

平成21年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19710061

研究課題名 (和文) モエジマシダの重金属土壌浄化システムの分子生物学的解析

研究課題名 (英文) Molecular biological analyses of soil remediation system of *Pteris vitatta*

研究代表者

畑山 正美 (HATAYAMA MASAYOSHI)

東北大学・大学院環境科学研究科・助教

研究者番号：30447148

研究成果の概要：

ヒ酸 (As (V)) の輸送に関与すると考えられるリン酸輸送体遺伝子 (*PHT1*) の単離を試みた。ホモロジークローニングにより取得した *PHT1* ホモログ (*Pvpht1;1*, *Pvpht1;2*) のうち、*Pvpht1;2* はヒ素に抑制される事なく、構成的に発現していることが明らかとなった。また、その発現は羽片にほぼ特異的であった。酵母異種発現系を用いた機能解析の結果、*Pvpht1;1* のヒ酸輸送活性が確認された。また、シダは多くをヒ酸として取り込み、生体内で亜ヒ酸に還元後、亜ヒ酸の一部を排出することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	0	2,600,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術、環境材料

キーワード：環境修復技術、植物分子生物学、ヒ素

1. 研究開始当初の背景

近年、地下水や土壌の汚染が世界的に深刻になっている。それに伴い土壌汚染対策法 (2006年) が制定され、土地所有者の調査と報告・汚染の除去・費用負担が義務化された。既存の物理化学的手法による土壌浄化法ではコストが高いため、低濃度で長期間の浄化が可能な場合は土壌に植えておくだけでよく格段にコ

ストが低い植物を活用した浄化法 (ファイトレメディエーション) が注目を集めている。また、ファイトレメディエーションは浄化の方法として社会的に容認されやすい利点も持つ。

2001年に土壌汚染件数が1、2に多いヒ素を高蓄積するモエジマシダが発見され、この植物を用いたファイトレメディエーションの実用化研究が盛んに行われるようになった。しかしながら、モ

エジマシダのヒ素耐性・高蓄積能の原因となる遺伝子を取得し、分子生物学的にメカニズムを解明したグループはいない。

2. 研究の目的

分子生物学的側面からモエジマシダのヒ素に対する耐性・解毒メカニズムを直接的に解明することを目的とする。分子生物学的な知見は 2005 年になってから得られ始め、モエジマシダの根において亜ヒ酸を還元する酵素遺伝子が単離され(D. R. Ellis et al., Plant Physiology, 2006, 141, 1544-) ヒ素が 5 価から 3 価に還元されることが明らかとなった。これらの知見は、同じ真核生物である酵母細胞において明らかにされているヒ素の解毒機構と一部同じものである。酵母細胞では、3 価の亜ヒ酸は水、尿素、グリセロールを通すアクアグリコポリンによって取り込まれる。一方、5 価のヒ酸はヒ素の同属元素であるリンと同じ化学的性質を示し、リン酸輸送体により細胞内に取り込まれる。細胞内に取り込まれたヒ酸(V)、亜ヒ酸(III)は毒性を示すため、酵母では 5 価のヒ酸はヒ酸還元酵素により 3 価の亜ヒ酸に還元され、細胞膜の輸送体により細胞外に排出されるか、低分子のチオール性化合物が結合したのち液胞膜上の輸送体により液胞内に隔離される事でヒ素を無毒化している。本研究室においても、ヒ素は 3 価より還元された状態で葉に蓄積しており、大部分のヒ素が有機ヒ素化合物として蓄積していると推測される知見が得られている。また、ヒ素の取り込みは水の吸収とともに行われている事が明らかとなった。そこで、本研究では高蓄積植物の原因として「課題 1：ヒ素の取り込み能」と「課題 2：ヒ素の解毒能」に着目して各項目に関する遺伝子の取得と機能の解析を行う。

3. 研究の方法

課題 1：5 価のヒ素の取り込みに関わると考えられるリン酸輸送タンパクは、リン酸欠乏時に高発現する酵母のホモログとしていくつかの植物で報告され、Pht1 ファミリーと呼ばれる輸送体に属している。その取り込み能の確認とヒ素の取り込み時にのみ機能するかどうかなどを調べ高蓄積性の原因を探る。羽片や根よりリン酸輸送体ファミリー

pht1;1 に相同な遺伝子を単離し、転写解析と(ヒ素の取り込み能)機能解析を行う。

課題 2：モエジマシダにおいてもヒ素が低分子のチオール化合物に抱合され、有機ヒ素化合物として存在することが報告されている。すなわち、ヒ素の無毒化には①重金属の捕側、結合因子(チオール化合物)の生合成経路、②重金属の取り込みや隔離を行う膜輸送系が関わっていると考えられる。まず、前者の経路に関連するメカニズムを解明する。チオール化合物には種々のものが存在するため、チオール化合物合成の共通経路であるγ-グルタミルシステイン合成酵素(γ-ECS)を取得し、取得した遺伝子の発現解析よりヒ素の無毒化にチオール化合物の生合成が関わっているか検討する。

4. 研究成果

19年度は、モエジマシダのヒ素高蓄積性の原因解明に向けて、ヒ酸(As(V))の輸送に関与すると考えられるリン酸輸送体遺伝子(PHT1)の単離を試みた。ホモロジークローニングにより取得したPHT1オルソログ(*Pvpht1;1*, *Pvpht1;2*)のうち(図1)、

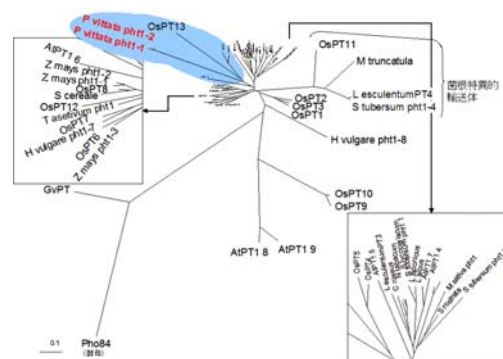


図1 pht1系統樹

*PvPht1;1*はヒ酸(V)添加によりその発現が抑制される一方で、*Pvpht1;2*は構成的に発現していることが明らかとなった(図2)。また、その発現は羽片にほぼ特異的であった。

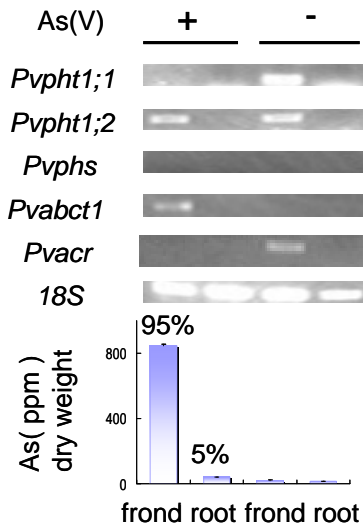


図 2

酵母異種発現系を用いた機能解析の結果、Pvpht1;1のヒ酸輸送活性が確認された。また20年度に行ったEXAFS解析の結果、ヒ素は大部分の亜ヒ酸と少量のヒ酸で存在している可能性が示された。そのため、本植物におけるγ-グルタミルシステイン合成酵素のヒ素耐性への役割は低いものと考え遺伝子の取得は行わず、ヒ素の吸収を担う根におけるヒ素の挙動と化学形態の詳細な分析を行うこととした。亜ヒ酸の取り込みを嫌気条件下、または好気条件下において亜ヒ酸の取り込みを検討した結果、嫌気条件下では、亜ヒ酸の取り込みはほとんど行われていなかった、一方で好

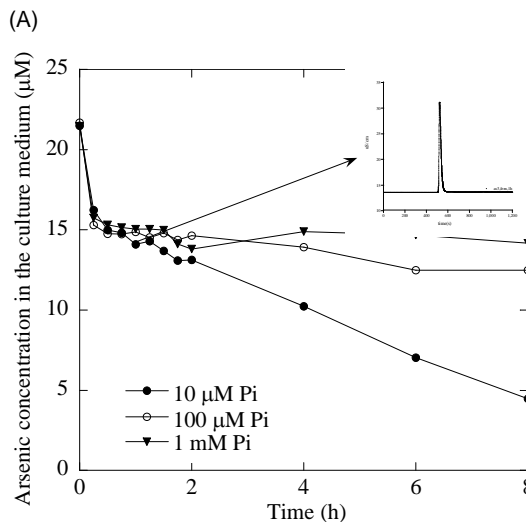


図 3

気条件下では、亜ヒ酸の一部が酸化され、ヒ酸として取り込まれている事が示された(図3)。次に、根におけるヒ素の排出量を検討し

た結果、本シダは主にヒ酸の形態で取り込み、その一部を亜ヒ酸の形態で排出していることが明らかとなった(図4)。

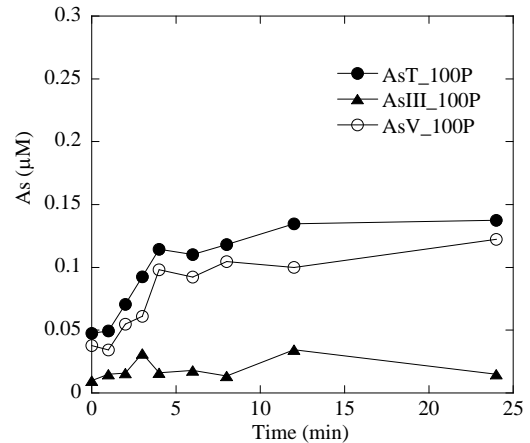


図 4

また、取り込みに対するこの排出量は通常の植物に比べて少なくヒ素高蓄積の要因の一つである可能性が考えられた。シダは多くをヒ酸として取り込み、生体内で亜ヒ酸に還元後、亜ヒ酸の一部を排出することが明らかとなった。

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)

[学会発表] (計5件)

- ① 畑山 正美 モエジマシダによるヒ素の取り込みと生体内の化学形態の解析, 第60回日本生物工学会 仙台 2008年8月27日
- ② M. Hatayama Characterization of a putative phosphate transporter involved in arsenate transport from Hyper-accumulating plant (*Pteris vittata*) leaves., Joint Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists and the Sociedad Mexicana De Bioquimica Rama: Bioquimica y Biologia Molecular de Plantas, Merida, Mexico, June 26-July 1, 2008.
- ③ 畑山 正美 リン酸濃度の違いによるモエジマシダのヒ素吸収, 第14回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 埼玉 2008年6月25日
- ④ 畑山 正美 モエジマシダ由来リン酸輸送体遺伝子のクローニングと機能解析 2007年9月26日 第59回日本生物工学

会（広島）

- ⑤ 畑山 正美 モエジマシダ由来リン酸
輸送体遺伝子のクローニングと発現解析
2007年6月4日 第4回東北大学バイオ
サイエンスシンポジウム（仙台市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑山 正美 (HATAYAMA MASAYOSHI)
東北大学・大学院環境科学研究科・助教
研究者番号：30447148

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：