

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06274

研究課題名(和文) 土壌細菌・高等動物における有機ヒ素還元・分解の分子機構研究

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanisms for reduction/degradation of organoarsenicals by soil bacteria and higher animals

研究代表者

吉永 雅史 (Yoshinaga, Masafumi)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：80754978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：有機ヒ素は諸外国で農業利用されているが、細菌によって毒性の高い無機ヒ素へと分解されるため、使用継続による環境汚染拡大が懸念されている。有機ヒ素代謝は高等動物でも報告されているが、細菌・動物いずれにおいても、その分子機構についてはほとんど分かっていない。そこで本研究では、有機ヒ素分解に関連する新規遺伝子の同定を試みた。新規遺伝子の同定には至らなかったが、細菌による一部の有機ヒ素分解経路において、新たな反応ステップの存在を明らかにした。また、代表者が以前発見していた有機ヒ素分解酵素について生化学・構造生物学的解析を行った結果、そのユニークな酵素反応機構の詳細を分子レベルで明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Organoarsenicals have been used for agricultural purposes in various countries. However, because they are degraded by microbes into more toxic inorganic arsenicals in the environment, spreading of the environmental pollution by the continued uses has been concerned. Although metabolisms of organoarsenicals have been reported also in higher animals, the molecular mechanisms either for microbes or animals have not been well understood yet. In this study, therefore, I attempted to identify novel genes related to organoarsenical degradation. Although no novel genes were identified, I could identify a new additional step for degradation pathways for specific organoarsenicals by microbes. In addition, I performed further biochemical and structural biological analyses on the organoarsenical degrading enzyme that I previously identified and clarified the detail of the unique reaction mechanism at molecular level.

研究分野：環境微生物学

キーワード：応用微生物 環境 細菌 有機ヒ素分解

1. 研究開始当初の背景

有害元素ヒ素は、環境中で様々な化学形態変化を受け、それに伴い毒性も著しく変化する。よって、環境中のヒ素の生態系・人体への影響を正確に把握するには、それら化学形態変化に関わる分子機構の理解が欠かせない。

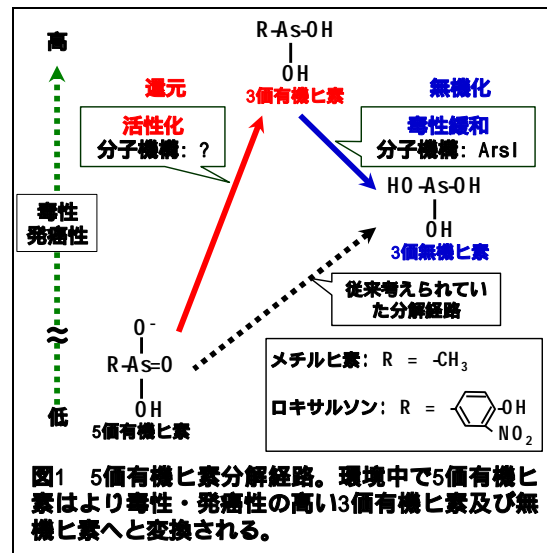
5価有機ヒ素は、その低毒性から環境負荷が低いとされ、モノメチルヒ素[MAs(V)]の5価メチルヒ素は除草剤、ロキササルソン[Rox(V)]等の5価モノフェニルヒ素は家畜の感染症予防薬として、それぞれ諸外国で広く利用されてきた。

これら環境中の5価有機ヒ素は、微生物によってより毒性・発癌性の高い無機ヒ素へと分解されるため、ヒ素汚染進行による生態系や公衆衛生への悪影響が憂慮されている。一方で、その分解分子機構についてはほとんど分かっておらず、有機ヒ素利用のより正確な環境アセスメントのために、その詳細説明が急務である。

代表者らは、有機ヒ素分解の分子機構解明を目指し、MAs(V)分解活性を持つ土壌試料を用いて研究を遂行した。結果、MAs(V)が異なる細菌種によって触媒される<還元>と<無機化>の二段階反応ステップを経て3価無機ヒ素[As(III)]に分解される新規経路を発見した(図1)。本経路第一ステップで、MAs(V)は3価モノメチルヒ素[MAs(III)]に還元され、無機ヒ素以上に高い毒性・発癌性を示すようになる。これより、第二ステップ無機化がMAs(III)に対する防御機構であることが考えられた。そこで、単離されたMAs(III)無機化菌 *Bacillus* sp. MD1のゲノムライブラリーを大腸菌を用いて作成、MAs(III)耐性を指標に原因遺伝子同定を試みた結果、新規ヒ素耐性遺伝子 *arsI* を発見、本遺伝子が炭素-ヒ素結合の開裂を行う新規の二価鉄依存性ジオキターゼをコードし、MAs(III)無機化を通してヒ素耐性に寄与することを明らかにした。*ArsI*は3価ロキササルソン[Rox(III)]をはじめとする3価モノフェニルヒ素の無機化も行うことから、Rox(V)等の5価モノフェニルヒ素もMAs(V)同様、環境において還元と無機化の二段階反応ステップを経てAs(III)へと分解されることが強く示唆されている。一方、本分解経路第一ステップの還元については、その分子機構は全く分かっていない。

ヒトを含む高等動物において、摂取された無機ヒ素の多くは体内でメチルヒ素へと変換された後、体外へ排出される。これら一連のヒ素代謝機構については分子理解が進んでいる一方、メチルヒ素還元に関しては、高等動物体内でも報告があるものの、その分子機構については不明な部分が多い。メチルヒ素は還元を通してその毒性・発癌性を著しく向上

させるため、ヒト体内における本反応の理解推進は、ヒ素の健康リスクをより正確に評価する上で大変重要である。



2. 研究の目的

これらの背景を元に、本研究では、土壌細菌における有機ヒ素分解の分子機構の詳細解明を目指し、関連遺伝子群の同定を試みた(1)。加えて、現在知られている唯一の有機ヒ素分解酵素である *ArsI* についても、生化学及び構造生物学的解析を行った(2)。また、追加検討事項として、高等動物における有機ヒ素還元・分解機構の理解の推進を目的に、マウス及びヒト培養細胞を使った予備的研究も並行して行った(3)。

3. 研究の方法

(1) 有機ヒ素還元酵素遺伝子の同定

代表者らは、細菌のヒ素耐性オペロン(*ars*)のリプレッサー *ArsR* が、3価ヒ素存在下でのみ調節遺伝子の発現誘導を行うことに着目、本性質を利用した目的遺伝子選別法を考案、そのためのプラスミド pBAD-*arsR*-*P_{ARS}*-*kan^r* を既に作成していたため、本プラスミド保持株を用いてMAs(V)還元菌ゲノムライブラリーを作成、アラビノース及びMAs(V)存在下でのカナマイシン耐性を指標にしたMAs(V)還元の原因遺伝子保持株の選別を試みた。得られた各陽性クローンについて、擬陽性の可能性もあるため、MAs(V)還元活性をLC-ICP-MSで確認した。*ArsR*はRox(III)にも同様の応答を示すため、Rox(V)還元の原因遺伝子同定にも同手法を利用した。本手法に加え、以下の2手法による遺伝子同定についても試みた。

AcAs(V)を利用した遺伝子選別法：5価モノアセテートヒ素[AcAs(V)]は、MAs(V)のメチル基をアセテート基(-CH₂-COO-)に置換したもので、その構造類似性からMAs(V)同様、MAs(V)還元・MAs(III)無機化の両機構を通して

As(III)に分解されると考えられ、本分解で生じる二炭素化合物は細菌生育の炭素源になると予測された。そこで、AcAs(V)を利用した目的遺伝子選別法構築が可能であるかを調べるため、*arsI*常発現ベクターを保持する大腸菌株とMAs(V)還元菌をAcAs(V)を炭素源とする最少培地で培養し、AcAs(V)が無機ヒ素に分解されるかについて解析を行った。

逆遺伝学的方法：逆遺伝学的方法による遺伝子同定が可能であるかを調べるため、還元菌破砕液をMAs(V)と反応させ、MAs(V)の還元が起こるかについて解析を行った。

Rox(V)等のモノフェニルヒ素の還元については、まだ予備的なデータが得られている段階であったため、様々な条件で培養を行い、その還元能についてより詳細について解析を行った。

(2)有機ヒ素分解酵素 *ArsI* の生化学及び構造生物学的解析

生化学的解析:*ArsI* は非ヘム 2 価鉄依存性ジオキシダーゼであり、3 価有機ヒ素内の炭素-ヒ素結合の開裂を触媒する。*ArsI* は、そのアミノ酸配列の解析を通して、芳香環の炭素-炭素結合の開裂を触媒する芳香環開裂ジオキシダーゼと大変高い相同性を持つことが示唆されていた。これより、*ArsI* が芳香環開裂ジオキシダーゼ同様、2 価鉄結合部位を持ち、その部位を活性中心とする反応機構を持つことが予測された。その一方で、芳香環開裂ジオキシダーゼに見られない特徴も見られ、特にその基質結合機構については、独特の特徴・構造を持つことが示唆されていた。そこで、2 価鉄結合及び基質結合に寄与すると予測された各アミノ酸残基に変異を導入した遺伝子を作成、各変異遺伝子を発現する大腸菌およびそれら大腸菌を用いて発現・精製した変異タンパク質を用いて様々な解析を行い、各アミノ酸残基と 2 価鉄・基質結合能との関連性の詳細を調べた。

構造生物学的解析:*ArsI* について、鉄を初めとする種々の 2 価金属及び MAs(III)や Rox(III)といった基質との結晶化を試みた。得られた各種結晶タンパク質について、構造の詳細を解析した。

(3)マウス・ヒト培養細胞を用いた解析

マウスによる有機ヒ素還元・分解能の解析:マウスに 5 価有機ヒ素(MAs(V)あるいは Rox(V))を含む水を一定期間与えた後、ヒ素の代謝・解毒を行う主要臓器である腎臓、ラットで有機ヒ素の還元が報告されている血液をそれぞれ摘出・採取後、作成した抽出液のヒ素化学種を LC-ICP-MS を用いて解析、有機ヒ素の還元能について調べた。

ヒト培養細胞による有機ヒ素還元・分解能の解析:ヒトの肝細胞を 5 価有機ヒ素(MAs(V)あるいは Rox(V))を含む専用培地で一定期間

培養後、培地及び細胞抽出液のヒ素化学種を LC-ICP-MS を用いて解析、有機ヒ素の還元能について調べた。

4. 研究成果

(1)有機ヒ素還元酵素遺伝子の同定

まず、pBAD-*arsR*-*P_{ARS}*-*kan^R* 保持株を用いて MAs(V)還元菌ゲノムライブラリーを作成、アラビノース及び MAs(V)存在下でのカナマイシン耐性を指標にした MAs(V)還元の原因遺伝子保持株の選別を試みた。その結果、いくつかの陽性株が得られたが、MAs(V)還元活性を LC-ICP-MS で確認したところ、いずれも擬陽性であった。Rox(V)をはじめとする 5 価モノフェニルヒ素についても同様の選別を行ったものの、活性を持つ陽性株の単離には至らなかった。次に、AcAs(V)を利用した遺伝子選別法が目的遺伝子の同定に有効であるかどうかを調べるため、*arsI* 常発現ベクターを保持する大腸菌株と MAs(V)還元菌を AcAs(V)を炭素源とする最少培地で培養し、AcAs(V)が無機ヒ素に分解されるかについて解析を行った。その結果、MAs(V)の分解能には劣るものの、AcAs(V)もこれら細菌の共培養によって無機ヒ素まで分解されることが明らかとなった。しかしながら、目的遺伝子選別法に利用するには活性が低すぎたことから、最後に逆遺伝学的方法によるアプローチを試みることにした。まず、MAs(V)還元菌の破砕液から MAs(V)還元活性が検出されるかどうか調べたところ、ほとんどそのような活性は見られず、種々の還元剤や補酵素、金属イオン等を反応液に追加しても結果は同様であった。以上、様々な手法を試みたものの、残念ながら、有機ヒ素還元の原因遺伝子を同定することはできなかった。

モノフェニルヒ素の還元について、より詳細を解析した結果、対象化合物が特定の官能基を有する場合、ヒ素部分の還元が起こる前にその官能基部位の還元がまず起こることが分かり、一部のモノフェニルヒ素化合物に対しては、より複雑な分解経路を経ることが明らかとなった。今後の展望として、有機ヒ素還元酵素とともに、その原因遺伝子の同定が望まれる。

(2)有機ヒ素分解酵素 *ArsI* の生化学及び構造生物学的解析

生化学的解析:*ArsI* において、2 価鉄結合及び基質結合に寄与すると予測された各アミノ酸残基に変異を導入した遺伝子を作成、各変異遺伝子を発現する大腸菌の有機ヒ素分解能を解析したところ、いずれの株も活性を失っていることが分かり、これらのアミノ酸残基のそれぞれが活性に重要な働きをしていることが確認できた。それぞれの変異タンパク質について、発現・精製し、その活性を調べたところ、やはり同様の結果が得られ

た。次に、これら活性の失活の原因について各精製タンパク質を用いて解析を行った結果、これらの変異によって2価鉄や基質への結合能が著しく低下することが分かり、本酵素の活性に、これらの結合能が必須であることが明らかとなった。

構造生物学的解析: Arslについて、2価金属及び MAs(III)や Rox(III)といった基質との結晶化を試みた結果、コバルト、ニッケルを活性中心に保持した Arsl の結晶化に成功し、その構造を明らかにした。これより、Arsl が芳香環開裂ジオキシダーゼの活性サブユニットと極めて類似した構造を持ち、その活性中心を担う2価鉄結合部位が両者で高く保存されていることが分かった。基質との結晶化はうまく行かなかったものの、Arsl が芳香環開裂ジオキシダーゼにはない独特の基質結合フレキシブルループ構造を有することも明らかとなった。以上の結果から、酵素反応自体は芳香環開裂ジオキシダーゼの機構を利用しつつも、基質の捕獲・活性中心への基質の移行を独自の基質結合フレキシブルループ構造で行うことが示唆され、そのユニークな酵素反応のメカニズムを分子レベルで明らかにすることができた(図2)。

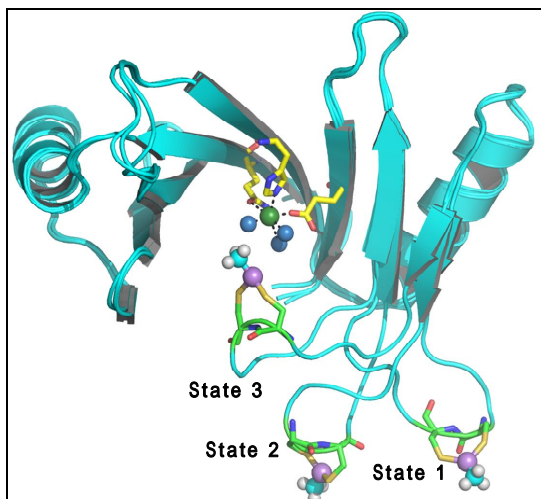


図2. Arslの結晶構造と基質結合フレキシブルループ構造。Arslに独自の基質結合フレキシブルループ構造が基質を捕獲(State 1)、活性中心へと基質を移行(State 3)することで酵素反応が進行する。

(3)マウス・ヒト培養細胞を用いた解析

マウスによる有機ヒ素還元・分解能の解析: マウスに5価有機ヒ素(MAs(V)あるいはRox(V))を含む水を一定期間投与したマウスの腎臓及び血液に含まれるヒ素化学種をLC-ICP-MSを用いて解析を行ったが、有機ヒ素の還元活性の検出には至らなかった。

ヒト培養細胞による有機ヒ素還元・分解能の解析: ヒトの肝細胞についても同様の解析を行ったが、明らかな有機ヒ素還元活

性の検出には至らなかった。

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 2 件)

(1) Masashi Kato, Mohammad Daud Azimi, Said Hafizullah Fayaz, Muhammad Dawood Shah, Md. Zahirul Hoque, Nobuyuki Hamajima, Shoko Ohnuma, Tomomi Ohtsuka, Masao Maeda, Masafumi Yoshinaga, Uranium in well drinking water of Kabul, Afghanistan and its effective, low-cost depuration using Mg-Fe based hydrotalcite-like compounds, Chemosphere, 査読有, Vol.165, 2016, pp. 27-32

(2) Venkadesh Sarkarai Nadar, Masafumi Yoshinaga, Shashank S. Pawitwar, Palani Kandavelu, Banumathi Sankaran, Barry P. Rosen, Structure of the Arsl C-As Lyase: Insights into the Mechanism of Degradation of Organoarsenical Herbicides and Growth Promoters, Journal of Molecular Biology, 査読有, Vol.428, No.11, 2016, pp. 2462-2473

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/hygiene/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉永 雅史 (YOSHINAGA, Masafumi)
名古屋大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号: 80754978

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし