

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660009

研究課題名(和文)環境中のストロンチウムを極めて高度に生体濃縮する遺伝子組換え植物の作出と評価

研究課題名(英文) Toward the production of a recombinant phyto mediator plant that highly accumulates environmental strontium.

研究代表者

佐藤 浩之 (SATO, Hiroyuki)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：80187228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ストロンチウム(Sr)を極めて高濃度に蓄積する海産緑藻オオハネモのSr濃縮メカニズムを解明し、将来的に環境浄化に役立てることを最終目標とした。オオハネモの含有元素分析、主要膜タンパク質の解析、転写産物の網羅的解析などを行い、Srを結合する新規タンパク質を発見した。また陽イオン交換クロマトグラフィーを用いてオオハネモの細胞内成分からSrを結合する低分子物質を検出する方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanism of hyper accumulation of strontium (Sr) by a green macroalga, *Bryopsis maxima* was analyzed in terms of its element analyses, membranous protein analyses, and expressed sequence tag analyses. In this study, a novel Sr-binding protein was identified. In addition, we found that the most of radioactive-Sr that have been incorporated into thalli were bound with low molecular weight soluble-substance. We developed a method for determination of this Sr-binding substance using cationic ion-exchange chromatography. These results are an important step toward the production of future phyto mediator plants that highly accumulates environmental strontium.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：ストロンチウム 生物濃縮

1. 研究開始当初の背景

2011年3月の福島第一原子力発電所の事故によって環境中に放出されたセシウム-137 (^{137}Cs) やストロンチウム-90 (^{90}Sr) などの長半減期放射性核種の除染は、我が国が長期的に向き合わねばならない大きな問題である。ストロンチウムはカルシウムと同族元素であり、内部被ばくでは向骨性を示し、白血病や骨腫瘍などの原因となりうるため、高等動物への生物学的な影響が大きい。放射性物質で汚染された広大な面積の除染を行う安価で簡便な方法の一つとして、植物による除染(ファイトレメディエーション)が検討されており、現在も有望な金属元素濃縮能をもつ植物種の探索などが試みられている。

福島第一原発の事故発生25日後、研究代表者は千葉県銚子市犬吠埼で数種の海藻類を採集して高放射能を示す海藻を探索した結果、大型緑藻であるオオハネモが他藻種と比較して極めて高い放射能を有するを見出した。

海洋中には人類の想像を絶する性質を持った未解析の生物が多数存在している。オオハネモが持つ海洋元素の濃縮能は極めて高く、本研究によって金属元素の新たな生体濃縮メカニズムに関する理解が深まると期待された。オオハネモはストロンチウムなど、周期表第2族元素以外にも第7族元素やその他レアメタル・レアアースも極めて高効率に生体濃縮しており、さまざまな金属の高度生物濃縮メカニズムの解明と、将来的なファイトレメディエーターの作出が期待された。

2. 研究の目的

各種機器分析によってオオハネモの含有元素濃度を定量したところ、オオハネモはさまざまな海洋元素を驚異的な効率で生物濃縮し、特にストロンチウム(Sr)は16g/kg(乾燥重量)もの量を蓄積しており、現在報告されている全生物種の中でも最高レベルの含有量を示していた。本研究では、このオオハネモが持つストロンチウムの高度生物濃縮機構の解明をめざし、それに関与するトランスポーター分子や、金属原子の毒性を緩和するファイトケラチン様分子を同定した後、これらの遺伝子をクローニングして陸上植物へ遺伝子導入し、土壌中の放射性Srの高効率ファイトレメディエーターとしての遺伝子組換え植物を作出して評価を行うことを最終目的とした。

3. 研究の方法

(1) オオハネモの含有元素の定量

オオハネモを千葉県銚子市犬吠埼から採集し、その元素組成を分析してその含有量および濃縮の特異性を解析した。

(2) オオハネモ細胞液中におけるSrを結合して毒性を緩和するファイトケラチン様分子の探索

人工海水中でオオハネモに ^{85}Sr を加えて

取込ませ、細胞内液の成分を遠心分離、透析、限外ろ過、カルボキシメチル(CM)セルロースカラムクロマトグラフィーなどにより分画し、細胞内で ^{85}Sr がどのような状態で存在するかを調べた。

オオハネモの細胞内液の可溶性画分を限外ろ過して得た低分子画分と ^{85}Sr 塩化ストロンチウムを混合し、細胞内成分と放射性ストロンチウムの結合を調べた。クロマトグラフィーにおいてストロンチウム係留分子が含まれると思われる画分を質量分析計(島津製作所社製LCMS2010)にかけてESIプローブを用いたイオン化により生じるイオンのシグナルを検出した。

(3) オオハネモの主要細胞膜タンパク質の同定

オオハネモが金属元素を濃縮するためには、まず金属原子を細胞膜中の元素トランスポーターを通して細胞内へ取込む必要がある。このため、まずオオハネモ細胞膜タンパク質を電気泳動によって分画し、その主要なタンパク質のバンドをエドマン分解およびLC-MS/MSによって解析し、既知タンパク質配列のデータベースと比較した。

(4) オオハネモで発現されるmRNAの網羅的な解析(EST解析)

オオハネモの細胞膜に存在すると考えられる金属トランスポーター分子や、タンパク質性のファイトケラチンなどは、EST解析からその本体が得られる場合がある。このためオオハネモ全cDNAライブラリーを作成してその網羅的な配列決定を行った。採集直後にオオハネモ細胞を破碎してキアゲン社のRNeasy Plant kitを用いてmRNAを調製し、アンカー配列を付加したOligo-dT配列をプライマーとして逆転写を行った。第1鎖cDNAに、ターミナルデオキシリボヌクレオチド転移酵素を用いてpoly-G配列を付加し、別のアンカー配列を付加したOligo-dCプライマーを用いて第2鎖cDNAを合成した。これを2種類のアンカープライマーを用いてPCR増幅してプラスミドベクターへクローニングし、cDNAライブラリーを構築した。これらについて網羅的な配列決定を行い、多数の配列を得た。

この方法で、分子内に金属結合モチーフを持った極めて高荷電タンパク質のcDNAを2種得て、これらがファイトケラチンとしての活性を有しているかどうかを検討した。具体的には、これら2種のタンパク質を大腸菌中で発現させて、 ^{85}Sr を結合するかどうかで評価した。

4. 研究成果

(1) オオハネモに含まれる元素の定量分析

オオハネモに含まれる元素の濃度を定量するために、採取した藻体を乾燥させて磨砕し、日鉄住金テクノロジージャにICP-MS、ICP-OES、燃焼イオンクロマトグラフィー、AAS分析を外注し、Elemental Analysis Inc.

