

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20310043

研究課題名（和文） 植物を用いた難分解性フェノール系汚染物質の除去システム

研究課題名（英文） Development of phytoremediation system for removal of persistent phenolic pollutants

研究代表者

平田 收正（HIRATA KAZUMASA）

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：30199062

研究成果の概要（和文）：本研究は下水および工場廃水中のフェノール系環境ホルモンを迅速に無毒化する園芸植物 *Portulaca oleracea* の鍵となる酵素がポリフェノールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼであることを示し、その遺伝子配列を解明した。さらに、これらの代謝酵素をビーズ形状の材料に固定化することにより、植物が生育できない環境でも廃水中の環境ホルモンを代謝させることに成功した。また、サルビア属の植物は低温環境下でも環境ホルモンを代謝可能であることも明らかにした。以上の内容は園芸植物を用いた環境ホルモン除去システム構築に有用な知見となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, it was uncovered the following things. i) The key enzymes which detoxicate phenolic endocrine-disrupting chemicals in *Portulaca oleracea*, that is a promising plant in phytoremediation, are 'polyphenol oxidase' and 'peroxidase'. ii) DNA sequences of these enzymes were decided. iii) These enzymes immobilized onto alginate and glass beads can detoxicate phenolic endocrine-disrupting chemicals under the conditions in which any plant was not able to grow. iv) *Salvia* cultivars showed a high BPA-eliminating ability under low temperature.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

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：環境浄化、内分泌かく乱物質、ペルオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、遺伝子組換え植物

1. 研究開始当初の背景

下水および工場廃水に含まれる難分解性フェノール系汚染物質として、内分泌かく乱物質、いわゆる環境ホルモンがあり、国土交通省による平成16年度全国一級河川の微量化学物質実態調査においても、それらの存在が指摘されていた。内分泌かく乱物質は、一般的な廃水中に含まれる量が微量で環境基

準が未制定であること、既存の除去技術がオゾンによる化学処理や活性炭による物理的吸着処理といった高エネルギー、高コストを要すること等から、積極的な除去は行わない場合が多い。しかしながら、長期間の生物濃縮によって生態系に影響を及ぼす可能性も示唆されており、源位置で簡便に完全除去を行う技術が地球全体の環境保全にとって必

要である。

上記の目的を達成する為の開発すべき除去システムには、省エネルギー、低コストという要件が必須で、植物を利用した環境浄化技術、ファイトレメディエーションが有効であると考えられる。しかし、ファイトレメディエーションは、水処理には水生植物しか利用できない、処理時間が長い、植物利用型の浄化装置がないといった要因から実用化が困難であると考えられている。

研究代表者らのグループでは、一般に栽培されている園芸植物を対象にモデルフェノール系環境ホルモンであるビスフェノール A (BPA) を無毒化代謝する活性を有する植物のスクリーニングを行った結果、ポーチュラカ (*Portulaca oleracea*) が極めて高い活性を有することを発見した。

2. 研究の目的

本研究は、園芸植物を用いた新たな高度水処理、特にフェノール系環境ホルモンの処理システムの開発及び事業化を最終目標とし、以下の項目を目的とした。

1) 植物のフェノール系環境ホルモン浄化機構の解明

ポーチュラカのフェノール系環境ホルモン無毒化代謝機構を解明し、それらの代謝に機能する遺伝子を単離する。

2) 植物機能のバージョンアップ

1) で単離する遺伝子資源 (BPA 代謝鍵酵素遺伝子) を、小胞輸送工学的的手法を利用して植物に導入することによって、難分解性フェノール系化合物代謝能の高い植物を分子育種する。

また、ポーチュラカは寒冷環境に弱い為、低温時でも代謝能が維持できる園芸植物を探索する。

3) 植物利用型高度水処理システムの実証

上記 1)、2) で得られる浄化植物を水処理用水耕栽培システムに組み込み、実際の廃水に含まれるターゲット汚染物質を高効率に除去できることを検証する。さらに、植物体が栽培できない環境でもフェノール系閉居ホルモンを処理可能な新規高度水処理システムのためのシーズとして、ポーチュラカなどから活性の強い環境ホルモン代謝酵素を抽出し、種々の担体への固定化を行う。

