

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340072

研究課題名(和文) 共生クロレラを持つ原生動物による土壌結合元素の取り込み機構

研究課題名(英文) Mechanism of uptake of soil-binding elements by protozoans with symbiotic
Chlorella

研究代表者

洲崎 敏伸 (Suzaki, Toshinobu)

神戸大学・理学研究科・准教授

研究者番号：00187692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：共生クロレラを持つ原生生物であるミドリゾウリムシ(以下Pb)が、土壌結合性セシウムを土壌から解離させ、細胞内に高濃度に蓄積することを見出した。そこで、EDS法による元素マッピングを行い、セシウムの細胞内での移動経路を探った。その結果、セシウムはPb細胞内の共生クロレラ内の油滴顆粒にいったん蓄積された後に、ホストのPbの油滴顆粒へと移行していくことがわかった。また、Pbから油滴を単離し、SDS-PAGEと質量分析による含有タンパク質の網羅的解析を行った。さらに、走電性を利用したPbの分離・回収装置を試作し、80%以上の効率でPbを土壌懸濁液から回収できることも確認した。

研究成果の概要(英文)：Paramecium bursaria (Pb), a protozoan with symbiotic chlorella, dissociates the soil-bound cesium from the soil and accumulates in the cell at high concentration. Element mapping by EDS method was carried out and the migration pathway of cesium in Pb was searched. Cesium was accumulated once in the oil droplet in the symbiotic chlorella in Pb and then transferred to oil droplets in the cytoplasm of Pb. Oil droplets were isolated from Pb and a comprehensive analysis of oil droplet proteins by SDS-PAGE and mass spectrometry was performed. It was also confirmed that over 80% of Pb can be recovered from the soil suspension by prototyping Pb separation and recovery device utilizing Pb galvanotaxis.

研究分野：原生物学

キーワード：セシウム除染 原生生物 細胞内共生 油滴 EDS

1. 研究開始当初の背景

我々は、共生クロレラを持つ原生動物が、土壤結合性セシウムを土壤から解離させ、細胞内に高濃度に蓄積することを見出していた。この方法は、福島県における放射性セシウムによる汚染土壤の処理に有効であると考えられるが、なぜこれらの原生動物がセシウムを蓄積するのかという生物学的な機構はわかっていなかった。また、ミドリゾウムシが様々な重金属イオンを蓄積することも知られていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、共生クロレラを持つ原生動物におけるセシウム蓄積に関わる共生クロレラの関与、蓄積の機構とその生物学的意義、について解析し、本技術の生物学的基盤を確立することを目指した。さらに、本法をセシウム汚染土壤の除染処理に用いるために、走電性を利用したミドリゾウムシの土壤懸濁液からの回収法の開発も研究の目的とした。

3. 研究の方法

研究に用いたミドリゾウムシ (*Paramecium bursaria* Pb-Kb1 株) は神戸大学の圃場から採取された。また、Pb-Kb1 株を 10 µg/ml シクロヘキシミド処理により、共生クロレラを持たない白化 Pb-Kb1 株を作った。これらのミドリゾウムシは、明暗サイクル 12 時間、20℃の条件下でクロロゴニウム (*Chlorogonium capillatum*) を唯一の餌とした無菌 2 者培養を行った。セシウム結合土壤は、20 mM の CsCl 水溶液に kaolin (カオリナイト) を加え、Cs を土壤粒子に結合させた後、1 か月放置し、その後遠心操作を繰り返すことで洗浄して作製した。ミドリゾウムシを kaolin 懸濁液に加え、餌のクロロゴニウムと共に一定期間静置した。ミドリゾウムシは、負の走電性を利用して回収した。回収した細胞は新しいシャーレに入れ、再び回収する作業を 2 度繰り返すことで kaolin 粒子の除去を行った。

セシウムがミドリゾウムシの細胞内のどの部位に蓄積するのかを、STEM 透過型電子顕微鏡 (JEOL, JED-2300) を用いた EDS 元素分析法を用いて検討した。ミドリゾウムシ細胞をピペティングで破碎し、遠心 (4℃, 15,000 rpm, 5 min) により上清に油滴が回収された。回収した油滴を 0.22 µm のフィルターを用いて洗浄・濃縮し、SDS-PAGE 用のサンプルとした。泳動後のゲルを切り出し、質量分析を行った。用いた参照データベースは、ミドリゾウムシのトランスクリプトームデータを織毛虫コドンを用いて翻訳した予想タンパク質配列データベースを用いた。

4. 研究成果

まず、土壤粒子のモデルとして用いた kaolin をミドリゾウムシが取り込むことを

確認した。ミドリゾウムシを濃縮・洗浄した後、0.02 g/ml の kaolin を加え光学顕微鏡によって観察したところ、kaolin が餌の生物と同様に細胞内に取り込まれることが確認できた。一度取り込まれた土壤は約 30 分で細胞外へ排出された。次に、Cs を吸着させた kaolin をミドリゾウムシに与え、一定時間の後に細胞を回収し、ICP 発光分光分析により細胞内平均 Cs 濃度を調べた。その結果、4 日間の処理により、細胞内の平均 Cs 濃度は約 30 mM にまで上昇した。これは、環境中の Cs 濃度 (0.1 mM) に比べて 300 倍の濃縮が起こったことを示している。このことからミドリゾウムシは、土壤結合性の Cs を土壤から分離し、細胞内に蓄積する能力があることが分かった。一方、共生クロレラを除去した白化ミドリゾウムシでは Cs の蓄積はまったく見られなかったため、Cs の蓄積には共生クロレラの存在が必須であることもわかった。

そこで、ミドリゾウムシの細胞内における Cs の局在を調べた。Cs に加えて、N、O、S、P、Mg、Si、K、C などに対して同様に二次元マッピング画像を得た。その結果、Cs はクロレラの細胞内にある油滴と、ミドリゾウムシの細胞質内の油滴の内部に局在していることがわかった。油滴の細胞内での形態を、通常の TEM 観察により調べたところ、ミドリゾウムシの細胞質内にある顆粒の多くは共生クロレラの包膜に近接して存在していることがわかった。これらより、細胞内に取り込まれた土壤結合性 Cs は、食胞内の低 pH 環境によって土壤から遊離した後、おそらくはいったん共生クロレラ内に蓄積された後に、何らかのメカニズムによってホストのミドリゾウムシの細胞質に移行し、細胞質中の油滴顆粒に蓄積されると推測された (図 1)。

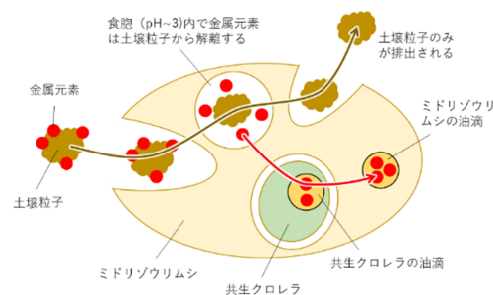


図 1. ミドリゾウムシは土壤粒子に結合したセシウムを取り込み、共生クロレラを介して細胞質中の油滴に蓄積させる機構を持っていることがわかった。

単離した油滴を SDS-PAGE により解析したところ、油滴に特異的ないくつかのバンドが検出できた。それらを切り出して質量分析を行ったところ、いくつかのタンパク質が同定

できた。これらのほとんどは機能未知のタンパク質であったが、その中に、CorA-like divalent cation transporter superfamily に属するイオン輸送体に類似したタンパク質があり、Cs の蓄積に関わっている可能性が示された。セシウムが油滴に運ばれ蓄積される機構は不明であり、今後解明すべき問題である。一方、植物の場合、セシウムはカリウム輸送体などの経路で根から吸収される。カリウムもセシウムと同様、土壌に強く吸着し、なかなか植物体に吸収されない性質がある。このため、カリウムは土壌中に多量に存在するにもかかわらず、植物はカリウム不足の状態にすることが多い。同様のことは、リンについても言える。もしも土壌に結合したカリウムやリンなどの栄養塩類を、ミドリゾウリムシを用いて作物に利用できる状態に転換する技術が開発できれば、農地に投与する肥料の低減化にも寄与できるかも知れない。真核生物の細胞内に比較的普遍的に存在する油滴は、従来はエネルギーの貯蔵場所として理解されてきたが、近年、重金属や様々な物質をその内部に蓄積する機能も有することが示されている。原生生物の油滴が土壌由来の栄養塩類などの蓄積と利用に積極的に関与しているならば、油滴の持つ新規で重要な機能を示すことができるだろう。

