

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871092

研究課題名(和文)イオンビーム誘発突然変異育種技術によるセシウム濃縮菌の開発

研究課題名(英文)Development of cesium-accumulating mutant of radioresistant bacteria by ion beam breeding technology

研究代表者

佐藤 勝也(Satoh, Katsuya)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究副主幹

研究者番号：90370402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射線抵抗性細菌デインコッカス・ラジオデュランスを供試菌として、イオンビーム誘発突然変異育種技術によるセシウム濃縮菌の開発を実施した。ラジオデュランスにおいて、突然変異誘発効果の高い線量のイオンビームを照射し、突然変異株集団を作製した。放射性セシウム137によるセシウム蓄積能画像化技術を用いて、作製したラジオデュランスの突然変異集団から野生株よりもセシウム蓄積能の向上した変異株の選抜を行った。その結果、約3,000株の変異集団の中から、野生株より2倍以上濃縮する33株のセシウム濃縮菌候補株を選抜することに成功した。これらの候補株は、バイオレメディエーションの供試菌として、その利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted the development of high Cs-accumulating mutant from *Deinococcus radiodurans* using ion beam breeding technology. *D. radiodurans* were mutagenized with ion beams that were the highest mutant frequency observed ($1E-1$ to $1E-2$ of surviving-fraction). The imaging analysis using Cs-137 was performed to estimate the Cs-accumulating ability of the mutagenized cells. Candidates of Cs-accumulating mutant were screened on the basis of the luminescent intensity and the cell area as indicators of intracellular Cs level and cell growth, respectively. As a result, we obtained 33 candidates, whose Cs-accumulating abilities were over 2-fold higher than that of the wild-type, from the population of mutagenized cells (about 3,000). Although more detailed analysis regarding the Cs-accumulating ability and the sensitivity to gamma rays are needed, these candidates generated by ion beam breeding technology could be expected to use for bioremediation purpose.

研究分野：放射線微生物学

キーワード：微生物バイオレメディエーション技術 放射線抵抗性細菌 イオンビーム突然変異育種技術 放射性セシウム デインコッカス・ラジオデュランス 環境修復 環境保全 突然変異株

1. 研究開始当初の背景

(1) 微生物によるバイオレメディエーションは、微生物の機能を活用して環境に有害な金属や汚染物質を除去することで、汚染環境の浄化・修復を図る技術である。汚染環境の浄化技術として、微生物を活用したバイオレメディエーションは、物理的・化学的技術に比べ、環境負荷が小さいだけでなく、多様な汚染物質に対して適用可能であり、重要な技術として注目され、今後の利用拡大が期待されている。しかし、まだまだ微生物機能が低いという課題がある。そこで、資源確保や環境保全を踏まえた微生物の有効利用をさらに推進するためには、微生物の機能の向上が必要である。

(2) 微生物の有用特性を高度化する上で、遺伝子組換え技術を用いた育種も行われるようになってきているが、パブリックアクセプタンスの観点から、依然として遺伝子組換え生物の産業利用は困難な状況にある。そのため、遺伝子組換え技術に依存しない突然変異育種に立脚した有用な微生物資源の創成は、重要な課題である。植物育種で非常に成果を上げているイオンビームの利用は、微生物の突然変異育種においても、薬剤、紫外線やガンマ線など他の変異原よりも新しい形質や変異体の創成が期待される。

(3) 東日本大震災の影響による東京電力福島第一原子力発電所の事故によって、多量の放射性物質が大気中に飛散し、その一部が土壤等に降下することで放射能汚染が引き起こされている。したがって、環境中より放射性物質を回収・除去することは喫緊の課題である。環境中に飛散した主な放射性物質は放射性セシウムであり、特にセシウム 137 は半減期も約 30 年と長く、長期的な対処が必要である。放射性セシウムの吸収・蓄積に微生物バイオレメディエーション技術を利用した場合、放射線に耐性を有する放射線抵抗性細菌の利用が適している。

2. 研究の目的

環境を汚染する有害な金属を回収・除去する技術である微生物バイオレメディエーション技術を高度化し、効率的な環境保全に資することは、非常に重要である。そこで、本研究では、放射線抵抗性細菌である Deinococcus 属細菌の中からセシウム蓄積に適した微生物種を選定するとともに、セシウム蓄積能が向上した突然変異体を取得するために、イオンビーム突然変異育種によって、バイオレメディエーション技術の供試菌として有用な変異体を獲得することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) イオンビーム誘発突然変異育種技術への供試菌として、放射線抵抗性細菌である