3. 研究の方法

1) 植物のフェノール系環境ホルモン浄化機構の解明

①植物粗酵素抽出物処理により生成するフェノール系環境ホルモン代謝産物の解析

ポーチュラカの植物を破碎し、調製した粗酵素抽出液に、BPA を添加し、濃度の減少速度を液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。また、生成した代謝物を液体クロ

マトグラフィー/質量分析 (LC/MS) により解析した。

②フェノール系環境ホルモン代謝酵素遺伝子のクローニング

①の結果から環境ホルモン代謝酵素遺伝子を推定し、既に配列が明らかになっている他生物種の関連遺伝子から保存配列を予測、これを鋳型としてディジェネレート PCR、5' RACE、3' RACE 法を用いて遺伝子のクローニングを行った。

③組換え植物培養細胞を用いた新規代謝遺伝子の機能解析

モデル植物であるタバコ培養細胞 BY-2 に ②で獲得した遺伝子を導入した形質転換細胞を作成し、その BPA 代謝能を評価した。

2) 植物機能のバージョンアップ

①小胞輸送工学的的手法を利用したポーチュラカ PRX 分泌培養細胞の作出

奈良先端科学技術大学院大学、加藤らのグループが開発した植物小胞工学的的手法を用いて、タバコ培養細胞 BY-2 に PoPRX を導入、分泌させ、培地中のフェノール系環境ホルモン代謝能を評価した。

②低温環境下で環境ホルモン代謝活性を維持する園芸植物の探索

様々な園芸植物について、10°C の条件で水耕栽培し BPA 代謝能を評価した。

3) 植物利用型高度水処理システムの実証

①ポーチュラカ根由来酵素の固定化

ポーチュラカ根から抽出した粗酵素抽出液を抱合したアルギン酸ビーズ、および粗酵素を表面に共有結合により吸着させたガラスビーズを作成し、それらの BPA 代謝能を評価した。

4. 研究成果

1) 植物のフェノール系環境ホルモン浄化機構の解明

①植物粗酵素抽出物処理により生成するフェノール系環境ホルモン代謝産物の解析

ポーチュラカを破碎し、調製した粗酵素抽出液に BPA を添加すると、BPA は迅速に代謝される。BPA が完全に代謝される途中の段階での粗酵素液を LC/MS に供し、代謝生成物の解析を行ったところ、BPA は水酸化、それに続くキノン化により代謝されていることが明らかになった (Fig. 1)。これらの結果より、ポーチュラカにおける BPA 代謝酵素はポリフェノールオキシダーゼ (PPO) およびペルオキシダーゼ (PRX) が担うことが推測された。また、キノン化された BPA はその後、粗酵素液から消失すること、粗酵素液に黒色の沈殿物が生成することから、BPA は粗酵素液の中で重合化することが示唆された。

