

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82107

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380044

研究課題名(和文) 土壌微生物 - 植物を介した形態別ヒ素輸送システムの解明

研究課題名(英文) Arsenic transport system by plant-soil microorganism interaction

研究代表者

石川 覚 (Ishikawa, Satoru)

独立行政法人農業環境技術研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：40354005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：我々はイネの根圏からヒ素のメチル化に関わる細菌GSRB54株とGSRB05株を単離した。GSRB54株はヒ素メチルトランスフェラーゼ(arsM)遺伝子を持ち、その塩基配列から新規の遺伝子であることがわかった。一方、GSRB05株は未知の有機ヒ素化合物を合成した。LC/MS/MSやNMR解析の結果、未知の有機ヒ素化合物は、モノメチルヒ素の部分構造を持つアミノ酸誘導体であり、アルシノスリシン(AST)と命名した。ASTはArthrobacterによってMMAまで分解されることがわかった。これらの結果、玄米中のメチルヒ素の由来はイネ根圏の微生物による亜ヒ酸のメチル化産物であることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：We isolated from the rice rhizosphere two bacteria responsible for As methylation. Strain GSRB54 and GSRB05 were classified into the genus Streptomyces and Burkholderia, respectively, by 16S rRNA sequencing. The arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase (arsM) gene of GSRB54 was phylogenetically different from known arsM genes in other bacteria. Heterologous expression of GSRB54 arsM in *E. coli* converted the methylation of As(III) into DMA. On the other hand, strain GSRB05 produced an unknown organic As compound (uAs1). The analyses by using LC/MS/MS, ¹H-, ¹³C-NMR and 2D-NMR elucidated that the chemical structure of uAs1 is amino acid derivative with a monomethylated As partial structure and we named it as Arsenothricin (AST). AST was degraded into MMA by *Arthrobacter* sp. These results suggest that the bacteria isolated from this study are associated with methylated As accumulation in rice grains through As methylation in the rice rhizosphere.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：無機ヒ素 メチルヒ素 イネ根圏 土壌微生物

1. 研究開始当初の背景

農耕地のヒ素汚染は、灌漑稲作農業の多いアジアを中心に顕在化している。特に Bangladesh やインドの西ベンガル州周辺では、地質由来のヒ素で汚染された地下水を農業用水に利用しているため、飲料水と共にコメのヒ素汚染が国家的な問題となっている。また、日本でも古くから鉱山由来のヒ素汚染が見られ、客土対策等の措置が執られている。農林水産省の実態調査によると、日本で生産される米の平均総ヒ素濃度は 0.16mg kg^{-1} であるが、この値は畑作物等に比べて、圧倒的に高い数値である。農産物からの総ヒ素摂取量を見てもコメの寄与率が最も高いことや、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(JECFA)では、通常米に多く含まれる無機ヒ素がヒトの肺がん発生確率を増加させることを疫学調査から明らかにしており、コメのヒ素濃度の低減対策が今後急がれる。

土壌中のヒ素は、湛水等で還元状態が進行するとヒ酸(As(V))から亜ヒ酸(As(III))に変化し、土壌溶液中に溶けやすくなり、イネに吸収される。一方、玄米中に検出されるヒ素は亜ヒ酸に限らず、ヒ酸、モノメチルアルソン酸(MMA)、ジメチルアルシン酸(DMA)と多様な形態を示す。形態別でのヒ素の存在比率は玄米の総ヒ素濃度に大きく依存する。例えば、日本産米の平均的なヒ素濃度である 0.16mg kg^{-1} 程度では、約80%が無機ヒ素(亜ヒ酸+ヒ酸)として存在するが、湛水下の高ヒ素土壌で栽培すると、玄米ヒ素濃度は $2\text{-}3\text{mg kg}^{-1}$ となり、無機ヒ素に代わってメチル化ヒ素の一種であるDMAが約80%を占める。コメ中に含まれるDMAの由来に関しては、これまで2つの仮説が提唱されている：1) 土壌微生物によって亜ヒ酸がDMAに代謝された後、イネがそのDMAを直接吸収する説、2) イネに吸収された亜ヒ酸がイネ体内でDMAに代謝される説。このどちらの仮説が正しいのか、未だ立証されていない。加えて、多様な形態を示すヒ素がどのようにイネに輸送されるのか、そのシステムも十分に理解されていない。

2. 研究の目的

以上の研究背景のもと、本研究では土壌微生物-植物を介した形態別ヒ素輸送システムの解明を目的として、以下の3つの課題を取り組んだ。

- (1) ヒ素のメチル化に関わる土壌微生物の単離・同定
- (2) イネによる形態別ヒ素の動態の解明
- (3) ヒ素輸送時に発現する遺伝子の解析

3. 研究の方法

- (1) ヒ素のメチル化に関わる土壌微生物の単離・同定

水稻栽培と根圏土壌の採取

鉱山周辺の水田からヒ素濃度の高い土壌(1M塩酸抽出で 8mg/kg)を採取した。風乾後、篩

を通した土壌にコシヒカリの幼苗を移植し、常時湛水下でポット栽培を行った。出穂後、ポットから稲株を取り出し根と根圏土壌を採取した。

ヒ素代謝細菌の選抜

採取した根と根圏土壌をすりつぶし、滅菌水で希釈した液を R2A 寒天培地上に広げた。2日後、得られたコロニーを形態的な特徴を基準に選抜した。各コロニーを $2.67\mu\text{M}$ 濃度の亜ヒ酸で10日間培養した。得られた懸濁液に希硝酸を添加することで、ヒ素化合物を抽出した。ヒ素の化学形態分析では、4種のヒ素標品(亜ヒ酸、ヒ酸、MMA、DMA)を用いて、逆層カラムが付属した HPLC で分画後、ICPMS 装置でヒ素濃度を測定した。

ヒ素代謝細菌の同定

選抜の結果、亜ヒ酸を DMA に変換できる細菌(GSRB54 株)と亜ヒ酸を未知の有機ヒ素化合物に変換できる細菌(GSRB05 株)が得られた。両細菌の形態的な特徴は電子顕微鏡を用いて観察した。16S rRNA の塩基配列情報を基に、菌種の同定を行った。

ヒ素のメチルトランスフェラーゼ(*arsM*)遺伝子の同定と発現解析

Degenerate-PCR と TAIL-PCR を用いることで、GSRB54 株が持つ未知の *arsM* の塩基配列を決定した。GSRB54 株をヒ素処理し、経時的に *arsM* 遺伝子の発現レベルを RT-PCR で測定した。

ヒ素感受性大腸菌を用いた *arsM* 遺伝子の機能解析

arsM 遺伝子を入れたベクターを、亜ヒ酸排出ポンプが欠損したヒ素感受性大腸菌(JW3469)に導入した。組換え大腸菌を高濃度($100\mu\text{M}$)の亜ヒ酸が入った LB 培地で12時間培養した。生育を2時間毎に OD_{600} で測定した。さらに培養液を経時的に採取し、HPLC-ICPMS で形態別にヒ素濃度を測定した。

GSRB54 株のイネへの接種実験

無菌栽培したコシヒカりに GSRB54 株を接種または非接種し、亜ヒ酸で約10日間処理した。処理後、イネ中に含まれる DMA 濃度を測定した。

GSRB05 株が生成する未知のヒ素化合物の精製と構造決定

GSRB05 株を亜ヒ酸を含む R2A 培地で大量培養し、その菌体を含む培養液から、未知の有機ヒ素化合物の精製を行った。精製にはイオン交換およびゲルろ過クロマトグラフィーを用いた。精製したヒ素化合物は高分解能 LC/MS/MS を用いて分子式を決定した。さらに化学構造を明らかにするため、 ^1H 、 ^{13}C -NMR およびそれらの2次元 NMR 解析を行った。

未知の有機ヒ素化合物の生物毒性試験

コシヒカリの苗に未知のヒ素化合物を与え、その生育と吸収性を調査した。同様に、ヒ素感受性大腸菌でも行った。

- (2) イネによる形態別ヒ素の動態の解明
当初の計画では、形態別にヒ素のラジオアイ

ソトープを製造し、投与実験を通してイネ体内におけるヒ素の挙動を明らかにする予定であった。しかしながら、東日本大震災の影響で茨城県東海村にある（独）日本原子力開発研究機構原子力科学研究所の原子炉 JRR3 が稼働できなくなり、ヒ素の RI を製造不可能になった。現段階でも停止状態のため、本計画を中止することとした。

(3) ヒ素輸送時に発現する遺伝子の解析形態別にヒ素で処理したコシヒカリの根、茎葉、子実から RNA を抽出し、イネオリゴ DNA マイクロアレイ (4 x 44K) によって網羅的に遺伝子の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒ素のメチル化に関わる土壌微生物の単離・同定
イネの根圏域から亜ヒ酸を DMA に変換する細菌 GSRB54 株 (図 1) および未知のヒ素化合物に変換する GSRB05 株を単離した。

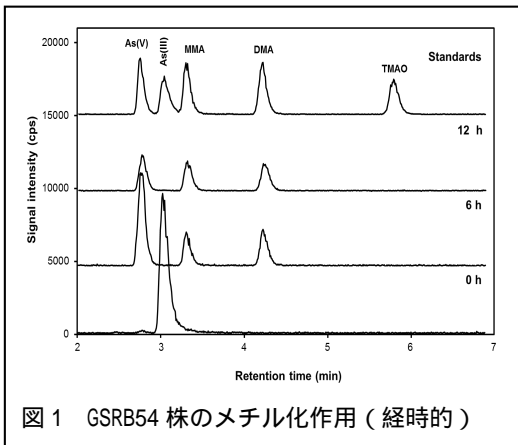


図 1 GSRB54 株のメチル化作用 (経時的)

16S rRNA の結果、GSRB54 株は *Streptomyces* 属、GSRB05 株は *Burkholderia* 属であり、共に新種であることがわかった。走査型電子顕微鏡で撮影した各細菌の形態を図 2 に示した。

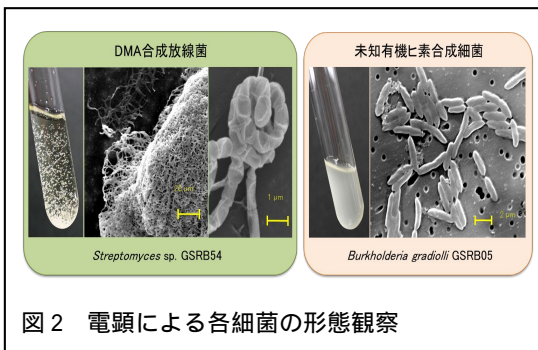


図 2 電顕による各細菌の形態観察

GSRB54 株の DMA 合成は亜ヒ酸応答性であり、MMA を基質とした場合は合成されなかった。また、菌の生育ステージに関係なく、DMA は合成された。本菌によるメチル化は DMA までであり、トリメチルヒ素の生産は認められなかった。GSRB54 株から *arsM* 遺伝子をクローニングしたところ、ORF は 780bp であった。

アミノ酸配列をもとに系統樹を作成したが、これまで報告された配列との相同性は低く、新規の *arsM* 遺伝子であることがわかった (図 3)。この *arsM* 遺伝子の発現量は亜ヒ酸の添加と共に上昇し、DMA が生成され培地中の亜ヒ酸濃度が低下するとその発現量も低下した。

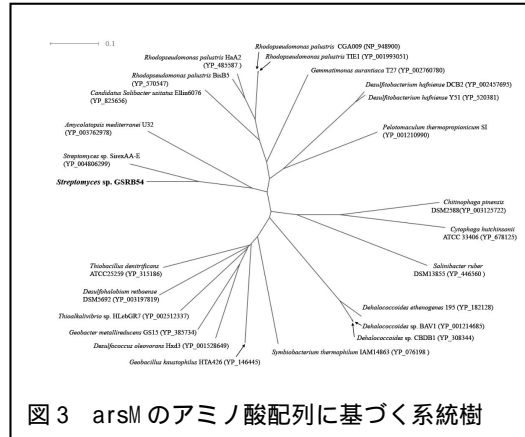


図 3 *arsM* のアミノ酸配列に基づく系統樹

arsM 遺伝子を導入したヒ素感受性大腸菌はベクターコントロールに比べて、亜ヒ酸による生育阻害が著しく軽減された。培地に添加した亜ヒ酸は DMA からさらにトリメチルアルシノキドまでメチル化が進行した (図 4)。このことから、GSRB54 株から単離した新規の *arsM* はヒ素のメチル化機能を持つことが立証された。

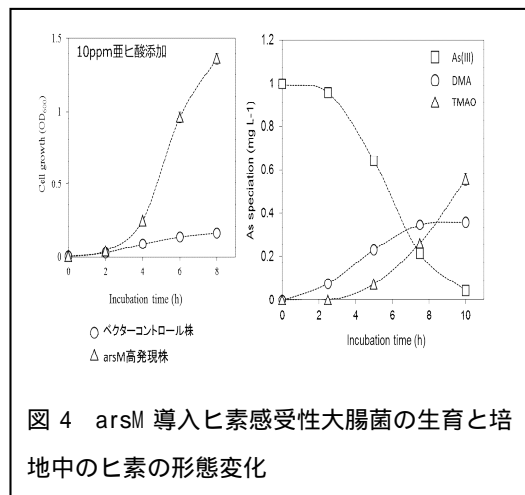


図 4 *arsM* 導入ヒ素感受性大腸菌の生育と培地中のヒ素の形態変化

無菌栽培したイネに GSRB54 株を接種した場合、地上部に DMA が検出された。一方、非接種の場合は無機ヒ素のみ検出された。このことから、GSRB54 によって生産された DMA は確かにイネに吸収されることが確認できた。Burkholderia 属の GSRB05 株が合成する新規のヒ素化合物を LC/MS/MS で解析した結果、分子式が $C_6H_{12}O_4NaS$ であることがわかった。NMR 解析の結果、モノメチルヒ素の部分構造を持つアミノ酸誘導体であることがわかった。本化合物の構造は除草剤であるピアラフオスの構成成分であるホスフィノスリシンと非常に類似する構造であることから、アルセノスリシンと命名した。イネおよびヒ素感受性大腸菌によるアルセ

ノスリシンの吸収を調べたところ、どちらもほとんど吸収されないことがわかった。アルセノスリシンは同様に分離した *arthrobacter* 属の細菌によって MMA まで分解されることがわかった。このことから、アルセノスリシンはイネに吸収されず、土壤微生物群集内で循環する一つの化学形態であることが示唆された。

(2) イネによる形態別ヒ素の動態の解明
上述のように、震災による影響でヒ素の RI が未だ製造できないため、本計画を中止した。

(3) ヒ素輸送時に発現する遺伝子の解析
マイクロアレイによる網羅的な遺伝子解析の結果、ヒ素処理によって酸化ストレス関連の遺伝子発現が多く認められた。仮にイネ体内で亜ヒ酸がメチル化されて DMA に変換される場合、S-アデノシルメチルトランスフェラーゼ (SAM) 関連の遺伝子が高発現すると予想される。しかしながら、SAM の遺伝子発現はヒ素処理によって認められなかった。このことからヒ素を特異的にメチル化する SAM 遺伝子はイネに存在しないことが示唆された。以上の結果を総合すると、玄米に含まれる DMA は、根圏土壤微生物のヒ素代謝産物であることがわかった。

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)

[学会発表](計 8 件)

Kuramata M, Kataoka R, Abe T, Yamazaki K, Sakakibara F, Asano M, Baba K, Takagi K, Hiradate S, Kamo T, Ishikawa S. Arsenic Dynamics in Rhizosphere and Relevance to Arsenic Speciation in Rice Grains - Arsenic Transformation by Rhizobacteria Separated from Rice Plant- (2013) XVII. INTERNATIONAL PLANT NUTRITION COLLOQUIUM.

Kuramata M, Kataoka R, Abe T, Sakakibara F, Takagi K, Ishikawa S. Rhizobacteria related to arsenic transformation in paddy soil - relevance to methylated arsenic in rice grains - (2012) ASA, CSSA, and SSSA International Annual Meetings, 390-9

Kuramata M, Kataoka R, Abe T, Sakakibara F, Asano M, Baba K, Takagi K, Ishikawa S. Separation and identification of rhizobacteria producing methylated arsenicals in paddy soil - Relevance to arsenic speciation in rice grains - (2012) "Risk Alleviation Technologies for Arsenic and Cadmium Contamination of Foods in Monsoon Asia" MARCO Satellite International Symposium

2012 Proceedings, 13-14

倉俣正人、片岡良太、山崎健一、榊原風太、安部匡、馬場浩司、高木和広、加茂綱嗣、平舘俊太郎、石川覚、イネ根圏土壤細菌の生産する新規有機ヒ素化合物の同定と根圏におけるヒ素の化学形態変化について、(2013)、日本土壤肥料学会 講演要旨集、59、77

倉俣正人、片岡良太、山崎健一、榊原風太、馬場浩司、石坂眞澄、安部匡、高木和広、加茂綱嗣、平舘俊太郎、石川覚、イネ根圏微生物が生産する新規ヒ素化合物の同定、(2013)、第 19 回ヒ素シンポジウム講演要旨集、56

倉俣正人、片岡良太、榊原風太、安部匡、高木和広、石川覚、コメに蓄積するヒ素の化学形態と土壤中の動態に関する微生物の影響について、(2013)、日本農芸化学 2013 年度大会、4C11a03

倉俣正人、片岡良太、山崎健一、榊原風太、馬場浩司、石坂眞澄、安部匡、高木和広、加茂綱嗣、平舘俊太郎、石川覚、イネ根圏土壤から分離した微生物のヒ素代謝、(2012)、第 18 回ヒ素シンポジウム講演要旨集、16-47

倉俣正人、片岡良太、安部匡、井倉将人、松本真悟、高木和広、荒尾知人、石川覚 イネの化学形態別ヒ素吸収における土壤微生物の関与、(2011)、日本土壤肥料学会 講演要旨集、57、87

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 覚 (ISHIKAWA, Satoru)

(独) 農業環境技術研究所・土壤環境研究領域・主任研究員

研究者番号:

(2) 研究分担者

高木和広 (TAKAGI, Kazuhiro)

(独) 農業環境技術研究所・土壤環境研究領域・上席研究員

研究者番号: 70354074

藤巻 秀 (FUJIMAKI, Shu)

(独) 日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究グループリーダー

研究者番号: 20354962

鈴井伸郎 (Suzui, Nobuo)

(独) 日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究副主幹

研究者番号: 20391287