

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 16 年度博士課程再入学
氏 名 内田 英二
指導教員名 山根 久和

論文題目

微生物由来の xenobiotics 分解能を付与した環境汚染物質分解植物の作出

Phytoremediation は、植物を利用して環境中から汚染物質を除く、或いはより害の少ない化合物に変換する環境汚染修復手法として注目されており、その対象は重金属をはじめとする無機化合物汚染から、農薬や有機溶媒などの難分解な非生物物質(xenobiotics)である有機化合物汚染にまで及ぶ。有機化合物汚染の phytoremediation では、分解除去可能な汚染物質の種類増加と共に、その効率の向上が重要であり、これらの問題を解決するために新規植物を探索する一方、微生物由来の有用な xenobiotics 分解酵素遺伝子を組み込んだ形質転換植物体の作出が試みられている。新規植物の探索の困難さと望ましい形質を自由に付与できる有利さを考えると、phytoremediation の更なる発展には遺伝子組換え技術の利用が避けられないと思われる。

形質転換植物体を用いた応用研究は、抗体やワクチンといった有用タンパク質を植物に生産させる目的で精力的に行われており、その過程でオルガネラ局在的な発現が試みられている。小胞体移行シグナル・残留シグナルを組み合わせた小胞体発現で抗体が高発現した事例が報告されているが、残留シグナルを除いてアポプラスト発現させ、植物体外へ分泌させるという例も知られている。この知見に基づくと、水溶性の低い xenobiotics は植物体内に取り込まれなくとも、分泌させた分解酵素により植物体外で分解できると予想され、アポプラスト発現が水溶性の低い xenobiotics の phytoremediation に貢献するものと強く期待される。

以上の背景から、本研究では植物細胞におけるオルガネラ局在的な発現手法を用いて、環境汚染物質分解植物体の作出を試みた。

1. *Terrabacter*. sp. DBF63 株由来のメタ開裂酵素 DbfB の植物細胞におけるオルガネラ局在的な発現¹⁾

環境汚染物質分解植物のモデルケースとして、遺伝子発現も活性評価も比較的容易で、2,3-dihydroxybiphenyl (2,3-DHB) を分解可能な *Terrabacter* sp. DBF63 株由来のメタ開裂酵素 DbfB を、シロイヌナズナ細胞のアポプラスト、小胞体、細胞質で局在的に発現させた。小胞体及びアポプラスト発現には、小胞体への移行のためにレグミン B4 シグナルを N 末端に、小胞体発現には更に小胞体残留シグナルを C 末端に付加し、全てカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター制御下で発現させた。形質転換はアグロバクテリウムを用いて行い、カナマイシン耐性を指標に形質転換体を選抜した。植物体への *dbfB* 導入、転写、翻訳の確認できたサンプルについて、2,3-DHB 分解による黄色生成反応を利用して葉の粗酵素抽出液を用いた活性評価を行ったところ、アポプラスト (line a1-a8)、細胞質発現区 (line c9-c18) で顕著な活性が検出された。アポプラスト発現区の粗酵素抽出液中の活性平均値 (0.341 U/mg) は、細胞質発現区 (0.636 U/mg) と比較して約半分に止まるものの、アポプラスト発現区の水耕液中の活性平均値 (86.7 mU/ml) は、細胞質発現区 (3.75 mU/ml) の

23.2 倍に及ぶ有意に高いものだった(Fig. 1)。更に 2,3-DHB を直接水耕栽培しているフラスコへ投与し、水耕液中の 2,3-DHB 分解活性を定量したところ、細胞質発現区の微弱な活性(0.434 U/gfw-plants)に対してアポプラスト発現区からはその 11.9 倍に及ぶ高い活性 (5.18 U/gfw-plants)が観察された。以上の結果は、外来タンパク質発現の際における細胞内での発現場所の重要性と共に、レグミン B4 の小胞体移行シグナルを用いた場合でも植物体外へ外来タンパク質の分泌が可能な事、実際の水耕液中でも DbfB は活性を維持しているためにアポプラスト発現が水溶性の低い xenobiotics の phytoremediation に有効な手法となる可能性を示すものと考えられる。

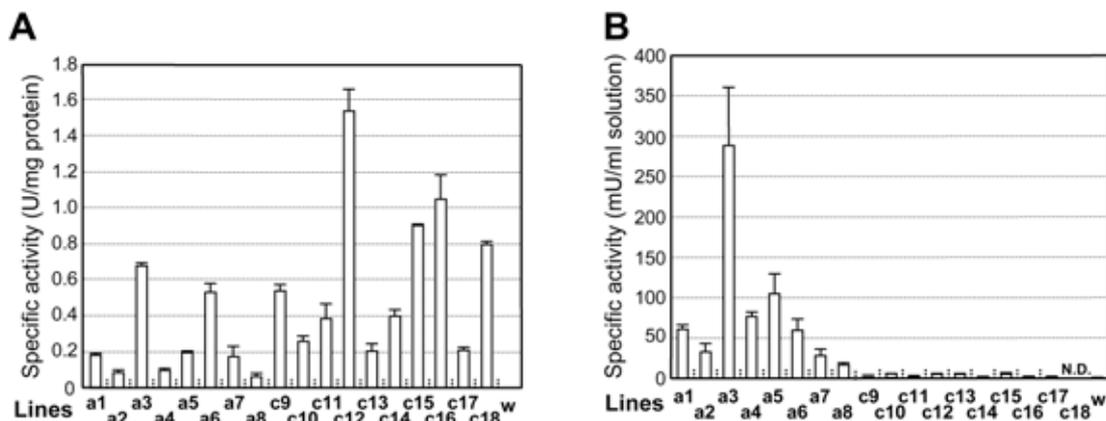


Fig. 1 葉の粗酵素抽出液(A) と水耕液(B)を用いた DbfB 活性評価

2. *Rhodococcus* sp. m15-3 株由来のハロアルカンデハロゲナーゼ DhaA の分泌系構築¹⁾

アポプラスト発現による植物体外への xenobiotics 分解酵素の分泌系を phytoremediation へ応用するモデルケースとして、医薬、農薬の合成原料である一方、その環境中での残留性が問題視されている 1-クロロブタンを特に補因子を必要とせずに脱塩素化可能な *Rhodococcus* sp. m15-3 株由来のハロアルカンデハロゲナーゼ DhaA をタバコ細胞のアポプラスト、細胞質で局在的に発現させた。形質転換体の作出は、1.と同様の手法で行い、植物体への *dhaA* 導入、転写、翻訳の確認できたサンプルについて、チオシアン酸水銀を用いた塩化物イオンの呈色定量法を利用して DhaA の活性評価を行った。アポプラスト発現区の葉の粗酵素抽出液中の活性平均値(line A1-A12; 1.42 mU/mg)は、細胞質発現区(line C14-C18; 10.9 mU/mg)の 13.0 %程度だったものの、アポプラスト発現区で最も活性の強かった line A4 の水耕液中の活性(20.9 mU/mg)は、細胞質発現区で最も発現の強かった line C16 (0.274 mU/mg)の 76.4 倍に及ぶ有意に高いものだった(Fig. 2)。また、水耕栽培しているフラスコへ 1-クロロブタンを加えて分解させた時の水耕液中の 1-クロロブタン脱塩素化物(1-ブタノール)の生成量を GC-MS で経時的に定量した結果、反応初期においては予想通り line A4 でのみブタノールが検出されたが、反応 10 時間後で line C16 が line A4 を上回った(Fig. 3)。これは、植物体に取り込まれた 1-クロロブタンが、細胞質で 1-ブタノールに分解され、長い時間をかけて水耕液中に拡散してきたためと考察する。一方、水耕液に 1-クロロブタンを加えて生育阻害実験を行ったところ、line A4 は line C16 や野生株に比べて 1-クロロブタンに対する顕著な耐性を示した(Table 1)。以上の結果は、*in vivo* でも水耕液中でも DhaA が活性を維持している事、植物体に取り込まれやすい xenobiotics については細胞質発現も phytoremediation の有効な手法になる事、植物体外で毒性物質を分解できるために生育阻害を受けにくいと考えられるアポプラスト発現は、持続的な phytoremediation に適した手法である事を示すものと考えられる。

