

助成番号 0610

好塩性細菌ハロモナスを利用した海水・かん水・にがり中の重金属浄化

仲山 英樹

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

概要 タイの塩土から同定された好塩性細菌ハロモナス(*Halomonas elongata*)は、海洋中にも存在し、0.3~21% NaCl、pH 5~10の広範囲の環境に適応可能である。そこで本研究では、高塩環境適応能力に優れたハロモナスに着目し、海水、かん水などの製塩過程にみられる、高塩濃度かつアルカリ性環境水圏の重金属浄化への応用を目指す。特に本研究では、実際の食塩やにがりの製造過程で海水やかん水に溶存する重金属類に対して、細胞表層工学技術によって重金属浄化能力を強化した好塩性細菌ハロモナスを用いた重金属浄化技術の有用性を検討することを目的とした。

まず、海水やかん水に代表される高塩濃度かつアルカリ性環境下でのハロモナスの各重金属(Cu、Cd または Zn)に対する耐性と蓄積能力を詳細に調べた結果、重金属耐性を示したハロモナス細胞の重金属の蓄積量は低く抑えられているため、現状では耐性と浄化能を両立することが困難であることが示された。そこで本研究では、細胞表層工学技術により、ハロモナスの細胞表層で重金属を捕捉して重金属浄化能を高めることを試みた。ハロモナスの細胞表層に重金属を捕捉する戦略により、細胞内に重金属を取り込むことなく、重金属耐性を維持したまま重金属浄化能を高めることができるため、飛躍的な浄化効率の向上が期待される。本研究では、人工金属結合ドメインとして、システイン(C)やヒスチジン(H)に富んだペプチド配列を提示したをアミン化ハロモナス細胞を作製した。その結果、高塩濃度かつアルカリ性の環境中では、Hに富んだペプチド配列は金属浄化能が低いのにに対し、Cに富んだペプチド配列の方が金属浄化能が高く、海水やかん水における重金属浄化に有用であることが判明した。また、酸性アミノ酸であるグルタミン酸(E)やアスパラギン酸(D)が隣接したペプチド(EC6またはDC6)を提示した細胞では、特にCuの浄化能が高いことが示された(Fig. 1)。

今後は、既存の製塩プロセスに重金属浄化能を高めたアミン化ハロモナス細胞を活用した海水・かん水からの重金属浄化プロセスを追加することによって、より安心・安全な食塩およびにがりの生産・供給に貢献できると期待される。

1. 研究目的

現代は、重金属による海域汚染が深刻化することにより、海産物や天然海水塩の安全性が懸念されるという危機的事態に陥っている。そのため、効率的な海水からの重金属浄化技術の開発が期待される。タイの塩土から同定された好塩性細菌ハロモナス(*Halomonas elongata* OUT30018株⁽¹⁾)は、海洋中にも存在し、0.3~21% NaCl、pH 5~10の広範囲の環境に適応可能である。そこで本研

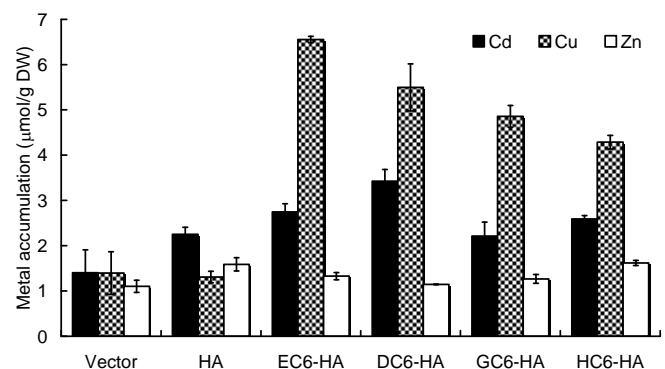


Fig. 1 Accumulation of heavy metals in *H. elongata* displaying synthetic peptides, XC6.

