

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380184

研究課題名（和文）海洋細菌の有する有機スズ耐性機構の解明と生態系評価への応用

研究課題名（英文）Organotin resistance mechanism of marine bacteria and its application to evaluation of ecosystem

研究代表者

鈴木 聡（SUZUKI SATORU）

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授

研究者番号：90196816

研究成果の概要（和文）：トリブチルスズ(TBT)は使用禁止後も海洋環境で検出され、微生物生態系への影響が懸念されている。本研究は TBT に対する海洋細菌の耐性機構を解明し、その機構に関連する遺伝子群を利用して TBT の生態系影響を評価できる分子生物学的システムを開発するのが目的である。成果として、新規の耐性機構を複数発見し、耐性遺伝子のひとつ *sugE* が TBT により発現促進されることが確認された。現在この遺伝子を用いてバイオセンサー化を進めている。

研究成果の概要（英文）：Tributyltin (TBT) is a serious contaminant in marine environment. This study aimed to reveal mechanisms of TBT resistance in marine bacteria. To apply the resistance genes for evaluation method of toxicity of TBT against microbial ecosystem. We could discover new mechanisms and defined the genes. One of the genes, *sugE*, is applied to the biosensor system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：有機スズ，海洋微生物，耐性遺伝子

1. 研究開始当初の背景
有機スズ化合物は原核，真核を問わず生物全

般に対して毒性があり，その毒性を利用して
船底や漁網へのベントスの付着を防ぐ防汚

剤として 80 年代までは広く使用されていた。しかし、免疫毒性や内分泌攪乱作用が知られるようになり、90 年代初頭には世界中の多くの国で製造・使用・輸出入が禁止された。ところが、欧州では近年になるまで使用されており、現在でも違法使用が世界各地で続いている。その結果、海洋における有機スズの汚染はまだ終結したとは言えない状況である。

有機スズ化合物は微生物に対しても毒性を示すが、微生物は容易に化学物質に対して耐性を獲得する能力を持っているため、有機スズ化合物に対しても耐性菌が出現する。また耐性のみならず海水中には有機スズを分解する細菌が棲息することが分解実験から知られている。過去の研究において、有機スズの一つトリフェニルスズに対する分解菌は知られているが、残留性の高いトリブチルスズ (TBT) に対しては本研究の申請時 (2006 年時点) では分解菌は特定されておらず、自然界での TBT の運命および微生物生態系の TBT 毒性に対する応答を明らかにすることは重要なテーマであった。一方、TBT 耐性菌については、本研究代表者鈴木聡が 90 年代はじめから研究成果を報告しており、世界で初めて TBT 耐性遺伝子を単離した背景がある。

2. 研究の目的

有機スズによる海洋汚染はまだ持続すると予想されることから、海洋生態系の汚染許容レベルを知ることは、生態毒性リスク評価基準を示すために欠かすことができない。また、生物修復技術や汚染評価技術開発のためにも、海洋細菌のもつ TBT 耐性機構の解明は必要である。そこで、本研究では、TBT 耐性海洋細菌の持つ TBT 耐性機構を生化学的に詳細に解明することで汚染に対する微生物の反応を解明し、さらに生態系の安定性と自浄作用を定量的に評価するための応用技術へ展開することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) *Pseudoalteromonas* M-1, *Pseudomonas aeruginosa* 25W および *Aeromonas molluscorum* Av27 の 3 株が TBT 耐性菌として得られた。これらの株の耐性機構を解明する。
- (2) 遺伝子をクローニングし、構造を解析する。遺伝子産物を精製し、リポソームに取り込んで TBT 排出機能を調べる。
- (3) TBT 耐性遺伝子の TBT および他の金属存在下での発現をリアルタイム PCR によって定量し遺伝子発現の特異性を明らかにする。
- (4) 耐性菌の TBT 分解活性を調べる。分解産

物である DBT, MBT および無機スズへの変換を明らかにする。

(5) 耐性遺伝子と蛍光マーカー遺伝子を組み込んだプラスミドを作成し、TBT による濃度依存的遺伝発現を検出できる技術の開発を試みる。

4. 研究成果

(1) 耐性菌の TBT 分解能：TBT 耐性菌 *Aeromonas molluscorum* は TBT を分解する能力を有することが明らかになった。これは、TBT 分解菌を単離した初めての成果である。

(2) 耐性遺伝子の解析：TBT 耐性菌から複数の新規耐性遺伝子を得る事に成功した。*Aeromonas molluscorum* の *sugE* 様遺伝子は、small multidrug resistance 遺伝子ファミリーの遺伝子であることが、立体モデリングで示された。TBT 排出に関与する機能が推察された。また、*Pseudoalteromonas* の耐性遺伝子は *secA* であることが明らかになった。本遺伝子の耐性機構はまだ不明であるが、TBT の毒性標的である ATPase 活性部位が耐性化している可能性が考えられた。さらに海洋由来 *Pseudomonas aeruginosa* からは新規の細胞質タンパク質が TBT 耐性遺伝子産物として発見された。これは TBT に結合して排出させる機能が推察されるが、生化学的実験による機能解明には至っていない。

(3) 耐性遺伝子の発現と利用：耐性遺伝子 *sugE* については高濃度 TBT 存在下で発現促進が見いだされた。さらに現在この遺伝子を蛍光マーカー遺伝子とともにプラスミドに組み込み、TBT 検出用ツールとして開発を進めている。

(4) まとめ：本研究で、新規の TBT 耐性遺伝子が少なくとも 3 種発見され、海洋細菌の TBT 耐性機構が多様であることが明らかになった。また、一部の遺伝子では TBT に対する発現応答が明らかになり、TBT 応答遺伝子を用いた生態系汚染の評価ツール開発への道筋を示した。

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 6 件)

①Cruz, A., Oliveira, V., Baptista, I., Almeida, A., Cunha, A., Suzuki, S. and Mendo, S. (2010) Effect of tributyltin (TBT) in the metabolic activity of

TBT-resistant and sensitive estuarine bacteria. Environmental Toxicology, in press

②Cruz, A., Micaelo, N. M., Felix, V., Song, J.-Y., Kitamura, S.-I., Suzuki, S. and Mendo, S. *sugE*-like gene of *Aeromonas molluscorum* Av27 is responsible for tributyltin (TBT) resistance. (submitted)

③Cruz, A., Henriques, I., Correia, A., Suzuki, S. and Mendo, S. (2010) *Aeromonas molluscorum* Av27: a potential natural tool for TBT decontamination. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Vol. 3 - Biological Responses to Chemical Contaminants. Eds. N. Hamamura, S. Suzuki, S. Mendo, C. Barroso, H. Iwata and S. Tanabe, pp. 37-46.

④Fukushima, K., Dubey, S. K. and Suzuki, S. (2009) Quantitative analysis of expression of tributyltin (TBT)-regulated genes in TBT-resistant *Pseudomonas aeruginosa* 25W. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Vol. 2 - Environmental Research in Asia. Eds. Y. Obayashi, T. Isobe, A. Subramanian, S. Suzuki and S. Tanabe, pp. 163-166.

⑤Suehiro, F., Mochizuki, H., Nakamura, S., Iwata, H., Kobayashi, T., Tanabe, S., Fujimori, Y., Nishimura, F., Tuyen, B. C., Tana, S. T. and Suzuki, S. (2007) Occurrence of tributyltin (TBT)-resistant bacteria is not related to TBT pollution in Mekong River coastal sediment: with hypothesis of selective pressure from suspended solid. Chemosphere, 68, 1459-1464.

⑥Cruz A., Caetano, T. Suzuki, S. and Mendo, S. (2007) *Aeromonas veronii*, a tributyltin (TBT)-degrading bacterium isolated from an estuarine environment, Ria de Aveiro in Portugal. Marine Environmental Research, 64, 639-650.

[学会発表] (計7件)

①Cruz A., Henriques I., Correia A., Suzuki S., Mendo S. (2009) *Aeromonas molluscorum* Av27: a potential natural tool for TBT decontamination. Biological Responses to Chemical Contaminants: from molecular to community level, September 2-4. Aveiro, Portugal.

②Cruz A., Suzuki S., Mendo S. (2009)

sugE-like gene: a gene involved in TBT resistance in *Aeromonas molluscorum* Av27. 2009 International Symposium on Environmental Science and Technology, June 2-5. Shanghai, China.

③Fukushima, K., Dubey, S. K. and Suzuki, S. (2008) Quantitative analysis of expression of tributyltin (TBT)-regulated genes in TBT-resistant *Pseudomonas aeruginosa* 25w. The 12th International Symposium on Microbial Ecology, ISME 12, August 17-22. Cairns, Australia.

④ Cruz A., Suzuki S., Mendo S. (2008) Different genes coding for tributyltin (TBT) resistance in *Aeromonas* spp. SETAC Europe 18th Annual Meeting in Warsaw, May 25-29. Warsaw, Poland.

⑤鈴木 聡・北村真一・久保田諭 (2007) 海洋細菌 *Pseudoalteromonas* sp. の SecA が関わるトリブチルスズ耐性機構. 日本水産学会秋季大会, 9月25-28日, 函館市.

⑥Cruz A., Nonaka L., Suzuki S., Mendo S. (2007) *Aeromonas veronii*, tributyltin (TBT) resistant bacteria: future development of a biosensor for TBT detection and bioremediation. XIII Symposium in Pesticide Chemistry, September 3-6. Piacenza, Italy.

⑦鈴木 聡・北村真一 (2007) 海洋細菌 *Pseudoalteromonas* sp. M-1 の SecA が関与する有機スズ耐性機構, 日本生化学会四国支部例会, 5月19-20日, 高知市.

[図書] (計1件)

① 鈴木 聡 (編著), 東海大学出版会, 分子でよむ環境汚染, 2009, 252.

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称: ウイルス捕捉用フィルタおよびその保存法

発明者: 鈴木 聡

権利者: 国立大学法人愛媛大学

種類: 特許

番号: 特許第4292271号

取得年月日: 平成21年4月17日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 聡 (SUZUKI SATORU)
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・
教授
研究者番号：90196816

(2) 研究分担者

高橋 真 (TAKAHASHI SHIN) (H19 のみ)
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・
准教授
研究者番号：30370266

(3) 連携研究者

なし