

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510088

研究課題名（和文）メチル水銀、カドミウム等有害重金属のファイトレメディエーション技術の開発

研究課題名（英文）Bacterial heavy metal transporter MerC increases mercury accumulation in *Arabidopsis thaliana*.

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（和文）：本研究では、メチル水銀、カドミウム等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。細菌由来のMerCは無機水銀・カドミウムのトランスポーター、MerEおよびMerFはメチル水銀・無機水銀の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AtVAM3は液胞膜に、SYP121は細胞膜にそれぞれ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、MerEを細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を融合したmerE-SYP121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。また、各産物が葉において発現していることを免疫染色法にて示した。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、merE遺伝子組換えシロイヌナズナ、merE-SYP121遺伝子組換えシロイヌナズナそれぞれにおいて、メチル水銀耐性は野生株とほぼ同程度であったが、メチル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、merEおよびmerE-SYP121遺伝子組換え植物体はそれぞれ、メチル水銀耐性を低下することなくメチル水銀高蓄積性を示し、メチル水銀浄化に適していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study evaluated the feasibility of transgenic *Arabidopsis* engineered to express the bacterial heavy metal transporter MerC for the phytoremediation of mercury pollution. MerC, MerC-SYP121, or MerC-AtVAM3 proteins were found to be expressed in leaf segments of transgenic plants using an anti-MerC antibody immunostaining method. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing merC, merC-SYP121, and merC-AtVAM3 were more resistant to mercury and accumulated significantly more of this metal compared with wild-type *Arabidopsis*. These results demonstrated that the expression of the bacterial heavy metal transporter MerC can promote the transport and accumulation of mercury in transgenic *Arabidopsis*, which represents a method of improving plants for the phytoremediation of mercury pollution.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
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：メチル水銀トランスポーター、MerE、MerF、メチル水銀浄化、ファイトレメディエーション、土壌汚染浄化

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。2003 年に土壌対策基本法が施行され、浄化ビジネスの社会的ニーズは増加しており、有害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。

筆者は重金属のバイオレメディエーションの開発を目指し、水銀耐性菌 *Pseudomonas* K-62 の水銀輸送遺伝子 *merT-merP* に *Klebsiella* 由来のポリリン酸キナーゼ遺伝子 *ppk* を組換えた水銀浄化遺伝子を構築した。本遺伝子組換え微生物は、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高蓄積させ、廃液を浄化した【**Kiyono M. et al.**, *FEMS Microbiol. Lett.* **207**:159 (2002); **Kiyono M. et al.**, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**:274 (2003); **Kiyono M. et al.**, *J Environ. Biotechnol.* **2**:95 (2003); **清野正子**他、*ファルマシア* **39**:841 (2003); **清野正子**他、*特願 2003-159080* (2003); **研究業績参照** *臨床環境医学* (2005); *J Health Sci.* (2006)】。

しかし本系は廃水に対して有用であるが、土壌汚染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、重金属蓄積能力を付与したトランスジェニック植物を作出すれば土壌中の重金属浄化が達成できると考えた。先の *ppk* 遺伝子を組換えたタバコは、水銀高蓄積性及び水銀浄化活性を示した【**清野正子**他、*特願 2003-282367* (2003); **研究業績参照** *Appl Microbiol Biotechnol.* (2006); *Biol. Pharm. Bull.* (2006)】。

筆者は平成 19-20 年度科研費基盤研究 C の助成により、植物に重金属高蓄積機能の向上を目指し、MerC を細胞膜や液胞膜などのターゲット器官にソーティングするエンジニアを行った。GFP-MerC は植

物培養細胞の小胞体やゴルジ体に局在したが、MerC と植物 SNARE, SYP121, AtVAM3 の融合により、GFP-MerC-SYP121 が植物細胞膜に、GFP-MerC-AtVAM3 が植物液胞膜にそれぞれソーティングされた。

2. 研究の目的

植物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現在でも不明な点が多い。しかし近年の研究によりその詳細が徐々に解明されている。その一例としてシタキシファミリーの一つである SYP121 が植物細胞膜に、AtVAM3 が植物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, 2004)。筆者はこれらの分子を細胞内膜輸送シグナル因子として用いることで、微生物由来の水銀トランスポーター MerE 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。