究では、高塩環境適応能力に優れたハロモナスに着目し、海水、かん水、にがり溶液などの製塩過程にみられる、高塩濃度かつアルカリ性環境水圏の重金属浄化への応用を試みる⁽²⁾。本研究の最終到達目標は、海水汚染の深刻化により一部の天然海水塩で汚染が報告されたCODEX食用塩規格の有害5元素である銅(Cu)、カドミウム(Cd)、鉛、水銀、砒素に代表される重金属類の浄化にハロモナスを利用した新規バイオレメディエーション技術

の開発である。特に本研究では、実際の製塩過程における海水・かん水・にがりに溶存する重金属類に対して、細胞表層工学技術によって重金属浄化能力を強化した好塩性細菌ハロモナスを用いたバイオレメディエーション技術の有用性を検討することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 使用菌種とプラスミド

Halomonas elongate OUT30018 株を使用した。遺伝子構築の大腸菌宿主として、*Escherichia coli* DH5 α を使用した。*H. elongate* への接合伝達のヘルパーとして、*E. coli* HB101(pRK2013)を使用した。*H. elongate* でのタンパク質発現用には、シャトルベクター pHS15N⁽³⁾を使用した。

2.2 使用培地

金属添加実験用の培地は、重金属類が不溶化するのを防ぐため、リン酸をほとんど含まない MJS 培地を基本とし、海水様の条件としては 3% NaCl を、かん水様の条件としては 6% NaCl を添加した改変 MJS 培地 (3% または 6% NaCl, 15 mM Tris, 50 mM NaCl, 20 mM NH₄Cl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 0.05 mM MnCl₂, 0.8% (wt/vol) Casamino Acids, 0.4% (vol/vol) glycerol, 0.005% (wt/vol) thiamine) を使用した。ここで、15 mM Tris を添加することで MSJ 培地は室温でおよそ pH 8.4 になるため、培地の pH を調整するために 15 mM Tris を添加した。さらに中性条件で実験する際には、HCl を添加して pH を調整した。また、耐性試験や浄化試験のための標的の金属として、ZnCl₂, CdCl₂, CuCl₂ を組みあわせて培地に適宜添加して使用した。

2.3 ICP 発光分析

ICP (Inductively Coupled Plasma) 発光分析は、IRIA Intrepid ICAP (Thermo electron) を用いて行った。各金属の波長は、それぞれ、Cd 2144, Cu 3247, Zn 2062 を用いた。解析は、TEVA CID Software を用いて行った。

3. 研究結果

3.1 ハロモナスの重金属耐性と重金属蓄積量に及ぼす細胞外塩濃度と pH の影響

これまでに、好塩性細菌であるハロモナスが高塩濃度かつアルカリ性の環境中で天然ミネラル成分である亜鉛 (Zn) や Cu に耐性を示し、特に 20 μ M 程度の低金属濃度条件下での Cu および Cd の蓄積能力 (すなわち浄化能力) に優れていることが示唆された。そこで、まず本研究で

は、海水やかん水に代表される高塩濃度かつアルカリ性環境下でのハロモナスの各重金属に対する耐性と蓄積能力を詳細に調べることにした。その結果、ハロモナスの金属に対する耐性は、細胞外の塩濃度や pH によって変化し、Cu に対してはアルカリ性 pH の条件下で耐性となるが、Cd に対してはアルカリ性 pH の条件下で感受性となり、pH の影響が顕著であることが示された。一方で、Zn に対しては pH の影響は少なく、塩濃度の影響が顕著であった。このように、添加した金属の種類に応じて異なる応答性を示したが、金属が過剰に存在する条件下で耐性を示した細胞では、共通して金属蓄積量が低く抑えられていることが明らかとなった (Fig. 1)。これにより、単細胞である細菌の細胞内に金属を高蓄積するには、量的な限界があることが示された。しかしながら、海水やかん水に代表される高塩濃度かつアルカリ性の環境条件下では、ハロモナスは高い重金属耐性を示すことが明らかとなった。しかしながら、重金属耐性を示したハロモナス細胞の重金属の蓄積量は低く抑えられているため、細胞の重金属浄化能 (蓄積能) は低く、現状では耐性と浄化能を両立することが困難であることが示された。

