

## 9315 ホヤの金属濃縮機能を利用した海水からのレアメタル分取のための基礎研究

助成研究者:道端 齊(広島大学 理学部附属臨海実験所)

共同研究者:宇山 太郎(広島大学)

内山 純子(広島大学)

能勢 泰寛(広島大学)

海産の無脊椎動物であるホヤは、その血球細胞中にレアメタル（希少金属）の一種であるバナジウムを高選択的かつ高濃度に濃縮しており、その濃度は海水に含まれるバナジウム濃度の約1000万倍にあたる350mMに達し、生理的な濃縮係数としては他の生物に例を見ない。本研究は、ホヤが具有するこの特異な金属濃縮機能に着目し、その機能の解明と応用によって、海水からの希少金属の選択的分取への道を拓こうとするものである。

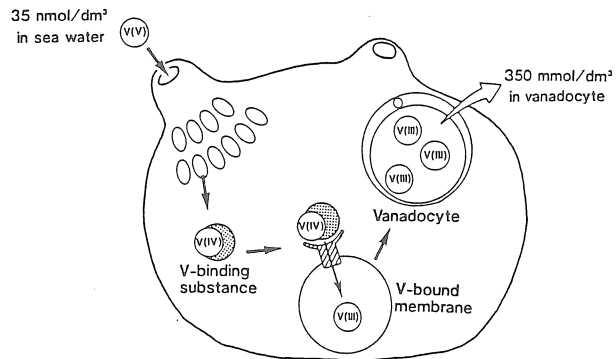
すでに、われわれは貴財団からの援助等により、ホヤの血球細胞のうちバナジウム濃縮細胞（バナドサイト）からバナジウム結合物質（バナドピン）を抽出し、その化学的性質を究めつ

つある。しかし、ホヤが海水からバナジウムを濃縮する際の経路を考えると、このバナドサイトは濃縮経路の末端に位置する。バナジウムがこの細胞に濃縮されるまでには、鰓を通った各種のイオンの中からバナジウムのみを選択してそれをバナドサイトの細胞膜まで運搬する物質（バナジウムトランスファー）、バナ

ドサイトの細胞膜上でそれを受け取る受容体（バナジウムリセプター）、そしてバナジウムイオンが貫通する膜チャネル（バナジウムチャネル）等が必要と思われる。

このように、海水中のバナジウムを高濃度かつ高選択的に濃縮するというホヤの特異な生理現象を解明するには、海水からバナドサイトまでの輸送経路を総合的に解析する必要がある。今回は、新たに行ったバナジウムトランスファーとバナジウムリセプターの抽出精製について報告したい。

Pathway of Vanadium Accumulation in Ascidians





## 9315 ホヤの金属濃縮機能を利用した海水からのレアメタル分取のための基礎研究

助成研究者:道端 齊(広島大学 理学部附属臨海実験所)

共同研究者:宇山 太郎(広島大学)

内山 純子(広島大学)

能勢 泰寛(広島大学)

**研究目的**

ホヤは脊椎動物に限りなく近い無脊椎動物であり、幼生の間だけ脊椎の原型といえる原索を有しているため原索動物あるいは脊索動物と言われている。今世紀始め、Henze(1911)はナポリの臨海実験所で得たホヤの一種にレアメタル(希少金属)の一種であるバナジウムが多量に濃縮されていることを見出した。それ以降、他の生物に例を見ないこの特異な現象は、動物生理学者のみならず生化学、分析化学、錯体化学といった広い分野の多くの研究者から注目されてきた。

最近のわれわれの研究により、ホヤの血球細胞中に含まれるバナジウムの濃度は海水に含まれるバナジウム濃度の約1000万倍にあたる350mMに達し、生理的な濃縮係数としては他の生物に例を見ないことが明らかとなった。

ホヤが高濃度に濃縮しているバナジウム(vanadium)は原子番号23の典型的な遷移元素で、地球上では20番目に多く地殻には広く分布している。しかし、バナジウムを高品位に含む褐鉛鉱(カルノー石)は限られた地域で少量しか産出せず、その大部分は磁鉄鉱などの鉱石スラグから分取されている。産出量の95%は南アフリカと旧ソ連邦に限られ、極端な偏在性を示す。

