

細菌の金属トランスポーターを利用した ファイトレメディエーションのためのバイオエンジニアリング

清野正子¹⁾ 曾根有香¹⁾ 中條麻澄¹⁾ 佐藤雅彦²⁾
松居彩²⁾ 中村亮介¹⁾ 坂部貢^{1,3)}

- 1) 北里大学薬学部公衆衛生学教室
- 2) 京都府立大学生命環境学部細胞動態学研究室
- 3) 北里研究所病院臨床環境医学センター

Engineering expression of metal transporter in transgenic plant for metal phytoremediation

Masako Kiyono¹⁾ Yuka Sone¹⁾ Masumi Chujo¹⁾ Masa H. Sato²⁾
Aya Matsui²⁾ Ryosuke Nakamura¹⁾ Kou Sakabe¹⁾

- 1) Department of Public Health, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University
- 2) Faculty of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University
- 3) Division of Environmental Medical Center, Kitasato Institute Hospital

要約

環境中に放出された水銀、カドミウム、ヒ素はヒトに深刻な健康影響をもたらす。有害金属により汚染された土壌を浄化するための技術の一つとしてファイトレメディエーションが注目されている。現在、分子生物学的、遺伝子工学的技術を用いて植物に金属を高蓄積させるための技術開発が盛んに行われている。金属のファイトレメディエーションの具体例を論述すると共に、筆者らが行っている細菌の金属トランスポーターと植物のシンタキシン SNARE を輸送制御マーカーとして利用した金属のファイトレメディエーションの技術開発について紹介する。

Abstract

Excess toxic metals such as Hg, Cd or As in soils pose a major environmental and human health problem. Phytoremediation is thought to be an effective technology to remove toxic metals from soils. Now, with the advancements of molecular biology, scientists can use genetic engineering to improve the metal accumulation capacity of plants. The feasibility of bacterial metal transporter for environmental phytoremediation of toxic metal pollution was investigated. In the present study, to increase accumulation of metals from the polluted sites in the transgenic plant, engineering expression of bacterial metal transporter and plant SNARE (soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor attachment

受付：平成20年12月10日 採用：平成20年12月29日

別刷請求宛先：清野正子

〒108-8641 港区白金5-9-1 北里大学薬学部公衆衛生学教室

Received: December 10, 2008 Accepted: December 29, 2008

Reprint Requests to Masako Kiyono, Department of Public Health, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641 Japan

protein receptors) fusion protein were undertaken.

《Key words》 phytoremediation, bacterial metal transporter, SNARE, SYP121, AtVAM3

I. はじめに

わが国はメチル水銀に起因する水俣病、カドミウムに起因するイタイイタイ病、ヒ素に起因する慢性ヒ素中毒などの金属汚染による公害を経験した。現在、わが国や先進国における金属の汚染問題は、水俣地区等で代表されるような高濃度で局所的な汚染段階から、微量ではあるが長期間にわたる持続的かつ広範囲な汚染段階へと移行している。近年のIT産業の発展、石油・石炭をはじめとする化石燃料の消費、医療行為などの人間の社会活動により、微量ながらも持続的に金属が環境に排出され続けている。その結果、現在、有害金属の微量汚染によるヒトへの健康影響が懸念されている。金属の暴露は微量であっても、その毒性はタンパク質のチオール基への非特異的結合およびタンパク質の活性中心に存在する必須金属の有害金属への置換によるタンパク質の機能消失を引き起こすと考えられている。

微量金属の有効な除去方法がない現状では、生活環境に蓄積された金属の量は、低濃度ながらも増加するだけでなく、その汚染が広範囲に及んでいる。この状態のまま放置すると、金属による環境汚染はさらに拡大し、わが国が経験した公害で再度苦しむことが危惧される。このような状況下、環境中の金属の安全かつ有効な浄化法の開発が待ち望まれている。

本稿では、有害金属の中でも水銀、カドミウム、ヒ素に注目し、これらの用途と汚染の現状、また、これら金属のファイトレメディエーションによる浄化への可能性について述べる。次に、これまでに細菌などで報告されたトランスポーターのうち、金属輸送活性のあるものを臨床環境医学に資する立場から概説する。また、筆者らが研究を進めている金属トランスポーターを植物の標的器官にソートするためのバイオエンジニアリング(遺伝子組換え操作を利用した生物工学的技術の開発)に関する最近の知見について紹介し、最後に将来

