

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780084

研究課題名(和文) 微生物における亜セレン酸還元機構の解明

研究課題名(英文) Study of mechanisms of selenite-reduction in gram positive bacteria

研究代表者

斎藤 茂樹 (Saito, Shigeki)

立命館大学・立命館グローバル・イノベーション研究機構・研究員

研究者番号：30589908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：セレンは水溶液中で細胞毒性を有するオキシアニオンとして存在し、かつ比較的安定して環境中に存在することから、これらを還元し無毒化する微生物が注目されている。本研究は高濃度セレン蓄積土壌から単離された *Bacillus* 属細菌の亜セレン酸還元酵素を単離・同定し、その還元機構を分子レベルで解明することを目的としている。トランスポゾンを用いた破壊株の探索から、マンガンカタラーゼをコードすると推定される遺伝子が本菌の亜セレン酸還元活性に深く関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Several bacterial strains were isolated from the rhizosphere of wheat crops in the northwestern region of Punjab, India. One of the strains, which reduced both selenate and selenite under aerobic conditions, was identified as *Bacillus* sp. NPT-1. The strain removed selenite in the medium within 24 h and produced amorphous selenium particles with an average particle size of 311 nm in diameter.

To identify genes responsible for selenite reduction, mutant strains defective in the activity were generated by random insertion of the conjugative transposon Tn916 using *Enterococcus faecalis* CG110. Among the mutants obtained, 3 mutants contained a single insertion of Tn916, and their reduction activity was significantly decreased. One of the genes responsible for the loss of the function showed a high homology with a manganese catalase-like gene in *Bacillus*. An *in vitro* selenite-reduction study of the heterologously expressed gene suggested its function as a selenite reductase.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：亜セレン酸還元酵素 セレン酸還元酵素 金属ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

セレンは必須微量元素の一つであり、周期表で酸素、硫黄の下に位置することからも予想されるように、非常に反応性の高い元素である。体内における適正量の幅が非常に狭く、環境中のセレン量の過不足から欠乏症や中毒症が引き起こされる。体内ではセレノシステイン、セレノメチオニンとしてタンパク質中に組み込まれており、チオレドキシ還元酵素などの抗酸化酵素や電子伝達タンパク質の活性部位で重要な働きをしている。また、その豊富な埋蔵量と半金属性を示す性質から産業でも幅広く用いられているが、環境中に排出される廃液中のセレンオキソアニオン(セレン酸、亜セレン酸)の除去が問題となっている。

ある種の微生物は溶液中のセレンオキソアニオンを元素状セレン(Se^0)に変換し、朱色のセレン粒子として細胞内外に蓄積・排出する。特に水溶液中で安定なセレン酸の還元メカニズムについては、これまで多くの研究者の注目を集めてきた。オーストラリア La Trobe 大学の J. M. Macy 教授のグループは、嫌気性グラム陰性細菌の *Thauera selenatis* からセレン酸還元酵素の精製に初めて成功し(Schröder, I., et al., 1997, *JBC*, 272: 23765)、その後セレン酸還元機構についての研究が大きく進展した。また大阪大学工学部の池教授のグループは、ガラス工場廃液からセレン酸還元能を有するグラム陽性の *Bacillus selenatarsenatis* の単離に成功し(Fujita, M., et al., 2002, *Biotechnol. Bioeng.*, 80: 755)、その活性が SrdBCA 複合体による物であることを明らかにしている(Kuroda, M., et al., 2011, *J. Bacteriol.*, 193: 2141)。これらセレン酸還元酵素は共に活性中心にモリブデンを持ち、セレン酸(SeO_4^{2-})を亜セレン酸(SeO_3^{2-})に還元する。しかしながら亜セレン酸から Se^0 への還元については、大腸菌を用いた研究からチオレドキシ還元酵素が関与することが報告されているものの、その詳細については不明である(Takahata M., et al., 2008, *J. Biochem.*, 143: 467)。一方、動物では、細胞質中のグルタチオンやグルタチオン還元酵素により還元されることが知られていたが、チオレドキシ還元酵素も亜セレン酸還元に関わっていることが先頃報告され(今井ら, 2011, 生化学 83: 111)、亜セレン酸分解経路が当初考えられていたよりも複雑なものであることが明らかとなった。

このような学術的背景を踏まえ、研究代表者はインドパンジャブ地方で単離された *Bacillus* 属細菌から亜セレン酸還元酵素の単離同定を目指し本研究を開始した。インド Thapar 大学の Prakash 博士の協力(二国間交流事業、代表三原久明)のもと、パンジャブ州の高濃度セレン蓄積土壌から単離された 33 菌株のセレン酸・亜セレン酸還元能を好気的条件下で調べたところ、9 菌株が

両セレンオキソアニオンを Se^0 まで還元し、20 菌株が亜セレン酸のみを還元した。一方、両オキソアニオンに対し還元能を示さない菌も 4 菌株見つかった。還元能を示した 29 菌株の中でも特に高いセレン酸・亜セレン酸還元能を示したグラム陽性細菌の *Bacillus* sp. NTP1 株をリゾチームで処理したところ、亜セレン酸還元活性がペプチドグリカン面で検出された。これらの結果は、細胞質中のグルタチオンやチオレドキシ還元酵素に依存しない未だ知られていない亜セレン酸還元機構の存在を示唆していると考え本実験を開始した。

2. 研究の目的

本研究はインドパンジャブ地方のセレン汚染土壌から単離された *Bacillus* 属細菌の亜セレン酸還元酵素を単離同定し、その還元機構を分子レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

本研究のスクリーニングで用いた菌株は、インド Thapar 大学 N. Tejo Prakash 教授が高濃度セレン蓄積土壌で単離したものを使用した。また、接合の際に使用したトランスポゾン供与菌 *Enterococcus faecalis* CG CG110 株は、北海道大学森川正章教授より供与頂いた。

(2) 培養条件

高濃度セレン蓄積土壌で単離した菌株の培養には、TSB 培地を用いた。また、*Enterococcus faecalis* CG110 株及び *E. coli* の培養には、LB 培地を用いた。

好気条件下の培養では、前培養した菌株を初期菌体濃度が $\text{OD}_{660} = 0.001$ になるように植菌し、 30°C 、250 rpm で振盪培養した。嫌気条件下の培養では、Glove-Box 内で溶存酸素を取り除いた培地に、好氣的に前培養した菌株を初期菌体濃度 $\text{OD}_{660} = 0.01$ になるように植菌した。培養容器を密閉した後、アネロパックに入れ 30°C で静置培養を行った。また、菌濁度測定時は、析出した赤色の元素状セレンを除くため、1 M DTT で菌体とセレン粒子を洗浄し、セレン粒子を還元して取り除いてから測定した。

(3) 接合によるトランスポゾンの導入

NTP-1 株をストレプトマイシン $10 \mu\text{g/ml}$ を含む TSB 寒天培地で培養し、耐性株を得た。その後、徐々にストレプトマイシンの濃度を上げ、最終的に $1000 \mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシン耐性株を単離した。それを TSB 液体培地で一晚 30°C で振盪培養し、1 ml の培養液を採取した。6,000 rpm、3 分間遠心して上清を取り除き、1 ml の LB 培地で二回洗浄した後、1 ml の LB 培地に再懸濁した。次にその懸濁液を、予めトランスポゾン保有

する *Enterococcus faecalis* CG110 株を一晩 37°C で培養した LB 寒天培地に 0.3 ml 塗布した。白金耳を用いてそれらをよく混合し、37°C で一晩静置した。菌をこすり取り、1 ml の LB 培地に懸濁し、Sm (1000 µg/ml)、Tc (10 µg/ml)、5 mM Na₂SeO₄ を含む LB 寒天培地に 50 µl ずつ塗布し、37°C で培養した。2 日後に朱色のコロニーが確認できたので、その中で薄い朱色のコロニーを単離し、同じ培地に再度植え継ぎ、色の確認を行い、欠損株候補とした。

(4) トランスポゾン導入箇所の特定

トランスポゾン導入箇所の特定には LA PCR *in vitro* Cloning Kit (TaKaRa) を用いた。また、各欠損株のトランスポゾン挿入数の特定には AlkPhos Direct (GE Healthcare) を用いた。標識プローブにはトランスポゾン Tn916 内の テトラサイクリン耐性遺伝子 *tetM* (524 bp) を用いた。

(5) 候補遺伝子の異種細胞発現

クローニング用プライマーは NTP-1 株と 16S rRNA 配列解析の結果高い相同性のあることが分かった *Bacillus pumilus* SAFR-032 株の配列を基に設計し、pCold I (TaKaRa) ベクターの BamHI サイトにサブクローニングし、大腸菌 BL21(DE3) 株を用いて発現させた。

(6) 亜セレン酸還元活性の測定

反応液 (100 µg/mL 細胞抽出液、1 mM NADPH、10 mM Na₂SeO₃、50 mM KPB) を 37°C で 3 時間反応させた。このとき、細胞抽出液には、不溶性画分を使用した。

(7) 元素状セレンの定量

元素状セレンを含む培養液を 15,000 rpm で遠心分離し、沈殿画分を凍結乾燥した。水で再懸濁後、1 M DTT 溶液を加えて攪拌し 10,000 rpm で遠心分離した。回収した上清に 0.1 N 塩酸に溶解させた 5 mM 酢酸鉛を加え、生成した PbSe の吸光度を測定した (400 nm)。

4. 研究成果

Bacillus sp. NTP-1 株の諸性質を調べたところ、本菌は約 1.2 µm の桿菌で、還元により生成したセレン粒子は粒径が 112 - 534 nm の範囲に分布し、平均 311 nm であった。また、本菌は好気条件下において培地中の 1 mM の亜セレン酸を 24 時間以内に全て元素状セレンへと変換した。

他のオキシアニオンがセレンオキシアニオンの還元及び影響について調べた。1 mM のセレンオキシアニオンに対し、それぞれ各 1 mM の亜硫酸塩、硫酸塩、亜硝酸塩、硝酸塩を TSB 培地に加え培養し、生成したセレン粒子量を比較した。その結果、亜セレン酸の還元活性は、好気条件下ではこれらオ

キシアニオンの影響をほとんど受けなかったが、嫌気条件下では亜硫酸塩により 97% の阻害を受けた。硫酸塩は好気・嫌気どちらの条件でも還元活性に影響を与えなかった。一方、セレン酸還元活性は亜硫酸塩、硫酸塩により、それぞれ 84%、33% 阻害され、嫌気条件下では亜硫酸塩により 87% 阻害されたが、嫌気条件下では有意な差は見られなかった。この結果から、NTP-1 株は好気と嫌気で異なる亜セレン酸還元経路を使用していることが示唆された (図 1)。

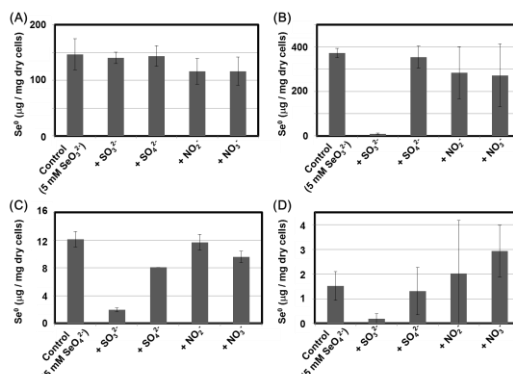


図 1. 他のオキシアニオンが NTP-1 株のセレンオキシアニオン還元能に及ぼす影響。(A) 好気条件下での亜セレン酸の還元、(B) 嫌気条件下での亜セレン酸の還元、(C) 好気条件下でのセレン酸の還元、(D) 嫌気条件下でのセレン酸の還元。

