

ユーグレナに含まれるタンパク質の分析、生育についての調査

1年 生物生産科学科 岩井 一真
1年 生物生産科学科 勝田 幹也
1年 アグリビジネス学科 加藤 博之
1年 アグリビジネス学科 佐藤 諒
指導教員 生物資源科学部 生物生産科学科
教授 鈴木 英治

目的

以前、「ミドリムシ大活躍！小さな生物が創る大きなビジネス 石川 憲二 B&T ビジネス」という本を読み、ユーグレナが世界の食料問題や、燃料問題の解決に役立つ可能性があるという事を学んだ。そこで、今回ユーグレナに含まれるタンパク質を分析してみようと考えた。

加えて、以前インターネットで、ユーグレナがセシウムを吸収する事を示唆するような記事を読んだ事があり、もし本当ならば放射能汚染の解決に繋がるのではないかと考えた。またアルミニウムは、人体に高濃度だと神経障害を引き起こすが、これをユーグレナに与えた時に、どれくらい影響があるか、構成するタンパク質に影響を及ぼすか興味があった。上記に記載した、セシウムとアルミニウムの影響を調べるために、生育条件についても調査しようと考えた。

今回の自主研究を通して、以下のような3つの実験を行った。

- ・有機培地ならびに無機培地での生育実験
- ・塩化セシウムと塩化アルミニウムがユーグレナの生育に及ぼす影響
- ・塩化セシウム培地ならびに塩化アルミニウム培地で生育した細胞抽出液(タンパク質)の電気泳動

材料と方法

ミドリムシ (*Euglena gracilis* NIES-48 株) は国立環境研究所から分与されたものを用いた。これを、以下に示す組成の培地を用いて 25°C で培養した。

- ・有機培地ならびに無機培地での生育実験

1. 以下の組成で条件の異なる培地を3つ(無機培地、有機培地、グルコース培地)を作成した。

基本組成は、以下の通りにした。

(mg/L) : NH₄NO₃ (500), KH₂PO₄ (540), MgSO₄·7H₂O (250), NaCl (100), CaCl₂·2H₂O (24), Fe NH₄ Citrate (3), H₃BO₃ (2.86), MnCl₂·4H₂O (1.81), ZnSO₄·7H₂O (0.222), Na₂MoO₄·2H₂O (0.39), CuSO₄·5H₂O (0.079), Co(NO₃)₂·6H₂O (0.05), thiamine-HCl (1×10⁻³), cyanocobalamin (1×10⁻⁴)

この培地を、無機培地とした。

この組成に、tryptone (600), yeast extract (400)を添加したものを有機培地とし、基本組成

に glucose (1500)を添加したものをグルコース培地とした。

2. 培地作製後、オートクレーブで滅菌処理を行った。
3. クリーンベンチ内で、ユーグレナ懸濁液を 400 μ l、培地に移し変えた。
4. 1 週間程、インキュベータで静置培養してから生育状態の比較と、確認を行った。

・塩化セシウムと塩化アルミニウムの生育に対する影響

塩化セシウム及び、塩化アルミニウムともに 3 M の溶液を作成し、有機培地に加えて 0 M、0.03M、0.1 M、0.3 M の培地を作製し、培養に用いた。

・塩化セシウム培地ならびに塩化アルミニウム培地で生育した細胞抽出液(タンパク質)の電気泳動
上記に記述した塩化セシウム 0 M、0.1 M の培地および、塩化アルミニウム 0 M、0.03 M の培養液 100 ml を遠心し、沈殿を懸濁しこれを用いて以下の操作を行い、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。

・細胞破碎

細胞懸濁液をフレンチプレスに 13.8 MPa の条件で 2 回通し、遠心後上清を抽出液として用いた。

・電気泳動 染色 脱色

ポリアクリルアミド電気泳動を行うため 2 枚のガラス板を組み合わせ、分離ゲル (6 mL 10 % アクリルアミド, pH 8.8) 濃縮ゲル (3 mL、5 % アクリルアミド, pH 6.8) の順に流しこみ重合した。細胞抽出液 10 μ L に 2 μ L の色素溶液を加え、ウェルにアプライした。そして、20–30 mA の条件で電気泳動を行った。泳動後、CCB 溶液で染色し、その後蒸留水で脱色した。

結果

・有機培地ならびに無機培地での生育実験

図 1 より、無機培地と有機培地では、有機培地の色が濃く、明瞭な差が出た。図 2 からグルコース培地の方が、無機培地と比較してわずかに濃くなっていた。図 3 より有機培地の方が、グルコース培地と比較して濃くなった。

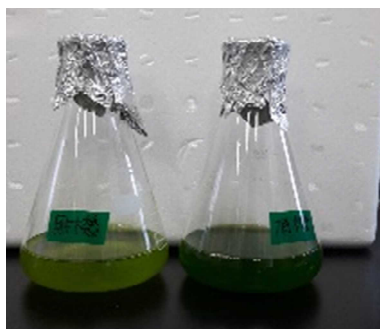


図 1 無機培地(左)、有機培地(右)での培養

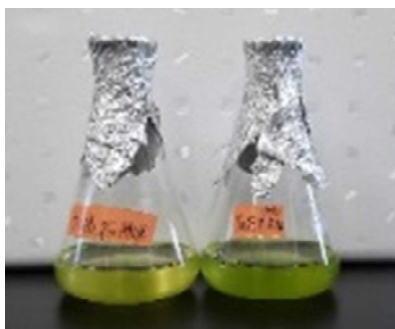


図 2 無機培地(左)、グルコース培地(右)での培養



図 3 有機培地(左)、グルコース培地(右)での培養

・塩化セシウムと塩化アルミニウムがユーグレナの生育に及ぼす影響

塩化セシウムの結果は、以下の表 1、塩化アルミニウムの結果は以下の表 2 に示した。

表 1 塩化セシウム培地での生育状態

0 M	0.03 M	0.1 M	0.3 M
○	○	△	×

(○:よく生育した、△:生育した、×:生育しなかった)

