

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658098

研究課題名(和文)大腸菌を利用したセシウムの回収

研究課題名(英文) Remediation of environmental pollution by the recombinant Escherichia coli accumulating cesium in the cell

研究代表者

吉岡 佐知子 (YOSHIOKA, Sachiko)

近畿大学・農学部・助手

研究者番号：80200939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、セシウムを高濃度に蓄積する大腸菌の作製を目的とした。我々は、マンガン及びモリブデンに対して「金属イオンを高濃度蓄積する大腸菌のゲノム育種の開発」を行い、大腸菌細胞内にこれらの金属を高濃度に蓄積させることに成功した。同様に大腸菌におけるセシウムの蓄積及び輸送に関する遺伝子の探索を、トランスクリプトーム解析により行った。そして、塩化セシウムの添加により金属結合転写因子と推定される3つの遺伝子の発現に変化を認めた。これらの遺伝子の欠損株は、細胞外のセシウム濃度に対して高い感受性を示した。故にこれ等の遺伝子を用いた大腸菌のゲノム育種により、セシウムを高濃度に蓄積する大腸菌の作製が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to design and construct the recombinant Escherichia coli, accumulating cesium ion in the cell. We showed genomic changes of metal-transporter and metal-binding protein increase the level of intracellular metal in E. coli in the cases of molybdenum and manganese. To identify the genes for cesium-transporter and cesium-binding protein in E. coli, we carried out transcriptome analysis. The result showed three genes, each encoding a putative metal-binding transcription factor, were increased by addition of cesium chloride. The deletion of these genes each increased the sensibility to high concentration of cesium. These results suggest that the identified genes involved in response to extracellular cesium in E. coli and are targets for genomic change to accumulate intracellular cesium ion in a cell.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学

キーワード：遺伝子工学

1. 研究開始当初の背景

研究分担者の法政大学山本らは、大腸菌金属ホメオスタシスの制御に関して数種の金属を特異的感知する転写制御因子を同定し、それらによる遺伝子発現機能を解明してきた。そして、その結果金属ホメオスタシスには、金属特異的輸送システムが重要であり、この金属ホメオスタシス能を強化したレアメタル回収技術の開発に着手している。そこで我々は、この技術を 2011 年 3 月の東日本大震災における原子発電所事故により漏洩した放射性セシウムの回収に応用することを目指した。放射性同位体セシウムは半減期が 30 年と長いうえにセシウム自体の反応性が大きい他元素と結合しやすい。そのため早期の除去が必要である。そこで、本研究では、マンガンとモリブデンにおける金属回収技術を確立し、これをセシウムに応用する。つまり、大腸菌の多様な金属ホメオスタシスにおけるセシウムの特異的な適応応答システムを解明し、得られるセシウム特異的輸送システムおよびセシウム特異的結合タンパク質を特定し、セシウム高蓄積大腸菌を作製することを目指した。

2. 研究の目的

アルカリ金属であるセシウムは生体に必須な微量元素でなく、比較的高い反応性からある程度の毒性を示す。単細胞であるが多様な環境適応能を持つ大腸菌の高濃度セシウムに対する適応応答を明らかにして、セシウムを選択的かつ特異的に取り込むシステムおよび結合するタンパク質を検索する。そして、これらの機能発現を同時に強化させた大腸菌を作製することで、細胞内で高濃度にセシウムを蓄積する能力を付加させる。本研究で開発される生物素材はバイオリーチングのように環境負荷が少ない微生物による金属回収技術への応用であり、緊急に対応すべき社会問題である東日本大震災による放射性同位セシウム回収への実用化に寄与できると考えた。

3. 研究の方法

まず、供試金属に対する初期応答遺伝子発現変化データを取得する。大腸菌野生株を対数増殖期まで培養後、金属を添加し、5 分後に細胞全 RNA を調製する。添加する金属濃度は大腸菌の生育を阻害しない最大濃度の半分とする。調製した全 RNA を鋳型に蛍光標識した cDNA を作製しマイクロアレイ解析により未添加を対照区として比較解析を行う。この解析により金属に対する初期応答性遺伝子発現プロファイルデータを作成し、特徴を見出す。次いで、このプロファイルより、発現変動が著しい、膜タンパク質遺伝子、転写

制御因子遺伝子、金属結合モチーフを持つタンパク質遺伝子を選抜する。そして、高濃度金属により発現変動する遺伝子についてそれらの欠損株と野生株との金属感受性を測定する。そして、大腸菌由来の金属取り込み遺伝子および金属特異的結合タンパク質遺伝子の各々について高発現プラスミドを作製し、これらを同時に大腸菌へ導入することで金属を高蓄積する遺伝子組換え大腸菌を作製する。

4. 研究成果

本研究は、セシウムを高濃度に蓄積する大腸菌の作製を目的とした。そのために、まず、大腸菌を基盤として、マンガン高蓄積大腸菌、モリブデン高蓄積大腸菌の作製を手掛けた。トランスクリプトーム解析により、マンガンに対しては、*mntH* および *mntR* の遺伝子が、モリブデンに対しては、*modABC*、遺伝子領域と *modF* および *modE* 遺伝子がそれぞれの金属を特異的に感知する遺伝子であると特定した。*mntR* および *modE* 遺伝子が金属結合タンパク質遺伝子であり、金属特異取り込みポンプ遺伝子が *mntH* および *modABC - modF* 遺伝子領域である。そして、「金属イオンを高濃度蓄積する大腸菌のゲノム育種の開発」を行った。つまり、マンガン高蓄積大腸菌として、*mntH* と *mntR* を同時に高発現した形質転換体をモリブデン高蓄積大腸菌として、*modABC - modF* を同時に高発現した形質転換体を作製し、マンガンとモリブデン酸を高濃度に大腸菌細胞内に蓄積させることに成功した。それらのゲノム改変は、金属輸送システムと細胞内金属結合タンパク質を同時に遺伝的に強化させることであった。また、これらのゲノム育種により創出した金属高蓄積組換え大腸菌は、金属を細胞内に高蓄積する能力をもつが、その生育は非組換え大腸菌と変わらなかった。これらの結果をふまえて、このゲノム育種の理論を基盤としてセシウムに対する金属輸送システム遺伝子と細胞内金属結合タンパク質遺伝子の探索を行った。まず、大腸菌野生株 W3110 のセシウムに対する感受性を調べた。0、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200mM の塩化セシウムを含む M9 最小培地で野生株を培養し、所定時間ごとに OD600 を測定した。しかし、M9 最小培地に塩化セシウムを加えて、37 でインキュベートすると大腸菌の有無に係わらず沈殿が生じた。そこで、塩化セシウムを硫酸セシウム、酢酸セシウムに変更したが沈殿は生じた。次に M9 最小培地を Davis 培地、M63 最小培地、MOPS 培地に変えた、すると MOPS 培地では、セシウム塩化物を加えても沈殿は生じなかった。そこで、MOPS 培地を用いて、塩化セシウムを使用することとした。こうして、大腸菌野生株の塩化セシウムに対する感

受性を調べた結果、今回使用した最高濃度である 200mM においても大腸菌の生育は認められた。しかしながら、生育速度は遅く、濁度も低下した、そこで、生育阻害されない最高濃度を 10mM と決定した。次にセシウムに対する初期応答遺伝子発現変化データを取得するため大腸菌を対数増殖期まで培養後、生育阻害しない最高濃度の半分の濃度の塩化セシウム(5mM)を添加し、5 分培養後細胞全 RNA を調製した。調製した全 RNA を鋳型に蛍光標識した cDNA を作成し、マイクロアレイ解析により未添加を対照区として比較解析を行った。すると、*adiY*、*yagS*、*ybgI*、*ycfN*、*flu*、*yfiA*、*ygfB*、*adiY*、*yjiX*、*accD* の 9 遺伝子の発現に変化が認められた。このうち、*ybgI* 遺伝子は金属結合に関与する遺伝子であることが知られており、*adiY*、*yagS* も金属結合遺伝子である可能性が高いとされている。他の遺伝子も細胞外セシウムに対して、何らかの発現や誘導を示す遺伝子候補である。

次いで、これらの遺伝子欠損株を用いて各々の遺伝子欠損株についてセシウムに対する耐性試験を行った。所定濃度の塩化セシウムを含む MOPS 液体培地にそれぞれの遺伝子欠損株と野生株を植菌し、所定時間培養後の濁度を測定した。その結果、塩化セシウム 200mM 濃度を含む培地で培養した全ての遺伝子欠損株において、野生株と比較して著しく生育が阻害された。つまり、これら遺伝子が欠損することにより、セシウムに対する感受性が高くなる。この結果からもこれらの遺伝子が細胞外のセシウムにより発現誘導され、細胞内セシウム恒常性に関与する遺伝子であることが示唆された。この遺伝子を用いた大腸菌のゲノム育種により、セシウムを高濃度に蓄積する大腸菌の作製が期待できる。

