

9414 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)

共同研究者：森山 芳則 (広島大学 理学部)

宇山 太郎 (広島大学 理学部)

能勢 泰寛 (広島大学 理学部)

内山 純子 (広島大学 理学部)

神田 敏行 (広島大学 理学部)

研究目的

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1,000万倍にあたる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構に着目し、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。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、鰓を通った各種イオンの中からバナジウムイオンのみを選択してそれをバナドサイトの細胞膜にまで運搬する物質(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通過するための膜チャンネル(バナジウムチャンネル)等が必要と考えられる。

今回、バナドサイトの膜上でバナジウムを受け取る役割をすると考えられるバナジウムリセプターの抽出に成功し、その抗体の作製を行ったので、その結果を報告する。

バナジウムを高濃度に濃縮しているホヤの中から、比較的大量に採集できるスジキレボヤ(*Ascidia sydneiensis samea*)を用いた。集めた血球細胞を融解後、細胞膜断片を可溶化してタンパク質を電気泳動にかけ、バナジウムと結合しているタンパク質を検索した。電気泳動(SDS-PAGE)で得られた多くのタンパク質のバンドからバナジウムと結合したタンパク質を検索するため、ゲルを上端から5mm幅で切り出し、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(セイコー電子工業(株)製)で定量し、バナジウム結合タンパク質を得た。

続いて得られたバナジウム結合タンパク質をカラムクロマトグラフィで抽出精製するために、DEAE Sephacelを充填したカラムを用いた。得られた全てのフラクションに含まれるバナジウム量は同様にフレイムレス原子吸光分光光度計で測定した。さらにバナジウムを含有するフラクションを電気泳動にかけて精製した結果、血球細胞の膜に表在する15kDaのバナジウム結合タンパク質を得た。

さらに、このバナジウム結合タンパク質の抗血清を作製するため、カラムクロマトグラフィで得られたバナジウム結合タンパク質を抗原としてウサギに免疫し、抗体を得た。



## 9414 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）

共同研究者：森山 芳則（広島大学 理学部）

宇山 太郎（広島大学 理学部）

能勢 泰寛（広島大学 理学部）

内山 純子（広島大学 理学部）

神田 敏行（広島大学 理学部）

## 研究目的

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1,000万倍にあたる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構に着目し、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(バナードピン)を抽出し、その化学的性質を究めつつある。

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、鰓を通った各種イオンの中からバナジウムイオンのみを選択してそれをバナドサイトの細胞膜にまで運搬する物質(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通過するための膜チャンネル(バナジウムチャンネル)等が必要と考えられる。

今回、バナドサイトの膜上でバナジウムを受け取る役割をすると考えられるバナジウムリセプターの抽出に成功し、その抗体の作製を行ったので、その結果を報告する。

## 材料と方法

バナジウムを高濃度に濃縮しているホヤの中から、比較的大量に採集できるスジキレボヤ(*Ascidia sydneiensis samea*)を用いた。材料を岩手県上閉伊郡大槌町の東京大学海洋研究所大槌臨海研究センター、青森県青森市の東北大学理学部附属臨海実験所、ならびに岡山県邑久郡牛窓町の岡山大学理学部附属臨海実験所で採集し、直ちに血液から血球細胞を分離後凍結し、研究室に持ち帰った。

集めた血球細胞を融解後、細胞膜断片を可溶化してタンパク質を電気泳動にかけ、バナジウムと結合しているタンパク質を検索した。電気泳動(SDS-PAGE)で得られた多くのタンパク質のバンドからバナジウムと結合したタンパク質を検索するため、ゲルを上端から5mm幅で切り出し、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(セイコー電子工業(株)製)で定量した。

続いて得られたバナジウム結合タンパク質をカラムクロマトグラフィで抽出精製

するために、DEAE Sephacelを充填したカラムを用いた。得られた全てのフラクションに含まれるバナジウム量は同様にフレイムレス原子吸光分光光度計で測定した。さらにバナジウムを含有するフラクションを電気泳動にかけて精製した。

