

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02839

研究課題名(和文) 微生物由来金属輸送体の発現制御による次世代型有害金属複合汚染浄化植物の開発

研究課題名(英文) Molecular breeding of Arabidopsis plants with cell-type specific promoters and a bacterial mercury transporter MerC

研究代表者

清野 正子 (KIYONO, MASAKO)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：30239842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：有害金属による複合汚染に対し、低環境負荷で現場での修復が可能な環境浄化法として、植物を用いたファイトレメディエーションが有望視されている。本研究は、微生物由来の有害金属輸送体 MerC を植物に発現させ、かつその発現を細胞型および細胞内のレベルで制御することで、有害金属の複合汚染に対応した植物浄化技術の開発を目指した。植物体内での物質輸送に重要ないくつかの細胞型において特異的に MerC を発現する組換え植物系統を確立した。これらの植物のヒ素、カドミウムなど有害金属に対する応答を解析したところ、MerC の発現パターンによって複数の金属の蓄積性や耐性を向上させる効果が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Environmental contamination by hazardous metals is often observed as multi-metal contamination. Although phytoremediation, a plant-based environmental restoration technology has been focused as a promising technique with less adverse effects on environments, development of plant resources suitable for remediating multi-metal contamination is desired. Our previous studies demonstrated that ectopic expression of a bacterial broad spectrum transporter MerC in membrane fractions of Arabidopsis plant cells was a useful tool for accelerating phytoremediation of metals such as mercurials and cadmium. In this study, we applied several plant cell-type specific promoters and generated Arabidopsis plants expressing MerC in specific cell types which were known as crucial for metal or ion uptake and distribution within plants. Analyses of these transgenic lines suggested that expression of MerC-fusion proteins improved various metal accumulation as well as toxic metal tolerance.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：有害金属 複合汚染 金属輸送体 発現制御 浄化植物

1. 研究開始当初の背景

わが国は、メチル水銀による水俣病、カドミウムによるイタイイタイ病等の公害を経験したが、現在においても様々な有害金属が土壤、水環境中に残留している。2015年の調査まとめにおいて、わが国の農用地における特定有害金属(カドミウム、ヒ素、銅)が基準値以上で検出された、又は検出されるおそれが著しい地域は、累計134地域7,592haにのぼった。また、市街地の土壤汚染についても近年、土壤汚染事例は増加しており土壤環境基準値以上の有害金属が検出された事例は934件あった。有害金属別では鉛、ヒ素、フッ素汚染が顕著であった。さらに世界では水銀汚染はブラジル、ロシア、中国など27ヶ国以上でみられ、さらにはヒ素やカドミウム汚染についても食品を介したヒトへの健康影響が懸念されている。

このような背景から、有害金属の浄化法として、低環境負荷かつ有効な技術の開発は国内外において急務の課題である。ファイトレメディエーションとよばれる植物を用いた生物学的手法は、比較的低コスト・低環境負荷な技術であり、なにより低濃度・広範囲な汚染に対して有効な点が利点である。しかしながら、既存の植物種を用いる場合、浄化の対象となりえる金属に限られること、浄化効率が工学的方法に劣り、結果として時間がかかること等の欠点があげられる。一方、自然界には、重金属汚染地域に生息する微生物が存在し、現在までに様々な重金属耐性菌が単離されており、耐性菌の重金属耐性遺伝子を組換え技術を用いて植物に導入するアプローチはこのような問題点の克服に有効であると考えられた。

筆者はこれまでに植物に対して重金属高蓄積機能を付加させることを目指し、細菌由来の水銀・有害金属トランスポーターの中でも主としてMerCに注目した組換え植物を作出してきた。MerCを細胞膜移行因子であるSYP121あるいは液胞膜移行因子であるAtVAM3との融合タンパク質として発現させることにより、細胞内でのMerCの局在を制御することに成功している。また、このような植物では水銀化合物やカドミウムに対して耐性が向上し、植物体内への蓄積も促進されていることを示してきた。これらの結果から、細菌由来のMerトランスポーターを植物に組換えることは、有害金属のファイトレメディエーションにおいて浄化効率の上昇と浄化時間の短縮をもたらすと考えられた。

2. 研究の目的

植物の物質輸送は、細胞・組織レベルそれぞれにおいて複雑なプロセスであるため、Mer輸送体を「どこで」発現させるかが環境浄化植物の高性能化には不可欠であると考えられた。上述したように、細胞内のレベルでは、筆者らは、細胞内の膜移行因子を用いるアイデアによってMerCの細胞内局在を

制御することに成功している。組織レベルで見ると、物質輸送に重要な細胞型が植物の内在性トランスポーターの研究から明らかになっている。そこで、本研究では、植物体内におけるMerCの発現制御をより高度化し、MerCを用いたファイトレメディエーションを加速するため、植物の細胞型特異的プロモーターとMerCを用いた分子育種に取り組んだ。

3. 研究の方法

バイナリーベクターの構築：シロイヌナズナの根において物質吸収と輸送に重要な表皮細胞(pEpi)、内皮細胞(pSCR)、維管束が集中する中心柱(pWOL、pXylem)、また地上部では維管束からの物質の積み下ろしに寄与する維管束鞘(pSULTR2;2)、葉の光合成組織を構成する葉肉細胞(pRBCS1A)において優先的にプロモーター活性が知られている細胞型特異的プロモーターをそれぞれ選択した。各プロモーター断片をバイナリーベクターpGWB501のGatewayカセット上流に挿入した。蛍光タンパク-MerC-SYP121あるいは蛍光タンパク-MerC-AtVAM3をコードする遺伝子をLR反応により、pGWB501のプロモーター配列の下流に挿入した。

組換えシロイヌナズナの確立：アグロバクテリウムを用いた常法に従い、作製したプラスミドをシロイヌナズナの野生型株Col-0に導入した。ハイグロマイシン耐性を指標として組換え体を選抜し、T3世代においてT-DNAを1コピーで保持すると考えられるホモ系統を選抜した。ゲノムへのT-DNAの挿入をT-DNA特異的プライマーを用いてPCR法により確認した。

導入遺伝子およびタンパク質の植物内での発現：pEpi、pSCR、pWOL系統については、total RNAを根および地上部から抽出し、リアルタイムRT-PCRあるいは半定量RT-PCRによって導入遺伝子の発現を解析した。また、共焦点レーザー顕微鏡により、各組換え系統のMerC融合タンパク質の発現を解析した。

組換え植物の重金属耐性および浄化活性の評価：系統の確立が先行したpEpiおよびpSCR系統については、固形培地あるいは水耕栽培による評価系を確立した。無機水銀、亜ヒ酸、カドミウムに対する耐性を植物の表現型および重量で評価するとともに、各有害金属の蓄積性を還元気化原子吸光光度法および誘導結合プラズマ発光分光分析法により定量した。

4. 研究成果

作製したプラスミドの概要を次頁の表1に示す。MerCを植物細胞において細胞膜ヘターゲティングする効果を期待して、pEpi、pSCR、pWOL、pXylem、pSULTR2;2につい

ては細胞膜移行因子として SYP121 を選択し、MerC との融合タンパク質として発現させた。

表 1 発現ベクターの作製に用いた各因子

プロモーター	主な発現場所	蛍光タンパク	膜移行因子
pEpi	表皮	mTRQ2	SYP121
pSCR	内皮	mCherry	SYP121
pWOL, pXylem	中心柱	mVenus	SYP121
pSULTR2;2	葉の維管束鞘	mOrange	SYP121
pRBCS1A	葉肉細胞	mT-Sapphire	AtVAM3

pRBCS1A については液胞膜移行因子である AtVAM3 と MerC との融合タンパク質として発現させた。さらに、蛍光観察によって細胞型特異的発現を観察するために、各コンストラクトによって異なる蛍光タンパクをタグとして用いて発現させた。ハイグロマイシン選抜の結果、各バイナリーベクターの組換え系統について T3 世代において、pEpi を 5 系統、pSCR を 4 系統、pWOL を 7 系統、pXylem を 9 系統、pSULTR2;2 を 5 系統、pRBCS1A を 2 系統、それぞれ T-DNA をホモに保持すると考えられる独立の形質転換系統として確立した。

