

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 28 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780098

研究課題名（和文）深海熱水活動域に生息する化学合成微生物の生育に必要なアルミニウム結合タンパク質

研究課題名（英文）Identification of essential aluminum-binding proteins for growth of chemosynthetic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal field.

## 研究代表者

宮崎 淳一 (Miyazaki Junichi)

独立行政法人海洋研究開発機構 海洋・極限環境生物圏領域 研究員

研究者番号：50435848

## 研究成果の概要（和文）：

生体内には重金属が微量含まれており、酵素タンパク質の活性中心などに配置され、重要な触媒機能を生み出している。深海に生息する硫黄酸化化学合成微生物がアルミニウム結合タンパク質を生産しているが、本研究はこれを同定することを目的として行った。

1年目は菌体およびタンパク質の効率の良い回収方法の構築を行った。

2年目は精製系と ICP-MS を組み合わせによって、生体内タンパク質のうち4種をアルミニウム結合タンパク質の候補とした。現在はこれらタンパク質のアミノ酸配列の決定を行っているところである。

## 研究成果の概要（英文）：

Metals are essential elements to catalyze important reactions for maintaining life activity. In the previous studies, we found that sulfur-oxidizing chemosynthetic bacterium produced aluminum (Al)-binding proteins. Therefore, the aim of this study is to identify novel Al-binding proteins from the bacterium.

In the 1st year, I established the method to obtain high amount of cells and their proteins. In the 2nd year, we tried to isolation of Al-binding proteins from the bacterium. Now, we have been determining the amino acid sequence of 4 candidates.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

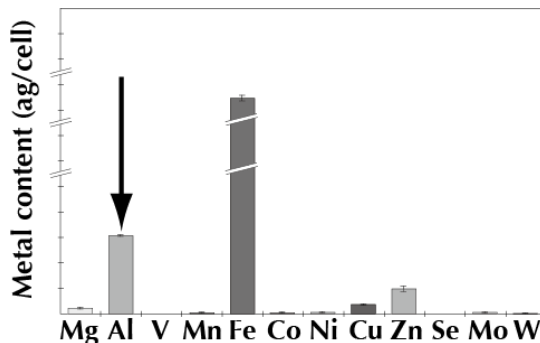
キーワード：微生物学、重金属タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

生命の体内には、ほんの微量ではあるが重金属が存在し、これが生命活動の維持に大きく貢献している。特に生体内の種々の反応を触媒する酵素の活性中心に配置され、これが酸化還元反応や脱水、置換といった機能をタンパク質に付与している。

このように重要な重金属に対して、研究代表者は、生体内における存在量、および生体内における重金属の特性を評価することを目的として研究を行ってきた。特にエネルギー代謝活動において酸化還元反応が非常に重要な化学合成独立栄養微生物に注目した。そして、この研究過程において、深海熱水活動域で分離・培養された硫黄酸化化学合成微生物の細胞由来のタンパク質にはアルミニウムを結合しているものがあり、かつそれが鉄の次にかなりの量で存在していることが明らかとなった(Fig. 1)。これまで、アルミニウムと結合して機能をもつタンパク質は知られていない。

Fig.1 硫黄酸化化学合成微生物の全タンパク質



に結合する重金属分析結果。この結果から鉄の次にアルミニウムと結合するタンパク質が多いことがわかる。

アルミニウムは原子番号 13 の元素であり酸化数は 3 である。遷移金属ではないため酸化還元反応を触媒することはできない。しかしながら地殻を形成する元素の中でケイ素、酸素に次ぐ量があり、初期生命形成の際にタンパク質に機能を持たせるために選択的に利用されたものが、現在の生命に保存されていても不思議ではない。ただし、一部の植物では高濃度のアルミニウムで毒性を示すことが知られている。

まずアルミニウムの重要性を確認するために、本研究の対象とする硫黄酸化化学合成独立栄養微生物のアルミニウム生育要求性を確認したところ、生育に対して必須であることが明らかとなった (Fig. 2)。したがって、本硫黄酸化化学合成微生物は生命維持活動

においてアルミニウムはタンパク質と結合し、何らかの機能を有していると考えられた。

そこで、本研究提案はこのアルミニウム結合タンパク質を既にゲノム配列が決定されている硫黄酸化化学合成独立栄養微生物から探索し、同定することを、ppt レベルという超微量な元素をも超高感度検出可能な ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP 質量分析) (Fig. 3)を利用することによって行うことを目的とした。

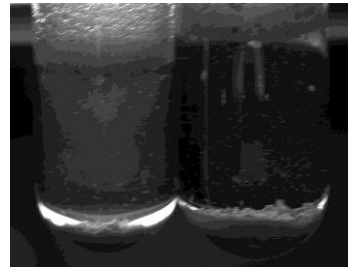


Fig.2. 左がアルミニウムを入れた普通の培地。右がアルミニウム無しの培地。生育は左の培地のみで起きている。



Fig. 3. ICP-MS

## 2. 研究の目的

本研究の目的は硫黄酸化化学合成独立栄養微生物から、生育に必須と考えられ、現在までにその存在が知られていない新規アルミニウム結合タンパク質を ICP-MS を利用して同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究の成功は、以下の大きな 2 点の手法確立が鍵となった。

- (1) 硫黄酸化化学合成独立栄養微生物の大量

培養系の構築およびそこからタンパク質を大量抽出。

以下に示す方法によって、硫黄酸化化学合成微生物の大量培養およびタンパク質の抽出を行った。

ジャーファーメンターによる硫黄酸化化学合成独立栄養微生物の大量培養  
↓  
遠心分離器による培養菌体回収  
↓  
超音波による菌体破碎  
↓  
超遠心分離により、上清にくる細胞質内タンパク質の抽出。  
↓  
上記操作の沈殿に対して界面活性剤処理による膜タンパク質の可溶化  
↓  
超遠心分離により、上清の膜タンパク質抽出。

(2) タンパク質の精製と重金属検出のための ICP-MS をカップリングさせたアルミニウム結合タンパク質のセレクション系の構築。

以下の操作により、アルミニウム結合タンパク質を全タンパク質から精製していった。重要なことは各精製ステップごとに ICP-MS を行い、アルミニウムが検出された画分のみを次の精製ステップに使用することにある。

陰イオン交換カラム DE-52 に吸着  
↓  
塩濃度を 0.1M, 0.2M, 0.3M とステップワイズで上げていくことにより、吸着したタンパク質の溶出。  
↓  
素通りを含む各画分を ICP-MS 分析。アルミニウムが検出された画分を限外ろ過により濃縮。  
↓  
ゲルろ過カラムにてサイズ分画。  
↓  
各画分を ICP-MS 分析を行い、アルミニウムが検出された画分のみ透析。  
↓  
陰イオン交換カラムに吸着させ、塩濃度のリニアグラジエントによりタンパク質を溶出。  
↓  
各画分を ICP-MS 分析を行い、アルミニウムが検出された画分に対して SDS-PAGE  
↓  
アミノ酸配列分析

#### 4. 研究成果

(1) 硫黄酸化化学合成独立栄養微生物の大量培養系の構築およびそこからタンパク質を大量抽出。

最初に、アルミニウム結合タンパク質の ICP-MS による検出に必要な量にアミノ酸配列決定に必要な量を加算した必要不可欠量を定め、その量を獲得するのに必要な総タンパク質量および菌体量の見積もりを行った。ICP-MS による検出限界を 50ppt、アミノ酸配列決定などに必要とされるタンパク質量を 0.2mg と仮定し、算出したところ総タンパク質は 8000mg 必要であると見積もられた。したがって、菌体はおおよそ 800g 必要という計算となり、この量の菌体を得るためには 200L の培地が必要となる事が明らかとなった。これだけの量を培養できる施設はなかったことから、50L ずつ、数回に分けて培養することとした。-80°C で菌体を冷凍しても、アルミニウム結合タンパク質の抽出には問題ないことも確認した。

