

## バナジウムを高濃度に濃縮するホヤの解析

技術センター 理学部等部門

研究実験技術班 山口 信雄

YAMAGUCHI Nobuo: Analysis of vanadium accumulation system of vanadium-rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*, Marine Biological Laboratory, Graduate School of Science, Hiroshima University

### 1. はじめに

理学研究科附属臨海実験所では、前所長の道端教授の赴任に伴い、1991年（平成3年）より海産原索動物ホヤのバナジウム濃縮に関する研究を行ってきた。私は技官（現技術員）として2000年（平成12年）に附属臨海実験所に配属された後、教育・研究支援と臨海実験所の維持管理の傍ら、ホヤの研究に強い関心を抱き、自らの研究を行った。本報告では、ホヤのバナジウム濃縮研究について得られた成果を報告したい。附属臨海実験所は遠隔地にあるため、業務内容や教育・研究の様子が必ずしも知られていないので、本報ではそれにも若干触れたい。

### 2. 施設の紹介

東広島キャンパスより東に約60km、尾道市の南東に位置する向島に理学研究科附属臨海実験所が設立されたのは1933年（昭和8年）のことである。現在、敷地22,931m<sup>2</sup>、教育研究棟2棟と宿泊棟1棟（延べ床面積1,556m<sup>2</sup>）を有し、教員と事務員の構成は教授1、助教授1、助手1、技術員1、事務補佐員1である。詳しくは臨海実験所のホームページ <http://labs.sci.hiroshima-u.ac.jp/homepage/marine/index.html>を参照されたい。実習や海洋生物の採集に用いる船舶は3.3トンのあびIIの他、小型ボートを3隻保有しているが、昨年台風で1隻が大破した。附属臨海実験所の目の前には海と砂浜が広がり、時折雉やコゲラが訪れる風光明媚な場所である。夏期は臨海実習の学生で活況を呈する。



図1 理学研究科附属臨海実験所外観

### 3. ホヤとバナジウムについて

ホヤ（海鞘）は海産の付着生物で、そのうちマボヤ（*Halocynthia roretzi*）は東北地方で食される珍味として知られる。ホヤ類は幼生期の尾部に脊索と呼ばれる器官を持つことから我々ヒトも属する脊索動物門に分類され、いわば脊椎動物に限りなく近い無脊椎動物とも言える。ちなみに、この脊索は脊椎の原型と表現されることもあるが、脊椎と脊索は同一の器官ではなく、ヒトの脊索は胎児期に消失する。

バナジウムは原子番号23番の遷移金属であり、主に特殊鋼の素材（包丁などの宣伝文句によく見受けられる）や化学触媒として利用されるほか、その化合物がインシュリン様の働き（血糖値の減少）を示すことでも知られる。このバナジウムは地殻には広く分布しているが、含有率の高いカルノー石は南アフリカや旧ソ連地域でしか産出されないため、国家備蓄を必要とする希少金属元素の一つとして選定されている。

このバナジウムは海水中に約35 nM（1.8 mg/t 海水）という非常に低い濃度で存在しているが、ホヤのうち管鰓類に分類される種は血球

中に最大で約350 mMの濃度にまで濃縮している。これは海水に対して約1,000万倍にまで達する値であり、生物濃縮の比率としては驚異的である。参考までに、ヒトでは海水比10倍程度の濃縮である。また、海水中で5価の状態が存在するバナジウムイオンは、その濃縮過程において4価を経て生体内では稀な3価にまで還元されている。

