

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：57701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26630249

研究課題名(和文)セシウムの吸収・濃縮に関わるきのこ遺伝子の特定とこれを利用した革新的技術の開発

研究課題名(英文)Identification of mushroom gene involving in absorption and concentration of Cs, and development of innovative technology by the exploitation

研究代表者

山内 正仁 (Masahito, Yamauchi)

鹿児島工業高等専門学校・都市環境デザイン工学科・教授

研究者番号：40239843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒラタケのゲノム情報からKトランスポーター(TRKH)とCs結合サイトをもつタンパク質のプライマーを設計し、抽出DNAにPCRを行いTRKH2および3が増幅可能であることを確認した。またTRKH2のリアルタイムRT-PCRを行い、Cs取り込みの活性化剤として確認しているジアゾキシドが有意に遺伝子発現を増加することを見出し、このトランスポーターがCs取り込みに関わることを推定した。

研究成果の概要(英文)：Primers of K transporters (TRKH) 1-4 and formyltetrahydrofolate synthetase with Cs binding site were designed using genome information on Pleurotus ostreatus. PCR with extracted DNA and primers revealed TRKH 2 and 3 could be amplified. Real time RT-PCR on TRKH2 showed diazoxide (previously confirmed as activator for Cs intake) increased the gene expression, suggesting that this transporter was involved in the Cs intake.

研究分野：環境工学，廃棄物工学

キーワード：きのこ セシウム カリウム カリウムトランスポーター

1. 研究開始当初の背景

東日本大震災以降、農作物から国が定めた「食品中の放射性物質の新たな基準値」を超える放射線量が検出され社会問題になっている。放出された放射性物質は主としてヨウ素(I)-131、セシウム(Cs)-134、セシウム(Cs)-137である。ただし、長期的に問題となるのは半減期が約30年のCs-137である。放射性物質を人為的に無害化することは困難であり、その対策として管理された区域に放射性Csを封じ込める技術として、プルシアンブルーを用いた除染技術の開発が盛んに行われ、ラボスケールではその効果が確認されているが実用化には達していない^{1),2)}。またフィールド実験において、土壌に蓄積した放射性Csに対してCsの回収のし易さからヒマワリのファイトレメディエーション効果について検討されたが、10a分のヒマワリが吸収する放射性Csは0.085%に過ぎず、除染効果は殆どないことが報告されている。

Csの化学的・物理的性質は、同じアルカリ金属のカリウム(K)と類似している。本研究室ではこれまでに有機性廃棄物を食用きのこ培地の栄養材として活用する研究を行ってきた。特にきのこの特性として、無機成分の60-70%がKであること、培地中のKをきのこ子実体が濃縮する特性があることを各種食用きのこで確認している。このため、選択的にKを多く吸収・濃縮する特性を有するきのこを利用してCsを除去できると考えた。また、きのこは植物よりも3オーダー濃縮率が高いことが知られているが、きのこの諸特性を活用したCsの回収除去技術の開発に関する研究はなされていない。

2. 研究の目的

(1) K含量が極めて低いために子実体が殆ど形成されないビール粕培地(培地基材; 針葉樹おが屑, 培地栄養材; ビール粕: 無添加区)にKCl, CsClをそれぞれ、または同時に添加することで子実体形成を試み、子実体中

のK, Cs量を定量し、両元素の動態について検討した。

(2) ヒラタケの有するCs吸収に関与すると考えられるKトランスポーターの機能遺伝子に注目し、これらの遺伝子発現のモニタリングに適用可能なRT-PCR定量系の構築を行った。

