

令和 3 年 4 月 24 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03401

研究課題名(和文)レアメタル回収を指向した金属輸送体の重複発現制御による金属複合汚染浄化植物の開発

研究課題名(英文) Generation of transgenic plants for phytoremediation of multiple rare metal polluted environments through expression regulation of bacterial metal transporters.

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、MerCに代表される水銀耐性菌由来の有害金属輸送体をモデル植物シロイヌナズナに発現させ、細胞型特異性と細胞内局在を制御することで、有害金属により汚染された土壌・水環境を修復するファイトレメディエーション技術の効率化を目指すものである。まず、根の表皮細胞あるいは内皮細胞の細胞膜特異的にMerC輸送体を発現するシロイヌナズナの水銀蓄積性を解析した。これらの形質転換系統では地上部への水銀蓄積性が向上しており、その効果は35Sプロモーターを用いたユビキタスなMerC発現系と同程度であった。さらに、Mer輸送体の多重発現カセットを1つのベクターで導入するためのプラスミド系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファイトレメディエーションは、植物を利用する低環境負荷型の環境修復技術であり、複数の有害金属・レアメタルに汚染された環境の修復に有用とされる。本研究は、水銀耐性微生物由来の水銀等有害金属の輸送体を植物に導入し、発現様式を高度に制御することで従来のユビキタスな発現系と同程度に植物の水銀蓄積性を強化することに成功した。植物を用いた有害金属・レアメタル汚染の浄化への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The study aimed to establish the transgenic model plant expressing MerC and other toxic metal transporters isolated from mercury-resistant bacteria and improve the feasibility of phytoremediation for multi-metal polluted environments. First, we analyzed inorganic mercury accumulation of the Arabidopsis plant lines expressing MerC mainly in the plasma membrane of the epidermis or endodermis. Both cell-type-specific expression of MerC improved mercury accumulation ability to the shoots, and the effect was comparable to the 35S-driven ubiquitously expressing plant. We further developed a vector system harboring up to four expression cassettes in a single T-DNA, which can be applied to introduce multiple Mer transporters to the plant by a single transformation.

研究分野：環境科学

キーワード：レアメタル 金属輸送体 金属複合汚染 浄化植物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒ素、水銀、カドミウムなど有害元素やレアメタルによる土壌汚染が世界中で報告されている。これら有害元素が土壌から植物に吸収され、さらに食物連鎖を介して摂取した場合は人の健康リスクとなる。ファイトレメディエーションは、植物を利用する低環境負荷型の環境修復技術で、複数の有害金属・レアメタルに汚染された環境の修復に有用と考えられる。ファイトレメディエーションに関する先行研究では、野生の金属超蓄積性植物(ハイパーアキュムレーター)の利用や、植物の輸送体遺伝子の改変や導入による新規浄化植物の開発が主要なアプローチとなる。しかし、野生の超蓄積植物は特定の金属しか蓄積しない例が多いこと、植物の内在性の輸送体の改変や発現制御は、植物の生育に必須な栄養元素の輸送に副次的な悪影響を与えることがあり、ファイトレメディエーション技術の発展上の問題である。

一方、研究代表者らはこれまでに、微生物由来の Mer 輸送体 (MerC、MerE、MerF、MerT) が無機水銀、カドミウム、メチル水銀、フェニル水銀、ヒ素、クロム等の有害金属種を広く認識して取り込み活性を有する可能性を見出した。また、Mer 輸送体のうち MerC を植物の膜局在因子と融合することで、植物細胞内での膜局在を制御することに成功した。さらに、MerC 過剰発現シロイヌナズナは水銀化合物の蓄積や耐性が向上することを示し、Mer 輸送体を用いたファイトレメディエーションを有害金属浄化の新たな方法として提示してきた。

2. 研究の目的

本研究では、Mer 輸送体を用いた遺伝子組換え植物の作出によるファイトレメディエーションを推進するため、(1)細胞型特異的プロモーターを用いた MerC 融合タンパク質の植物体内での発現制御、および(2)多重発現ベクターシステムを用いて Mer 輸送体の多重発現シロイヌナズナ作出を試みた。すなわち本研究は、Mer 輸送体の植物システムでの重複発現を細胞型特異的プロモーターおよび細胞内局在因子の複合発現制御系の利用により実現し、Mer 輸送体組換え植物を用いたファイトレメディエーションにおいて、有害金属浄化効率の上昇と有害金属種の適応の拡大、さらに、有用資源としてのレアメタル回収方法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナの水銀応答性の解析条件の最適化

まず、シロイヌナズナの無機水銀に対する耐性や水銀蓄積の解析に用いる固形培地の条件の最適化を行った。3種類の寒天試薬に対して2つの独立のロットを用意し、1/10 改変 Hoagland 培地に添加した時の無機水銀に対するシロイヌナズナの野生型 (Col-0)、重金属感受性の異なる3つの変異株 (*cad1-3*、*cad1-6*、*abcc1/abcc2*) の無機水銀感受性を解析した。さらに、水銀の吸収・蓄積に対する寒天試薬の影響を解析した。

(2) 根の細胞型特異的に MerC-SYP121 を発現するシロイヌナズナ系統の解析

先行研究において作出した表皮細胞特異的 mTRQ2-MerC-SYP121 発現系統 (pEpi 系統)、内皮細胞特異的 mCherry-MerC-SYP121 発現系統 (pSCR 系統) を用いて、無機水銀に対する耐性や水銀の蓄積性を解析した。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて MerC-SYP121 の発現を観察した。

(3) 葉肉細胞特異的に MerC-AtVAM3 を発現するシロイヌナズナ系統の解析

先行研究において作出した葉肉細胞特異的 mT-Sapphire-MerC-AtVAM3 発現系統 (pRBCS1A 系統) を用いて、無機水銀および亜ヒ酸に対する耐性や元素の蓄積性を解析した。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて MerC-AtVAM3 の発現を観察した。

(4) 多重発現ベクターの構築

4つのオルガネラマーカー発現カセットを単一の T-DNA に含む多重発現ベクター Colorful circuit (Ghareeb et al., 2016 *Frontiers in Plant Science*) を改変し、翻訳エンハンサー配列および強力なターミネーターの挿入を行った。改変したベクターを用いて、4つの Mer 輸送体 (MerC、MerE、MerF、MerT) と SYP121 の融合タンパク質を過剰発現するベクター、および表皮・内皮および葉肉細胞特異的に MerC を発現させる3つ発現カセットを含むベクターの構築に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの有害金属応答の解析条件の最適化

我々は有害元素に対するシロイヌナズナの応答を鋭敏に解析できる培地として、これまでに1/10 改変 Hoagland 培地といくつかの寒天試薬を用いてきた。しかし、その過程で寒天試薬あるいは同一試薬でもロットによって無機水銀に対する表現型が変動する問題に直面してきた。そ

ここで、いくつかのメーカーの寒天試薬およびロット間差を網羅的に解析し、無機水銀応答の解析を行う際の培地条件の最適化を試みた。寒天試薬中の元素プロファイルを ICP 発光分析によって解析したところ、寒天試薬の種類(メーカー)やロットに依存して元素プロファイルが大きく異なった。これらの寒天試薬を用いて変異株の水銀感受性を解析すると、マグネシウムやカルシウム含有量の高い寒天試薬を用いた場合に、水銀毒性が観察されにくくなることがわかった。さらに、高マグネシウム・カルシウム寒天を用いた培地では、植物体に吸収・蓄積される水銀濃度が低下した。これらの結果から、水銀応答性の解析を行う際はマグネシウムやカルシウム濃度の低い寒天試薬を利用するのが適切であることが示された。本成果の一部は *Frontiers in Plant Science* 誌に発表した。

(2) 根の細胞型特異的に MerC-SYP121 を発現するシロイヌナズナ系統の解析

先行研究において作出した表皮細胞特異的 mTRQ2-MerC-SYP121 発現系統 (pEpi 系統)、内皮細胞特異的 mCherry-MerC-SYP121 発現系統 (pSCR 系統) を、低濃度の無機水銀あるいは比較的高濃度の無機水銀で処理して、水銀の蓄積量を CV-AAS によって定量した。野生型と比べて pEpi、pSCR 系統においては、MerC-SYP121 過剰発現系統と同程度に水銀蓄積性が向上していた。共焦点レーザー顕微鏡によって導入遺伝子産物の発現部位を観察したところ、mTRQ2-MerC-SYP121 は側部根冠と表皮細胞、mCherry-MerC-SYP121 は内皮細胞に特異的に発現していた。これらの結果から、表皮・内皮という根の物質吸収に重要な細胞型に限定した MerC-SYP121 の発現は、水銀蓄積性の増強に関してユビキタスな過剰発現系と同じ程度の効果をもたらすことが示された。本成果は *Scientific Reports* 誌および *Planta* 誌にそれぞれ発表した。

(3) 葉肉細胞特異的に MerC-AtVAM3 を発現するシロイヌナズナ系統の解析

pRBCS1A 形質転換系統は、T1 世代において矮性・低稔性を示す系統が多く、結果として T3 世代において 2 つの独立のホモ系統のみ確立できた。まず、導入遺伝子産物である mT-Sapphire-MerC-AtVAM3 の細胞内局在を解析した。液胞膜マーカーである 35S-TIP-GFP 発現系統と pRBCS1A 系統を交配し、F1 植物の葉より調整したプロトプラストを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、mT-Sapphire と GFP のシグナルは共局在したことから、mT-Sapphire-MerC-AtVAM3 がおもに液胞膜に局在することが示された。続いて、pRBCS1A 系統の無機水銀蓄積と水銀耐性をプレート栽培で解析したところ、pRBCS1A 系統の組織中の水銀濃度は野生型と同程度であったが、水銀ストレス下でも成長量において野生型よりも優れていた。亜ヒ酸処理においても、同様の傾向が示され、ヒ素の蓄積は野生型と同程度でありながら、pRBCS1A 系統は亜ヒ酸耐性を示した。以上の結果より、液胞膜局在の MerC が水銀やヒ素を液胞内に輸送することで、無機水銀や亜ヒ酸に対する耐性が強化された可能性が示された。

(4) 多重発現ベクターの構築

ベクター構築に用いた Colorful circuit (Ghareeb et al., 2016 *Frontiers in Plant Science*) は、エントリーベクターとして作成した発現カセットを最大で 4 つアッセンブルし、1 つのバイナリーベクターの T-DNA 領域内に組み込み、1 つの形質転換工程でシロイヌナズナに多重発現系を導入できる。本実験では、微生物由来の Mer 輸送体遺伝子と細胞内局在因子 SYP121 あるいは AtVAM3、さらに蛍光観察用の蛍光タンパク質の 3 つの融合遺伝子を 1 つの発現カセットとして導入する。そこで、4 つの発現カセットの発現の安定的高発現を達成するため、エントリーベクターの発現カセットの 5'側に翻訳エンハンサー配列、3'側に強力な HSP ターミネーターを挿入した。この改変版多重ベクターに、MerC、MerE、MerF、MerT と 4 つの Mer 輸送体遺伝子を SYP121 との融合遺伝子の形で導入した。作出予定のクローンのうち、GFP-MerC-SYP121、mOrange-MerT-SYP121、mKate2-MerF-SYP121 を含むエントリーベクターは作出できたが、mBFP2-MerE-SYP121 は期間内に作出することができなかった。さらに、改変ベクターの過剰発現プロモーターをそれぞれ pEpi、pSCR、pRBCS1A に置換し、細胞型特異的に MerC-SYP121 を多重発現する系の構築を試みた。pEpi と pRBCS1A のコンストラクトについては作出できたが、pSCR については期間内に作出することができなかった。今後、Mer 輸送体多重発現系統の開発を進めることで、Mer を用いたファイトレメディエーションのさらなる進展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uraguchi S, Ohshiro Y, Otsuka Y, Tsukioka H, Yoneyama N, Sato H, Hirakawa M, Nakamura R, Takanezawa Y, Kiyono M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Selection of Agar Reagents for Medium Solidification Is a Critical Factor for Metal (loid) Sensitivity and Ionic Profiles of <i>Arabidopsis thaliana</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 503(1-17)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ohshiro Y, Uraguchi S, Nakamura R, Takanezawa Y, Kiyono M.	4. 巻 367
2. 論文標題 Cadmium transport activity of four mercury transporters (MerC, MerE, MerF and MerT) and effects of the periplasmic mercury-binding protein MerP on Mer-dependent cadmium uptake.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 fnaa177(1-6)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fnaa177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uraguchi S, Sone Y, Yoshikawa A, Tanabe M, Sato H, Otsuka Y, Nakamura R, Takanezawa Y, Kiyono M.	4. 巻 250
2. 論文標題 SCARECROW promoter-driven expression of a bacterial mercury transporter MerC in root endodermal cells enhances mercury accumulation in <i>Arabidopsis</i> shoots.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 667-674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00425-019-03186-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uraguchi S, Sone Y, Kamezawa M, Tanabe M, Hirakawa M, Nakamura R, Takanezawa Y, Kiyono M	4. 巻 9
2. 論文標題 Ectopic expression of a bacterial mercury transporter MerC in root epidermis for efficient mercury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40671-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浦口晋平, 米山寧々, 川上史穂, 大城有香, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 葉肉細胞特異的なMerC-AtVAM3の発現はシロイヌナズナの亜ヒ酸耐性を増強する
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大城有香, 浦口晋平, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 水銀トランスポーター MerT による水銀輸送におけるシステイン残基の役割
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大城有香, 川口航輝, 浦口晋平, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 水銀トランスポーターMerCの元素選択性の解析
3. 学会等名 フォーラム2019（京都）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦口 晋平、月岡 輝璃、米山 寧々、大城 有香、中村 亮介、高根沢 康一、清野 正子
2. 発表標題 Mer輸送体の多重発現シロイヌナズナの作出を指向したMer輸送体多重発現ベクターの構築
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清野 正子、月岡 輝璃、米山 寧々、大城 有香、中村 亮介、高根沢 康一、浦口 晋平
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるMer輸送体多重発現システムの構築
3. 学会等名 日本薬学会140年会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦口 晋平、曽根 有香、大塚 裕登、中村 亮介、高根沢 康一、清野 正子
2. 発表標題 シロイヌナズナの有害元素応答の解析に適した寒天試薬の検討
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2018年度神奈川大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 曽根有香、金澤早紀、浦口晋平、中村亮介、高根沢康一、清野正子
2. 発表標題 MerC組換え植物を利用した有害元素複合汚染のファイトレメディエーション
3. 学会等名 フォーラム2018（長崎）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子莉子、曽根有香、浦口晋平、中村亮介、高根沢康一、清野正子
2. 発表標題 水銀トランスポーターの亜ヒ酸およびクロム酸輸送活性に関する研究
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2018（仙台）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清野正子、曾根有香、吉川藍乃、田邊美知、佐藤遼、大塚裕登、中村亮介、高根沢康一、浦口晋平
2. 発表標題 根の内皮細胞特異的に水銀輸送体MerCを発現する植物の作出と水銀蓄積性の解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会(千葉)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子莉子、曾根有香、浦口晋平、中村亮介、高根沢康一、清野正子
2. 発表標題 水銀トランスポーターの有害元素及び微量元素輸送に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会(千葉)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関