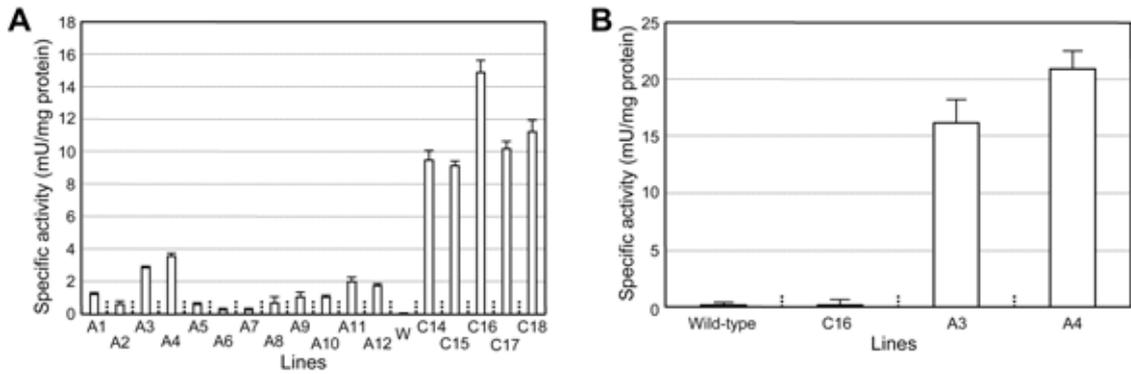


Fig. 2 葉の粗酵素抽出液(A) と水耕培養液(B)を用いた DhaA 活性評価

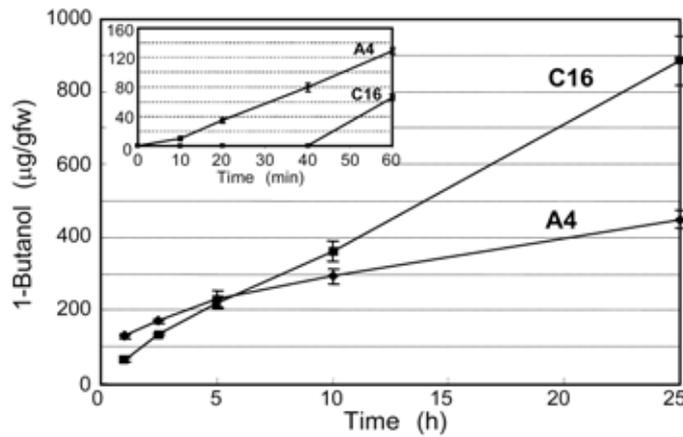


Fig. 3 水耕液中における 1-ブタノール生成量の経時的変化

Table 1. 様々な 1-クロロブタン(1-CB)濃度の水耕液に 6 日間晒した時の植物体湿重量^a

1-CB (mM)	Wild-type		Line C16		Line A4	
	Weight (g)	TI (%)	Weight (g)	TI (%)	Weight (g)	TI (%)
0	2.44 ± 0.44	100	2.43 ± 0.62	100	2.26 ± 0.33	100
8	1.45 ± 0.34	59.3	1.26 ± 0.65	51.8	2.23 ± 0.54	98.3
12	0.99 ± 0.24	40.4	0.10 ± 0.04	4.1	2.01 ± 0.57	88.7
16	0.17 ± 0.03	7.1	0.08 ± 0.03	3.2	0.14 ± 0.05	6.2

^a湿重量は 8 つの植物体の平均値、TI (tolerance index)は(各 1-CB濃度の時の湿重量 / 0 mMの時の湿重量 × 100)で表されている。

3. カルバゾール分解菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株由来 carbazole 1,9a-dioxygenase (CARD0)の分泌系構築

生体への強力な毒性を示すダイオキシンは、最も環境修復を望まれている xenobiotics の一つであるが、水溶性が極めて低いために土壤中に吸着しやすく、汚染土壌からの植物体を用いた効率的な吸収除去は難しいと考えられていた。しかし本研究 1. と 2. の結果は、ダイオキシン分解に関与する酵素をアポプラスト発現で植物体外に分泌させる事で、吸収困難なダイオキシンを植物体外で積極的に分解できる可能性を示していた。そこで本研究ではダイオキシンの分解植物のモデルケースとして、当研究室で精力的に研究が行われているダイオキシン骨格構造の分解に関与する *P. resinovorans* CA10 株由来の CARD0 (三つの遺伝子産物 CarAaAcAd からなる multi-component 系) を、タバコやシロイヌナズナ細胞のアポプラスト細胞質で局所的に発現させた。形質転換体の作出は、上記と同様にアグロバクテリウム法で行い、ハイグロマイシン耐性を指標に形質転換体を選抜した。三つの遺伝子を導入できたタバコ 20 line について、CarAa を認識するポリクローナル抗体を用いたウエスタン解析を行い、更に CarAa の発現量の高い 3 line に絞り込んだ。現在、シロイヌナズナについても同様の選抜を試みている一方、タバコについては選抜した 3 line の葉の酵素抽出液や水耕液を用いた CARD0 活性評価やカルバゾールに対する生育阻害実験を行っている。

本研究では、アポプラスト発現が水溶性の低い xenobiotics の phytoremediation に有効である可能性と共に、細胞質発現が植物体に取り込まれやすい xenobiotics の phytoremediation に有効である事を実験室レベルでの研究で明らかにした。一般的に、微生物は植物よりも xenobiotics に対して強い分解活性を有するが土着の微生物との競合で淘汰されやすいため持続性に乏しく、逆に植物は xenobiotics の分解活性で微生物に劣るものの持続性に優れ、微生物と植物の共生系は両者の長所を生かして短所を補う事ができるより良い手法と考えられていた。しかし最近、共生系による phytoremediation の研究で、微生物が植物から分泌される有機物を資化してしまうために期待通りに xenobiotics を分解しない例が知られており、phytoremediation への応用に関する研究がますます重要性を増してきている。そこで、本研究での方法論が実際の phytoremediation への応用に有効であるかについて更に検討するために、今後は実際の 1-クロロブタン汚染排水を用いた分解試験や、xenobiotics 分解菌、環境汚染物質分解植物、両者の共生系の三者間の分解活性の強弱や持続性の比較、更に土壌系での xenobiotics 分解試験等の実践的レベルでの研究を行い、アポプラスト発現の phytoremediation への有用性について評価していく必要がある。

- 1) Uchida et al., Secretion of Bacterial Xenobiotic-Degrading Enzymes from Transgenic Plants by an Apoplastic Expressional System: an Applicability for Phytoremediation. *Environmental Science & Technology*, **39**, 7671-7677 (2005)