

平成21年6月4日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19510094
 研究課題名(和文) 水銀、カドミウム等重金属ファイトレメディエーションのためのバイオエンジニアリング
 研究課題名(英文) Engineering expression of mercury transporter MerC and SNARE in *Arabidopsis thaliana* for phytoremediation of mercury.
 研究代表者 清野正子 (KIYONO MASAKO)
 北里大学・薬学部・准教授
 研究者番号：30239842

研究成果の概要：本研究では、毒性が軽減された形の重金属を植物に高蓄積させるための新規バイオエンジニアリングを施すことにより、汚染地域の浄化と重金属のリサイクルを目指した次世代型低負荷環境修復技術を確立することを目的とした。トランスジェニック植物の作出に際しては、(1)細菌由来の重金属トランスポーター(MerC)の植物細胞膜局在化及び重金属輸送能の付与、(2) MerCの植物解毒器官である液胞膜局在化及び重金属液胞隔離(高蓄積)能の付与という二段階構想をもっている。細菌由来の MerCは無機水銀、カドミウムを細胞外から細胞内へ輸送するトランスポーターである。また、シロイヌナズナ由来の SNAREファミリーの SYP121は細胞膜に、AtVAM3は液胞膜に特異的に局在する一回膜貫通型の膜タンパク質である。本研究では、MerCを細胞膜や液胞膜へ効率的に輸送させるために、輸送制御タグとして SYP121 または AtVam3 を融合した *merC-SYP121*、*merC-AtVAM3* 融合遺伝子を作成し、植物ベクターpMAT137に組換え、常法に従いシロイヌナズナに形質転換した。次に作成した遺伝子組換え植物を用いて、ゲノムPCRにより目的遺伝子のゲノムへの組換え、RT-PCRにより目的遺伝子の発現を mRNA レベルでそれぞれ確認した。さらに遺伝子組換え植物体の水銀耐性および蓄積性について検討した結果、*merC-SYP121*、*merC-AtVAM3* 遺伝子組換えシロイヌナズナにおいて、水銀耐性は野生株とそれぞれほぼ同程度であったが、水銀蓄積性は野生株に比べそれぞれ有意に上昇した。以上の結果より、*merC-SYP121*、*merC-AtVAM3* 遺伝子組換え植物体は、水銀耐性を低下することなく水銀高蓄積性を示し、水銀浄化に適していると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,300,000	690,000	2,990,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、ファイトレメディエーション

1. 研究開始当初の背景

水銀による環境汚染はブラジル、コロンビア、ロシア、中国などの27ヶ国、30地域以上で確認され、ヒトへの健康影響が未だに懸念される。わが国は、有機水銀による水俣病、カドミウムによるイタイイタイ病等の重金属汚染による公害を経験した。過去、イモチ病予防のために全国の水田に撒布されたフェニル水銀による土壤汚染が懸念される。現在でも世界のカドミウム消費量の約40%を消費しており、カドミウム汚染米の問題も記憶に新しい。全国の汚染地域は微量汚染を含めると32万ヶ所あると推定される。2003年に土壤対策基本法が施行され、これから社会的ニーズが高まる重金属による土壤・地下水汚染の浄化ビジネスに貢献する為にも、水銀、カドミウム等の重金属の安全かつ有効な除去法の開発は急務の課題である。

筆者は、これまでに生物活性を用いた重金属浄化システムの開発を進めてきた。水銀耐性菌 *Pseudomonas* K-62 のもつ水銀輸送遺伝子 *merT-merP* をクローニングし、その下流に *Klebsiella* 由来のポリリン酸キナーゼ遺伝子 *ppk* を組換えた新規水銀浄化遺伝子を構築した。本遺伝子をもつ組換え微生物は、廃水中の水銀、カドミウムをポリリン酸のキレート体として菌体内に蓄積させることで廃液を浄化することが判明した（研究業績参照 FEMS Microbiol. Lett. 2002; Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003; J Environ. Biotechnol. 2003; ; ファルマシア 2003; 特願 2003-159080 2003; 臨床環境医学 2005; J Health Sci. 2006）。

しかし、本系は廃水の浄化に対しては有用であるが、土壤汚染地域の浄化には利用し難いという技術的な限界があった。そこで筆者は、ファイトレメディエーションの技術を用いて、重金属回収・蓄積能力を付加させたトランスジェニック植物を作出すれば、土壤中の重金属浄化が達成できると考えた。先の *ppk* 遺伝子をタバコへ組換えたトランスジェニック植物を作出した結果、水銀高蓄積植物となり、土壤中の重金属を浄化することが判明した（研究業績参照 Appl Microbiol Biotechnol. 2006; 特願 2003-282367 2003; Biol. Pharm. Bull. 2006）。

