

機関番号：57601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780298

研究課題名 (和文) 微生物由来のレアメタル結合物質の探索と同定

研究課題名 (英文) Probing chromium binding proteins from *Paramecium bursaria*.

研究代表者

高橋 利幸 (TAKAHASHI TOSHIYUKI)

都城工業高等専門学校・物質工学科・講師

研究者番号：50453535

研究成果の概要 (和文) : クロムは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、微生物由来のクロム吸着性物質を同定・精製する事を目的とした。クロム特異的因子を同定する一環として、クロム特異的な遺伝子発現の変化を解析した。その結果、クロム処理によりシステイン残基を多く含むタンパク質の発現が抑制された。この事は、金属イオン反応性に富むシステインが、クロム結合物質に利用され、相対的に他のシステイン含有タンパク質の発現や合成が抑制される可能性を示している。

研究成果の概要 (英文) : Chromium (Cr) is widely used as a functional material and one of rare metals in multiindustries. This study aimed to identify Cr binding factors from *Paramecium bursaria* that can accumulate Cr in the cytosol. To identify the Cr related factors, we analyzed genes induced by Cr treatment with RT-PCR and Differential Display. By the Cr treatment, expressions of cystein-rich proteins including cystein proteinases were depressed. The result suggests that cysteins being responsive to metals are consumed by a Cr binding protein after the Cr treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：生物・生体工学, 環境技術, バイオリアクター, 生体分子

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、機能性材料として多くの産業に利用されている。近年、新興国の経済成長に伴い、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知見と本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 (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 ほか)。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、原生動物ミドリゾウリムシから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) クロム吸着性物質発現条件の検討

ミドリゾウリムシを6価クロム処理し、処理期間(48時間または1週間)によるタンパク質発現量および発現パターンの変化をSDS-PAGE法で解析した。なお、この際のタンパク質定量は、紫外吸光法(UV法)または蛍光法(インビトロジェン社のQubit法)により行った。

(2) 固定化金属イオンアフィニティー樹脂を用いたクロム吸着性物質の精製

Niイオンなど各種金属イオンを固定化した固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー(IMAC)用の樹脂が市販されているが、クロムイオンを固定化した樹脂は市販されていない。そこで、まず初めに、金属イオン未固定のIMAC用樹脂を用いて、クロムイオンを固定化した樹脂を作製した。作製したクロムイオン固定化樹脂を用いて、クロム処理した当該微生物由来のタンパク質阻抽出液を上記樹脂と混合させた。樹脂に未吸着分画(S)を回収し、緩衝液で洗浄後、溶出液(EGTA)で処理し、溶出分画(E)を回収した。回収した各タンパク質画分をSDS-PAGE法で展開し、タンパク質の泳動パターンを解析した。

(3) クロム処理特異的遺伝子の検出と同定
クロム処理した当該微生物から全RNAを抽出した。RNA抽出後、oligo dTプライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。得られたcDNAを鋳型として、数種類の任意プライマーとoligo dTプライマー(上記とは別の配列)を用いて、RT-PCR反応を行った。PCR反応後、アガロースゲル電気泳動法で、増幅産物の解析を行った。クロム処理試料と未処理試料とで発現量に差のあった増幅産物をゲルから切り出し、DNAシーケンス解析を行った。遺伝子データベース(DDBJ)を用いて、得られたシーケンス解析結果と既存の遺伝子・タンパク質との相同性解析を行った。

4. 研究成果

(1) クロム処理試料の特徴とクロム特異的タンパク質の発現

クロム処理したタンパク質をUV法と蛍光法の2種類の方法でタンパク質定量した。その結果、蛍光法では、クロム処理試料でタンパク質濃度が高めに評価され、正確なタンパク質定量ができなかった(図1)。これは、クロム吸着性タンパク質に結合したクロムイオンが測定に干渉している可能性がある。一方、対照として行ったUV法では、クロム処理試料でも比較的正確にタンパク質濃度の測定が可能であった。そこで、本研究では、タンパク質定量はUV法で行った。

48時間または1週間クロム処理した試料の両者からタンパク質粗抽出液を得た。それらをSDS-PAGE法で解析した結果、両試料からクロム特異的なタンパク質(分子量29kDa付近)が検出された。したがって、少なくとも48時間のクロム処理により十分にクロム特異的なタンパク質を発現させる事ができると考えられる。

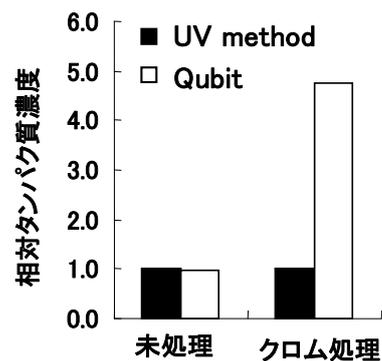


図1: 定量法の違いによるクロム処理したタンパク質溶液の特性

(2) 固定化金属イオンアフィニティー樹脂を用いたクロム吸着性タンパク質の探索・同定

市販の金属イオン未固定のIMAC用樹脂を用いて、クロムイオン固定化樹脂を作製した。また、タンパク質試料との反応方法(バッチ法とカラム法)も合わせて検討した。予備実験の結果、今回使用した樹脂とクロムイオンとの結合は、加圧により固定したクロムイオンが容易に解離する事が分かり、タンパク質試料との反応方法は加圧を必要としないバッチ法で行う事とした。クロムイオン固定化樹脂を用いて、樹脂に未吸着の分画(S)と吸着分画(E)の両タンパク質分画をSDS-PAGE法で展開した。その結果、吸着分画中では、

クロム特異的なタンパク質 (29 kDa 付近) が強く検出された。したがって、クロム特異的なタンパク質が、クロム吸着性タンパク質である事が示唆された。

(4) クロム特異的遺伝子の検出と解析

クロム処理試料から抽出した RNA を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、数種類の任意プライマーと oligo dT プライマーを使用して RT-PCR を行った。その結果、クロム処理により発現量が増加または減少する複数の遺伝子を確認できた(図 2)。DNA シーケンス解析とデータベースを用いたアミノ酸配列の相同性検索の結果、クロム処理により、システインプロテアーゼを含むシステイン残基に富むタンパク質の発現が抑制されている事が示唆された。この事は、金属イオン反応性の高いシステイン残基が、クロム結合性物質に利用され、相対的に他のシステイン含有タンパク質の発現や合成が抑制されている可能性を示している。一方で、本研究期間で解析済みのいくつかの遺伝子には、既存のデータベース上で相同性を示すものが存在しない新規遺伝子も見つかった。これらの解析は、今後の課題として取り組む必要がある。以上の成果は、今後、更なる詳細なクロム結合性物質の実体を明らかにする上で有意義な情報となりえる。

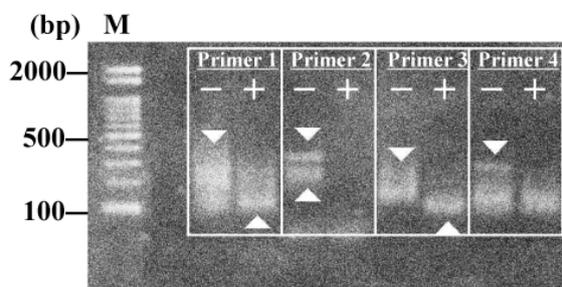


図2:クロム処理特異的遺伝子発現の解析

M: 分子量マーカー,
-: 未処理(コントロール), +: クロム処理

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

①B. I. Gerashchenko, T. Takahashi, T. Kosaka, H. Hosoya. Life cycle analysis of unicellular algae. *Current Protocol in Cytometry*, 52: 11.19.1-11.19.6, 2010. (Invited paper)

②横山誠二, 鈴木玲人, ニク ヒシャムディン ビンムハンマド ノル, 兼松秀行, 小川亜希子, 高橋利幸, 伊崎昌伸, 梅本実. 普通鋼精錬プロセスから排出された電気炉

酸化スラグの淡水への繰返し溶出試験, 鉄と鋼 Tetsu-to-Hagané, Vol. 96, pp. 26-33, 2010. (査読あり)

③S. Yokoyama, A. Suzuki, NIK H. B. M. Nof, H. Kanematsu, A. Ogawa, T. Takahashi, M. Izaki, M. Umemoto. Serial batch elution of electric arc furnace oxidizing slag discharged from normal steelmaking process into fresh water. *ISIJ International*, Vol. 50, pp. 630-638, 2010. (査読あり)

④H. Kanematsu, A. Ogawa, S. Yokoyama, T. Takahashi, H. Ikigai, D. Kuroda. Biofouling on EAF Stainless Steel Oxidizing Slag in Marine Environment. *Proceedings of 15th International Congress on Marine Corrosion and Fouling*, p. 56, 2010. (査読あり)

⑤S. Yokoyama, T. Shimomura, N. H. M. Nor, H. Kanematsu, T. Takahashi, A. Ogawa, J. Sasano, M. Izaki. Safety Assessment of Oxidizing Slag Discharged from EAF Used In Normal Steelmaking by Conventional Leaching Test and Biological Evaluation. *Proceedings of 17th Asian Symposium on Ecotechnology*, p. 35, 2010. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

①下村徹也, 横山誠二, Nik Hisyamudin Muhd Nor, 笹野順司, 伊崎昌伸, 兼松秀行, 小川亜紀子, 高橋利幸. Influence of gas species on elution of oxidizing slag discharged from EAF, 日本鉄鋼協会第161回春季講演会, 日本鉄鋼協会第161回春季講演大会講演論文集「材料とプロセス」Vol. 24(1), 2011年(査読あり) (*東日本大震災の影響で学会自体は中止になったが、発表自体は紙面(講演集)で発表した扱いとなった。)

②高橋利幸, 横山誠二, 兼松秀行, 小川亜希子. Assessment of Components Eluted from Electric Arc Furnace Oxidizing Slag with Phytoplankton, 日本鉄鋼協会第 161 回春季講演会討論会, 日本鉄鋼協会第 161 回春季講演大会講演論文集「材料とプロセス」Vol. 24(1), 2011年(査読あり) (*東日本大震災の影響で学会自体は中止になったが、発表自体は紙面(講演集)で発表した扱いとなった。)

③高橋利幸, 小倉優加, 横山由佳, 高橋嘉夫, 横山誠二, 兼松秀行, 小川亜希子.

Chemical and Biological Properties of Electric Arc Furnace Slag in Aquatic Environments, **日本水環境学会 第 45 回大会**, 北海道, 2011 年 3 月 (*東日本大震災の影響で学会自体は中止になったが、発表自体は紙面(講演集)で発表した扱いとなった。)

④S. Yokoyama, T. Shimomura, N.H.M. Nor, H. Kanematsu, **T. Takahashi**, A. Ogawa, J Sasano, M. Izaki. Safety Assessment of Oxidizing Slag Discharged from EAF Used In Normal Steelmaking by Conventional Leaching Test and Biological Evaluation. **17th Asian Symposium on Ecotechnology**, Toyama, 2010年11月。(査読あり)

⑤横山誠二, 兼松秀行, 黒田大介, 小川亜希子, 生貝初, **高橋利幸**. Immersion of Iron-Steel Slag into Marine Environment and Biofilm Formation, **日本鉄鋼協会第 160 回秋季講演会 討論会**, 北海道, 2010 年 9 月 26 日 (口頭発表) (査読あり)

⑥H. Kanematsu, A. Ogawa, S. Yokoyama, **T. Takahashi**, H. Ikigai, D. Kuroda. Biofouling on EAF Stainless Steel Oxidizing Slag in Marine Environment. **15th International Congress on Marine Corrosion and Fouling**, England, 2010 年 7 月。(査読あり)

⑦**高橋利幸**, 小倉優加, 村美奈代, 横山誠二, 兼松秀行, 小川亜希子. Assessment of Steel Oxidizing Slag on the Growth of Phytoplankton, **日本鉄鋼協会第 159 回春季講演会**, 筑波, 2010 年 3 月 30 日 (口頭発表)

⑧小川亜希子、三浦あす香、横山誠二、兼松秀行、**高橋利幸**. The comparison of cytotoxicity of different types of eluted slags : electric arc furnace oxidizing slag and normal steel slag, **日本鉄鋼協会第159 回春季講演会**, 筑波, 2010年3月30日 (口頭発表)

⑨横山誠二, N. H. M. Nor, 梅本実, 兼松秀行, 小川亜希子, **高橋利幸**. Elusion behavior of EAF stainless steel oxidizing slag in fresh water at time of serial batch elution test, **日本鉄鋼協会第 159 回春季講演会**, 筑波, 2010 年 3 月 30 日 (口頭発表)

[その他]

(1) 招待講演など (計 1 件)

①**高橋利幸**. 環境評価や資源回収・エネルギー開発に対する原生動物の利用, **社団法人霧島工業クラブ平成 21 年 4 月度例会**, 2009 年 4 月

(2) その他の発表 (計 2 件)

①山下利沙, 小倉優加, **高橋利幸**, 横山誠二. 生物検定法を用いた水域使用時における電気炉酸化スラグの安全性評価, **平成 21 年度高専連携教育研究プロジェクト成果発表会**, 豊橋, 2010 年 8 月

②**高橋利幸**. 水棲生物操縦システム, 独立行政法人 科学技術振興機構 **南九州発 新技術説明会 資料集**, 2009 年 12 月

(3) アウトリーチ活動 (計 2 件)

①**高橋利幸** (講師および実施主担当者). 都城高専で体験するバイオテクノロジー実験, 独立行政法人 科学技術振興機構 **平成 22 年度 サイエンス・パートナーシップ・プロジェクト (プラン初 A) (講座型学習活動)**, 2010 年 10 月

②**高橋利幸** (指導講師). 自分のからだ (細胞) を顕微鏡でのぞいてみよう!, 財団法人日本科学技術振興財団・科学技術館 **青少年のための科学の祭典 2009 宮崎大会**, 2009 年 8 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 利幸 (TAKAHASHI TOSHIYUKI)
都城工業高等専門学校・物質工学科・講師
研究者番号: 50453535

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし