

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560878

研究課題名（和文）ウラン濃集タンパク質の効率的な新規探索法の開発

研究課題名（英文）Development of the effective novel identification method of the proteins which accumulate uranium

研究代表者

坂本 文徳（SAKAMOTO FUMINORI）

独立行政法人日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究副主幹

研究者番号：60391273

研究成果の概要（和文）：ウランを特異的に集めるタンパク質を効率的に特定する新規の手法を開発した。この方法は、サイズ排除カラムを利用した液体クロマトグラフィーと質量分析器を組み合わせた検出系を利用している。実際に、この方法を利用して、酵母タンパク質からウランを集めるタンパク質特定を試みたところ、46 キロダルトン程度の大きさのタンパク質がウランを集めることを明らかにした。そして、そのタンパク質は硫黄を含むアミノ酸（メチオニンとシステイン）を構成要素としないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We developed new technique to identify the protein which specifically accumulated uranium effectively. This method uses the detection system that combined mass spectrograph with liquid chromatography using a size exclusion column. We tried to identify the proteins which accumulate uranium using this method. As a result, we made clear that about 46 kilo Daltons of protein accumulated uranium. It was also suggested that the protein did not conclude the amino acid including sulfur (methionine and cysteine).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学・原子力額

キーワード：核燃料サイクル、酵母、ウラン濃集、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

（1）微生物が金属を濃集することは 1970 年代から報告されており[1]、アクチノイド、レアメタル、有害金属などの回収に利用する目的で、金属を濃集する微生物の探索が国内外で広範に行われている。中でも、アクチノイドの効率的な回収は、核燃料サイクルの確立や、ウランで汚染されたウラン廃鉱地域の

環境浄化のために重要視されている。OECD-NEA の原子力科学委員会は、1997 年に微生物を用いたアクチノイドの分離に関する研究を紹介し[2,3]、坂口らは、生物が核燃料物質に対して強い親和性を示すことを報告している[4]。

（2）一方、微生物による金属の濃集機構も徐々に明らかにされてきている。微生物の細

胞表面には、生体分子であるタンパク質、糖鎖や脂質などが存在している。これらの生体分子は、カルボキシル基、リン酸基、水酸基などの官能基を有しているため、陽イオンとして存在するアクチノイドを吸着する。最近の研究成果によると、ウランを濃集するのは細胞表面タンパク質やリン酸基を有した生体分子であることが分かってきた[5,6]。また、これらの成果は、ウランを濃集するタンパク質を分離・抽出するかあるいは細胞表面に発現させることが可能であれば、天然微生物を用いるよりも効率的にアクチノイドを分離・回収することが可能であることを示唆している。実際、上田らは遺伝子工学の手法を用いて細胞表面に特定タンパク質を発現させることに成功している[7]。

(3) しかし、ウラン濃集にタンパク質を利用することが可能と認識されているが、実際のシステムに応用するまでには至っていない。微生物には数千種類のタンパク質が存在するが、それらのタンパク質からウランを濃集するタンパク質を網羅的・効率的に特定する手法が確立されていないためである。ウラン濃集タンパク質を効率的に特定する手法が確立されれば、さらに高度化した研究が推進されるのは間違いない。

[1]A. B. Cobet, C. Wirsen, and G. E. Jones, *J. Gen. Microbiol.*, 62, 159 (1970).

[2]L. E. Macaskie, *Critical Rev. Biotechnol.*, 11, 41 (1991).

[3]G. M. Gadd, *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*, 225 (1991).

[4]坂口孝司, 化学と生物, 35 巻, 11 号, p.752-754 (1997).

[5]M. Kalin, W.N. Wheeler and G. Meinrath, *Journal of Environmental Radioactivity*, 78, 151 (2005).

[6]P. J. Panak, J. Raff, S. Selenska-Pobell, G. Geipel, G. Bernhard and H. Nitsche, *Radiochim. Acta*, 88, 71276 (2000).

[7]T. Fukuda, D. Isogawa, M. Takagi, M. Kato-Murai, H. Kimoto, H. Kusaoke, M. Ueda and S. Suye, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 2845(2007).

2. 研究の目的

本研究では、ウランを濃集するタンパク質を特定する効率的な新規手法を開発し、タンパク質探索に一大ブレークスルーをもたらすものである。そして、タンパク質を用いた使用済核燃料や放射性廃棄物、さらに環境中からのウラン回収方法の確立を目指すとともに、核燃料サイクル実現に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、1. 微生物の培養条件確認、2. 微生物からのタンパク質の抽出条件確立、3. ゲル二次元電気泳動の条件確立、4. ウェスタンブロッティングの条件確立、5. タンパク質とウランの接触ならびに放射能測定条件確立、6. タンパク質の同定の6つのステップからなる。

研究初年度である平成21年度には、主に2に関連した研究を実施するとともに、後期からは3と4にも着手する。平成22年度には3、4及び5を主に研究する。そして、平成23年度には5と6を中心に研究するとともに、それまでの成果をまとめ、ウラン濃集タンパク質の効率的な新規探索法を確立する。

(1) 微生物の培養条件確認

微生物の培養条件は参考文献、参考書等に記載されているので、その条件を踏襲して再現性を確認して研究に利用する。

(2) 微生物からのタンパク質の抽出条件確立

タンパク質の抽出には、市販の抽出キットを利用する。抽出剤が何種類もあり、種類により抽出されるタンパク質の種類が異なる。また、微生物細胞を破碎するガラスビーズの大きさや量、破碎時間によっても抽出されるタンパク質の種類が異なってくる。それらを考慮して、多くのタンパク質を抽出する最適条件を確立する。

(3) ゲル二次元電気泳動の条件確立

二次元目の電気泳動で使用するラウリル硫酸ナトリウム(SDS)がウラン濃集に影響を及ぼす可能性がある。それを確認するとともに、もし影響を及ぼすならば、洗浄によるSDSの除去を行う手法、あるいはSDSを使用しない、例えば二次元目の電気泳動に別の手法を利用することを検討する。これらの問題点を解決し、ゲル二次元電気泳動の最適条件を確立する。

(4) ウェスタンブロッティングの条件確立

ゲル中に存在するタンパク質をPVDF(ポリフッ化ビニリデン)膜に転写・固定する。またPVDF膜への転写を確認する方法として、クマシーブリリアントブルー染色法や抗体染色法を考えている。これらを検討して確認方法を確立する。

(5) タンパク質とウランの接触ならびに放射能測定条件確立

溶液中のウラン濃度、接触時間を検討し、最適な接触条件を確立する。また、放射能測定はバイオイメージングアナライザーBAS2500を利用するが、その際に使用するイメージングプレートの種類、露光時間、解像度等の条件設定を最適化する。

(6) タンパク質の同定

放射能測定によりウラン濃集タンパク質を特定する。

4. 研究成果

(1) 微生物の培養条件確認

使用する微生物を出芽酵母である

Saccharomyces cerevisiae の BY4743 株と決めて、この酵母を利用して培養条件を検討した。この酵母は 4000 株以上の一遺伝子欠損酵母として利用されている酵母の親株にあたる。培養条件としては、成分を変えた数種類の培地を調製し、酵母の最適培養温度 30 度で培養した。その結果、この BY4743 酵母培養には YPD 培地が最適あることを確認した。しかし、YPD 培地はウランを沈殿させる成分が含まれており、培地にウランが含まれる条件では YPD 培地を使用出来ない。その対策として YNB 培地での培養を試みた。YNB 培地では BY4743 酵母の生育があまり良くないので、カザミノ酸を加えることで生育度を上げることに成功した。

(2) 微生物からのタンパク質の抽出条件確立

抽出キットの選定、ガラスビーズの粒径、ガラスビーズとの混合割合、破砕機での破砕回数などを試験して抽出条件を最適化した。その条件は以下の通りである。抽出キットはバイオラッド社製「ReadyPrep Sequential Extraction Kit」(No. 163-2100)を使用。ガラスビーズはシリカガラスで粒径が 1.0 mm。1 回に使用する酵母菌体の量は、湿重量で 100 から 500 mg。その他の条件は、抽出キットの手順に従う。