を展望したい。

II. 金属の用途と汚染の現状

1. 水銀

水銀化合物は、有用な化学的・物理的性質をもつため古くから利用されてきた。749年に完成した奈良の大仏の建造の際には、金を約9トン、水銀を約50トン使用したとされる。この大仏の金メッキは金と水銀のアマルガムとして鑄銅仏に塗りつけたのち、大仏の内部から加熱して水銀を揮発させる手法により行われた。この大仏建立の際に起こった水銀中毒が、日本における最初の中毒事例であったという労働衛生史学的見解がある。近代産業の発達に伴い水銀の用途は、医薬品、農薬、生活必需品や化学触媒などとしてさらに広がった。医薬品として過去に汎用された水銀製剤の例をあげると、抗スピロヘータ剤として黄色酸化水銀、外用殺菌消毒剤として塩化第二水銀、マーキュロクロムやチメロサルなどが使用された。これらは毒性が強いために医薬品として使用されなくなったが、現在でもチメロサルは一部のワクチンの防腐剤として使用されている。また、国内外の歯科医療活動において水銀アマルガムも使用されている。次に、農薬としての利用例としては、稲イモチ病予防のために用いられた酢酸フェニル水銀があげられる。1968年にその使用が中止されるまでの間、約2300トンの酢酸フェニル水銀が農薬として狭いわが国土に散布された。一方、生活必需品の使用例としては、乾電池、水銀灯、蛍光灯、体温計などがあげられる。これらは現在でも使用されており、誤飲や廃棄する際のゴミの分別には注意を要する。化学工業での化学触媒としての使用例としては、アセトアルデヒド製造過程で使用された硫酸水銀があげられる。その製造過程で副生成物として生じたメチル水銀が水俣病の原因物質であることは周知の事実である。1971年頃までに水俣湾には約80トンに及ぶ水銀化合物が投

棄され、その結果、数十年間周辺住民に多大の苦痛を与えたことは記憶に新しい。水俣湾内の水銀含有ヘド口は、その後、多額の費用をかけて埋め立てられた。わが国の悲劇が教訓として生かされず、水俣湾と同様の水銀汚染が世界各地で起こっており、例えば、中国貴州省貴陽地方では1971年から2000年までの約30年の間に、約130トンに及ぶ水銀化合物が投棄された¹⁾。中国以外にも、ブラジル、ロシア、タンザニア、東南アジア地域などでは、金の採掘・工場排水等による高濃度の水銀化合物による環境汚染が依然として進行しており、わが国の悲劇が繰り返されようとしている。

2. カドミウム

カドミウムは、銅・銀・ニッケルなどの合金、鉄などの電気メッキ、携帯電話のニッカド (Ni-Cd) 電池、原子炉制御棒、ハンダ、顔料、合成樹脂安定剤などの用途がある。精錬工場などにおいて数年間、酸化カドミウムのフェームに経気道的に曝露された労働者においては、肺気腫、腎障害、蛋白尿を三大症状とする慢性中毒症を発症する。カドミウムの長期的な経口曝露による慢性毒性の例としては、神通川流域で発生したイタイイタイ病がある。この原因は上流の神岡鉱山から神通川へ流出したカドミウムであることが判明した。その後、非鉄金属鉱山で銅や亜鉛の採掘が盛んに行われたいくつかの地域で、銅や亜鉛の鉱石に共存するカドミウムが、製錬過程で排除されて鉱毒水や排煙として環境中に放出され、結果的に下流の川周辺の農用地のカドミウム汚染が問題となった。わが国は、カドミウムの生産量・輸入量を合わせると年間6000トンのカドミウムを消費している。カドミウムの消費量とニッカド電池の生産量は比例しており、ニッカド電池の国内流通量が多いこと、また、リサイクル率が低いことから、年間約1000トンのカドミウムが環境を汚染する可能性がある²⁾と推定されている。以上のほかにカドミウムの環境汚染の原因としては、化石燃料の燃焼、ゴミの焼却、リン酸肥料、下水汚泥および自動車排ガスが挙げられる。

3. ヒ素

ヒ素化合物の用途は、古代ギリシャ・ローマ時

代から既に知られており、顔料や歯神経壊死を目的とした歯科治療、また、自殺や他殺の手段として使用された。ヒ素の毒性はその化学形態により様々である。なかでも、亜ヒ酸の毒性は強く、急性中毒症状としては、嘔吐、下痢、腹痛、さらに血液循環不全・低血圧から死に至る場合がある。慢性中毒症状としては、腹部の色素沈着と色素脱色、手掌や足底部の角化症、さらにボーエン病、皮膚癌が認められる。わが国の亜ヒ酸の中毒事例として、和歌山毒物カレー事件が記憶に新しい。一方、諸外国において、地下水が自然由来の無機ヒ素で汚染されたバングラデシュやベトナムでは、地下水の灌水によって栽培されたイネ、コムギなどのヒ素汚染が報告されるとともに、汚染された地下水を飲用することによるヒトへの健康被害が報告されている^{3,4)}。現在、ヒ素の工業的用途としては、半導体であるガリウムヒ素 (GaAs) は発光ダイオードや通信用の高速トランジスタなどに用いられている。ヒ素の環境汚染の原因としては、鉱山、金属精錬、鋼鉄製造、化石燃料の燃焼、リン酸肥料、農薬などが挙げられる。

以上のように国内外を問わず、水銀、カドミウム、ヒ素をはじめとする金属の濫用・廃棄・漏出により、土壌・地下水などの生活環境が汚染された地域は多数存在する。環境中に放出された金属の安全かつ有効な浄化法の開発は全世界的な要望である。

