

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440170

研究課題名(和文)バナジウム濃縮関連遺伝子の機能破壊とバナジウム放出経路の研究

研究課題名(英文) Disruption of genes related to vanadium accumulation and the study of vanadium utilization pathway

研究代表者

植木 龍也 (Ueki, Tatsuya)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10274705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では微量金属イオンの代謝経路と生理学的意義の解明のために、バナジウムを高度に濃縮するホヤ類をモデル系として、人工酵素によるノックアウトホヤの作成実験とバナジウム濃縮経路の逆経路による生理作用の検証実験を行った。また当初計画をさらに深く掘り下げるためにメタゲノム解析とトランスクリプトーム解析も並行して進めた。バナジウム濃度の異なる3種のホヤの器官ごとのメタゲノム解析を行い、金属濃縮と相関する細菌群を見出した。また、バナジウム放出経路に関与する血球で高発現する新規バナジウム結合タンパク質およびバナジウムチャンネル候補遺伝子を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, using vanadium-accumulating ascidians as a model system, we performed gene knockout experiments using artificial nucleases and examination of the vanadium export pathway by reverse pathway of vanadium accumulation pathway. In addition, in order to examine more deeply on the molecular mechanism, we also performed metagenomic and transcriptomic analyses. We found the correlation between vanadium concentration and microbiome. We also found novel vanadium-binding proteins and vanadium channels that are expected to be involved in vanadium export pathway.

研究分野：分子生理学

キーワード：機能破壊 酵素 ホヤ 金属イオン 生体分子 メタゲノム トランスクリプトーム

した。ポジティブコントロールとして EGFP を発現する mRNA を同時に注入した。幼若個体まで発生させた後、一部の組織を取り PCR 法によって変異導入効率を確認した(F₀)。

確認後、成熟個体にまで発生させた。精子と卵を採取し、人工授精させて F₁ の作成を試みた。F₀ において生殖系列への変異導入に成功した場合、F₁ において全身で変異が起こったホモ変異体が得られると期待される(図 3)。

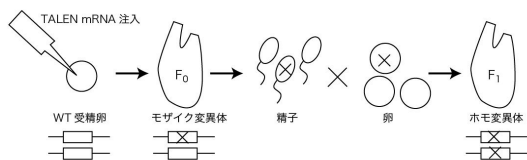
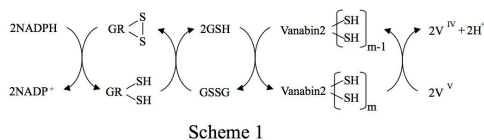


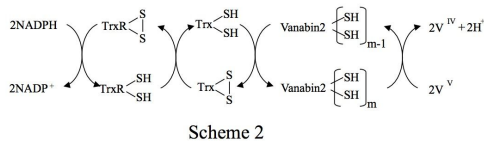
図 3. TALEN による変異導入実験手順。

(2) バナジウム酸化還元カスケード

大腸菌発現系を用いて、カタユウレイボヤの 5 種類の Vanabin 組換えタンパク質を合成する。陰イオン交換カラムで精製した後、マスペクトル解析によって分子量を確認した。合成した Vanabin を用いて、図 4 のカスケード(放出経路)が起こるか否かを *in vitro* 実験で確認した。NADP⁺ の産生・消費量を吸光度変化(A340)で定量し、四価バナジウムの消費量は ESR で測定した。



Scheme 1



Scheme 2

図 4. V^V還元カスケード。いずれも還元物質 NADPH を初発とする。Scheme 1 はグルタチオン経路、Scheme 2 はチオレドキシソ経路である。

(3) トランスクリプトーム解析

ホヤ血球から RNA を抽出し、逆転写の後、ライブラリーを作成した。次世代シーケンサー Misaq によってランダムに塩基配列を決定した。Trinity ソフトウェアによってアセンブルを行い、予想アミノ酸配列と発現頻度のデータベース化を行った。

(4) メタゲノム解析および細菌由来バナジウ

ム還元酵素の解析

バナジウム濃縮度の異なる 3 種のホヤから、腸内細菌叢および腸管壁・鰓籠に共生する細菌叢からメタ DNA を抽出し、16S アンプリコンのランダム塩基配列決定を行った。得られた配列を Misaq Reporter で分類し、バナジウム濃度と細菌叢の相関関係を解析した。