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 7 件)

山本兼由 (2014) 細胞内でレアメタルを高蓄積する大腸菌のゲノム育種と応用 **ケミカルエンジニアリング**, 2014 年 4 月号 (VOL.59 No.4) 査読無

Shimada K, Ogasawara H, Yamada K, Shimura M, Kori A, Shimada T, Yamanaka Y, Yamamoto K, Ishihama A. (2013) Screening of promoter-specific transcription factors: multiple regulators for the *sdiA* gene involved in cell division control and quorum sensing. **Microbiology** 159(Pt 12):2501-2512. 査読有

Kurata, T., Katayama, A., Hiramatsu, M., Kiguchi, Y., Takeuchi, M., Watanabe, T., Ogasawara, H., Ishihama, A., and Yamamoto, K. (2013) Identification of the set of genes, including non-annotated *morA*, under the direct control of ModE in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 195(19):4496-44505. 査読有

Pukklay, P., Nakanishi, Y., Nitta, M., Yamamoto, K., Ishihama, A., and Shiratsuchi A. (2013) Involvement of EnvZ-OmpR two-component system in virulence control of *Escherichia coli* in *Drosophila melanogaster*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 438(2):306-311. 査読有

Shimada, T., Katayama, Y., Kawakita, S., Ogasawara, H., Nakano, M., Yamamoto, K., Ishihama, A. (2012) A novel regulator RcdA of the *csgD* gene encoding the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli*. **Microbiologyopen**. doi:10.1002/mbo3.42.

Ogasawara, H., Shinohara, S., Yamamoto, K., and Ishihama, A. (2012) Novel regulation targets of the metal-response BasS-BasR two-component system of *Escherichia coli*. **Microbiology** 158(Pt 6), 1482-1492.

Yamanaka, Y., Ishihama, A., and Yamamoto, K. (2012) Induction of YdeO, a regulator for acid resistance genes, by ultraviolet irradiation in *Escherichia coli*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 76(6), 1236-1238.

〔学会発表〕(計 5 件)

山中幸、志波優、山本健太郎、川岸郁朗、吉川博文、石浜明、山本兼由 大腸菌 GadE によるゲノム発現制御メカニズムの解明 日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス(神奈川県) 平成 26 年 3 月 27 日 ~ 平成 26 年 3 月 31 日

山本兼由、山田佳代子、岩田紀子、小澤貴博、富山あや乃、千野拓馬、石井絵里、鈴木孝太、尾崎友紀、石浜明 大腸菌システム合成遺伝子群を制御する CysB-Cbl カスケード 日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス(神奈川県) 平成 26 年 3 月 27 日 ~ 平成 26 年 3 月 31 日

中野雅博、多田麻里永、石浜明、山本兼

由 システイン代謝遺伝子転写因子 YdcN の包括転写因子としての機能 日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス(神奈川県)、平成 26 年 3 月 27 日~平成 26 年 3 月 31 日

山本兼由、山中幸、大島拓、山田佳代子、岩田紀子、大村悦子、崎井裕貴、中川日出子、渡會祥、曾和義幸、川岸郁朗、石浜明 大腸菌核様体形成の主要蛋白 H-NS のシステマティックな制御機能解析 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(兵庫)、平成 25 年 12 月 3 日~平成 25 年 12 月 6 日

吉多美祐、安達友美、渡邊宏樹、石浜明、山本兼由 大腸菌の二成分制御系レスポンスレギュレーター間における転写制御ネットワーク 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(兵庫)、平成 25 年 12 月 3 日~平成 25 年 12 月 6 日

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

■新聞記事：日刊工業新聞(2014 年 1 月 15 日)、「法政大、大腸菌でレアメタルを高濃度に蓄積することに成功」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 佐知子 (YOSHIOKA Sachiko)
近畿大学・農学部・助手
研究者番号：8 0 2 0 0 9 3 9

(2) 研究分担者

山本 兼由 (YAMAMOTO Kaneyoshi)
法政大学・生命科学部・准教授
研究者番号：4 0 3 5 1 5 8 0