

光合成細菌のカロテノイド代謝酵素遺伝子をレポーターとした有害金属応答型微生物センサーの開発

前田 勇*・吉田 一之

現在、世界規模で飲料水の不足が進行しており、今後、水の資源としての重要性は増していくであろう。このような状況下、上水道が整備されていない国や地域では、多くの人々が有害金属に汚染された飲料水の摂取による慢性中毒に苦しんでいる^{1,2)}。このため、地下水の有害金属汚染を簡易検出する技術の進展が望まれており、生物工学的手法によりこのような技術を進展させる取り組みとして、有害金属に特異的に応答する転写スイッチの下流にレポーター遺伝子を配置した組換え微生物をセンサー素子として利用するための研究が数多く報告されている³⁾。このような微生物センサーでは、細胞を懸濁させた時に、被検試料中に有害金属が存在すると細胞内にその情報が伝達され転写スイッチが作動する。これによりレポーター遺伝子が発現し、この際にレポーター由来の信号が発生する。最終的にその信号を検出あるいは強度測定することにより、被検試料中の対象金属の検出あるいは定量が可能となる⁴⁾。

現在、微生物センサーのレポーターとしては発光タンパク質や蛍光タンパク質の遺伝子が主に利用されている^{5,6)}。しかし、これらのレポーターを利用する場合は発光基質や理化学機器が必要とされ、一次スクリーニング技術としての簡便性を損ないかねない。そこで筆者らは、新たなレポーター遺伝子として光合成細菌のカロテノイド代謝酵素遺伝子の利用を検討した(図1)。このレ

ポーターの長所として、センサーの信号検出に発色基質や理化学機器を必要としないという点が挙げられる。すなわち、カロテノイド代謝に伴う微生物の色変化により、比色での汚染の有無の判定が可能となる。

スフェロイデン酸化酵素をコードする *crtA* の利用

スフェロイデン経路 *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodovulum sulfidophilum* といった光合成細菌はカロテノイド代謝経路としてスフェロイデン経路を有する⁷⁾。スフェロイデン経路では、フィトエン脱水素酵素 CrtI によりフィトエンから二重結合が3つ増えたニューロスポレンが生成する。この3段階の脱水素反応により共役二重結合数はフィトエンの3からニューロスポレンの9に増加する。ニューロスポレンからデメチルスフェロイデンあるいはスフェロイデンまでは黄色カロテノイドであるが、スフェロイデン酸化酵素の触媒下で生成する2-ケトカロテノイド、デメチルスフェロイデノンあるいはスフェロイデノンは赤色を呈する(図2)。

***crtA* をレポーター遺伝子とするセンサー株** スフェロイデン酸化酵素をコードする *crtA* をレポーター遺伝子とし、スフェロイデン経路において最も大きなカロテノイドの色相変化となる黄から赤への変化を利用した CrtA バイオセンサー株 (CrtABS) を開発した⁸⁾。CrtABS 株

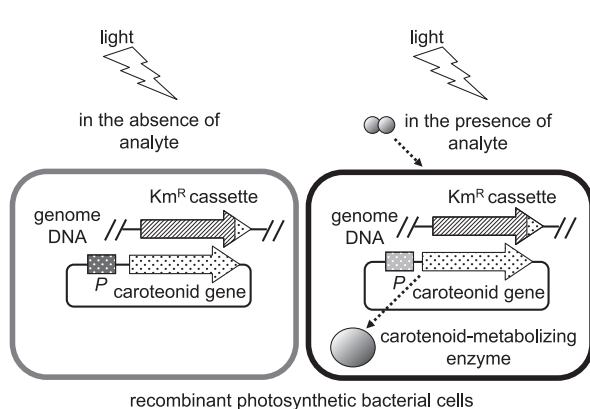


図1. 光合成細菌のカロテノイド代謝酵素遺伝子をレポーターとした生細胞型バイオセンサー株の概念図。Km^R、カナマイシン耐性遺伝子；P、転写スイッチ。

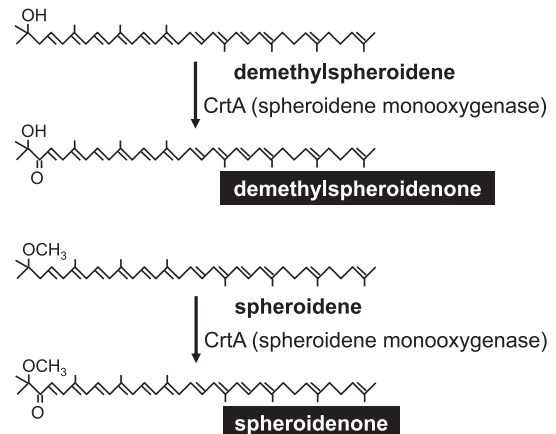


図2. 光合成細菌 *Rvu. sulfidophilum* を宿主としたセンサーのレポーター、CrtAにより触媒されるカロテノイド代謝反応

*著者紹介 宇都宮大学農学部生物生産科学科(准教授) E-mail: i-maeda@cc.utsunomiya-u.ac.jp

の育種手順としては、まず、*Rvu. sulfidophilum*の野生株の *crtA* 遺伝子を破壊した株 (CDM2) を育種した⁹⁾。野生株は主としてスフェロイデノン蓄積し、その培養液は赤色を呈するが、CDM2は *crtA* 欠損のためスフェロイデンとデメチルスフェロイデンを蓄積し、その培養液は黄色を呈する。次に、*Escherichia coli* K12由来のヒ素応答性の転写スイッチ (*P_{ars}-arsR*)¹⁰⁾ に *crtA* 遺伝子を連結させたヒ素センサープラスミドを CDM2 に導入することにより CrtABS 株が育種された¹¹⁾。CrtABS はヒ素の非存在下では *crtA* が発現しないため、スフェロイデンとデメチルスフェロイデンが蓄積し培養液は黄色のままであるが、ヒ素が存在する場合にはヒ素センサープラスミド上の転写スイッチが *crtA* を発現させるように働くため、スフェロイデノンが合成され培養液は赤色を呈するようになる。

CrtABSの金属選択性と検出下限濃度 三酸化二ヒ素 (As₂O₃) を標準物質として CrtABS のヒ素検出感度を調べたところ、ヒ素濃度として 3 μg/l の濃度で生じる色変化を視覚的に認識することができた。しかしながら、(ア) CrtA はスフェロイデンあるいはデメチルスフェロイデンの 2 位の炭素に酸素原子を導入する酵素であるため (図2)、ヒ素検出の際に溶存酸素濃度により影響を受けること、(イ) 黄から赤への変化は暖色の中での変化であるため、より視覚的に判別しやすい寒色から暖色への変化が望ましいこと、(ウ) *Rvu. sulfidophilum* は好塩性細菌であり表層水や地下水などの淡水試料の計測においては塩濃度を調節する必要がない淡水性の細菌の利用が望まれること、といった改良点が考えられた。したがって、次に溶存酸素濃度の影響を受けない安定したレポーター遺伝子と淡水性光合成細菌を用い、さらに寒色から暖色への変化を生じさせるバイオセンサー株を育種することとした。

フィトエン不飽和化酵素をコードする *crtI* の利用

スピリロキサンチン経路 *Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum* といった光合成細菌はカロテノイド代謝経路としてスピリロキサンチン経路を有する⁷⁾。スピリロキサンチン経路のフィトエン脱水素酵素 CrtI は、フィトエンから二重結合が 4 つ増えたりコペンまでの脱水素反応を触媒する (図3)。四段階の反応でフィトフルエン、 ζ -カロテン、ニューロスポレンが順に生成し、二重結合の数が増えるごとに黄色の色味が増しリコペンで赤色となる。ロドピンはリコペンの 1 位の炭素が CrtC により水酸化されることにより生成する。この呈色は、脱水素反応によりカロテノイド分子の共役

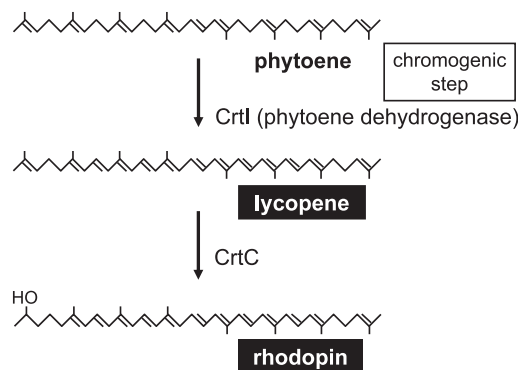


図3. 光合成細菌 *Rps. palustris* を宿主としたセンサーのレポーター、CrtI により触媒されるカロテノイド代謝反応

二重結合数がフィトエンの 3 からリコペンあるいはロドピンの 11 に増加することによる。フィトエンは無色であるため、淡水性光合成細菌 *Rps. palustris* No. 7 の *crtI* 遺伝子を破壊して得られた No. 711¹²⁾ の菌体は、バクテリオクロフィルの青緑色となった (図4)。したがって、スピリロキサンチン経路では CrtI が最も顕著な色相変化を生じさせることが期待された。