次に、亜セレン酸還元酵素を単離するためトランスポゾンによる遺伝子破壊株の作製を行った。トランスポゾン (Tn916) を保有する *Enterococcus faecalis* CG110 株との接合により、*Bacillus* sp. NTP-1 株ゲノムにランダムにトランスポゾンを挿入し、セレンオキシアニオン還元能欠損株の単離を行った。亜セレン酸が還元されると朱色の元素状セレンが生成し、コロニーは朱色を呈するので、白色もしくは薄い朱色のコロニーを単離した。単離した菌は 16S rRNA シーケンス解析により NTP-1 株であることを確認し、亜セレン酸還元能欠損株として TN 1、TN 2、TN 3、TN 4 の 4 株を得た。

サザンブロット解析の結果、TN 1、TN 3、TN 4 株にはトランスポゾンが一箇所のみ導入されている事が示唆された。一方、TN 2 株はトランスポゾンが複数挿入されていることが分かった。野生株からはバンドが検出されなかった。

カセット PCR 法を用いてトランスポゾン導入箇所の同定を行った結果、TN1 株はマンガカタラーゼをコードすると予想される遺伝子 A の上流に挿入されている事が分かった。一方、TN 2 株ではペプチドグリカン合成に関わる遺伝子 B の上流と、膜タンパク質をコードする遺伝子 C の 2 箇所に挿入されていることが分かった。TN 2 株には、2 箇所のトランスポゾン挿入があり、ど

これらの遺伝子が亜セレン酸還元に関与しているのかが明らかにならなかった。しかしながら、TN 3 株 および TN 4 株がそれぞれ、遺伝子 B 内および遺伝子 C の上流を欠損している事が明らかになり、両方の遺伝子が亜セレン酸還元に関与している可能性が示唆された。

これら欠損株の生育に亜セレン酸が及ぼす影響について調べた。好気条件下で亜セレン酸を添加時の生育曲線を作成したところ、これら Tn916 挿入株では野生株に比べ生育が大きく遅延 (TN 1, TN 2, TN 4)、もしくは生育しない (TN 3) ことが確認できた (図 2)。亜セレン酸を加えない場合は、野生株に比べ若干の生育遅延が見られたが、定常期の濁度に大きな違いは見られなかった。

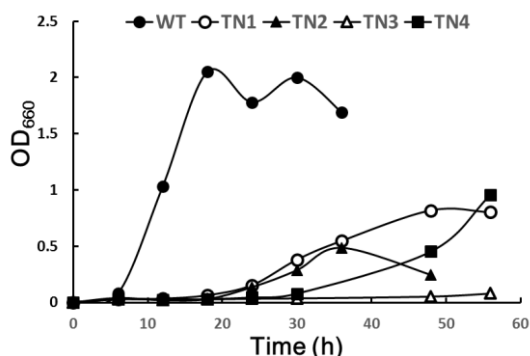


図 2. 亜セレン酸がトランスポゾン挿入株の好気条件下での生育に与える影響。

これら Tn916 挿入株の内、遺伝子 A に着目し、大腸菌での大量発現を試みた。その結果、本タンパク質は不溶性画分に発現した。NTP-1 株と 16S rRNA 解析で高い相同性を示した *Bacillus pumilus* SAFR-032 株の当該遺伝子は不溶性の胞子殻タンパク質であることが知られている。そこで遺伝子 A を発現させた大腸菌から調製した不溶性画分の亜セレン酸還元活性を 1 mM NADH 存在下で測定した。その結果、対照区 (pColdI ベクター導入株の不溶性画分) と比較して約 2 倍高い亜セレン酸還元活性が得られた。このことから遺伝子 A が亜セレン酸還元酵素として機能する可能性が示唆された (図 3)。

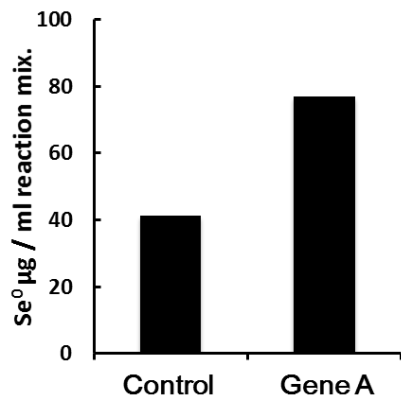


図 3. 大腸菌で発現させた遺伝子 A の亜セレン酸還元活性。

微生物による亜セレン酸還元機構は、これまで細胞質内でチオレドキシ還元酵素が中心となって還元されると考えられてきたが、本研究の結果、それとは異なる経路の存在が強く示唆された。遺伝子 A の細胞内局在は未だ不明であるが、細胞質以外での局在が予想され、微生物の亜セレン酸還元機構がこれまで予想されていたよりも複雑なものであることが明らかとなった。また、本研究を行う過程で、他のグラム陽性細菌由来セレンナノ粒子の解析を行った結果、粒子表面に細胞膜に存在する複数の膜タンパク質が見つかった。NTP-1 株由来粒子でも同様に膜タンパク質が見つかる可能性は低いと予想される。今後遺伝子 A の解析を進めることで、微生物におけるセレンオキシアニオンの還元からセレン粒子形成・排出に至る経路の全容が明らかになる可能性が高い。

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 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 大内田 竜大, 田島 寛隆, 山本 紘資, 斎藤 茂樹, 谷 泰史, 峯元 高志, PRAKASH N. Tejo, 三原 久明「細菌におけるセレン微粒子生成に関わるタンパク質の同定」日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日, 明治大学, 東京都.
- ② 名田 イサナ, 田島 寛隆, 斎藤 茂樹, 谷 泰史, PRAKASH N. Tejo, 三原 久明「*Cellulomonas* sp. D3a 株におけるテルル酸還元に関わる遺伝子の同定」日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日, 明治大学, 東京都.
- ③ 大内田 竜大, 斎藤 茂樹, 山本 紘資, 谷 泰史, 峯元 高志, N Tejo Prakash, 三原 久明「*Cellulomonas* sp. D3a 株が生成するセレンナノ粒子表面に結合するタンパク質の解析」第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日, パシフィコ横浜, 神奈川県.
- ④ 永野 知哉, 奥田 華朱美, 斎藤 茂樹, 谷 泰史, 峯元 高志, Prakash N. Tejo, 三原 久明「*Bacillus* sp. NTP-1 株における亜セレン酸還元に関与する遺伝子の同定」第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 12 日, パシフィコ横浜, 神奈川県.
- ⑤ 斎藤 茂樹, 岡林 拓弥, 加藤 元嗣, 谷 泰史, PRAKASH N. Tejo, 三原 久明

「*Cellulomonas* 属細菌のカルコゲンオキシアニオン還元特性」日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 26 日, 東北大学, 宮城県.

- ⑥ 大内田 竜大, 斎藤 茂樹, 谷 泰史, 峯元 高志, N. Tejo Prakash, 三原 久明「*Enterobacter* sp. E3b におけるセレンナノ粒子生成機構の解析」第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡県.
- ⑦ 永野 知哉, 加藤 元嗣, 斎藤 茂樹, 谷 泰史, N. Tejo Prakash, 三原 久明「トランスポゾン挿入変異を用いたセレン耐性菌のセレンオキシアニオン還元機構の解明」第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 15 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡県.
- ⑧ 山際 恭平, 岡林 拓弥, 斎藤 茂樹, 谷 泰史, N. Tejo Prakash, 三原 久明「*Cellulomonas* sp. D3a の亜セレン酸還元能の解析」第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 15 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡県.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斎藤 茂樹 (SAITO SHIGEKI)

立命館グローバル・イノベーション研究
機構、研究員

研究者番号：30589908