一方、バナジウム結合タンパク質の抗血清を作製するため、カラムクロマトグラフィで得られたバナジウム結合タンパク質を抗原としてウサギに免疫した。

## 結果と考察

### 電気泳動法によるバナジウム結合タンパク質の抽出

スジキレボヤの血球細胞は約10種類に区分される。今回は、その中のGiant cellsを除いた全ての細胞を用いた。軽い遠心によってGiant cellsを除き残りの血球細胞を可溶化し、SDS-PAGEにかけた結果を図1に示した。血球細胞には低分子から高分子に至る数多くのタンパク質が含まれており、それぞれがバンドを形成していた。これらの中からバナジウムと結合したタンパク質を探す目的で、ゲルを切り出して含まれるバナジウム量を測定したところ、図2のようになった。すなわち、分子量約100kDaのタンパク質と40kDa、さらに15kDa付近のタンパク質がバナジウムを含んだいわゆるバナジウム結合タンパク質であることが判明したのである。

### カラムクロマトグラフィによるバナジウム結合タンパク質の抽出

次に、カラムクロマトグラフィによるバナジウム結合タンパク質の抽出を試みた。図3に示す方法に従って、血球細胞を緩衝液に懸濁し凍結と融解を行うと、遠心上清に細胞膜表在性と思われるタンパク質が得られた。これを陰イオン交換クロマトグラフィのDEAE Sephacelのカラムにかけ、段階的に濃度を上げた塩化ナトリウム溶液を加えて溶出させたところ、非吸着部分であるフラクション9を中心に高い吸光度のピーク（ピーク1）が得られた。バナジウム含有量を測定したところ、このピークに高濃度のバナジウムが検出された。フラクション36以降にはカラムに吸着した無機バナジウムが溶出した（図4）。

このピーク1をSDS-PAGEにかけたところ、図5に見られるように15kDaに明瞭なタンパク質のバンドが得られた。これは先に電気泳動で得られたバナジウム結合タンパク質のうち、15kDaのものとほぼ一致した。このタンパク質が陰イオン交換樹脂に吸着しないことから、バナジウム結合タンパク質は中性あるいは塩基性タンパク質であると考えられる。

### バナジウム結合タンパク質の抗体の作製

続いて、陰イオン交換クロマトグラフィのDEAE Sephacelのカラムで得られたピーク1に含まれるバナジウム結合タンパク質を抗原とする抗体の作製を試みた。タンパク質量にして100  $\mu$ g分を抗原としてウサギに免疫した。免疫を3回繰り返したところ、免疫価が上昇し、図5に見られるような抗体が得られた。得られた抗体が実際にこの抗原タンパク質を認識しているか否かを確かめるために、イムノブロットアッセイを行ったところ、15kDa付近に明瞭なバンドを得ることができた。

## 今後の課題

今回の研究で、バナジウム結合タンパク質のうち、低分子のタンパク質を抽出・精製することに初めて成功した。また、そのタンパク質の抗体を作製することもできた。今後は、このタンパク質のアミノ酸配列を決定し、その立体構造を明らかにしていく必要がある。そのことによって、バナジウムが特異的に結合する部位を特定することが可能となる。また、さらに高分子のバナジウム結合タンパク質を抽出し、精製することも重要である。今回得られた低分子のバナジウム結合タンパク質は、その性質から細胞膜に表在するいわゆるバナジウムリセプターと考えられるが、バナジウムの運搬に関わるバナジウムトランスファーならびにバナジウムの細胞膜通過に関わるバナジウムチャンネルのタンパク質に相当するものが、高分子のバナジウム結合タンパク質である可能性があるからである。

また、今回このバナジウム結合タンパク質の抗体を得ることができた。この抗体を用いることで、数多くの血球細胞の中でどの細胞にバナジウム結合タンパク質が局在しているのか、あるいはこのタンパク質がホヤのどの組織で生成されるのかを明らかにすることができよう。