3.2 金属結合ペプチドを提示したアーミングハロモナス細胞の作製

高塩濃度かつアルカリ性環境中で重金属耐性を示すハロモナスは、重金属に汚染された海水やかん水においても旺盛なバイオマス生産力を維持することができるため、重金属浄化に有用であると考えられる。しかしながら、上述のとおり、現実的には細胞の重金属耐性と重金属蓄積量 (浄化能に相当) は負の相関関係があるため、飛躍的な浄化能の向上は期待できない。そこで本研究では、細胞表層工学技術により、ハロモナスの細胞表層で重金属を捕捉して重金属浄化能を高めることを試みることにした。ハロモナスの細胞表層に重金属を捕捉する戦略により、細胞内に重金属を取り込むことなく、重金属耐性を維持したまま重金属浄化能を高めることができるため、飛躍的な浄化効率の向上が期待される。

これまでに、我々はハロモナス細胞の外膜リポタンパク質をアンカーとして利用することで、目的のペプチド配列を細胞表層に提示させるに成功した⁽⁴⁾。実際に、エピトプタグ (HA) を提示した細胞を蛍光標識抗体で免疫蛍光染色すると、細胞表層に提示された HA が蛍光標識抗体を捕捉することにより細胞表層に蛍光のシグナルが検出された (Fig. 2A)。そこで、重金属浄化能力を強化するため

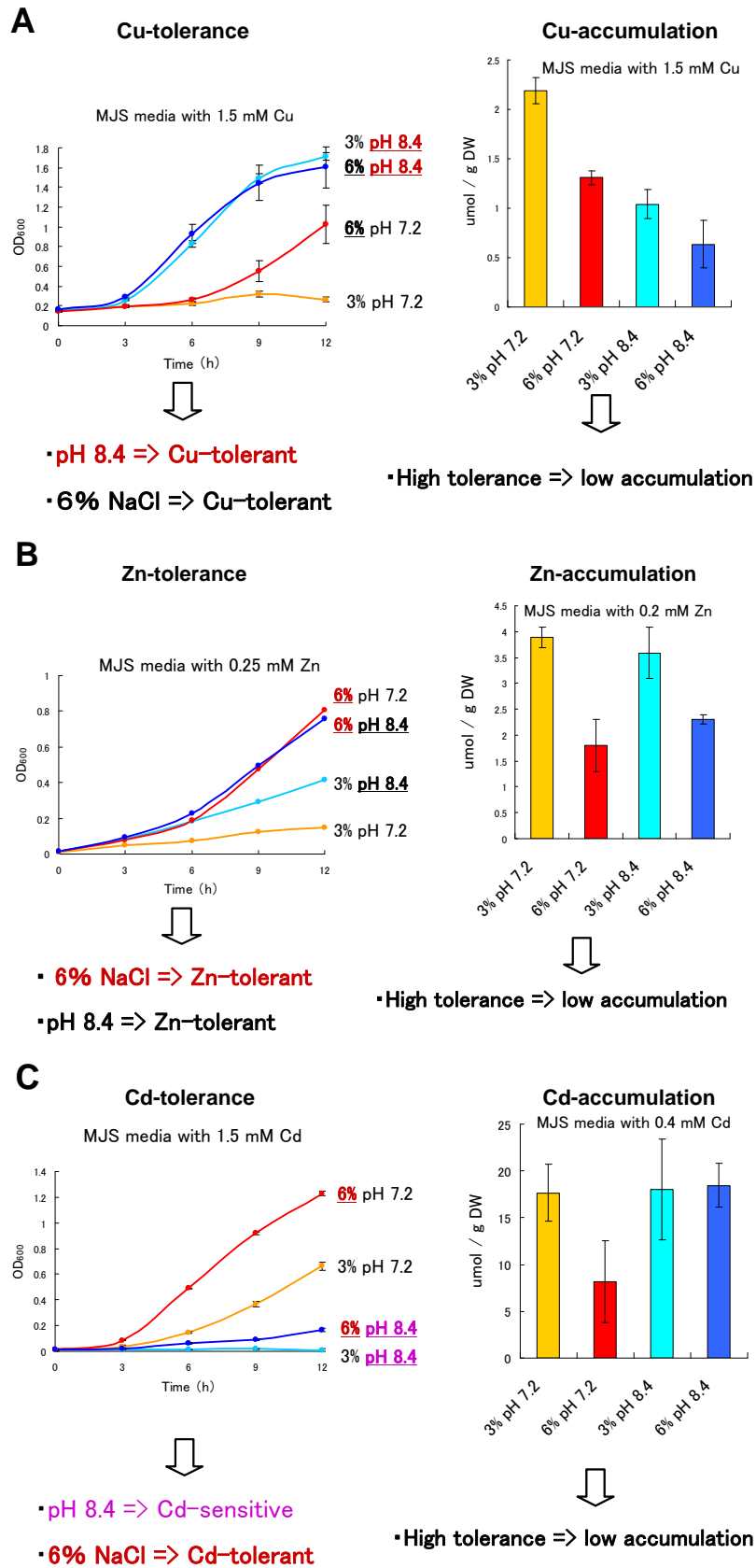


Fig. 1 Metal-tolerance is negatively correlated with metal-accumulation in *H. elongata*.
A: Cu-response in *H. elongata*. B, Zn-response in *H. elongata*. C, Cd-response in *H. elongata*.

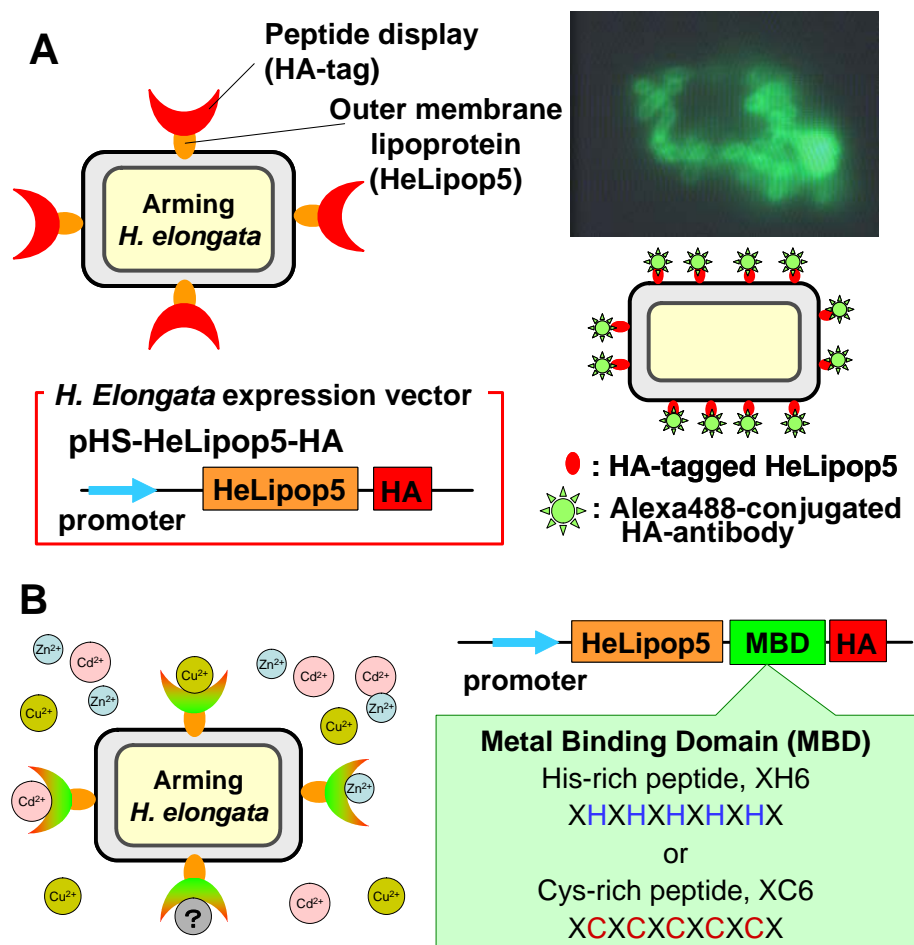


Fig. 2 Cell-surface display system in *H. elongata*.
A, *H. elongata* cells displaying HA-epitope tag on the cell-surface.
B, *H. elongata* cells displaying synthetic metal-binding peptides on the cell-surface.

に、この細胞表面工学技術を活用し、金属結合ドメイン (MBD) として機能することが予想されるシステイン (C) やヒスチジン (H) に富んだペプチド配列を提示したをアミングハロモナス細胞を作製することにした (Fig. 2B)。

本研究では、どのような配列のペプチドが金属結合能に優れているのかを調べるため、金属と直接作用するアミノ酸である H および C の繰り返し配列をもつ合成ペプチドを用いた実験を行った。また、C や H の近傍のアミノ酸配列によって、金属の結合特性が変化するかどうかを調べるため、H または C に富んだ 8 種類の人工金属結合ペプチド (EC6, DC6, GC6, HC6, HD6, HE6, HG6, H12) を設計し、それらを細胞表面に提示したハロモナスを作製した。そして、海水程度の 3% NaCl 濃度の条件下において、3 種の重金属を等量混合した培養液中から細胞により回収された金属量を ICP 発光分析により定量化した (Fig. 3)。その結果、C に富んだドメインを細胞表面に提示したときにハ

ロモナスの重金属浄化能が増加することが示された。その一方で、高塩濃度かつアルカリ性の環境中では、H に富んだペプチド配列 (HD6, HE6, HG6, H12) は金属結合能が低く、C に富んだ配列 (EC6, DC6, GC6, HC6) の方が金属結合能が高く、海水やかん水における重金属浄化に有用であることが判明した。また、酸性アミノ酸であるグルタミン酸 (E) やアスパラギン酸 (D) が隣接した EC6 や DC6 を提示した細胞において、特に Cu に対する浄化能が高いことが示された。さらに、人工の金属結合ペプチドである EC6 および DC6 は、海水の 2 倍程度濃縮したかん水様の 6% NaCl 濃度の条件下で、Cu に特異的な浄化能が高いことが明らかとなった (data not shown)。

3.3 多重コピーの金属結合ペプチドを提示したアミングハロモナス細胞の作製

さらに、ハロモナス細胞の重金属浄化能を向上させるため、提示するアンカータンパク質 1 分子当たりの金属結合

ペプチド(EC6 または DC6)のコピー数を増加させることを試みた(Fig. 4)。その結果、重金属の結合量は金属結合ペプチドのコピー数の増加とともに上昇する傾向があるこ