産業界では従来から、バナジウムを高抗張力鋼あるいは触媒として用いてきたが、最近ではさらに超伝導材料、半導体、磁性体、蛍光体あるいはファインセラミックスなど次世代の産業技術を支える材料の一部として使われるようになり、重要性を増している。これらのことから、バナジウムはクロムやマンガン等とともに国家備蓄を必要とするレアメタルに選ばれている。

海水に溶解しているバナジウムはきわめて希薄であり、35 nM(1.8ppb)にすぎない。しかし、地球の海水の容量である $1.37 \times 10^{21}$ リットルを乗ずると、全海水には2億4500万トンものバナジウムが含まれていることになる。これは陸上でのバナジウムの推定埋蔵量5600万トンの50倍に相当する。

ホヤはナトリウムを始めとして多くの共存イオンが溶解している海水中から、この希薄なバナジウムのみを高選択的かつ高濃度に濃縮している唯一の生物である。本研究は、このホヤが具有する特異な生理作用を解明することにより、海水

からレアメタルを効率よく分取するための基礎研究への道を拓くことを目的としている。

われわれは、バナジウムがホヤの血球細胞中で何らかの錯化合物を形成していると考え、血球細胞からバナジウム化合物の抽出を試みてきた。これまでにスジキレボヤ *Ascidia sydneiensis samea* の血球細胞を還元気流中でホモジナイズし、分子ふるいにかけて得られた分画のバナジウム含有量を放射化分析法で定量するという方法で、バナジウムと結合した物質を検出し、それをさらにイオン交換カラムにかけて分子量約1300Daのバナジウム結合物質(バナードピン)を得ることに成功している。最近、バナードピンはスジキレボヤ以外にもバナジウムを含有するほとんどのホヤに含まれることが明かとなり、これらのことから、バナードピンがホヤによるバナジウムの還元濃縮の重要なカギを握っていると考えられる。

一方、ホヤが海水からバナジウムを濃縮する際の経路を考えると、このバナードピンを含有しているバナドサイトは濃縮経路の末端に位置する。バナジウムがこの細胞に濃縮されるまでには、鰓を通った各種のイオンの中からバナジウムのみを選択してそれをバナドサイトの細胞膜まで運搬する物質(バナジウムトランスファー)、バナドサイトの細胞膜上でそれを受け取る受容体(バナジウムリセプター)、そしてバナジウムイオンが貫通する膜チャネル(バナジウムチャネル)等が必要と思われる(図1)。海水中のバナジウムを高濃度かつ高選択的に濃縮するというホヤの特異な生理現象を解明するには、海水からバナドサイトまでの輸送経路を総合的に解析する必要がある。今回は、新たに行ったバナジウムトランスファーとバナジウムリセプターの抽出精製について報告したい。

## 研究の方法

### ホヤの血球細胞の前処理

バナジウムを高濃度に濃縮しているホヤのうち、スジキレボヤ (*Ascidia sydneiensis samea*) とナツメボヤ (*Ascidia ahodori*) を青森市浅虫の東北大学理学部附属臨海実験所、岩手県大槌町の東京大学海洋研究所大槌臨海研究センターならびに当広島大学理学部附属臨海実験所で採集した。

空気酸化を防ぐためアルゴンガスの還元気流中で血液を集め、高速冷却遠心機で血球と血漿成分に分離し、それぞれを凍結して使用時まで保存した。

### バナジウムトランスファーの抽出

血漿成分を解凍してホモジナイズした後、10,000g、30分遠心して上清を得た。その上清2mlに50mMのHEPES緩衝液を同量加えて、pHを6.5に調整した。この溶液を

Sephacrose CL-6B(Pharmacia)を充填した $\phi 1.5 \times 50$ cmのカラムに添加してゲル濾過を行い、血漿中のバナジウム結合タンパク質（バナジウムトランスファー）を抽出・精製した。各分画に含まれるバナジウムの検出はフレイムレス原子吸光分光光度計によって行った。