我々が実験に使用しているホヤによるバナジウムの濃縮は、十数種類あるホヤの血球のうち、指輪型の形をしたシグネットリング細胞で行われている。バナジウムを濃縮する細胞をバナドサイト (vanadocyte) と呼ぶことも多い。このバナドサイトは有核の細胞で総体積のほとんどを巨大な一つの液胞が占める。このために細胞質が指輪上の形になるが、その液胞にバナジウムが3価の状態では貯蔵されている。さらにその1.5倍の濃度の硫酸イオンもカウンターイオンとして保持している。液胞内のpHは酸性側に大きく傾いており、貯蔵されるバナジウムの量に比例して水素イオン濃度が上がる（つまりpHが下がる）傾向がある。最も低いpHは350 mMのバナジウムを濃縮するバナジウムボヤのpH 1.86である。

では、ホヤのバナジウムが一体何をしているのか。免疫や呼吸に関わる等、諸説あるが未だ解明されておらず、これからの研究で1つずつ証拠を積み重ねて行くことで明らかにしたいと考えている。また、これらの研究成果は我々ヒトも含めた生物全般におけるバナジウムの役割解明にも大きな役割を果たすものと信じている。

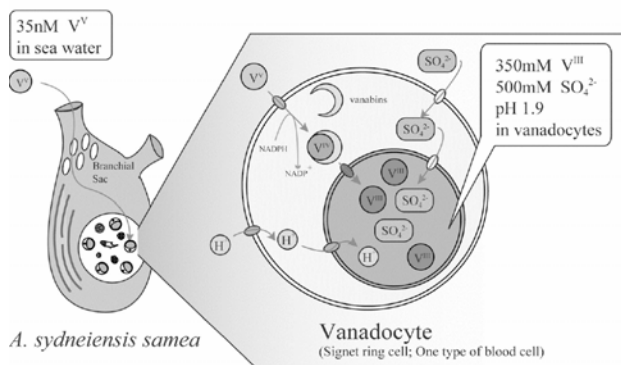


図2 海産原索動物ホヤのバナジウム濃縮モデル図

#### 4. EST解析とその目的

このホヤ特有の不思議な現象を解明するにあたって、我々は近年その濃縮メカニズムの解明に力を注いでいる。様々な方面からのアプローチが取られているが、私の担当はEST (Expressed Sequence Tag) 解析によるバナドサイトで発現している遺伝子の網羅的解析となった。これは目的の細胞や組織で発現している遺伝子をランダムに拾い上げてその配列を読む解析法で、得られた塩基配列情報は、その細胞で発現している遺伝子群を反映する。つまり、遺伝子の面からその細胞で行われている生命現象を俯瞰するための解析手法、と言い換えても良いと思う。

この手法を用いた理由は、①Vanabin (バナビン, vanadium binding protein) というバナジウムに結合する新規タンパク質の遺伝子のホモログを得る、②バナドサイトに存在している様々な金属関連遺伝子の検出、③今後の遺伝子のクローニングを加速する為の遺伝子情報のデータベース作製、である。まず①については、当時 Vanabin 遺伝子は2種類得られていたが、タンパク質レベルでの解析では最低でもあと1つは存在することが示唆されていた。しかしながらタンパク質の分離や解析が難しく、既知の遺伝子間に相同性がないために、遺伝子のクローニングが困難であった。EST解析はランダムに解析する性質の手法である為に、Vanabinをダイレクトにターゲットとするわけではないが、適切な検出方法を用いて解析を続けて行くうちに、その発見は可能であると考えた。②については、現在知られている金属関連遺伝子のうち、どのようなものが発現しているか、またそれぞれの金属がバナジウムに置き換わっていないか、置き換わっているとすればバナジウム結合タンパク質に共通の構造がないかを調べるのが目的となった。③に関しては、集めた遺伝子配列やそれから得られる情報をまとめ、データベース化することで、情報の管理を容易にするとともに検索ツールとしての活用を目指した。特にバナジウムというあまり知られていない金属に対して作用する遺伝子は、現在の既知遺伝子デ

データベースに収録されている遺伝子に対して相同性を示さない場合が十分に考えられるため、このデータベースを活用すれば遺伝子の単離にかかる時間が大幅に短縮される。

## 5. バナドサイトの分離

EST解析を行う前に、通常は遺伝子情報を読むための遺伝子プールを用意する必要がある。我々はそれをライブラリーと呼ぶが、例えば何かの哲学の文章を知りたい時に、図書館全部の本を片端から読むのは明らかに効率が悪い。せめて哲学の棚に絞って読む方が効率的である。我々の遺伝子ライブラリー作りも同じで、ホヤ全体の遺伝子全部のライブラリーを作るのではなく、バナジウムを濃縮している血球の、特にバナドサイトの遺伝子ライブラリーを作る必要がある。当時、全血球の遺伝子ライブラリーは存在していたため、まずはそこから仕事を始めたが、やはり根本的な効率化を目指すべく、バナドサイトを十数種類の血球の中からなるべく分離して、そこから遺伝子ライブラリーを作製することを試みた。なお、実験材料にはスジキレボヤ (*Ascidia sydneiensis samea*) を用いた。

ホヤの血球を分離するには主に密度勾配遠心法が用いられるが、これまでの論文にあった方法に改良を加え、溶媒の Ficoll を Percoll に変え、さらにその濃度を細かく設定することで最終的に純度 91.1% のバナドサイト画分を得ることができた。作業の途中で破裂したバナドサイトも不純物として見なしているため、実際にはもう少し純度が高いと考えている。この画分から EST 解析用の遺伝子プールを作製した。

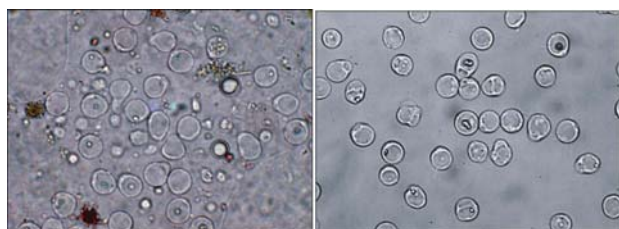


図3 ホヤ血球の顕微鏡写真  
左：全血球，右：精製したバナドサイト

## 6. EST データベース作製

遺伝子プールから大腸菌を利用して個々の遺伝子を分離・増殖させた後に塩基配列 (DNA 配列) を決定するが、この際の細かな操作や改良点に関しては、本題と直接関係しないので割愛させて頂く。得られた遺伝子の塩基配列そのままでは、ただの ACGT の 4 つのアルファベットの並びであり、ほとんど意味を成さない。これをアミノ酸と呼ばれる物質に置き換え、さらに既知のタンパク質とその類似性を調べることでようやく意味のあるデータになってくる。この時点でその遺伝子がどういった遺伝子と似ている (一般的に相同性がある、ホモロジーがあるという言い方をする) のかがわかるのである。無論、今まで登録されていない遺伝子については、相同性についての情報を得ることは出来ない。既知の遺伝子とホモロジーがある場合、似た遺伝子ごとにそれらをソートしてカテゴリーを作製する。このような情報に出現頻度や他の細かい情報を入れて、データベース化した。基本的には FileMaker というソフトウェアを用いて入力作業を行い、検索機能を付けることで、特定の遺伝子名や配列、性質等で検索できるようにした。得られた EST のうち 300 個は DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録しており、近日中にも 1,000 個を登録予定である。

## 7. 新規 Vanabin 遺伝子

1,000 の EST データベースから金属に関わる遺伝子を抜き出すと、93 個の遺伝子が得られた。この中には様々な興味深い遺伝子が含まれているが、個々の詳述は避けて、そのうち 1 種のみ、目的①でも触れた Vanabin に絞って紹介したいと思う。

これまでバナジウム結合タンパク質は Vanabin1 と Vanabin2 のみが知られていたが、EST 解析からこれらにホモロジーを示すものが 6 つ見つかった。そのうち 4 つは Vanabin2 と全く同じであったが、残る 2 つはそれぞれが独立した Vanabin と考えられた。これは遺伝子産物に含まれるシステインというアミノ酸が 18 個存在し、その並び方がよく似ている特徴から推測した。予想される分子としての大きさも

ほぼ一致し、その他の諸性質もよく似ていたが、これらは遺伝子と予想される産物の特徴が似ているだけであり、バナジウムと結合する機能を確認しなければ Vanabin の名を与えることはできない。そのため、これらの遺伝子産物のバナジウム結合能を確認する必要があった。

## 8. バナジウム結合能の確認

金属とタンパク質が結合していることを証明する手法は多々あるが、いずれにしても遺伝子情報である DNA のみを用いて行うことはできないため、これをタンパク質にして、かつ精製しなければならぬ。最近では様々なキットが市販されているため、基本的なことを押さえておけば人工的に別の生物のタンパク質を大腸菌に作らせることができる。ここでも詳細については割愛させて頂くが、水に不溶性のタンパク質を生産、解析することは一般的に大きな困難を伴う。不運にも今回の新規 Vanabin も片方がそれに該当し、困難を伴った。

実際にバナジウム結合能を調べる手法としては、金属キレートカラムというものをを用いた。これは金属イオンを固定することができる化学物質(イミノジ酢酸)を結合した樹脂に対して、目的の金属を固定するものであり、この場合は4価バナジウム ( $VO^{2+}$ ) を固定化した。ここに調べたいタンパク質を流すと、この金属に結合性をもつタンパク質は金属とイミノジ酢酸を介して樹脂に結合する。樹脂をきれいに洗浄した後、このイミノジ酢酸から金属を引きはがす処理を行うと、金属と一緒に結合性のタンパク質も一緒に得られる仕組みである。

実際に実験を行うと2つの Vanabin と似たタンパク質はバナジウムへの結合能を示した。この段階で晴れてこれらに Vanabin3, Vanabin4 の名を与えることができた。現在ではさらに、当時の所属学生が単離した VanabinP が加わり、5つの Vanabin が知られることとなった。

## 9. Vanabin の局在について

なぜ Vanabin という似たようなタンパク質が同一の生物に5つもあるのか。この疑問に対

して、我々はその答えを探求している。

最初のアプローチは、まずそれぞれの Vanabin が同じ所にあるのか、それとも細胞内でも存在する場所が違うのかを確かめることから始めている。この手法には一般的に調べたいタンパク質を特異的に認識する抗体を使うが、未知のタンパク質の場合は、抗体は市販されていない。自分でマウスを使って作ることになる。詳細については読む側の精神衛生を考慮して記述しない。今は岡山大学医学部の先生と共同で、自作の抗体を用いてそれぞれの vanabin の局在を明らかにするために、実験を行っている。

## 10. 今後の業務について

ひとまずは、これまで得られた Vanabin の局在解析に関するデータをまとめて論文として投稿する予定である。平成16年度ナメクジウオの研究の権威である安井金也教授が着任された。ナメクジウオの研究については、技術員として未だ手探りの状態である。新たな挑戦の機会を得たと思って努力していきたい。

## 謝辞

著者が附属臨海実験所に赴任して以来、常に熱心なご指導と叱咤激励を頂いた前臨海実験所所長の道端齊教授(現理学研究科生物科学専攻教授)に、心からの御礼を申し上げます。また、同研究室の植木龍也助教授の丁寧かつ適確なご指導に対しても深く御礼申し上げます。そして、その間に苦楽をともにした臨海実験所のスタッフ、学生の皆様にも感謝申し上げます。

この一連の研究成果を学術論文として発表し、博士(理学)号を授与されました。ご指導頂いた先生方に、この場を借りて御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Expressed sequence tag analysis of vanadocytes in a vanadium-rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*. Yamaguchi N., Kamino K., Ueki T., Michibata H. (2004) *Marine Biotechnology*, 6: 165-174.