また、17β-エストラジオールの代謝生成

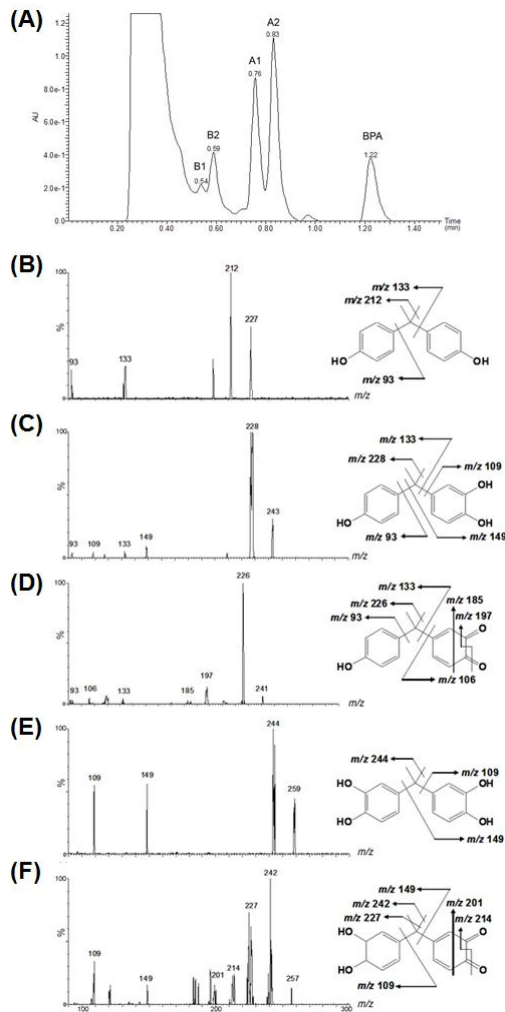


Fig 1. ポーチュラカ粗酵素処理により生成した BPA 代謝産物の LC/MS 解析 (A)は UV クロマトグラム、(B)-(F)は BPA (B)および各種代謝産物の MS/MS スペクトルを示した。代謝産物は(C) product A1、(D) A2、(E) B1、(F) B2 である。使用した分析装置は Acquity UPLC-Quattro Premier XE tandem quadrupole mass spectrometer (Waters)を使用した。

物についても解析を行い、BPA と同様に水酸化、キノン化を経て代謝されていることが明らかになった。

②フェノール系環境ホルモン代謝酵素遺伝子のクローニング

①の結果よりポーチュラカによる BPA 代謝は PPO もしくは PRX が担うことが推測された。これらの遺伝子は他の微生物、植物から多数クローニングされており、それらの保存配列をもとにポーチュラカ由来の当該遺伝子候補配列をクローニングした。その結果、PPO、PRX と相同な遺伝子配列をそれぞれ 5 種類獲得した。(以下、*PoPPO1-5*、*PoPRX1-5* と略す。)これらの遺伝子発現器官特異性を逆転写 PCR で確認したところ、全ての遺伝子が主に根で発現していることが確認された (Fig. 2)。

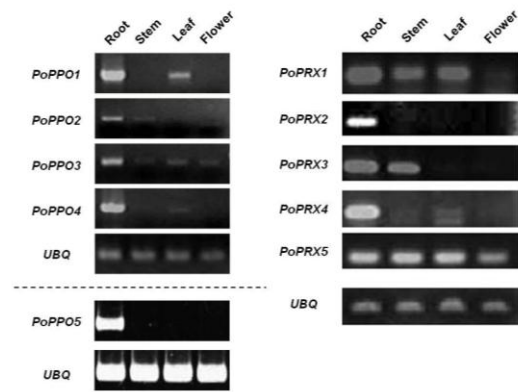


Fig 2. ポーチュラカ植物体における各 *PoPPO*、*PoPRX* 遺伝子の発現解析 内部標準としてユビキチン (UBQ) を使用

③組換え植物培養細胞を用いた新規代謝遺伝子の機能解析

②で獲得した遺伝子をタバコ培養細胞 BY-2 に導入した。*PoPPO* については 1、2、4、5 を導入した形質転換細胞の作出に成功した (Fig. 3(B))。この培養細胞を破碎し、調製した粗酵素抽出液に BPA を添加したところ、*PoPPO2*、4、5 で BPA の減少が確認され (Fig. 3(C))、ポーチュラカ粗酵素抽出液と同様に水酸化、キノン化された代謝産物が検出された。一方、現在のところ、これらの形質転換細胞抽出液から 17β-エストラジオールなどの環境ホルモン代謝物は検出できていない。

PoPRX については 1、2、4 を導入した形質転換細胞の作出に成功した (Fig. 4(B))。これらの酵素の H_2O_2 に対する K_m 値は 2、4 それぞれ 0.72 ± 0.069 、 1.2 ± 0.12 mM であり、前者は一般的な PRX よりも低く、優れた H_2O_2 親和性を有していることが明らかになった。さらに *PoPRX2* は BPA、17β-エストラジオール、オクチルフェノール、ノニルフェノールの酸化重合活性を有することが確認された。

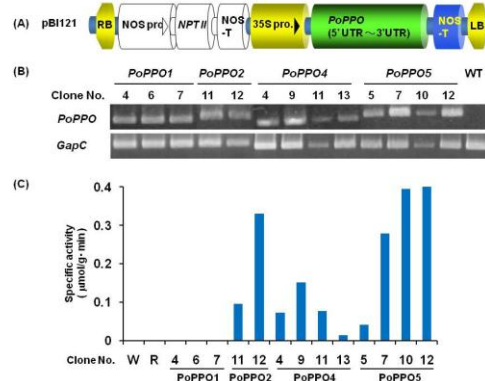


Fig 3. *PoPPO* 導入 BY-2 細胞の作出と BPA 代謝活性評価 (A) 形質転換用ベクターコンストラクト。(B) 逆転写-PCR による各形質転換 BY-2 細胞における *PoPPO* mRNA 発現確認。内部標準として細胞質 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase を使用。(C) 形質転換細胞破碎液の BPA 代謝活性。W は BY-2 野生株、R は *PoPRX5* 導入 BY-2 細胞を示す。