#### バナジウムリセプターの抽出

次に、バナジウムリセプターの調整は図2のように行った。血球を50mMホウ酸緩衝液に懸濁して洗浄後、同緩衝液に0.2mM EDTAを加えて超音波処理を行った。その後激しく攪拌し250gで遠心し、この上清をさらに1,500gで遠心して膜成分を集めた。

得られた膜成分を2.3%の界面活性剤SDSを含むサンプルバッファーに懸濁し、室温で30分放置して膜を可溶化した。得られた溶液を10,000gで10分間遠心し、その上清をSDS電気泳動法にかけて膜タンパク質を分離した。

電気泳動後、ゲルを上端より3mm間隔で切り出し、ゲル片を坩堝に入れて灰化した。灰化した試料を0.1Mの硝酸に溶解し、そこに含まれるバナジウムをフレイムレス原子吸光分光光度計で同様に定量し、バナジウム結合膜タンパク質（バナジウムリセプター）が含まれるゲルを同定した。

### 研究結果

#### バナジウムトランスファーの抽出

図3にホヤの血漿から得られたバナジウムトランスファーのゲル濾過のパターンを示す。280nmの吸光を示すタンパク質成分は分画番号12番をピークとするフラクションが主なものであった。

このゲル濾過分画に含まれるバナジウム量を測定したところ、分画番号12番と分画番号17番をピークとする2つの山が得られた。後者の山にはタンパク質成分が検出されておらず、吸光波長の分析等からタンパク質成分と解離した無機バナジウムイオンが含まれていると考えられた。

一方、前者の山はバナジウム量とタンパク質成分とがほぼ一致することから、この分画がホヤの血漿に含まれるバナジウム結合タンパク質、いわゆるバナジウムトランスファーであると考えられる。

現在、このタンパク質をイオン交換、疎水性、さらに逆相カラムを装着したHPLCで精製を進めている。

#### バナジウムリセプターの抽出

図4はホヤの血球細胞の膜成分をSDS電気泳動にかけた時の分離のパターンを示

す。膜タンパク質が数本のバンドに分離し、中でも45 kDaのタンパク質が多く存在することが判明した。

これらの中からバナジウムと結合した膜タンパク質を検出するために、ゲル片をゲルの上端から3 mmごとに切り出して、含まれるバナジウム量を定量した結果を図4に示す。バナジウムを含む膜タンパク質は分子量の大きい順から、212 kDa、183 kDa、53 kDaそして36 kDaであった。

現在、この膜タンパク質をさらに詳細に検討している。

### 考察と今後の課題

これまでのわれわれの研究は、バナジウムが高濃度に濃縮されている血球細胞(バナドサイト)に着目し、そこに含まれるバナジウムの濃度と化学形さらに錯化合物の探索に焦点を定めていた。しかし、海水中のバナジウムを高濃度かつ高選択的に濃縮するというホヤの特異な生理現象を解明するには、海水からバナドサイトまでの輸送経路を総合的に解析する必要がある。

今回の試みは、ホヤが海水からバナジウムイオンを濃縮する際に、鰓を通して血漿中に入ってきたバナジウムイオンを選択的に結合し、血球細胞の膜に運搬するタンパク質(バナジウムトランスファー)と、バナドサイトの細胞膜上でそれを受け取る受容体(バナジウムリセプター)が確かに存在することを初めて明らかにしたものである。

今後は得られたそれぞれのタンパク質を精製し、アミノ酸の一次構造を明らかにし、バナジウムイオンと特異的に結合するアミノ酸配列あるいはその高次構造の決定するための研究を推進する必要がある。

### 最近の主な論文

- (1) Kanamori, K. and Michibata, H. (1994) Raman spectroscopic study of the vanadium and sulfate in blood cell homogenates of the ascidian, *Ascidia gemmata*. J. Mar. Biol. Ass. U.K., in press.
- (2) Wuchiyama, J. and Michibata, H. (1994) Classification, based on autonomous fluorescence, of the blood cells of several ascidians that contain high levels of vanadium. Acta Zool., in press.
- (3) Uyama, T., Moriyama, Y., Futai, M. and Michibata, H. (1994) Immunological detection of a vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in vanadocytes of the ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*. J. Exp. Zool., in press.
- (4) 道端 齊 (1994) 海水中のバナジウムを濃縮するホヤの謎。「現代版・元素物語」. 化学, 49(7), 印刷中.

- (5) 道端 齊 (1994) 原索動物ホヤによるバナジウムの還元濃縮. 生化学, 66, 495-509.
- (6) 道端 齊 (1994) ホヤのバナジウム濃縮機構—新しい生理化学をめざして—. 比較生理生化学. 11: 3-13.
- (7) 道端 齊 (1994) ホヤによる金属濃縮. バイオサイエンスとインダストリー, 52: 27-29.
- (8) Maeda, H., Kanamori, K., Michibata, H., Konno, T., Okamoto, K. and Hidaka, J. (1993) Preparation and properties of vanadium(III) complexes with L-cysteinate and D-penicillamine. Bull. Chem. Soc. Japan., 66: 790-796.
- (9) Michibata, H. (1993) The mechanism of accumulation of high levels of vanadium by ascidians from seawater: Biophysical approaches to a remarkable phenomenon. Adv. Biophys., 29: 105-133.
- (10) Maeda, H., Kanamori, K., Michibata, H., Konno, T., Okamoto, K. and Hidaka, J. (1993) Preparation and properties of vanadium(III) complexes with L-cysteinate and D-penicillamine. Bull. Chem. Soc. Japan, 66: 790-796.
- (11) Uyama, T., Uchiyama, J., Nishikata, T., Satoh, N. and Michibata, H. (1993) The accumulation of vanadium and manifestation of an antigen recognized by a monoclonal antibody specific to vanadocytes during embryogenesis in the vanadium-rich ascidian, Ascidia sydneiensis samea. J. Exp. Zool., 265: 29-34.
- (12) Hirata, J. and Michibata, H. (1992) Electron spin resonance spectrometry of vanadium ions in the blood cells of the ascidian, Ascidia gemmata. Zool. Sci., 9: 207-209.
- (13) Michibata, H., Uchiyama, J., Seki, Y., Numakunai, T. and Uyama, T. (1992) Accumulation of vanadium during embryogenesis in the vanadium-rich ascidian, Ascidia gemmata. Biol. Trace Element Res., 43: 219-223.
- (14) 道端 齊 (1992) 海産無脊椎動物ホヤによる遷移金属元素バナジウムの濃縮. 放射線科学. 35: 261-265.
- (15) 道端 齊 (1992) ホヤの特技: 遷移金属元素バナジウム濃縮の謎. 化学増刊 安元健編「化学で探る海洋生物の謎」 121: 167-165.
- (16) 道端 齊 (1992) 海洋資源とバイオテクノロジー—ホヤの驚くべき金属濃縮の能力とその応用. 朝日百科. 67: 222-223.

# Pathway of Vanadium Accumulation in Ascidians

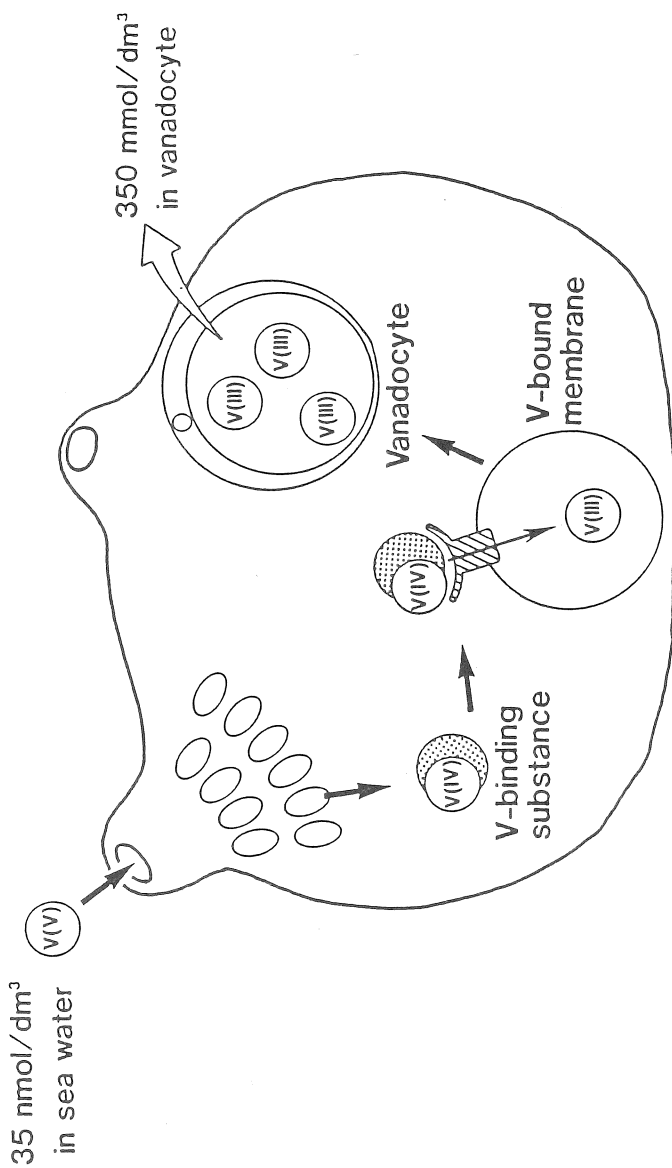


図1 ホヤによるバナジウムの濃縮経路と関与する結合物質



## EXPERIMENTAL PROCEDURE

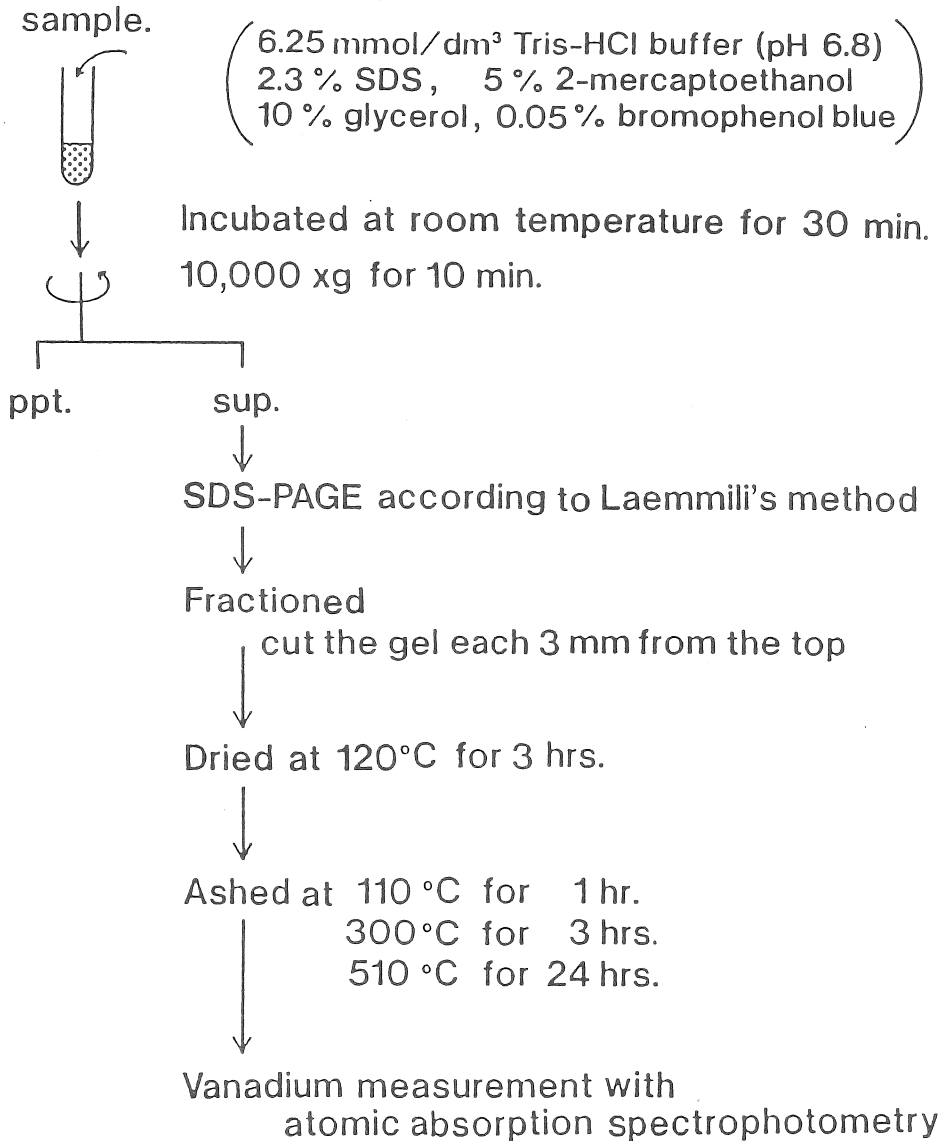


図2 ホヤの血漿中に含まれるバナジウム結合タンパク質（バナジウムトランスファー）の抽出過程

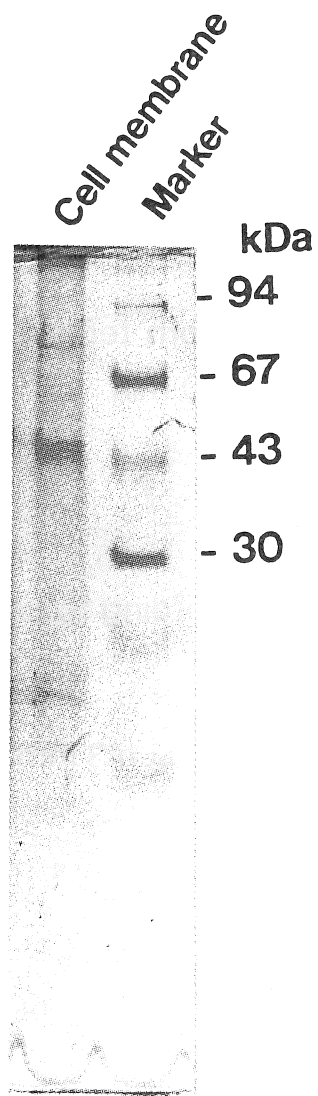


図3 ホヤの血球細胞の膜を可溶化した試料の電気泳動パターン

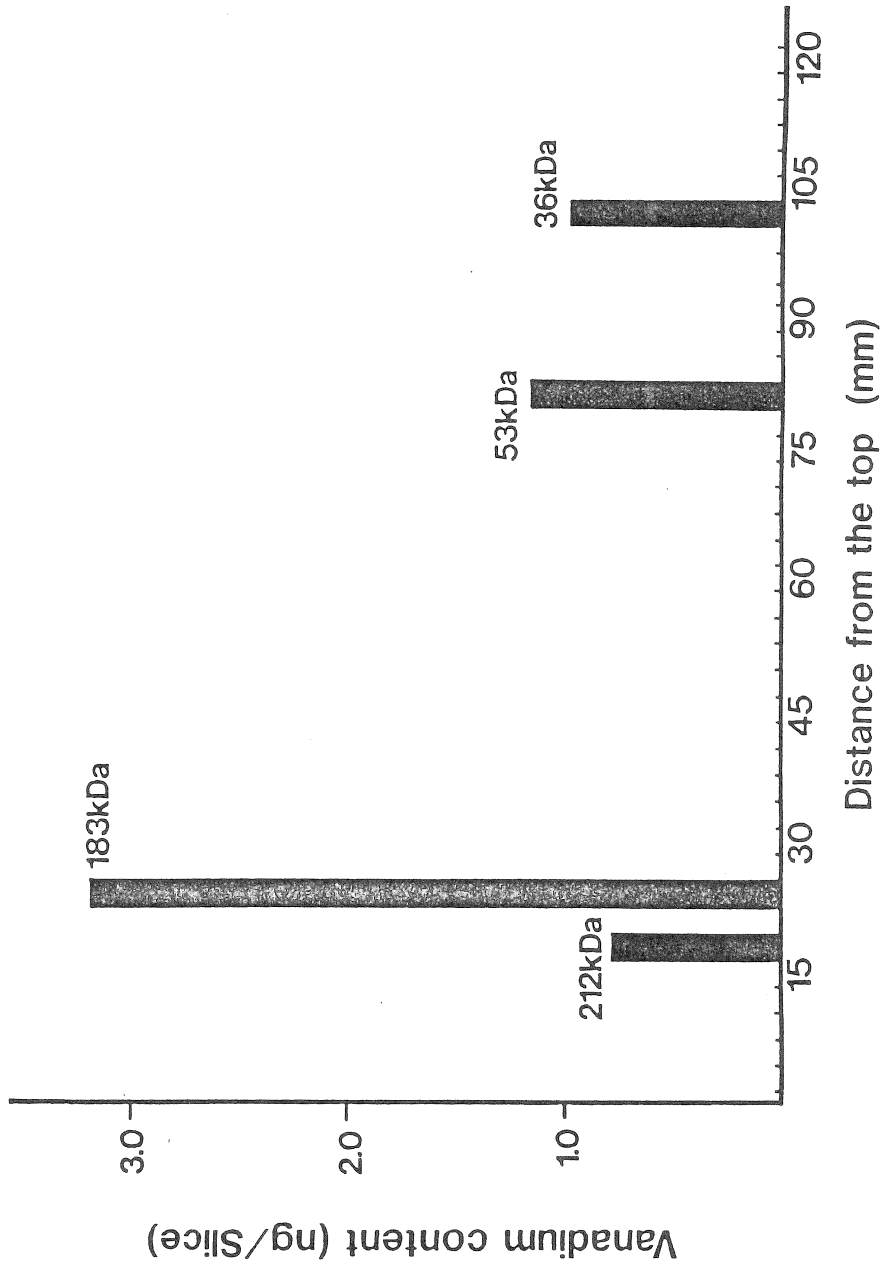


図4 ホヤの血球細胞膜に存在するバナジウム結合タンパク質

Foundational Study on Selective Extraction of the Rare Metal from Seawater, Based on the Mechanism of Accumulation of High Levels of Vanadium by Ascidians

Hitoshi Michibata, Taro Uyama, Junko Wuchiyama and Yasuhiro Nose, Mukaishima Marine Biological Laboratory, Faculty of Science, Hiroshima University, Mukaishima-cho 2445, Hiroshima 722, Japan

Summary

Ascidians (tunicates, known as sea squirts) are marine animals that live under water, either free in the sand or attached to stones, rocks, and other solid surfaces. Phylogenetically, ascidians are treated as a subphylum of the Chordate, between the vertebrates and the invertebrates.

High levels of vanadium were found by mere chance in the blood cells of an ascidian by the German chemist Friedrich Wolfgang Martin Henze in 1911. The remarkable phenomenon has attracted many investigators from various fields including physiology, biochemistry, biophysics, and the chemistry for natural products. Several years ago, we redetermined the content of the metals in several tissues of ascidians, employing a definitive method of neutron activation analysis and found out that the highest level of vanadium, 350mM, was contained in the blood cells of *Ascidia gemmata*, which concentration corresponds to 10,000,000 times the concentration in sea water.

Although we have extracted a vanadium-binding substance, named vanadobin, from the blood cells, it is necessary to make clear what kind of substance is bound with vanadium ions in the blood plasma, how the ions are transferred to the blood cells and whether a receptor for vanadium ions exists on cell membrane of the blood cells, in order to resolve the mechanism of accumulation of vanadium.

In the present experiments, we have succeeded to extract a vanadium-binding protein (vanadium-transfer) from blood plasma and vanadium-bound proteins (vanadium-receptors) from cell membranes of blood cells of ascidians. Purification of these proteins is in progress.