

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24510104
 研究課題名(和文)メチル水銀トランスポーターを利用した水銀化合物のファイトレメディエーション

 研究課題名(英文) Bacterial methylmercury transporter MerE increases mercurials accumulation in Arabidopsis thaliana.

 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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メチル水銀を植物に高蓄積させるための新規植物浄化技術を開発することを目的とした。これまでにMerC, MerE, MerF, MerTなど種々の細菌由来のMerトランスポーターが単離、同定されているが、基質特異性については不明な点が多かった。この中でも本研究ではMerEに注目し、MerEを組換えた大腸菌を用いて活性検討したところ、MerEはメチル水銀を輸送するトランスポーターであることが明らかになった。次に、MerEを高発現させた植物を作出し、水銀耐性および蓄積性について検討した結果、メチル水銀耐性および蓄積性が野生株に比べそれぞれ有意に上昇した。

研究成果の概要(英文)：The characteristics of bacteria take up mercury into cells via Mer superfamily which transport mercuric ions into the cytoplasm, have been applied in engineering of bioreactor used for mercurial bioremediation. We demonstrated that MerE is broad-spectrum mercury transporters that mediate both Hg(II), methylmercury and phenylmercury transport into bacterial cells. A transgenic Arabidopsis engineered to express MerE was constructed and the impact of expression of MerE on methylmercury accumulation was evaluated. The transgenic Arabidopsis expressing MerE accumulated significantly more methylmercury and mercuric ions into plants than the wild-type Arabidopsis did. These results demonstrated that expression of the bacterial mercury transporter MerE promoted the transport and accumulation of methylmercury in transgenic Arabidopsis, which may be a useful method for improving plants to facilitate the phytoremediation.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：環境修復技術 ファイトレメディエーション メチル水銀 水銀化合物 トランスポーター MerE MerF MerC

1. 研究開始当初の背景

水銀による環境汚染はブラジル、ロシア、中国など 27 ヶ国以上で確認され、ヒトへの健康影響が懸念される。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、今でも狭い国土に重金属が残留しており、微量汚染を含めると汚染地域は 32 万ヶ所あると推定される。

水銀汚染土壌の従来の浄化方法として、汚染土壌を掘削し、新しく客土をする物理化学的手法が用いられてきたが、多大な費用を要することや運び出した汚染土壌の廃棄処理の問題などの短所がある。このような状況下、環境中に排出された重金属の安全かつ有効な浄化方法の早急な開発が待ち望まれている。近年、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が注目されている。この技術は、比較的 low コストで、低濃度で広範囲な汚染に対して有効であると考えられている。しかしながら、野生種の植物を用いる場合、処理に時間がかかる等の欠点がある。水銀回収・蓄積能を付加させたトランスジェニック植物の創生により、処理時間を短縮することができると考えられる。

筆者はこれまでに平成 21-23 年度科研費基盤研究 C の助成により、次のことを示唆した。植物に重金属高蓄積機能の向上を目指し、細菌由来の種々の Mer トランスポーターの中でも主として MerC に注目し、MerC を植物に組換え、水銀化合物の浄化試験を行った結果、一定の効果が得られることを明らかにした (Kiyono M, *et al.*, *Planta* 235, 841-850, 2012)。この結果から、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、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

細菌由来の Mer トランスポーターは、これまでに MerC, MerE, MerF, MerT などが単離、同定されている。しかしながら、基質特異性については今もなお不明な点が残されている。このうちの MerE の局在、機能は不明であった (Barkay T, *et al.*, *FEMS Microbiol Rev.* 27, 355, 2003)。筆者は MerE の機能解析を行い、無機水銀のみならずメチル水銀を細胞外から細胞内へ輸送する細胞膜局在型トランスポーターであることを初めて明らかにした (Kiyono M, *et al.*, *FEBS Lett.* 583, 1127-1131, 2009)。原核・真核生物を問わず、メチル水銀のトランスポーターはこ

れまで同定されていなかった。本 MerE を新たに利用することは、メチル水銀のファイトレメディエーションの起爆剤になると考えた。そこで、本研究では、MerE に注目し、MerE の水銀輸送に対する機能解析および MerE を利用したファイトレメディエーションに関する研究を行った。

3. 研究の方法

MerE の機能解析: *Pseudomonas* K-62 由来の plasmid pMR26 上の水銀調節遺伝子 (*merR*-o/p) の下流に *Shigella flexneri* 由来の Tn21 上の *merE* を結合させた遺伝子 (*merR*-o/p-*merE*) を pKF19k vector に組換え、plasmid pE4 を構築した。この plasmid を大腸菌 XL1-Blue に形質転換した MerE 組換え株を作製し、*merE* 遺伝子産物の菌体内における局在について検討した。

また、MerE 組換え株のメチル水銀 (CH_3Hg^+) 及び無機水銀 (Hg^{2+}) に対する耐性及び取り込みを検討した。pKF19k vector を大腸菌に形質転換した株をコントロールとして用いた。 CH_3Hg^+ 及び Hg^{2+} 耐性は阻止円法により、 CH_3Hg^+ 取り込みは放射性 $^{14}\text{CH}_3\text{Hg}^+$ を用いて液体シンチレーションカウンターにより、 Hg^{2+} 取り込みは還元気化原子吸光度法により測定した。

目的遺伝子の植物ゲノムへの組換え: 標的融合タンパク質をコードする遺伝子 (MerE, MerE-SYP121) をそれぞれ植物ベクター pMAT137 へ遺伝子組換えた。融合タンパク質をコードする遺伝子を組換えたバイナリーベクターを常法に従ってアグロバクテリウムへ形質導入し、さらにシロイヌナズナへ感染させた。遺伝子組換えシロイヌナズナは抗生物質耐性を利用して選抜し、T₁, T₂, T₃ 種子を採取した。T₃ 種子から育成した植物 (葉) ゲノム中に各融合タンパク質をコードする遺伝子が挿入されていることはゲノム PCR 法及びサザンブロット法により確認した。

融合タンパク質の植物内での発現: 作出した植物 (葉) から totalRNA を調製し、RT-PCR 法により融合遺伝子の mRNA の発現を調べる。融合タンパク質の発現は、各トランスポーターをカイコの発現系大量生産および精製し、これを抗原としてポリクローナル抗体を作製し、作出した植物 (葉) から粗タンパク質抽出液を調製し、Western Blot 法に従って検討した。

トランスジェニック植物の重金属耐性および浄化活性の評価: 作出した植物のメチル水銀、無機水銀等の重金属耐性

を調べた。重金属浄化能は液体培地中に残存する重金属量および植物内に蓄積した重金属量をそれぞれ定量することで評価した。

4. 研究成果

pE4 (*merR-o/p-merE*) を持つ菌(MerE 組換え株)において、 Hg^{2+} 存在下 MerE 産物は粗抽出画分及び膜画分において検出された。MerE 組換え株はコントロール株に比べ、 CH_3Hg^+ 及び Hg^{2+} による阻止円がそれぞれ有意に増大した。また、MerE 組換え株における CH_3Hg^+ 及び Hg^{2+} の取り込み量はコントロール株に比べ、それぞれ有意に増加した。以上の結果から、MerE は Hg^{2+} によって転写・翻訳され、膜タンパク質として CH_3Hg^+ 及び Hg^{2+} を取り込むトランスポーターであることを確認した。

MerE 組換え植物の作出について、 T_1 種子をカナマイシン培地で選抜したところ、11 株の形質転換体を獲得した。作出した株において *merE* 遺伝子の植物ゲノムへの組換えが検出され、*merE* の mRNA が発現した系統を 6 株 (E2, E3, E4, E5, E6, E7) 獲得した。これらの株は野生株と同様の発生・分化・生育を示した。6 株の表現型および mRNA の発現量はそれぞれほぼ同等であった為、以降の検討には E2 株を用いた。

E2 株における MerE の発現を抗 MerE 抗体を用いて Western blotting した結果、MerE は粗抽出画分および膜画分において検出された。