***crtI* をレポーター遺伝子とするセンサー株** 先に述べた改良点 (ア) (イ) (ウ) を達成することを目的として、No. 711 を宿主とし、No. 7 よりクローニングした *crtI* 遺伝子をレポーター遺伝子としたバイオセンサー株 (CrtIBS) を育種した¹³⁾。CrtIBS においても CrtABS の時と同様にヒ素応答性転写スイッチの下流にレポーター遺伝子 *crtI* を配置し、この DNA フラグメントを含むプラスミドを、青緑色を呈する No. 711 株に導入するといった手順で育種を行った。このようにして得られた As-CrtIBS では、三価無機ヒ素の存在時に *crtI* の発現により No. 711 株の緑黄から赤への変化がセンサーのシグナルとして生じる。

CrtIBSの細胞増殖条件とアッセイ条件 As-CrtIBS は生細胞がセンサー素子として機能するため、センサー素子を調製する過程は、細菌を培養して増殖させる過程となる。この生細胞に凍結乾燥等の処理が施された上で、センサーは被検試料中のヒ素検出試験 (アッセイ) に供される。この一連の流れを考慮すると、As-CrtIBS の増殖、すなわちセンサー素子の調製の条件最適化と、アッセイ条件の最適化を行う必要がある。そこでまず、As-CrtIBS を用いたアッセイ条件の最適化を行った。微好気・明条件で培養した As-CrtIBS 株を集菌し、亜ヒ酸 (AsO₂⁻) アッセイを好気・暗条件、微好気・明条件、嫌気・明条件で行い、24 時間後に亜ヒ酸を添加した培