微生物由来の水銀トランスポーター MerC と同属に分類される因子としては MerE, MerF, MerT が存在するが、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。

本研究では、MerE および SNARE を用いて、メチル水銀、カドミウム等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。

3. 研究の方法

微生物由来の重金属トランスポーター (MerE, MerF) と細胞膜輸送シグナル因子 (SYP121, AtVAM3) を融合発現させたトランスジェニックシロイヌナズナを常法に従い作出した。トランスジェニックシロイヌナズナのゲノムへの標的遺伝子の組換えはゲノム PCR 法により確認した。また、植物体での各融合トランスポーターの mRNA の発現は RT-PCR により、標的蛋白質は Western Blot によりそれぞれ検出した。

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-SYP121, MerE-AtVAM3, MerF-SYP121, MerF-AtVAM3) 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、カドミウム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

平成 21 年度は、微生物由来の重金属トランスポーター (MerE, MerF) と細胞膜輸送シグナル因子 (SYP121, AtVAM3) と融合発現させたトランスジェニックシ

ロイヌナズナを作出した。トランスジェニックシロイヌナズナのゲノムへの標的遺伝子の組換えはゲノム PCR 法により確認した。また、植物体での各融合トランスポーターの発現は RT-PCR により標的 mRNA を、ウエスタンブロッティングにより標的蛋白質をそれぞれ検出した。

平成 22~23 年度は、平成 21 年度に選抜したトランスジェニックシロイヌナズナにおいて、標的トランスポーターが細胞膜及び液胞膜に発現すること、また、液胞内に重金属が蓄積することを証明した。トランスジェニック植物の重金属吸収・蓄積量が、非組換え植物に比べて、有意に上昇するとともに、その結果として、液体培地中あるいは土壌中に残存する重金属量が減少し、重金属浄化への利用性を明らかにした。

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、*merE* 遺伝子組換えシロイヌナズナ、*merE-SYP121* 遺伝子組換えシロイヌナズナそれぞれにおいて、メチル水銀耐性は野生株とほぼ同程度であったが、メチル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、*merE* および *merE-SYP121* 遺伝子組換え植物体はそれぞれ、メチル水銀耐性を低下することなくメチル水銀高蓄積性を示し、メチル水銀浄化に適していると考えられた。

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、MerE 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 6 件)

