

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18907

研究課題名(和文) 微生物由来Mer輸送体の有害金属輸送活性の解析と有害金属複合汚染浄化への利用

研究課題名(英文) Role of Mer transporters in the transport of toxic metals in Escherichia coli.

研究代表者

曽根 有香 (SONE, Yuka)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：60550035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はこれまでに水銀耐性菌由来のMer輸送体が無機水銀だけでなく、メチル水銀やフェニル水銀を輸送することを見出した。本研究ではMer輸送体の有害金属輸送活性の解析および有害金属複合汚染浄化への利用性を検討した。その結果、MerC、MerE、MerF、MerTがそれぞれカドミウム及び亜ヒ酸輸送活性を有することが明らかとなった。さらにMerCはクロム酸輸送活性を有することが示された。水銀輸送体として同定されたMer輸送体の中でもMerCが水銀をはじめカドミウム、ヒ素、クロムなど多様な金属輸送活性を持つことが明らかとなったことから、有害金属複合汚染に適用できることが期待された。

研究成果の概要(英文)：The characteristics of bacteria take up mercury into cells via Mer superfamily, i.e., MerC, MerE, MerF, or MerT, have been applied in engineering of bioreactor used for mercurial bioremediation. Our objective was to clarify individual role of MerC, MerE, MerF, or MerT and potential in transport of toxic metals. The *E. coli* cells that carried control vector or mer recombinants were suspended in LB broth containing Cd(II), As(III), or Cr(VI) and incubated for various time, respectively. The cells that expressed MerC, MerE, MerF, or MerT accumulated significantly more Cd, or As than control. MerC recombinants accumulated significantly more Cr than control. Consequently, we demonstrated that MerC, MerE, MerF, and MerT are broad-spectrum toxic metals transporters. Our results suggested that all Mer transporters can be used for designing toxic metals bioremediation systems, moreover, MerC is the most efficient tool.

研究分野：環境薬学

キーワード：水銀耐性遺伝子 有害金属輸送活性 複合汚染浄化

1. 研究開始当初の背景

アフリカ、アジア、中南米の小規模金採掘の現場では、金の抽出に水銀が使用され、これまでに 2000 トン以上の気化した水銀が河川や土壌を汚染している。日本ではメチル水銀による水俣病や、カドミウムによるイタイイタイ病などを経験した。現在まで有害金属による国土の土壌汚染は継続しており、低濃度・広範囲な汚染が問題となっている。また、東日本大震災の津波堆積物が農地にヒ素、鉛、カドミウム、銅などの有害金属の複合汚染をもたらした (Shima *et al.* Bull. Miyagi Pref. Furukawa Agric. Exp. Stn. 2012; 10: 33-42)。これらの背景から、土壌浄化の社会的ニーズは増加しており、有害金属の安全かつ有効な除去法の開発が求められていた。

環境汚染物質の浄化技術として植物の生理活性を利用したファイトレメディエーションが注目されていた。この方法は、既存の浄化技術である物理化学的手法に比べ経済的で自然への影響が少ないという利点を有する一方で、野生植物を用いた浄化は時間を要し、処理効率が低いという欠点を抱えた。植物の浄化効率を向上させるためには、植物が積極的に有害金属を吸収する能力を持つことが必要であり、有害金属輸送体の利用が有効であると考えられた。

また、自然界には水銀に対する耐性能を獲得した水銀耐性菌が多数存在する。水銀耐性菌は水銀取り込み型輸送体を保持し、MerE, MerF, MerT, MerC の 4 種が同定されていた。筆者が MerE, MerF, MerT, MerC の無機水銀及び酢酸フェニル水銀の輸送活性について比較検討したところ、MerE, MerF, MerT, MerC 全てがフェニル水銀輸送活性を有した。また、Mer 輸送体の無機水銀輸送能は既知であったが、中でも MerC の無機水銀取り込み活性が最も高いことを見出し、水銀浄化に対して MerC が最も有用な因子であると考えられた (Sone *et al.*, Biol Pharm Bull. 2013; 36: 1835-41)。さらに、近年 Mer 輸送体が水銀の他にカドミウムを取り込む可能性を見出したことから、Mer 輸送体が水銀以外の有害金属を輸送する活性を有するか検討する必要性が生じた。また、Mer 輸送体の有害金属選択性や輸送活性を調べることで、環境中の有害金属による複合汚染の浄化に利用できると考えた。

2. 研究の目的

有害金属による複合的な環境汚染が問題となっており有効な除去法の開発が求められている。植物の生理活性を利用した浄化方法であるファイトレメディエーションは経済的で環境への影響が少ないという利点を持つ。しかし浄化期間・浄化効率が悪いという欠点を抱えるため、金属を効率的に取り込む輸送体の利用が有効であると考えられる。筆者はこれまでに水銀耐性菌由来の Mer 輸送体が無機水銀だけでなく、メチル水銀やフェ

ニル水銀を輸送することを見出した。Mer 輸送体は水銀、カドミウム、クロム、ヒ素等の有害金属複合汚染の浄化に有効であることが期待され、本研究では Mer 輸送体の有害金属輸送活性について解析すると共に、複合汚染の浄化活性について明らかにすることで有害金属浄化効率の向上を目指した。

3. 研究の方法

(1) MerE, MerF, MerT, MerC の有害金属耐性及び取り込み活性

カドミウム耐性及び取り込み活性

各 Mer 輸送体を組換えた大腸菌を用いてカドミウムに対する耐性及び取り込み活性評価を行った。Pseudomonas K-62 株由来プラスミド pMR26 上の水銀調節遺伝子 (*merR-o/p*) の下流に水銀輸送遺伝子 (*merC, merE, merF, merT*) をそれぞれ組換えたプラスミド pC7, pE4, pF17, pT5 を形質転換した大腸菌を評価に使用した。コントロールとして pKF19k を形質転換した大腸菌を用いた。

耐性評価は、Growth curve 法を用いて行った。菌数を一定にした各遺伝子組換え大腸菌の再懸濁液に種々の濃度の CdCl₂ 溶液を滴下し 37 °C で一晚培養した。培養後の菌液の濁度を指標に菌の増殖率を測定することでカドミウムに対する耐性を評価した。取り込み活性は以下の方法で評価した。各遺伝子組換え大腸菌を LB 培地で 3-4 時間発現誘導し、菌数を揃えて再懸濁した。再懸濁液に各濃度 CdCl₂ 溶液を添加し、37 °C で反応させた。硝酸を用いて灰化处理した溶液をフレイム式原子吸光光度計により測定することで各組換え株の Cd 取り込み量を評価した。

ヒ素及びクロム取り込み活性

上述(1)で用いた各遺伝子組換え大腸菌を LB 培地で 3-4 時間発現誘導し、菌数を揃えて再懸濁した。再懸濁液に各濃度の NaAsO₂ または CrO₃ 溶液を添加し、37 °C で反応させた。硝酸を用いて灰化处理した溶液を誘導結合プラズマ発光分光分析計により測定することで各組換え株の As または Cr 取り込み量を評価した。

(2) 有害金属複合汚染における Mer 輸送体の取り込み活性評価

有害金属の取り込み活性比較の結果から、複数の有害金属を取り込む活性を持つと示された MerC について、無機水銀と有害金属を複数組み合わせた複合汚染条件下における取り込み活性について検証した。

Pseudomonas K-62 由来の水銀調節遺伝子 (*merR-o/p*) の下流に *Shigella flexneri* 由来の *merC* 遺伝子を導入したプラスミド pC7 を形質転換した大腸菌を評価に用いた。pKF19k ベクターを形質転換した大腸菌をコントロール株として用いた。Hg+Cd, Hg+As および Hg+Cr ばく露条件下で、各クローンの水銀取り込み量は還元気化原子吸光光度法により、カドミウム、ヒ素およびクロム取り込み量は

誘導結合プラズマ発光分光分析法により測定した。

4. 研究成果

(1)-

カドミウム耐性について検討した結果、MerC, MerE, MerF, MerT 組換え株はコントロールに比べ耐性がそれぞれ有意に低かった (Fig.1A)。濃度別 Cd²⁺ 取り込み量を調べた結果、100 μM Cd²⁺ 添加条件では、MerC 組換え株はコントロールに比べ取り込み量が有意に高かった。300 μM および 500 μM Cd 添加条件では、MerC, MerE, MerF, MerT 組換え株の Cd²⁺ 取り込み量がコントロールに比べそれぞれ有意に高かった (Fig.1B)。次に、時間依存的な Cd²⁺ 取り込み量について検討したところ、MerC, MerE, MerF, MerT 組換え株の Cd 取り込み量はそれぞれ経時的に増加した。以上より、MerC, MerE, MerF, MerT はそれぞれカドミウム取り込み活性を有することが明らかとなった。

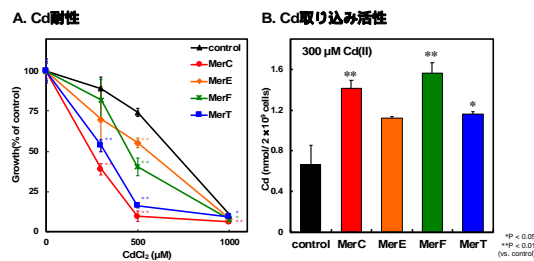


Fig. 1 カドミウムに対する耐性及び取り込み活性

(1)-

MerC, MerE, MerF および MerT 組換え株の As 取り込み量はコントロールに比べそれぞれ有意に高かった (Fig.2A)。また、MerE, MerF または MerT 組換え株はコントロールとほぼ同等の Cr 取り込み量を示したが、MerC 組換え株の Cr 取り込み量はコントロールに比べ有意に高かった (Fig.2B)。以上の結果から、MerC, MerE, MerF および MerT はそれぞれ亜ヒ酸輸送活性を有すると示唆された。この中でもクロム酸輸送活性を有する MerC は水銀、カドミウム、ヒ素、クロムなど最も多様な金属輸送活性を持つことが明らかとなった。MerC は有害金属のバイオレメディエーションに適用できる最も有力な候補因子であると考えられた。

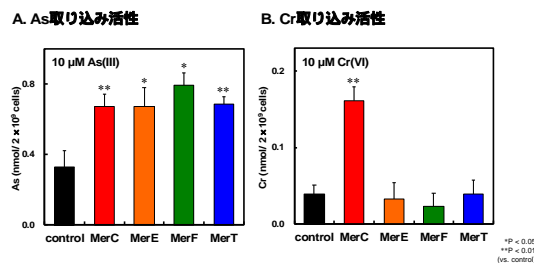


Fig. 2 亜ヒ酸及びクロム酸取り込み活性

(2)

Hg+Cd および Hg+As ばく露条件において、MerC 組換え株の Hg 取り込み量は Cd または As の共存による影響を受けず、コントロールに比べ有意に高かった (Fig.3AB)。一方、MerC 組換え株の Cd および As 取り込み量は Hg が存在するとコントロールとほぼ同等となった (Fig.3AB)。また、Hg+Cr ばく露条件では、MerC 組換え株の Hg 取り込み量および Cr 取り込み量は互いの共存金属による影響を受けず、それぞれコントロールに比べ有意に高かった (Fig.3C)。これらの結果から、MerC は Cd や As よりも Hg に対して高い基質選択性を有することが示された。一方、MerC の Hg と Cr の選択性が等しいことから、Hg と Cr の複合汚染に適應することが明らかとなった。

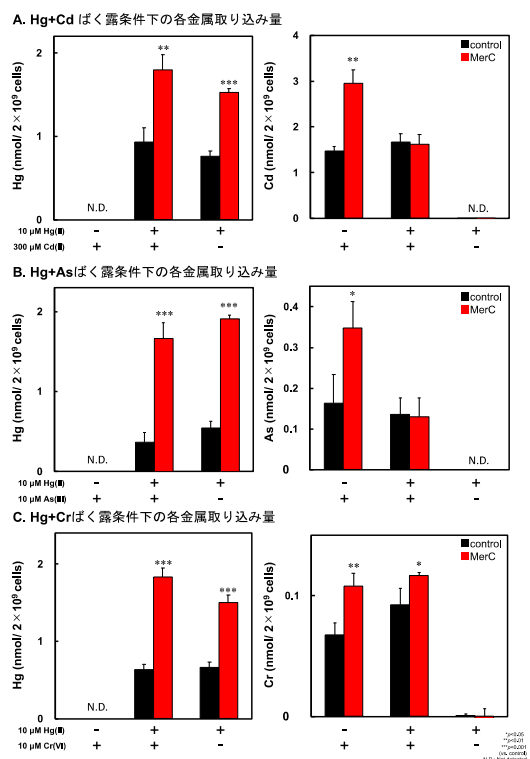


Fig. 3 水銀トランスポーターMerCの金属選択性

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)

Yuka Sone, Shimpei Uraguchi, Yasukazu Takanezawa, Ryosuke Nakamura, Hidemitsu Pan-Hou, Masako Kiyono. Cysteine and histidine residues are involved in *Escherichia coli* Tn21 MerE methylmercury transport. *FEBS open bio* 査読有、Vol.7 (2017) 1994-1999. doi: 10.1002/2211-5463.12341.

Yuka Sone, Shimpei Uraguchi, Yasukazu Takanezawa, Ryosuke Nakamura, Hidemitsu Pan-Hou, Masako Kiyono. A

Novel Role of MerC in Methylmercury Transport and Phytoremediation of Methylmercury Contamination. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 査読有、vol.40 (2017) 1125-1128. doi: 10.1248/bpb.b17-00213.

〔学会発表〕(計6件)

曾根有香、金子莉子、浦口晋平、中村亮介、高根沢康一、清野正子、水銀トランスポーターMerCの金属選択性に関する研究、日本薬学会第138年会、2018年

Yuka Sone, Shimpei Uraguchi, Ryosuke Nakamura, Yasukazu Takanezawa, Masako Kiyono. Role of Mer in the transport of toxic metals in *Escherichia coli*. FEMS 2017. 2017年

曾根有香、浦口晋平、中村亮介、高根沢康一、清野正子、水銀トランスポーターMerC, MerE, MerF, MerTのヒ素およびクロム輸送に関する研究、日本薬学会第137年会、2017年

曾根有香、浦口晋平、中村亮介、高根沢康一、清野正子、水銀トランスポーターMerCを利用したメチル水銀高蓄積性植物の作出、日本薬学会第136年会、2016年

Yuka Sone, Ryosuke Nakamura, Yasukazu Takanezawa, Shimpei Uraguchi, Masako Kiyono. Role of Mer in the transport of mercurials in *Escherichia coli*. Pacificchem 2015. 2015年

Yuka Sone, Ryosuke Nakamura, Yasukazu Takanezawa, Shimpei Uraguchi, Masako Kiyono. Role of MerC, MerE, MerF, or MerT in the transport of mercurials in *Escherichia coli*. ICOBTE 2015. 2015年

〔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

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/kouei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾根 有香 (SONE, Yuka)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：60550035