

令和 5 年 9 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02896

研究課題名(和文) ヨウ素呼吸細菌の3分岐型電子伝達鎖の解明：放射性ヨウ素回収への応用を目指して

研究課題名(英文) Elucidation of branched-electron transport chain in iodate-respiring bacteria

研究代表者

天知 誠吾 (Amachi, Seigo)

千葉大学・大学院園芸学研究院・教授

研究者番号：80323393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：Pseudomonas sp. SCTのヨウ素酸呼吸に重要と予想される遺伝子の欠損変異株を複数作成し、その生育を観察した。その結果、ヨウ素酸呼吸条件で全く生育しない株、生育はするものの親株よりも遅れが生じる株などを取得することに成功した。これら欠損変異株の1つを用いて、idr遺伝子の転写に及ぼすヨウ素酸イオンとヨウ化物イオンの影響を調べた。また、Idrタンパク質を精製し、その分子量とサブユニット構造を予測した。さらに、地下水環境から分離されたヨウ素酸呼吸細菌Azoarcus sp. DN11と銀担持ゼオライトを用いて、ヨウ素をヨウ化銀(AgI)として効率よく回収・除去できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヨウ素酸呼吸は最近になって発見された細菌の嫌気呼吸様式で、脊椎動物の必須元素であるヨウ素の地球規模での循環に与える影響から注目を集めている。またヨウ素酸呼吸細菌は、地下水汚染が報告されている放射性ヨウ素(I-129)の回収・除去にも応用が期待される。本研究では2種類のヨウ素呼吸細菌を用いて、ヨウ素酸呼吸に重要な役割を演じる複数の遺伝子を同定し、その機能を予測した。また、ヨウ素酸呼吸反応を触媒するタンパク質の分子量とサブユニット構造を予測した。さらに、ヨウ素酸呼吸細菌を用いてヨウ素酸をヨウ化物に変換することで、I-129をヨウ化銀(AgI)として効率的に回収・除去できることを示すデータを得た。

研究成果の概要(英文)：Several types of gene knockout mutants were constructed from an iodate-respiring bacterium Pseudomonas sp. SCT, and their growth under iodate-respiring, denitrifying, and oxygen-respiring conditions was compared with that of the wild-type strain. By using one of these mutants, effect of iodate and iodide concentrations on the transcription of idr gene was determined. Idr protein complex was purified, and its molecular weight and subunit composition were deduced. Furthermore, silver-impregnated zeolite was added to the spent medium of Azoarcus sp. DN11, another iodate-respiring bacterium isolated from gasoline-contaminated subsurface aquifer. Iodine was successfully removed from the aqueous phase and recovered as silver iodide (AgI). These results suggest that iodate-respiring bacteria are potentially helpful for bioaugmentation of radioiodine (I-129)-contaminated subsurface aquifers.

研究分野：環境微生物学

キーワード：ヨウ素酸呼吸 電子伝達鎖 idr遺伝子 放射性ヨウ素 地下水汚染 銀担持ゼオライト バイオレメディエーション

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ヒトの必須元素であるヨウ素は主に海洋に存在し、その化学形態は+5 価のヨウ素酸 (IO_3^-) と -1 価のヨウ化物 (I^-) である。ヨウ素の化学形態変化には、しばしば微生物が関与するが、ヨウ素酸のヨウ化物への還元反応には不明な点が多い。ヨウ素酸は大気中に揮発できないが、ヨウ化物は容易に揮発性ヨウ素 (CH_3I など) へ変わる。揮発性ヨウ素は光分解を受けた後、雨水と共に陸地に達し、動植物に取り込まれる。従って、ヨウ素酸の還元はヒトを含めた動物が甲状腺ホルモン (ヨードチロシン) を合成する上で必須の反応と言える。一方、米国を始めとする核施設では、ウランやプルトニウムの核分裂に起因する放射性ヨウ素 ^{129}I による地下水汚染が報告されている。放射性的ヨウ化物は銀イオンと反応させ固体のヨウ化銀 AgI として容易に回収・除去できる。これに対し、ヨウ素酸は銀イオンと反応せず、その回収は困難である。従って、ヨウ素酸の還元反応は放射性ヨウ素汚染の浄化という観点からも重要である。

我々は以前、ヨウ素酸を呼吸 (異化的還元) できる細菌 *Pseudomonas* sp. SCT を初めて分離した。その後の研究から、SCT のヨウ素酸呼吸には新規 DMSO (ジメチルスルホキシド) 還元酵素ファミリーを含むタンパク質複合体 $\text{IdrABP}_1\text{P}_2$ が関与することが明らかになった。またヨウ素酸呼吸では、電子伝達鎖が途中で3つに分岐し、ヨウ素酸のみならず過酸化水素と酸素も最終電子受容体になると推測されている。しかしながら、ヨウ素酸呼吸メカニズムの詳細はまだまだ不明な点が多く、 Idr タンパクの各サブユニットの機能もよくわかっていない。またこれまで、ヨウ素酸呼吸細菌を用いることで、地下水環境から放射性ヨウ素を回収・除去できるか検討された例もなかった。

2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究課題では海洋から分離されたヨウ素酸呼吸細菌 *Pseudomonas* sp. SCT 株を用いて、ヨウ素酸呼吸に重要な役割を演じると予想される複数の遺伝子欠損変異株を作成し、その表現型を親株と比較した。また、それぞれの遺伝子相補株を作成し、表現型の回復が見られるか確認した。また、これら遺伝子欠損変異株の1つを用いて、*idr* 遺伝子の転写に及ぼすヨウ素酸イオンとヨウ化物イオンの影響を調べた。さらに Idr タンパク質を精製し、その分子量とサブユニット構造を予測した。一方、陸圏の地下水環境より分離された細菌 *Azoarcus* sp. DN11 のゲノムには *idrABP}_1\text{P}_2* 遺伝子が存在することがわかっている。本研究課題の後半では、DN11 株が SCT 株と同様にヨウ素酸呼吸条件下で生育することを確認し、その鍵酵素が $\text{IdrABP}_1\text{P}_2$ であることを明らかにした。また DN11 株を培養し、その培養上清に銀担持ゼオライトを添加することで、ヨウ素をヨウ化銀 (AgI) として効率よく回収・除去できるか検討を行った。

3. 研究の方法

(1) *idr* 遺伝子欠損変異株の構築

インバース PCR により、スーサイドベクター-pK18mobsacB を線状化した。各 *idr* 遺伝子の上流および下流を別々に増幅し、ベクターと連結するインサートとした。In-Fusion HD cloning kit を用いて2種類のインサートと線状ベクターを連結し、遺伝子欠損用のベクターを構築した。*E. coli* DH5 α を形質転換し、カナマイシンを含む LB 寒天培地で形質転換体をスクリーニングした。次に接合伝達により、形質転換体から野生株にベクターを導入し、染色体上の相同配列と1度目の相同組換えを起こした。このベクターには、培養時にスクロースが存在していると生育に致命的な影響を及ぼす *sacB* 遺伝子がコードされている。よって次にスクロース存在下で培養することで、ベクターを排除する2度目の相同組換えを誘導した。ストレプトマイシンを含む LB 寒天培地でのみ生育が確認された株を純化し、コロニー-PCR による増幅サイズを確認し、 ΔidrA , ΔidrP_1 , ΔidrP_2 , $\Delta\text{idrP}_1\text{P}_2$ 欠損変異株を得た。

(2) *idr* 遺伝子相補株の作成

インバース PCR により、広宿主域発現ベクター-pMMB67EH を線状化した。各 *idrA* 遺伝子の全長を増幅し、ベクターに連結するインサートとした。In-Fusion HD cloning kit を用いてインサートと線状ベクターを連結し、各 *idr* 遺伝子の全長を含むプラスミドを構築した。*E. coli* DH5 α を形質転換し、アンピシリンを含む LB 寒天培地で形質転換体をスクリーニングした。(1)と同様に接合伝達によりプラスミドを遺伝子欠損株に導入し、コロニー-PCR により相補株を確認した。

(3) Idr タンパク質複合体の精製

電子供与体として 20 mM の酢酸、電子受容体として 12 mM のヨウ素酸を用いて嫌氣的に培養した SCT 株の菌体からペリプラズム画分を調製し、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより、 Idr を高純度で含む精製酵素標品を得た。この標品を HPLC に供し、 Idr の分子量を推定した。また、精製酵素標品を Native-PAGE によって再分離し、得られた高純度の標品を LC-MS/MS 解析に供した。

(4) ヨウ素酸呼吸細菌 *Azoarcus* sp. DN11 と銀担持ゼオライトを用いたヨウ素の回収試験

DN11 株を 2 mM の酢酸を電子供与体、2 mM のヨウ素酸を電子受容体として培養した。適当な時間でサンプリングを行い、培養液の濁度を測定した。また、イオンクロマトグラフィーを用いて培地中の酢酸、ヨウ素酸、ヨウ化物イオン濃度を測定した。粗酵素液のヨウ素酸還元酵素活性は、メチルピオロゲン (MV) を電子供与体、ヨウ素酸を電子受容体として還元型 MV の酸化に伴う吸収波長の減少を経時的に測定し算出した。また、MV を電子供与体、ヨウ素酸を電子受容体とした活性染色で、Native-PAGE ゲル上のヨウ素酸還元酵素を検出した。活性バンドを切り出し、SDS-PAGE による再分離を行った後、LC-MS/MS 解析に供してヨウ素酸還元酵素のペプチド配列の同定を行った。DN11 株をヨウ素酸、硝酸、または酸素を電子受容体として培養し、RNeasy Mini Kit により RNA 抽出を行った。SuperScriptIV First-Strand Synthesis System for RT-PCR により逆転写 PCR を行った後、*idrA*、*idrP₁*、*idrP₂*、内部標準として *recA* 遺伝子を標的遺伝子とした qRT-PCR を行った。最後に DN11 株を 200 μ M のヨウ素酸を電子受容体として培養し、培養液を回収した後、0.2 g の銀担持ゼオライトを添加して混合した。その後、培養液を遠心し菌体と固体成分を除き、上清中のヨウ素酸、ヨウ化物イオン濃度をイオンクロマトグラフィーにて測定した。

4. 研究成果

(1) *idr* 遺伝子欠損変異株と相補株の表現型

後日再提出する。

(2) Idr タンパク質複合体の分子量の推定

後日再提出する。

(3) ヨウ素酸呼吸細菌 *Azoarcus* sp. DN11 と銀担持ゼオライトを用いたヨウ素の回収試験

DN11 株は最大 2 mM のヨウ素酸を 70 時間で全て還元し、生育に伴い消費したヨウ素酸と同量のヨウ化物イオンを生成した(図 1)。DN11 株の生育はヨウ素酸に依存していたことから、本菌はヨウ素酸呼吸を行うことが確認された。また、生育条件による Idr 活性の違いを比較するため、ヨウ素酸または硝酸呼吸条件の粗酵素液を用いて活性測定を行った。その結果、ヨウ素酸呼吸条件では高い Idr 比活性 (2.98 U/mg) が観察されたのに対し、硝酸呼吸条件では有意な活性が認められず、Idr はヨウ素酸呼吸条件で誘導されることがわかった。次に粗酵素液を Native-PAGE に供し、Idr の活性バンドを切り出して LC-MS/MS 解析に供したところ、*IdrA*、*IdrP₁*、*IdrP₂* が高頻度で検出された。さらに、*idrA*、*idrP₁*、*idrP₂* の転写量を qRT-PCR にて比較したところ、硝酸呼吸条件に対するヨウ素酸呼吸条件の相対転写量は *idrA* で 104 倍、*idrP₁* で 53 倍、*idrP₂* で 26 倍であった。このことから、*idr* 遺伝子は脱窒条件と比較してヨウ素酸呼吸条件で転写が誘導されることがわかった。

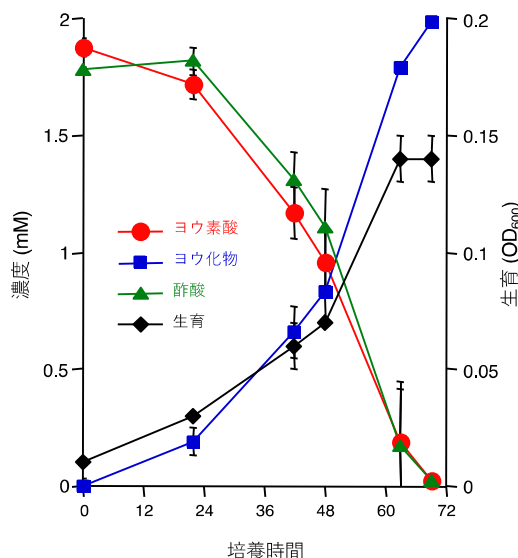


図 1 . *Azoarcus* sp. DN11 によるヨウ素酸呼吸

DN11 株を 200 μ M のヨウ素酸を電子受容体として嫌氣的に生育させた後、培養液を銀担持ゼオライトと混合し、上清中のヨウ素 (ヨウ素酸塩およびヨウ素化物) を測定した (表 1)。DN11 株を接種しない培地中のヨウ素酸濃度は、ゼオライトの添加にかかわらず一定 (192 ~ 193 μ M) であり、ゼオライトはヨウ素酸を除去しないことが確認された。一方、DN11 株の生育後、DN11 株が産生したヨウ化物 (198 μ M) はゼオライトによって上清から完全に除去された。その結果、上清からはヨウ素酸もヨウ化物も検出されなかった。今回の実験条件下でのヨウ化物の検出限界は 5 μ M であったため、ヨウ素除去の効果は 97.5% 以上と算出された。

以上の結果より、陸圏の地下水環境より分離された細菌 *Azoarcus* sp. DN11 はヨウ素酸呼吸細菌でありその鍵酵素が Idr であること、またこのような細菌を利用することで地下水環境から放射性ヨウ素を効率的に回収・除去できる可能性が示された。

表 1 . 銀担持ゼオライトを用いた DN11 培養上清からのヨウ素除去試験

	ゼオライトなし		ゼオライトあり	
	ヨウ素酸	ヨウ化物	ヨウ素酸	ヨウ化物
DN11 培養前	192 ± 1.57	<5.00	193 ± 1.40	<5.00
DN11 培養後	<3.00	198 ± 3.05	<3.00	<5.00

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamazaki Chihiro, Kashiwa Sumie, Horiuchi Ayaka, Kasahara Yasuhiro, Yamamura Shigeki, Amachi Seigo	4. 巻 22
2. 論文標題 A novel dimethylsulfoxide reductase family of molybdenum enzyme, Idr, is involved in iodate respiration by <i>Pseudomonas</i> sp. SCT	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 2196 ~ 2212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1462-2920.14988	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 Sasamura Seiya, Ohnuki Toshihiko, Kozai Naofumi, Amachi Seigo	4. 巻 14
2. 論文標題 Iodate respiration by <i>Azoarcus</i> sp. DN11 and its potential use for removal of radioiodine from contaminated aquifers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2023.1162788	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柏澄江、黒田真史、天知誠吾
2. 発表標題 idrAとidrPは <i>Pseudomonas</i> sp. SCT株のヨウ素酸呼吸に必須である
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会（オンライン開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 天知誠吾
2. 発表標題 微生物の金属タンパクと元素循環：ヨウ素、ヒ素、アンチモンを例として
3. 学会等名 立命館大学「生命×金属」シンポジウム（オンライン開催）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柏澄江、山崎千尋、笠原康裕、天知誠吾
2. 発表標題 細菌のヨウ素酸呼吸には新規鉄硫黄モリブデンタンパク Idr が関与する
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木根健、天知誠吾
2. 発表標題 海洋好気性細菌によるヨウ素酸還元
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柏澄江、香取七奈、黒田真史、天知誠吾
2. 発表標題 idrA と idrP は <i>Pseudomonas</i> sp. SCT のヨウ素酸呼吸に必須である
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柏澄江、香取七奈、黒田真史、天知誠吾
2. 発表標題 <i>Pseudomonas</i> sp. SCT 株における idr 遺伝子群の破壊がヨウ素酸呼吸に与える影響
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2022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	山村 茂樹 (Yamamura Shigeki) (90414391)	国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境保全領域・室長 (82101)	

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
---------	---------