

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450086

研究課題名(和文)新規ヒ酸還元細菌Geobacter OR-1のヒ素代謝遺伝子発現ダイナミクス

研究課題名(英文)Expression dynamics of arsenic-metabolizing genes in a dissimilatory arsenate-reducing bacterium Geobacter sp. OR-1

研究代表者

天知 誠吾 (AMACHI, SEIGO)

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号：80323393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒ素汚染の原因菌の1つGeobacter sp. OR-1におけるヒ素代謝遺伝子群の発現解析およびヒ素存在下で発現するタンパク質の網羅的解析をおこなった。ヒ酸呼吸条件において、異化的ヒ酸還元酵素遺伝子arrAと解毒的ヒ酸還元酵素遺伝子arsCの発現量は、フマル酸呼吸条件と比べそれぞれ52倍と260倍に上昇した。一方プロテオーム解析では、ヒ酸呼吸条件でArrABやArsAの他、抗酸化酵素、ストレス応答、分子シャペロンなどの発現上昇が確認された。OR-1株は高濃度のヒ素に曝露されると、ヒ素代謝経路のみならず種々の代謝系を協調的に発現上昇させ、ヒ素耐性を獲得することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Arsenic (As) is released from anaerobic sediments into groundwater as arsenite, and dissimilatory arsenate-reducing bacteria (DARB) may play important roles in As release. Geobacter sp. OR-1, one of DARB, has a variety of As-metabolizing genes such as dissimilatory arsenate reductase genes (arrAB) and genes for As resistance (arsACDR) in its genome. The aim of this study was to understand expression dynamics of these genes or proteins in strain OR-1. Transcriptional analysis revealed that most of As-metabolizing genes were induced by As, and that the expression of arrA and arsC was 52 and 260 times higher in the presence of As, respectively. Comprehensive proteomic analysis showed that proteins involved in oxidative stress response, protein folding, molecular chaperones, and sulfur metabolism were also expressed cooperatively in the presence of As. Our results shed light on how microbes cope with this toxic metalloid, and play an important role in the transfer of As in nature.

研究分野：環境微生物学

キーワード：ヒ素 汚染 溶出 Geobacter ヒ酸還元 arrA arsC

1. 研究開始当初の背景

環境中でヒ素は、主に5価のヒ酸(H_3AsO_4)と3価の亜ヒ酸(H_3AsO_3)として存在する。酸化環境ではヒ酸が優占するが、鉄酸化物へ吸着しやすく、生物への可給性は低い。これに対し、還元条件ではヒ酸がある種の嫌気性細菌に還元されて亜ヒ酸が優占種となり、液相に溶出する。現在、バングラディッシュやインドの西ベンガル地方、カンボジアなどでは地下水のヒ素汚染が深刻で、数百万もの人々が慢性ヒ素中毒による健康被害(皮膚がん、肺がん、黒皮症)に晒されている。

これまで種々の既往研究より、鉄還元細菌 *Geobacter* のヒ素溶出への関与が示唆されている。例えば、西ベンガルのヒ素汚染堆積物中では *Geobacter* に近縁な 16S rRNA 遺伝子クローンが優占し (Islam *et al.*, 2004) カンボジアや西ベンガルのヒ素汚染堆積物中では、*Geobacter* に近縁な異化的ヒ酸還元酵素遺伝子 (*arr*) クローンが多数検出されている (Héry *et al.*, 2010)。*Geobacter* は最も普遍的な鉄還元細菌として知られるが、上記の結果は *Geobacter* が異化的ヒ酸還元細菌としても機能し、ヒ素溶出を引き起こすことを強く示唆している。しかしながら、これまでにヒ酸還元能を有する *Geobacter* が分離培養された例はなかった。