とが示された。しかしながら、EC6 では2コピー数、DC6 では、3 コピー数程度の条件で Cu の結合能に閾値があることが示された。

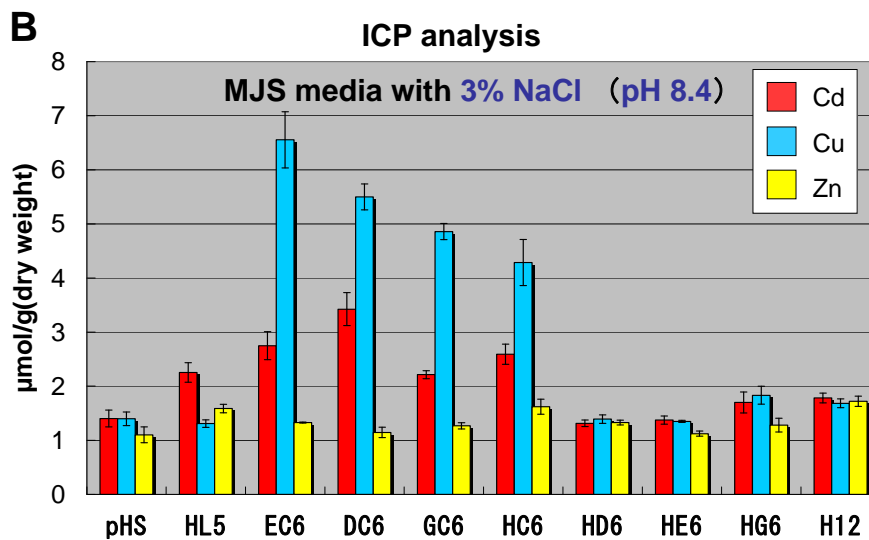
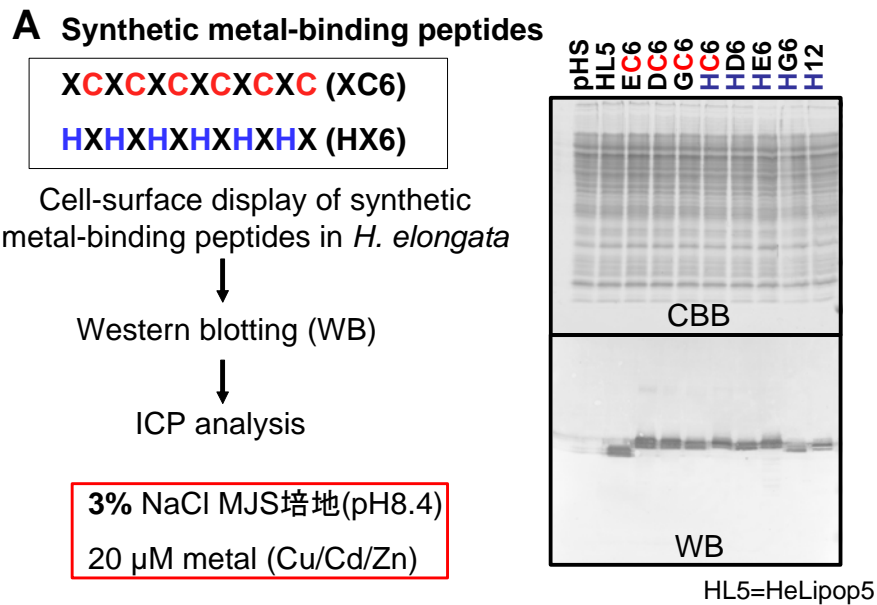


Fig. 3 Generation of arming *H. elongata* cells displaying synthetic metal-binding peptides.
 A, Synthetic metal binding peptides, Cys-rich XC6 or His-rich XH6, were designed and displayed on the cell-surface of *H. elongata*.
 B, Cell-surface display of Cys-rich XC6 peptides actually function as metal-binding peptides in *H. elongata* under seawater like condition.

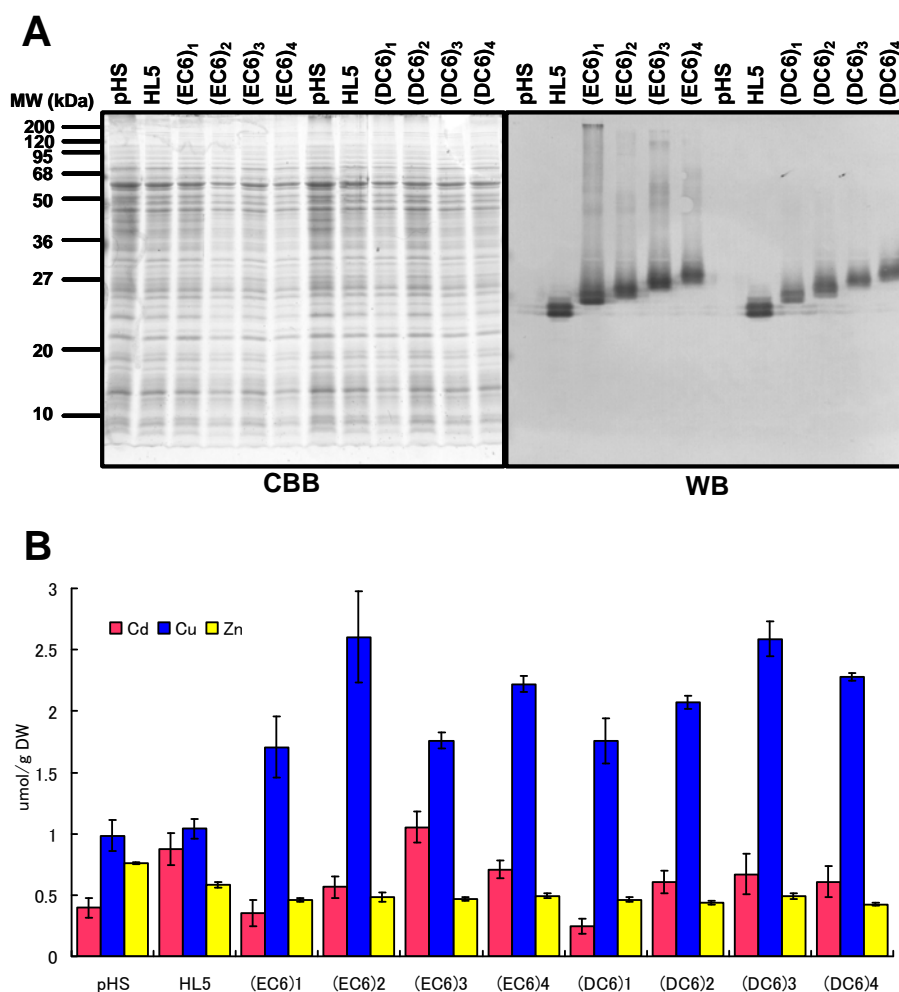


Fig. 4 Cell-surface display of multi-copies of EC6 or DC6 peptides in *H. elongata*.
 A, Production of the arm protein fused with multiple copies of EC6 or DC6 peptides in *H. elongata*.
 B, Accumulation of heavy metals in *H. elongata* OUT30018 displaying multiple copies of synthetic metal-binding peptides, EC6 or DC6.

4. 考察

実際の塩やにがりの製造過程で重金属汚染が懸念されている海水やかん水の浄化には、本研究で用いたハロモナスのように、重金属や塩が濃縮された環境に適応した好塩性生物でなければ適用できない。しかしながら、ハロモナスは重金属を細胞内に取り込まないことで耐性を獲得しているため、重金属を浄化する効率には限界がある。そこで、本研究では、細胞内に重金属を取り込んで蓄積する戦略とは異なり、細胞表面工学技術により金属結合ペプチドを提示したアーミングハロモナス細胞を作製し、細胞表面で重金属を捕捉して細胞の表面で蓄積する戦略を選択した。アーミングハロモナス細胞を使用した重金属浄化技術は、細胞内に重金属を取り込む必要がないため、金属耐性と金属蓄積量の向上を両立できる点が優れ

ているといえる。

本研究では、人工金属結合ペプチドを表面に提示しているが、遺伝子組換え技術の安全性を危惧する世論の問題から、外来の塩基配列を導入するのは好ましくない。よって、人工金属結合ペプチドに加えて、ハロモナスに内在性の金属結合タンパク質に存在する金属結合ドメインのペプチド配列を活用することも重要な戦略であると考え

5. 今後の課題

今後は、Cu 以外の汚染金属に対応するために、その他の重金属に対しても有用な金属結合ペプチドを探索して活用するとにより、種々の金属汚染に対応できる浄化能力を備えたアーミングハロモナス細胞の開発が今後の課題

である。実際の汚染現場の環境に応じて最適化されたアーミング *H. elongata* は、重金属浄化のツールとして有用であるだけでなく、また、金属回収・再資源化のツールとしても重要な技術としての発展が期待できる。将来的には、既存の製塩プロセスに対して、実用的なアーミングハロモナス細胞を用いた海水およびかん水の重金属浄化プロセスを追加することによって、より安心・安全な食塩およびにがりの生産・供給に貢献できることが期待される。

文献等

1. 参考文献

- (1) Ono, H., Sawada, K., Khunajakr, N., Tao, T., Yamamoto, M., Hiramoto, M., Shinmyo, A., Takano, M. and Murooka, Y. (1999) Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. J. Bacteriol. 181:91-99.
 - (2) Nakayama, H., Shinmyo, A. and Yoshida, K. (2006) Bioremediation of metals in high salinity environments using the moderate halophile *Halomonas elongata* OUT30018. Proceedings of the International Symposium on Environmental Biotechnology Leipzig 2006, Germany.
 - (3) Vargas C, Fernandez-Castillo R, Canovas, D., Ventosa, A. and Nieto, J.J. (1995) Isolation of cryptic plasmids from moderately halophilic eubacteria of the genus *Halomonas*. Characterization of a small plasmid from *H. elongata* and its use for shuttle vector construction. Mol. Gen. Genet. 246:411-418.
 - (4) Nakayama, H., Shinmyo, A., and Yoshida, K. (2006). Cell-surface engineering of *Halomonas elongata* for metal-bioremediation at high salinity sites. Proceedings of the 18th annual meeting of the Thai Society for Biotechnology.
- ### 2. 国際学会発表
- (1) Nakayama, H., Shinmyo, A., and Yoshida, K.: Cell-surface engineering of *Halomonas elongata* for metal-bioremediation at high salinity sites. The 18th annual meeting of the Thai Society for Biotechnology. Bangkok, Thailand. (November 2-3, 2006). (Oral presentation).
 - (2) Nakayama, H., Shinmyo, A., and Yoshida, K.: Bioremediation of metals in high salinity environments using the moderate halophile *Halomonas elongata* OUT30018. The International Symposium on Environmental Biotechnology Leipzig 2006. Leipzig, Germany. (July 9-13, 2006). (Poster presentation).
- ### 3. 国内学会発表
- (1) 仲山英樹, 小笠原直毅, 新名惇彦, 吉田和哉: 中度好塩性細菌 *Halomonas elongata* OUT30018 株のゲノム情報を活用した細胞表層工学技術の開発と重金属浄化への応用. 第1回日本微生物ゲノム学会年会. 2007年3月2日, P-081. 千葉県木更津市(かずさアカデミアホール内). (2007). (ポスター).
 - (2) 仲山英樹: 好塩性細菌 *Halomonas elongata* の細胞表層工学技術の開発と重金属浄化への応用. 第43回好塩微生物研究会. 2006年12月. 奈良県奈良市(帝塚山大学学園前キャンパス内). (2006). (口頭).
 - (3) 仲山英樹, 新名惇彦, 吉田和哉: 中度好塩性細菌 *Halomonas elongata* OUT30018 株を利用した細胞表層工学技術の開発と塩類集積環境の重金属浄化への応用. 日本生物工学会第58回大会. 2006年9月, 1115-1. 大阪府豊中市(大阪大学豊中キャンパス内). (2006). (口頭).

No. 0610

Heavy Metal Remediation of Sea Water, Brine, and Bittern Using the Moderate Halophile *Halomonas elongata*

Hideki Nakayama

Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology,
8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0192, Japan

Summary

Metal pollution is a growing threat to the environment and human health. High salinity and metal pollution are often observed together because inorganic metals and mineral salts are concentrated simultaneously in nature. Therefore, the key to a successful metal-bioremediation is to develop a remediation technology that can be used in high-salinity environments. Halophilic bacteria are typical inhabitants of high-salinity sites such as marine environments and salt fields. *Halomonas elongata* strain OUT30018, a moderate halophile isolated from high-salinity soil from Khon Kaen, Thailand, can survive heavy metal-stress under high salinity and alkaline conditions. Using *H. elongata* OUT30018, we aim to develop superior biotechnology for metal-remediation. We have developed a cell-surface engineering system for *H. elongata* OUT30018 using its own outer-membrane lipoprotein as an anchor. Expression of the synthetic phytochelatin (PC), EC8, composed of (Glu-Cys)₈Gly peptide fused to the lipoprotein anchor on the surface of *H. elongata* OUT30018 resulted in improved bioaccumulation of Cu, Cd and Zn in medium containing each metal separately, while in medium containing mixed metals (Cu, Cd and Zn), Cu is the main metal accumulated. Furthermore, to test the effect of charged amino acid residues next to Cys on metal-binding selectivity of PC-like peptides, we expressed alternative PC-like peptides, XC6, composed of (Xaa-Cys)₆ peptides (Xaa = Glu [E], Asp [D], Gly [G], or His [H]) fused to the lipoprotein anchor on the surface of *H. elongata* OUT30018. In the *H. elongata* OUT30018 cells displaying PC-like peptides with acidic amino acid residues (EC6 and DC6), bioaccumulation of Cu was greatly improved. Therefore, cell-surface engineered *H. elongata* OUT30018 is a promising tool for decontamination of heavy metals in salty water such as seawater and brine.