

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06664

研究課題名(和文) 微生物由来Mer輸送体の有害金属及び希少金属輸送活性の環境浄化への展開

研究課題名(英文) Role of Mer transporters in the transport of toxic metals and rare metal in Escherichia coli and usability for environmental purification.

研究代表者

大城 有香 (Ohshiro, 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：微生物由来のMer輸送体が水銀やカドミウム等の有害金属を取り込むことをこれまでに明らかにした。本研究ではMer輸送体の金属輸送活性について希少金属を始めとする有用金属に焦点を当て解析し、金属汚染浄化及び回収への利用性を明らかにすることを目的とした。その結果、MerC及びMerP共存下のMerTが銅及び金輸送活性を示し、MerC、MerE、MerF、MerTはアンチモン輸送活性を示した。Mer輸送体が銅、金、アンチモン等の産業需要の高い金属を取り込むことが明らかとなった。最も多様な金属輸送活性を持つMerC組換え植物を利用することで有害金属汚染の浄化と有用金属の回収を達成できると期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、水銀等の有害金属や希少金属を含む電気電子機器廃棄物の不適切な処理により、特に途上国において環境が汚染され健康リスクが高まっている。土壌浄化の社会的需要の増加に伴い、経済的で環境負荷の少ない「植物による環境浄化」に注目が集まっているが、浄化期間の長さや効率に課題を抱えている。本研究から、微生物由来のMer輸送体が有害金属、貴金属、希少金属の取り込み活性を持つことが明らかとなり、Mer輸送体は植物による環境浄化の課題の克服の切り札となると期待される。また、希少金属の回収に利用することで、国際的な価格高騰が問題となり、先端産業の必須材料である希少金属の新たな供給源の確保に繋がると考えられる。

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, MerT, or MerP, have been applied in engineering of bioreactor used for phytoremediation. Our objective was to clarify individual role of MerC, MerE, MerF, MerT, or MerP and potential in transport of toxic metals and rare metals. The E. coli cells that carried mer recombinants were treated with Cu, Au, or Sb. MerC or MerT+MerP recombinants accumulated significantly more Cu and Au than control. The cells that expressed MerC, MerE, MerF, or MerT accumulated significantly more Sb than control. Consequently, we demonstrated that MerC, MerE, MerF, and MerT are broad-spectrum metals transporters. Our results suggested that MerC is the most efficient tool and it was expected that not only the purification of toxic metal pollution but also the recovery of rare metals could be achieved.

研究分野：環境薬学

キーワード：水銀耐性遺伝子 金属輸送活性 希少金属 金属汚染浄化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ガス製造工場の跡地である東京都中央区豊洲では、製造過程に伴い生成されたベンゼン・シアン化合物・ヒ素・鉛などの副産物による汚染が見つかった。豊洲土壌汚染の浄化は、土を洗浄する物理化学的手法と客土での処理が適応され、長い期間と高額な処理費が生じた(第6回豊洲市場における土壌汚染対策等に関する専門家会議報告書、東京都)。金属による国土の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た。さらに世界では、アメリカなどから中古家電製品が途上国に輸出され、それらは鉛・カドミウム・水銀などの有害金属を含むものが多く、不適切な処理により環境を汚染し健康リスクを高めた(Asante et al. *Sci Total Environ.* 2012; 424: 63-73)。フィリピン、中国、ベトナム、ガーナ、パキスタン等では、電気電子機器廃棄物のリサイクル施設及びその周辺地域の土壌の銅・鉛・亜鉛・カドミウム濃度が環境濃度に比べ数倍高いことが報告された(Fujimori et al. *J Hazard Mater.* 2012; 221-222: 139-46)。一方で、これらの金属汚染の中には経済価値の高い希少金属も存在する。これらの背景から、土壌浄化の社会的需要は増加しており、汚染金属の安全かつ有効な除去・回収法の開発が求められていた。

植物の生理活性を利用した環境浄化技術として注目されるファイトレメディエーションは、既存の物理化学的手法に比べ経済的かつ環境負荷が少ないという利点を持つ一方、浄化効率に弱点を抱えた。植物の浄化効率を向上させるために、積極的に有害金属を取り込む金属輸送体の利用が有効であると考えられた。

自然界には高濃度の有害金属汚染土壌から単離された耐性菌が多数存在する。その中で、水銀耐性菌は水銀取り込み型輸送体(Mer輸送体)を保持し、これまでにMerC, MerE, MerF, MerTの4種が同定された。研究代表者はこれまでにこれら4種のMer輸送体が無機水銀のみならず、フェニル水銀やメチル水銀を輸送することを明らかにした。さらに、MerC, MerE, MerF, MerTの有害金属輸送活性について検討したところ、Mer輸送体がカドミウム及び亜ヒ酸を輸送する知見を得た。この中でMerCはクロム酸輸送活性を有することが示された。Mer輸送体が有害金属のみならず、生体微量金属のクロムを輸送する知見を得たことから、Mer輸送体が銅、亜鉛などのベースメタルに加え、マンガン、モリブデン等の希少金属といった産業利用価値の高い金属類の輸送活性を有するか検討する必要性が生じた。

また、申請者らは水銀輸送体MerCを組換えたシロイヌナズナを既に作出し、無機水銀、メチル水銀あるいはカドミウム浄化の有用性を示した。これらのことから、Mer輸送体をファイトレメディエーションへ利用することにより、有害金属だけでなく希少金属など様々な金属による汚染の浄化を可能にすると考えられた。

### 2. 研究の目的

Mer輸送体は有害金属や希少金属による汚染の浄化及び回収に有効であることが期待され、本研究ではMer輸送体の希少金属を含む金属輸送活性について明らかにすると共に、Mer輸送体組換え植物を用いた金属汚染の浄化および回収への利用性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

各Mer輸送体を組換えた大腸菌を用いてベースメタルである銅(Cu)、亜鉛(Zn)、産業的価値の高い希少金属であるマンガン(Mn)、モリブデン(Mo)、チタン(Ti)、アンチモン(Sb)、コバルト(Co)、インジウム(In)、貴金属である金(Au)の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(*merR-o/p-merC*)、pE4(*merR-o/p-merE*)、pF17(*merR-o/p-merF*)、pT5(*merR-o/p-merT*)及び、ペリプラズムの水銀輸送を補助する水銀結合遺伝子である*merP*を共発現させたpPC20(*merR-o/p-merP-merC*)、pPE62(*merR-o/p-merP-merE*)、pPF8(*merR-o/p-merP-merF*)、pTP4(*merR-o/p-merP-merT*)をそれぞれ形質転換した大腸菌(XL1-Blue)を評価に使用した。コントロールとしてpKF19k vectorを形質転換した大腸菌を用いた。

各*mer*遺伝子組換え大腸菌をLB培地に植菌し一晩培養後、0.25 µM HgCl<sub>2</sub>を含むLB培地に3-5%植菌し、3-4時間培養した。無機水銀によりMer輸送体を発現誘導し、濁度がOD600=1.0となる様にLB培地で再懸濁した。再懸濁液に各濃度金属溶液(CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, TiCl<sub>4</sub>, Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub>, InCl<sub>3</sub>, HAuCl<sub>4</sub>)をそれぞれ添加し、37°Cで一定時間反応させた。60%硝酸を用いて灰化処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金属取り込み濃度を測定した。

### 4. 研究成果

研究代表者はこれまでに水銀トランスポーターとして見出されたMerC, MerE, MerF, MerTが無機水銀、有機水銀、カドミウム、亜ヒ酸及びクロム酸などの有害金属を輸送することを明らかにしていた。また、ペリプラズムの水銀結合タンパク質であるMerPは、MerTによる無機水銀輸送を補助することが知られていた。これまでは有害金属を中心に解析してきたが、本研究では、希少金属を含む様々な金属輸送活性について網羅的に解析した。まず、MerC, MerE, MerF, MerT組換え大腸菌を用いてMer輸送体の亜鉛(Zn)、モリブデン(Mo)、チタン(Ti)、マンガン(Mn)、

コバルト (Co), インジウム (In) の取り込み活性について検討した。その結果, 各 MerC, MerE, MerF, MerT 組換え株のそれぞれの Zn, Mo, Ti, Mn, Co, In 濃度はコントロール株とほぼ同等であった。この結果から, 4 種の Mer 輸送体は亜鉛, モリブデン, チタン, マンガン, コバルト, インジウム取り込み活性を示さないことが示唆された。

次に, Mer 輸送体の銅 (Cu) 取り込み活性について調べたところ, MerE, MerF または MerT 組換え株はコントロール株とほぼ同等の Cu 濃度を示した。一方, MerC 単独組換え株はコントロール株に比べ約 3 倍, MerT + MerP 組換え株はコントロール株に比べ約 1.5 倍高い Cu 濃度を示した (Fig. 1)。このことから, MerC 及び MerP 共存下の MerT が銅取り込み活性を有することが明らかとなった。

また, Mer 輸送体の金 (Au) 取り込み活性について検討した結果, MerT + MerP 組換え株はコントロール株に比べ約 3 倍高い Au 濃度を示した (Fig. 2)。また, MerC 組換え株の Au 濃度は MerT + MerP 組換え株ほどではないが, コントロール株に比べ約 1.3 倍高かった。MerE, MerF または MerT 単独組換え株はコントロール株とほぼ同等の Au 濃度を示した。このことから, MerC 及び MerP 共存下の MerT は金取り込み活性を有することが明らかとなった。

さらに, Mer 輸送体のアンチモン (Sb) 取り込み活性について調べたところ, MerC, MerE, MerF, MerT 組換え株はいずれもコントロール株に比べ有意に高い Sb 濃度を示した (Fig. 3)。このことから, MerC, MerE, MerF, MerT はアンチモン取り込み活性を有することが明らかとなった。アンチモン (Sb) はヒ素 (As) と同族の半金属であり, 化学的特性がヒ素 (As) と類似していることから, Mer 輸送体の基質となったと考えられた。

これらの結果から, Mer 輸送体が有害金属の取り込みだけでなく, 生体内微量元素である銅, 貴金属である金や希少金属であるアンチモンなど多様な金属輸送活性を持つことが初めて明らかとなった。Mer 輸送体の中でも輸送する金属が異なることが示唆された。この中でも, トランスポーター単独で最も多様な輸送活性を持つ MerC 組換え植物を利用することで有害金属汚染の浄化のみならず, 貴金属や希少金属の回収を同時に達成できることが期待された。

Fig. 1 銅取り込み活性

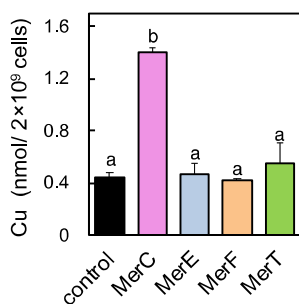


Fig. 2 金取り込み活性

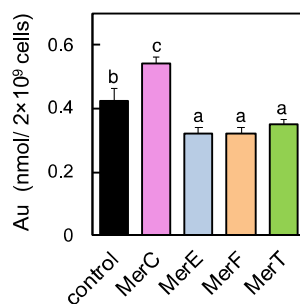
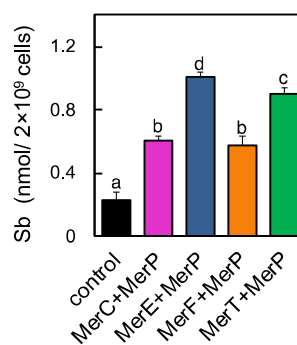
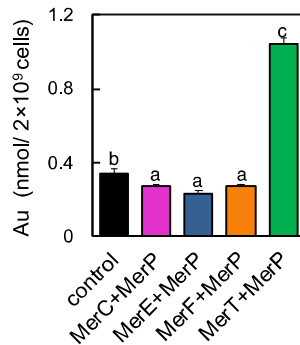
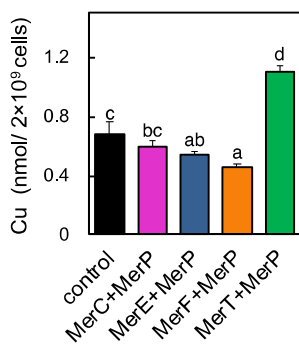
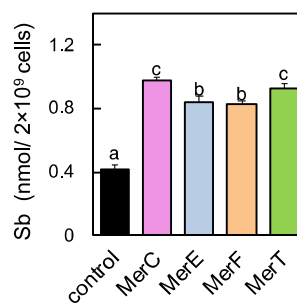


Fig. 3 アンチモン取り込み活性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohshiro Yuka, Uraguchi Shimpei, Nakamura Ryosuke, Takanezawa Yasukazu, Kiyono Masako	4. 巻 367
2. 論文標題 Cadmium transport activity of four mercury transporters (MerC, MerE, MerF and MerT) and effects of the periplasmic mercury-binding protein MerP on Mer-dependent cadmium uptake	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fnaa177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大城有香, 浦口晋平, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 水銀トランスポーター MerT による水銀輸送におけるシステイン残基の役割
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大城有香, 山岡千容, 浦口晋平, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 Pseudomonas K-62 pMR68上のmer operonの発現機構及び新規遺伝子の機能解析
3. 学会等名 フォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大城有香, 山岡千容, 浦口晋平, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 Pseudomonas K-62株由来pMR68上のmer operonの発現調節機構
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大城有香, 川口航輝, 浦口晋平, 中村亮介, 高根沢康一, 清野 正子
2. 発表標題 水銀トランスポーターMerCの元素選択性の解析
3. 学会等名 フォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子莉子, 大城有香, 浦口晋平, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 Mer 輸送体の Au 輸送能に関する研究
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大城有香, 浦口晋平, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 微生物由来の水銀トランスポーターの金属輸送能及びファイトレメディエーションへの展開
3. 学会等名 第4回トランスポーター研究会関東部会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曾根有香, 常盤修平, 山岡千容, 浦口晋平, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 水銀耐性菌Pseudomonas K-62株由来pMR68上の新規遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子莉子、曽根有香、浦口晋平、中村亮介、高根沢康一、清野正子
2. 発表標題 水銀トランスポーターの有害元素及び微量元素輸送に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曽根有香、金澤早紀、浦口晋平、中村亮介、高根沢康一、清野正子
2. 発表標題 MerC組換え植物を利用した有害元素複合汚染のファイトレメディエーション
3. 学会等名 フォーラム2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学薬学部公衆衛生学教室ホームページ <a href="http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/kouei/">http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/kouei/</a>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------