次に、E2 株の CH_3Hg^+ および Hg^{2+} に対する耐性および蓄積性について検討した結果、E2 株は野生株に比べ、 CH_3Hg^+ および Hg^{2+} に対し耐性を示した。さらに、E2 株は野生株に比べて有意に高い CH_3Hg^+ 蓄積量および Hg^{2+} 蓄積量をそれぞれ示した。

以上の結果から、MerE トランスジェニック植物において、 CH_3Hg^+ および Hg^{2+} に対する耐性および総水銀蓄積量が上昇したことから、MerE を利用したファイトレメディエーションは、 CH_3Hg^+ および Hg^{2+} の浄化に効果的である可能性が考えられた。

本研究により得られた知見が、より効率的な水銀化合物浄化のためのファイトレメディエーションの開発に繋がると期待される。将来的には、重金属汚染土壌の浄化に適用され、環境修復に貢献する技術として実用化されることを期待する。

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4件)

Kiyono M., Oka Y, Sone Y, Nakamura R, Sato MH, Sakabe K, Pan-Hou H. Bacterial heavy metal transporter MerC in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Eng J*, 71:19-24, 2013 査読有

Sone Y, Mochizuki Y, Koizawa K, Nakamura R, Pan-Hou H, Itoh T, Kiyono M. Mercurial-resistance determinants in *Pseudomonas* strain K-62 plasmid pMR68. *AMB Express*, 3:41, 2013 査読有

Sone Y, Nakamura R, Pan-Hou H, Itoh T, Kiyono M. Role of MerC, MerE, MerF, MerT, and/or MerP in resistance to mercurials and the transport of mercurials in *Escherichia coli*. *Biol Pharm Bull*, 36:1835-41, 2013 査読有

Sone Y, Nakamura R, Pan-Hou H, Sato MH, Itoh T, Kiyono M. Increase methylmercury accumulation in *Arabidopsis thaliana* expressing bacterial broad-spectrum mercury transporter MerE. *AMB Express*, 3:52, 2013 査読有

[学会発表](計10件)

曾根有香、中村亮介、高根沢康一、清野正子 細菌由来の水銀トランスポーター MerC, MerE, MerF, MerT の機能解析 2015.3.28 日本薬学会第 135 年会(神戸学院大学)

曾根有香、中村亮介、高根沢康一、清野正子 水銀トランスポーターの水銀化合物に対する機能解析 2014.9.19 フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー(つくば国際会議場)

曾根有香、清野正子 水銀耐性菌のメチル水銀トランスポーターに関する研究 2013.12.11 平成 25 年度メチル水銀研究ミーティング(LMJ 東京研修センター)

清野正子、曾根有香 メチル水銀トランスポーターを利用した水銀化合物のファイトレメディエーション 2013.12.11 平成 25 年度メチル水銀研究ミーティング(LMJ 東京研修センター)

清野正子、曾根有香、中村亮介、伊藤智

夫 MerC を利用したメチル水銀のファイトレメディエーション 2013.9.13
フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー（九州大学医学部百年講堂）

曽根有香、中村亮介、芳生秀光、清野正子 水銀トランスポーターMerC, MerE, MerF, MerT の機能解析 2013.3.30 日本薬学会第 133 年会（パシフィコ横浜）

清野正子、曽根有香、中村亮介、芳生秀光 MerC および SNARE を利用した水銀のファイトレメディエーション 2013.3.29 日本薬学会第 133 年会（パシフィコ横浜）

清野正子、曽根有香、中村亮介、芳生秀光 *Pseudomonas* K-62 由来 plasmid pMR68 の水銀耐性遺伝子の機能解析 2012.10.25 フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー（名古屋観光ホテル）

Masako Kiyono, Yuka Sone, Ryosuke Nakamura, Kou Sakabe, Hidemitsu Pan-Hou Bacterial heavy metal transporter MerC increases mercury accumulation in *Arabidopsis thaliana*. 2012.7.20 The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (Sendai International Center, Japan)

清野正子、曽根有香、中村亮介、坂部 貢、芳生秀光 MerC および SNARE を利用した水銀・カドミウムのファイトレメディエーション 2012.7.17 第 39 回日本毒性学会学術集会（仙台国際センター）

〔その他〕
ホームページ等

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

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) 研究協力者

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