Ⅲ. ファイトレメディエーションとは

上述のように人体に対して強い毒性をもたらす水銀、カドミウム、ヒ素はそれらの有用性から人間の日常生活に欠かせない物質であり、微量ながらも持続的に環境中に放出されている。微量であっても環境中に放出された金属は早急に浄化しなければならない。金属による土壌汚染サイトからの浄化法として現在よく用いられるのは物理化学的手法である。汚染土壌を掘削し、別の場所へ運び出して、新しく客土をすることであるが、短期間に除染できる長所を持つ反面、多大な費用を要するという短所も持っている⁵⁾。また、運び出した汚染土壌の廃棄処理の問題が生ずる。

近年、この物理化学的手法の欠点を補う技術としてバイオレメディエーションとよばれる生物学的手法が注目されている。バイオレメディエーションとは、一般に生物機能を活用して汚染環境を修復する技術である。この技術は、比較的低コストで、物理化学的処理では対応が困難な低濃度で広範囲な汚染に対して有効であると考えられている。昨今、このバイオレメディエーションのなかでも植物の生理機能を用いたファイトレメディエーション技術が脚光を浴びている^{6,7)}。身近なファイトレメディエーションの例としては、建物の外壁に生えたツタによる大気中の窒素酸化物やイオウ酸化物の浄化、湖の岸辺に群生するヨシによる流入汚水中の窒素やリンの浄化などがあげられる。この方法は、経済的な長所をもつ一方、浄化に要する期間が長いという欠点をもつ。この欠点を克服し、生物機能を利用した有害金属浄化技術をより確実なものにするためには、いくつかの点で創意工夫を施す必要がある。その工夫点としては、植物の生育が早く、バイオマスが大きいこと、根からの吸収効率を上げること、植物体が十分な金属耐性をもち、植物の地上部に高濃度の金属を蓄積・封入できることなどがあげられる。さらに、金属を高蓄積した植物は枯れる前に収穫され、土壌を再汚染しないように適切に処理されるとともに、将来的には植物に回収された金属のリサイクルが期待されている。しかしながら、金属リサイクルまでの道のりはまだ遠く、本稿では最初の段階の金属を植物に高蓄積する技術についてのみ注目する。

植物の地上部に金属を高蓄積させるための技術概念については、いくつかの考え方が存在しており、その概略を図1に示した⁸⁾。エンジニアリングの際に着目する点として、第一点は植物細胞質内における金属蓄積許容量をあげること、第二点は有害金属を液胞内へ隔離することである。図1-①の例として、Arazi T *et al.*⁹⁾はタバコ由来の*NiCBP4* 遺伝子を *Nicotiana tabacum* (タバコ) に組換えることによって、鉛耐性は変化しないが、鉛蓄積が野生株に比べて2倍増加したことを報告している。図1-②の例として、Zhu *et al.*¹⁰⁾は

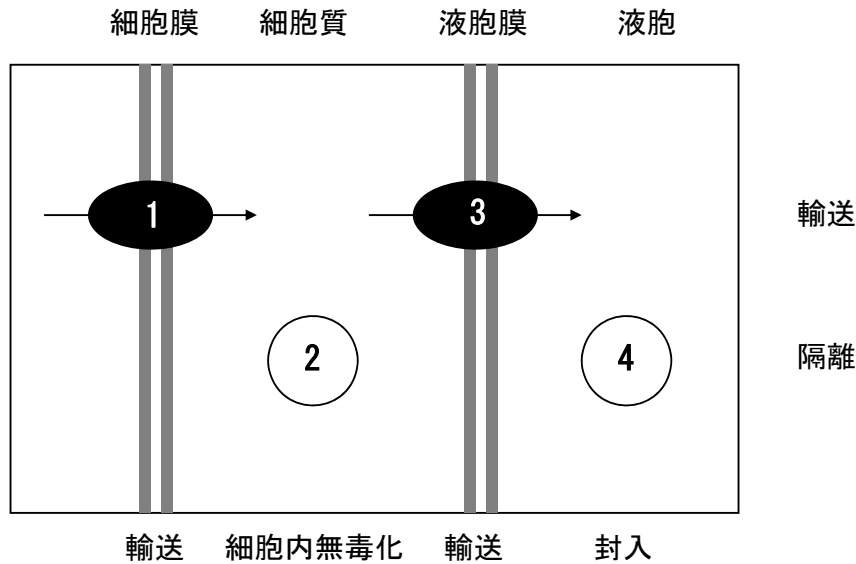
大腸菌由来の GSH Synthetase (グルタチオン合成酵素) 遺伝子を *Brassica juncea* (カラシナ) に組換えることによって、カドミウム耐性が上昇し、茎葉におけるカドミウム集積が40-90%増加したことを報告している。また、Hasegawa *et al.*¹¹⁾は酵母由来のメタロチオネイン遺伝子 (*CUP1*) を *Brassica oleracea* (カリフラワー) に組換えることによって、カドミウム耐性が上昇し、カドミウム集積量も増加したことを報告している。図1-③及び④の例として、Won-Yong Song *et al.*¹²⁾は酵母由来の *YCF1* 遺伝子を *Arabidopsis thaliana* に組換えることによって、カドミウム、鉛耐性が上昇し、地上部におけるカドミウム、鉛の集積量が2倍増加したことを報告している。カドミウム、鉛はそれぞれ2分子の GSH と結合した形で、液胞膜に存在するトランスポーター YCF1により液胞内に輸送され、GSH と結合した状態で液胞内に蓄積していることが示唆された。

筆者らは、環境中に放出された水銀、カドミウム、ヒ素をはじめとする金属のファイトレメディエーションの開発を目指している。金属高蓄積性植物の作出に際しては、(1)金属トランスポーターにより植物体への金属輸送能を上昇させること、(2)金属による植物体への毒性を軽減させるために、植物の解毒器官である液胞に金属を隔離させることの二点を重要視している。本系の特長は金属を植物の解毒器官である液胞に封じ込める形で蓄積させるため、金属の再溶出や再汚染の危険性が低く、開放系においても安全に適応できるという利点をもつことである。

IV. ファイトレメディエーションのためのエンジニアリング

1. 細菌の金属トランスポーター

環境に存在する細菌には金属に対して耐性を示すものが存在し、その多くが金属トランスポーターを保有することがこれまで数多く報告されている。上述の見地において、種々の金属トランスポーターのうち筆者らは、MerC、MerF、CadD、ArsBの4種に注目した。これらのトランスポーターの



- ① 金属トランスポーターによる金属の細胞内への輸送
- ② 細胞質内での金属結合タンパク質による無毒化
- ③ 金属トランスポーターによる金属の液胞内への輸送
- ④ 液胞内での金属の隔離

図1 金属高蓄積性植物の創生を目指した標的タンパク質について

うち MerC、MerF は水銀を取り込むトランスポーターとして同定されたが、MerC は水銀以外にもカドミウムを輸送することがのちに明らかにされている^{13~16)}。CadD はカドミウムの排出ポンプである¹⁷⁾。ArsB はヒ素を排出する¹⁸⁾。本研究で用いるトランスポーター遺伝子は、細菌の染色体、プラスミドまたはトランスポゾン上にコードされるオペロン中の構造遺伝子の一つとして存在している。図2に示すように、水銀、カドミウムのトランスポーター遺伝子の *merC* は水銀耐性オペロン (*mer* operon) 上に、水銀トランスポーター遺伝子の *merF* も *mer* operon 上に、カドミウムトランスポーター遺伝子の *cadD* はカドミウム耐性オペロン (*cad* operon) 上に、ヒ素トランスポーター遺伝子 *arsB* はヒ素耐性オペロン (*ars* operon) 上にそれぞれコードされている。研究に用いた *merC* は *Shigella flexneri* のトランスポゾン Tn21 上に、*merF* は *Xanthomonas*

sp のトランスポゾン Tn5053 上に、*cadD* は *Staphylococcus aureus* UT0007 のプラスミド pRW001 上に、*arsB* は *Staphylococcus aureus* のプラスミド pI258 上にそれぞれコードされている。

現在までに解明されたこれらのトランスポーターの機能について、MerC は TMD (transmembrane domain) が4回の膜タンパク質であり、無機水銀のみならずカドミウムを菌体の外から内へ取り込むことが知られている^{13~15)}。MerF は TMD が2回の膜タンパク質であり、無機水銀を菌体の外から内へ取り込むことが知られている¹⁶⁾。CadD は5回の TMD をもち、カドミウムを菌体の内から外へ排出することが知られている¹⁷⁾。ArsB は3価のヒ素を菌体の内から外へ排出する膜タンパク質であるが、TMDの数については明らかにはされていない¹⁸⁾。

