

カリウム輸送タンパクの人工進化によるセシウム蓄積微生物の創出

加藤 創一郎^{1,2} (1産総研・生物プロセス, 2北大院農)

1. 背景と目的

■ セシウム (Cs) とは

- カリウム (K) と物理化学的性質が類似
- 放射性同位体 (¹³⁴Cs, ¹³⁷Cs) の問題
→ 生物を使った環境浄化技術への期待



■ (微)生物とCs

- Kは必須元素 vs. Csは非必須元素
- K輸送系を介した非特異的な取込み
- 植物、カビ (キノコ)、微生物等で細胞内蓄積の報告
→ 低濃度Cs、高濃度K条件での取り込み能は低い

Cs取り込み能の高い生物を自然界から探すには限界が、？

**目的：K輸送タンパクの人工進化により
高いCs取り込み能を持つ微生物を創れないか？**

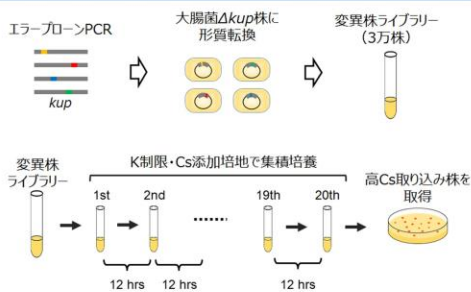
■ 大腸菌のカリウム輸送系

K, Csに対するKinetic parameters (Ref. 1)

Transporters	V_{max} $\mu\text{moles min}^{-1} \text{g dry cells}^{-1}$, K_m μM			
	K ⁺	Cs ⁺	K ⁺	Cs ⁺
Kdp	150	-	2	-
Trk	190-500	-	900-1500	-
Kup	27	17	370	5000

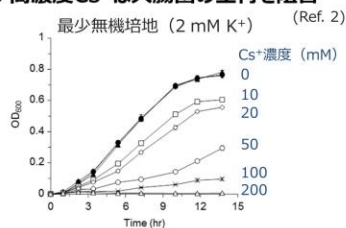
KupのみCs⁺輸送活性を持つが親和性は低い

2. 方法

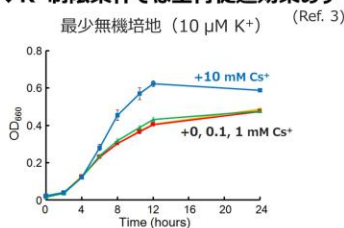


3. スクリーニング条件の検討

◆ 高濃度Cs⁺は大腸菌の生育を阻害



◆ K⁺制限条件下では生育促進効果あり

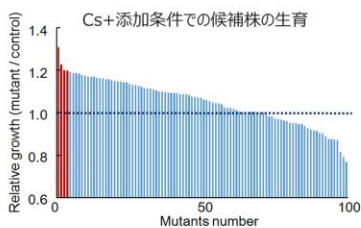


K⁺制限条件下でCs⁺が大腸菌の生育を促進 → ポジティブスクリーニングが可能に！

4. Kupの人工進化・スクリーニング

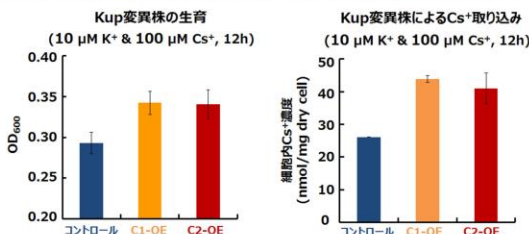
◆ 高いCs⁺取り込み能を有する株の集積・スクリーニング

- 変異株ライブラリーをK制限 & 100 μM Cs⁺添加条件下で集積培養
- 100コロニーをランダムに取得
- 候補株の生育をコントロールと比較

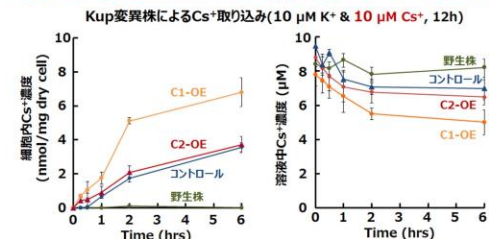


**Cs⁺添加条件下で再現よく
高い生育を見せる2株を選抜**

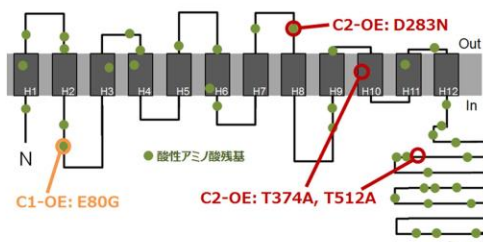
◆ 2株の変異型Kup導入株は高いCs⁺取り込み能を有する



◆ うち1株はより低濃度のCs⁺条件下でも高いCs⁺取り込み能を有する



5. 変異箇所の特定



- 大腸菌Kupは12回膜貫通構造を有する膜タンパク
- 複数の酸性アミノ酸残基がK⁺の認識・取り込みに重要 (Ref. 4)
- Cs⁺取り込みが向上した2つの変異型Kupのいずれにも酸性アミノ酸に変異
酸性アミノ酸残基がCs⁺に対する親和性にも影響？

6. まとめと展望

【まとめ】

- 人工進化によりCs⁺取り込みが向上した変異型Kupを2つ取得
- うち1つは低濃度Cs⁺条件 (10 μM) でも高い取り込み活性
- いずれの変異型Kupにも酸性アミノ酸に変異

【展望】

- 変異型KupのK⁺/Cs⁺取り込みのkinetics解析
- 変異型Kupをベースとしたさらなる人工進化実験
- 酸性アミノ酸をターゲットとした変異導入実験
- 変異型Kupの植物根での発現/植物Kupホモログの人工進化実験

References
 1. Bossemeyer D. et al., *J. Bacteriol.* 171:2219-2221 (1989).
 2. Kato S. et al., *Sci. Rep.* 6:20041 (2016).
 3. Kato S. et al., *Sci. Rep.* 7:1965 (2017).
 4. Sato Y. et al., *J. Biochem.* 155:315-323 (2014).

■ Contact to:
加藤創一郎
s.katou@aist.go.jp