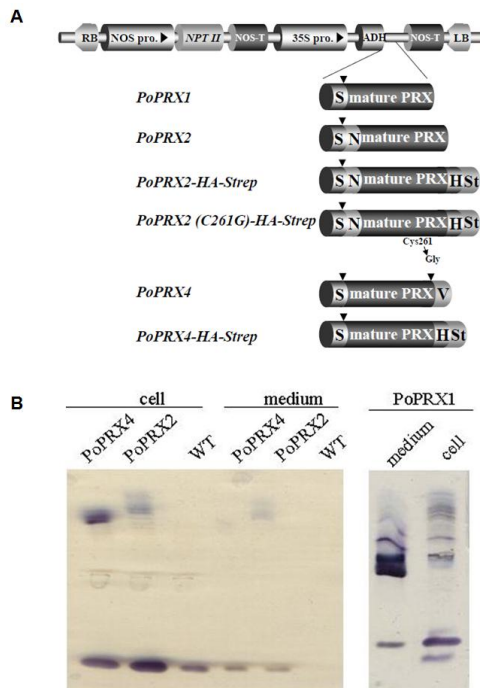


Fig 4. PoPRX 導入 BY-2 細胞の作出と PRX 活性評価
 (A) 形質転換用ベクターコンストラクト。(B) 各形質転換細胞の細胞抽出液および培養液を等電点電気泳動により分離し、4-クロロ-1-ナフトールを用いて活性染色を行った。上側が酸性側で導入した PoPRX により生じたバンドである。下側は塩基性側で BY-2 内在性の PRX により生じたバンドである。

2) 植物機能のバージョンアップ

① 小胞輸送工学的的手法を利用したポーチュラカ PRX 分泌培養細胞の作出

小胞輸送工学的的手法を用いたタバコ培養細胞 BY-2 細胞に PoPRX2 を導入し、培地に分泌させた (Fig. 4(B))。培地中に分泌された PoPRX2 は PRX 活性を維持し、また BPA、17β-エストラジオール、ノニルフェノール、オクチルフェノールも代謝可能であった。

② 低温環境下で環境ホルモン代謝活性を維持する園芸植物の探索

様々な園芸植物を試験したところ、サルビア属の植物が 10℃ 環境下でも BPA 代謝能が維持できることが確認された (Fig. 5)。

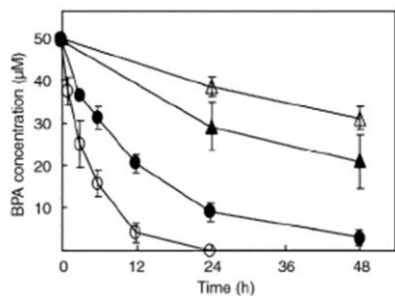


Fig 5. 園芸植物水耕液中の BPA 濃度変化
 ○: Portulaca 25°C、●: Salvia 25°C、▲: Salvia 10°C、△: Portulaca 10°C (5. 発表論文等、雑誌論文②に掲載データ)

3) 植物利用型高度水処理システムの実証

① ポーチュラカ根由来酵素の固定化

ポーチュラカ根から抽出した粗酵素抽出液を抱合したアルギン酸ビーズ、および粗酵素を表面に共有結合により吸着させたガラスビーズをそれぞれ作成した (Fig. 6)。調製したビーズの BPA 代謝能を評価したところ、両者と当該能力を有していた。さらに BPA 代謝後、ビーズを回収し、新たな BPA 溶液に添加するという繰返し処理も複数回可能であった。検討した材料の間では、BPA 代謝速度、処理可能回数はいずれもガラスビーズが優れていた。単位重量当たりのビーズの表面積、固定化様式の安定性などが影響していることが考えられる。

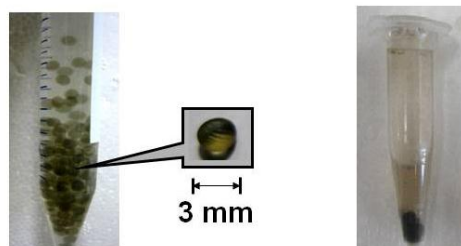


Fig 6. ポーチュラカ根粗酵素固定化ビーズ
 左: アルギン酸ビーズ、右: ガラスビーズ

以上の結果より、ポーチュラカ根におけるフェノール系環境ホルモン代謝活性は PoPP0、PRX が担っていることが強く示唆された。また、これら PoPP0、PoPRX はフェノール系環境ホルモンの除去に優れた性質を有していることも示された。

さらに、低温環境下で環境ホルモン代謝活性を維持できるサルビア属園芸植物や、植物が生育できない環境下でも環境ホルモンが代謝可能な、ポーチュラカ根粗酵素固定化技術は、様々な環境条件下でフェノール系環境ホルモン除去システムを運用する為に、大変有用なシーズとなることが期待される。

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 3 件)

① Takeshi Matsui, Yuki Nomura, Mai Takano, Sofue Imai, Hideki Nakayama, Hitoshi Miyasaka, Hiroshi Okuhata, Satoshi Tanaka, Hideyuki Matsuura, Kazuo Harada, Takeshi Bamba, Kazumasa Hirata, Ko Kato, 'Molecular cloning and partial characterization of a peroxidases gene expressed in roots of *Portulaca oleracea* cv. that is potentially useful for the remediation of phenolic pollutants'

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, in press (2011). 査読有.

② Hiroshi Okuhata, Kazunori Ikeda, Hitoshi Miyasaka, Satoru Takahashi, Takeshi Matsui, Hideki Nakayama, Ko Kato, Kazumasa Hirata, 'Floricultural *Salvia* plants have a high ability to eliminate bisphenol A' Journal of Bioscience and Bioengineering, 110, 99-101 (2010). 査読有. Doi:10.1016/j.jbiosc.2009.12.014

③ 平田収正、原田和生、奥畑博史、宮坂均、「環境ホルモンを分解する植物-環境浄花-」、Bio Industry, 11, 15-20 (2009). 査読有.

[学会発表] (計3件)

①金田洋和、松井健史、富安諒介、渡辺一平、黒田友佳子、松浦秀幸、原田和生、奥畑博史、仲山英樹、宮坂均、加藤晃、平田収正
「園芸植物 *Portulaca oleracea* 由来ポリフェノールオキシダーゼの遺伝子単離と内分泌攪乱物質代謝能の解析」、第28回日本植物細胞分子生物学会、2010年9月2日、東北大学

②金田洋和「園芸植物 *Portulaca oleracea* 由来 BPA 代謝酵素の固定化」平成22年度生化学若手研究者の集い、2010年7月3日、岡山県倉敷シーサイドホテル

③黒田友佳子「*Portulaca oleracea* による内分泌攪乱物質の浄化」第4回質量分析夏の学校、2009年9月18日、大阪府長居ユースホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 和哉 (YOSHIDA KAZUYA)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授
研究者番号：50252622
(平成20年5月30日死去に伴い、同年8月5日付で辞退)

平田 収正 (HIRATA KAZUMASA)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：30199062
(平成20年8月5日付で旧研究代表者より交代)

(2) 研究分担者

平田 収正 (HIRATA KAZUMASA)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：30199062
(平成20年8月より研究代表者に変更)

仲山 英樹 (NAKAYAMA HIDEKI)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
研究者番号：30324982
(平成20年8月より研究分担者として参画、平成21年に異動に伴い辞退)

加藤 晃 (KATO KO)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
研究者番号：80283935
(平成21年から研究分担者として参画)

原田 和生 (HARADA KAZUO)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：50397741
(平成21年から研究分担者として参画)

(3) 連携研究者

宮坂 均 (MIYASAKA HITOSHI)
関西電力株式会社環境技術研究センター・チーフリサーチャー
研究者番号:60451283

馬場 健史 (BAMBA TAKESHI)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：10432444