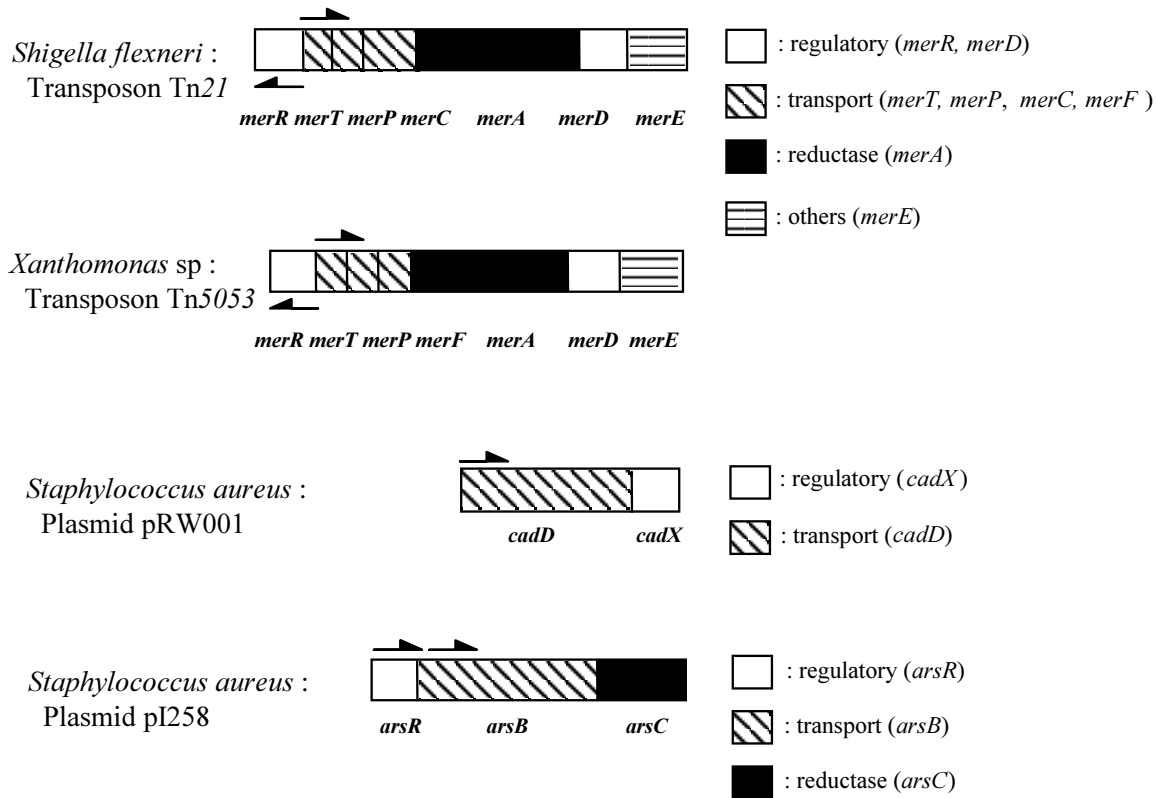


図2 細菌の金属耐性遺伝子の構造

2. SNARE ファミリータンパク質について

細菌の金属トランスポーターを用いたファイトレメディエーションの構想について述べる。筆者らは植物への金属の蓄積性を上昇させるためのエンジニアリングとして、細菌の種々の金属トランスポーター (MerC、MerF、CadD、ArsB) を細胞膜や液胞膜に発現させることが効果的であると考えた。しかしながら、細菌の金属トランスポーターを植物細胞の目的のオルガネラへ輸送させるためには、これらの膜タンパク質を標的器官にソーティングするための輸送制御マーカが必要となる。筆者らは、これらの金属トランスポーターを目的のオルガネラ膜へ輸送させるための輸送制御マーカとしてシロイヌナズナの SNARE (soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor attachment protein receptor) ファミリータンパク質に注目した。SNARE ファミリータンパク質は、真核生物のタンパク質小胞輸送系におい

て、輸送小胞が、目的の標的膜に融合する際に働いているタンパク質であり、輸送小胞に存在する R-SNARE と標的膜に存在する Qa、Qb 及び Qc-SNARE がそれぞれのオルガネラ膜系に特異的な複合体 (SNARE 複合体) を形成することにより、輸送小胞と標的膜との融合の特異性を決定している。

筆者らは、これらの SNARE 分子のシロイヌナズナの細胞内小器官への局在について詳細に解明しており¹⁹⁾、これまでに SNARE ファミリータンパク質のうち t-SNARE に属する SYP121 分子が細胞膜に、また AtVAM3 (SYP22) が液胞膜に、それぞれ特異的に局在することを見出した (図3)^{19~23)}。そこで、筆者らは細菌などの外来膜タンパク質の細胞内局在をコントロールする目的で、前述の金属トランスポーター (MerC、MerF、CadD、ArsB) と SYP121 あるいは AtVAM3 とを融合させたタンパク質をエンジニ

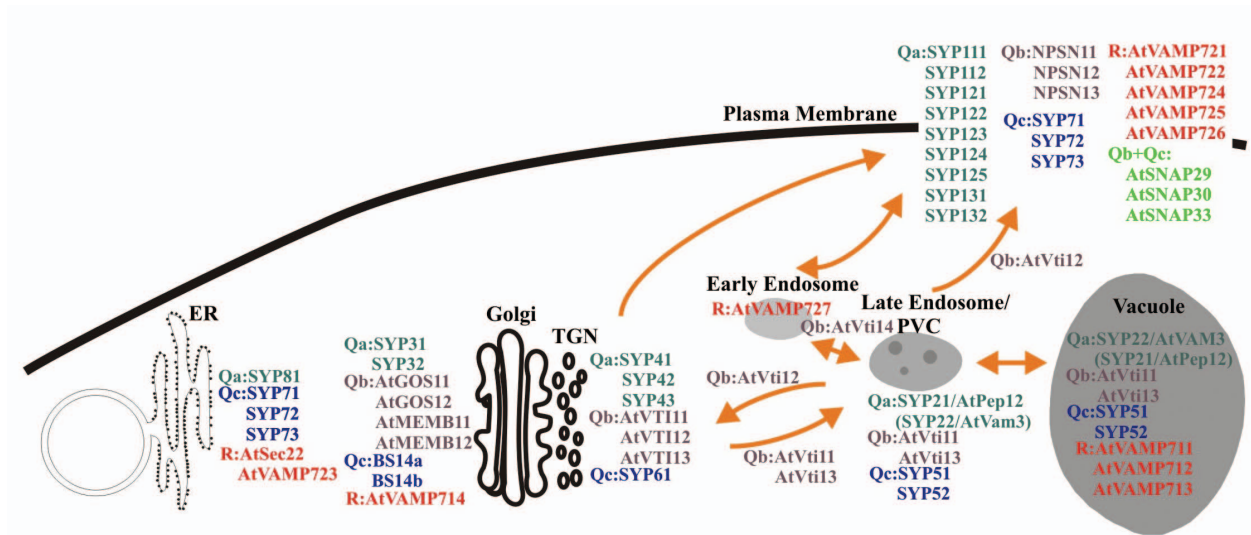


図3 植物の SNARE の細胞内局在と輸送モデル (文献19を改変)

アリングすることにより細胞膜や液胞膜へこれらの金属トランスポーターをソーティングさせることを試みた。尚、取り込み型と排出型の金属トランスポーターの両方を使用した理由としては、これらの金属トランスポーター (膜タンパク質) の植物細胞膜および液胞膜への配向性が不明であったからである。

3. SNARE による金属トランスポーターのターゲット器官へのソーティング

本研究では、種々の金属トランスポーターと細胞膜への輸送制御マーカーとして細胞膜 SNARE、SYP121または液胞膜への輸送制御マーカーとして液胞膜 SNARE、AtVAM3を融合した後、それらをそれぞれ植物ベクター CaMV35S-sGFP (S65T)-NOS3'に組換え、*gfp* 遺伝子を5'末端に融合させた融合遺伝子を、シロイヌナズナ培養細胞に発現させるコンストラクトを作成した。金属トランスポーター遺伝子の植物ベクターへの組換えプラスミドの構築については、PCR 法に従い、各金属トランスポーター遺伝子を増幅させた。各組換えプラスミドは、常法に従ってシロイヌナズナ培養細胞内に形質転換した。各組換えプラスミドをもつシロイヌナズナ培養細胞内における GFP の蛍光像および培養細胞の微分干渉顕微鏡像 (DIC) は図4から図7に示した。

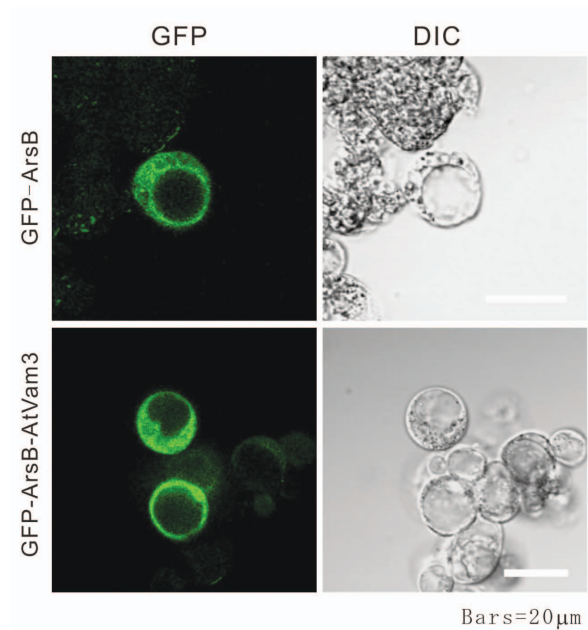


図4 シロイヌナズナ培養細胞における GFP-ArsB と GFP-ArsB-AtVam3の局在

まず最初に、ArsB に GFP を融合したときの培養細胞内における細胞内局在を調べた。図4に示すように、GFP-ArsB は核を中心としたネットワーク上の構造体に局在した。この局在パターンから、GFP-ArsB が小胞体にとどまっていることが示唆された。一方、液胞膜輸送制御マーカー

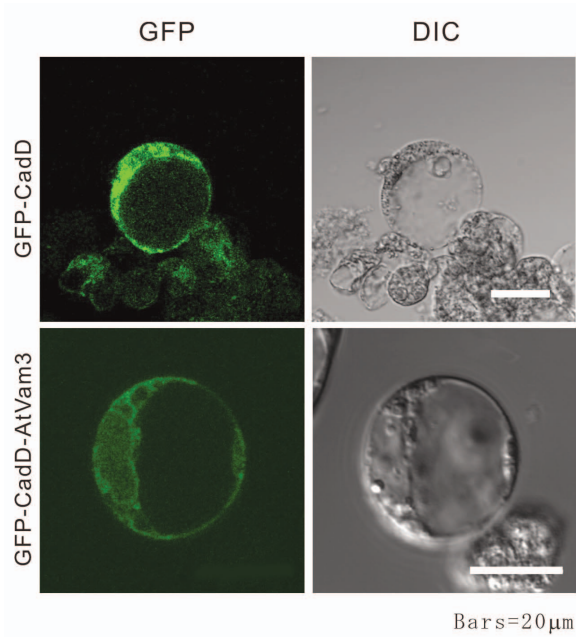


図5 シロイヌナズナ培養細胞における GFP-CadD と GFP-CadD-AtVam3の局在

を結合した GFP-ArsB-AtVam3においては、GFP-ArsB の局在と明確な差は観察されず、AtVam3の輸送制御における明確な効果は見られなかった。また、カドミウム輸送トランスポーターである CadD についても、輸送制御マーカを付加していない GFP-CadD、液胞膜輸送制御マーカを付加した GFP-CadD-AtVam3ともに小胞

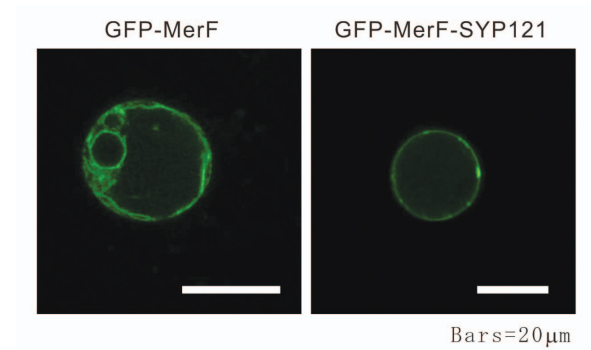


図6 シロイヌナズナ培養細胞における GFP-MerF と GFP-MerF-SYP121の局在

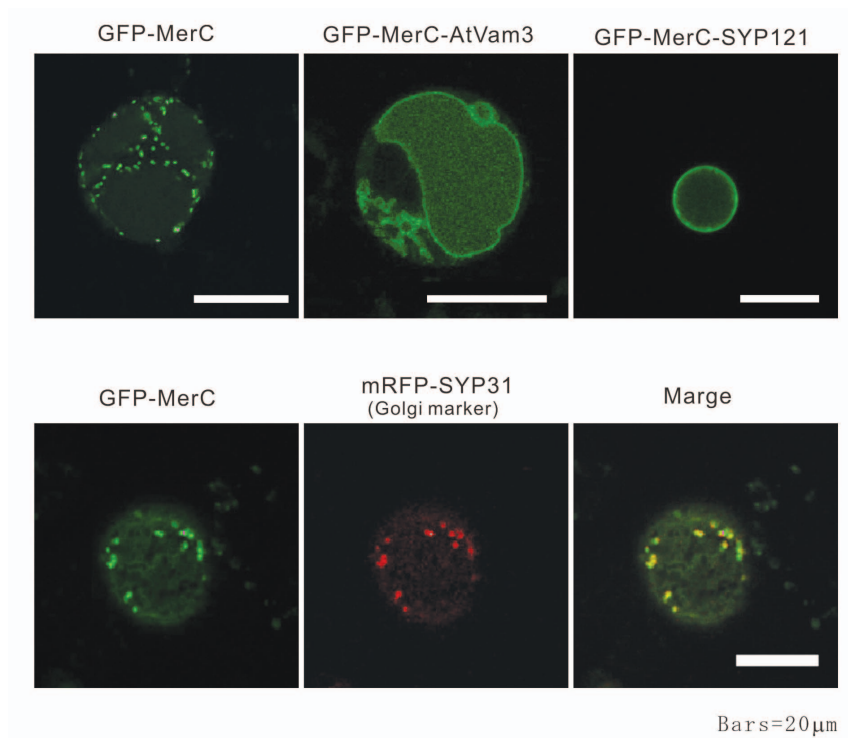


図7 シロイヌナズナ培養細胞における GFP-MerC と GFP-MerC-AtVam3と GFP-MerC-SYP121の局在

体に局在し、輸送制御マーカ付加による局在性の変化は観察されなかった (図5)。

以上の結果から、ArsB 及び CadD はそれぞれ細菌の細胞膜に存在する膜タンパク質であるが、植物培養細胞内での細胞内局在は細菌内の局在とは異なり細胞膜へ移行しないことが示唆された。

次に筆者らは、水銀トランスポーターである MerF と MerC について輸送制御マーカ付加の効果を検討した。図6に示すように輸送制御マーカを付加していない GFP-MerF は、GFP-ArsB、GFP-CadD と同様に小胞体に局在した。一方、細胞膜への輸送制御マーカである SYP121 を付加した GFP-MerF-SYP121 は、明確な細胞膜への局在パターンを示し、輸送制御マーカ SYP121 によって、GFP-MerF が細胞膜上へ輸送されることが示された。

GFP-MerC については、他の金属輸送体と異なり、細胞質内に点在することが示された。この GFP-MerC の斑点状に見える緑色のシグナルは、ゴルジ体 SNARE である SYP31 の赤いシグナルと重なると黄色く見えたことから、GFP-MerC はゴルジ体に局在することが明らかになった (図7下段)。一方、GFP-MerC に液胞膜輸送制御マーカ、AtVam3 または細胞膜輸送制御マーカ、SYP121 を付加した場合、それぞれ液胞膜、細胞膜へと局在が変化した (図7上段)。

以上の結果から、細菌の金属トランスポーターは、(1)種類によって細胞内への局在性に差異があるものの、そのままの形では植物細胞内の特定小器官へ移行させることが極めて困難であること、(2)輸送制御マーカとしての SNARE タンパク質の効果は、マーカを付加する金属輸送タンパク質によって大きく効果の差があるものの一定の効果があることが明らかとなった。

今後、SYP121 や AtVAM3 の分子全体ではなく、それぞれの分子中のどのアミノ酸配列が特定の小器官への移行性をコントロールしているのかという、移行性のメカニズムの詳細が明らかになれば、今回、移行性をコントロールできなかった各トランスポーター分子も実験的利用の可能性がある。

V. おわりに

シロイヌナズナ培養細胞における遺伝子の発現は一過性であり融合タンパク質の機能解析には不向きであることから、今後は、細胞内小器官として液胞をもつ酵母を用いた融合タンパク質の機能解析として、金属蓄積性及び耐性を評価する予定である。また、今回細胞膜および液胞膜へ局在をそれぞれコントロールできた因子である MerF-SYP121、MerC-SYP121、MerC-AtVAM3 については、シロイヌナズナへ遺伝子組換えし、金属耐性および蓄積性について検討する予定である。遺伝子組換え技術のファイトレメディエーションへの利用は、組換え植物が食糧生産を目的とするものではなく非食品であること、また環境に優しいイメージが強いことから、パブリックアクセプタンスを得る上でより受け入れやすいと考えられる。筆者らが指向する液胞膜へのトランスポーターの導入による吸収された金属を無毒化して蓄積させるための機構の強化が、より早く、より効率的な金属浄化のための組換え植物の開発につながると考えている。また、これにより通常の植物では対応が不可能であるような高濃度汚染地域の浄化への適応も可能になるであろう。

文献

- 1) Matsuyama A, Liya Q, et al: Distribution of methylmercury in an area polluted by mercury containing wastewater from an organic chemical factory in China. Bull Environ Contam Toxicol 73: 846-852, 2004
- 2) 深見元弘: 食の安全と元素循環 — 雑考. 季刊肥料, 103: 8-10, 2006
- 3) Huq SM, Joardar JC, et al: Arsenic contamination in food-chain: transfer of arsenic into food materials through ground-water irrigation. J Health Popul Nutr 24: 305-316, 2006
- 4) Phuong NM, Kang Y, et al: Abstracts of ESAFS 8: 99, 2006
- 5) 藤原靖: 土壌汚染対策法と重金属汚染土壌の浄化技術の現状と課題. 環境バイオテクノロジー

- ジー 2 : 117-126, 2002
- 6) Pilon-Smits E, Pilon M: Breeding mercury-breathing plants for environmental cleanup. *Trends Plant Sci* 5: 235-236, 2000
 - 7) 早川孝彦、栗原宏幸：重金属環境汚染に対するファイトレメディエーション技術の実用化へ向けて。環境バイオテクノロジー 2 : 103-116, 2002
 - 8) Tong YP, Kneer R, et al: Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends Plant Sci* 9: 7-9, 2004
 - 9) Arazi T, Sunkar R, et al: A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J* 20: 171-182, 1999
 - 10) Zhu YL, Pilon-Smits EA, et al: Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol* 121: 1169-1177, 1999
 - 11) Hasegawa I, Terada E, et al: Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (CUP1). *Plant and Soil* 196: 277-281, 1997
 - 12) Song WY, Sohn EJ, et al: Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nat Biotechnol* 21: 914-919, 2003
 - 13) Sahlman L, Wong W, et al: A mercuric ion uptake role for the integral inner membrane protein, MerC, involved in bacterial mercuric ion resistance. *J Biol Chem* 272: 29518-29526, 1997
 - 14) Sahlman L, Hagglof EM, et al: Roles of the four cysteine residues in the function of the integral inner membrane Hg²⁺-binding protein, MerC. *Biochem Biophys Res Commun* 255: 307-311, 1999
 - 15) Liebert CA, Watson AL, et al: The quality of *merC*, a module of the *mer* mosaic. *J Mol Evol* 51: 607-622, 2000
 - 16) Wilson JR, Leang C, et al: MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercuric ion transporters? *FEBS Lett* 472: 78-82, 2000
 - 17) Crupper SS, Worrell V, et al: Cloning and expression of *cadD*, a new cadmium resistance gene of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 181: 4071-4075, 1999
 - 18) Kuroda M, Dey S, et al: Alternate energy coupling of ArsB, the membrane subunit of the Ars anion-translocating ATPase. *J Biol Chem* 272: 326-331, 1997
 - 19) Uemura T, Ueda T, et al: Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct* 29: 49-65, 2004
 - 20) Sato MH, Nakamura N, et al: The AtVAM3 encodes a syntaxin-related molecule implicated in the vacuolar assembly in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 272: 24530-24535, 1997
 - 21) Uemura T, Yoshimura SH, et al: Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein. *Genes Cells* 7: 743-753, 2002
 - 22) Yano D, Sato M, et al: A SNARE complex containing SGR3/AtVAM3 and ZIG/VTI1 in gravity-sensing cells is important for *Arabidopsis* shoot gravitropism. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8589-8594, 2003
 - 23) Uemura T, Sato MH, et al: The longin domain regulates subcellular targeting of VAMP7 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 579: 2842-2846, 2005