各系統は、基本的には野生型様の正常な生育を示したが、pRBCS1A については、T3 世代に至る過程において、多くの系統が矮性を示し、栄養成長の段階で枯死したため種子を得ることができなかった。これは AtVAM3 との融合タンパクとして MerC を葉肉細胞で恒常的に発現させたことによる副次的な表現型であったと考えられる。今後、MerC を葉肉細胞で液胞膜へ恒常的に発現させる方法として、他の液胞膜移行因子の利用や MerC の N 末端側での膜移行因子との融合などについて検討する必要があることが示唆された。

pEpi、pSCR、pWOL 系統については、T3 系統の確立が先行したため、導入遺伝子の転写産物の解析をまず行った。以前の研究で確立していた CaMV 35S RNA プロモーター制御下で MerC-SYP121 を過剰発現させる系統（以下 CS）と導入遺伝子の転写レベルを比較すると、本研究で確立した系統における *merC* の発現レベルは、CS より低かった。これは、各系統で用いたプロモーター活性が特定の細胞型に限定されていたことを反映していると考えられた。pEpi、pSCR、pWOL 各組換え植物について、発現レベルの系統間差を調べたところ、ある程度のばらつきはあるものの系統間で発現レベルに大きな差は認められなかった。

続いて、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光タンパク-MerC-膜移行因子の融合タンパクの植物体内における発現を解析した。pEpi では根の表皮細胞および根端の側部根冠、pSCR では根の内皮細胞、pSULTR2;2 では葉

の維管束鞘、pRBCS1A では葉の葉肉細胞において蛍光タンパクのシグナルを検出した。pEpi 系統については、FM4-64 で細胞膜を染色し、mTRQ2-MerC-SYP121 の細胞内局在を解析した。その結果、mTRQ2 のシグナルは細胞内全体で検出されたものの、FM4-64 とも共局在したことから、発現させた MerC 融合タンパクは細胞膜にも局在していることが示唆された。

さらに、確立した植物系統の有害金属蓄積性や耐性を評価する系として、固形培地での栽培よりも長期間な栽培が可能であり、かつ有害金属の使用量や拡散を抑える水耕栽培系を確立した。この方法により、pEpi、pSCR 系統について、亜ヒ酸、カドミウムで処理し、金属の蓄積性と耐性の評価を行った。無機水銀については、従来の固形培地を用いる方法により評価を行った。野生型株である Col-0 と MerC-SYP121 過剰発現株である CS と比較した。カドミウムに関しては、Col-0 と比較して CS 系統において根への高蓄積が認められたが、pEpi、pSCR は野生型と同程度の傾向であった。一方、亜ヒ酸処理された植物体では、pSCR 系統において他の系統よりも地上部へのヒ素移行率が高い傾向が認められた。同時に、この pSCR 系統は亜ヒ酸処理下で他の系統よりも地上部・根部ともに重量が大きく、亜ヒ酸に対する耐性が向上している可能性が示された。無機水銀に関しては、pEpi 系統が CS 系統と同様に、地上部への水銀蓄積が高い傾向が認められた。以上の結果から、MerC-SYP121 の発現部位の違いによって、有害金属の蓄積や耐性に対する影響が異なることが示唆された。

また、本研究助成で導入した誘導結合プラズマ発光分光分析によって、MerC 発現シロイヌナズナにおける多元素分析を実施した。その結果、MerC 発現系統は、これまで報告のない亜鉛や銅、鉄に関して野生型株と比べて異なる蓄積パターンが示唆された。

以上の結果より、MerC を発現させた植物体では、これまでに報告のある水銀化合物やカドミウムのみならず、ヒ素や遷移金属に関しても蓄積を変化させる効果があることが示唆された。また、発現させる細胞型や組織による効果の違いについても今後検討していく必要があると考えられる。

本研究で得られた知見は、有害金属の複合汚染に対してファイトレメディエーションを実施していく上で新たなアプローチ・アイデアを提供するものであり、土壤、水質保全技術分野の発展に大きく貢献できると考えられる。

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 2 件)

Yuka Sone、Shimpei Uraguchi、Yasukazu

Takanezawa、Ryosuke Nakamura、Hidemitsu Pan-Hou、Masako Kiyono. Cysteine and histidine residues are involved in *Escherichia coli* Tn21 MerE methylmercury transport. *FEBS open bio* 査読有、Vol.7 (2017) 1994-1999. doi: 10.1002/2211-5463.12341.

Yuka Sone、Shimpei Uraguchi、Yasukazu Takanezawa、Ryosuke Nakamura、Hidemitsu Pan-Hou、Masako Kiyono. A Novel Role of MerC in Methylmercury Transport and Phytoremediation of Methylmercury Contamination. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 査読有、vol.40 (2017) 1125-1128. doi: 10.1248/bpb.b17-00213.

〔学会発表〕(計6件)

清野正子、曾根有香、中村亮介、高根沢康一、浦口晋平、表皮細胞特異的プロモーター制御下で水銀輸送体 MerC を発現する植物の作出、日本薬学会第 138 年会、2018 年

曾根有香、金子莉子、浦口晋平、中村亮介、高根沢康一、清野正子、水銀トランスポーター MerC の金属選択性に関する研究、日本薬学会第 138 年会、2018 年

Masako Kiyono、Yuka Sone、Ryosuke Nakamura、Yasukazu Takanezawa、Shimpei Uraguchi. Molecular breeding of *Arabidopsis* plants with cell-type specific promoters and a bacterial mercury transporter. 14th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements. 2017 年

Yuka Sone、Shimpei Uraguchi、Ryosuke Nakamura、Yasukazu Takanezawa、Masako Kiyono. Role of Mer in the transport of toxic metals in *Escherichia coli*. FEMS 2017 7th Congress of European Microbiologists. 2017 年

清野正子、曾根有香、中村亮介、高根沢康一、浦口晋平、植物の細胞型特異的プロモーターと微生物由来の金属輸送体 MerC を用いたシロイヌナズナの分子育種、日本薬学会第 137 年会、2017 年

曾根有香、浦口晋平、中村亮介、高根沢康一、清野正子、水銀トランスポーター MerC、MerE、MerF、MerT のヒ素およびクロム輸送に関する研究、日本薬学会第 137 年会、2017 年

曾根有香、浦口晋平、中村亮介、高根沢康一、清野正子、水銀トランスポーター

MerC を利用したメチル水銀高蓄積性植物の作出、日本薬学会第 136 年会、2016 年

Masako Kiyono、Yuka Sone、Ryosuke Nakamura、Yasukazu Takanezawa、Shimpei Uraguchi. Expression of the bacterial heavy metal transporter MerC fused with a plant SNARE in *Arabidopsis thaliana* increases mercury accumulation. *Pacificchem* 2015. 2015 年

Yuka Sone、Ryosuke Nakamura、Yasukazu Takanezawa、Shimpei Uraguchi、Masako Kiyono. Role of Mer in the transport of mercurials in *Escherichia coli*. *Pacificchem* 2015. 2015 年

Masako Kiyono、Yuka Sone、Ryosuke Nakamura、Yasukazu Takanezawa、Shimpei Uraguchi. Bacterial heavy metal transporter MerC increases mercury accumulation in *Arabidopsis thaliana*. 13th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements. 2015 年

Yuka Sone、Ryosuke Nakamura、Yasukazu Takanezawa、Shimpei Uraguchi、Masako Kiyono. Role of MerC、MerE、MerF、or MerT in the transport of mercurials in *Escherichia coli*. 13th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements. 2015 年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/kouei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清野 正子 (KIYONO, Masako)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：30239842

(2) 連携研究者

高根沢 康一 (TAKANEZAWA, Yasukazu)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：90345257

浦口 晋平 (URAGUCHI, Shimpei)

北里大学・薬学部・講師
研究者番号：20638837

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

中村 亮介 (NAKAMURA、 Ryosuke)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号：50383659