

平成 19 年度科学研究費補助金実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 若手研究 (B) 4. 研究期間 平成 18 年度 ~ 平成 19 年度
5. 課題番号

1	8	7	1	0	0	6	4
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 好塩性細菌ハロモナスのセルフクロニング型アーミング細胞の開発と金属浄化への応用

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
3 0 3 2 4 9 8 2	ナカヤマ, ヒデキ 仲山, 英樹	バイオサイエンス研究科	助教

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名
	ナカヤマ		
	ナカヤマ		
	ナカヤマ		
	ナカヤマ		
	ナカヤマ		

9. 研究実績の概要(国立情報学研究所でデータベース化するため、600字～800字で記入。図、グラフ等は記載しないこと。)

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

好塩性細菌ハロモナス (*Halomonas elongata* OUT30018株) は、優れた環境適応能力を持ち、重金属浄化技術のツールとして非常に有用である。本研究では、本学で独自に解読したハロモナスゲノム情報を基にハロモナス細胞表層工学を確立し、セルフクロニング型アーミングハロモナスの作製及び高塩環境水圏の効率的な浄化技術の開発を最終的な目的とし、特に平成19年度は以下の研究を行った。

まず、平成18年度の研究成果により、ゲノム情報からハロモナス細胞表層工学のアンカータンパク質として選抜した外膜局在性リポタンパク質遺伝子について、ハロモナスを宿主としたプラスミド発現系を用いた解析を行った。そして、3%～18%NaClを添加した高塩環境下においてもハロモナス細胞表層工学のアンカーとして利用可能なりポタンパク質を選定した。

さらに、プラスミド由来の外来遺伝子配列を保持せずに、アンカーと金属結合ドメインを融合した「金属浄化型アームタンパク質」を細胞表層に提示したセルフクロニング型アーミングハロモナスを作製するため、ゲノム上のリポタンパク質遺伝子部位の利用を検討した。ゲノム上のリポタンパク質遺伝子プロモーターの支配下にHAタグを付加したキメラ遺伝子を導入したハロモナスにおいても、プラスミド発現系を用いた場合と同等の発現量が得られたことから、目的遺伝子の導入部位としてリポタンパク質遺伝子部位が利用可能であると結論した。さらに、金属浄化型アーミングハロモナスにおける標的金属の蓄積量が顕著に上昇したことから、本研究成果の重金属浄化技術開発への応用が期待される。

※ 成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差し控え期間等を記入した調査(A4 判縦長横書 1 枚)を添付すること。

10. キーワード

- | | | |
|-------------------------------|--------------|--------------|
| (1) <i>Halomonas elongata</i> | (2) 細胞表層工学 | (3) アーミング細胞 |
| (4) 好塩性細菌 | (5) リポタンパク質 | (6) 金属結合ドメイン |
| (7) 重金属浄化 | (8) セルフクロニング | (裏面に続く) |

11.研究発表（平成19年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計（ 0 ）件

著者名	論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
			・ ・ ・	

著者名	論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
			・ ・ ・	

著者名	論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
			・ ・ ・	

〔学会発表〕 計（ 9 ）件

発表者名	発表標題	
H. Nakayama	Display of phytochelatin-like peptides on cell surface of the moderately halophilic bacterium, <i>Halomonas elongata</i> OUT30018 as a novel strategy for metal-bioremediation of high salinity sites.	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 2007 international symposium and annual meeting of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology	2007. 6. 29.	Seoul, Korea

発表者名	発表標題	
仲山英樹	グラム陰性菌の細胞表面ディスプレイ技術の開発	
学会等名	発表年月日	発表場所
第18回「バイオテクノロジー産業化のための技術シーズ公開会」. NPO法人 近畿バイオインダストリー振興会議	2007. 8. 2.	大阪府大阪市

発表者名	発表標題	
古賀愛弓	中度好塩性細菌 <i>Halomonas elongata</i> OUT30018株における金属応答遺伝子の発現解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本生物工学会第59回大会	2007. 9. 25.	広島県東広島市

発表者名	発表標題	
仲山英樹	ハロモナス細胞表面ディスプレイシステムを用いた高塩環境浄化に有用な金属結合ドメインの探索	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本生物工学会第59回大会シンポジウム「ライフサイエンス構築をめざしたナノバイオとコンビバイオの融合の新しい展開」	2007. 9. 26.	広島県東広島市

発表者名	発表標題	
仲山英樹	好塩性微生物のゲノム情報から環境技術へ	
学会等名	発表年月日	発表場所
第30回日本分子生物学会フォーラム「分子生物学がいかに未来の地球環境に貢献できるか！」	2007. 12. 13.	神奈川県横浜市

発表者名	発表標題		
仲山英樹	塩類集積環境の金属浄化に有用なセルフクロニング型アーミングハロモナスの作製		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第30回日本分子生物学会年会	2007. 12. 14.	神奈川県横浜市	

発表者名	発表標題		
仲山英樹	ゲノム情報を活用した金属結合タンパク質の探索と環境メタルバイオへの応用		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本生物工学会メタルバイオテクノロジー研究部会シンポジウム「メタルバイオの可能性」	2008. 1. 8.	大阪府大阪市	

発表者名	発表標題		
河目祐介	塩類集積環境の重金属浄化に有用なセルフクロニング型アーミング <i>Halomonas elongata</i> の作製		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第2回日本微生物ゲノム学会年会	2008. 3. 7, 8. (ポスター, 口頭)	大阪府吹田市	

発表者名	発表標題		
仲山英樹	中度好塩性細菌 <i>Halomonas elongata</i> OUT30018株における銅応答性遺伝子の発現解析		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第2回日本微生物ゲノム学会年会	2008. 3. 7.	大阪府吹田市	

【図書】 計 (0) 件

著者名	出版社		
	書名	発行年	総ページ数

12. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

【出願】 計 (1) 件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別
グラム陰性菌の細胞表面発現システム	仲山英樹, 吉田和哉	同左	特許、PCT/JP2007/060153	2007.5.17	国際出願

【取得】 計 (0) 件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別

13. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

特許 (出願番号: PCT/JP2007/60153、公開番号: W02007/135958) に関するページ
<http://ipw.naist.jp/PatentSys/index.php>

好塩性細菌ハロモナス 細胞表面に重金属析出

奈良先端大

外膜リポたんぱく質選定

濃縮海水浄化などに応用

奈良先端科学技術大学院大学の仲山英樹助教らは、好塩性細菌ハロモナスの細胞表面に重金属をとらえるたんぱく質を出す技術を開発した。水中に微量に溶けている重金属類は塩分とともに濃縮される。高塩環境での重金属回収や製塩過程、海水淡水化プラントで発生する濃縮海水の浄化などへの応用が考えられる。

好塩性細菌ハロモナスはタイ東北部の乾燥地帯の塩類集積土壌で採集したもの。研究ではハロモナスのゲノム配列情報を活用し、細胞表面に出すことができる外膜リポたんぱく質を選定。海水程度の3%から6倍の18%の塩濃度でも細胞表面に出せることを確認した。

さらに、外膜リポたんぱく質選定とハロモナス由来の金属結合ペプチドを融合した遺伝子を構築、金属結合ペプチドを細胞表面に出すことができた。

実験では金属結合ペプチドを出したハロモナス細胞を用い、6%の高塩濃度条件下でカドミウム、銅、亜鉛の混合条件で選択的な重金属浄化試験を行った。すると金属が高い場合、亜鉛が高い場合があった。

このため選択的に特定重金属を回収できる可能性がある。重金属はイオンとしてとらえるため、酸化剤などを用いれば比較的容易に回収できるとみられる。

また外膜リポたんぱく質選定がハロモナスの塩耐性には影響がないことを確認した。

科学新聞 19年9月21日2面

細菌の重金属析出細胞表面
奈良先端科学技術大学院大学の仲山英樹助教らは、好塩性細菌ハロモナスの細胞表面に重金属を捉えるタンパク質を出す技術を開発した。この細菌のゲノム配列情報を活用し、細胞表面に出すことができる外膜リポたんぱく質を選定。海水程度の3%から6倍の18%の塩濃度でも細胞表面に出せることを確認した。さらに、外膜リポタンパク質選定とハロモナス由来の金属結合ペプチドを融合した遺伝子を構築、金属結合ペプチドを細胞表面に出すことができたという。

(日刊工業3日)