にて中性子放射化分析を外注した。分析結果は次の表のようになり、極めて多種類の金属元素がオオハネモ中に生物濃縮されていることが明らかとなった。

オオハネモに含まれる主な元素

| Element | <i>B. maxima</i> | Mean seaweed in Japan | fold* | Average of sea water** |
|---------|------------------|-----------------------|-------|------------------------|
| S | 5,000 | — | — | 8.98×10^{-5} |
| K | 11,600 | 12,500 | 0.93 | 399 |
| Ca | 12,500 | 20,400 | 0.61 | 412 |
| Sc | 0.65 | 0.315 | 2.1 | 7×10^{-7} |
| Mn | 82 | 104 | 0.8 | 2×10^{-5} |
| Fe | 2,400 | 542 | 4.4 | 3×10^{-5} |
| Br | 3,400 | 180 | 18.9 | 67 |
| Sr | 15,900 | 1,190 | 13.4 | 7.8 |
| Cd | 0.09 | — | — | 7×10^{-5} |
| I | 1,800 | 434 | 4.1 | 0.058 |
| Cs | 0.13 | 0.093 | 1.4 | 3.06×10^{-4} |
| Ba | 3,750 | 30 | 125 | 0.015 |
| La | 0.72 | 0.76 | 0.9 | 5.6×10^{-6} |
| Ce | 1.4 | 1.2 | 1.2 | 7×10^{-7} |
| Pr | 0.17 | — | — | 7×10^{-7} |
| Sm | 0.2 | 0.14 | 1.4 | 5.7×10^{-7} |
| Yb | 0.07 | 0.088 | 0.8 | 1.2×10^{-6} |
| Re | 4.9 | — | — | 7.8×10^{-6} |
| Pb | 1.1 | 10 | 0.11 | 2.7×10^{-6} |
| Th | 0.55 | 0.18 | 3.1 | 2×10^{-8} |
| U | 0.06 | 1.1 | 0.05 | 3.2×10^{-3} |

非常に興味深いことにオオハネモ中に含まれるカルシウムの濃度は、日本の海藻の平均濃度のおよそ6割程度である一方、同じ周期表第2族のストロンチウムは13.4倍、バリウムは125倍にも及ぶことが明らかとなり、オオハネモはカルシウム濃度よりもストロンチウム濃度が高いという、極めて特殊な生物であることがわかった。また、ヨウ素は海藻平均の4.1倍、臭素は18.9倍にもおよび、オオハネモはハロゲン族元素も大量に蓄積することが明らかとなった。さらにトリウムや鉄も高度に生物濃縮することが明らかとなり、オオハネモは様々な元素を濃縮するが、濃縮する元素はある特異性をもっていることが確認された。

(2) オオハネモ細胞中のストロンチウム

オオハネモに取り込まれた放射性ストロンチウムは主として可溶性画分に存在し、透析または限外ろ過において低分子画分に分離された。低分子画分の放射性ストロンチウムは、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した CM セルロースカラムに捕捉され、0.1 M NaCl を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) によりカラム容の9倍以内で溶出した。放射性ストロンチウムのみを CM セルロースカラムクロマトグラフィーにかけ溶出させるには 0.1 M NaCl を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) をカラム容の16倍以上流す必要があるため放射性ストロンチウムは細胞内でストロンチウム係留分子と結

合し、複合体は遊離ストロンチウムと比較して CM セルロースへの吸着が弱くなっていると考えられる。ストロンチウム係留分子-放射性ストロンチウム複合体の溶出画分を再度 CM セルロースカラムクロマトグラフィーにかけると溶出が1回目よりも遅れ、遊離ストロンチウムと同様の画分に放射能が溶出した。ストロンチウム係留分子-放射性ストロンチウム複合体をカラムクロマトグラフィーにより精製すると、ストロンチウム係留分子とストロンチウムイオンに解離したと考えられる。ストロンチウム係留分子-放射性ストロンチウム複合体を塩基性、中性、酸性の条件で酢酸エチルまたは1-ブタノールに抽出することを試みたがいずれの場合にも放射能は全量水層にとどまった。

(3) ストロンチウム係留分子とストロンチウムの結合の検出

オオハネモの細胞内液を限外ろ過して得た低分子画分の物質とストロンチウムの結合について調べた。

CM セルロースカラムクロマトグラフィー。オオハネモ細胞内液の低分子画分と ^{85}Sr 塩化ストロンチウムを混合し、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) または 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した CM セルロースカラムクロマトグラフィーにかけた。いずれの緩衝液を用いた場合にも、オオハネモ藻体に放射性ストロンチウムを取り込ませたときと同様に放射性ストロンチウムは 0.1 M NaCl を含む緩衝液によりカラム容の20倍以内の遊離ストロンチウムの溶出よりも前の画分に溶出した。すなわち、オオハネモの低分子画分と放射性ストロンチウムを混合したときに係留分子とストロンチウムが結合することを CM セルロースカラムクロマトグラフィーにより検出することができた。

ストロンチウム係留分子の液体クロマトグラフ質量分析。オオハネモ細胞内液の低分子画分に非放射性ストロンチウムを加える条件と加えない条件で CM セルロースカラムクロマトグラフィーにかけて分離し、ストロンチウム係留分子が含まれていると思われる画分を高速液体クロマトグラフ質量分析計により分析したところ m/z 比 606.5 および 782.5 付近に強いシグナルが認められた。前記のピークを中心に m/z 比の差 2.0 で対称にピークが7本分布しており、分子中に臭素6個を含むことによる同位体存在比を反映していると推定された。

薄層クロマトグラフィー (TLC) による放射性ストロンチウムの分析。本研究の途中に、ストロンチウム係留分子と放射性ストロンチウムの結合の検出を TLC により行うことを試みた。シリカゲル 60 薄層プレートに試料をのせメタノール-1-ブタノール-3 M 塩酸 (8:1:1 v/v/v) で展開すると、放射性ストロンチウムが Rf 値 0.2 付近にスポットを作る

のに対して、オオハネモ成分と放射性ストロンチウムを混合して試料とし展開すると放射能は原点にとどまった。これを係留分子とストロンチウムが結合したことによるものと考え、オオハネモ成分の分離を進めたが、これは誤りであったことが研究期間の終了間際に判明した。すなわち、オオハネモ成分と放射性ストロンチウムの混合により TLC における展開位置が変化したのはオオハネモ細胞内液に含まれるストロンチウムイオンによるものと思われる。放射性ストロンチウムに 10 mM の非放射性塩化ストロンチウムを等容混合し分析に供すると放射能は原点にとどまった。

(4) オオハネモ膜に存在する主要タンパク質の配列解析

オオハネモの細胞膜(細胞壁)を調製して SDS で可溶化し、SDS-PAGE で分画したところ、多数の膜タンパク質のバンドが観察された。それらの中の主要なタンパク質のうち、250kD, 47kD, 32kD, 25kD, 10kD のバンドの部分配列をエドマン分解および LS-MS/MS 解析によって決定した。エドマン分解ではアミノ末端の 20-30 残基が、LS-MS/MS 解析では数十にもおよぶ短鎖配列が得られたが、これらの全ての配列で、データベース上での相同性を示すタンパク質が得られなかった。オオハネモにおける金属濃縮能は極めて高いことから、膜に存在するトランスポート分子の量も多いと考えられ、今回主要なタンパク質バンドを解析した。今回得られた配列の中に目的とする未知のトランスポートがある可能性は否定できないが、その配列の相同性が極めて低いことから、このアプローチでは元素トランスポートの同定は難しいと結論付けた。これらの配列から PCR のプライマーを合成して、現在遺伝子クローニングを試みている。

(5) オオハネモ中で転写される mRNA の網羅的解析 (EST 解析)

採集直後にオオハネモの細胞を破碎して mRNA を調製し、cDNA ライブラリーを構築した。これらを用いて大腸菌を形質転換したところ、総計で 3,896 個のホワイトコロニーを得、アンカープライマーを用いてコロニー PCR を行ったところ、886 個にアンカープライマーで増幅する(正しく合成されている) cDNA がクローニングされていることがわかった。そのうち現在までに配列を決定したクローンは 383 個であり、BLAST 解析の結果、そのうちの 23% が相同性 NO HIT であり、データベースに登録が無い、まったく新規のタンパク質をコードしていた。また 43% が未同定タンパク質であった。

オオハネモは多核嚢状単細胞緑藻類であり、一つの細胞は 30 μ m にもおよぶ多核体という特殊な藻類である。またクロロフィル a/b 比も他の植物とはまったく異なりクロロ

フィル b が a と比べて 3 倍量存在するという極めて特異な生物である。このように、他の生物における一般的な常識がオオハネモには通用しにくく、極めてユニークで新規性にあふれている反面、得られた結果の比較解析は困難である。しかし、オオハネモは未知の生理活性分子や代謝経路の宝庫であると考えられ、萌芽的な研究として極めて重要な生物種であることが今回再認識された。

今回行った EST 解析の結果、分子内にメタロチオネインの金属結合モチーフとして知られる CxC, CxxC, CxxxC 配列を多数有するタンパク質 cDNA を 2 種類発見することができた。1 つは GJYP と命名した cDNA であり、分子内に、配列中の Cys, Lys, His の 3 残基のみで全体の 60% にもなる高荷電タンパク質である。またもう 1 つは、分子内に金属結合モチーフ CxxxC をもつ 15 残基のアミノ酸配列ユニットが 9 回繰り返されている極めて特異なタンパク質であり、CRRP と名付けた。これらの 2 つを大腸菌用発現ベクターにクローニングして、大腸菌中で発現させたところ、両方とも大腸菌の不溶性画分に分画された。この画分を尿素によって可溶化し、透析を行って立体構造を再構築する際に、⁸⁵Sr を外液に添加して、透析膜内外の放射能を測定することにより ⁸⁵Sr の結合能を評価した。大腸菌で発現させた GJYP および CRRP タンパク質については、CRRP で明確な ⁸⁵Sr 結合活性が確認され、Sr 結合を持つ新規なタンパク質であることが確認された。一方、GJYP ではその活性は確認できなかった。遺伝子組換え植物を作成するべく pBI ベクターを用いて construct を構築し、GJYP に関しては遺伝子組換えシロイヌナズナを作成することができたが、大腸菌で発現させた組換え GJYP タンパク質が ⁸⁵Sr 結合活性を示さなかったことから、本組換えシロイヌナズナの Sr 耐性機構については解析を中止した。CRRP に関しては、その発現 construct を現在作成中である。

しかし、⁸⁵Sr をオオハネモ培養液に添加して細胞中に取り込ませ、その細胞液中の ⁸⁵Sr の存在状態を透析によって調べたところ、透析膜を通過しない画分(タンパク質など)には全体の 2% 程度の放射能しか残存せず、ほとんどが透析膜を通過する、分子量がおよそ一万以下の物質であることがわかった。このため、今後のオオハネモの Sr 濃縮機構の解明には、金属結合タンパク質成分に力点を置くのではなく、低分子量の Sr 係留分子の同定および、その構造決定、また生合成経路の解明などに力点を置く必要があることが明らかとなった。

今回の挑戦的萌芽研究により、オオハネモの Sr 濃縮機構に関して、多くの重要な知見が得られた。残念ながら当初の計画には届かなかったが、極めて独創性・新規性の高い有意義な研究であったと自己評価できた。

今回の挑戦的萌芽研究で得られた知見を基礎として、この特殊な Sr 濃縮メカニズム

の全容を解明し、福島第一原子力発電所付近の Sr に汚染された土壌のファイトレメディエーションに向けた遺伝子組換え植物の作出に関する端緒としたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Shigekazu Takahashi, Kyoko Aizawa, Saki Nakamura, Katsumi Nakayama, Shingo Fujisaki, Soichiro Watanabe, Hiroyuki Satoh

Accumulation of alkaline earth metals by the green macroalga *Bryopsis maxima*.

Biometals 28:391, 2015

DOI: 10.1007/s10534-015-9843-y

〔学会発表〕(計1件)

渡邊 直之、梅澤 朋代、富澤 美月、大津 郁也、佐藤 浩之

海産大型緑藻の Expressed Sequence Tag 解析から得られたストロンチウムを結合する新規タンパク質の性質

環境放射能除染学会 第5回研究発表会・国際シンポジウム 2016年7月7日 とうほう・みんなの文化センター(福島県文化センター(福島県福島市))

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 浩之 (SATOH, Hiroyuki)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：80187228

(2)研究分担者

藤崎 真吾 (FUJISAKI, Shingo)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：70190022