

令和 4 年 10 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14902

研究課題名(和文) フィトケラチン合成酵素を用いた多様な重金属検出が可能な高感度バイオセンサーの開発

研究課題名(英文) Development of sensitive biosensors which detectable multi-heavy metal by applying phytochelatin synthase

研究代表者

村岡 未彩 (muroaka, misa)

大阪大学・薬学研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：00707614

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)：Cdによって活性化されるフィトケラチン合成酵素(PCS)をセンサー素子として、多様な有害重金属が検出可能な高感度バイオセンサーを開発することを目的に研究を行った。シロイヌナズナ由来のAtPCS1についてラン藻由来NsPCSと組み合わせた融合酵素や点変異導入による感度変化と金属特異性の多様化を試みた結果、有意な変化は認められなかった。しかし、反応条件を最適化することにより、環境水のモニタリングに必要な0.003 mg/Lを下回るCdの検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境や食品の有害重金属汚染については、東南アジアなどの発展途上国では鉱山や精錬工場由来の重金属汚染が数多くあり、さらに膨大な電子ゴミに由来する新たな重金属汚染も拡大していることから、健康被害が今後益々深刻化することが危惧されている。これを防ぐためには、重金属による環境や食品の汚染状況を的確に把握し、迅速な対策を講じることが重要であり、そのためには実効性の高い有害重金属モニタリングシステムを確立しなければならない。本研究の研究成果により、環境モニタリングに実際に使用しうる感度までCd検出感度を向上できたことは健康被害の防止への貢献となるといえる。

研究成果の概要(英文)：We have tried to develop the high sensitive biosensors which can detect several kinds of heavy-metal by application of modified phytochelatin synthase(PCS). Combined enzymes of AtPCS1 derived from Arabidopsis thaliana and NsPCS derived from Nostoc nor point mutated enzymes couldn't show any significant change. Optimization of the reaction condition could make us detect lower level of cadmium than 0.003 mg/L which is environmental standards for water quality.

研究分野：酵素利用学

キーワード：感度向上

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Cd は国際がん研究機関 (IARC) による発がん性リスク評価で発がん性が十分に認められる Group1 に分類され、また長期曝露により腎障害を引き起こすことが知られている。かつて日本では垂鉛や銅の鉱山から流出し、水系や土壌を高濃度で汚染していた Cd が食物などを通じて人体に摂取された結果、イタイイタイ病などの甚大な健康被害が発生した。また現在ではポリ塩化ビニルの安定剤、着色料、ニッケル・カドミウム蓄電池の電極材料、様々な合金の成分として工業的に利用されており、これらの工場の跡地から検出されることも多い。Cd による健康被害を未然に防ぐため、日本では食品中や環境中などに対して Cd 濃度の基準値が設定されてきた。さらに近年、国際状況に合わせ、その Cd 濃度の基準がより厳格化された。例えば、米に関しては Cd 基準値が玄米で 1.0 mg/kg 未満から玄米及び精米中で 0.4 mg/kg 未満へと引き下げられ、水質環境基準値に関しても 2011 年に 0.01 mg/L から 0.003 mg/L へと引き下げられた。国民の安全・安心への関心も高まり、これまでよりも網羅的かつ、上記の基準に対応した高感度なモニタリングが必要とされる。また、世界的にみるとさらにその必要性は高く、例えば中国の環境保護部らによって 2014 年に報告された調査によると、土壌の環境基準値の 5 倍以上の Cd が検出された地域もあり、Cd による汚染状況は非常に深刻である。こうした国や地域では上記のような網羅的かつ高感度のモニタリングによって早急に汚染の現状を把握し、対策を講じることが必要とされている。

現在、原子吸光法や ICP (Inductively coupled plasma) 発光分析法などが、環境試料や食品中の Cd 分析のための公定法として定められている。これらの測定方法は高感度・高精度であり、引き下げられた基準値の Cd も十分に検出可能であるが、試料の前処理や分析操作が煩雑であることや、分析機器が高価であることから、一般的には専門機関への分析委託が行われている。例えば、厚生労働省の認可機関である日本食品分析センターでは、1 検体あたり 7000 円の費用が必要であり、さらに結果報告まで数日間を要する。このように現行の機器分析法では多くの試料を対象とした網羅的な食品や環境試料のモニタリングには適さない。このため、上記のような基準値を検出できる高い感度を持ちながら、簡便で、迅速、低コストで、さらにはオンサイトでの使用が可能な、機器分析法に代わる新たなモニタリング技術の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

主に Cd によって強く活性化される高等植物由来フィトケラチン合成酵素 (PCS) は、グルタチオン (GSH) を基質として重金属抱合ペプチド、フィトケラチン (PC) を重金属濃度依存的に合成する ( $GSH \rightarrow \gamma\text{-EC} + Gly$ ,  $\gamma\text{-EC} + GSH \rightarrow PC_2$ )。我々はこの性質を利用して PCS をセンサー素子とする Cd バイオセンサーの構築を行ってきた。しかし、現在世界規模で問題となっている有害重金属による環境汚染の対策には、さらに高感度に多様な重金属を検出することが求められる。本研究では、PCS の基質の結合及び重金属による活性化に影響を与える部位を特定・改変することにより、高い基質親和性と今まで報告されていない重金属特異性を有する PCS を作成し、この PCS をセンサー素子として、多様な有害重金属の検出が可能な高感度バイオセンサーを開発することを目的としてきた。

### 3. 研究の方法

(1) 我々がこれまで用いてきた酵母表面提示 PCS に代わり、精製組換え PCS を Cd 認識素子としたバイオセンサーについて反応条件の最適化を行った。

(2) 高感度素子の作成を目指し、シロイヌナズナ由来 AtPCS1 ヘルラン藻由来 NsPCS の基質結合部位を導入した融合酵素を作成し、評価を行った。

(3) NsPCS の酵素工学的評価を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究では、精製した AtPCS1 の組換えタンパク質を用いた検討を行った。精製については、AtPCS1 を His-tag 融合タンパク質として大腸菌で発現させ、その後、Ni-Sepharose アフィニティーカラムを用いて精製した。しかし、精製後の酵素液中には宿主大腸菌の培養及び精製過程において用いた試薬、カラム等に含まれる重金属が混入している可能性が高く、低濃度 Cd の検出にあたってはその影響は無視できない。実際に、酵母表層提示した PCS を Cd 認識素子として用いた場合にも Cd 非添加条件で PC 合成が確認されており、高い感度で Cd 検出ができない原因の一つと考えられる。そこでこれらの夾雑金属類を PC 合成反応前に取り除くことを目的とし、His-tag 精製後、金属キレート剤である Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) を加えて、その効果を調べた。その結果、2 mM の EDTA 処理を行うことにより Cd 非添加時の PC 合成量が減少し、Cd 0.01  $\mu\text{M}$  (0.0011 mg/L) 添加時の PC 合成量との差が大きくなることが確認された (Fig.1)。

次に、精製 AtPCS1 の Cd 認識素子としての Cd 検出能を調べた。上記の系と同様に、精製後 2 mM EDTA で処理した精製 AtPCS1 を用いて PC 合成反応を行った。その結果、Cd 非添加時と比較して、Cd 0.004  $\mu\text{M}$  添加時から PC 合成量が増加し、0.008  $\mu\text{M}$  添加時において有意に PC 合成量の増大が認められた (Fig.2)。

上記の結果から、EDTA 処理によって試薬やカラム等に含まれる余分な金属類を取り除くことで、Cd 非添加時の PC 合成量を減少させ、Cd 検出限界の向上に成功したと言える。しかし、依然 Cd 非添加時においても PC が検出されており、これを減少させることにより、さらに感度を向上できる可能性があり、今後の検討課題である。

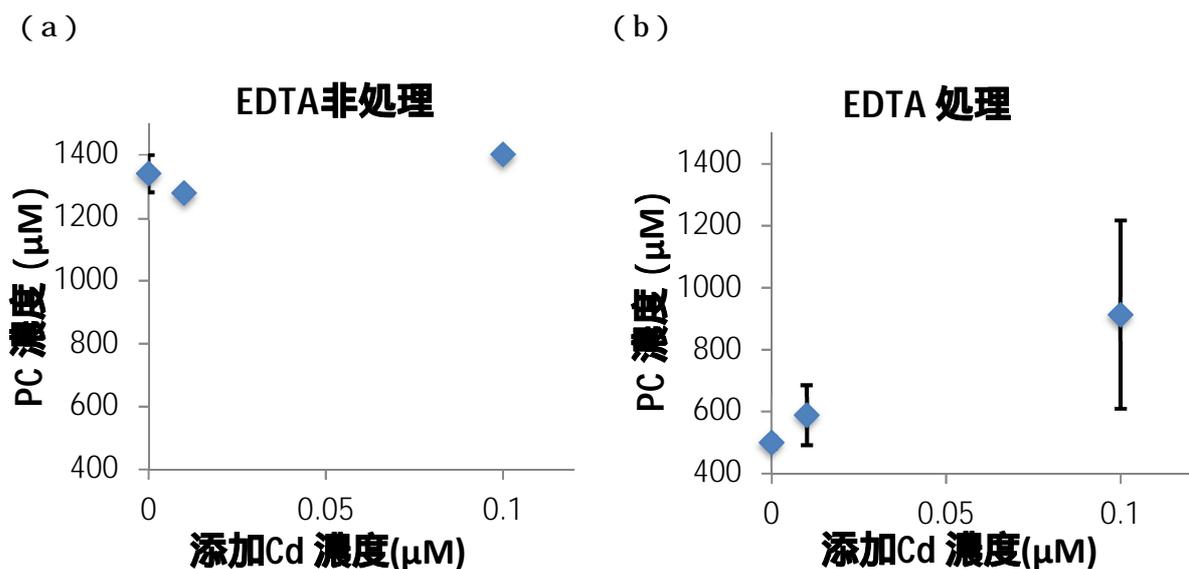


Fig.1 EDTA 処理による PC 合成反応への影響評価

(a) EDTA 処理なし (b) 2 mM EDTA 処理

PC 合成量は HPLC によって測定。エラーバーは標準偏差を表す。(n=3)

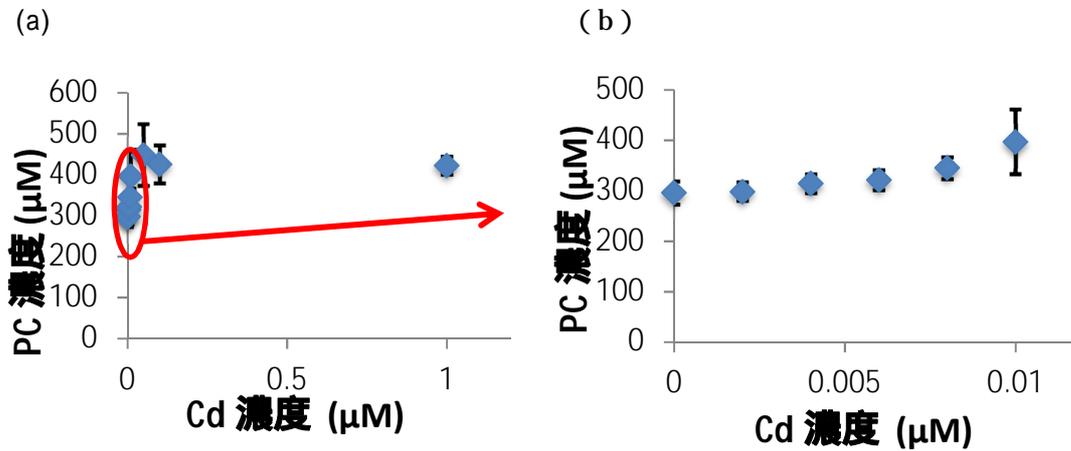


Fig.2 精製 AtPCS1 センサーの検出能

(a) Cd 1 μM までの PC 合成量 (b) Cd 0 ~ 0.01 μM までの PC 合成量

HPLC によって定量。エラーバーは標準偏差を表す。(n=3)

(2) PCS は真核生物に広く存在しており、AtPCS1 をはじめとする真核生物由来 PCS は保存性の高い N 末端と種によって大きく異なる C 末端から構成されており、共通して、重金属に活性化されて PC を合成する機能を有する。一方、ラン藻由来 NsPCS は保存性の高い N 末端のみから構成されており、PC 合成能を有さない。また、我々のこれまでの研究により、NsPCS は AtPCS1 と比較して基質である GSH への親和性が高いことを確認している。そこで、N 末端を NsPCS 由来、C 末端を AtPCS1 由来とする融合酵素を作成し、基質親和性を向上させ、かつ PC 合成能を有する Cd 検出能の高いセンサー素子の作成を目指した (fig.3)。しかし、融合酵素は PC 合成能を持つ



Fig.3 酵素比較図

ものの、AtPCS1 と比較して親和性が向上したとは言えず、Cd 検出能の高いセンサー素子の作成には至らなかった。

(3) 上記の研究と並行して、NsPCS の酵素工学的評価を行った。その結果、反応の条件下の最適化に成功し、反応速度を向上させることができた。この結果は、今後 Cd 検出能の高いセンサー素子作成に役立つ可能性がある。

本研究の結果より、日本の水質環境基準値以下の Cd も検出可能なセンサー素子の作成に成功したと言える。今後、Cd 非添加時の PC 合成を減少させ、かつ簡便な検出方法と組み合わせることで、実用可能なバイオセンサーとして利用できる可能性が示唆された。しかし、検出可能な重金属の多様化には至らず、今後さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Muraoka Misa, Ohno Moeka, Tateishi Makoto, Matsuura Hideyuki, Nagano Kazuya, Hirata Yoshihiko, Hirata Kazumasa	4. 巻 44
2. 論文標題 Optimization of Reaction Conditions for $\gamma$ -Glutamylcysteine Production from Glutathione Using a Phytochelatin Synthase-Like Enzyme from <i>Nostoc</i> sp. Pasteur Culture Collection 7120	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1832 ~ 1836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00494	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Muraoka Misa, Yoshida Saki, Ohno Moeka, Matsuura Hideyuki, Nagano Kazuya, Hirata Yoshihiko, Arai Masayoshi, Hirata Kazumasa	4. 巻 596
2. 論文標題 Reactivity of $\gamma$ glutamyl cysteine with intracellular and extracellular glutathione metabolic enzymes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 180 ~ 188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Muraoka Misa, Ohno Moeka, Nakai Takuya, Matsuura Hideyuki, Nagano Kazuya, Arai Masayoshi, Hirata Yoshihiko, Uyama Hiroshi, Hirata Kazumasa	4. 巻 45
2. 論文標題 Gamma-Glutamylcysteine Production Using Phytochelatin Synthase-Like Enzyme Derived from <i>Nostoc</i> sp. Covalently Immobilized on a Cellulose Carrier	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1191 ~ 1197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b22-00316	査読の有無 無
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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------