチド名称	ペプチド配列 (下線部が塩基配列に基づく配列である)	クローン数
Cr(OH) ₃ -1	FITC-Acp-GGG <u>SALSPQLPNKGNP</u> -NH ₂	2/25
Cr(OH) ₃ -2	FITC-Acp-GGG <u>SSEFPRSWDMETN</u> -NH ₂	2/25
Cr(OH) ₃ -3	FITC-Acp-GGG <u>SGAMHLPWHMGTL</u> -NH ₂	3/25

(2) CCA 処理した木材に特異的に結合するペプチドの探索

「研究の方法」欄に記述した方法に準じて CCA 処理した木材に特異的に結合するペプチドの探索を試みた。ここでは水酸化クロムの場合とは異なり、木材細胞壁への非特異的な吸着の影響が大きいと考えられた為、CCA 処理木材に吸着させる前段階として、未処理木材への吸着ステップを導入し、そこで結合しなかったペプチドのライブラリーを用いて選抜実験を行った。このペプチド提示ファージライブラリーを用いたペプチドの選抜実

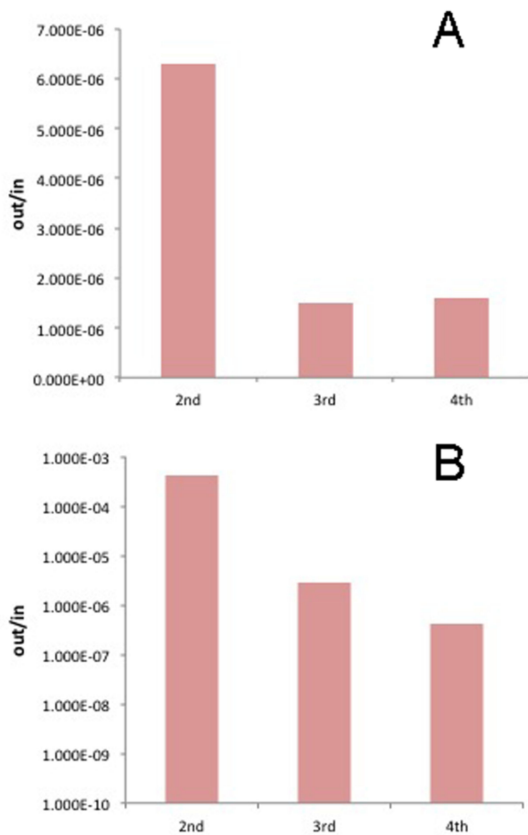


図2 CCA処理した木材(スギ)に吸着するペプチドを提示したファージの選抜
A: 溶出処理により回収されたファージ
B: 溶出できなかったファージ

験におけるファージの濃縮具合を図2に示した。本選抜実験では2 M NaClと0.5% Tweenを含む50 mM 酢酸緩衝液(pH5.0)を用いた溶出ステップにより溶出されたものだけでなく、溶出されずに標的物質に結合し続けたペプチドも選抜の対象とした。その結果、いずれの場合も4回の繰り返し処理によりファージが濃縮されたことが明らかとなった。

4回目のラウンドのファージを対象にして、48クロンの塩基配列解析を行った。その結果得られた配列情報をもとにして、表2に示すペプチドがCCA処理した木材結合性ペプチドの候補として選抜された。本選抜実験では、溶出処理により得られたファージを46クロン、溶出処理によって遊離しなかったファージを48クロン、塩基配列解析に供した。その結果、前者では46クロン中の38クロンがEL-1と名付けた配列であり、後者では48クロン中の35クロンがUE-1と名付けた配列であった。このことは、水酸化クロムの選抜試験とは異なり、ある特定配列を有するファージが濃縮されたことを示している。また、ここで得られた配列は、未

表2 選抜されたCCA処理木材(スギ)に結合すると予想されたペプチド

ペプチド名称	ペプチド配列 (下線部が塩基配列に基づく配列である)	クローン数
EL-1	FITC-Acp-GGGSS <u>NSYKNFLNI</u> HP-NH ₂	38/46
EL-2	FITC-Acp-GGGSH <u>PHEYSSWGLA</u> -NH ₂	5/46
EL-3	FITC-Acp-GGGSH <u>NSHKNFINI</u> HP-NH ₂	2/46
EL-4	FITC-Acp-GGGSK <u>VTFYTNLNSMD</u> -NH ₂	1/46
UE-1	FITC-Acp-GGGSH <u>SPLMHVSSTDN</u> -NH ₂	35/48
UE-2	FITC-Acp-GGGSL <u>QPPSPDAWEGL</u> -NH ₂	7/48
UE-3	FITC-Acp-GGGSS <u>APIFYDPMTP</u> -NH ₂	6/48

EL: 溶出処理により遊離したもの

UE: 溶出処理により遊離しなかったもの

処理木材における同様の選抜試験では見いだされない配列であったことから、今回見いだされたペプチド配列のCCA処理材への高い特異性を裏付けるものと判断した。よって、以後の実験には、EL-1、EL-2、UE-1およびUE-2を用いることとした。

得られた配列情報に基づき、EL-1、EL-2、UE-1およびUE-2の配列を有するペプチドを合成した。その際、結合挙動を評価することを目的とし、FITCを蛍光標識物質として付加した。しかしながら、EL-2およびUE-2に関しては、合成したペプチドの水溶性が極めて低かったことから、EL-1とUE-1を用いて結合実験を行うこととした。

図3に結合実験の結果を示す。ここでは、CCA処理材への吸着の可否を確認するため、合成したペプチド150 μMと2 mgのCCA処理木粉を混合し、遠心分離により標的物質を除去した後、上清中のスペクトル分析を行った。CCA木粉はCCA注入量7.2%のものを用いた。その際、木材細胞壁への非特異的吸着も評価するため、未処理の木粉に対しても同様の吸着試験を行った。その結果、図3Aに示すようにEL-1において、コントロールである吸着試験を行わなかったペプチドでは明確なFITC由来の吸収が確認されたが、CCA処理木粉に吸着させた後の上清のスペクトルにはFITCに由来する吸収が観察されなかった。このことから、本ペプチドはCCA処理材に吸着したことが明らかとなった。しかしながら、未処理の木粉に対しても同様の試験を行った結果、わずかにFITC由来の吸収は確認されたものの、コントロールと比較して、その吸収は極めて弱いものであった。このことから、EL-1ペプチドは、CCA処理材中の金属元素に特異的に吸着しているのではなく、多くは木材細胞壁に非特異的に吸着していることが示唆された。一方、図3Bに示すように、UE-1ペプチドに関しては、コントロールである吸着試験を行わなかったペプチドでは明確なFITC由来の吸収が確認されたが、CCA処理木粉に吸着させた後の上清のスペクトルにはFITCに由来する吸収が観察されず、さらに、未処理の木粉に対する同様の試験にお

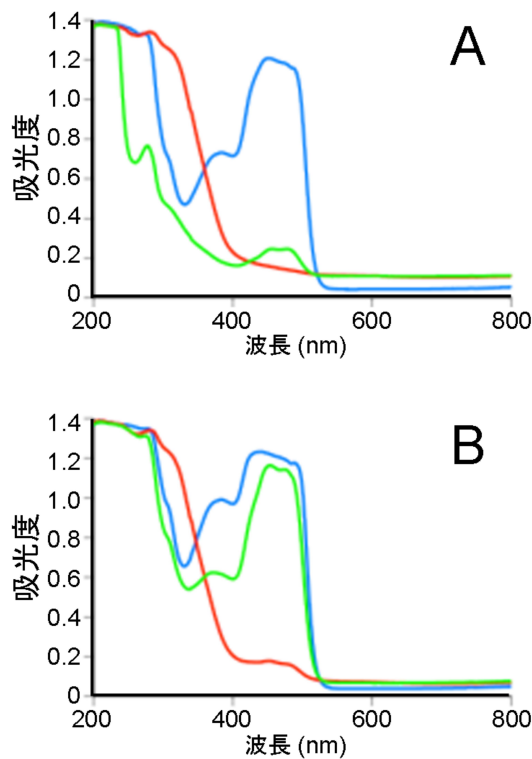


図3 ペプチドのCCA処理材(スギ)および未処理材(スギ)に対する吸着試験
 A: EL-1ペプチド
 B: UE-1ペプチド
 青線: 吸着試験を実施しなかったサンプル
 赤線: CCA材を用いた吸着試験のサンプル
 緑線: 未処理材を用いた吸着試験のサンプル

いては、FITC由来の明確な吸収が確認された。このことは、UE-1ペプチドがCCA処理材に特異的に吸着している可能性を示唆するものである。

上記の吸着試験により、CCA処理材を特異的に検出可能なペプチドとしての可能性を有するものはUE-1のみであることが示唆された。そこでここでは、UE-1の吸着性能をより詳細に検討するために、吸着操作の上清を対象として、蛍光マイクロプレートリーダーを用いた解析により遊離ペプチドの定量を試みた。これまでの解析ではCCA処理材としてCCA注入量が7.2%のサンプルを用いてきたが、ここでは注入量が吸着量に与える影響を調査するため、注入量7.2%のものに加えて、0.9%のもの、3.7%のものも用いた。また、ここで使用したペプチド濃度は $30\mu\text{M}$ とした。その結果を図4に示した。UE-1はいずれの注入量のサンプルにおいても上清にペプチドは検出されなかった。このことは本条件下では、いずれのサンプルにおいても全てのペプチドが吸着していることを示唆している。実際の現場で用いられてきたCCA処理材は、一般に1%程度の注入量であることを考慮すると、本ペプチドを用いることで実際に使用されているCCA処理材を判別することができる

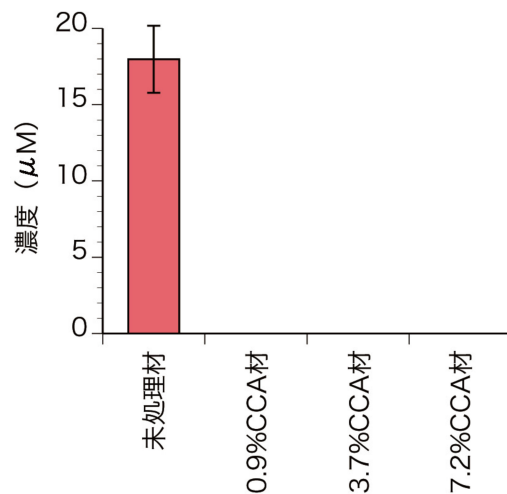


図4 注入量の異なるCCA処理材(スギ)および未処理材(スギ)を用いた吸着試験

可能性が考えられた。

これまでの解析で、UE-1はCCA処理材の判別に使用可能なポテンシャルを有していることが示唆された。しかしながら、図4に示したとおり、本ペプチドを用いて未処理材への吸着性能を定量化したところ、 $30\mu\text{M}$ のペプチドを用いた場合、2mgの木紛に対して40%程度のペプチドが吸着することが明らかとなった。このことから、非特異的な木材細胞壁への吸着を阻害するため、各種ブロッキング剤や界面活性剤の効果を検討した。具体的には、これまでの解析と同様の吸着試験において、各種ブロッキング剤や界面活性剤(Tween20, BSA, TritonX-100, スキムミルク, カゼイン, その他各種市販のブロッキングキット)を添加し、試験を行った。しかしながら、いずれの添加物も非特異的結合を明確に抑制するには至らなかった。

今後、ペプチドとCCA処理材との吸着メカニズムを明らかにし、その吸着メカニズムに基づくタンパク質工学的な改質を行い、より特異の高いペプチドを創出することで、CCA検出試薬の開発に繋がることを期待される。

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1件)

Yuji Nakada, Satoshi Nakaba, Hiroshi Matsunaga, Ryo Funada, and Makoto Yoshida: Visualization of the mycelia of wood rotting fungi by fluorescence in situ hybridization using a peptide nucleic acid probe. Biosci. Biotechnol. Biochem. 77:405-408 (2013)

[学会発表](計2件)

吉田 誠: 腐朽メカニズムの解明を目指す

した微生物学的基礎研究とその応用，日本木材保存協会第30回年次大会(招待講演)，2014年5月28日，メルパルク東京

太田原統，中澤 光，梅津光央，吉田誠：クロム・銅・ヒ素（CCA）系保存剤で処理された木材に結合するペプチドの探索，日本農芸化学会 2014 年度大会，2014年3月30日，明治大学生田キャンパス

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

吉田 誠，中田裕治，太田原統：木材保存の新技术，東京農工大学科学技術展 2012，2012年11月9日～11日，東京農工大学府中キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 誠 (MAKOTO YOSHIDA)
東京農工大学・農学研究院・准教授
研究者番号：30447510

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：