

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790128

研究課題名(和文) *Pseudomonas* K-62 の新規水銀耐性遺伝子の機能解析および浄化への利用研究課題名(英文) Mercurial-resistance determinants in *Pseudomonas* strain K-62 plasmid pMR68

研究代表者

曽根 有香 (SONE, YUKA)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：60550035

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)：酢酸フェニル水銀汚染土壌から単離された水銀耐性菌 *Pseudomonas* K-62 株の中でも極めて強い水銀耐性を有する 68 kb plasmid (pMR68) に着目し、pMR68 の遺伝子及び機能解析を行った。遺伝子解析の結果、pMR68 は全長 71,020 bp で複数の水銀耐性 operon を有することを明らかにした。pMR68 上の水銀耐性 operon を pUC118 ベクターへ組換え大腸菌に形質転換した。組換え体の水銀化合物耐性および代謝活性について検討した結果、pMR68 の水銀耐性 operon は無機水銀および酢酸フェニル水銀に対し耐性及び代謝活性を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We report the complete nucleotide sequence of plasmid pMR68, isolated from *Pseudomonas* strain K-62, two plasmids contribute to broad-spectrum mercury resistance and that the mer operon from one of them (pMR26) has been previously characterized. The plasmid (pMR68) was 71,020 bp in length. Three mer gene clusters were identified. The first comprised merR-orf4-orf5-merT1-merP1-merF-merA-merB1, which confers bacterial resistance to mercuric ions and organomercury. The second and third clusters comprised merT2-merP2, which encodes a mercury transport system, and merB2, which encodes an organomercurial lyase, respectively. *Escherichia coli* cells carrying pMKY12 (containing merR-orf4-orf5-merT1-merP1-merF-merA-merB1 cloned from pMR68) were more resistant to, and volatilized more, mercury from mercuric ions and phenylmercury than the control cells. The novel mer gene identified in pMR68 may help us to design new strategies aimed at the bioremediation of mercurials.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード： *Pseudomonas* K-62 水銀耐性遺伝子 pMR68

1. 研究開始当初の背景

日本における水銀の汚染影響としては、公害である水俣病が挙げられる。1952-1971年、チッソ水俣工場から水俣湾に排出されたメチル水銀が大規模な海洋汚染を起こし、メチル水銀は脂溶性であるため生物ピラミッド上層の魚介類に多量に蓄積され、人がその魚介類を摂取することにより中枢神経障害を引き起こした。水俣湾はその後、高濃度水銀汚染されたヘドロを埋め立て処理という、多額の費用を要する技法により一度は収束が見られた。しかし、埋め立てた場所からの水銀流出が懸念され、完全な環境修繕が行われたとは言い難い。世界各地においても水銀化合物による海洋や土壌の環境汚染が深刻な問題となっていた。ブラジルのアマゾン川流域における金の採掘に使用される金属水銀汚染では、これまでに約 2000 トン以上の気化した水銀が環境中に放出されてきた。このような汚染の拡大は持続しており、水銀の環境中からの浄化は早急な課題であった。

自然界には、高濃度の水銀汚染地域にも関わらず生息した微生物が存在し、微生物は水銀に対する耐性能を有することが報告され、現在までに様々な水銀耐性能をもつ微生物が発見、単離されていた。これら水銀耐性菌は水銀耐性遺伝子群である *mer operon* を保持することで耐性を獲得していることが明らかとなっていた。

そこで我々は水銀耐性菌である *Pseudomonas* K-62 (*P.* K-62) に注目した。*P.* K-62 は外村らにより酢酸フェニル水銀汚染土壌から単離された水銀耐性菌であり、無機水銀のみならず有機水銀に対しても、他の耐性菌に比べ極めて強い耐性を保持する。特に酢酸フェニル水銀においては一般の細菌に比べ数千倍の耐性を示す。本菌株は 6 本の plasmid (82、68、56、31、26、および 8.5 kb) を保持し、中でも 26 kb plasmid (pMR26) および 68 kb plasmid (pMR68) が本菌株における、水銀耐性機能に関与していることが既に明らかにされていた。その耐性能は既知の *mer operon* に比べ、極めて強い耐性を保持している。pMR26 は過去に当グループが解析を行い、plasmid 上に水銀耐性遺伝子群の存在を確認した【Kiyono M *et al.* *Arch Microbiol.* 1995; 163:242-7】。