図 1 最適抽出キットで抽出したタンパク質の二次元電気泳動図。一番多くのタンパク質が抽出・分離されている。

(3) ゲル二次元電気泳動の条件確立

使用する電気泳動用ゲルの種類、泳動時間、マーカータンパク質の条件を検討して最適化を図った。その条件は以下の通りである。二次元電気泳動用ゲルはバイオラッド社製「レディーゲル J10-20%」(No.161-J391V)、一次元用ストリップはバイオラッド社製「IPG Ready Strip pH5-8」(No.163-2004)、マーカータンパク質はバイオラッド社製「プレジジョン Plus デュアルスタンダード」

(No.161-0374)を使用。二次元目の泳動時間は、時間やボルト時間で判断するのではなく、プロモフェノールブルーがゲル下面 1 cm 程度付近まで泳動されたら終わりにする。その他の条件は、バイオラッド社製「タンパク質サンプル調製キット ReadyPrep サンプルプレパレーションキット(No.163-2100)の手順に従う。

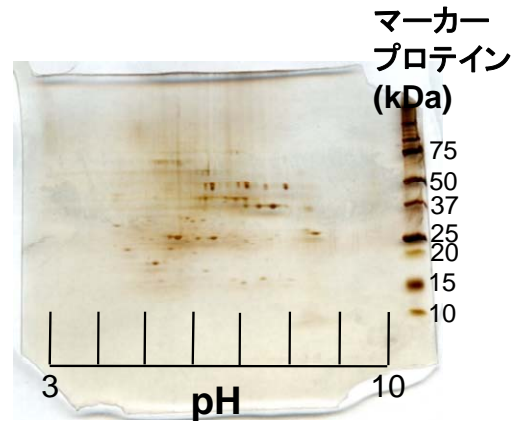


図 2 最適一次元ストリップ確認用二次元電気泳動図。pH 範囲が 3-10 のストリップをしたところ、ほとんどのタンパク質が pH5-8 の間に存在していることを確認した。

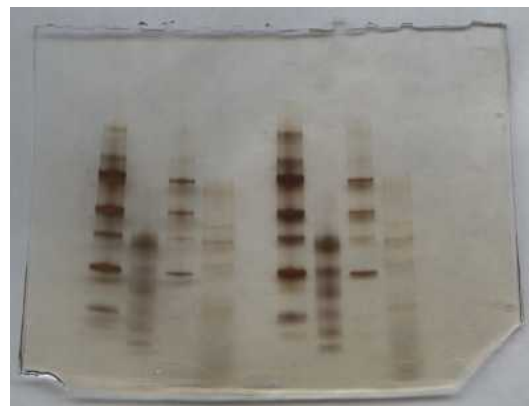


図 3 最適マーカータンパク質確認用二次元電気泳動図。4 種類のマーカーを加熱有り(右側)と加熱無し(左側)で泳動した。加熱無しのプレジジョン Plus デュアルスタンダード(一番左のレーン)が最適マーカーと判断した。

(4) ウェスタンブロッティングの条件確立

ウェスタンブロッティングはタンパク質をゲルから PVDF 膜に転写する操作のことである。ウェット式とセミドライ式が利用されているが、我々はウェット式を採用した。バイオラッドの専用装置「ミニトランスプロットセル」(No. 170-3930JA)を利用し、その手順に従った。PVDF 膜に転写されずにゲルに残

ったタンパク質の銀染色法による観察、PVDF膜に転写したタンパク質の金コロイド染色法による観察からタンパク質の転写を確認し、ウェスタンブロッティングの条件を確立した。

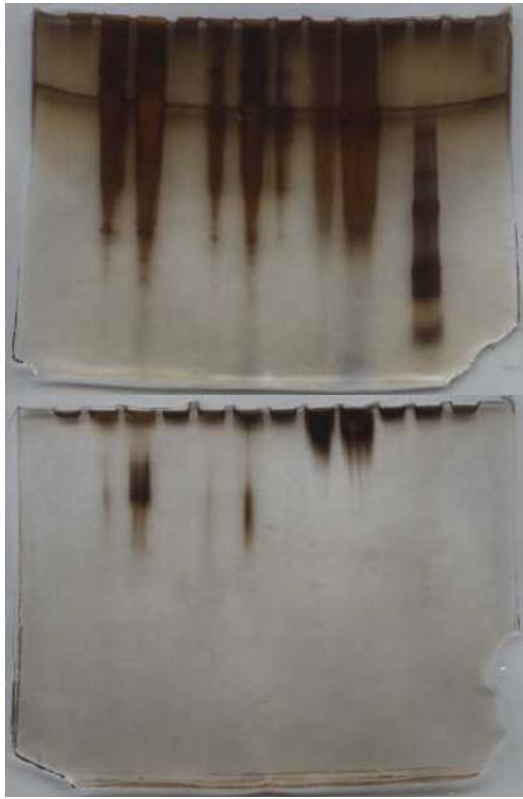


図 4 ウェスタンブロット前のゲル画像(上)と後のゲル画像(下)。ウェスタンブロット後は、ゲル上のタンパク質はほとんど観察されないことから、タンパク質が PVDF 膜へ転写されたと考えられる。

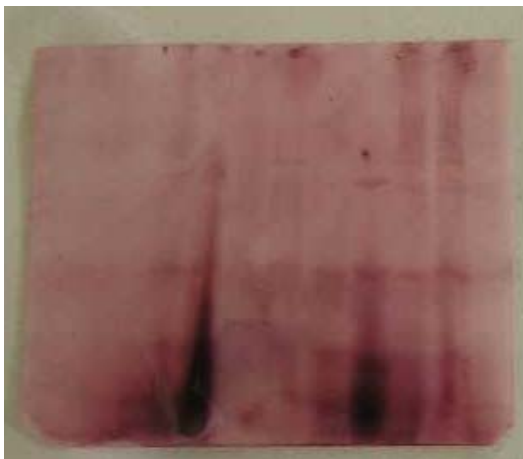


図 5 ウェスタンブロット後の PVDF 膜の金コロイド染色画像。膜状にタンパク質が観察された。

(5) タンパク質とウランの接触ならびに放射

能測定条件の確立

まず酵母がウランを濃集すること、酵母のタンパク質がウランを濃集することを再確認した。BY4743 酵母を培養し、それにウランを加えて培養を継続した。一定時間後に溶液の吸光度と上清の放射能を測定した。その結果、上清からは放射能は検出されず、図 6 に示す通り全て酵母菌体に濃集していることを確認した。

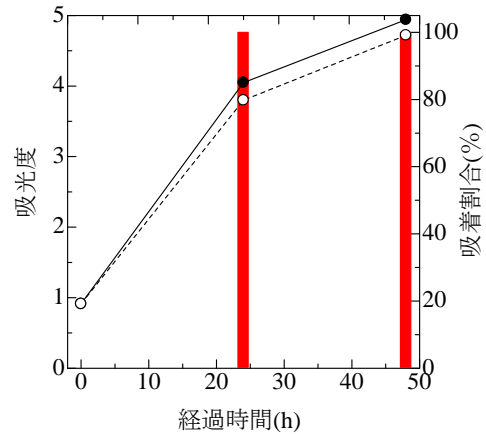


図 6 ウラン存在下での酵母の成長度合いと酵母のウラン濃集割合。折れ線グラフ(●がウラン無し培地、○がウラン有り培地)が吸光度で棒線がウランの吸着割合。ウラン吸着割合は 100%となった。

酵母菌体からタンパク質を抽出し、そのタンパク質にウランを接触させてウランの濃集割合を測定した。その結果、図 7 に示す通り、一定の割合でウランは酵母タンパク質に濃集することを確認した。

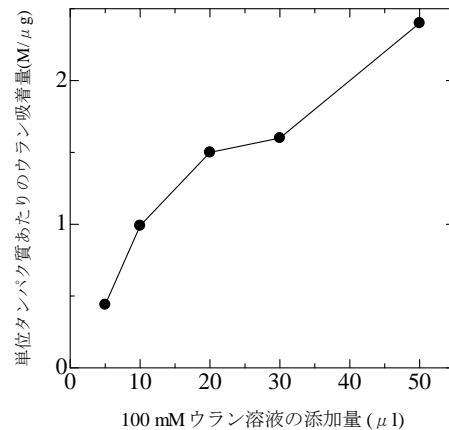


図 7 ウラン添加量とタンパク質へのウラン吸着量の関係。ウランは一定の割合でタンパク質に吸着している。

同じ酵母タンパク質を PVDF 膜状に載せ、その状態でウランを接触させてウランが濃

集するかどうか確認した。その結果、図8に示す通り、PVDF膜上でもウランはタンパク質に濃集することを確認した。ウランの放射能測定手順は以下の通り。PVDF膜をメタノールに15秒浸す。続いて精製水に2分浸す。一定量のタンパク質を数カ所に載せて自然乾燥させる。メタノールに5秒浸下後、すぐに精製水に2分浸す。一定濃度のウラン溶液に30分接触させる。精製水に2分浸してリンスを2回行う。自然乾燥後、イメージングプレートに接触させて露光する。一定時間経過後、ウランの放射能を測定する。

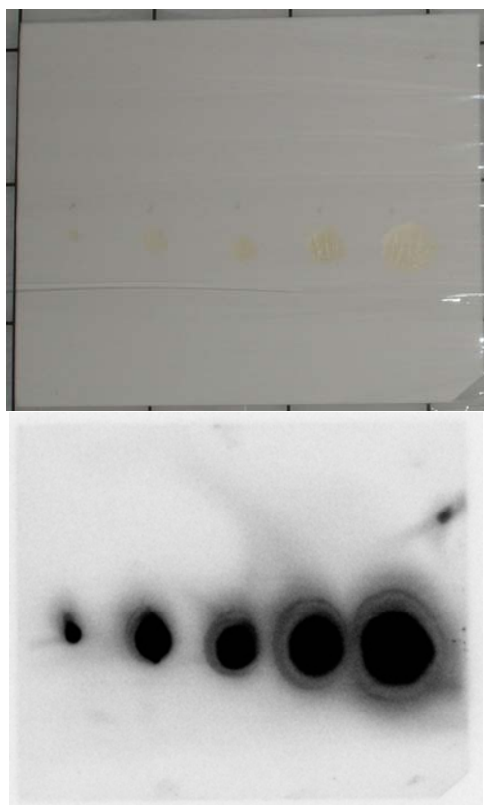
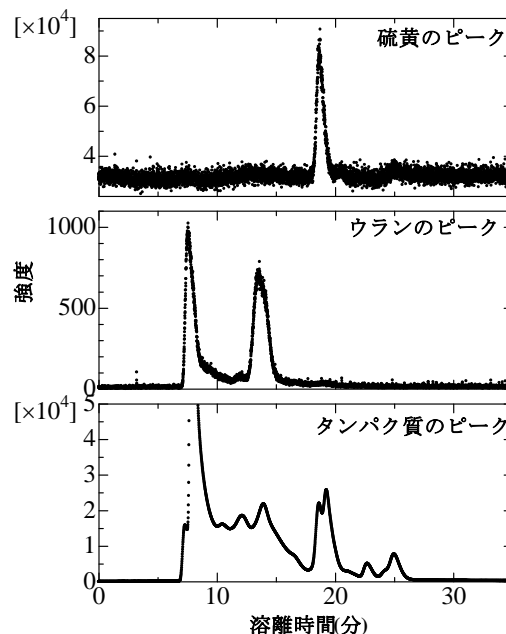


図8 PVDF膜状のタンパク質画像(上)とタンパク質に吸着したウランの放射能画像(下)。タンパク質のある場所でウランの放射能が検出された。左端の一番小さいタンパク質で約 50 μg 、右の一番大きいタンパク質で約 1600 μg 存在する。

これらの結果を基に、酵母タンパク質を二次元電気泳動で分離し、ゲル上のタンパク質をウェスタンブロッティングでPVDF膜に転写した。PVDF膜状のタンパク質にウラン溶液を接触させ、PVDF膜をリンス・乾燥後放射能を測定した。ウラン溶液の濃度を変えたり、接触時間を変えたり、露光時間を変えて実験を行ったが、タンパク質に吸着したウランの放射能を検出することは出来なかった。これは、二次元電気泳動で扱えるタンパク量はごく少量であり、それに吸着するウランもごくわずかのため、放射能を検出するのに十分な

ウランが吸着しないと考えられた。

そこで、新たにサイズ排除カラムを利用した液体クロマトグラフィーと質量分析器を組み合わせた検出系を準備し、これを利用してタンパク質に濃集するウランの測定を試みた。



タンパク質、ウラン、硫黄のヒストグラム

図9 液体クロマトグラフィーと質量分析器によるタンパク質、ウラン、硫黄のヒストグラム。ウランのピークと同じ場所にタンパク質のピークも検出された。一方、ウランのピークに硫黄のピークは検出されなかった。

その結果、図9に示す通り、7.9分と13.9分あたりにウランのピークを検出した。タンパク質の大きさと溶離時間の関係を検量線から求めた結果、これらのピークは1000キロダルトンと46キロダルトン程度の大きさのタンパク質のピークと考えられ、ウランはこれらのタンパク質に濃集することを明らかにした。また、ウランのピークと同じ時間に硫黄のピークが検出されなかったことから、当該タンパク質は含硫アミノ酸(メチオニンとシステイン)を構成要素としないことが示唆された。これら一連の結果により、当初の研究実施計画通りの成果がほぼ得られた。

この液体クロマトグラフィーと質量分析器を組み合わせた検出系は、当初考えていた系よりもさらに短時間でタンパク質特定が可能となっている。今後は、サイズ排除カラムの種類を再検討することにより、より分解能の高い検出系を開発出来る可能性がある。また、溶離液を回収し、当該溶液に含まれるタ

ンパク質を二次元電気泳動で分離した後、時間飛行型質量分析器で解析することにより、タンパク質の同定も可能と考えられる。

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7件)

- ① Fuminori Sakamoto、Takuya Nankawa、Toshihiko Ohnukia、Tsutomu Fujii and Haruyuki Iefuji、Yeast Genes Involved in Uranium Tolerance and Uranium Accumulation: A Functional Screening Using the Nonessential Gene Deletion Collection、*Geomicrobiology Journal*、査読有、29 巻、2012、470-476、DOI:10.1080/01490451.2011.581330
- ② N. Kozai、T. Ohnuki、F. Sakamoto、et al、Accumulation of Co in Yeast Cells under Metabolically Active condition -Implication for Role of Yeast in Migration of Radioactive Co-、*Journal of Nuclear Science and Technology*、査読有、48 巻、2011、1206-1213、DOI:10.1080/18811248.2011.9711808
- ③ O. Ohnuki、N. Kozai、F. Sakamoto、et al、Association of actinides with microorganisms and clay: Implications for radionuclide migration from waste-repository sites、*Geomicrobiology Journal*、査読有、27 巻、2010、225-230、DOI:10.1080/01490450903456715
- ④ Mingyu Jiang、Toshihiko Ohnuki、Naofumi Kozai、Kazuya Tanaka、Yoshinori Suzuki、Fuminori Sakamoto、Eigo Kamiishi and Satoshi Utsunomiya、Biological nano-mineralization of Ce phosphate by *Saccharomyces cerevisiae*、*Chemical Geology*、査読有、277 巻、2010、61-69、<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemgeo.2010.07.010>
- ⑤ F. Sakamoto、T. Ohnuki、F. Fujii、and H. Iefuji、Response of *Saccharomyces cerevisiae* to heavy element stress: lead vs. uranium、*Geomicrobiology Journal*、査読有、27 巻、2010、240-244、DOI:10.1080/01490450903456756

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 文徳 (SAKAMOTO FUMINORI)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究副主幹

研究者番号：60391273

(2) 研究分担者

香西 直文 (KOZAI NAOFUMI)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究主幹

研究者番号：80354877