

平成 21 年 4 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19510068  
 研究課題名（和文）  
 ラン藻の重金属イオンに対する新規なトキシコロジーと耐性機構に関する研究  
 研究課題名（英文）  
 Study on the toxicology and tolerance mechanism of cyanobacteria against heavy metals  
 研究代表者  
 中島 進（NAKASHIMA SUSUMU）  
 岡山大学・資源生物科学研究所・准教授  
 研究者番号：60033122

## 研究成果の概要：

強力な重金属耐性を有することを見出した糸状体ラン藻における重金属イオンの新規なトキシコロジー並びに耐性機構について研究した。本ラン藻は1価(銅、銀)及び2価(カドミウム、亜鉛)の重金属イオンに暴露されるとリプレッサーを介して重金属輸送及び重金属結合タンパク質が発現するが、そのメカニズムを明らかにした。また銅や銀のような重金属イオンに暴露されると生じる活性酸素とその抑制機構について明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：水環境学、環境微生物生理学

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

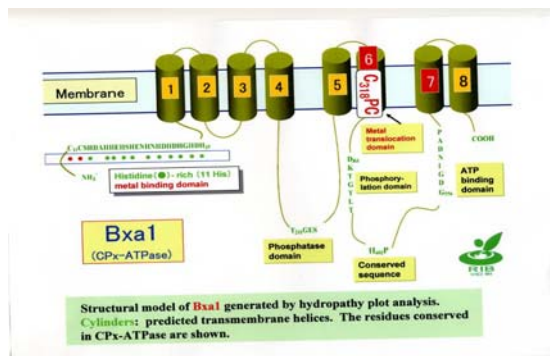
キーワード：水環境、ラン藻、重金属、トキシコロジー、重金属結合タンパク質、重金属輸送体

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、人間活動に伴って環境水中に放出される重金属量は年々増加しており問題になっている。本研究代表者は長年にわたる、水道水の異臭味に関わるかび臭物質産生ラン藻の研究の結果、強力な重金属耐性を有する糸状体ラン藻 *Oscillatoria brevis* を見出し、重

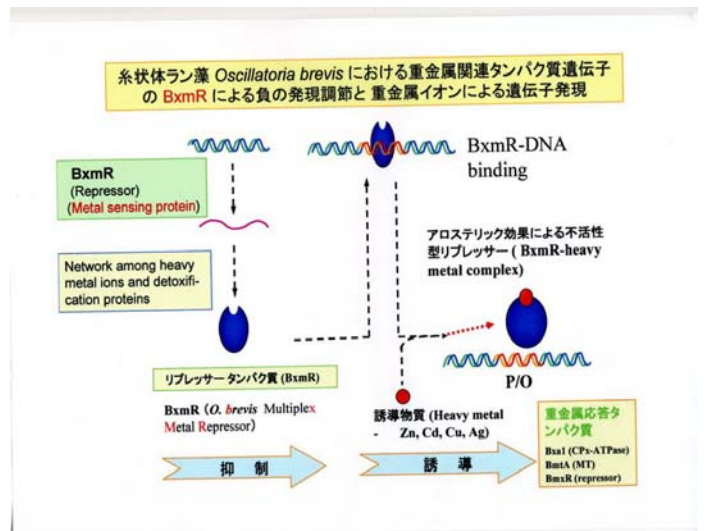
金属耐性機構について研究を行ってきた。これまでに、本ラン藻は新規の重金属輸送体(トランスポーター, CPx-ATPase; Bxa1と命名)を有すること、細胞内に取り込まれた重金属イオンと結合するタンパク質メタロチオネイン(MT; BmtAと命名)を生成することを明らかにした。本研究では、上記輸送体及びMTの

重金属イオンによる発現挙動、機能解析及び細胞内における重金属イオンの無毒化の機構を明らかにする。さらに重金属輸送体及びMTの発現制御に関わる制御因子(リプレッサー; BxmRと命名)を見出しており、重金属輸送体、MT、リプレッサーの3者間のネットワークを明らかにする。これらの研究結果を総合的に解析することにより、重金属が過剰に存在する環境下での生物の適応機構を明らかにすることができると考えている。



(2) これまでの研究で、糸状体ラン藻 *O. brevis* は重金属耐性に関わる MT 及び重金属イオン輸送体をもつラン藻であることを示した。一方、単細胞ラン藻 *Synechococcus* は MT のみ、*Synechocystis* は Zn を細胞外へ排出する輸送体のみを有している。従って、MT と重金属輸送体の両者を有する *O. brevis* は重金属耐性機構及び細胞内における重金属の恒常性を解明するための優れたモデル生物になると考えている。またこれまでに報告された MT 及び重金属輸送体は 1 価 (Ag, Cu) あるいは 2 価 (Cd, Zn) の重金属イオンのいずれかにしか応答しないことが報告されている。しかし、*O. brevis* の MT 及び重金属輸送体は 1 価及び 2 価の両種の重金属に対しても応答する初めての微生物であることが明らかになった。また MT 及び重金属輸送体の両者の発現を制御するリプレッサーも見出した。これらのことは従来全く報告されていない。本研究が進めば、重金属輸送体、MT、リプレッサーの機能、ラ

ン藻の重金属耐性機構や重金属イオンの細胞内恒常性の維持機構の解明が大きく進展するものと考えている。



(3) *O. brevis* を含む糸状体ラン藻の重金属耐性機構に関する詳細な研究は国内外で全くない。本研究は、研究代表者が強力な重金属耐性を有していることを初めて見出したラン藻を用いるものである。

本種の MT、重金属輸送体、及び両者の発現制御に関わるリプレッサーのいずれも 1 価 (Ag, Cu) 及び 2 価 (Cd, Zn) の重金属イオンに応答するという特徴を有している。

## 2. 研究の目的

本研究はラン藻 *O. brevis* 等における重金属の新規なトキシコロジー及び耐性機構を明らかにすることを目的とする。*O. brevis* の細胞に Cu や Ag のような重金属イオンの投与によって細胞内で発生する活性酸素について研究する。また細胞に予め Zn を投与して MT を誘導して、Cu や Ag による強い毒性を抑制できるかどうか検討し、MT の生理的な役割を明らかにする。さらに本種による重金属の蓄積、ゲルろ過クロマトグラフィーを用い

て重金属と MT、色素タンパク質との相互作用、重金属輸送体や MT の重金属イオンによる発現挙動及び細胞内における無毒化機構を解明する。さらに重金属に対するラン藻の応答反応を明らかにして、その反応系を利用する水中の重金属イオンの検出、定量法の開発を行う。

### 3. 研究の方法

(1) ラン藻 *O. brevis* に重金属、特に毒性が強い Cu や Ag のようなイオンを投与した場合の活性酸素の発生の検討。

蛍光試薬 DCFH-DA (dichlorofluorescein diacetate) を用いて蛍光顕微鏡で細胞中の活性酸素の発生を観察する。こうした手法で重金属に起因する活性酸素の発生を調べることができれば、環境水中における重金属イオンのモニター系に使えることが考えられる。さらに予め Zn を投与して MT を生成しておく、Cu や Ag を暴露した場合、それらの毒性が軽減できるかどうか上記と同様な手法を用いて検討する。

(2) ラン藻類に及ぼす重金属のトキシコロジーの解析と水中の重金属のモニターへの応用。

ラン藻類に重金属を投与して、その応答反応を調べて溶出する色素タンパク質量や、色素タンパク質と重金属との反応等を調べることにより、水中の重金属を簡便に調べるモニター系を開発する。

(3) ラン藻細胞による重金属の吸着量の測定及び MT のプロファイルに及ぼす各種重金属イオンの影響。

ラン藻 *O. brevis* が強力な重金属耐性を示す要因の一つとして本種が強固な細胞壁を

有していることを認めている。ラン藻細胞に Cu や Ag などの各種重金属イオンを投与して細胞による吸着量を原子吸光法により調べる。またゲルろ過クロマトグラフィーにより MT のプロファイルに及ぼす各種重金属イオンの影響について検討する。

(4) ラン藻細胞に投与した重金属イオンによる MT、重金属輸送体 (CPx-ATPase)、リプレッサー (BxmR) の各遺伝子の発現量の測定。

*O. brevis* が重金属イオンに暴露された際の上記の重金属耐性関連遺伝子の発現レベルを調べる。*O. brevis* を含む培養液に重金属の濃度を変えて、また投与後の時間を変えて培養を続けた後、細胞から RNA を調製し、Real-time Quantitative Reverse Transcription (QRT)-PCR により各遺伝子の発現パターンを調べ、各重金属イオンに対する応答反応を解析する。

(5) リプレッサー (BxmR) と重金属応答遺伝子のオペレーター/プロモーター (O/P) 領域との結合の検討。

本リプレッサー遺伝子を大腸菌に導入して形質転換体を作製する。大量培養した大腸菌から本タンパク質を精製する。ゲルシフトアッセイ法を用いて、このリプレッサータンパク質が MT、重金属輸送体の各遺伝子の O/P 領域の DNA 断片との結合を調べる。本リプレッサーと DNA 断片が結合した複合体が各種重金属イオンの濃度変化によってどのように解離するかゲルシフトアッセイ法により調べる。

(6) *O. brevis* の *bxa1* 遺伝子の機能解析。

*Bxa1* の詳細な機能解析を行うため、酵母と大腸菌の両方に *bxa1* 遺伝子を導入し、重金

属に対する感受性を調べると同時に、Bxa1 の N 末の His リッチ領域を欠損した変異株を作成し、同様に重金属に対する感受性を調べて、重金属耐性における N 末領域の役割を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) かび臭物質を産生する糸状体ラン藻 *Oscillatoria brevis* のゲノム DNA から単離した、重金属輸送体 CPx-ATPase に関わる新規遺伝子 (*bxa1*)、重金属結合タンパク質メタロチオネイン (MT) をコードする遺伝子 (*bmtA*) 及び SmtB/ArsR ファミリーに属する金属制御遺伝子 (リプレッサータンパク質) をコードする新規遺伝子 (*bxmR*) の特性解析を行った。その結果、BxmR は *bxa1*, *bmtA* 及び *bxmR* 自身の発現を制御することが判明した。また *O. brevis* は 1 価 (Cu, Ag) 及び 2 価 (Zn, Cd) の両種の重金属によって発現制御される上記 3 種の遺伝子を持つことが判明した。さらに次の 2 つの重要なことが示唆された。

① *bxmR* の発現は *bmtA* の発現と完全に同様な傾向を示した。さらに EMSA (ゲルシフトアッセイ法) の実験により、リプレッサー BxmR は *bmtA* と *bxmR* の operator/promoter 領域に存在する 12-2-12 inverted repeat を含む DNA 断片に結合することが示された。従って、このサイトはこれら 2 つの遺伝子の同時転写制御に関わると考えられる。また、結合した BxmR と DNA 断片は各種重金属イオン (Ag, Cu, Cd, Zn) を加えると両者は解離することを EMSA により確認し、BxmR は *bmtA/bxmR*, *bxa1* の発現を制御していてリプレッサーとして働いていることが示された。

② 金属に依存する輸送体 Bxa1 の発現が、*O. brevis* の重金属毒性に対する最初の防御機構として働き、メタロチオネイン BmtA の

発現はゆっくりとした 2 番目の防御システムとして機能することが示唆される。

(2) ラン藻 *O. brevis* は重金属耐性を有し、重金属イオンを投与すると MT (BmtA) を生成する。*O. brevis* の培養液に予め投与した Zn により BmtA を誘導 (Zn-BmtA が生成) しておくと、毒性の強い Cu や Ag のようなイオンを投与しても、細胞内に取り込まれた Cu や Ag は Zn と置換して Cu-, Ag-BmtA となり、活性酸素の発生が抑制され、毒性が軽減されることが判明した。さらに、*O. brevis* の培養液に Cu や Ag のような重金属イオンを投与して細胞内で発生する活性酸素の発生の度合いを蛍光顕微鏡により検出できた。本法を用いて水環境中の重金属汚染を感度よくモニターできることが明らかになった。

(3) ラン藻等由来の光合成補助色素 [*O. brevis* 由来の Phycoerythrin (PE), Phycocyanin (PC)、その他 *Phormidium tenue* 等のラン藻細胞から得られた PC、ラン藻 *Spirulina* 由来の PC、紅藻由来の PE] を反応させ、PE と PC の蛍光強度を蛍光分光光度計により測定した。その結果、Ag, Cu, Au, Pt, Pd は PE, PC と混合すると濃度依存的に蛍光強度の著しい減衰が認められ、強い反応性が認められた。これらのイオンは低濃度においても色素と反応することから、低濃度の Ag, Cu, Au, Pt, Pd の検出に有用である。Cd と Zn に関しては、蛍光強度は減衰せず、反応性は低いと考えられた。

(4) 貴金属イオンのラン藻細胞への影響。

ラン藻細胞を含む溶液に貴金属を投与し、数時間～1日経過した細胞溶液を遠心分離し、得られた上清画分に含まれる PC の蛍光強度を測定し、ラン藻に及ぼす貴金属イオン

の影響を検討した。ラン藻細胞を含む培地に重金属イオンを投与すると、細胞膜が傷害を受けて、*O. brevis*からPC、PC、*P. tenue*等からPCが溶出することが認められた。しかし、AuやPtは色素と反応するにも係わらず、高濃度のAuやPtを*P. tenue*細胞を含むCT培地へ投与しても、細胞から溶出した色素の蛍光強度は減衰しなかった（Cu及びAgの場合は減衰）。検討の結果、用いたCT培地中の $\beta$ -glycerophosphate ( $\beta$ -GP、リン源)及びラン藻から培地中に分泌された物質が、AuやPtと反応するためであることがわかった。 $\beta$ -GPを含まないCT培地にラン藻細胞を移し変えて、AuあるいはPtを投与したところ、高濃度で加えたAuやPtは溶出したPCと反応して、PCの蛍光強度が減衰することが認められた。

#### (5)ラン藻による重金属の吸着.

ラン藻細胞による重金属イオンの吸着能力について検討した。その結果、貴金属を含む重金属イオン溶液に*O. brevis*の細胞を添加すると、貴金属イオンは他の重金属イオン(Cd, Zn, Cu, Ag)に比べてよく吸着されることが判明した。

(6)*O. brevis*に重金属イオンを投与し、破砕した細胞の上澄液を熱処理してゲル濾過クロマトグラフィーにかけると、Cd, Znの場合にはCd-MT, Zn-MTの生成が認められた。しかし、Cuの場合には、熱処理すると、Cu-フィコビリタンパク質の生成が認められた。そこで、上澄液を熱処理せずにゲル濾過クロマトグラフィーにかけると、Cuの場合にはMT-Cu-フィコビリタンパク質が生成することが明らかになった。さらに、CuとCdを投与して、上記と同様に細胞を破砕して熱処理せずにゲル濾過クロマトグラフィーにかけ

ると、MT-Cd-Cu-フィコビリタンパク質が生成することが認められた。

(7)*O. brevis*由来の重金属輸送体Bxa1のN末に存在するHisリッチドメインは、2つのCys残基の後にHisリッチなモチーフを含み、他の重金属輸送体のそれとは大きく異なっている。本研究ではBxa1のより詳細な解析を行うために酵母と大腸菌の両方でheterologous expressionを行った結果、Bxa1は重金属輸送に関する重要なタンパク質であることがわかった。しかし、酵母での結果が大腸菌と逆の結果になり、その原因として酵母ではBxa1の細胞内局在が大きく関わっていることが考えられた。また、Bxa1のN末のHisリッチ領域を欠損させることによって、Bxa1は機能を失うことが示され、*O. brevis*のBxa1のN末に存在するHisリッチドメインが、1価及び2価の重金属に対する耐性に必要不可欠であることを明らかにした。

本研究が進展したことにより、重金属イオンが生物に及ぼす毒性機構並びに耐性機構を明らかにすることができ、複合領域としての環境学、特に水圏環境学におけるトキシコロジーの分子レベルにおける理解に貢献できたものと考えている。このような幅広い研究は国内外でみられない。今後、さらに重金属輸送体、重金属結合タンパク質、リプレッサーの3者間のネットワーク、並びに重金属関連の新規遺伝子の探索と機能解析が進み、ラン藻細胞における重金属イオンのトキシコロジー及び耐性機構の詳細を分子レベルで解明されることが期待される。また光合成補助色素を用いた水中の微量重金属イオンのモニタリングへの応用が期待される。さらに本ラン藻は重金属耐性に深く関わる細胞壁を有してい

ることを認めており、このラン藻の細胞壁の構造と機能を検討し、重金属耐性への寄与を明らかにすることが望まれる。

近年、重金属結合タンパク質(MT)や重金属輸送体(CPx-ATPase)はラン藻細胞だけでなく、植物細胞における機能、並びに人間の健康維持や病気にも深く関わっていることが認識されてきており、こうしたラン藻における研究の進展が植物細胞における機能や人間の病気の問題解決にも寄与するものと考えている。

## 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2件)

- ① E. Nakakihara, H. Kondo, S. Nakashima, B. Ezaki, Role of N-terminal His-rich domain of *Oscillatoria brevis* Bxal in both Ag(I)/Cu(I) and Cd(II)/Zn(II) tolerance. Open Microbiology Journal 27:951-961, 2009. 査読有
- ② 中島 進・広瀬和信・橋本あづさ・江崎文一・山崎良樹・今野晴義:かび臭物質ラン藻 *Oscillatoria brevis* におけるメタロチオネインのプロファイルに及ぼす重金属イオンの影響、分取クロマトグラフィー研究会誌 3(1):53-61, 2008. 査読無

[学会発表] (計8件)

- ① 中島進, 重金属イオンに対するかび臭物質産生ラン藻の応答反応(1), 日本水処理生物学会第45回大会, 2008年11月13日, 秋田.
- ② 中島進, 重金属イオンに対するかび臭物質産生ラン藻の応答反応(2), 日本水処理生物学会第45回大会, 2008年11月13日, 秋田.
- ③ 中島進, 糸状体ラン藻に及ぼす重金属の作用の解析, 第3回分取クロマトグラフィー研究発表会, 2008年4月19日, 倉敷.
- ④ 江崎文一, 糸状体ラン藻 *Oscillatoria brevis* の重金属輸送体 *bxa1* 遺伝子のCdストレスに関する機能解析, 第49回日本植物生理学会年会, 2008年3月21日, 札幌.
- ⑤ S. Nakashima, Effect of heavy metals on a cyanobacterium and application to

environmental biomonitoring of heavy metals. International Symposium on Metallomics 2007, November 30, 2007, Nagoya.

- ⑥ 中島進, かび臭物質産生ラン藻 *Oscillatoria brevis* における重金属による活性酸素の発生とその抑制, メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス 2007, 2007年9月29日, 徳島.
- ⑦ 中島進, 糸状体ラン藻の重金属イオンに対する適応機構, メタロチオネインおよびバイオサイエンス 2007, 2007年9月29日, 徳島
- ⑧ S. Nakashima, Heavy metal induces oxidative stress and is modulated by a metallothionein in a cyanobacterium, 13<sup>th</sup> International Symposium on Toxicity Assessment, August 21, 2007, Toyama.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 進 (NAKASHIMA SUSUMU)

岡山大学・資源生物科学研究所・准教授  
研究者番号: 60033122

### (2) 連携研究者

江崎 文一 (EZAKI BUNICHI)

岡山大学・資源生物科学研究所・准教授  
研究者番号: 90243500