バナジウム耐性をもつ腸内細菌株を大量培養し、陰イオンカラムおよび HPLC カラムにかけた。膜画分からバナジウム還元酵素を同定し、精製した。NADPH および NADH を初発とする *in vitro* 再構築系により、バナジウム還元酵素活性を定量した。

4. 研究成果

(1) ホヤの遺伝子機能破壊実験

5 つの Vanabin はゲノム中の 8.4kb の範囲にタンデムに並んでいる。本研究では、発生過程において最も顕著な発現を示す Vanabin3 の単独ノックアウトと、Vanabin1~5 の全体のノックアウト個体を作成した。第一段階のキメラ個体では 30~50% 程度の頻度でノックアウトを導入できていることが分かった。キメラ個体では、成長およびバナジウム濃縮ならびに遺伝子発現様式には大きな変化は認められなかった。

キメラ個体の精子と野生型の卵を掛け合わせて、F₁ の作成を試みた。受精率は比較的高く、変異導入個体を高頻度で得ることが出来た。今後はホモ個体の性質を精査し、バナジウム濃縮の生理的意義と影響を明らかにする。

(2) バナジウム酸化還元カスケード

Vanabin の 9 対の SS 結合が、バナジウムの酸化還元にどのように関与するのかを検証した。その結果、酸化還元反応に関与する SS 結合は一つではなく複数あることを示唆する結果が得られた。

また Vanabin とチオレドキシソの SS 結合との間で電子伝達反応が起こるか否かを検証した。その結果、チオレドキシソと Vanabin との間で SS-SH 交換反応が起こりうることが示唆された。

逆反応については当初予想とは異なる結果が得られた。今後は(3)の結果も踏まえて構築した新たな経路の検証を進める。

(3) トランスクリプトーム解析

4 個体のホヤから個別に RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を行った。約 50GB の配列データを得た。各々アセンブルした後、個体差に留意しながら予想アミノ酸配列のデータベースを作成した。その結果、8520 個のユニークな遺伝子産物を同定した。

このデータベースから、バナジウムの酸化還元反応に関与すると思われる未同定の因子を探し、逆反応の解析系を再構築した。

また、新規バナジウム結合タンパク質およびバナジウム膜輸送体候補遺伝子を見出し、刺激応答性膜輸送チャンネルと酸化還元酵素を組み合わせた新たな放出経路のモデル化を行った。今後は実験的に経路の検証を行う。

(4) メタゲノム解析および細菌由来バナジウム還元酵素の解析

バナジウム濃度の異なる3種のホヤの器官ごとのメタゲノム解析を行い、金属濃縮度と相関する細菌群を見出した。今後はこれら細菌群の単離と、ホヤによるバナジウム濃縮との関係性を明らかにするための実験を行う。

また腸内細菌の細胞質画分および膜画分に由来するバナジウム還元酵素を見出した。今後はこれらの酵素を大量合成して特性を詳しく調べるとともに応用可能性を模索する。

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)

1. Romaidi, T. Ueki, Bioaccumulation of vanadium by vanadium-resistant bacteria isolated from the intestine of *Ascidia sydneiensis samea*, *Marine Biotechnology*, 印刷中, 2016 年. 査読あり.
2. N. Yamaguchi, M. Yoshinaga, K. Kamino, T. Ueki, Vanadium-binding ability of nucleoside diphosphate kinase from vanadium-rich fan worm, *Pseudopotamilla ocellata*. *Zoological Science*, 印刷中 2016 年. 査読あり.
3. T. Ueki, N. Yamaguchi, Y. Isago, H. Tanahashi, Vanadium accumulation in ascidians: A system overview, *Coordination Chemistry Reviews*, 301-302 巻, 2015 年, 300-308 頁. 査読あり DOI: 10.1016/j.ccr.2014.09.007
4. T. Ueki, M. Uwagaki, S. Yamamoto, H. Michibata, Participation of thioredoxin in the V(V)-reduction reaction by Vanabin2, *Biochimica Biophysica et Acta*, 1840 巻, 2014 年, 3238-3245 頁. 査読あり DOI 10.1016/j.bbagen.2014.07.023
5. S. Yamamoto, K. Matsuo, H. Michibata, T. Ueki, Role of cysteine residues in the V(V)-reductase activity of Vanabin2, *Inorganica Chimica Acta*, 420 巻, 2014 年, 47-52 頁. 査読あり. DOI: 10.1016/j.ica.2013.11.023
6. H. Kitayama, S. Yamamoto, H. Michibata, T. Ueki, Metal ion selectivity of the vanadium(V)-reductase Vanabin2. *Dalton Transactions*, 42 巻, 2013 年, 11921-11925 頁. 査読あり. DOI: 10.1039/c3dt50404b

[学会発表](計 15 件)

1. ロマイディ, 植木龍也, Vanadate reductase facilitated vanadium reduction in vanadium-resistant bacterial strain isolated from the intestine of *Ascidia sydneiensis samea*, 日本動物学会中国四国支部広島県例会, 2016 年 3 月 2 日, 東広島市.
2. 植木龍也, 藤江学, 佐藤矩行, スジキレボヤ血球のトランスクリプトーム解析, 日本動物学会第 86 回新潟大会, 2015 年 9 月 17 日~9 月 19 日, 新潟市.
3. 植木龍也, 藤江学, 佐藤矩行, ホヤ腸内細菌のメタゲノム解析, 平成 27 年度中四国動物生理シンポジウム, 2015 年 8 月 8 日~8 月 9 日, 米子市.
4. Romaidi, T. Ueki, Vanadium reduction by intestinal bacteria isolated from an ascidian, 平成 27 年度中四国動物生理シンポジウム, 2015 年 8 月 8 日~8 月 9 日, 米子市.
5. T. Ueki, T. Hino, Romaidi, Vanabins: A family of vanadium-binding proteins uniquely found in the genome of vanadium-rich ascidians, 8th International Tunicate Meeting (第 8 回国際ホヤミーティング), 2015 年 7 月 12 日~7 月 17 日, 青森市. 一般口演, 国際学会.
6. Romaidi, T. Ueki, Screening for vanadium-accumulating bacteria isolated from the intestine of *Ascidia sydneiensis samea*, 第 17 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 2015 年 5 月 30 日~5 月 31 日, 東京都港区.
7. 植木龍也, 藤江学, 佐藤矩行, ホヤ類における腸内細菌叢の比較メタゲノム解析, 第 17 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 2015 年 5 月 30 日~5 月 31 日, 東京都港区.
8. 砂後 義明, 佐久間 哲史, 白江-倉林 麻貴, 山本 卓, 植木 龍也, TALEN を用いたカタユレイボヤ Vanabin の機能解析, 日本動物学会中国四国支部大会, 2015 年 5 月 16 日~5 月 17 日, 松山市.
9. 植木龍也, Biotechnology and biomimetics: lessons from marine animals, 第 5 回グリーンテクノロジー会議, 2014 年 11 月 7 日~11 月 8 日, マラン(インドネシア). 招待講演, 国際学会.
10. 植木 龍也, Vanadium accumulation in ascidians: A overview as a system, 8 回国際バナジウム化学・生物学シンポジウム, 2014 年 6 月 26 日~7 月 2 日, パドヴァ(イタリア). 招待講演, 国際学会.
11. 植木龍也, 藤江学, 佐藤矩行, ナツメボヤ腸内細菌叢のメタゲノム解析, 第 16 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 2014 年 5 月 31 日~6 月 1 日, 津市.
12. ロマイディ, 植木龍也, Vanadium-resistant bacteria isolated from the intestine of *Ascidia sydneiensis samea* and their ability to accumulate vanadium ions, 第 16 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 2014 年 5 月 31 日~6 月 1 日, 津市.
13. 植木龍也, Vanabin2 の五価バナジウム還元能に影響を与える部位の探索, 日本動物学

会第 84 回岡山大会, 2013 年 9 月 26 日～9 月 28 日, 岡山市.

14. 植木龍也,カタユレイボヤ Vanabin の発現解析および機能破壊の試み, 中国四国動物生理シンポジウム, 2013 年 8 月 23 日～8 月 24 日, 竹原市.

15. 植木龍也, 最も高度にバナジウムを濃縮するバナジウムボヤの EST 解析による新規バナジウム結合タンパク質 Vanabin の同定, 第 14 回マリンバイオテクノロジー学会, 2013 年 6 月 1 日～6 月 2 日, 那覇市.

〔図書〕(計 2 件)

1. T. Ueki, Springer, Vanadium in the environment and its bioremediation (Book Section), Plants, Pollutants and Remediation, 2016 年, 13-26 頁.

2. 植木龍也, 山口信雄, 羊土社, 海水からの 1,000 万倍濃縮—ホヤの金属代謝(章著), 実験医学増刊, 2014 年, 123-129 頁.

〔その他〕

ホームページ

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/lmcp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

植木 龍也 (UEKI TATSUYA)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号 : 10274705