3. 研究の方法

(1) 表-1、表-2に培地配合条件を示す。培地は850mLのポリプロピレン製の培養瓶に450gずつ充填した。その後、121で3時間高圧滅菌処理を行い、室温まで冷却後、栽培期間が短く、害菌に強いヒラタケ菌(H67号: (株)キノックス)を約10g接種した。培養は培養室(温度 22 ± 1 , 湿度 $75 \pm 5\%$)で27日間行い、その後、菌掻き、注水操作を施し、2時間静置後、発生室(温度: 14 ± 1 , 湿度 $90 \pm 5\%$)にピンを移し、子実体形成を促した。なお培養室内の蛍光灯の点灯は作業時のみ、発生室内の蛍光灯の点灯は8時間とした。収穫は子実体の傘の径が20~30mm程度で行い、子実体の生重量及び水分率を測定した。収穫した子実体、培養開始前培地及び廃培地は通風乾燥機を用いて60で乾燥させ、ビーズミルで微粉碎した。粉碎後の試料は、それぞれ1gずつ磁性ろつぽに秤量し、450で15時間乾式灰化後、濃硝酸5mLを加えて乾熱板(ホットプレート)上で30分間加熱した。加熱処理後の試料は放冷した後、ろ紙No.5Cを用いてろ過を行った。ろ液は100mLに定容し、適宜希釈を行い、分析に供した。分析方法はK, CsともにICP/MS法により測定した。その後、培地中のCsがきのこ子実体に移行する程度の指標として用いられる移行係数(TF)を次式で求めた。

$TF(CF) = (\text{子実体 } 1\text{kg (乾物) あたりの K, Cs 量}) / (\text{培地 } 1\text{kg (乾物) あたりの K, Cs 量})$

(2) 2014年に公表されたヒラタケ(*Pleurotus ostreatus*)のゲノム情報を基に、

表-1 培地の配合条件 (単独添加区)

試験区 番号	試験区	培地基材		その他		播種 め量 (g/瓶)	水分 率 [*] (%)	pH ^{**}
		針葉樹 おが屑 (乾物%)	ビール粕 (乾物%)	貝化石 (乾物%)	K ⁺ (mg/乾物/瓶)			
1	無添加区	-	-	-	-	84.2	5.4	-
2		-	-	-	250	84.5	5.4	-
3	KCl添加区	-	-	-	500	83.9	5.4	-
4		-	-	-	1,000	84.0	5.3	-
5		46.0	50.0	4.0	2,000	84.3	5.3	-
6		-	-	-	250	83.8	5.6	-
7	CsCl添加区	-	-	-	500	84.0	5.4	-
8		-	-	-	1000	83.5	5.4	-
9		-	-	-	2000	84.4	5.4	-

*K, Csは、それぞれKCl, CsClを培地の水分調整時にイオン交換水に溶解させて添加。

**減菌後の培地水分。

表-2 培地の配合条件 (複合添加区)

試験区 番号	試験区	培地基材		その他		播種 め量 (g/瓶)	水分 率 [*] (%)	pH ^{**}
		針葉樹 おが屑 (乾物%)	ビール粕 (乾物%)	貝化石 (乾物%)	K ⁺ (mg/乾物/瓶)			
10	無添加区	-	-	-	-	83.3	5.3	-
11	KCl添加区	-	-	-	-	83.0	5.3	-
12		46.0	50.0	4.0	0.1	83.2	5.3	-
13	KCl+CsCl 添加区	-	-	-	500	1	83.5	5.3
14		-	-	-	-	10	83.3	5.3
15		-	-	-	-	100	83.2	5.3

*K, Csは、それぞれKCl, CsClを培地の水分調整時にイオン交換水に溶解させて添加。

**減菌後の培地水分。

カリウムおよびセシウムの取込みに関与すると推察されるトランスポーターの機能遺伝子 TRKH1~4 およびセシウム結合サイトを持つ FTHFS の機能遺伝子を標的とする RT-PCR 定量系を構築し、また構築した定量 RT-PCR 系を、カリウムおよびセシウム取り込み能を活性化させる薬剤 (活性化剤) を添加したヒラタケに対して適用し、活性化剤がヒラタケのカリウム・セシウムトランスポーター遺伝子の発現量に与える影響を評価した

4. 研究成果

(1) 表-3に無添加区及び無添加区にKClを添加したKCl添加区の栽培試験結果を示す。菌搔きから収穫までの日数 (発生処理後の日数), 総栽培日数は, 試験区2~5 (KCl添加区) では試験区1 (無添加区) と比較して4~5日間短縮された。収量は, 試験区1で34.4gであったが, 培地中のK量が増加するにつれて多くなり, 試験区3で90.7gと最大になった。それ以上の試験区では収量は減少傾向にあった。表-4に無添加区及びCsCl添加区の栽培試験結果

表-3 KCl添加区の栽培試験結果

試験区 番号	条件 試験区	発生処理 後の日数	総栽培日数	収量	乾物
				(生) [*]	重量
(g/瓶)					
1	無添加区	13.5±1.0	40.5±1.0	34.4	3.96
2		9.5±1.0	36.5±1.0	66.7	7.67
3	KCl添加区	8.0±0.0	35.0±0.0	90.7	9.98
4		8.0±0.0	35.0±0.0	84.3	9.27
5		8.0±0.0	35.0±0.0	62.6	7.20

*n=4の平均値

表-4 CsCl添加区の栽培試験結果

試験区 番号	条件 試験区	菌圃り 日数	培養 日数	発生処理 後の日数 (日)	総栽培日数	収量	乾物
						(生) [*]	重量
(g/瓶)							
1	無添加区	17	27	13.5±1.0	40.5±1.0	34.4	3.96
6		17		13.5±1.0	40.5±1.0	60.4	6.84
7	CsCl添加区	17	27	13.5±0.6	40.5±0.6	68.7	7.56
8		18		13.5±0.6	40.5±0.6	55.8	6.25
9		19		13.0±0.0	40.0±0.0	-	-

*n=4の平均値

試験結果を示す。CsCl添加区では発生処理後の日数, 総栽培日数は無添加区と同様であり, 表-3のKCl添加区と比較して5日程度長かった。収量は試験区7 (Cs: 500mg/瓶) で, 68.7gと最も多かったが, それ以上の添加量では減少傾向を示し, 試験区9 (Cs: 2,000mg/瓶) では培地に菌糸は蔓延したが子実体は形成されなかった。以上のことから, 低カリウム培地にKの代替としてCsを添加した場合, KCl添加区よりも収量が減少し, 発生処理後の日数が長くなる傾向が見られた。また, 無添加区よりは収量が増加していることからK程度ではないが, Csも子実体の成長に利用されていると考えられた。表-5に無添加区, KCl及びKCl+CsCl添加区の栽培試験結果を示す。無添加区は培地に菌糸が蔓延したが, 子実体形成は認められなかった。これは表-1の試験で利用したビール粕のK濃度は820mg/kg (66.1mg/瓶) (乾物) であったのに対し, 本試験で使用したものはその半分の420mg/kg (37.2mg/瓶) (乾物) であったことが影響していると考えられる。関谷はビール粕 (593mg/kg (47.0mg/瓶) 乾物) を用いてヒラタケ子実体の発生に及ぼすカリウムの影響を調査し, カリウム量が極端に少ない培地では子実体は形成されないと報告している。本試験結果も同様であった。一方, KClを添加した試験区11 (K: 500mg/瓶) では表-3の試験区3と同等の収量を得ることができた。KとCsを添加した試験区12~15では, Cs添加量が増加するにつれて発生処理後の日数 (収穫までの日数), 総栽培日数が長くなる傾向にあった。収量はCs添加量が少ない程多くなる傾向を示したが, 本試験条件の範囲では顕著な差は

表-5 KCl及びKCl+CsCl添加区の栽培試験結果

試験区 番号	条件 試験区	培養日数	発生処理後 の日数	総栽培日数	収量	乾物
					(生) [*]	重量
(g/瓶)						
10	無添加区	32	-	-	-	-
11	KCl添加区		7.3±0.6	32.3±0.6	93.1	10.24
12			8.0±0.8	33.0±0.8	90.3	10.11
13	KCl+CsCl 添加区	25	7.7±0.6	32.7±0.6	87.4	10.05
14			9.7±1.5	34.7±1.5	89.0	10.24
15			10.0±0.8	35.0±0.8	85.0	9.86