さらに、今回用いたスジキレボヤの血球細胞に含まれているcDNAライブラリーを作製中である。近い将来このライブラリーの中からバナジウム結合タンパク質をコードしている遺伝子をつり上げることが可能になると考えている。

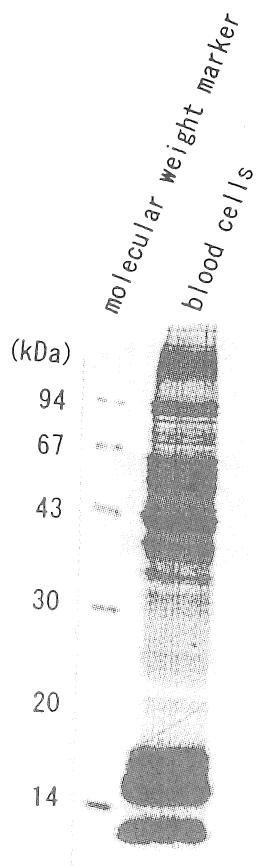


図1 スジキレボヤの血球細胞をホモジナイズして、SDS-PAGEにかけた時に得られたタンパク質のバンド。数多くのタンパク質が含まれていることが分かる。

# 各ゲル断片のバナジウム含有量

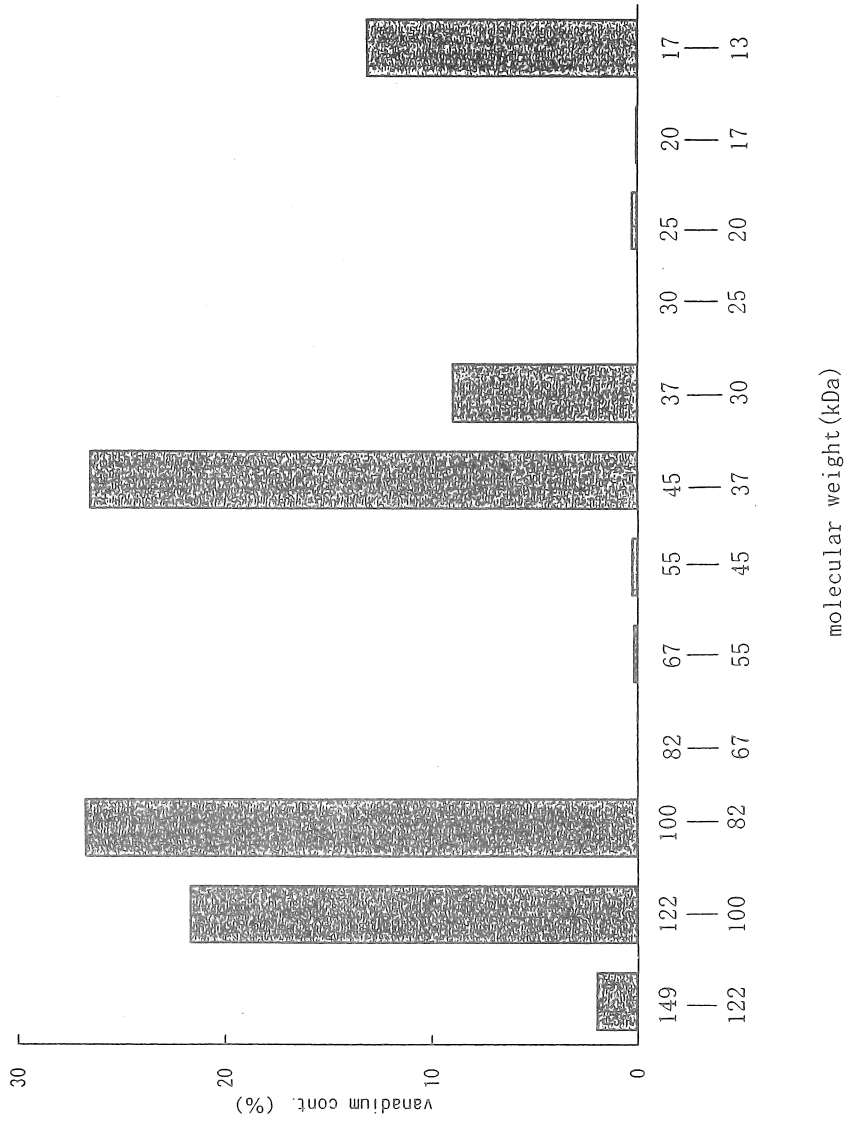


図2 SDS-PAGEのゲルを上端から下端にかけて5 mmの幅で切り出し、それぞれのゲル断片に含まれるバナジウム含有量をフレイムレス原子吸光分光法で定量した結果、約100 kDa、40 kDa、そして15 kDaのタンパク質にバナジウムが含まれていることが明らかとなった。

## 凍結融解によるタンパク質の抽出

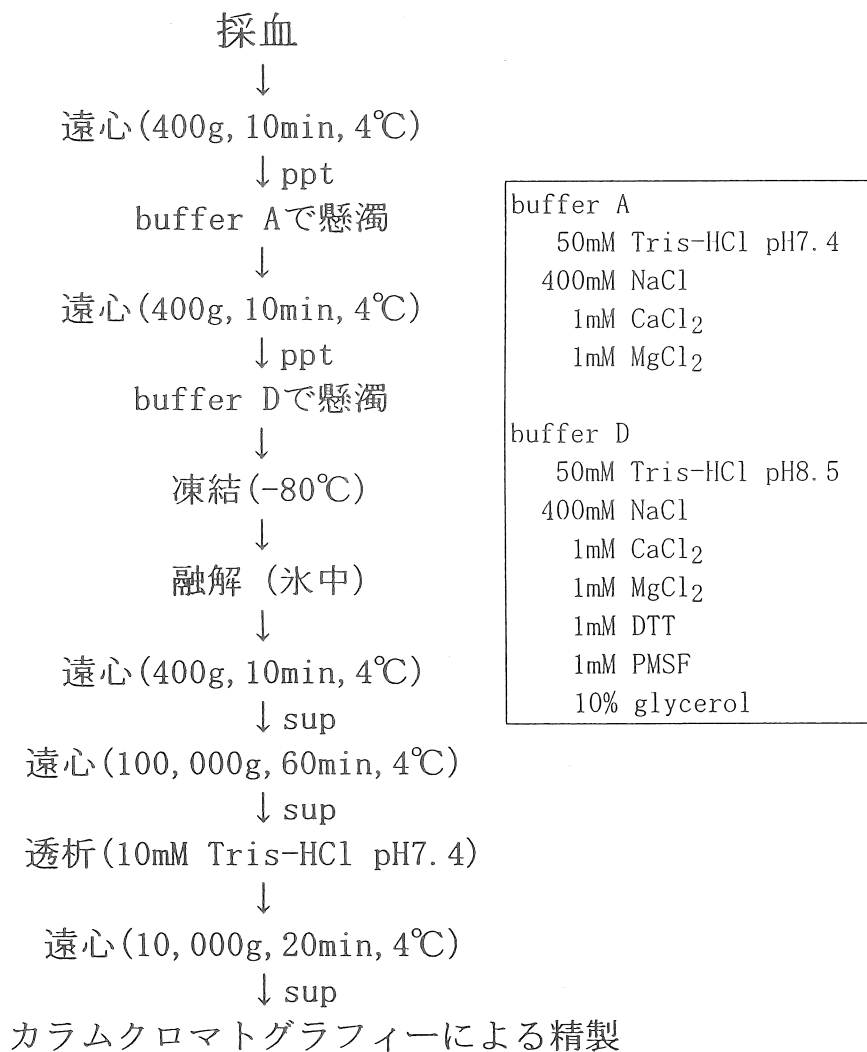


図3 血球細胞の膜表面に存在するバナジウム結合タンパク質を抽出する際の手法



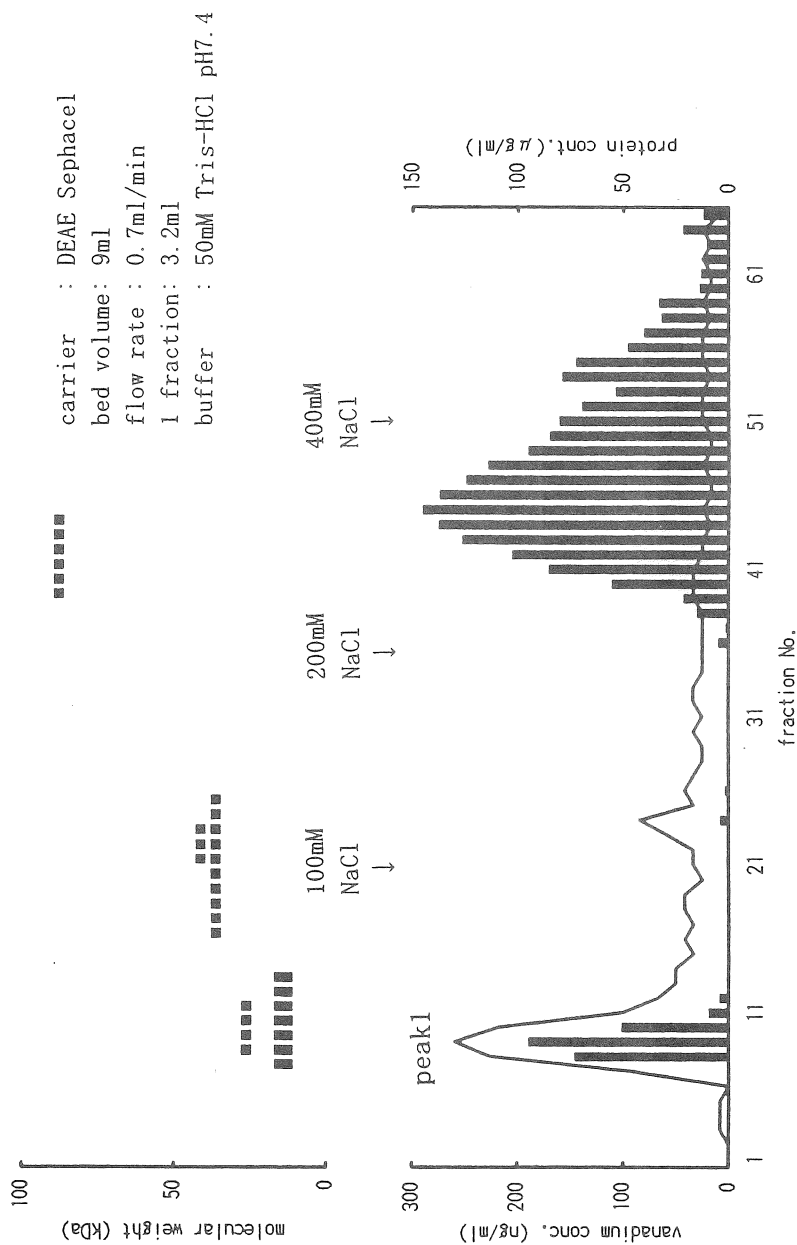


図4 陰イオン交換カラムによるバナジウム結合タンパク質の抽出  
 図3の手法で得られたタンパク質をDEAE Sephacelにかけたところ、非吸着部分であるピーク1にバナジウム結合タンパク質が抽出できた。200mMのNaClを流して溶出した分画には多くのバナジウムが抽出されたが、タンパク質とは結合していなかった。

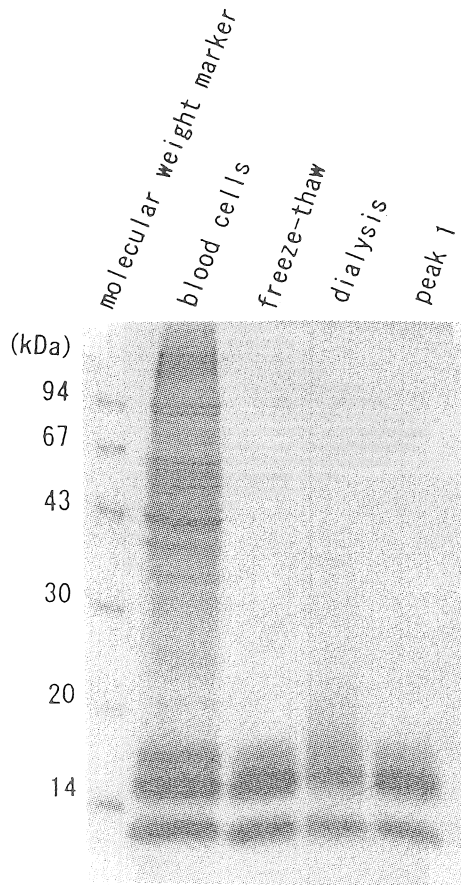


図5 陰イオン交換クロマトグラフィーで精製したピーク1のバナジウム結合タンパク質を、血球細胞のタンパク質、凍結融解した後のタンパク質、それを透析した際のタンパク質と比較するために、それぞれのタンパク質をSDS-PAGEにかけた結果を示す。この結果、バナジウム結合タンパク質の分子量は約15kDaであること、凍結融解しただけでかなり精製されることがわかった。



図6 得られたピーク1のバナジウム結合タンパク質を抗原としてウサギに免疫した結果、その抗体を得ることができた。得られた抗体でイムノプロットをすると血球細胞ならびにピーク1のタンパク質を選択的に認識していることが判明した。

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, Yoshinori Moriyama, Taro Uyama, Junko Wuchiyama, Toshiyuki Kanda and Yasuhiro Nose  
Mukaishima Marine Biological Laboratory, Faculty of Science,  
Hiroshima University, Mukaishima-cho 2445, Hiroshima 722, Japan

Summary

Ascidians that were marine invertebrate treated phylogenetically as a subphylum of the Chordate were found to contain high levels of vanadium ions in their blood cells (Henze, 1911). As the result of our redetermination by means of a neutron activation analysis, the highest level of vanadium was estimated to reach 350mM in the blood cells of *Ascidia gemmata*, corresponding to  $10^7$  times higher than that in seawater.

In the present experiments, we have succeeded to extract a vanadium-binding protein from the blood cells of *Ascidia sydneiensis samea*, a vanadium-rich ascidian belonging to the family of Ascidiidae. The blood collected by cardiac puncture was centrifuged at 400 xg to separate the blood cells from the serum. The obtained blood cells except giant cells were homogenized and submitted to SDS-PAGE. In order to determine vanadium-binding proteins, the each gel fraction cut at 5 mm length from the top to the bottom was analyzed its content of vanadium by a flameless atomic absorption spectrometry. Consequently, it was revealed that about 100 kDa, 40 kDa and 15 kDa proteins were vanadium-binding proteins.

Furthermore, anion-exchange chromatography, DEAE Sephacel, was used to extract a membrane-bound protein from the blood cells. The blood cells freezed at  $-80^{\circ}\text{C}$  and thawed were centrifuged at 100,000 xg for 60 min and the supernatant obtained was applied to the column and fractioned. Vanadium content in each fraction obtained was also determined. As the result, a 15 kDa protein was revealed to be a vanadium-binding protein bound with membranes of the blood cells.

To prepare the antibody against the 15 kDa protein, 1 ml solution containing 100  $\mu\text{g}$  of the protein was injected to rabbit intraperitoneally three times and the antibody was obtained. Immunoblot analysis revealed that the antibody obtained specifically recognized the antigen.