Deinococcus 属細菌の中から、原子吸光分析技術を用いて菌体内のセシウム吸収量を指標として、セシウム濃縮に適した微生物種を選定した。

(2) Deinococcus 属細菌の効率的な突然変異誘発に向けたイオンビーム照射条件について、抗生物質に対する耐性獲得を指標とした突然変異株の出現頻度を測定し、最適な照射条件を検討した。

(3) イオンビーム照射により Deinococcus・ラジオデュランス (以下、ラジオデュランス) の突然変異集団を作製した。作製したラジオデュランスの突然変異集団から、放射性セシウム 137 によるセシウム蓄積能画像化技術を用いて、野生株よりもセシウム蓄積能の向上した変異株の選抜を試みた。

(4) セシウム蓄積に関連の示唆される生体高分子であるポリリン酸について、遺伝子工学的手法により、ラジオデュランスのポリリン酸生合成関連遺伝子群の破壊株及び過剰発現株を作製した。

(5) 作製したラジオデュランスのポリリン酸生合成関連遺伝子群の破壊株及び過剰発現株を用いて、菌体内のポリリン酸及びセシウム蓄積への影響について検証した。

(6) 作製したラジオデュランスのポリリン酸生合成関連遺伝子群の破壊株及び過剰発現株を用いて、ガンマ線耐性への影響について検証した。

4. 研究成果

(1) 非放射性セシウムを含む液体培地で 6 種の Deinococcus 属細菌 (ラジオデュランス、グランディス、プロテオリティカス、ラジブグナンス、ジオサーマリス及びマーレイ) と大腸菌を培養後、原子吸光分析技術を用いて菌体内のセシウム吸収量を測定したところ、Deinococcus 属細菌はいずれも大腸菌の 5 倍以上のセシウム蓄積能があり、その中でもラジオデュランス及びグランディスがセシウム蓄積に適しており、供試菌として選定した (図 1)。

(2) イオンビームは、異なる突然変異誘発効果を期待し、線質の異なる 5 種のイオンビーム (${}^4\text{He}^{2+}$ 、 ${}^{12}\text{C}^{6+}$ 、 ${}^{12}\text{C}^{5+}$ 、 ${}^{20}\text{Ne}^{8+}$ 及び ${}^{40}\text{Ar}^{13+}$) を照射し、生存率を測定すると共に抗生物質 (リファンピシン及びストレプトマイシン) に対する耐性獲得を指標とした突然変異株の出現頻度を測定した。抗生物質耐性変異株の出現頻度は、いずれのイオンビームに対しても、生存率がおおよそ 1~10% の範囲で最も高いことを明らかにした (図 2)。この結果から、この生存率の範囲となる放射線量が、突然変異株の創成には最も適していると考え

られ、イオンビーム照射による突然変異誘発に関する重要な知見が得られた。

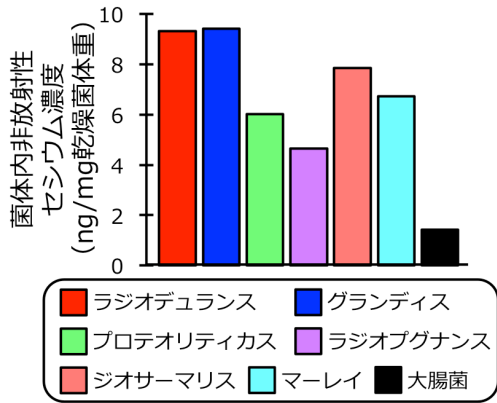


図1. デイノコッカス属細菌 (6種) と大腸菌 (対照) の菌体内非放射性セシウム濃度。

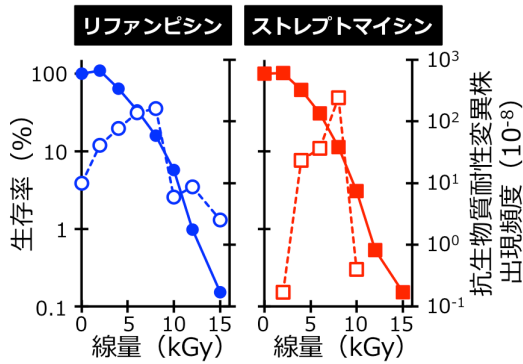


図2. 炭素イオンビームに対する生存率と抗生物質耐性変異株出現頻度。各シンボルは、生存率 (●及び■) 及び抗生物質耐性変異株の出現頻度 (○及び□) を示す。

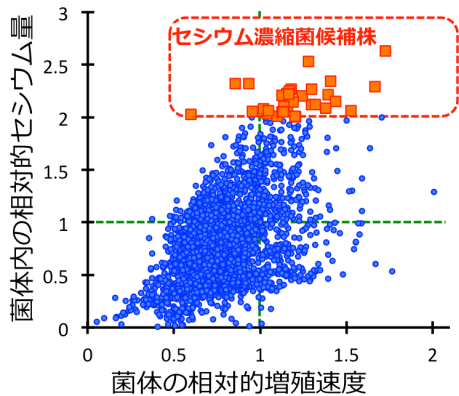


図3. ラジオデュランスの変異集団からのセシウム濃縮菌候補株の選抜。野生株の菌体内セシウム量及び増殖速度を1としたときの相対値を示す。

(3) 放射性セシウム 137 を含む固形培地で細菌を培養し、ガンマ線イメージングにより菌体内に蓄積されたセシウム 137 を検出するセシウム蓄積能画像化技術を開発した。イオンビーム照射により作出した突然変異集団 (約 3,000 株) について、セシウム蓄積能画像化技術を用いて、セシウム蓄積能の向上し

た変異株の選抜を行ったところ、野生株より2倍以上濃縮する33株のセシウム濃縮菌候補株を選抜することに成功した (図3)。

(4) ラジオデュランスのポリリン酸生合成に関連する *ppk* 及び *ppx* 遺伝子の破壊は、相同組換え機構を利用して、それぞれ抗生物質耐性遺伝子に挿げ替えるあるいは挿入することで作製した。また、*ppk* 遺伝子過剰発現株は、*ppk* 遺伝子のプロモーター領域を、強力な活性を示す *groEL* 遺伝子の最小プロモーター領域に挿げ替えることで作製した *ppk* 遺伝子の破壊株及び過剰発現株では、*ppk* 遺伝子領域がホモザイゴートであり完全な相同組換えが確認された。一方、*ppx* 遺伝子破壊株では、*ppx* 遺伝子領域はヘテロザイゴートであった。このことから、ラジオデュランスにおいて、*ppk* 遺伝子は生存に必須ではないが、*ppx* 遺伝子は生存に必須な遺伝子であると考えられた。

(5) 作製したラジオデュランスの遺伝子破壊株及び過剰発現株における菌体内ポリリン酸量を野生株と比較した。その結果、野生株と比較すると、*ppk* 遺伝子破壊株では同程度かやや少なく、*ppk* 遺伝子過剰発現株では若干多く、*ppx* 遺伝子破壊株では蓄積の増加が見られた (図4)。これより、ポリリン酸高蓄積に *ppx* 遺伝子が関与していることを明らかにした。さらに、菌体内セシウム量を野生株と比較したところ、菌体内ポリリン酸量と同様の結果を示した (図5)。このように、パラツキは大きい、ポリリン酸蓄積量の増加に伴い、セシウム蓄積量が増加する傾向にあることから、ポリリン酸蓄積とセシウム蓄積に正の相関がある可能性が示唆された。

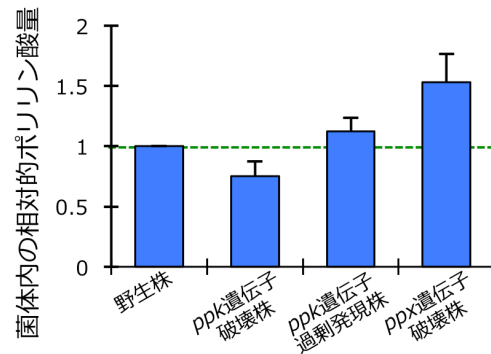


図4. 遺伝子破壊株及び過剰発現株における菌体内ポリリン酸量の比較。野生株の菌体内ポリリン酸量を1としたときの相対値を示す。

(6) 放射能汚染環境下での利用を考慮し、ガンマ線に対する耐性について、作製したラジオデュランスの遺伝子破壊株及び過剰発現株を用いて、野生株と比較した。その結果、*ppk* 遺伝子破壊株では低下、*ppk* 遺伝子過剰発現株ではやや増加、*ppx* 遺伝子破壊株では

同程度であった (図 6)。このことから、ポリリン酸蓄積量の減少によって、ガンマ線に対する生存率が低下する傾向がみられた。一方、ポリリン酸蓄積量の増加がガンマ線に対する生存率を必ずしも増強する傾向にはならなかった。

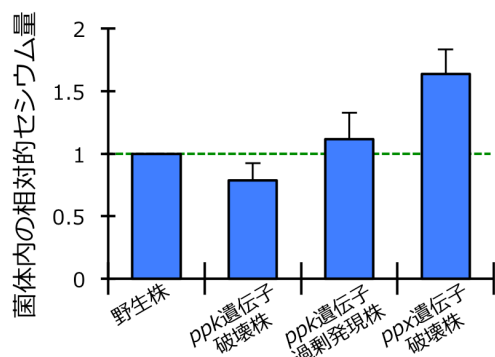


図5. 遺伝子破壊株及び過剰発現株における菌体内セシウム量の比較.

野生株の菌体内セシウム量を1としたときの相対値を示す。

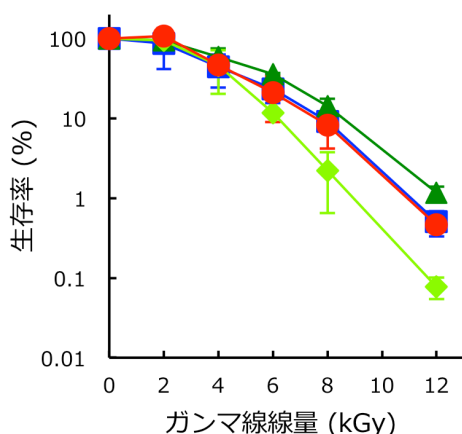


図6. 遺伝子破壊株及び過剰発現株におけるガンマ線耐性の比較.

各シンボルは、野生株 (■)、ppk遺伝子破壊株 (◆)、ppk遺伝子過剰発現株 (▲) 及びppk遺伝子破壊株 (●) を示す。

(7) 以上のように、ラジオデュランスを用いて、セシウム蓄積能向上の要因の一端を明らかにしセシウム濃縮菌開発に重要な知見を得られたと共に、有用なセシウム濃縮菌候補株を取得することができた。今後、これらの知見を基に、微生物バイオレメディエーションによる省労力かつ安価な放射性セシウム除染技術・減容化技術を確立することが課題である。

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 4 件)

① Katsuya Satoh, Ryoshiro Ueda, Yoshihiro Hase, Issay Narumi, Yutaka Oono, Development of cesium-accumulating bacteria by ion beam breeding technology, JAEA Takasaki Annual Report 2013, 査読無、2014-050、2015、117

② Ryoshiro Ueda, Katsuya Satoh, Hidenori Hayashi, Issay Narumi, Yutaka Oono, Molecular analysis of polyphosphate biosynthesis-related genes in *Deinococcus radiodurans*, JAEA Takasaki Annual Report 2013, 査読無、2014-050、2015、118

③ 鳴海 一成、佐藤 勝也、放射線抵抗性細菌を用いた基礎研究とその応用への展開、工業技術、査読無、2014、78-83

④ Katsuya Satoh, Takefumi Onodera, Kiyoko Takeda, Issay Narumi, Mutagenic effect of carbon ion beams in *Deinococcus radiodurans*, JAEA Takasaki Annual Report 2012, 査読無、2013-059、2014、110

[学会発表] (計 6 件)

① 佐藤 勝也、イオンビーム育種による産業微生物の高度化、前橋市産学官金連帯フェスタ 2014、2014年11月10日、前橋テルサ (群馬県・前橋市)

② 佐藤 勝也、上田 涼史郎、長谷 純宏、大野 豊、鳴海 一成、イオンビームを用いた放射線抵抗性細菌のセシウム濃縮向上変異株の作出、第15回極限環境生物学会年会、2014年11月1日~3日、今帰仁村コミュニティセンター (沖縄県・今帰仁村)

③ 上田 涼史郎、佐藤 勝也、林 秀謙、鳴海 一成、大野 豊、放射線抵抗性細菌におけるポリリン酸生産とセシウム蓄積、第15回極限環境生物学会年会、2014年11月1日~3日、今帰仁村コミュニティセンター (沖縄県・今帰仁村)

④ 佐藤 勝也、上田 涼史郎、長谷 純宏、大野 豊、鳴海 一成、イオンビーム育種技術によるセシウム濃縮菌の開発、第9回高崎量子応用研究シンポジウム、2014年10月9日~10日、高崎シティギャラリー (群馬県・高崎市)

⑤ 上田 涼史郎、林 秀謙、鳴海 一成、佐藤 勝也、大野 豊、放射線抵抗性細菌におけるポリリン酸生合成関連遺伝子の解析、第9回高崎量子応用研究シンポジウム、2014年10月9日~10日、高崎シティギャラリー (群馬県・高崎市)

- ⑥ 佐藤 勝也、小野寺 威文、武田 喜代子、
鳴海 一成、放射線抵抗性細菌における炭
素イオンビームの突然変異誘発効果、第 8
回高崎量子応用研究シンポジウム、2013
年 10 月 10 日～11 日、高崎シティギャラ
リー（群馬県・高崎市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.taka.jaea.go.jp/rab_div/grr/
index_j.html](http://www.taka.jaea.go.jp/rab_div/grr/index_j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 勝也 (SATO, Katsuya)

独立行政法人日本原子力研究開発機構
原子力科学研究部門 量子ビーム応用研
究センター・研究副主幹

研究者番号：90370402

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：