ミドリゾウリムシを用いたセシウム除染の工程では、汚染土壌の現場処理を計画している。そこでは、汚染土壌に水を加え、田んぼの要領で懸濁する。そこに大量培養したミドリゾウリムシを加え、数日間置き、Cs を吸収させる。そして、ポンプを用いて土壌懸濁液を吸い上げ、ミドリゾウリムシのみを回収する。残った土壌懸濁液はもとの土地へもどす。これらの工程で最も重要なのは、土壌懸濁液からのミドリゾウリムシの回収作業である。今回の研究においては、ミドリゾウリムシの持つ負の送電性を利用した回収装置を試作し、その性能を検証した。その結果、80%以上の効率で、土壌懸濁液中のミドリゾウリムシを分離できることがわかった。水田から回収できる濁水は、1 アール (100 m²) あたり約 0.7 m³ という報告がある (吉田ら、環境放射能除染研究発表会, 2014) が、本試作装置を用いた土壌懸濁液の処理能力は 4.4 mL/min であり、0.7 m³ の濁水 (= 7×10⁵ mL) を処理するためには 159,000 分 = 2650 時間が必要である。つまり、本試作カラム 100 本分の分離装置があれば、約 1 日で 1 アール分の濁水を処理することが可能であることがわかった。カラム 1 本は外径約 3 cm なので、30 cm 平方の床面積に収まる。つまり、小型の冷蔵庫程度のスペースがあれば、1 アールの水田を 1 日で処理することが可能という試算結果となった。

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 6 件)

Song, C., Murata, K. and Suzaki, T. (2017) Intracellular symbiosis of algae with possible involvement of mitochondrial dynamics. *Scientific Repots*, 7: 1221 (DOI:10.1038/s41598-017-01331-0). (査読あり)

Sugiura, M., Yamanaka, M., Suzaki, T. and Harumoto, T. (2016) Rapid response to nutrient depletion on the expression of mating pheromone, gamone 1, in *Blepharisma japonicum*. *Jpn. J. Protozool.*, 49: 27-36. (doi.org/10.18980/jjprotozool.49.1-2_27) (査読あり)

Chen, L., Ma, Q. and Suzaki, T. (2016) Dielectric measurement of *Euglena gracilis* as a multi-parametric approach for non-invasive biomonitoring of aquatic environment. *Int. J. Environ. Agr. Res.*, 2: 59-64.

(<http://www.ijoeear.com/issue-November-2016.php>) (査読あり)

Ishida, H., Gobara, Y., Kobayashi, M. and Suzaki, T. (2016) Use of ionic liquid for scanning electron microscopy of protists. *Int. J. New Tech. Res.*, 2: 43-46. (www.ijntr.org/download_data/IJNTR02120026.pdf) (査読あり)

Song, C., Jung, H.S. and Suzaki, T. (2015) Recent Application of Electron Tomography in Biology. *J. Electr. Microsc. Technol. Med. Biol.* 29 (2): 97-98. (http://emtech.jp/journal/index_e.html) (査読あり)

Maekawa, S., Kobayashi, Y., Morita, M. and Suzaki, T. (2015) Tight binding of NAP-22 with acidic membrane lipids. *Neurosci Lett.* 600: 244-248. (doi.org/10.1016/j.neulet.2015.06.025) (査読あり)

[学会発表] (計 108 件)

洲崎 敏伸 (2016) 原生生物の環境センシングと運動 第 31 回日本微生物生態学会、2016.10. 22-25、横須賀市文化会館 (神奈川県)

中田 杏子、洲崎 敏伸 (2015) ミドリゾウリムシによる土壌結合性セシウムの取り込み機構. 第 48 回日本原生生物学会大会、2015. 11. 6-8、国立感染症研究所 (東京都)

中田 杏子、洲崎 敏伸 (2015) ミドリゾウリムシによる土壌結合性セシウムの取り込み. 第 86 回日本動物学会大会、2015. 9. 17-19、朱鷺メッセ (新潟市)

Nakata, K., Islam, M.D. S., Yoshimura, C. and Suzaki, T. (2015). Accumulation of cesium in lipid droplets of *Paramecium bursaria*. VII European Congress of Protistology, 2015. 9. 5-10, Seville (Spain).

中田 杏子、洲崎 敏伸 (2015) ミドリゾウ
リムシによる汚染土壌からのセシウム除
去. 第 39 回日本藻類学会大会、2015.3.21
~22、九州大学 (福岡市)

〔図書〕(計 2 件)

洲崎 敏伸 他、化学同人、原生生物フロ
ンティア その生物学と工学、2014 年、165
(1-16)

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称：セシウム汚染土壌粒子を含む土壌また
は水系の処理方法
発明者：洲崎敏伸・吉村知里
権利者：国立大学法人神戸大学
種類：特許
番号：6099124 号
取得年月日：2017 年 3 月 3 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-suzaki/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

洲崎 敏伸 (SUZAKI, Toshinobu)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：00187692

(2)研究分担者

吉村 知里 (YOSHIMURA, Chisato)
神戸大学・環境管理センター・助教
研究者番号：60362761