また、最初は試験管で行っているのと同様に、硫黄酸化化学合成微生物のファーメンター培養においても硫黄を入れて培養を行っていたが、見積もり量を大きく下回る菌体量しか集菌できず、それに伴いタンパク質も見積もり量と比較してかなり少ない量しか得ることができなかった。これは多くの菌体が硫黄に吸着していることが原因であることが明らかとなり、タンパク質抽出に支障をきたしたと考えられた。そこで、硫黄に代わり、チオ硫酸を培地に添加する方法に切り替えて培養を行うこととした。この変更でアルミニウム結合タンパク質が生産されるかどうかをスモールスケール(100mL のバイアル4本、培地量各 30mL)で確認したところ、問題なく検出できた。以上の結果から以降の実験は、硫黄ではなくチオ硫酸を加えた培地により行うこととした。これにより、目標の菌体量を回収することに成功した。

次に細胞質内タンパク質を抽出するために、超音波処理による菌体破碎を行い、超遠心分離の上清画分を回収した。さらに膜結合型タンパク質を抽出するために、先の超遠心分離の沈殿画分を界面活性剤である n-Dodecyl-β-D-maltoside を含む buffer で可溶化し、超遠心分離後の上清を回収した。このステップで得た 2 つのタンパク質画分をそれぞれ ICP-MS にて分析を行った結果、アルミニウムは期待通りの値で検出された。そこで、これらを精製していくこととした。

(2) タンパク質の精製と重金属検出のための ICP-MS をカップリングさせたアルミニウム結合タンパク質のセレクション系の構築。

まず、(1)のステップで得られた上清画分および膜画分を合わせて、陰イオン交換カラムである DE-52 に吸着させ、塩濃度をステップワイズで上げていくことにより、タンパク質を分画した、吸着しなかった画分を含めて、それぞれ ICP-MS により分析を行ったところ、0.1、0.2、0.4M の塩濃度で溶出された画分においてアルミニウムが検出された。これらの画分それぞれを限外ろ過により濃縮後、ゲルろ過カラム (Superose200) にてタンパク質サイズによる分画を行った。ゲルろ過の結果、タンパク質画分は 4mL ずつ 96 本の小試験管に分画されるが、これら全て (DE-52 で 3 種類の濃度からアルミニウムが検出されているので合計 288 本) に対し、ICP-MS 分析を行うことにより、アルミニウム結合タンパク質がどの画分に存在するか確認を行った。その結果、DE-52 の 0.1M 画分および 0.4M 画分からは 2 本、0.2M 画分からは 5 本アルミニウムが検出された。

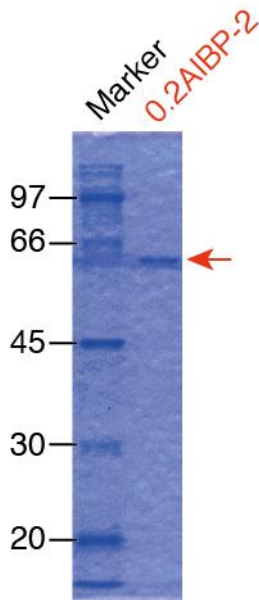


Fig. 4. 最終精製ステップ後の SDS-PAGE 結果の一部。赤矢印でしめしたバンドがアルミニウム結合タンパク質(0.2AIBP-2)と考えられるタンパク質の 1 つ。

さらに精製を行うために、これらを塩無しの buffer で透析を行い、高分解能の陰イオン交換カラムである MonoQ に吸着させた。タンパク質の溶出は塩濃度をリニアグラジエントで上昇させることにより分画した。そして、ICP-MS による分析によりアルミニウム結合タンパク質がどの画分に含まれているのかを確認した結果、DE-52 の 0.1M 画分および 0.4M 画分からは 1 本、0.2M 画分からは 2 本

アルミニウムが検出された。

これらアルミニウムが検出された画分を SDS-PAGE により確認したところ、1 本のバンドがそれぞれの画分から検出された (合計 4 本) (Fig. 4)。

現在はこれら 4 本のタンパク質バンドのアミノ酸配列を分析しているところである。この分析結果と既に決定されているゲノム配列を照らし合わせることによって同定を行い、論文作成へと進めていく予定である。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

①宮崎淳一：インド洋中央海嶺における超塩基性岩に支えられた深海熱水系と玄武岩に支えられた深海熱水系の微生物群集構造における違い、微生物生態学会、2011 年 10 月 8 日 京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 淳一 (MIYAZAKI Junichi)

独立行政法人海洋研究開発機構 海洋極限環境生物圏領域 研究員

研究者番号：50435848

### (2) 研究分担者

なし