

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		有機水銀分解酵素発現株を用いた環境中水銀の連続回収の分子機構と定量評価技術の確立			
研究テーマ (欧文) AZ		Molecular and analytical studies on a mercury recovery by use of organomercurial lyase			
研究氏代表名者	カナ CC	姓)モリモト	名)ユキオ	研究期間 B	2017～ 2019 年
	漢字 CB	森本	幸生	報告年度 YR	2018年
	ローマ字 CZ	MORIMOTO	YUKIO	研究機関名	京都大学 複合原子力科学研究所
研究代表者 CD 所属機関・職名		京都大学複合原子力科学研究所・教授			
<p>概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。)</p> <p>有機水銀分解酵素を特異的に大量発現する遺伝子改変大腸菌を用いて、溶液中の有機水銀を酵素分子内に選択的に取り込ませた水銀回収方法の開発と放射化分析による残存水銀の検出評価方法の確立、および無機水銀単離までの経路・分子機構解明とその協働方法の確立を目的とした。</p> <p>[実験]</p> <p>1) 有機水銀化合物を分解する酵素 (MerB) 遺伝子 (R831b OMR locus) を化学合成し、大腸菌 (E. coli, BL21DE3 (plysS) 株) 遺伝子サイトに組み込んで、MerB 発現系大腸菌株を作成した。</p> <p>2) 塩類のみから構成される最小培地にて発現株を培養し、MerB 酵素を単離・精製・結晶化を行い、放射光による構造解析を行った。</p> <p>3) 50mL 培養規模で、塩化メチル水銀化合物を 5, 2.5mM になるように添加し、培養経過とともに、培地溶液、菌体量をサンプリングし、濾紙上で乾燥させ、放射化分析試料とした。</p> <p>4) 研究所内研究用原子炉 KUR の 5MW 運転時に放射化ポートにより中性子照射を行い、48 時間以上の Hg 半減期を待って、γ 線検出を行った。</p> <p>[結果および考察]</p> <p>MerB 遺伝子を BL21DE3 株に導入した形質転換株は、MerB 酵素を IPTG 添加誘導の後、菌体内で生産を始める。この時の培養培地を、後述の放射化分析のため、塩のみで構成される最小培地で生育できるよう、徐々に純化を行い、最終的には 5 L 規模での培養を行って発現菌体約 10 g を得た。菌体破碎溶液を、His タグ導入された MerB を単離するため Ni-アフィニティーカラムを用い、ゲルろ過、イオン交換カラムクロマトグラフィーで精製し、精製試料約 10mg を得た。ポリエチレングリコールを沈殿剤として結晶化を行い、SPring-8 放射光によって回折データを収集した (ネイティブ結晶)。</p> <p>これとともに、結晶化時に塩化メチル第二水銀 (CH₃HgCl) を 0.5mM になるよう添加し結晶化を行い、構造解析を行った。ネイティブと塩化メチル水銀添加後結晶構造の比較から、MerB 酵素内の Cys96, Asp99, Cys159 の 3 残基に囲まれた活性部位に、メチル鎖が切断された水銀原子の結合 (捕捉) を見出した。このことは、MerB 酵素が溶液中でメチル水銀結合を切断し、水銀原子のみを保持していることを示している。</p> <p>培養中の形質転換菌体内では、MerB が大量に生合成されているので、培養終期あるいは培養途中での培地内のメチル水銀はその酵素分子の産生と共に切断され、水銀原子に分解され酵素分子内に固定される。培地に添加したメチル水銀の、菌体内への移動量、あるいは培養液で残量を原子炉中性子照射による放射化分析・γ 線検出により定量した。半減期を充分考慮した 96 時間後の定量的結果、発現誘導剤 IPTG 添加をしない場合 (通常の見現量) は、菌体内/培地の水銀量は約 2 倍近く強く捕捉されているが、IPTG 誘導をかけるとその比は逆転あるいは同等程度となり有意な差は見られなかった。このことは、酵素分子を強制的に発現させた転換株では生育そのものが不安定となる事が予想された。</p>					
キーワード FA	有機水銀分解酵素	放射化分析	メチル水銀	水銀回収	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	Mercury recovered from smeared solution by the organo-mercury lyase enzyme revealed and detected by an <i>in-cell</i> radioactive analysis							
	著者名 ^{GA}	K. Takamiya and Y. Morimoto	雑誌名 ^{GC}	KURRI Progress Report 2018					
	ページ ^{GF}	in press	発行年 ^{GE}	2	0	1	9	巻号 ^{GD}	53
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

This research has a purpose of the development of the mercury recovery method to have made an enzyme intramolecular capture organomercury in solution, with using the overexpression strain for an organomercury lyase, transfected into *E. coli* and the establishment of the detect-evaluation method of the remaining mercury by the activation analyses.

[Experiments]

- 1) The enzyme gene (R831b OMR locus) was chemically synthesized, and incorporated into the *E. coli* (*E. coli*, BL21DE3 (plysS)) gene site.
- 2) Strains were cultivated in a minimal-medium which is composed only of salts. The MerB enzyme was isolated, purified and crystallized.
- 3) At the 50mL cultivation scale, it added a methyl chloride mercuric-compound as it became 5.0 or 2.5 mM, and used in an activation analyses.
- 4) Gamma rays were detected after a neutron irradiation with the activation port when operating by 5 MW of research-reactor

[Results and Discussion]

The transformed BL21DE3 strain produces the MerB enzyme in the IPTG addition. Crystal structure of the enzyme reveals an active site composed of three amino acids (Cys96, Asp99, Cys159) and, although a CH₃HgCl was added in a native enzyme, Hg atom was found in the enzyme molecule. It shows that the enzyme hydrolyzed the mercury compound and bind only Hg atom.

In the activation analyses, the gamma ray detection after neutron irradiation from Hg smeared cells, the mercury quantity was about twice as strongly caught, but in the case of IPTG induction, the ratio became reverse or an equal degree. As for this result, it was expected that growth itself became unstable in the convertible share to have made enzyme molecule be overexpressed compulsorily.