

令和元年6月26日現在

機関番号：27401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18811

研究課題名（和文）越境拡散浮遊粒子状物質に含まれるタンパク質の定量分析の試み

研究課題名（英文）Experiments on the quantification of protein in trans-boundary suspended particulate matters

研究代表者

張代洲（Zhang, Daizhou）

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号：90322726

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：

汎用のBCA法を基に浮遊粒子状物質中のタンパク質を定量する方法を開発した。実大気への試験的な応用より、天気や大気汚染の変化に伴う大気中のタンパク質の濃度変動の測定が可能となった。越境移動気団中のタンパク質の定量評価を試みた。タンパク質の濃度は数十ng/m³から十数μg/m³の範囲で、天気及び大気汚染の状況によって著しく異なった。黄砂時には濃度は数μg/m³から十数μg/m³であり、他の天気条件と大気汚染状況の時より高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大気汚染による健康影響の原因のひとつ物質は、浮遊粒子状物質中のタンパク質である。本研究では、複数分野の知識と技術を融合して、濃度が極めて低い大気浮遊粒子状物質中のタンパク質について天気と大気汚染の変化時間スケールの変動を求める方法を開発した。開発した方法を用いて、さまざまな天気及び大気汚染の状況の下で、浮遊粒子状物質中のタンパク質の定量が可能となった。そのような高時間分可能のデータは、知っている限りまだ報告されることがない。今後の応用によって、浮遊粒子状物質の健康影響の評価、および大気中の生物物質の生態系へのかかわりの研究推進に独創的かつ先駆的な貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Based on the traditional protein quantification technique of BCA, we developed in laboratory an approach to quantify the protein in airborne particulate matters. Tests for its application to the real atmosphere showed its effectiveness to depict the variation of airborne protein concentration with the changes of weather and the evolution of air pollutants concentration.

With the developed method, we tried to quantify the airborne protein in trans-boundary-moved air parcels. Results show that the concentration of protein in the air parcels varied in a large range of hundreds to thousands of nanograms of protein per cubic meter, responding to various weather and pollutant conditions. When Asian dust appeared, the range was from several to more than 10 micrograms of proteins per cubic meter, much larger than under other weather or pollutant conditions.

研究分野：大気環境学

キーワード：越境大気汚染 浮遊粒子状物質 タンパク質 定量分析 東アジア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は過去数年に大気中の浮遊微生物の定量分析方法を開発し浮遊微生物の越境拡散を調査してきた。偏西風によって大気中の微生物の振る舞いは、気流の変化に強く依存し、大気圏を介して微生物の越境長距離輸送や局地的な排出などは天気の変化に伴って変わり続けている実態を明らかにした。

浮遊粒子状物質による健康被害は、主に粒子に含まれるタンパク質から引き起こされるアレルギー性疾患である。しかし、国内外において浮遊粒子状物質中のタンパク質に関する報告は僅かにあり、使用方法の検証が行われていなかったため、報告された情報の正確さは不明である。申請者は生化学分野の専門家と連携して浮遊粒子状物質中のタンパク質の測定方法を模索した。その結果、タンパク質を定量分析する汎用の BCA 法を用いて大気中タンパク質濃度の定量分析が可能であることが確認された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、汎用のタンパク質定量分析の BCA 法と Picotan/Picotein 微量タンパク質検出法を用いて大気中浮遊粒子状物質に含まれるタンパク質の定量分析法を確立し、黄砂やヘイズなどの越境移動の浮遊粒子状物質に含まれるタンパク質の測定を行い、大気環境学と生化学を横断する斬新な研究サブジェクト「大気中のタンパク質の濃度変化およびそのアミノ酸構造の解明」に初期的なデータを蓄積することである。

3. 研究の方法

本研究は、実験室での検証と実大気への応用で構成される。実験室内の検証では、大気のサンプルからタンパク質を抽出し、BCA 法を用いたタンパク質濃度の測定と Picotan/Picotein 法を用いた分子量別のタンパク質の相対割合の測定について操作手順と感度の検討実験を中心にを行い、大気中浮遊粒子状物質中のタンパク質の測定法を確立する。実大気への応用では、中国東部沿岸域青島市と熊本県天草西岸において大気浮遊粒子状物質を採集し、越境大気汚染気団中のタンパク質の定量評価を試験的に行う。

(1) 実験室での検証(平成 29 年度)

前処理方法の検証：タンパク質吸着仮想フィルターを利用して、含まれるタンパク質の定量と分子量別の相対定量を行い、回収率を確認し、抽出時間及び大気から短時間でサンプルを採取する際の最も適する流量と採集時間を推定する。

実大気浮遊粒子中のタンパク質測定法の確立：の結果に基づいて、大気中浮遊粒子状物質をフィルター上に採集し、生体成分のタンパク質の分離手法や阻害物質除去試薬等を用いた前処理を行った後、凍結乾燥させ、蒸留水に溶解させたタンパク質の定量を行い、最適測定条件を確立する。

(2) 実大気への応用(平成 30 年度)

サンプルの採集：春季と秋期に大陸性気団が九州地方によく流れたときに、熊本県天草半島西海岸と中国東部沿岸都市青島市においてフィルターサンプルを複数採集する。サンプルの採集は、気象条件を参考にして流れ経路別の気団(アジア大陸からの気団、東シナ海からの気団、局地的な気団)に対して、気団毎に行う。

分析：検証されたタンパク質の BCA 法と Picotan/Picotein 法を利用して、トータルのタンパク質の濃度およびその分子量別のタンパク質の割合を測定する。結果の質を保証するために、複数のフィルターからの結果を統計処理し、大気中のタンパク質の濃度と構成を推定する。

まとめ：得られるデータで、異なる気団中のタンパク質およびその分子量別のタンパク質の濃度と構成を評価し、九州地方における越境汚染大気中のタンパク質濃度の実態について初期的なコンセプトを取りまとめる。学会での発表と学術論文の発表に努めながら、次の段階の研究を準備する。

4. 研究成果

平成 29 年度では標準溶液と実大気中のサンプルを利用して実験室内において BCA 法を用いた定量分析の操作手順と抽出精度の検討を重点的に実施した。操作手順などを検討するために、タンパク質の抽出率、検量線の再現率、吸光度の測定を繰り返し行なった。また、大気中浮遊粒子状物質中のタンパク質について、試験的な測定も行なった。その結果、標準溶液の濃度 0.5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の吸光度が超純水の吸光度とほぼ一致した。よって、本実験において濃度 5.0-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で検量線法が最も適応であることが確定された。実大気(熊本市にて)へ試験的に使用した結果、大気中のタンパク質濃度は 0.2-1.07 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。このことから、サンプルの採集は数立米の空気を採集しないと、浮遊粒子状物質中のタンパク質に対して、正確な定量が難しいことがわかった。また、天気条件の違いによって、大気浮遊粒子中のタンパク質量が大きく異なる結果もあった。同一地点でも、地上からの高度の違いによって、大気浮遊粒子中のタンパク質の濃度が異なることも分かった。これらの研究活動によって、天気や大気汚染の状況の変化に伴う大気中のタンパク質の定量分析が汎用な BCA 法を利用して可能となった。

平成 30 年度では、確立された方法を利用して、九州西岸および中国東部沿岸域(平成 31 年 1 月)において観測を実施し、越境大気汚染気団中のタンパク質の定量評価を試験的に行い、複数の方法でタンパク質の分子量別の相対定量も試みた。サンプルの採集は、気象条件を参考して流れ経路別の気団に対して気団毎に行なった。また、浮遊粒子状物質中のタンパク質の量と浮遊微生物の濃度の関係も調べた。実大気浮遊粒子状物質中のタンパク質の量は天気及び大気汚染の状況によって大きく異なり、浮遊粒子状物質の濃度の変動とほぼ一致し、その値は数十 ng/m³ から十数 μg/m³ (1ng=10 億分の 1 グラム; 1 μg=百万分の 1 グラム)の範囲であった。特に黄砂時には、タンパク質の濃度は数 μg/m³ から十数 μg/m³ であり、他の状況より濃度が高かった。図 1 は結果の事例を示している。これらの結果は、浮遊粒子状物質中のタンパク質が浮遊粒子の種類と濃度に強く依存していることを示唆している。そのため、大気浮遊粒子中のタンパク質の変動を解明するために、天気条件と大気汚染状況への考慮は不可欠であることが分かった。

また、海外の研究者と連携して令和元年 5 月に熊本県天草西岸と中国沿岸都域青島市で同時共同観測を実施した。6 月現在、採集したサンプルを分析しながら、6 月下旬に中国の砂漠域で実施する予定の砂漠観測を準備している。今後の予定では、取得したデータをとりまとめて、再度タンパク質の分子量別の相対定量を挑む。また、研究成果を国内外の学会で積極的に発表する。開発された方法と得られた結果をもとにして学術論文の原稿を作成し、専門雑誌に投稿する。

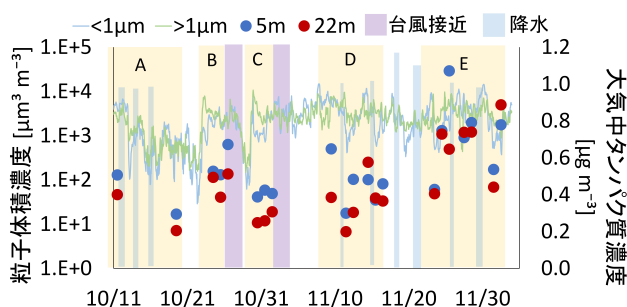


図 1 高度の違う二箇所における様々の天気時の 1 μm 以上と以下の浮遊粒子の体積濃度とその浮遊粒子全体中のタンパク質の濃度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Yuki Hashimoto, Ayumi Naganuma, Hiromi Mastusaki, Tomoko Kojima, Zhang Daizhou: Tests for the Quantification of Proteins in Aerosol Particles. The 11th Asian Aerosol Conference, Hong Kong, May 27-30, 2019.

橋本優希, 長沼歩, 張代洲, 小島知子: 大気浮遊粒子中のタンパク質抽出法の検証. 第59回大気環境学会, 福岡市, 2018年9月12日-14日

橋本優希, 長沼歩, 張代洲, 小島知子: 大気浮遊粒子中のタンパク質抽出法の検証, 第35回エアロゾル科学・技術研究討論会, 名古屋, 2018年7月31日 8月2日

Daizhou Zhang: Concentration and Viability of Bacterial Aerosols Associated with Weather in Asian Continental Out-flow: Summary of Recent Studies at PUK. 第11回大気バイオエアロゾルシンポジウム、長野、2018年2月20日 - 21日 .

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pu-kumamoto.ac.jp/~aerl/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：松崎 弘美
ローマ字氏名：Hiromi Matsusaki
所属研究機関名：熊本県立大学
部局名：環境共生学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：30326491

研究分担者氏名：山元 涼子（平成30年3月31日まで）
ローマ字氏名：Ryoko Yamamoto
所属研究機関名：熊本県立大学（平成30年3月31日まで）
部局名：環境共生学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：50580429

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：長沼 歩
ローマ字氏名：Ayumi Naganuma

研究協力者氏名：橋本 優希
ローマ字氏名：Yuki Hashimoto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。