pMR26 における水銀耐性メカニズムは以下の通りである。*mer operon* の構成として *operon* の発現を調整する遺伝子 *merR*、細胞外で水銀と結合する遺伝子 *merP*、水銀の細胞内取り込みに関与する遺伝子 *merT*、無機水銀を金属水銀へと還元するレダクターゼをコードする遺伝子 *merA*、有機水銀を無機水銀に分解するリアーゼをコードする遺伝子 *merB*、フェニル水銀耐性遺伝子 *merG* およびオペロン終末プロモーター遺伝子 *merD* から成り立っている。しかし、pMR26 よりも強い水銀耐性能をもつと示されてきた pMR68 については、技術的な問題により未

解析のままであった。

一方、当時注目されていたのは生物の生理機能を利用した浄化手法であるバイオレメディエーション技術であった。既存の手法に比べ省エネルギー、経済的、効率的、かつ自然への影響が少なく、環境汚染物質を処理することができるという利点を持つ。バイオレメディエーションは日本をはじめ世界各国の環境問題である、低濃度水銀化合物汚染に対しても利用が可能であると考えられた。バイオレメディエーションを行うためには、水銀に対する耐性能をもつ微生物の機能解析が重要な課題であった。

2. 研究の目的

グラム陰性細菌である *Pseudomonas* K-62 株は酢酸フェニル水銀に汚染された土壌から、外村らにより単離・発見された水銀耐性菌である。*P.* K-62 の中でも水銀耐性に関与する plasmid は、水銀が存在しない条件下ではその plasmid pMR68 が菌体から消失するという性質を持つ。土壌から単離された当初の非常に強い水銀耐性を持続的に保持した *P.* K-62 を保有しているグループは極僅かであった。この背景から塩基配列すら不明であった pMR68 plasmid の遺伝子解析および機能解析を世界で初めて行うことが本研究の特色であり独創的な点であると考えられた。過去の研究成果から既知の pMR26 よりも水銀に対して強い耐性を持つとされる pMR68 には、その耐性に寄与する独自の新規遺伝子を持つことが予測された。あるいは、水銀耐性遺伝子を多数保有することで相乗的に水銀耐性を増強している可能性も考えられた。

本研究では、酢酸フェニル水銀汚染土壌から単離された水銀耐性菌 *Pseudomonas* K-62 の中でも極めて強い水銀耐性能を有する 68 kb plasmid (pMR68) に着目し、水銀のバイオレメディエーションへの応用を視野に入れ、pMR68 上の新規の水銀耐性遺伝子の機能解析を行い、有用遺伝子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

平成 24 年度はまず巨大 plasmid である pMR68 を回収し、これを鋳型に *mer operon* を遺伝子組換えした大腸菌を作製した。平成 25 年度は、新規の遺伝子組換え大腸菌を用いて、水銀化合物に対する耐性評価、代謝活性について検討した。

(1) pMR68 plasmid の単離と塩基配列解読

P. K-62 を水銀存在下で培養後、Kado の方法をを用いて plasmid の抽出を行い、パルスフィールドゲル電気泳動法により分離後、pMR68 を単離・精製した。得られた pMR68 から、塩基配列群 (コンティグ) を次世代シーケンシング技術により獲得した。得られた pMR68 の塩基配列は PubMed BLAST SEARCH により、既知配列とホモロジー検索を行った。

(2) mer operon の大腸菌へのクローニング

pMR68 上の 3,000 - 10,000 bp の位置にある mer operon (*merR-orf4-orf5-o/p-merT1-merP1-merF-merA-merB*) を、Long PCR 法を用いて増幅し、約 7,000 bp の長鎖遺伝子断片を制限酵素処理した pUC118 ベクターへ導入した。作製したプラスミドを大腸菌 XL1-blue 株に形質転換し、遺伝子組換え大腸菌を作製した。

