

令和元年6月22日現在

機関番号：31302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14333

研究課題名(和文)細菌を用いた新規ヒ素検出・定量システムの開発

研究課題名(英文)Development of arsenic detection and quantification systems using bacteria

研究代表者

宮内 啓介(Miyauchi, Keisuke)

東北学院大学・工学部・教授

研究者番号：20324014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細菌のヒ素耐性遺伝子群とその転写制御系を用いた水環境中のヒ素検出システムを開発した。亜ヒ酸存在下で転写抑制を解く転写制御因子ArsRとそれが結合するプロモーター領域を用いたレポータープラスミドを構築し、宿主細菌に導入することで、水溶液中のヒ酸及び亜ヒ酸を検出可能な系を構築した。さらに、ヒ素の排出ポンプ遺伝子を含む遺伝子群の破壊株を用いることでヒ素に対する感度を上昇させること、リン酸存在下で測定することで亜ヒ酸のみに反応する系を構築することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サンプルと混合してインキュベートし発光量を測定するだけで、環境基準値以下の濃度のサンプルでも亜ヒ酸を検出可能な系を構築することができた。また、既知のヒ酸還元酵素遺伝子以外にもヒ酸還元に関与している遺伝子の存在が示唆されるなど、細菌とヒ素の関わりに関する新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：An Arsenic detection system using bacteria and their arsenic resistant system was developed. A reporter plasmid in which the arsR gene and the promoter region of arsenic resistant genes including ArsR-binding site were inserted upstream of the luciferase gene, was constructed. The ArsR represses the transcription of the arsenic resistant genes and de-represses it in the presence of arsenite. It was shown that the resultant transformant can detect both arsenate and arsenite. By using a mutant lacking arsenite efflux pump genes, the sensitivity toward arsenic was enhanced. By adding the phosphate buffer during incubation, the strain can detect only arsenite.

研究分野：環境工学、応用微生物学

キーワード：ヒ素 検出システム バイオセンサー ヒ素耐性遺伝子群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒ素は地殻中に多く存在しており、自然由来のヒ素による環境汚染は日本でもしばしば問題となっている。申請者は東日本大震災を契機として、ヒ素によって汚染された土壌の植物を用いた浄化に関する研究を進めており、ヒ素で汚染された津波被害土壌や鉱山近隣の土壌を用いて国内外で浄化実験をおこなってきた。ヒ素汚染が疑われる土壌や水を調べる際には、ICP-MS や原子吸光度計を用いたヒ素濃度の分析を行うが、これらの解析には多額の費用と大規模な機器が必要となる。また、簡易的な比色法を用いたツールも市販されているが、やはり時間・機器・コストが障害となる。さらにヒ素分析を煩雑にさせているのが環境中のヒ素の化学形態である。環境中のヒ素は3価の亜ヒ酸または5価のヒ酸の形で存在することが知られており、この2つを分けて測定するために、ヒ素濃度測定の前段に、高速液体クロマトグラフやヒ酸吸着用イオン交換カラム等を用いた分離をおこなっており、これもコスト高の一因となっている。一方申請者はこれまでに細菌のヒ素耐性に関する分子生物学的解析をおこなっており(下図)多くの細菌がヒ素耐性を有していること、細菌は細胞内でヒ酸を亜ヒ酸に変換しそれを排出することで耐性を得ていること、亜ヒ酸に反応して上記の酵素遺伝子群の転写のスイッチを入れるタンパク質(ArsR)が存在することが明らかになっている。一般に細菌のヒ素耐性は高く、環境基準の1000~10000倍のヒ素濃度でも生育する。しかし、排出タンパク質をコードする遺伝子を破壊することで、低濃度のヒ素でも菌体内に濃縮され、その耐性が大きく下がること明らかとなった。そこで、この菌株を用いることで、環境中の低濃度のヒ素の検出が可能なのではないか、という着想に至った。また、ヒ酸と亜ヒ酸の分離に関しても、ヒ酸の取り込みに関与しているリン酸トランスポーターの働きを制御することによって、菌体内に亜ヒ酸のみまたはヒ酸と亜ヒ酸の両方を取り込ませることで2つの形態の濃度を簡便に測定することが可能になると考えられる。

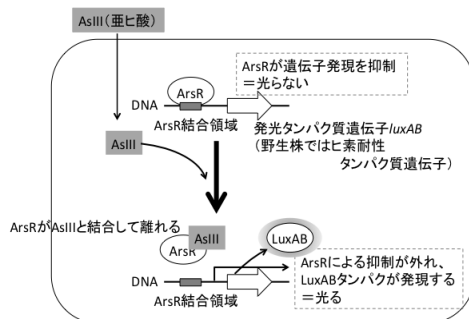


図 細菌が亜ヒ酸に反応して
遺伝子を発現するメカニズム

2. 研究の目的

細菌のヒ素耐性遺伝子群とその転写制御系を用いた水環境中のヒ素検出システムを開発する。ヒ素の排出ポンプ遺伝子の変異株を用いることで、ヒ素に対する感度を上昇させることと、ヒ酸・亜ヒ酸、それぞれを検出できる系とすることを目的とする。可能であれば定量する系も構築する。

3. 研究の方法

(1) ヒ素検出系の構築

宿主細菌として土壌細菌の一種である *Rhodococcus erythropolis* IAM1399 を用いた。IAM1399 は高いヒ素耐性を有しており、ゲノム上にヒ素耐性遺伝子群を2セット(ars1領域とars2領域)保持していることが明らかとなっている。ars1領域には *arsR1arsB1arsC1* 遺伝子群が、ars2領域には *arsR2arsB2arsC2arsC3arsC4arsD1arsA1* 遺伝子群がコードされている。IAM1399のars1及びars2遺伝子群を破壊した破壊株(ars1 ars2株)も宿主として用いた。ars1 ars2株は、ヒ素感受性株である。

レポータープラスミドとして、pKLAParsR3+arsR を構築し、これを用いた。本プラスミドは、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼ 遺伝子 (*luxAB*) の上流に *Rhodococcus jostii* RHA1 の *arsR* 及びその上流のプロモーター領域を挿入したプラスミドである。

ヒ酸還元酵素遺伝子 *arsC* の高発現用プラスミドは、構成的発現を行う *aphII* 遺伝子のプロモーターの下流に *arsC* 遺伝子を挿入した遺伝子断片を、*Rhodococcus* - *E. coli* シャトルベクターである pFAJ2574 (De Mot, R. et. al., Microbiology, vol.143, 3137-47) に挿入することで構築した。それぞれのプラスミドは、宿主細胞にエレクトロポレーションで導入し実験に用いた。

(2) 培養と発光量測定

菌体はLB培地を用いて培養した。前培養液を新たな培地に加え、ヒ酸、または亜ヒ酸存在下

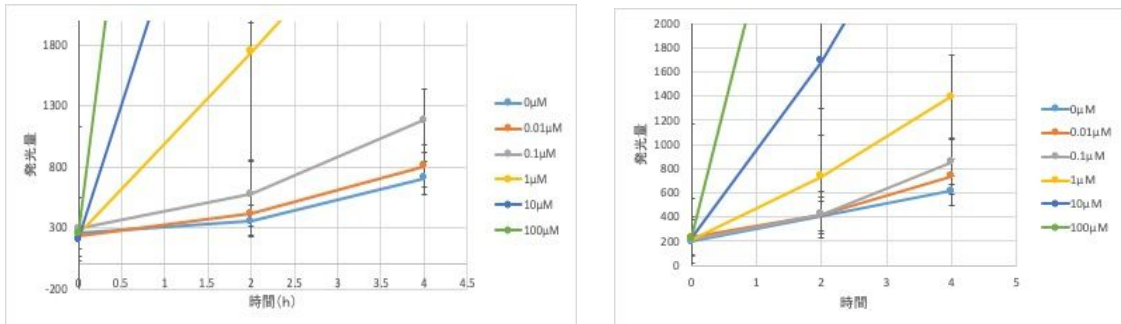
で菌体を培養した。一定時間後に菌液をサンプリングし、発光量をプレートリーダーで測定した。必要に応じて、1 M リン酸バッファー (pH7.0) を培養液の 1/10 量加えた。

4. 研究成果

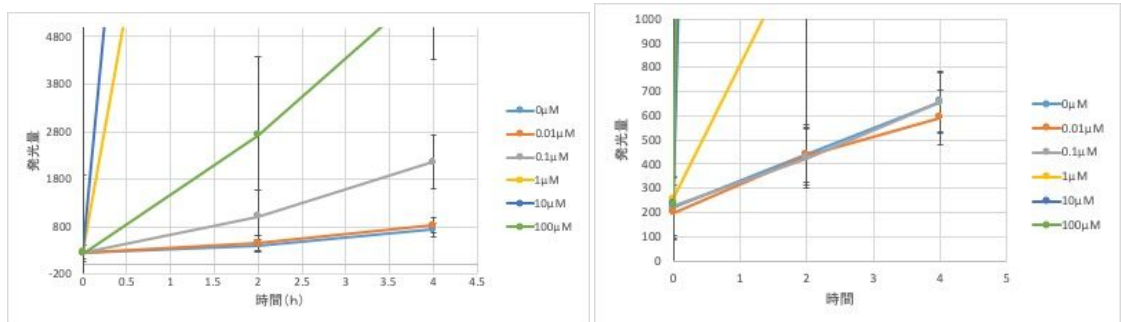
土壌由来の細菌である *Rhodococcus erythropolis* IAM1399 株 (以下 IAM1399 株) と、そのヒ素耐性遺伝子群破壊株 (以下 *ars1 ars2* 株) を用いてヒ素検出系を構築した。*ars1 ars2* 株は亜ヒ酸排出ポンプである *ArsB* タンパク質を生成することが出来ないため、亜ヒ酸を細胞外に排出することが出来ず、数 μM (数十~数百 ppb) の亜ヒ酸に対して感受性を示す。すなわち、低濃度の亜ヒ酸を菌体に蓄積することが出来ると考えられる。

上記の 2 株に、亜ヒ酸に応答して転写抑制を解除する *ArsR* タンパク質をコードする *arsR* 遺伝子と、*ArsR* が結合して転写を抑制する DNA 領域 (*arsR* プロモーター領域、以下 *ParsR*)、さらにその下流にレポーター遺伝子として発光タンパク質遺伝子 (*luxAB*) を連結したプラスミド (pKLAParsR3+*arsR*) を導入した。構築した組換え菌の亜ヒ酸およびヒ酸に対する応答を観察した。

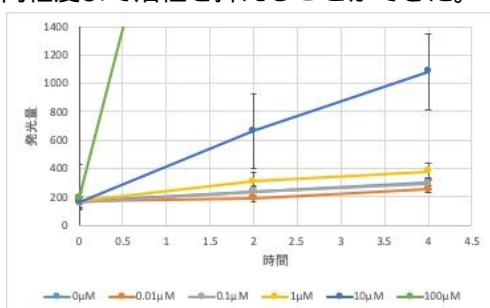
IAM1399 株を宿主として用いた結果、亜ヒ酸に対しては 1 μM まで、ヒ酸に対しては 10 μM までは明確な反応を示した (下図、左: 亜ヒ酸、右: ヒ酸)。環境基準は約 0.13 μM であるため、どちらに対しても感度が不十分であることが強く示唆された。



そこで、ヒ素感受性株である *ars1 ars2* 株を宿主として用いた結果、亜ヒ酸に対しては 0.1 μM まで、ヒ酸に対しては 1 μM まで明確な反応を示した (下図、左: 亜ヒ酸、右: ヒ酸)。破壊株を用いることで、感度を 10 倍にすることに成功した。しかし、高い濃度のヒ素 (特に亜ヒ酸) に関しては、菌体へのダメージの方が勝るため、発光が弱くなることが明らかとなった。また、ヒ酸に関しては環境基準の濃度を検出することができなかった。*ars1 ars2* 株は *arsC* も破壊されているため、ヒ酸存在には菌体内で亜ヒ酸が存在しないはずであるが、亜ヒ酸に反応して転写抑制を解く *ArsR* タンパク質が反応しているため、破壊した *arsC* 遺伝子以外にもヒ酸還元に関与する酵素遺伝子が存在する可能性が考えられた。



上記システムではサンプル中の亜ヒ酸とヒ酸の区別がつかないため、サンプル中の亜ヒ酸のみを測定する系の構築を試みた。ヒ酸は、リン酸トランスポーターによって菌体内に取り込まれることが明らかとなっているため、リン酸を過剰に与えることでヒ酸の取り込みを抑えることを試みた。その結果、終濃度 10 mM 程度のリン酸バッファー加えることでヒ酸に対する発光値のみを大幅に抑えることに成功した (下図)。1 μM のヒ酸に対しては、ヒ素非添加のサンプルと同程度まで活性を抑えることができた。



ヒ酸に対する感度を上昇させるため、菌体内でヒ酸を亜ヒ酸に還元する酵素遺伝子 *arsC* を高発現させた。構成的プロモーターの下流に *arsC* を挿入したプラスミドを導入し、ヒ酸に対する活性を測定したが、活性の上昇は観察されなかった。

構築した検出系が実際の環境サンプルにも適用可能かを調べるため、ヒ素汚染土壌を水溶出したサンプルを用いて実験を行なった結果、検出に成功した。しかし、原子吸光光度計を用いて得た濃度は約 0.3 μM であったが、発光量では 0.01 μM と 0.1 μM の亜ヒ酸存在下で得られた発光量の間の数値であり、定量に使うためには今後更なる研究が必要であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

富田 尚樹, 荒井 佑哉, 佐藤 舜, 庄司 有理, 平間 知之, 福田 雅夫, 遠藤 銀朗, 宮内 啓介. *Rhodococcus* 属細菌を用いたヒ素検出システムの構築. 第 68 回日本生物工学会. 2016 年

Keisuke Miyauchi, Yuri Shoji, Naoki Tomita, Yuya Arai, Shun Sato, Masao Fukuda, Ginro Endo. Construction of arsenic detection system using *Rhodococcus* strains. IBS2016. 2016 年

佐藤舜, 荒井祐哉, 富田尚樹, 遠藤銀朗, 宮内啓介. 細菌を用いたヒ酸及び亜ヒ酸検出システムの構築. 平成 28 年度土木学会東北支部技術研究発表会. 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。