表 2 塩化アルミニウム培地での生育状態

0 M	0.03 M	0.1 M	0.3 M
○	△	×	×

・塩化セシウム培地ならびに塩化アルミニウム培地で生育した細胞抽出液(タンパク質)の電気泳動
図 4 および図 5 に示したような結果となった。



図 4 塩化セシウムがユーグレナのタンパク質組成に及ぼす影響

M はマーカー

1、3、5、7、9 は 0.1 M CsCl

2、4、6、8 は 0 M

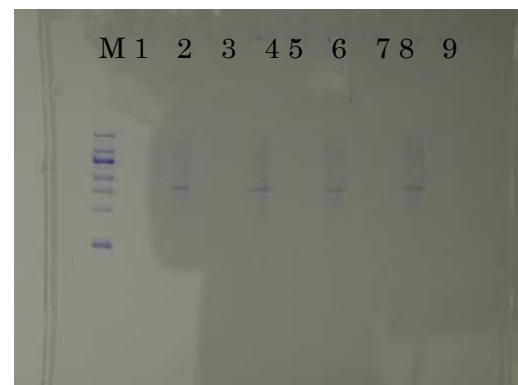


図 5 塩化アルミニウムがユーグレナのタンパク質組成に及ぼす影響

M はマーカー

1、3、5、7、9 は 0 M

2、4、6、8 は 0.03 M AlCl₃

・セシウム存在下で生育した細胞抽出液の電気泳動

結果は図 4 のようになった。濃いバンド(矢印)がある位置のタンパク質は濃く染色されたので、マーカーと比較してみると、このタンパク質の分子量は約 52 kDa であった。このタンパク質は光合成に関わる RuBisCO の大サブユニットと考えられる。また、0 M の試料では一番最後に分子量の軽いタンパク質が認識できるが、0.1 M の試料には見られなかった。

・アルミニウム存在下で生育した細胞抽出液の電気泳動

結果は図 5 のようになった。アルミニウムはセシウムよりミドリムシに対する毒性が強く、生育が悪かったため、十分な細胞量(タンパク質量)が得られなかった。培養、電気泳動を 2 度行ったが、薄い染色像しか得られなかった。

マーカーと比較してみると、濃いタンパク質の分子量は約 55 kDa であった。分子量の見積もりが若干異なるが、これも RuBisCO の大サブユニットと考えられる。0 M のアルミニウム条件では見えるが、アルミニウムが 0.03 M という濃度ではタンパク質が全く見えなかった。

考察

・有機培地ならびに無機培地での生育実験

図 1~3 より、無機培地<グルコース培地<有機培地の順に生育したことが分かった。ユーグレナは、植物プランクトンであるため、光合成を行うことで有機物を合成することができる。今回の実験では、インキュベータで、連続光照射条件下で静置していたので光合成が行われていたため、無機培地でもユーグレナが生育したのだと考えられる。無機培地と、有機培地の比較から光合成に加えて、有機物を取り込むことで生育しやすくなったのではないかと考える。また、有機培地と、グルコース培地の比較より、トリプトンと酵母エキスの方が、グルコースよりも生育に良い効果をもたらすということが分かった。

・塩化セシウムと塩化アルミニウムがユーグレナの生育に及ぼす影響

塩化セシウム培地と、塩化アルミニウム培地を比較したところ、塩化アルミニウム存在下では、塩化セシウムより生育が悪かった。この理由として以下のことを考察した。まず、セシウムは第 1 族に所属する原子である。そのため、ユーグレナがナトリウムと誤認して吸収してしまい塩ストレスが起きたのではないかと予想する。一方でアルミニウムは、生物が多量に摂取すると生存に、悪影響を及ぼす原子であるのであまり生育しなかったのではないかと考える。

・塩化セシウム培地ならびに塩化アルミニウム培地で生育した細胞抽出液(タンパク質)の電気泳動
セシウム存在下で特定のタンパク質が消失する事が見られたが、このタンパク質の実体に分かる
と興味深い。塩化アルミニウムについては、条件を再検討して培養を行う必要がある。

・セシウムの性質

セシウムは周期表で第 1 族、第 5 周期の典型元素である。アルカリ金属の分類で原子量は 132.9 である。常温で液体になる金属である。放射性セシウムが発する放射線のエネルギーは時間と共に減少し、約 30 年で半分となる。空気中で急速に酸化し、また湿った空気中では自然発火することもある。炎色反応は青紫色を示す。

・アルミニウムの性質

第 13 族第 3 周期の常温で固体である。原子量は、26.98 の元素である。人体へは摂取しても吸収される量は微量で、ほとんどはそのまま排出される。アルミニウムが体内でどのような役割を果たしているかは、まだよく分かっていないが、アルツハイマー病や、パーキンソン病などといった神経系に異常が出て病気の原因になるという意見がある。植物に対しては、有害なアルミニウムイオン (Al^{3+}) が根の伸長成長を阻害することが知られている。

まとめ

本自主研究を通して、ユーグレナに含まれるタンパク質や、有機物の有無、塩化セシウムと塩化アルミニウム添加時の生育状態の違いについて概要を知る事が出来た。今後、機会があれば、濃度を変更して、詳しく検証したり、他の元素の影響についても調べてみたいと考えている。