最近になって我々は、ヒ酸還元能を持つ新規な *Geobacter* sp. OR-1 株の分離に成功した (Ohtsuka *et al.*, 2013)。*OR-1* 株はアジアのヒ素汚染地域で検出されたクローンとも系統的に近縁で、鉄還元能も有していた。また、ヒ酸を吸着させた鉄酸化物やヒ素含有土壌からヒ素を効率的に溶出できた。さらに、水田土壌中の *arr* を解析したところ、*Geobacter* と近縁なクローンが優占しており、このうち約半分は *OR-1* 株と極めて近縁であった。以上の結果は、ヒ酸還元能を持つ未培養の *Geobacter* が広く環境中に存在すること、また東アジアをはじめとする世界各地のヒ素汚染地域で *Geobacter* がヒ素溶出の原因菌である可能性を強く示唆している。

我々は *OR-1* 株を「ヒ素溶出能を有するモデル *Geobacter* 属細菌」と位置づけ、そのドラフトゲノム解析を行った。その結果、予測される総塩基長は 5.5 Mb、CDS は 4,309 個見出された。また、異化的ヒ酸還元酵素遺伝子群 (*arr* genes) およびヒ素耐性遺伝子群 (*ars* genes) を中心としたヒ素代謝遺伝子群 (arsenic islands) が、ゲノム上に独立して2つ存在した。さらに、電子の授受に関与する *c* 型シトクロームが 84 個存在し、全ゲノムの 2% を占めた。

2. 研究の目的

以上のように、*Geobacter* sp. *OR-1* 株は、新規な異化的ヒ酸還元細菌で、同様の細菌が東アジアをはじめとする世界各地のヒ素汚染地域でヒ素溶出の原因となっている可能性がある。また *OR-1* 株のゲノム上には、2つ

の独立した arsenic island、および 80 個以上の *c* 型シトクロームが存在する。本研究は、*Geobacter* 属細菌によるヒ素溶出の制御因子を見出すことを目的に、異化的ヒ酸還元酵素遺伝子 (*arr*) の発現に及ぼす各種環境因子の影響、ヒ素耐性酵素遺伝子 (*ars*) の発現解析、ヒ酸還元時に発現するシトクロームの同定、の3点について検討を行うことを目的とした。また *Geobacter* sp. *OR-1* 株以外に、我々が最近見出した新規ヒ酸還元細菌 *Anaeromyxobacter* sp. *PSR-1* 株も用いて同様の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒ素代謝遺伝子の発現解析

ヒ酸またはフマル酸を電子受容体として嫌氣的に培養した菌体から総 RNA を抽出し、SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR を用いて逆転写 PCR を行った。付属のランダムヘキサマーを用いて逆転写反応を行った後に標的遺伝子 (*arrA*, *arrB*, *arsC*, *acr3*) のプライマーを用いて PCR 増幅を確認した。

(2) *arr* オペロン構造のマッピング

Geobacter sp. *OR-1* 株の *arr* 遺伝子群は *arrA*, *arrB*, *arrD*, *arrE* の順にオペロン様構造をとる。これら遺伝子群がどのような単位で転写されるのか決定した。*arrA* 内部、および *arrA* 上流に位置する *arsR* 内部に設計したプライマーを用いて逆転写反応を行った。逆転写反応後、各 *arr* 遺伝子間を標的とした PCR を行い、転写の有無を確認した。

(3) 異化的ヒ酸還元酵素 (*Arr*) 活性の測定

ヒ酸またはフマル酸を電子受容体として培養した *Geobacter* sp. *OR-1* 株の細胞を破壊後、無細胞抽出液を得た。メチルピオロゲンの酸化活性を指標として嫌氣的に *Arr* 活性を測定した。また、洗浄菌体を用いても同様の検討を行った。

(4) ヒ素代謝遺伝子の転写量に及ぼすヒ素濃度の影響

arrA および *arsC* のヒ素存在下、非存在下における転写量を Real-time PCR により定量した。内部標準としては *recA* を用いた。(1) と同様に培養した菌体から RNA 抽出、逆転写 PCR を経て、Power SYBR Green PCR Master Mix および ABI PRISM 7000 を用いてインターカレーター法にて *Ct* 値を比較した。さらに、フマル酸で培養中に 1 nM~100 μM の亜ヒ酸を添加し、これが *arrA* の転写量に与える影響についても検討した。

(5) ヒ素存在下で特異的に発現するタンパクの網羅的解析

(1) と同様に培養した菌体から ReadyPrep Protein Extraction Kit によりタンパク抽出液を調製し、SDS-PAGE に供した。CBB 染色後、

1 mm ずつのスライスに切り出し、アルキル化・乾燥後、トリプシン処理によりゲル内消化を行った。その後アセトニトリルにてペプチドを抽出し、これを nanoLC-MS/MS 解析に供した。解析には LTQ ion-trap MS、multi-dimensional HPLS、および nano-spray electrospray ionization device を用いた。得られたペプチド断片の MS/MS 結果を Mascot program ver. 2.5 を用いて NCBI 上の OR-1 株のドラフトゲノムデータと照合し、タンパク質を同定した。半定量解析には emPAI 値を用い、サンプル内における発現比 Protein content (PC) も求めた。生育条件による発現量の差が5倍以上ある場合に、発現上昇あるいは低下があると定義した。

4. 研究成果

(1) ヒ素代謝遺伝子の発現解析

ヒ素代謝遺伝子がヒ素により転写制御を受けるかを確認するため、ヒ酸またはフマル酸を電子受容体として生育した菌体より抽出した RNA を用いて逆転写 PCR による解析を行った。標的とした遺伝子は *arrA*、*arrB*、*arsC*、および *acr3* である。その結果、ヒ酸生育条件の方がバンド強度が強い傾向が認められたものの、いずれの生育条件においても全ての遺伝子の転写が確認された。

(2) *arr* オペロン構造のマッピング

OR-1 株のドラフトゲノム中でオペロン様構造をとる *arr* 遺伝子群がどのような転写単位で転写されるかを検討した。逆転写を行った cDNA を鋳型とした PCR を行った結果、*arrA-arrB*、*arrB-arrD*、*arrD-arrE* 間では遺伝子の増幅が確認されたのに対し、*arrA-arsR* 間では増幅が確認されなかった。このことから、*arrA*、*arrB*、*arrD*、*arrE* は同時に転写されるが、*arrA* 上流の *arsR* とは同時に転写されないことが分かった。

(3) 異化的ヒ酸還元酵素 (Arr) 活性の測定

ヒ酸またはフマル酸を電子受容体として生育した菌体の Arr 活性を、メチルピオロゲンを電子供与体として洗浄菌体または無細胞抽出液を用いて嫌氣的に測定した。その結果、ヒ酸生育時の Arr 活性はフマル酸生育時に比べて洗浄菌体で 4.0 倍、無細胞抽出液では 8.5 倍 (比活性 7.74 U mg^{-1}) に上昇した。以上のことから、Arr 活性はヒ素の存在下で強く誘導されることがわかった。

(4) ヒ素代謝遺伝子の転写量に及ぼすヒ素濃度の影響

ヒ酸またはフマル酸を電子受容体として生育した菌体から RNA を抽出し、逆転写 PCR の後、*arrA* および *arsC* の発現量を *recA* を内部標準として求めた。その結果、ヒ酸生育時の *arrA* の発現量はフマル酸生育時の 52 倍、*arsC* ではその差は 260 倍に達した。従って、ヒ素の存在下では *arrA* のみならずヒ素の

解毒に関与する *arsC* の転写も強く誘導されることがわかった。さらに、フマル酸を電子受容体として生育する培養液に $1 \text{ nM} \sim 100 \mu\text{M}$ の亜ヒ酸を添加し、これが *arrA* と *arsC* の転写量に与える影響を検討した。その結果、*arrA* は $1 \mu\text{M}$ 亜ヒ酸存在下で発現が上昇しはじめ、 $100 \mu\text{M}$ 亜ヒ酸存在下では亜ヒ酸非存在下の 12 倍の発現量が認められた。これに対し、*arsC* の発現は $100 \mu\text{M}$ 亜ヒ酸存在下でも有意に上昇せず、両遺伝子の発現調節系の違いが明らかになった。

(5) ヒ素存在下で特異的に発現するタンパクの網羅的解析

ヒ酸とフマル酸生育条件下でのプロテオーム解析において、それぞれ 985 個と 831 個のタンパク質が同定された。ヒ酸生育条件下では、フマル酸生育時と比較して、異化的ヒ酸還元酵素 ArrAB が高い発現量を示し、Arr の活性中心 molybdopterin の生合成系 (MoeA, MoaA) や亜ヒ酸排出に関わる ArsA の発現上昇も見られた。また、抗酸化酵素 (peroxiredoxin, rubrerythrin, rubredoxin)、ストレス応答 (UspA, Hsp90)、folding 関連タンパク質 (SurA, DsbC)、分子シャペロン (ClpB, DnaJK, GrpE)、trigger factor などの発現上昇も確認された。ヒ酸生育時には、ヒ酸のアナログであるリン酸の transporter 関連タンパク質 (PhoU) の発現上昇が見られ、硫黄代謝経路の活性化、特に thiol 基の再形成に関わる酵素 (CysNH) も発現上昇していた。これは、亜ヒ酸と thiol 基の親和性が高いことに関連すると考えられた。一方、フマル酸生育時に特異的に発現する *c* 型シトクロームは検出されたものの、当初期待していたヒ酸生育時に発現する *c* 型シトクロームは同定されなかった。以上の結果から、OR-1 株は高濃度のヒ素に曝露されることで、異化的ヒ酸還元酵素を中心として、抗酸化酵素、分子シャペロンなどを協調的に発現上昇させ、ヒ素耐性を獲得することが示唆された。

(6) *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株におけるヒ素代謝遺伝子群の発現解析

我々が最近分離した異化的ヒ酸還元細菌 *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株は、ゲノム中に *ars* 遺伝子群は保持するものの、*arr* 遺伝子群は保持していない。一方、*ars* 遺伝子群の近傍に Arr と同じく DMSO reductase family に属する tetrathionate reductase とアノテーションされた遺伝子 (*ttrA*) が存在する。遺伝子発現解析の結果、*ars* 遺伝子群はヒ酸存在下で発現上昇が確認された。また *ttrA* もヒ酸生育条件下で発現が約 5 倍上昇した。プロテオーム解析においても *TtrA* の発現はヒ素存在下で 26 倍上昇した。その他 *TtrB*、ヒ素解毒 (ArsABC)、ストレス応答 (UspA, DnaAK, GroEL)、ピリ合成 (PilZ)、鞭毛合成 (FlgL, FliH)、ペプチドグリカン合成、莢膜合成、種々の輸送系、エネルギー生産 (acetate kinase) などに関わるタンパク質の発現上昇が確認

された。ヒ酸呼吸条件下での発現上昇に加え、異化的ヒ酸還元酵素遺伝子は一般的に *ars* 遺伝子群に隣接して存在すること、古細菌 *Pyrobaculum* においても *ttrA* に比較的近縁な遺伝子がヒ酸還元に必要なことから、PSR-1 株では *ttrA* が異化的ヒ酸還元酵素として機能する可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文](計7件)

小林秀誉、牧野知之、加藤英孝、石川覚、馬建峰、橋本洋平、山口紀子、天知誠吾、川崎晃、馬場浩司、荒尾知人、水稲におけるヒ素とカドミウムをめぐる諸問題、日本土壤肥料学会誌, 88, 73-78 (2017). 査読なし (<http://ci.nii.ac.jp/naid/40021106226/>)

D. T. Dong, S. Yamamura and S. Amachi, Impact of arsenite on bacterial community structure and diversity in soil, *Microbes Environ.* 31, 41-48 (2016). 査読あり (doi: 10.1264/jisme2.ME15093)

M. Tonomura, A. Ehara, H. Suzuki and S. Amachi, Draft genome sequence of *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1, an arsenate-respiring bacterium isolated from arsenic-contaminated soil, *Genome Announcements* 3, e00472-15 (2015). 査読あり (doi: 10.1128/genomeA.00472-15)

A. Ehara, H. Suzuki and S. Amachi, Draft genome sequence of *Geobacter* sp. OR-1, an arsenate-respiring bacterium isolated from paddy soil, *Genome Announcements* 3, e01478-14 (2015). 査読あり (doi: 10.1128/genomeA.01478-14)

D. T. Dong, N. Yamaguchi, T. Makino and S. Amachi, Effect of soil microorganisms on arsenite oxidation in paddy soils under oxic conditions, *Soil Sci. Plant Nutr.* 60, 377-383 (2014). 査読あり (doi: 10.1080/00380768.2014.897924)

D. Dong, T. Ohtsuka, D. T. Dong and S. Amachi, Arsenite oxidation by a chemolithoautotrophic *Sinorhizobium* sp. KGO-5 isolated from arsenic-contaminated soil, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 1963-1970 (2014). 査読あり (doi: 10.1080/09168451.2014.940276)

S. Yamamura and S. Amachi, Microbiology of inorganic arsenic: From metabolism to bioremediation, *J. Biosci. Bioeng.*, 118, 1-9

(2014). 査読あり (doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.011)

[学会発表](計11件)

土屋達哉、笠原康裕、濱村奈津子、天知誠吾、異化的ヒ酸還元細菌によるヒ素ストレス応答機構の発現解析, 日本微生物生態学会第31回大会(2016.10.24.横須賀市文化会館)。

殿村美森、山田樹奈、天知誠吾、ヒ酸呼吸細菌 *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株のヒ酸還元酵素について, 日本微生物生態学会第31回大会(2016.10.24.横須賀市文化会館)。

天知誠吾、土壌中のヒ素存在形態の変化と微生物の役割, 日本土壤肥料学会2016年度大会(2016.9.22.佐賀大学)。

土屋達哉、笠原康裕、天知誠吾、異化的ヒ酸還元細菌のヒ素ストレス応答の網羅的解析, 日本農芸化学会2016年度大会(2016.3.30.札幌コンベンションセンター)。

倉澤響、天知誠吾、山村茂樹、異化的ヒ酸還元菌を用いた土壌中ヒ素の可溶化条件の検討, 第30回日本微生物生態学会大会(2015.10.23.土浦亀城プラザ)。

殿村美森、江原彩香、鈴木治夫、天知誠吾、異化的ヒ酸還元細菌 *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株のドラフトゲノム解析, 環境微生物系学会合同大会2014(2014.10.23.アクトシティ浜松)。

須藤崇行、山村茂樹、天知誠吾、ヒ酸還元細菌とメディエーターを用いたヒ素汚染土壌のバイオレメディエーション手法の検討, 環境微生物系学会合同大会2014(2014.10.22.アクトシティ浜松)。

江原彩香、Timothy Sanchez, Srinivas Iyer, Chris Yeager、濱村奈津子、鈴木治夫、天知誠吾、ヒ酸呼吸細菌 *Geobacter* sp. OR-1 のプロテオーム解析, 環境微生物系学会合同大会2014(2014.10.22.アクトシティ浜松)。

天知誠吾、山村茂樹、ヒ酸呼吸細菌を利用した土壌ヒ素汚染浄化, 環境微生物系学会合同大会2014(2014.10.22.アクトシティ浜松)。

山村茂樹、天知誠吾、池道彦、異化的ヒ酸還元細菌と酸化還元メディエーターを併用した汚染土壌浄化技術の開発, 第66回日本生物工学会大会(2014.9.10.札幌コンベンションセンター)。

天知誠吾、微生物によるヒ素の可溶化-汚染土壌のバイオレメディエーションを目指して-, 第 66 回日本生物工学会大会 (2014.9.10.札幌コンベンションセンター).

〔図書〕(計 2 件)

天知誠吾、山村茂樹、微生物の細胞外電子伝達と汚染浄化、難培養微生物研究の最新技術 III, 大熊盛也、野田悟子 編, pp 185-193, シーエムシー出版 (2015).

山村茂樹、天知誠吾、ヒ素、地球を救うメタルバイオテクノロジー, 山下光雄、清 和成 編, pp 118-125, 成山堂書店 (2014).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

天知 誠吾 (AMACHI, Seigo)
千葉大学・大学院園芸学研究科・教授
研究者番号 : 80323393