(3) 水銀化合物耐性評価

上記 (2) で作製した遺伝子組換え大腸菌について、無機水銀 (HgCl_2) と有機水銀の一種である酢酸フェニル水銀 ($\text{CH}_3\text{COOHgC}_6\text{H}_5$) に対する耐性評価を Growth curve 法を用いて行った。コントロールとして pUC118 を、比較対象として pMR26 由来の mer operon (*merR-merT-merP-merA-merG-merB1*) を持つプラスミド pMRA114 をそれぞれ形質転換した大腸菌を用いた。菌数を一定にした各遺伝子組換え大腸菌の再懸濁液に種々の濃度の水銀化合物を滴下し 37 °C で一晩培養した。培養後の菌液の濁度を指標に菌の増殖率を測定することで水銀に対する耐性を評価した。

(4) 水銀代謝活性の検討

上記 (3) と同様に、各遺伝子組換え大腸菌を LB 培地で 37 °C で一晩振とう培養し、菌数が揃うように LB 溶液で再懸濁した。その菌液に各濃度の HgCl_2 あるいは $\text{CH}_3\text{COOHgC}_6\text{H}_5$ 溶液を滴下し、37 °C で一晩培養した。硝酸を用いて灰化処理した溶液を MERCURY ANALYZER (HIRANUMA) を用いて、還元気化原子吸光度法により、溶液中の水銀残量を測定することで菌の代謝活性能力を検討した。

4. 研究成果

P. K-62 から pMR68 plasmid の単離・精製法を確立し、純品約 20 μg を得た。次世代シーケンス解析の結果、pMR68 由来のコンティグが 7 種類得られた。これらのコンティグの配列順序を決定し、遺伝子配列をつなぎ合わせた結果、pMR68 の塩基配列全長は 71,020 bp であった。BLAST SEARCH によるホモロジー検索により、pMR68 上に mer operon、重金属耐性関連遺伝子、transposase など 75 種類の遺伝子がコードされていた。

pMR68 mer operon の配列は *merR-orf4-orf5-o/p-merT1-merP1-merF-merA-merB1, merT2-merP2, merB2* であった (Fig. 1)。pMR68 の mer operon の注目すべき点は、有機水銀を無機水銀に分解するリアーゼをコードする *merB* を 2 種類、無機水銀を金属水銀に還元するレダクダーゼをコードする *merA* を 1 種類、水銀輸送遺伝子 *merT, merP* を 2 種類ずつ保有することであった。また、機能未知である open reading frame (*orf*) が 2 種類存在した。

pMR68 上の mer operon (*merR-orf4-orf5-o/p-merT1-merP1-merF-merA-merB*) をベクターに組換えたプラスミド pMKY12 を作製し、大

腸菌へ形質転換を行った。作製した組換え体の水銀化合物耐性および水銀化合物代謝活性について検討した結果、pMR68 の mer operon は無機水銀および酢酸フェニル水銀代謝活性を有し、無機水銀および酢酸フェニル水銀に対し耐性を示すことが明らかとなった (Fig. 2A-D)。また、既知の pMR26 の mer operon を有するプラスミド pMRA114 を持つ大腸菌に比べ、pMKY12 を持つ大腸菌の方が有意に高い酢酸フェニル水銀代謝活性を示した (Fig. 2D) 【Sone *et al.* *AMB express.* 2013; 3: 41】。

pMR68 の mer operon 上には、既知の水銀耐性遺伝子 (*mer* 遺伝子) と相同性の低い 2 種類の *orf4* および *orf5* 遺伝子が存在した。通常、グラム陰性菌が有する mer operon では *merR-merT* 間に遺伝子が存在することは稀である。この間に位置している *orf4* 及び *orf5* 遺伝子は新規の mer 遺伝子であると考えられ、pMR68 の mer operon が有する非常に高い水銀代謝活性及び耐性に寄与していると推測された。これら水銀のファイトレメディエーションに利用することは、環境中からの水銀化合物の回収に効果的であると考えられた。

これらの結果は、新規の知見であると同時に、水銀のバイオレメディエーション技術への応用の際に、水銀浄化効果を飛躍させる因子や条件になりうると考えられた。

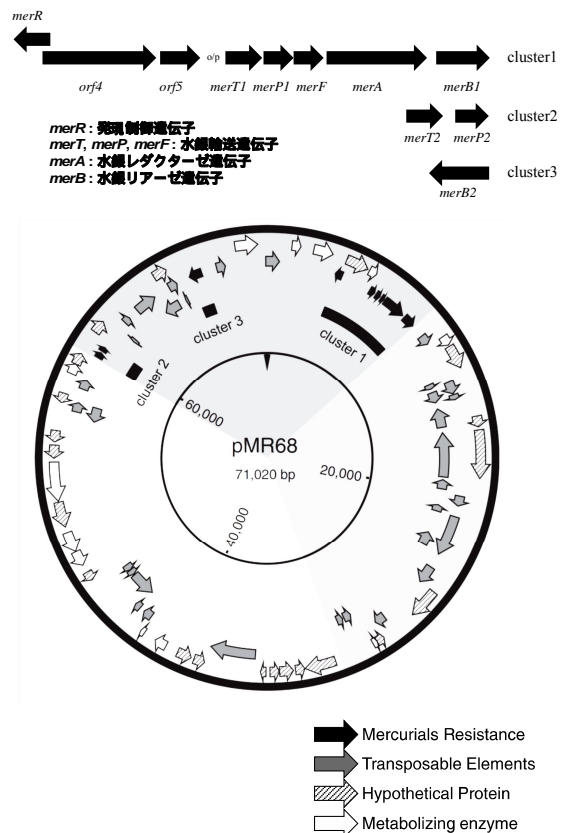


Fig. 1 pMR68 の遺伝子マップ

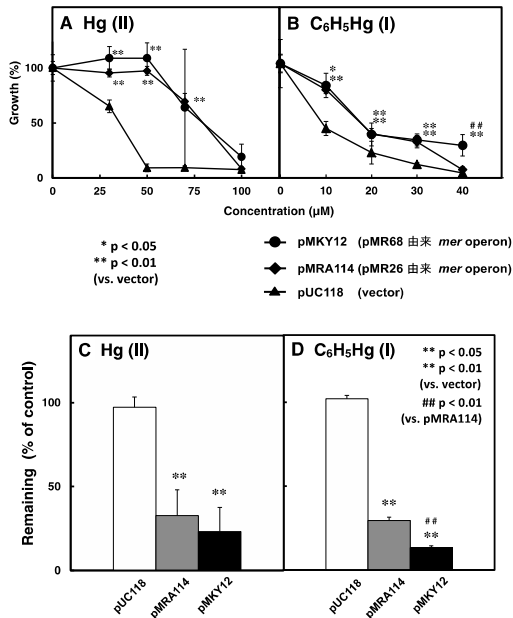


Fig. 2 水銀に対する耐性及び代謝活性評価

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1件)

- (1) Sone Y, Mochizuki Y, Koizawa K, Nakamura R, Pan-Hou H, Itoh T, Kiyono M. Mercurial-resistance determinants in *Pseudomonas* strain K-62 plasmid pMR68. *AMB express*. 査読有 3: 41 (2013) doi:10.1186/2191-0855-3-41

[学会発表](計3件)

- (1) 曽根有香、清野正子 水銀耐性菌のメチル水銀トランスポーターに関する研究 平成 25 年度メチル水銀研究ミーティング(東京) 2013 年 12 月 11 日
- (2) 曽根有香、中村亮介、芳生秀光、清野正子 水銀トランスポーター MerC, MerE, MerF, MerT の機能解析 日本薬学会第 133 年会(横浜) 2013 年 3 月 30 日
- (3) 清野正子、曽根有香、中村亮介、芳生秀光 *Pseudomonas* K-62 由来 plasmid pMR68 の水銀耐性遺伝子の機能解析 フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー(名古屋) 2012 年 10 月 25 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

曽根 有香 (SONE YUKA)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号: 60550035

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし