

カリウム輸送タンパクの分子進化工学的改変による セシウム蓄積大腸菌の創出

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 応用菌学 金田 祥宜

1. 背景と目的

核実験や放射性廃棄物などに由来する放射能汚染の原因物質としてセシウム (Cs) の放射性同位体が問題視されており, その回収技術の開発が急務である。生物, 特に微生物を利用した Cs 回収技術は, 安価で環境負荷が低いという特性から大きな期待を集めている。実際にいくつかの Cs 蓄積能が高い生物種が報告されているが, Cs は物理化学的性質がカリウム (K) と類似することから, アナログとして生物の K 輸送システムにより取り込まれているに過ぎないことが知られている。大腸菌野生型株 (*Escherichia coli* K-12 株) は 3 種類の K^+ トランスポーターを持ち, そのうちのひとつ (Kup) は Cs^+ の輸送活性も有する。しかし Kup の Cs^+ に対する輸送活性, 親和性は非常に低く, 低濃度の Cs^+ 濃度では大腸菌はほとんど Cs^+ を取り込むことはない。本研究では分子進化工学的手法を用いて Cs^+ に対して高い取り込み能・親和性を有する変異型 Kup を作製し, より低い Cs^+ 濃度で Cs^+ を特異的に取り込み・蓄積可能な大腸菌を創出することを目的とした。

2. 方法と結果

Cs^+ 取り込み能向上株をスクリーニングするために, まず Cs^+ 取り込み能の簡易的な評価法の構築を試みた。 K^+ 制限条件下で細胞内機能の一部を Cs^+ が代替可能との知見に基づき, M9 最少培地を基本培地として Cs^+ の存在が大腸菌の増殖を促進させるかを検討した。 K^+ 制限条件下で終濃度 10 mM Cs^+ の添加により, 大腸菌野生型株の増殖が促進されることを見出した。次に, Kup の発現増大による大腸菌 Cs^+ 取り込み能の向上を試みた。Kup 遺伝子のアラビノース誘導発現株を作製し, 上記の K^+ 制限条件下における増殖および細胞内 Cs^+ 濃度を調べた。その結果, Kup 高発現株の増殖は野生型株より低い 1 mM Cs^+ 濃度で促進されることが確認された。全ての菌株で増殖の良い菌ほど細胞内 Cs^+ 濃度が上昇しており, 両者の間に正の相関関係があることが示唆された。さらに Kup に対して変異導入することで更なる Cs^+ 取り込み能の向上を試みた。校正機能を持たない DNA ポリメラーゼ (rTaq) の使用および反応液中への Mn^{2+} の添加により増幅産物にランダムな変異を導入する PCR 法 (エラープロン PCR) を大腸菌 Kup 遺伝子に対して行った。エラープロン PCR の増幅産物をアラビノース誘導プラスミドに組み込み, 大腸菌 Δkup 株に形質転換して約 30,000 株からなる変異株ライブラリーを作製した。ライブラリーを基に 0.1 mM Cs^+ 添加条件で集積培養した後, ランダムに得た 100 コロニーについて生育試験を行った。その結果, 変異株 2 株は Kup 高発現株と比較して Cs^+ 添加条件での増殖が促進し, より高い Cs^+ 取り込み能を示した。得られた変異株 2 株, C1-OE 株の Kup には E80G, C2-OE 株には D283N, T374A および T512A のアミノ酸置換が確認された。さらに C1-OE 株は 10 μM という非常に低い Cs^+ 添加条件でも野生型株および Kup 高発現株より有意に高い Cs^+ 取り込み能を示した。

3. まとめ

本研究は, Kup を高発現させること・変異を導入することで, 大腸菌の Cs^+ 取り込み能の増大が可能であることを明らかにしたものである。得られた 2 株の変異型 Kup は共に酸性アミノ酸が置換していることから, 陽イオンの認識に関与すると予想される酸性アミノ酸の変異が Cs^+ の取り込み能向上に重要であると示唆された。