

平成21年 6月15日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19780244

研究課題名（和文） 好氣的条件下における好塩細菌のテクネチウム蓄積機構

研究課題名（英文） The accumulation of technetium under aerobic condition by halophilic bacteria.

研究代表者 藤本 賢 (FUJIMOTO KEN)

独立行政法人水産総合研究センター・中央水産研究所・海洋生産部・研究員

研究者番号：20371841

研究成果の概要：テクネチウムは過去の核実験や核燃料再処理施設から自然界に放出されてきた人工放射性核種で、一般に水溶性の高い化合物を形成する。そのためテクネチウムを水溶液から回収するためには嫌氣的条件や特殊な樹脂が必要とされてきた。本研究では好氣的な条件下でテクネチウムを菌体内に取り込む海洋細菌に着目し、遺伝子組み換え実験により、その蓄積に関わる遺伝子のいくつかを特定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	210,000	2,410,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境修復、応用微生物、バイオリアクター、テクネチウム

1. 研究開始当初の背景

本課題で対象とするテクネチウム-99（以下 Tc-99 とする；半減期； 2.1×10^5 年）は過去の核実験をはじめ、近年では使用済核燃料再処理過程から自然界に放出されている人工放射性核種である。実際にイギリスのアイリッシュ海に面する核燃料再処理施設から放出された Tc-99 が海流により運ばれ、スカンジナビア半島沿岸の海藻から検出された事例もある。日本では Tc-99 は青森県六ヶ所村に建設中の使用済核燃料再処理施設から、基準値以下の濃度であるが今後継続して海洋に放出されることがわかっていること

から、テクネチウムへの注目は年々高まりを見せている。Tc-99 は水溶液中で過テクネチウム酸イオン (Tc(VII)O_4^-) として安定して溶存し、微粒子に吸着することなく拡散する。一方、Tc-99 は還元されると不溶性の性質を示す。この性質を利用して水溶液から Tc-99 を回収する技術開発が試みられている。

Tc-99 を還元する方法として微生物の還元酵素を利用する手法が提案されている。これまでの報告では嫌氣的条件下で Tc-99 を還元し不溶化させる、硫黄還元細菌や好塩性細菌の存在が知られている。これらの微生物はいずれも嫌氣的条件下でしか Tc-99 を還元しないことから、還元反応させるための特殊な装

置、実験条件が必要である。

筆者は簡便な方法・条件で、しかも好気的条件下で Tc-99 を還元する微生物の探索を行ない、2004年に *Halomonas* sp. Tc-202 株の単離に成功している。本菌は Tc-99 を塗布した平板培地で培養するとコロニーに Tc-99 を蓄積する。Tc-99 を添加した液体培地により本菌を培養後、遠心分離で菌体を回収すると、添加した Tc-99 の 6 割が菌体画分に回収され、ペーパークロマトグラフィーの結果、回収された Tc-99 は Tc(IV) に還元されていることが判明した。このように好気的条件下で Tc-99 を還元する微生物は Tc-202 株が初めてであり、これらの結果を外国雑誌に報告している (**Aerobic removal of technetium by a marine Halomonas strain**, K. Fujimoto and T. Morita, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**(12):7922-7924, 2006.)。

2. 研究の目的

嫌気的な Tc-99 の還元にはヒドロゲナーゼが関与するとの報告があり、この反応は嫌気的条件下に限定され、さらに培地成分の他に電子供与体として水素を必要とする。また、この活性は銅イオンによって阻害を受けるとされている。一方、Tc-202 株による Tc-99 の還元では、培地成分以外に電子供与体を必要とせず、銅イオンにより阻害されないことから、既報のヒドロゲナーゼを介した反応とは異なるものと考えられる。Tc-202 株は好気的条件下で Tc-99 を還元し菌体内に回収できるという特徴があるが、嫌気的に Tc-99 を還元する細菌に比べ回収量が少ないという欠点がある。

そこで本課題では、Tc-202 株の好気的 Tc-99 還元に関わる酵素の同定および菌体への移行経路を解明することを目的とする。また、Tc-202 株の Tc-99 蓄積に関わる遺伝子を発現させた大腸菌を用いてそれらの諸性状を解明する。

3. 研究の方法

Tc-202 株による Tc-99 の還元および蓄積が 1 つのタンパク質より起こるものであるならば、発現クローニング法で目的の遺伝子を単離する方法が最も効率的である。しかしながらこの現象が複数のタンパク質を介して起こっている場合はこの方法は適当でない。そこで発現クローニングと平行して、Tc-202 株の染色体にトランスポゾンを導入することで Tc-99 蓄積能を失った変異株の作出を行なう。これにより Tc-202 株の Tc-99 還元酵

素遺伝子および Tc-99 の菌体内移行に関わる遺伝子を同定する。

(1) 発現クローニング法

Tc-202 株のゲノムを抽出し、制限酵素 *Mbo* I により限定分解した DNA 断片を発現ベクター (pBluescript SK) に組み込み遺伝子ライブラリーを作製する。これを大腸菌に導入し、抗生物質および Tc-99 を添加した平板培地で培養後、コロニーを濾紙に写し取る。濾紙上に移されたコロニーの放射能をイメージングアナライザーで解析し、Tc-99 を蓄積するコロニーを単離する。Tc-99 蓄積能を示すポジティブクローンのインサートを解析し、挿入されている塩基配列をデータベース (BLAST) 上で検索する。

(2) トランスポゾン導入変異株の作出

Tn5 トランスポゾンと薬剤耐性遺伝子を含むプラスミド (PANC-1 plus mini-Tn5, Biomedal 社) で形質転換した大腸菌をのドナーとして用い、レシピエントとなる Tc-202 株と共培養する。必要であれば、接合伝達効率を向上させるためにヘルパー株大腸菌を使用する。この時、平板培地の塩濃度を高く設定し培養温度を 15°C にすることで、Tc-202 株とドナーおよびヘルパー大腸菌とのセレクションが可能である。得られた変異株の Tc-99 蓄積形質の有無は上記 (1) に記述したスクリーニング方法と後述の液体培養方法で確認する。

変異株を得た後、トランスポゾン内の塩基配列をもとにプライマーを作製し、Tc-202 株の染色体のどこに変異が生じているかを確認する。その近傍の塩基配列をプローブとして用いて、Tc-202 株のゲノムからサザンハイブリダイゼーションで目的の遺伝子を単離する。

Tc-99 還元酵素が菌体外に放出されておらず、Tc-99 が一度菌体内に取り込まれた後、細胞内で還元されている可能性も考えられるため、菌体内への Tc-99 の移行機構についても変異体作製実験から検討する。

(3) 液体培養実験

PPES 改変培地にて前培養した Tc-202 株および変異株を、終濃度 50 Bq / mL になるように Tc-99 (Tc(VII)O₄⁻) を添加した PPES 改変培地 1 mL に接種した。24 ウェルのマルチプレート上で、15°C で 24 時間震盪培養した。培養後、遠心分離 (15,000 rpm X 5 分) により菌体と培地成分に分け、培地成分 1 mL を液体シンチレーションバイアルに分注し、液体シンチレーションカクテル 4 mL を加え液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

4. 研究成果

発現クローニングでは、Tc-202 株のゲノムを制限酵素 *Mbo*I により限定分解し、約 3 kbp - 5 kbp の DNA 断片を、*Bam*HI で切断後 BAP 処理した pBluescript SK とライゲーションさせ、遺伝子ライブラリーを構築した。この発現ベクターを用い大腸菌 DH-5 α を形質転換させ、ブルーホワイトスクリーニングにより形質転換体を選択した。Tc-99 を塗布した平板培地上に形質転換体を単離培養し、37°C で 24 時間培養後にコロニーをろ紙に写し取り、ろ紙上の放射活性をイメージングアナライザーで解析した。

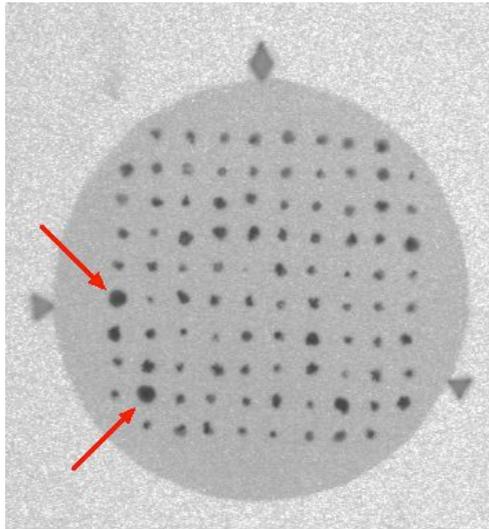


図 1, ろ紙の放射活性イメージング

遺伝子組み換えに用いた大腸菌 (DH-5 α) に DNA 断片を組み込まないベクターにより形質転換したもの、わずかに Tc-99 を取り込むことがわかった。そこでコロニーの放射活性を定量し、明らかにもとの大腸菌よりも高い蓄積能を示すコロニー (図 1、赤矢印) についてインサート配列を解析するとともに、液体培養による Tc-99 蓄積能を調べた。インサートには他種のバクテリア由来のレダクターゼや酸化還元酵素と類似性を示す塩基配列が確認されたが遺伝子の全長は含まれていなかった。平板培地でスクリーニングした変異体は、液体培養条件下でも弱い Tc-99 蓄積能を示すものの、Tc-202 株の約 3 割程度しか Tc-99 を培地中から回収できなかった。このことから Tc-202 株の Tc-99 還元に関わる遺伝子はほぼ特定できたと考えられるが、液体培養条件下で Tc-99 を菌体内への取り込みに関わる遺伝子は発現クローニングの結果から得ることはできなかった。

トランスポゾン導入による変異体作製では、Tc-202 株のエレクトロコンピテントセルを作製することが困難であったためエレクトロポレーション法で変異体を作製する

ことはできなかった。そこで、トランスポゾンと薬剤耐性遺伝子を含むプラスミドで形質転換した大腸菌と Tc-202 株を共培養する方法で変異体を作製した。当初、得られた変異 Tc-202 株の Tc-99 蓄積能を平板培地上で行なっていたが、Tc-202 株とともに大腸菌も生育してしまい、蓄積能の欠損株の特定が困難であった。そのためトランスポゾン導入実験に供する Tc-202 株に抗生物質耐性能を持たせるべく、抗生物質リファマイシン濃度を徐々に上昇させた培地を用いて Tc-202 株を継代培養した。これにより終濃度 20 μ g/mL のリファマイシン下でも良好に生育する抗生物質耐性株 Tc-202Rif+株を得た。この変異株に対してトランスポゾン配列を含むベクターで形質転換した大腸菌と共培養することによりトランスポゾンを導入させた。接合条件は、Tc-202Rif+株および大腸菌いずれも 1.0×10^8 cells/mL となるように調製し、5 mL の 10 mM MgSO $_4$ 溶液中で混合した後、0.45 μ m のメンブレンフィルターに通した。このメンブレンを抗生物質を含まない PPES 改変培地上で 15°C、24 -48 時間培養した。予備培養したメンブレンを裁断し、1 mL の PPES 改変培地中で接合体を懸濁させた。この懸濁液をリファマイシンと、トランスポゾン導入により耐性能を示す抗生物質の 2 種の抗生物質および 20 Bq/mL Tc-99 を含む PPES 改変培地を用い Tc-202Rif+株の最適培養温度 (15°C) で培養することで、トランスポゾンが導入された Tc-202Rif+株のみを生育させることができた。変異体へのトランスポゾン導入はトランスポゾンに特異的な 1 組のプライマーをもちいた PCR 法により確認した。また、同時に 16S rRNA 領域の塩基配列を解析し変異体が Tc-202 株由来であることも確認した。

平板培地に生育した変異株の Tc-99 蓄積能はもとの Tc-202Rif+株と変化はみられなかった。そこで変異株を単離し液体培養で Tc-99 蓄積能を調べたところ、複数の変異株において Tc-99 蓄積能がわずかに低下していることが確認されたが、顕著に Tc-99 蓄積能を失う変異株は得られなかった。したがって予定していたサザンハイブリダイゼーションによる遺伝子の特定には至っていない。

今回の実験で使用している Tc-99 の化学形態が TcO $_4^-$ であることから、Tc-202 株の Tc-99 菌体移行が硫酸イオン (SO $_4^-$) の輸送機構によるのではないかと、BROOKHEAVEN National Laboratory の A. J. Francis 博士から助言を受けた。そこで Tc-202 株の Tc-99 蓄積への硫酸イオンの影響を調べたところ、終濃度 50 mM までの硫酸イオンは Tc-202 株の Tc-99 蓄積に影響を与えないことが分かった。このことから本菌の Tc-99 蓄積機構はこれまでに推定されている経路とは異なることが示唆さ

れた。

これまでの結果から、今回目的としている Tc-202 株の Tc-99 蓄積に関わる遺伝子は単独ではなく複数の遺伝子が相互的に作用していることが示唆された。トランスポゾン導入実験では Tc-99 蓄積能を欠損した変異株の作出ができないことから、Tc-99 の蓄積に関わる遺伝子のいくつかは Tc-202 株にとって増殖に不可欠なものである可能性がある。今後は発現クローニングで得られた酵素遺伝子の全長を取得し、その諸性状を解明する。またそれらを過剰発現させた組み換え大腸菌を用いて、好氣的条件下で実際の海洋条件下においても Tc-99 を菌体内に取り込み、還元しているのかを検討する。

本課題により、好気性細菌の Tc-99 還元に関わる酵素が同定されつつあるが、菌体への移行機構は未だ解明されていない。しかしながら好氣的な条件で Tc-99 を還元する酵素の発見は、これまでは不可能と思われていた好氣的な Tc-99 回収技術開発に向けた新たな研究が進展することが予想される。また、Tc-202 株は海洋表面から単離されたことから、このような好気性細菌が自然界に放出された Tc-99 の挙動に影響を与えていることが十分考えられる。したがって本申請課題は、微生物の代謝機構を用いた環境修復技術開発の端緒となるだけでなく、海洋化学分野においては Tc-99 が微生物により海洋表面から深海へ輸送されている可能性を示唆するものとして意義のあるものとなる。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 藤本 賢 (FUJIMOTO KEN)
独立行政法人水産総合研究センター
中央水産研究所・海洋生産部・研究員
研究者番号：20371841