

所属 (主指導教官)	遺伝子教育研究センター植物細胞工学部門 (佐野 浩 教授)		
氏名	鈴木 伸昭	提出	平成14年 1月 8日
題目	Studies on molecular response to heavy metal ions in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナの重金属イオンに対する分子応答の研究)		
<p> カドミウム、水銀などの重金属は動植物に深刻な悪影響を与える。近代産業はこれらを多用し、多くの被害を引き起こした。汚染修復には膨大なコストと時間がかかる。有機水銀で汚染された熊本県・水俣湾では、150 トンもの水銀へドロの処理のため 13 年の歳月と 485 億円を費やした。一方で、大地に根ざす植物には様々な元素を吸収する能力がある。効率的、経済的な環境浄化方法の開発が期待される中、これを利用して有害物質を除くアイデアが生まれた。Phytoremediation と呼ばれ、経済的かつ吸収させた元素の再資源化も可能として米国では既に事業化も試みられ、数年後に市場規模は 400 億円に達するとの試算もある。現実にはまだ効率などに難点があるため、分子育種よって重金属吸収能を高めた実用的な浄化植物の創出が期待されている。だが、重金属に関する植物の分子レベルでの知見は少ない。 </p> <p> 本研究では、実用的な環境浄化植物の創出を最終目標に、植物に与える重金属元素の影響を分子レベルで明らかにすることをテーマとした。実験材料にはシロイヌナズナ（アブラナ科）とカドミウムを選んだ。シロイヌナズナは全ゲノム配列が明らかになるなどモデル植物として分子生物学的知見が豊富である。また、アブラナ科植物には重金属耐性や蓄積に関する能力が高い種が多い。カドミウムは毒性が高いうえ、生体に対して全く不要な元素とされ、近年、環境汚染の広がりや人体への影響が懸念される汚染物質のひとつである。 </p> <p> 本論文では、まず、シロイヌナズナに 0-0.5mM のカドミウム処理を行い、カドミウムによるシロイヌナズナの生理、形態的影響の観察を行った（第 1 章）。次にこの結果に基づき、蛍光ディファレンシャルディスプレイ（FDD）法による遺伝子 mRNA のスクリーニング、カドミウムストレスに応答する遺伝子の大規模単離、遺伝子レベルでカドミウムが引き起すストレスの同定を行った（第 2 章）。さらに、この中から重金属代謝に関わると予想される遺伝子・蛋白質の機能解析（第 3 章）へと研究を進めた。 </p> <p> 植物は酸化的ストレスを受けると、対処するためにアスコルビン酸ペルオキシターゼ（APX）やスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）などの様々な抗酸化酵素を働かす。カドミウム処理をした植物では未処理試料に比較して APX、SOD とも活性が一時的に 50%程度にまで低下、また培地中 H₂O₂ 濃度も 4 倍程度にまで上昇した。一方で、抗酸化能を持つ還元糖「マンニトール」をカドミウムに加えて添加すると、培地中 H₂O₂ 濃度の上昇は 2 倍程度にまで抑制され、カドミウムにより植物体内で酸化的ストレスが生じていることが示唆された。 </p>			

このストレスに対処するために、植物は遺伝子レベルで様々な対応をしていることが予想された。FDD によるスクリーニングの結果、カドミウムストレスに応答する 31 の遺伝子を単離でき、うち 1/4 は機能未知の遺伝子であったが、残りはリン酸化酵素などのシグナル伝達因子、分子シャペロン、硫黄代謝系遺伝子などであった。

これらの遺伝子の 12 時間の発現パターンは、早期一過的に発現するものや長時間発現が継続するものなどバラエティに富んでいた。また、蛋白質リン酸化の阻害剤処理により一部の mRNA 蓄積量は有意に減少。リン酸化の関与するシグナル伝達経路がカドミウムストレスで活性化されることも明らかとなった。これらのうち 15 は H_2O_2 や細胞内で酸化的ストレスを生じさせる銅イオン処理に、また、12 は熱や変性蛋白質を生じさせる代謝阻害剤の処理に応答し、酸化的ストレスと蛋白変性ストレスがカドミウムの与える主要な影響である可能性が示唆された。

FDD で単離された遺伝子は、生体内でのカドミウムストレスの軽減に機能することが期待された。よって、単離した遺伝子の幾つかを酵母内で過剰発現させ、カドミウムに対する耐性を調べた結果、低温や乾燥ストレスに応答する ATMEKK1 遺伝子と、機能未知の遺伝子 CdI19 の形質転換体 2 種が、野生型より 2-5 倍高い Cd 耐性を示した。CdI19 にはモチーフ検索の結果、分子内に金属結合に機能するドメインと蛋白質を膜局在させるアミノ酸配列が見つかった。植物は通常、重金属イオンをキレート化などにより隔離して、悪影響を抑える機能が提唱されている。CdI19 はシロイヌナズナでこのような機能を担う因子である可能性が考えられた。

そこで、CdI19 の機能についてさらに研究を進めた。蛋白質は金属イオンとの結合で多くはその構造を変化させる。このため蛋白質の大まかな構造観測ができる円偏光二色性 (CD) 分光法により、大腸菌で発現させた CdI19 蛋白のスペクトルを測定した。その結果、蛋白質の二次構造を反映する 200-240nm の領域で、CD スペクトルはカドミウム、銅、水銀の添加により大きく変化する一方、コバルト、マンガン、カルシウムの添加ではほとんど変わらなかった。CdI19 がカドミウムなどと結合し、構造を変化させたためと考えられる。また CdI19 をタバコ BY2 細胞中で緑色蛍光蛋白 (GFP) との融合蛋白質として発現させると、細胞膜周辺に GFP に由来すると思われる強い蛍光が観測され、CdI19 が細胞膜上に存在する可能性が示唆された。

GUS 遺伝子をレポーターとして CdI19 遺伝子の 5 末端上流部 1Kb のプロモーター配列を組み込んだシロイヌナズナの形質転換体は、根の先端付近や中心柱の導管周辺、胚軸、葉柄、花芽の付け根付近で GUS 遺伝子の強い発現を示した。ノーザン解析から、CdI19 は処理後 4 時間でカドミウムのほか、水銀、鉄、銅、マンガンイオンにも応答し、mRNA 蓄積量を増加させることが分かった。CdI19 はこれらの組織で上述のイオンに応答して発現、機能し、地上部、さらに葉や花などの重要組織に不要な重金属イオンが侵入するのを防いでいる可能性が考えられる。

本研究は、カドミウムが植物体内で酸化的、蛋白変性ストレスを中心として様々な生理的变化を生じさせることを明らかにした。これに対応するため多数のシグナル伝達経路が活性化され、多くの遺伝子、蛋白質が発現、機能していることも示した。また、新たに得られた遺伝子の中で、CdI19 は重金属イオンと直接、相互作用し、植物体内における重金属イオンの隔離や恒常性維持に関与する因子であることが考えられた。これまで報告例の少ない植物と重金属との分子レベルでの関係について多くの新しい知見を得ることができ、今後、これらの結果の応用とさらなる研究により実用的な環境浄化植物の創出が実現できるものと期待している。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 鈴木伸昭

本研究では、実用的な環境浄化植物の創出を最終目標に、植物に与える重金属元素の影響を分子レベルで明らかにすることをテーマとした。実験材料にはシロイヌナズナ（アブラナ科）とカドミウムを選んだ。

本論文では、まず、シロイヌナズナに 0-0.5mM のカドミウム処理を行い、カドミウムによるシロイヌナズナの生理、形態的影響の観察を行った（第 1 章）。短期間の生長には目立った変化を与えない 0.15mM 程度の処理でも、根には深刻な害を与えること、それは特に生長点、つまり、盛んに分裂している細胞で顕著なことなどが分かった。こうしたストレスに対して遺伝子レベルでの対応を調べるために、蛍光ディファレンシャルディスプレイ（FDD）法による遺伝子 mRNA のスクリーニング、カドミウムストレスに応答する遺伝子の大規模単離、遺伝子レベルでカドミウムが引き起すストレスの同定などを行った（第 2 章）。その結果、カドミウムストレスに応答する 31 の遺伝子を単離した。それらを機能別に分類したところ、リン酸化などの関与するシグナル伝達経路にかかわるもの、 H_2O_2 や細胞内で酸化的ストレスを生じさせる銅イオンに応答するもの、熱など変性蛋白質を生じさせる因子に応答するもの、などが発見された。結局、酸化的ストレスと蛋白変性ストレスがカドミウムの与える主要な影響であることが示唆された。得られた遺伝子の中から特に、重金属代謝に関わると予想される遺伝子・蛋白質の機能解析（第 3 章）へと研究を進めた。単離した遺伝子の幾つかを酵母内で過剰発現させ、カドミウムに対する耐性を調べた結果、低温や乾燥ストレスに応答する ATMEKK1 遺伝子と、機能未知の遺伝子 CdI19 の形質転換体 2 種が、野生型より 2-5 倍高い Cd 耐性を示した。CdI19 にはモチーフ検索の結果、分子内に金属結合に機能するドメインと蛋白質を膜局在させるアミノ酸配列が見つかった。実際、CdI19 をタバコ BY2 細胞中で GFP との融合蛋白質として発現させる結果、細胞膜上に存在することが示めされた。大腸菌で発現させた CdI19 蛋白はカドミウム、銅、水銀を強く結合したが、コバルト、マンガン、カルシウムには結合しなかった。これらの結果は CdI19 が重金属イオンと直接、相互作用し、植物体内における重金属イオンの隔離や恒常性維持に関与する因子であることを示唆する。

今後、これらの結果に基づいた応用研究により実用的な環境浄化植物の創出が実現できる可能性を開いたことは、本研究の大きな成果である。

以上のように、本論文はこれまで報告例の少ない植物と重金属との分子レベルでの関係について多くの新しい知見を与えるもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。