1. Kiyono M, Miyahara K, Sone Y, Pan-Hou H, Uraguchi S, Nakamura R, Sakabe K
Engineering expression of the heavy metal

- transporter MerC in *Saccharomyces cerevisiae* for induced cadmium accumulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:753-759 2010 査読有
2. Nagata T, Muraoka T, Kiyono M, Pan-Hou H Development of a luminescence-based biosensor for detection of methylmercury *J Toxicol Sci* 35:231-234 2010 査読有
 3. Sone Y, Pan-Hou H, Nakamura R, Sakabe K, Kiyono M Roles played by MerE and MerT in the transport of inorganic and organic mercury compounds in gram-negative bacteria. *J Health Sci* 56:123-127 2010 査読有
 4. Yasutake A, Cheng JP, Kiyono M, Uraguchi S, Liu X, Miura K, Yasuda Y, Mashyanov N. Rapid monitoring of mercury in air from an organic chemical factory in China using a portable mercury analyzer. *Scientific World J* 11: 1630-1640, 2011 Sep 査読有
 5. Kiyono M, Sone Y, Miyahara K, Oka Y, Nakamura M, Nakamura R, Sato MH, Pan-Hou H, Sakabe K, Inoue K. Genetic expression of bacterial *merC* fused with plant SNARE in *Saccharomyces cerevisiae* increased mercury accumulation. *Biochem Eng J* 56: 137-141, 2011 査読有
 6. Kiyono M, Oka Y, Sone Y, Tanaka M, Nakamura R, Sato MH, Pan-Hou H, Sakabe K, Inoue K. Expression of the bacterial heavy metal transporter MerC fused with a plant SNARE, SYP121, in *Arabidopsis thaliana* increases cadmium accumulation and tolerance. *Planta*, 235(4): 841-850, 2012 査読有
- [学会発表] (計 12 件)
1. 曾根有香、清野正子、芳生秀光、中村亮介、坂部 貢 Tn2I 由来 MerE の水銀輸送に関する研究 2009.7.3 第 18 回日本臨床環境医学会学術集会 (岡山) [臨床環境医学 18(2):125 2009.11]
 2. 清野正子、岡由美子、佐藤雅彦、曾根有香、中村亮介、坂部 貢 水銀トランスポーターMerC 及びシンタキシン SNARE 分子を利用した水銀高蓄積植物の作出 2009.7.4 第 18 回日本臨床環境医学会学術集会 (岡山) [臨床環境医学 18(2):149 2009.11]
 3. 東條博隆、曾根有香、中村亮介、芳生秀光、坂部 貢、清野正子 水銀トランスポーターMerF および SNARE 分子を利用したメチル水銀高蓄積植物の作出 フォーラム 2009 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (沖縄) 日本薬学会環境衛生部会 2009.11.5 [Journal of Health Science 55 : 120 2009.11]
 4. 曾根有香、中村亮介、芳生秀光、坂部 貢、清野正子 Tn2I 由来 MerE のメチル水銀輸送機能の解析 フォーラム 2009 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (沖縄) 日本薬学会環境衛生部会 2009.11.6 [Journal of Health Science 55 : 271 2009.11]
 5. 清野正子、曾根有香、東條博隆、中村亮介、芳生秀光、佐藤雅彦、坂部 貢 水銀トランスポーターMerC を高発現した植物の水銀浄化活性 フォーラム 2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー (沖縄) 日本薬学会環境衛生部会 2009.11.6 [Journal of Health Science 55 : 276 2009.11]
 6. 清野正子、東條博隆、曾根有香、中村亮介、芳生秀光、坂部 貢 水銀トランスポーターMerF および SNARE 分子を利用したメチル水銀高蓄積植物の作出 日本薬学会第 130 年会 (岡山) 2010.3.30 [日本薬学会第 130 年会生物系薬学要旨集要旨集 3 p.246 2010.3]
 7. 曾根有香、中村亮介、芳生秀光、坂部 貢、清野正子 MerE の水銀輸送活性を利用した水銀ファイトレメディエーション系の構築 日本薬学会第 130 年会 (岡山) 2010.3.30 [日本薬学会第 130 年会生物系薬学要旨集要旨集 3 p.246 2010.3]
 8. 曾根有香、清野正子、中村亮介、坂部 貢、井上健一郎 水銀トランスポーター MerE の機能解析およびファイトレメディエーションへの応用 第 19 回日本臨床環境医学会学術集会 (東京) 2010.7.2 [第 19 回日本臨床環境医学会学術集会抄録集 p34 2010.7]
 9. 清野正子、東條博隆、曾根有香、中村亮介、坂部 貢、井上健一郎 水銀トランスポーター MerF を利用したメチル水

銀高蓄積植物の作出 第 19 回日本臨床環境医学会学術集会（東京） 2010.7.2 [第 19 回日本臨床環境医学会学術集会抄録集 p66 2010.7]

10. 望月優佑、清野正子、曾根有香、中村亮介、井上健一郎 *Pseudomonas* K-62 由来 68 kb plasmid の水銀耐性遺伝子に関する研究 第 54 回日本薬学会関東支部大会（東京） 2010.10.2 [第 54 回日本薬学会関東支部大会講演要旨集 p110 2010.10]
11. 清野 正子，曾根 有香，中村 亮介，佐藤 雅彦，坂部 貢，井上 健一郎 MerC および SNARE を利用したカドミウムのファイトレメディエーション BMB 2010（兵庫） 2010.12.8 [第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会 プログラム集 p302 2010.12]
12. 望月優佑、清野正子、曾根有香、中村亮介、井上健一郎 *Pseudomonas* K-62 由来 68 kb plasmid (pMR68) の水銀耐性遺伝子に関する研究 日本薬学会第 131 年会（静岡） 2011.3.30 [日本薬学会第 131 年会要旨集 3 p234 2011.3]

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（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：特許
番号：第 4502052 号
取得年月日：2010.4.30
国内外の別：国内

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし