

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：35409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651087

研究課題名(和文)植物のフィトレメディエーション機構解明と実用化に向けた取り組み

研究課題名(英文)Studies of molecular mechanism in phytoremediation of plants

研究代表者

太田 雅也(OHTA, Masaya)

福山大学・生命工学部・教授

研究者番号：00203802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ダイオキシン類などの残留性有機汚染物質の高蓄積植物(セイタカアワダチソウ、ヨウシュヤマゴボウ)について、PCB同族体の吸収および移行に関わる分子メカニズムを調べるため、これら植物から抽出した糖脂質の組換え型シロイヌナズナを用いたバイオアッセイ系への添加効果について検討した。その結果、セイタカアワダチソウから得られたSGとDGDG、及びヨウシュヤマゴボウから得られたフィトラッカサポニン類の添加により、組換え型シロイヌナズナのPCB同族体取込み量の顕著な増加が認められた。このことから、これら糖脂質が、PCB同族体の植物体への取り込み吸収、及び植物体中での移行に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the molecular mechanisms of uptake and high accumulation to PCB residues by *Solidago canadensis* and *Phytolacca americana* L., it was attempted to use glycolipids obtained from these plants for assays of PCB congeners in the transgenic *Arabidopsis* plants carrying a recombinant guinea pig AhR-mediated GUS reporter gene expression system. The glycolipids SG from the roots and DGDG from the leaves of *S. canadensis*, and triterpenoidal glycosides (phytolaccasapnins) from the leaves of *P. americana* L. increased PCB126-induced GUS activity. In contrast, SG from soy beans and DGDG from wheat did not affect PCB126-induced GUS activity. These results suggested glycolipids SG of *S. canadensis* appeared to increase the uptake of PCB126, and glycolipids DGDG appeared to transport PCB126 into aerial parts. Moreover the present study suggested that possible to increase the sensitivity of the monitoring by adding these glycolipids.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：環境修復技術 フィトレメディエーション

1. 研究開始当初の背景

生活・産業活動に伴って環境に放出された環境化学物質、残留性有機汚染物質 (POPs) や有害金属 (Hg、Cd、As など) による大気、土壌、水質の環境汚染は、農作物、畜産物、水産物の食物汚染へと拡大し、それらの食物の飲食によりヒトの体内に残留物が蓄積する。特に POPs 類は脂溶性で残留性が高く、水系の底質に溜まり食物連鎖を介して生物濃縮され、最上位の生物種に高濃度に蓄積する。さらに、その残留は大気や海洋を介して長距離を移動することによって地球全体に汚染が拡大する。従って、POPs 類の監視、汚染の浄化、発生量の削減などに係わる技術開発は、国際的な取り組みが必要となっている。しかしながら、現在のところ、POPs 類の有効な浄化方法はほとんどない。そのようななかで植物を利用した汚染土壌を浄化対象とするフィトレメディエーションの有効性が示されつつあるが、除去効果や実用化に向けては様々な問題が残されている。その原因として、これら環境汚染物質が土壌粒子に吸着して取り込まれにくいこと、汚染物質が存在する土壌表面と植物の根部の接触がほとんど無いことが挙げられているが、この問題の根本として、POPs 類や重金属の植物吸収や移行に関与している科学的な根拠が乏しいのが大きな要因となっていると思われる。

大川らは、組換え型アリルハイドロカーボン受容体 (AhR) を介した β -グルクロニダーゼ (GUS) レポーターの遺伝子誘導発現系を導入した遺伝子組換え植物を作出し、それを用いて環境と食料のダイオキシン様作用物質のリスク評価と管理を行う迅速・簡便なバイオケミカルアッセイの基盤技術確立している (*Plant Biotechnol. J.*, **7**, 119-128, 2009)。しかし、これら POPs 類は、植物の根系から受動拡散によって土壌中から取り込まれるが、難分解性でしかも脂溶性が高い

ために土壌中では土壌粒子や有機物に吸着し、極めて取り込まれ難い化合物が多く存在する。そこで、我々はダイオキシン様作用物質のバイオアベイラビリティに関して、バイオサーファクタントやキャリアー蛋白質などの利用を試み、PCB126 のアッセイに酵母が産生するバイオサーファクタントである MEL-B (マンノシルエリスリトールリピッド) や牛血清のアルブミン (BSA) を培地に添加したところ、MEL-B と BSA の添加で組換え植物の GUS 活性が高くなることを見出している (*J. Environ. Sci. Health*, **45**, 750-756, 2010)。さらに Ficko らをはじめ様々な研究機関から、種々の雑草 (weed) が汚染土壌からのダイオキシン類の抽出能を有していることが報告されている (*Ficko et al., Science of the Total Environment*, 2010)。このことは、これらダイオキシン類の抽出能を有している植物はある種のサーファクタント様の物質を分泌しているか、あるいはそれら植物に共生する根粒菌がバイオサーファクタントを生産し、それらがダイオキシン類の吸収に関与していることが示唆される。実際、我々はウリ科植物であるキュウリの茎葉部に酵母の産生する糖脂質バイオサーファクタントと類似の性質をもつ糖脂質が存在することを見出している。

2. 研究の目的

本研究ではバイオサーファクタントを用いた環境化学物質のバイオアッセイおよび浄化技術確立させることを目的とし、ウリ科植物やダイオキシン類の抽出能を有している雑草 (セイタカアワダチソウ等) に存在するバイオサーファクタント能を持つ脂質成分などを同定し、それらの POPs 類の可溶化能について検討する。次いで種々の雑草中の類似成分の存在を定量的に調べ、POPs 類吸収効果との相関を調べる。これらの新たな知見により、環境化学物質のより有効なバイオアッセイおよび浄化手法の確立につながる

ると共に、植物のフィトレメディエーション機構について的一端を明らかにすることができるものと考えられる。

また、帰化植物のヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca Americana*) 茎葉部の懸濁液は、鋼板表面の汚れの除去に対して著しい効果があることから、福山のある企業では作業用機器の洗浄剤として使用されている。この懸濁液の成分中には、多量の DGDG が存在し、さらにより極性の高い成分にも DGDG と同程度の POPs 類の可溶化能を示す結果も得ている。この物質は、直接吸収する根部でも見出されており、直接の取り込み時には、この物質の関与が示唆される。

従って、植物の POPs 類の取り込み、そして根から茎葉部への移行にこれらのサーファクタント様の物質の関与が証明されれば、より効率的なフィトレメディエーションの確立への道標になるものと確信する。さらに、POPs 類に対して効果的なバイオサーファクタントを見出すことができれば、POPs 類や重金属類の環境化学物質のより効果的なバイオアッセイおよび浄化システムに利用できるものと思われる。

3. 研究の方法

植物体(キュウリ、セイタカアワダチソウ、ヨウシュヤマゴボウの茎葉)にメタノール(あるいはエタノール)を加えて界面活性様物質を抽出した。抽出物は、Folch分配で脂溶性成分と水溶性成分に分離し、脂溶性成分はさらにイアトロピーズカラムクロマトグラフィーにかけ、単純脂質、糖脂質およびリン脂質画分に分画した。糖脂質画分は、さらにイアトロピーズカラムクロマトグラフィーと調製用TLCを用いて、移動度の異なる画分に分画した。

分画した各画分は、PCB同族体を添加したムラシゲ・スクーグ培地に組換え型gAhR/GUSレポーター遺伝子系導入シロイヌナズナ(XgD2V11-6系統)を播種して2週

間培養した後、シロイヌナズナ植物体のGUS活性を測定した。

また、分画した各画分の糖組成、および脂肪酸組成は、加水分解物を誘導体化(TMS化メチルグリコシド、脂肪酸メチルエステル)した後、ガスクロマトグラフィー/質量分析計を用いて解析した。

4. 研究成果

PCB 同族体の高蓄積植物であることが知られているウリ科植物やセイタカアワダチソウから PCB 同族体の植物体への取り込み・移行に関与する物質の探索を行ったところ、これら植物から得られた糖脂質画分の添加により、組換え体シロイヌナズナ(XgD2V11-6)の PCB 取込み量に依存した GUS 活性の上昇が認められた。さらに糖脂質画分中の PCB 同族体の取り込み吸収に関与している物質を同定するため、糖脂質成分を極性の差に基づきステリルグルコシド(SG、ステロール組成: スチグマステロール)、モノガラクトシルジグリセリド(MGDG、脂肪酸組成: 18:3 - 18:3)、セラミドモノグルコシド(CMG、セラミド組成:t18:1-C24h:0)、ジガラクトシルジグリセリド(DGDG、脂肪酸組成: 18:3 - 18:3)を分離した。このうち、十分な量が得られた SG、MGDG、及び DGDG についてフェナントレン(Log Pow 4.5)の可溶化試験、及び組換え体シロイヌナズナを用いた PCB126 のファイトモニタリングへの添加効果について検討した。その結果、3成分ともフェナントレンの可溶化能に加えて、組換え植物体の PCB126 誘導 GUS 活性の上昇が認められた。特に、SG と DGDG の添加は、無添加の場合と比べて 3~5 倍の組換え体植物の PCB126 誘導 GUS 活性の上昇が認められた。これに対して、大豆由来の SG(ステロール組成: β -シトステロール)や小麦由来の DGDG(脂肪酸組成: 16:0 - 18:2)の添加による顕著な GUS 活性の上昇は、認められなかった。これらのことから、

セイタカアワダチソウの糖脂質成分は、組換え体シロイヌナズナの PCB 取り込み吸収に有効な効果があることが示された。さらに同じ糖脂質においても、その脂溶性性質に関わる脂肪酸やステロール組成の違いが PCB の吸収に大きな影響を与えていることが示唆された。そして、この植物体中における脂肪酸やステロール組成の違いが、植物体自身の PCB 同族体の取り込み吸収に大きく影響し、その植物が PCB 同族体の高蓄積植物であるかどうかの重要な要因になっていることが示唆された。

また、組換え体シロイヌナズナ (XgD2V11-6) の PCB126 と有害金属 (Fe、Cu、Zn、Cd、および Pb) との複合的な影響評価を検討したところ、Fe、Cu および Zn の添加による GUS 活性の上昇は認められなかった。これに対して、Cd と Pb の添加では、相加的な GUS 誘導活性の上昇が認められ、その相加的作用は、Cd と Pb の添加濃度に依存的事であったことから、本組換え体シロイヌナズナは重金属を含む環境共汚染物質の複合的な毒性影響を評価出来る可能性が示唆された。また、重金属類の評価には、サーファクタントやキャリアタンパク質の影響はほとんど認められなかった。このことは、これらサーファクタント類は、植物体の Co-PCB 同族体の取り込みや移行に重要な役割を担っているものと考えられた。

一方、ヨウシュヤマゴボウの葉から抽出した糖脂質成分もフェナントレン可溶化能に加えて、組換え体シロイヌナズナの PCB126 誘導 GUS 活性の上昇が認められた。ヨウシュヤマゴボウ中の糖脂質は、一般の植物中に存在しているモノ、ジガラクトシルジグリセリド (MGDG や DGDG) に加えて、薄層 (TLC) 上で移動度の異なる十数種類のトリテルペノイダール配糖体 (フィトラッカサポニン) が存在し、組換え体シロイヌナズナの PCB126 取込み量に関してこれらのフィトラ

ッカサポニン群の添加は、MGDG や DGDG 添加に比べても 2~3 倍量の GUS 活性の上昇が認められた。これらフィトラッカサポニン群のうち、主要な 9 成分は、いずれもトリテルペノイダール骨格の C3 位の水酸基グルコース、ガラクトース、キシロース、ラムノースからなる 1~3 残基のオリゴ糖がグリコシド結合し、C28 位のカルボキシル基にグルコースあるいはキシロース 1 残基がエステル結合している構造であった。これら糖鎖構造とサーファクタント能および組換え体シロイヌナズナの PCB 同族体の取込みに関する添加効果については現在検討中であるが、これらフィトラッカサポニンのトリテルペノイド骨格に結合している糖鎖の種類および水酸基の有無が、サーファクタント能としての効果に何らかの影響を与えていると予想している。

一方、ヨウシュヤマゴボウの葉や茎から抽出した水溶性画分 (メタノールで抽出した後、Folch 分配の上層) について、組換え体シロイヌナズナの PCB126 取込みに関する添加効果を調べたところ、0.05 mg/ml 濃度の添加で組換えシロイヌナズナの GUS 活性は 3 倍量の上昇が認められた。さらに水溶性成分は SDS-ポロアクリルアミドゲル電気泳動で明瞭な 4 種のタンパク質のバンド (分子量 15kD、20kD、28kD、50kD) が認められ、このうち低分子の成分 (分子量 15kD) 含む画分中に顕著な POPs 類の可溶化能が認められた。これらのことから、ヨウシュヤマゴボウ中に存在しているフィトラッカサポニン類と分子量 15kD の低分子のタンパク質は、バイオサーファクタント様の機能を有しており、これらの成分が植物の脂溶性物質の取込みおよび植物体内の移行に関わっている可能性が強く示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Application of lipid extracts from *Solidago canadensis* to phytomonitoring of PCB126 in transgenic *Arabidopsis* plants.

S. Shimazu, M. Ohta, and H. Asida

Science of the Total Environment,

492, 240-245 (2014) 査読有り

DOI:10.1016/j.scitotenv.2014.01.090

Assays of polychlorinated biphenyl congeners and co-contaminated heavy metals in the transgenic *Arabidopsis* plants carrying the recombinant guinea pig aryl hydrocarbon receptor-mediated β -glucuronidase reporter gene expression system.

S. Shimazu, M. Ohta, H. Ohkawa, and

H. Ashida

J. Environ. Sci. Health Part B, **47**, 925-932 (2012) 査読有り

DOI:10.1080/03601234.2012.706549

[学会発表](計6件)

複合糖質の構造と機能について～食品の安全性の考え方と微量分析法

太田 雅也

広島文教食物栄養研究会、2014-11、広

島文教女子大学(広島県・広島市)

セイタカアワダチソウ抽出物を利用した組換え型 AhR/GUS レポーター遺伝子系導入シロイヌナズナによる PCB 同族体のファイトモニタリング

嶋津小百合、太田雅也、芦田 均

日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部2013年度合同広島大会、2013-9、県立広島大学(広島県・広島市)

Application of *Solidago Canadensis* extract to phytomonitoring of polychlorinated biphenyl congeners in the transgenic *Arabidopsis* plants carrying the recombinant guinea pig aryl hydrocarbon receptor-mediated β -glucuronidase reporter gene

expression system.

S. Shimazu, M. Ohta, and H. Asida

The 33rd International Symposium on Halogenated Persistent Organic

Pollutants and POPs, 2013-8, Daegu,

Republic of Korea

セイタカアワダチソウの PCB 同族体の取り込み・移行促進物質の探索

嶋津小百合、内山琢磨、太田雅也、

芦田 均

日本農芸化学会2013年度大会、2013-3、東北大学(宮城県・仙台市)

糸状菌の生産する糖タンパク質の N-結合型糖鎖

太田雅也

平成 24 年度日本応用糖質科学会中国・

四国支部シンポジウム、2012-11、福山

大学(広島県・福山市)

組換え体シロイヌナズナを用いた PCB

同族体と重金属の共汚染のファイトモニ

タリング

嶋津小百合、太田雅也、大川秀郎、

芦田均

日本農芸化学会 2012 年度大会、2012-3、

京都女子大学(京都府・京都市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

太田 雅也(OHTA, Masaya)

福山大学・生命工学部・教授

研究者番号:00203802