*n=3の平均値

表-6 各試験区の移行係数と回収率

試験区 番号	条件 試験区	移行係数(-)		回収率(%)	
		K	Cs	K	Cs
1	無添加区	2.39	-	55.7	-
6	CsCl添加区	1.95	0.54	78.1	21.2
7		2.14	0.69	105.3	30.9
8		2.13	0.29	100.2	10.2
9		-	-	-	-
11	KCl添加区	0.93	-	52.5	-
12	KCl+CsCl 添加区	0.95	0.16	51.6	8.6
13		0.88	0.21	47.1	10.9
14		0.90	0.22	46.7	11.6
15		0.90	0.21	46.1	10.9

*n=3の平均値

見られなかった。表-6に各試験区におけるK及びCsの子実体への移行係数(TF)及び回収率を示す。まず、無添加区とCsCl添加区を比較すると、無添加区のKの移行係数は2.39であったが、試験区6~8のKの移行係数は1.95~2.14と、無添加区のそれより0.3~0.4程度小さかった。またCsCl添加区のCsの移行係数はKより小さく、0.29~0.69であった。特に試験区8(Cs:1,000mg/瓶)では、Csの移行係数は試験区6,7と比較して極端に小さかった。つぎに全ての試験区でKの移行係数を比較すると、KCl(K:500mg/瓶)添加区、KCl(K:500mg/瓶)とCsCl(Cs:0.1~100mg/瓶)を併用した試験区のKの移行係数は無添加区、CsCl添加区と比較して小さく、0.88~0.95の範囲にあった。またCsの移行係数は試験区8よりさらに小さく、0.16~0.22の範囲にあった。さらにKCl+CsCl添加区ではK, Csの移行係数はCsが0.1~100mg/瓶の範囲で変化してもほぼ一定の値を示した。このことから、培地中にKが多く存在する場合、試験区6~8と比較してCsは子実体へ移行しにくいことがわかった。これらの現象はKとCsが拮抗的な関係にあることが影響しているためと考えられる。また、K回収率は試験区7でほぼ100%であった。一方、Cs回収率は試験区7で30.9%と最大なり、それ以上では減少した。KClとCsClを併用した試験区12~15の回収率は試験区6,7と比較して低かった。以上のことから、培地中のカリウム濃度が高い培地よりも、ビール粕培地(無添加区)にCsClのみを添加した方が培地中のCsは子実体に移行し易く、回収率も高くなることがわかった。特にビール粕培地にCsを瓶あたり500mg以内で添加するとカリウムトランスポーター、カリウムチャンネルが活発に作用し、K, Csが子実体に効果的に吸収されると思われた。また、試験区9において子実体

が形成されなかった理由として、カリウムチャンネルをKが通過する場合、高い透過性のため瞬時に細胞内に吸収される。しかしCsの場合、イオン半径がKと比較して大きいため、通過に時間を要する。このようにCs量がK量と比較して極端に多い場合、Csがカリウムチャンネルを支配する時間が長くなり、K供給が阻害され、子実体形成が抑制されたと考えられる。

(2) ヒラタケからのDNA抽出およびRNA抽出

ヒラタケからのDNA抽出にはISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン)を使用した。ヒラタケの子実体凍結乾燥粉末およそ0.1 gからヒラタケの全DNAを抽出した結果、102~156 ng/ulと安定してDNAを抽出することができた。またヒラタケからのRNA抽出にはRNeasy Plant Mini Kit (キアゲン)を使用し、-80°Cに凍結保存しておいたヒラタケ子実体を液体窒素存在下で粉碎処理を行い、凍結粉碎試料およそ0.5 gをRNA抽出に供した。結果、およそ1500~2600 ng/ulの全RNAを分解することなく抽出することができた。以降、これらの方法によりヒラタケからのDNA, RNAの抽出し、以降の操作に供することとした。

ヒラタケ抽出DNAからのPCRによる18S rRNA遺伝子の増幅およびシーケンシング

ヒラタケ抽出DNAを鋳型とした18S rRNA遺伝子のPCRには、真核生物の18S rRNA遺伝子に特異的なEukA (5' -AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3'), EukB (5' -TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3') プライマーセットを使用した。グラジエントPCRによりアニーリング温度の至適化を行い、65°Cを18S rRNA遺伝子の特異的に増幅可能なアニーリング温度とし、以降の実験で適用した。ヒラタケ抽出DNAより増幅した18S rRNA遺伝子をpBR2.1プラスミドに導入し*E. coli* TOP10を用いてクローン化後、CEQ8000 (ベックマン・コールター)を用いたサンガー法によるDNAシーケンシングを行った。得られた配列をBLAST解析 (NCBI) した結果、すべてのクローン配列がヒラタケ

(*Pleurotus ostreatus*) の18S rRNA遺伝子と100%の相同性で一致した。このことから本法によりヒラタケから遺伝子解析に適用可能なDNAを抽出可能であると判断した。

カリウムおよびセシウム取り込みに関する各種遺伝子を標的とするPCRプライマーの設計とリアルタイムRT-PCR定量系の構築

NCBI に公開されたヒラタケ *Pleurotus ostreatus* の全ゲノム情報から、カリウムの取り込みに関与するトランスポーター—the integral membrane K(+)-translocating protein (TRKH) 1~4およびセシウム結合サイトを持つ formyltetrahydrofolate synthetase (FTHFS) 遺伝子情報を入手し、これらの遺伝子を実験的にPCR増幅可能なプライマーセットを設計した。プライマー設計にはプライマー設計支援ソフト Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) を使用し、約1000 bpの増幅産物が得られるように各種遺伝子を標的とするフォワードおよびリバースプライマーを設計した。以下に設計したプライマー情報を記す。Set1: Po1TRKH1828-F (5' -ACC CTT TCA ACA GGC ATA CG-3'), Po1TRKH3316-R (5' -TAA CAC AGC TCG GTC AAT CG-3'), Set2: Po2TRKH1260-F (5' -CCA TGT TCC ACT TGT TGA CG-3') Po2TRKH2757-R (5' -CTC AAT GAT GCA AAG CAG GA-3'), Set3: Po3TRKH267-F (5' -GGC AGC AAG TCC TGA TCT TC-3'), Po3TRKH1764-R (5' -TGG AAG GGG ACC ATA GAC TG-3'), Set4: Po4TRKH1502-F (5' -GCT CGC ATG CGC ATA TAG TA-3'), Po4TRKH2997-R (5' -CCT CTC CTC GTA GAC GTT CG-3'), Set5: PoFTHFS996-F (5' -AGG TGT AGG CCC AAT GAC TG-3'), PoFTHFS2493-R (5' -ACT TCT CCA TTC CCA TGT CG-3')。これらのプライマーセットにてヒラタケ抽出DNAを鋳型にPCRを適用した結果、Set2およびSet3において標的配列のDNA増幅産物を得ることができた。Set1, 4, 5については、様々なPCR条件を試してみたものの、

特異的な増幅産物を得るに至らなかった。考えられることとして、今回実験に使用したヒラタケのゲノムと公開されているヒラタケのゲノム情報に違いがある可能性がある。今後は設計したプライマーセットで増幅することのできたSet2およびSet3を使用し、リアルタイムRT-PCRの定量系に用いることとした。市販のヒラタケ子実体よりトータルRNAを抽出し、TaKaRa PrimeScript Rt reagent Kit (タカラバイオ) を使用し、ランダムプライマーによる抽出全RNAのcDNA合成を行った。合成cDNAを標的とし、設計したプライマーセットによるリアルタイムPCR法を適用した。リアルタイムPCRにはssoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (パイオラッド) を使用したインターカレーター法による定量法を採用した。結果、設計したプライマーセットおよび18S rRNA遺伝子特異的プライマーセット (EukA-EukB set) の両者において、cDNAの段階希釈系列に対してPCRのCt値が均等に増加したことより標的遺伝子の定量を行うことができると判断した。

活性化剤 (ジアゾキシド) の添加がヒラタケのTRKH2の発現量に与える影響

カリウムの取り込みを活性化させる活性化剤 (ジアゾキシド) を添加して生育させたひらたけ子実体およびコントロール (活性化剤未添加区) のヒラタケ子実体からRNAを抽出し、設計したプライマーセット (Set2) およびEukプライマーセットを使用したリアルタイムRT-PCR法を適用し、活性化剤の添加がTRKH2 (Set2標的遺伝子) の発現量に与える影響を調査した。リアルタイムRT-PCR法には比較Ct法 (Ct法) を採用し、コントロール発現遺伝子を18S rRNAとして行った。結果、ジアゾキシド添加区において活性化剤未添加区と比較し有意な遺伝子発現の増加が確認された。

<参考文献>

1) 迫田章義, 石井和之, 工藤一秋, 立間 徹: 担

体固定化吸着剤を用いた環境中からの小規模分散型セシウム回収プロセスの開発 ～プルシアンブルー添着布を用いた土壤中の放射性セシウムの回収～, 第 48 回水環境学会年会, 2014.

2) 迫田章義, 石井和之, 工藤一秋, 立間徹, 赤川賢吾, 小尾匡司, 藤田洋崇, 藤井隆夫, 黒岩善徳, 高橋勇介, 島長義, 佐藤理夫: プルシアンブルー添着布を用いた土壤中の放射性セシウム回収プロセス, 第 27 回日本吸着学会研究発表会, 2013.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

福山 一世、上田橋 克、山田 真義、八木史郎、山口 隆司、山内 正仁: ヒラタケを利用したセシウムの回収に関する基礎研究、日本きのこ学会 25 周年記念大会、2014.9

上田橋 克、山田 真義、八木 史郎、山口隆司、山内 正仁: きのこの生理機能を利用したセシウムの濃縮・回収に関する基礎研究、日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会、2015.2

山崎 寛登、池田 匠児、山田 真義、山口善敬、八木史郎、井口 晃徳、重松 亨、山口 隆司、山内 正仁: 低カリウムきのこ栽培用培地を用いたセシウムの濃縮・回収に関する研究、第 52 回環境工学研究フォーラム、2015.11

山崎 寛登、池田 匠児、山田 真義、八木史郎、山内 正仁: きの子実体を利用したセシウムの濃縮に関する基礎研究、日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会、2016.2

山内正仁: 有機性廃棄物の有効利用、エコビジネス振興のために人材育成講座、NPO 法人広島循環型社会推進機構(招待講演)、2016.8

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 正仁 (YAMAUCHI Masahito)
鹿児島工業高等専門学校・都市環境デザイン工学科・教授

研究者番号: 40239843

(2) 研究分担者

重松 亨 (SHIGEMATSU Toru)
新潟薬科大学・応用生命科学部・教授
研究者番号: 10315286

井口 晃徳 (IGUCHI Akinori)
新潟薬科大学・応用生命科学部・助教
研究者番号: 60599786

山田 真義 (YAMADA Masayoshi)
鹿児島工業高等専門学校・都市環境デザイン工学科・准教授
研究者番号: 80469593

(3) 連携研究者

山口 隆司 (YAMAGUCHI Takashi)
長岡技術科学大学・工学研究科・教授
研究者番号: 10280447

(4) 研究協力者

八木 史郎 (YAGI Fumio)
鹿児島大学名誉教授