2. 研究の目的

本研究では、毒性が軽減された形の重金属を植物に高蓄積させるための新規バイオエンジニアリングを施すことにより、汚染地域の浄化と重金属のリサイクルを目指した次世代型低負荷環境修復技術を確立することを目的とする。トランスジェニック植物の作出に際しては、(1)細菌由来の重金属トランスポーター (MerC) の植物細胞膜局在化及び重金属輸送能の付与、(2) 細菌由来の重金属トランスポーター (MerC) の植物解毒器官である液胞膜局在化及び重金属液胞隔離 (高蓄積) 能の付与という二段階構想をもっている。

これまでに筆者は平成17年度～18年度科研費若手研究Bの助成により、トランスジェニック植物作出の前段階として、細菌由来の重金属トランスポーターを植物培養細胞に導入し、その局在発現を調べた。水銀及びカドミウムのトランスポーターの MerC が植物ヘソータイングされるターゲット器官を GFP-MerC 融合タンパク質を用いて検証したところ、一部分は細胞膜に局在するものの大部分はゴルジ体に局在した。細菌内での MerC の発現部位は細胞膜であるので、細菌と植物では目的タンパク質の局在が異なることが明らかになった。重金属高蓄積機能を付与するためには MerC を細胞膜または液胞膜へ特異的に局在化させることが必須であり、そのためにさらなるエンジニアリングが必要であることが明らかになった。

植物や酵母における膜タンパク質の細胞内標的小器官への輸送・装填機構については不明な点が多く、未だに膜タンパク質の細胞膜及び液胞膜移行性シグナル因子は同定されていない。しかし近年の研究によりその詳細が徐々に明らかにされつつある。その一例としてシンタキシンファミリーの一つである SYP121 分子が植物細胞膜に、AtVAM3 分子が植物液胞膜に、Sso1p 分子が酵母細胞膜に、Vam3p 分子が酵母液胞膜にそれぞれ特異的に局在することが見出された (Uemura T, *et al.*, Cell Struct Funct. 29, 49-65, 2004)。筆者はこれらの分子を細胞内膜輸送マーカーとして用いることで、細菌由来のトランスポーター (MerC) を細胞膜及び液

胞膜へ標的化できるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

本研究では、細菌由来の重金属トランスポーター (MerC) を植物に導入し、これらが細胞膜や液胞膜に局在化することにより、重金属の細胞内輸送活性の上昇及び解毒器官である液胞内への重金属高蓄積・隔離できるトランスジェニック植物の作出を目指した。MerC は無機水銀以外にもフェニル水銀、カドミウムを細胞外から細胞内へ輸送する4回膜貫通型トランスポーターである (Sahlman L *et al.*, J Biol Chem. **272**, 29518-29526, 1997; Sahlman L *et al.*, J, Biochem Biophys Res Commun. **255**, 307-311, 1999)。MerC と細胞膜局在化シンタキシン Sso1p 及び Syp121、液胞膜局在化シンタキシン Vam3 及び AtVam3 とをそれぞれ融合させるエン지니어リングを行った。以下、年度別に方法を述べる。

[平成19年度]

MerC とシンタキシン (Sso1p, Syp121, Vam3, AtVam3) 融合タンパク質が酵母内にソーティングされるターゲット器官を検証すると同時に重金属耐性、重金属蓄積性を評価し、種々の融合タンパク質から浄化に最適な候補タンパク質を選抜した。

重金属トランスポーターとシンタキシン融合タンパク質の酵母細胞内局在: MerC のN末端側に GFP を、C末端側にシンタキシンを融合させるための遺伝子のコンストラクトを設計し、酵母ベクターに組換えた。これらのエン지니어リングした融合タンパク質を酵母内に発現させ、共焦点蛍光顕微鏡により観察し、細胞内局在を決定した。

酵母における融合タンパク質の発現: 各融合タンパク質を酵母に発現させたときの転写状況は RT-PCR 法により調べた。

融合タンパク質高発現酵母における重金属耐性・蓄積性: 細胞膜や液胞膜へ各融合タンパク質が発現した各種融合タンパク質を高発現させた酵母における重金属耐性は濁度法により測定した。重金属蓄積に関して、水銀は還元気化原子吸光度法、カドミウムは放射性カドミウムを用いてそれぞれ測定した。各融合タンパク質から重金属耐性及び重金

属蓄積性の向上に寄与するものを選抜した。

[平成20年度]

平成19年度に選抜した融合タンパク質をコードする組換え遺伝子をシロイヌナズナに導入し、トランスジェニック植物での導入遺伝子の発現を調べた。作出した植物の栽培条件を検討すると同時に水銀耐性・吸収能・浄化活性を評価した。

選抜した融合タンパク質の植物ゲノムへの組換え: 平成19年度に選抜し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た。作出した植物(根または葉)ゲノム中に各トランスポーター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(根または葉)から totalRNA を調製し、RT-PCR 法により融合遺伝子の発現を調べるとともに、融合タンパク質の発現は、各トランスポーターに対するペプチド抗体を作製し、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吸収能の評価: 作出した植物の水銀、カドミウム耐性を調べた。また、植物地上部への水銀蓄積量を測定した。

4. 研究成果

平成19年度は、細菌由来の重金属トランスポーター MerC とシンタキシン (Sso1p, Vam3p) 融合タンパク質が酵母内にソーティングされるターゲット器官を検証すると同時に重金属耐性、重金属蓄積性を評価し、種々の融合タンパク質から浄化に最適な候補タンパク質を選抜した。水銀及びカドミウムのトランスポーター MerC がソーティングされるターゲット器官を GFP-MerC 融合タンパク質を用いて酵母において検証したところ、大部分は小胞体に局在した。細菌内での MerC の発現部位は細胞膜であるので、細菌と酵母では目的タンパク質の局在が異なることが明らかになった。一方、GFP-MerC-Sso1p は細胞膜、GFP-MerC

-Vam3p は液胞膜にそれぞれ局在した。シンタキシンを融合させることで、細胞膜及び液胞膜へトランスポーターを標的化するエンジニアリングが成功したと考えられる。次に機能解析について、MerC-Sso1p を高発現させた酵母においては有意に放射性カドミウムを高蓄積することが明らかとなった。平成19年度の酵母での本プレ実験を経て、平成20年度のトランスジェニック植物作出および機能解析・重金属浄化実験へ移行させた。

平成20年度は、MerC を細胞膜や液胞膜へ効率的に輸送させるために、輸送制御タグとして SYP121 と AtVam3 を融合した *merC-SYP121*、*merC-AtVAM3* 遺伝子をそれぞれ作成し、植物ベクター pMAT137 に組換え、常法に従いシロイヌナズナに形質転換した。また、それぞれの遺伝子に GFP を融合させ、シロイヌナズナ培養細胞内における局在を観察した。その結果、GFP-MerC-SYP121 は細胞膜に、GFP-MerC-AtVAM3 は液胞膜にそれぞれ特異的に局在することが明らかになった。

次に、作成した遺伝子組換え植物を用いて、ゲノム PCR により目的遺伝子のゲノムへの組換え、RT-PCR により目的遺伝子の発現を mRNA レベルでそれぞれ確認した。その結果、*merC-SYP121*、*merC-AtVAM3* 遺伝子組換えシロイヌナズナの作出に成功した。さらに遺伝子組換え植物体の水銀耐性および蓄積性について検討した結果、*merC-SYP121*、*merC-AtVAM3* 遺伝子組換えシロイヌナズナにおいて、水銀耐性は野生株とそれぞれほぼ同程度であったが、水銀蓄積性は野生株に比べそれぞれ有意に上昇した。以上の結果より、*merC-SYP121*、*merC-AtVAM3* 遺伝子組換え植物体は、水銀耐性を低下することなく水銀高蓄積性を示し、それぞれ水銀浄化に適していると考えられた。

以上の結果より、SYP121 は細胞膜に、AtVAM3 は液胞膜にそれぞれ MerC を発現させるための輸送制御マーカーとして有用であることが明らかになった。また、MerC、MerC-SYP121 または MerC-AtVAM3 をそれぞれ植物に発現させることにより、水銀の蓄積性を向上させる効果が得られた。したがって、水銀高蓄積植物の作出に成功したと考えられる。今後は、無機水銀が細胞内小器

官のどこに蓄積しているのか、液胞に封入されているのかどうかの検討を行うとともに、これらの植物による水銀浄化活性についての詳細な検討を行う予定である。

ファイトレメディエーション技術の開発においては、現在さまざまな取り組みがなされているが、本研究の輸送制御マーカーとして SNARE 分子を用い、MerC に融合させたタンパク質をエンジニアリングすることによって、重金属高蓄積植物を作出するという今回の試みは新規のものである。本研究により得られた知見が、より効率的な水銀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考えている。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2件)

①清野正子他6名、細菌の金属トランスポーターを利用したファイトレメディエーションのためのバイオエンジニアリング臨床環境医学、17(2)、108-117、2008、有

②Masako Kiyono *et. al* (4)、The MerE prote in encoded by transposon Tn21 is a broad mercury transporter in *Escherichia coli*、FEBS Letters、583、1127-1131、2009

[学会発表] (計4件)

①清野正子ら他4名、水銀輸送体 MerC 及びシンタキシン SNARE を利用した水銀高蓄積酵母の分子育種、フォーラム 2007：衛生薬学・環境トキシコロジー、2007.11.2、大阪

②曾根有香、清野正子ら他3名、Tn21 由来 MerE のメチル水銀輸送に関する研究、フォーラム 2008：衛生薬学・環境トキシコロジー、2008.10.17、熊本

③岡由美子、清野正子ら他5名、重金属のファイトレメディエーションのためのエンジニアリング、フォーラム 2008：衛生薬学・環境トキシコロジー、2008.10.18、熊本

④清野正子ら他6名、重金属のファイトレメディエーションのためのエンジニアリング、

日本植物生理学会、2009.3.22、名古屋

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：重金属高蓄積性の形質転換体および重金属汚染の浄化法

発明者：清野正子

権利者：学校法人北里研究所

種類：

番号：2008-209309

出願年月日：2008.8.15

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清野正子 (KIYONO MSAKO)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号：30239842

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし