

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22264

研究課題名（和文）非栄養元素・毒性元素を代替利用する細胞の危機適応力の探究

研究課題名（英文）Elucidation of adaptability to substitute non-trophic elements of cells

研究代表者

魚住 信之（Uozumi, Nobuyuki）

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：40223515

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：細胞は必須元素をもちいて増殖するものの、非栄養元素を細胞が積極的に利用することはないと考えられてきた。ところが、申請者は大腸菌が、非栄養元素が主要の培地においても、通常の培地と同程度に増殖することを示した。細胞内に最も多く存在する陽イオンのKであるが、Naは微生物などにおいて必須元素ではない。しかし、一般に生存が難しい養分元素がない環境においてもNaなどの非栄養元素を利用して細胞が生存する可能性を本研究で検討した。大腸菌と光合成細菌の藍藻の生体膜で機能するNaを透過する輸送体を調べて、細胞増殖を支えるアルカリ金属元素の吸収と調節機構の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過酷な環境でも生存するために、原核生物は様々な元素を利用することができること明らかにした。本研究では、最適な好ましい環境にも生存範囲を拡張して生育する生命分子装置を明らかにした。このことは、地球誕生から進化の過程で細胞がしたたかな生存戦略を維持してきたことを示している。本研究で、基本生物である大腸菌と葉緑体の先祖である藍藻において非栄養元素を利用する仕組みが存在し、養分の確保や光合成の維持に本輸送体が寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Cells proliferate using essential elements, but that they do not actively use non-nutritional elements. However, bacteria can grow in a medium containing major non-nutritional elements to the same extent as in a normal medium. Potassium is the most abundant cation in cells, whereas Na is not required by microorganisms. This study elucidated the possibility that cells can survive in the absence of nutrient elements by using non-nutritive elements such as sodium, which does not generally support the growth of the microorganisms. We have studied the function and physiological role of Na-permeable transporters located in the cell membranes of *E. coli* and cyanobacteria which is photosynthetic bacteria under the harsh and low essential element, and the absorption and regulation mechanisms of alkali metal elements.

研究分野：生物化学

キーワード：非栄養元素 イオン輸送体 必須元素 ナトリウム 光合成生物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞が利用する元素は、栄養分として利用する必須元素と、生存に不必要な非栄養元素に大別される。非栄養元素を細胞が積極的に利用することはないと考えられてきた。ところが、申請者は大腸菌が、非栄養元素の Rb や Cs が主要である培地においても、通常の培地と同程度に増殖することを報告した(2017)。さらに、細胞毒性の強い Cs を利用する機構の一端も明らかとなった。すなわち、高濃度の Cs 培地では、Cs を取込む輸送体 (Kup) と培地内の極低濃度の K を吸収する高親和性 K 輸送体 (Kdp) の両輸送体が同時に活性化することが必要であった。この結果は、非栄養元素の Rb と Cs が細胞内の主要な必須元素 K に代わって利用されることを示しており細胞の適応能力が明らかになった。

2. 研究の目的

細胞が利用する元素は、栄養分として利用する必須元素と、生存に不必要な非栄養元素に大別される。非栄養元素を細胞が積極的に利用することはないと考えられてきた。ところが、申請者は大腸菌が、非栄養元素のルビジウムやセシウムが主要の培地においても、通常の培地と同程度に増殖することを示した。非栄養元素は細胞増殖に寄与しないと考えられてきた理由は、代替が可能となる限られた条件を見抜くことができなかつたことに起因すると推定する。この結果は、他の非栄養元素にも当てはまる可能性を示唆している。本研究で、非栄養元素を養分として細胞が増殖できる可能性を、微生物を中心に用いて検討する。非栄養元素のアルカリ金属の細胞増殖に焦点をあてる。細胞増殖を支える高親和性 K 輸送体の必要性の証明、新規非養分のアルカリ金属元素の取込み輸送体遺伝子の単離と同定、非栄養元素の細胞吸収と動態および仮説の検証を試みる。

3. 研究の方法

Na の排出輸送体遺伝子の変異株 (nhaA, nhaB, nhaC, ybdG 変異株) を P1 transduction by *E. coli* PCR による相同的組み換え法によって作成した。単独遺伝子の発現プラスミド (大腸菌全遺伝子の ASKA クローン) を変異株に導入し、0.1-100 mM 濃度の Na と Li を含有する培地で生育する菌を単離する。申請者が構築した測定方法を中心に遂行した。イオン輸送体の機能測定と細胞内元素測定：研究代表者の研究室で構築している電気生理学的測定、大腸菌の反転膜小胞を用いた輸送活性の蛍光測定と細胞内の元素濃度を調べた。

4. 研究成果

大腸菌に 4 種類の K 輸送体 Kup, Kdp, TrkG, TrkH が存在する。この 4 種類の遺伝子変異体を R1 トランスダクション及び PCR を用いた相同的組換え法によって四重変異株の作成を行った。途中、変異導入ができない場合が生じたことから遺伝子の変異する順序を代えることにより多重変異株の作成を行った。この四重変異株を完成したのち、野生株と比較したところ、高い K 要求性を確認した。この K 輸送活性バックグラウンド活性の本変異株に各輸送体を導入し、輸送活性を確認した。次に、Li と Na などの他の陽イオン輸送活性を測定した。この結果、TrkG と TrkH において他の輸送体よりも高いナトリウム輸送活性を見いだした。一方、Li の透過性は TrkG と TrkH で検出されなかった。さらに TrkG と TrkH を比較したところ TrkH の輸送活性は TrkG に比べて非常に高いことが分かった。また、TrkG は Na 依存的イオン輸送活性を持つことを明らかにした。また、TrkH の K 輸送活性は TrkG よりも大きく、Kdp に近いほどの高親和性を示した。Na 輸送活性を詳細に検討するために大腸菌が Na を排出する輸送体の遺伝子の多重変異株の作製を上記と同様に行った。三重変異株を作成し、Na 輸送活性および Na 感受性を測定する菌として利用できる。大腸菌と光合成微生物の藍藻から非栄養元素の輸送体を探索して、Na などの非栄養源を細胞は輸送して、通常では使用しないと考えられている Na などの元素を利用する可能性を検証することを目的に研究を行った。大腸菌の K 輸送体の多重変異株および Na 輸送体の多重変異株を作成してその性質を調べた。TrkG が Na を栄養元素として利用する可能性が高いことを示すため、TrkG を導入した大腸菌を様々な陽イオンの濃度の培地で生育させる実験を行った。しかし、Na 培地でよりよい増殖は認められなかった。TrkG と TrkH は相同性のあるホモログでありながら、Na 依存性に関する差異があることから、両者のキメラタンパク質を作成して検討を行った。様々なキメラタンパク質を作成したが、輸送活性を消失するキメラタンパク質しか得られなかった。TrkH は TrkG よりも大きな輸送活性を示すことから、タンパク質安定性または、膜への挿入度合いを検討するために、N 末端に付随する膜輸送には関係ないと考えられる 2 回膜貫通領域を入れ替えたキメラを作成した。入れ替えたことによって、大きな輸送活性への違いは認められなかったことから、本体の構造に輸送機能を決める箇所があることが分かった。

藍藻の Na 排出系を明らかにするために 6 種類の Na/H アンチポーター遺伝子の変異株を作成した。その増殖曲線について検討したところ、いくつかの変異株では Na 要求性を示した。しかし、野生株でも Na 要求性を示すことが新たに明らかになったことから、藍藻は強い Na を栄養源に用いることが分かった。作成した変異株の Na 要求性を野生株と比較して 6 種類の輸送体変異株の中から Na 要求性に関与する変異株を見いだした。藍藻は Na に耐性を示すだけでなく、ストレス環境では Na を要求する。培地の検討により、Na を要求する環境を見いだした。この環境で、藍藻の Na/H アンチポーター遺伝子変異株を用いた増殖試験を行った。2 つの変異株に

において、Na の少ない培地で増殖が見られなくなったことから、Na/H アンチポーターが Na を用いて、栄養源として利用していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Saito Shunya, Uozumi Nobuyuki | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Calcium-Regulated Phosphorylation Systems Controlling Uptake and Balance of Plant Nutrients | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science | 6. 最初と最後の頁 1-11 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.00044 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ishikawa Ko, Chubachi Chihiro, Tochigi Saeko, Hoshi Naomi, Kojima Seiji, Hyodo Mamoru, Hayakawa Yoshihiro, Furuta Tadaomi, Kera Kota, Uozumi Nobuyuki | 4. 巻 166 |
| 2. 論文標題 Functional characterization of multiple PAS domain-containing diguanylate cyclases in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology | 6. 最初と最後の頁 659 ~ 668 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mic.0.000929 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Tsuji Masaru, Tanudjaja Ellen, Uozumi Nobuyuki | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Diverse Physiological Functions of Cation Proton Antiporters across Bacteria and Plant Cells | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 4566 ~ 4566 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21124566 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Uehara Chihiro, Takeda Kota, Ibuki Tatsuki, Furuta Tadaomi, Hoshi Naomi, Tanudjaja Ellen, Uozumi Nobuyuki | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Analysis of Arabidopsis TPK2 and KC03 reveals structural properties required for K ⁺ channel function | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Channels | 6. 最初と最後の頁 336 ~ 346 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19336950.2020.1825894 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Kera Kota, Yoshizawa Yuichiro, Shigehara Takehiro, Nagayama Tatsuya, Tsujii Masaru, Tochigi Saeko, Uozumi Nobuyuki | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Hik36/Hik43 and Rre6 act as a two-component regulatory system to control cell aggregation in Synechocystis sp. PCC6803 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1-13 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76264-2 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Sugawara Keita, Toyoda Hayato, Kimura Mami, Hayasaka Shunsuke, Saito Hiromi, Kobayashi Hiroshi, Ihara Kunio, Ida Tomoaki, Akaike Takaaki, Ando Eiji, Hyodo Mamoru, Hayakawa Yoshihiro, Hamamoto Shin, Uozumi Nobuyuki | 4. 巻 478 |
| 2. 論文標題 Loss of cell wall integrity genes cpxA and mrcB causes flocculation in Escherichia coli | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical Journal | 6. 最初と最後の頁 41 ~ 59 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20200723 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ellen Tanudjaja, Naomi Hoshi, Yi-Hsin Su, Nanatani Kei, Shin Hamamoto and Nobuyuki Uozumi |
| 2. 発表標題 Kup-driven Cs+ uptake promote Escherichia coli growth under K+ limited condition |
| 3. 学会等名 American Society of Microbiology |
| 4. 発表年 2019年 ~ 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 山上 睦 (Yasmagami Mutsumi) (60715499) | 公益財団法人環境科学技術研究所・環境影響研究部・副主任 研究員 (81103) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|