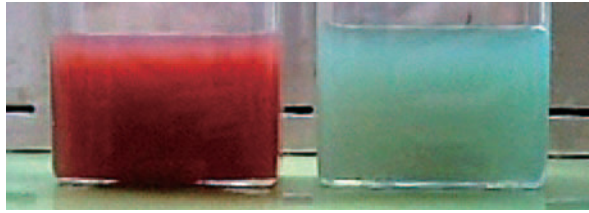


図4. 光合成細菌 *Rps. palustris* の野生株 No. 7 (左) と *crtI* 遺伝子破壊株 No. 711 (右) の培養液の色調

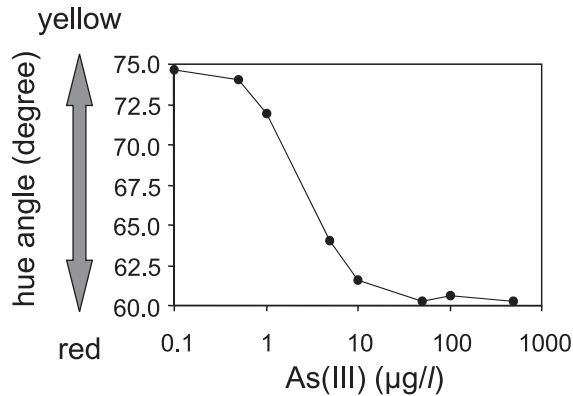


図5. L*a*b* 表色系の色相角度で表した As-CrtIBS のアッセイ後培養液の色の評価

培養液と添加しない培養液の色差 (ΔE^*ab) を求めて色違いの度合いを評価した。亜ヒ酸を添加した培養液と添加しない培養液の色差を比較した結果、嫌気・明条件において他の2条件と比較し大きな色差が生じることが明らかとなった。次に、アッセイに用いる細胞を調製するための前培養条件として嫌気・明条件と好気・暗条件を検討したところ、いずれの条件で細胞を調製した場合においてもアッセイを嫌気・明条件で行いさえすれば、同等の色変化が生じた。したがって、好気・暗条件もしくは嫌気・明条件で調製した細胞を用いて嫌気・明条件にて亜ヒ酸アッセイを行うと亜ヒ酸存在下で明瞭な色変化が生じることが示された。種々の As (III) 濃度 (0, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/l}$) の標準水溶液を調製し、As-CrtIBS の培養液と混合して最適条件下で培養とアッセイを行った結果、1.0 $\mu\text{g/l}$ から 10 $\mu\text{g/l}$ の濃度で顕著な色変化が生じることが明らかとなった (図5)。しかし、この条件を用いた場合においても L*a*b* 表色系で表現した亜ヒ酸非添加時の色座標点は、緑から赤の色彩を表す a^* 値、青から黄の色彩を表す b^* 値が共にプラスの値であることから暖色を示していたため、亜ヒ酸添加による色変化は寒色から暖色への変化とはいえなかった。

表1. As-CrtIBS の色変化に及ぼす炭酸水素ナトリウム添加の影響

As(III) ($\mu\text{g/l}$)	L* ^a	a* ^a	b* ^a	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*ab
+ NaHCO ₃							
-	93.05	-1.05	5.16				
10	91.90	1.15	6.05	-1.14	2.20	0.89	2.64
50	91.66	1.27	6.18	-1.38	2.32	1.02	2.89
- NaHCO ₃							
-	91.94	1.41	5.61				
10	91.15	3.03	5.21	-0.80	1.63	-0.40	1.86
50	91.45	3.12	4.61	-0.50	1.71	-1.00	2.05

^a 3回の測定の平均値を示す。-は非添加を示す。



図6. As-CrtIBS の亜ヒ酸に対する色調変化。下, 亜ヒ酸非添加; 上, 50 $\mu\text{g/l}$ As (III) 添加。

これを改善するために、0.1%(w/v)の炭酸水素ナトリウムを嫌気・明条件下の前培養時と、嫌気・明条件下の亜ヒ酸アッセイ時にそれぞれ添加した。これにより、亜ヒ酸非添加時の a^* 値がマイナス値、すなわち寒色の緑の色相に移行し、10 $\mu\text{g/l}$ の濃度においても視覚的に容易に認識可能な色変化が24時間で生じた (表1)。さらに 50 $\mu\text{g/l}$ では色相の変化が明瞭化した (図6)。選択した嫌気・明条件では宿主である光合成細菌は光合成により ATP 合成を行うことから、添加した炭酸水素ナトリウムは光合成の電子伝達系において最終電子受容体としての役割を担っていることが推察される。炭酸水素ナトリウム添加によるアッセイで b^* 軸上の黄の色相が増したのは、亜ヒ酸非添加時に ζ -カロテンやニューロスポレンといった黄色カロテノイドの蓄積が抑えられており、亜ヒ酸添加時にこれらのカロテノイドの含量がリコペンやロドピンといった赤色カロテノイドの含量と共に増加したためと考察される。また、明るさの指標となる L* 軸の値は炭酸水素ナトリウムの添加の有無に関わらず亜ヒ酸添加により減少した。L* 軸の値の減少は、亜ヒ酸添加時に高細胞密度になるまで細胞が増殖したことを示している。細胞にとって毒性の強い亜ヒ酸が直接的に増

殖を亢進したとは考えられないため、添加した濃度においては亜ヒ酸の増殖に対する負の影響は現れていないと考えられる。亜ヒ酸はAs-CrtIBSのレポーター遺伝子である*crtI*の発現を誘導することによりカロテノイド代謝を促し、その結果、光合成による増殖が促進されたことが推察される。炭酸水素ナトリウム添加時においては、カロテノイド含量が低く抑えられているため光合成による増殖が炭酸水素ナトリウム非添加時より強く抑えられたものと考えられる。

亜ヒ酸の非添加時から添加時への培養液の色相と明るさの変化の結果、10 µg/l As(III) での色差 (ΔE^*ab) は2.64であり、炭酸水素ナトリウム非添加時に10 µg/l As(III) で得られた色差である1.86と比較し高い値となった(表1)。このように、As-CrtIBSに寒色から暖色への培養液の色変化を生じさせた結果、亜ヒ酸の有無をより明瞭に識別可能となった。

この宿主-レポーター系に、*Rps. palustris*のゲノムに存在する転写調節因子HmrRの遺伝子とその結合領域DNAと予測される領域を転写スイッチとして*crtI*上流域に導入した。その結果、カドミウムや鉛に反応して色変化を生じるセンサー株を得ることが可能であった。

As-CrtIBSの金属選択性と検出下限濃度 As-CrtIBSが地下水やミネラルウォーター中で亜ヒ酸に対して応答するか否かを検討した。試験に用いた地下水は大学構内で採取されたものであり硬水である。ミネラルウォーターAも同様に硬水である。一方、ミネラルウォーターBとCは軟水である。As-CrtIBSの色は硬水と軟水で変化がみられた。硬水では寒色側に、軟水では暖色側に亜ヒ酸非存在時の色がシフトすることが明らかとなった。しかしながら、水の硬度に関係なく10 µg/lおよび50 µg/lのAs(III) に応答することが明らかになった。軟水中では色変化の低下傾向が見受けられた。したがって、環境水の検査においては、水の硬度あるいは軟水か硬水かを予め把握しておくことが望ましい結果となった。

また、As(V) や同族元素であるSb(III) に対する応答性と検出下限濃度について調べたところ、いずれに対しても応答性を示すものの、検出下限濃度はAs(III) の5 µg/lと比較し高くなることが明らかとなった。したがって、As(V) を含めたヒ素の検出においては、As(V) のAs(III) への還元処理が前処理として必要であることが判明した。さらに、環境水の検査においては、自然界に豊富に存在する鉄のイオンがAs-CrtIBSのヒ素検出に及ぼす影響について調べる必要がある。種々のFe(II) としてFe(III) イオン濃度の存在下で50 µg/lのAs(III) に対する色相変化を調べたところ、10 mg/lまでの濃度では

亜ヒ酸アッセイは鉄イオンの影響を受けないことが明らかとなった。50 mg/lと100 mg/lのFe(II) においては、色相の変化量が低下した。しかしながら、この低下はAs-CrtIBSの実用性を大きく損なう要因とはならない範囲のものであった。

まとめ

光合成細菌のカロテノイド代謝酵素遺伝子をレポーターとした有害金属検出用生細胞型バイオセンサー株を作製した。スフェロイデン経路を有する*Rvu. sulfidophilum*の*crtA*発現を*E. coli*ヒ素応答性転写スイッチに連動させることで得られたCrtABSは、三酸化二ヒ素に反応し黄から赤へと色相が変化した。また、スピリロキサンチン経路を有する*Rps. palustris*の*crtI*発現をヒ素あるいはカドミウム/鉛に反応する転写スイッチに連動させることで得られた二種類のCrtIBSは、各金属に反応し緑黄から赤へと色相が変化した。CrtABSとAs-CrtIBSのヒ素検出下限濃度はそれぞれ実用的な濃度域にあることを確認した。レポーターのカロテノイド代謝反応の特性から光合成条件において、CrtABSでは酸素分子が必須であるのに対し、CrtIBSではそのような必要性はなく炭酸水素ナトリウムが色変化を顕著にした。地下水やミネラルウォーターを試料としたAs-CrtIBSによるアッセイの結果から、ヒ素汚染の有無を視認することが可能な一次スクリーニング法としての利用の可能性が示された。

本研究はNEDO技術開発機構・産業技術研究助成事業(05A22703a)を受けて行われた。

文 献

- 1) Bagla, P. and Kaiser, J.: *Science*, **274**, 174 (1996).
- 2) Nickson, R. *et al.*: *Nature*, **395**, 338 (1998).
- 3) Belkin, S.: *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**, 206 (2003).
- 4) Trang, P. T. *et al.*: *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 7625 (2005).
- 5) Kohlmeier, S. *et al.*: *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 1578 (2007).
- 6) Stocker, J. *et al.*: *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 4743 (2003).
- 7) Takaichi, S.: *The photochemistry of carotenoids*, (Frank, H. A. *et al.*), p.39, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands (2003).
- 8) Maeda, I. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 397 (2006).
- 9) Maeda, I. *et al.*: *Curr. Microbiol.*, **51**, 193 (2005).
- 10) Xu, C. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **271**, 2427 (1996).
- 11) Fujimoto, H. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 332 (2006).
- 12) Yoshida, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 1043 (2007).
- 13) Yoshida, K. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 6730 (2008).