
総説 シンポジウム2**水銀トランスポーターを利用した水銀のファイトレメディエーション**

清野正子¹⁾ 曾根有香¹⁾ 浦口晋平¹⁾
中村亮介¹⁾ 高根沢康一¹⁾ 坂部貢²⁾

1) 北里大学薬学部公衆衛生学教室

2) 東海大学医学部医学科基礎医学系生体構造機能学領域

Engineering expression of mercury transporter in transgenic plant for mercurials phytoremediation

Masako Kiyono¹⁾, Yuka Sone¹⁾, Shimpei Uraguchi¹⁾
Ryosuke Nakamura¹⁾, Yasukazu Takanezawa¹⁾, Kou Sakabe²⁾

1) Department of Public Health, School of Pharmacy, Kitasato University

2) Department of Human Structure and Function, Tokai University School of Medicine

要約

筆者らは、細菌の無機水銀・カドミウムのトランスポーターとして知られている MerC が、これら以外にもメチル水銀やフェニル水銀の輸送活性を有することを明らかにした。そこで環境中に放出された種々の重金属の浄化を目指し、MerC を利用したファイトレメディエーションの開発を行った。MerC を植物に発現させる際には、シロイヌナズナの SNARE ファミリーの一つである SYP121 を細胞膜タグ、AtVAM3 を液胞膜タグとしてそれぞれ用いた。シロイヌナズナ培養細胞において、MerC 単独では小胞体に発現したが、MerC-SYP121 は細胞膜に、MerC-AtVAM3 は液胞膜にそれぞれ発現した。MerC、MerC-SYP121、MerC-AtVAM3 を発現させたシロイヌナズナを作出したところ、いずれの MerC 組換え植物においても、水銀耐性および蓄積性ともに野生型株に比べて上昇した。筆者らが指向する MerC を利用したファイトレメディエーションは、浄化期間の短縮と効率の向上、さらに重金属複合汚染への対応が期待できる。

(臨床環境 24 : 71-78, 2015)

《キーワード》 phytoremediation, mercurials, bacterial heavy metal transporter MerC, SNAREs, SYP121, AtVAM3

Abstract

We reported the eukaryotic expression of a bacterial heavy metal transporter, i.e., MerC in the

受付：平成27年9月2日 採用：平成27年9月5日

別刷請求宛先：清野正子

〒108-8641 東京都港区白金5-9-1

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

Tn21-encoded mer operon, which can recognize and transport not only cadmium and mercuric ion but also methylmercury and phenylmercury into bacterial cells. This study evaluated the feasibility of transgenic Arabidopsis plants engineered to express the MerC for the phytoremediation of mercurials pollution. Arabidopsis soluble N-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptors (SNARE) molecules, including SYP121, and AtVAM3 were attached to the C-terminus of MerC to target the protein to various organelles. We found that GFP-MerC-SYP121 localized to the plasma membrane, whereas GFP-AtVAM3 localized to the vacuolar membranes in Arabidopsis suspension-cultured cells. To enhance the efficiency and potential of plants to sequester and accumulate mercury from contaminated sites, transgenic Arabidopsis plants expressing MerC, MerC-SYP121, or MerC-AtVAM3 were generated. Transgenic plants that expressed MerC, MerC-SYP121, or MerC-AtVAM3 were more resistant to mercury and accumulated more of this metal than wild-type Arabidopsis. These results demonstrated that expression of the bacterial mercury transporter MerC promoted the transport and accumulation of mercury in transgenic Arabidopsis, which may be a useful method for improving plants for the phytoremediation of mercury pollution.

(Jpn J Clin Ecol 24 : 71 – 78, 2015)

《Key words》phytoremediation, mercurials, bacterial heavy metal transporter MerC, SNAREs, SYP121, AtVAM3

I. はじめに

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、現在においても様々な有害金属が土壌、水質に残留している。特定有害金属（カドミウム、ヒ素、銅）が、平成24年度までに基準値以上で検出された地域は、累計134地域7,592haである。市街地の土壌汚染については、近年、事例が増加しており、平成24年度に土壌環境基準値以上の有害金属が検出された事例は906件、有害金属別では鉛、ヒ素、フッ素汚染が顕著である。地下水質については、平成24年度調査対象井戸の6.1%において、環境基準を超過する項目が見られ、有害金属ではヒ素汚染が顕著である。さらに世界では水銀汚染はブラジル、ロシア、中国など27ヶ国以上でみられ、今後、ヒトへの健康被害の拡大が懸念される。有害金属の安全で有効な除去法の開発は国内外において急務の課題である。

近年、環境汚染物質浄化技術の一つとして注目される植物浄化（ファイトレメディエーション）は、経済的かつ自然への影響が少ないという利点に対し、浄化期間と浄化効率における弱点をもつ。一方、自然界には、重金属汚染地域に生息する細菌が存在し、現在までに様々な重金属耐性菌

が単離されている。これらの耐性菌の重金属耐性遺伝子の植物浄化への利用は先の弱点克服に有効であると考えられる。

本稿では、有害重金属の中でも水銀に注目し、最初に筆者らがこれまでに解析した水銀耐性菌の水銀耐性機構について概説する。次に、耐性菌が有する水銀トランスポーターの機能解析およびこれらを用いた水銀のファイトレメディエーションに関する最近の筆者らの知見について紹介し、最後に将来を展望する。

II. 水銀耐性菌の水銀耐性機構

水銀化合物は生体成分、特にタンパク質のSH基に強い親和性をもつため強い殺菌作用を示す。しかし、水俣湾などの水銀汚染地域においては、水銀の毒性に耐え抜いた水銀耐性菌が存在する。現在までの種々の研究により水銀耐性菌の水銀耐性獲得機序は、1) 水銀化合物の菌体内への取り込みの減少¹⁾、2) 細菌が産生する硫化水素と水銀との反応による硫化水銀産生²⁾、3) 菌体内での水銀化合物のメチル化反応³⁴⁾、4) 菌体内での水銀化合物の還元・気化反応⁵⁸⁾の4つが知られている。このうちの1～3)の耐性機構は限られた細菌に見られるマイナーな現象であるが、4)はグ

ラム陰性菌・陽性菌を問わず、好気性細菌全般に見られるメジャーな現象であり、以下、概説する。

Pseudomonas K-62は、外村らにより酢酸フェニル水銀で濃厚に汚染された土壌から単離された水銀耐性菌であり、これまでに世界各地で単離された耐性菌の中でも最強の耐性を示す⁹⁻¹²⁾。筆者らは、これまでに*P. K-62*の水銀耐性機構を遺伝学的に詳細に解析してきた。最初に*P. K-62*は6本のプラスミド(82, 68, 56, 31, 26および8.5-kb)を保有しており、そのうちの26-kb(pMR26)および68-kb(pMR68)のプラスミドが本菌株の水銀耐性に関与することを明らかにした¹³⁾。次にpMR26およびpMR68上の水銀耐性遺伝子(*mer* operon)をそれぞれクローニングし、その構造と機能を解析した。pMR26上には、*merR*⁻ o/p-*merT*⁻ *merP*⁻ *merA*⁻ *merG*⁻ *merB1* および *merR*⁻ o/p-*merB2*⁻ *merD* から構成された有機水銀化合物の分解を司る二組の *mer* operon が存在することを明らかにした^{14,15)}(図1)。この *mer* operon は、構造遺伝子の発現を制御する調節因子 MerR、オペレーター・プロモーター o/p、ペリプラズムで水銀との結合に関与する水銀結合タンパク質 MerP、水銀の膜透過に関与するトランスポーター MerT^{16,18)}、フェニル水銀の取り込み抑制タンパク質 MerG¹⁹⁾、有機水銀を無機水銀に分解する有機水銀リアーゼ MerB1、MerB2²⁰⁾、無機水銀を金属水銀に還元する水銀レダクターゼ MerA およびオペロン終末プロモーター MerD から構成された(図1)。一方、pMR68上には、*merR*⁻ *orf4*⁻ *orf5*⁻ o/p-*merT1*⁻ *merP1*⁻ *merF*⁻ *merA*⁻ *merB1*、*merT2*⁻ *merP2* および *merB2* の3つのクラスターから構成された *mer* operon が存在することを明らかにした²¹⁾。現在、新規遺伝子 *orf4* および *orf5* の機能を解析しているところである。

一般に水銀耐性菌は、plasmidあるいはtransposon上に存在する *mer* operon により支配される。菌体外の無機水銀はペリプラズムに存在する水銀結合タンパク質 MerP に結合した後、内膜に存在する水銀トランスポーター MerT により菌体内に取り込まれる。メチル水銀をはじめとする有機水銀はリアーゼ MerB により無機水銀に分解さ

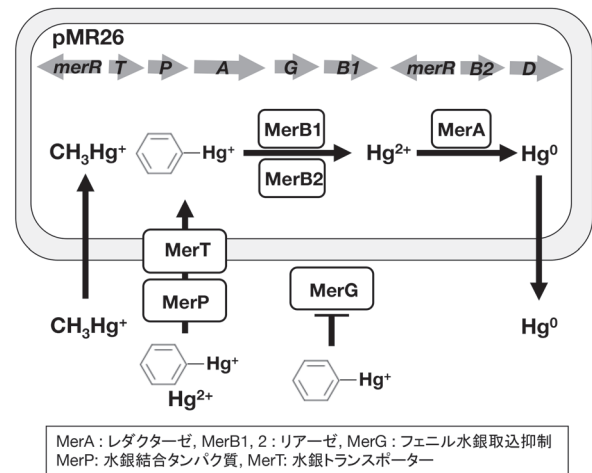


図1 細菌の水銀耐性機構

れ、次いで、レダクターゼ MerA により還元され、金属水銀 Hg^0 となり菌体外に放出されることで、水銀耐性を獲得している(図1)。以上のように、*P. K-62*の pMR26 および pMR68 の *mer* operon 上の水銀耐性遺伝子は、他の耐性菌と比較して配列順序がユニークであり、また、その種類・数ともに大幅に上回っていた。この中でも注目すべきは、水銀トランスポーター MerT-MerP、有機水銀リアーゼ MerB および無機水銀レダクターゼ MerA のアイソザイムを複数保有している点であり、このことが本菌の高い水銀耐性を支持していると考えられる^{14,15,21)}。

種々の有害金属耐性菌の中でも、有害金属を積極的に菌体内に取り込むトランスポーターは水銀の Mer 産物以外には見出されていない。例えば、ヒ素、鉛、銀に対する耐性菌はこれらの有害金属を菌体内から菌体外に排出するポンプを有しており、これにより耐性を獲得している^{7,22)}。水銀については種々の水銀の形態を最終的に金属水銀に代謝し、これを揮発・蒸散させることが耐性菌にとっては有利であり、他の有害金属とは異なる機構が発達したのではないかと思われる。筆者らは種々の有害金属耐性菌の中でも唯一菌体外から菌体内に輸送する活性を有する水銀トランスポーターに注目し、環境浄化への利用性について次に検討した。

Ⅲ. 細菌の水銀トランスポーター

水銀耐性菌から同定された水銀トランスポーターはMerT以外にもMerC, MerE, MerFが存在する。筆者らはこれまでにMerEが水銀トランスポーターであり、無機水銀のみならずメチル水銀を輸送すること^{23,24)}、MerTがフェニル水銀を輸送すること¹⁸⁾などを明らかにしてきた。しかしながら、これらのトランスポーターの機能については未だ不明な点が多く残されていた。つまり、環境浄化に用いるにはどのトランスポーターが最も適しているのかははっきりしていなかった。そこで、筆者らはこれらの水銀トランスポーターMerC, MerE, MerF, MerTの無機水銀およびフェニル水銀に対する輸送活性について検討した。

P. K-62由来のpMR26上の水銀調節遺伝子(*merR-o/p*)の下流に*Shigella flexneri* R100由来の*merC*または*merE*、*Xanthomonas* sp pMER327/419由来の*merF*、pMR26由来の*merT*遺伝子をそれぞれ結合させた遺伝子をpKF19k vectorに組換え、plasmid pC7 (MerC)、pE4 (MerE)、pF17 (MerF)、pT5 (MerT)を構築した。各plasmidをそれぞれ大腸菌XL1-Blueに形質転換し、各種水銀化合物の取り込み活性と耐性を調べた結果を図2に示した²⁵⁾。無機水銀に対して、MerC, MerE, MerF, MerT組換え株はコントロールに比べ耐性がそれぞれ低下し(図2A)、無機水銀取り込み量が有意に上昇した(図2B)。MerCまたはMerT組換え株の耐性低下・取り込みの上昇がMerEまたはMerF組換え株に比べて顕著であった。次にフェニル水銀に対して、MerC, MerE, MerF, MerT組換え株はコントロールに比べ耐性が有意に低下し(図2C)、フェニル水銀取り込み量がそれぞれ有意に上昇した(図2D)。また、それらの取り込み量はほぼ同等であった²⁵⁾。以上の結果から、MerE, MerF, MerT, MerCのいずれもが無機水銀およびフェニル水銀の浄化に利用にできる可能性が示された。つまり、これらのトランスポーターを植物に組換え、植物体に積極的に水銀を回収させることで環境浄化を指向するものである。さらに、この中でも活性の高いMerCが最も有力な候補因子であると考えら

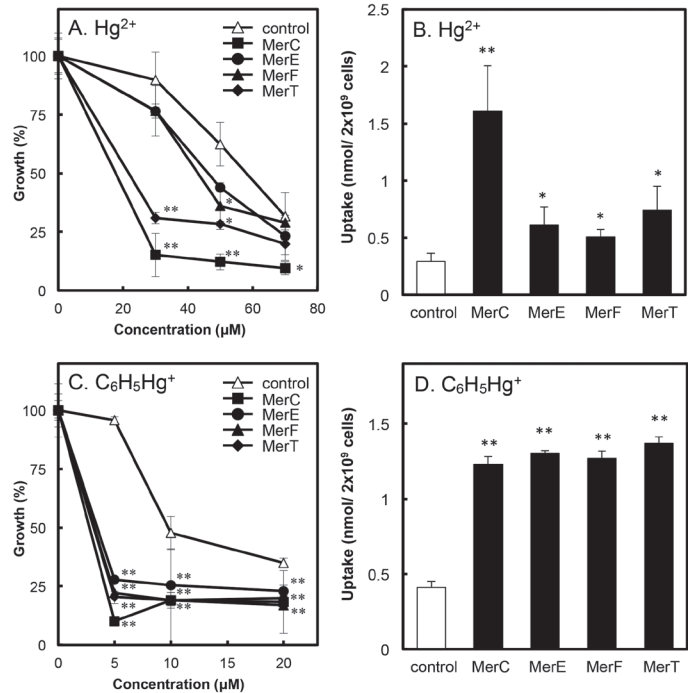


図2 水銀トランスポーターの機能 (文献25より改変)

れた。また、植物体の耐性が減弱する可能性については、後述の植物体の中での解毒器官への隔離などの工夫が必要であろうと考えられた。

Ⅳ. 水銀のファイトレメディエーション

有害金属の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をもっている。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注目されている²⁶⁻²⁹⁾。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重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。

有害金属高蓄積性植物の作出に際しては、(1) 重金属トランスポーターにより植物体への重金属輸送能を上昇させること、(2) 重金属による植物体への毒性を軽減させるために、植物細胞の解毒器官である液胞に重金属を隔離させることの二点を重要視している³⁰⁾。本系の特長は重金属を植物細胞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、重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。

これまでの知見を踏まえ、水銀輸送遺伝子 MerC を植物細胞内の特定の器官に発現させるエンジニアリングを新たにモデル植物であるシロイヌナズナに加えることにより、浄化効率のさらなる上昇をもたらすことができると考えた。しかしながら、細菌の水銀トランスポーター MerC 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シグナル因子が必要となる。筆者らは、MerC を目的のオルガネラ膜へ輸送させるためのシグナル因子としてモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の SNARE (soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor attachment protein receptor) に注目した³¹⁻³³⁾。シロイヌナズナ由来の SNARE ファミリーの SYP121 は細胞膜に、AtVAM3 は液胞膜にそれぞれ特異的に局在する膜タンパク質である³⁴⁾。

筆者らは、MerC に膜輸送タグとして SYP121 または AtVAM3 を融合させたタンパク質 (MerC-SYP121、MerC-AtVAM3) を発現させた遺伝子組換え植物を構築し、水銀に対する耐性と蓄積性を指標とした機能解析を行った^{35,36)}。Tn21 由来 merC 遺伝子、細胞内局在因子融合タンパク質 merC-SYP121、merC-AtVAM3 遺伝子は、それぞれ *gfp* と融合させた形で、植物培養細胞用ベクターに組換え、シロイヌナズナ培養細胞に形質転換した。GFP-MerC、GFP-MerC-SYP121、

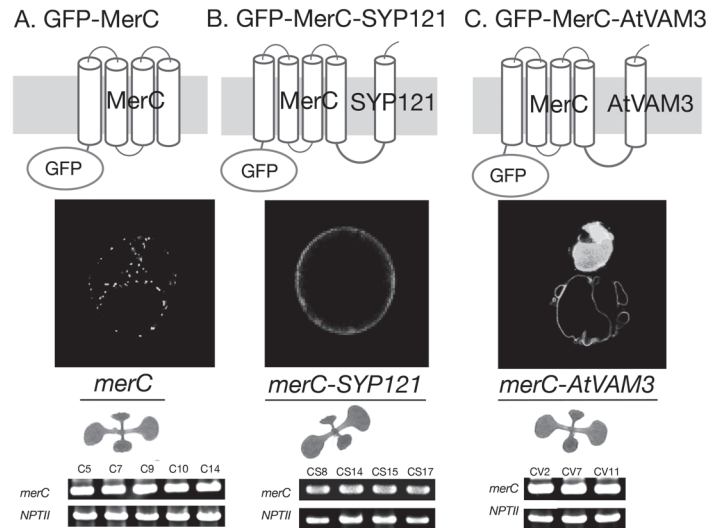


図3 植物における MerC の局在と発現 (文献36より改変)

GFP-MerC-AtVAM3 タンパク質の培養細胞内における局在は共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果、GFP-MerC は小胞体に局在するのに対し、GFP-MerC-SYP121 は細胞膜に、GFP-MerC-AtVAM3 は液胞膜に、それぞれ発現した (図3)³⁷⁾。次に、merC、merC-SYP121、merC-AtVAM3 遺伝子を植物ベクター pMAT137 に組換え、常法に従いシロイヌナズナに形質転換し、T₁ 種子を収穫した。その後、T₂ および T₃ 世代の種子を収穫するとともに、各段階の植物体を用いて、merC、merC-SYP121、merC-AtVAM3 遺伝子のゲノムへの組換えおよび mRNA の発現を調べた。ゲノム PCR により merC、merC-SYP121、merC-AtVAM3 遺伝子のゲノムへの組換え、RT-PCR により merC、merC-SYP121、merC-AtVAM3 遺伝子の mRNA 発現、Western blotting により merC、merC-SYP121、merC-AtVAM3 遺伝子の産物をそれぞれ確認した。T₁ 種子をカナマイシン培地で選抜したところ、merC 遺伝子組換え植物は17株、merC-SYP121 遺伝子組換え植物は20株、merC-AtVAM3 遺伝子組換え植物は15株得られた³⁷⁾。merC、merC-SYP121 または merC-AtVAM3 を組換えた株については、植物体としての形態に異常は認められず、野生型株と同様の発生・分化・生育を示した。これらの株の中から merC 遺伝子の植物ゲノムへの組換えが検出され、merC

の mRNA が発現した系統を抽出した。その結果、*merC* 遺伝子組換え植物は5株 (C5、C7、C9、C10、C14)、*merC-SYP121* 遺伝子組換え植物は4株 (CS8、CS14、CS15、CS17)、*merC-AtVAM3* 遺伝子組換え植物は3株 (CV2、CV7、CV11) 選抜した (図3)³⁷⁾。次に、それぞれの目的遺伝子をゲノムに保持し、 Hg^{2+} 存在下においても安定して mRNA が発現しているクローン C10 (*merC* 遺伝子組換え植物)、CS17 (*merC-SYP121* 遺伝子組換え植物)、CV11 (*merC-AtVAM3* 遺伝子組換え植物) を選抜し、以降の実験に用いた³⁸⁾。

植物体の水銀化合物に対する耐性および蓄積性については、常法に従い還元気化原子吸光度法を用いて検討した。水銀耐性について、C10、CS17、CV11は野生型株に比べてそれぞれ高い耐性を示した。CS17は、C10やCV11に比べても、高い耐性を示した。水銀蓄積性について、低濃度の場合、C10、CV11は野生型株とほぼ同等の蓄積性を示すのに対し、CS17は野生型株よりも高い蓄積性を示した。高濃度の場合、C10、CS17、CV11は野生型株に比べてそれぞれ高い蓄積性を示し、この中でも CS17において高い傾向がみられた (図4)³⁸⁾。以上の結果から、SYP121を用いて MerC を細胞膜に局在化したファイトレメディエーションは、水銀化合物の回収に適した技術であると考えられた。

今後は、CS17とCV11を交配することで、MerC を細胞膜と液胞膜に同時に発現する株を作出し、水銀の植物への取り込みの上昇と液胞への水銀の隔離による毒性の軽減を目指し、水銀浄化について検討する予定である。

V. おわりに

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重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、より効率的な重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 (図5)。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。

今後の研究のさらなる展望としては、植物の根

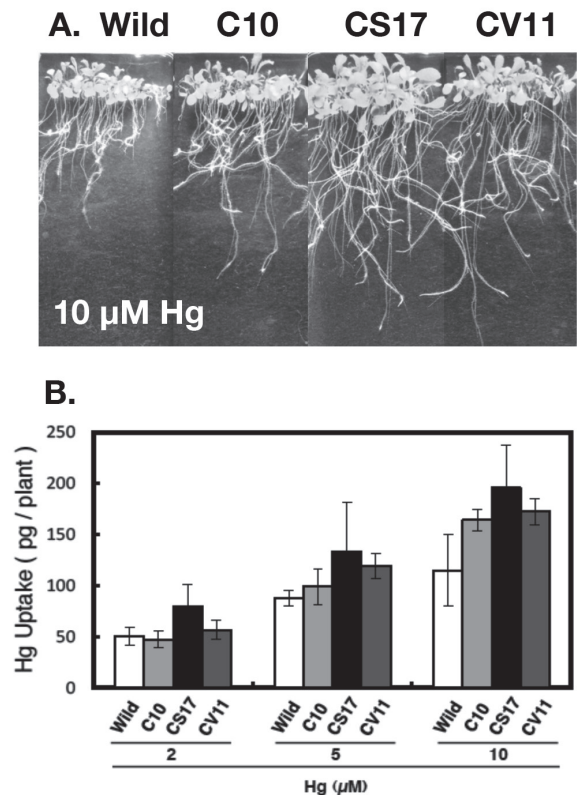
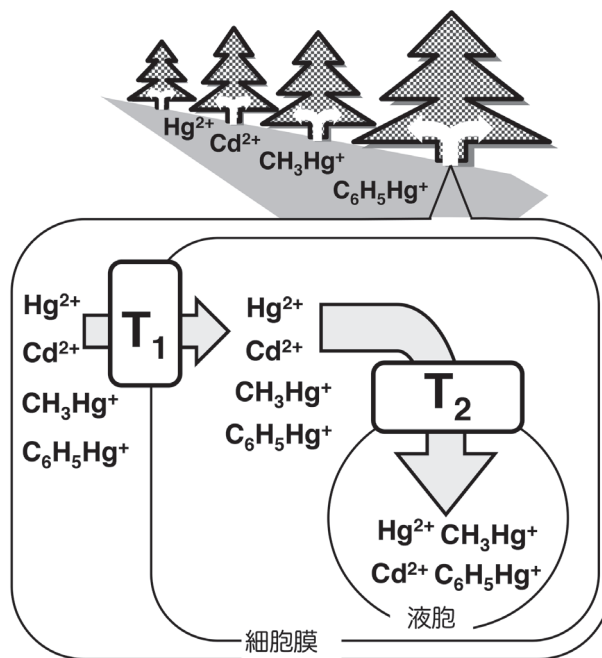


図4 MerC 組換え植物の水銀蓄積 (文献37より改変)



T: 重金属トランスポーター: MerC, MerE, MerF

T₁: 細胞膜型トランスポーター: Mer-SYP121

T₂: 液胞膜型トランスポーター: Mer-AtVAM3

図5 水銀トランスポーターを用いた有害金属複合汚染の浄化

の表皮、内皮、葉の葉肉細胞等の細胞型特異的なプロモーターに関する分子基盤を応用し、本プロモーターを制御化することで Mer 輸送体を特定の植物組織に発現するシステムを確立することが挙げられる。今回の SYP121 や AtVAM3 などの細胞内局在因子による膜局在の制御システムと融合することにより、微生物由来 Mer 輸送体を植物組織・細胞内レベルで精密に発現制御する植物体の構築を目指したいと考えている。つまり、有害金属複合汚染の浄化効率の上昇と浄化期間の短縮を達成し、かつ集積した有害金属の環境中への再拡散リスクの低い次世代型の植物浄化技術の開発が期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり多大なご協力を戴きました京都府立大学大学院生命環境科学研究科 佐藤雅彦准教授、摂南大学薬学部 芳生秀光名誉教授に深甚なる感謝の意を表します。また、北里大学薬学部公衆衛生学教室の大学院生 中村麻澄修士、宮原清美修士、岡由美子修士、東條博隆修士、望月優佑修士ならびに卒業研究生に深謝します。

参考文献

- Pan-Hou HS, Nishimoto M, et al: Possible role of membrane proteins in mercury resistance of *Enterobacter aerogenes*. Arch Microbiol 130: 93-95, 1981
- Pan-Hou HS, Imura N: Role of hydrogen sulfide in mercury resistance determined by plasmid of *Clostridium cochlearium* T-2. Arch Microbiol 129: 49-52, 1981
- Pan-Hou HS, Imura N: Physiological role of mercury-methylation in *Clostridium cochlearium* T-2C. Bull Environ Contam Toxicol 29: 290-297, 1982
- Pan-Hou HS, Imura N: Involvement of mercury methylation in microbial mercury detoxication. Arch Microbiol 131: 176-177, 1982
- Osborn AM, Bruce KD, et al: Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. FEMS Microbiol Rev 19: 239-262, 1997
- Silver S, Walderhaug M: Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. Microbiol Rev 56: 195-228, 1992
- Silver S, Phung LT: Bacterial heavy metal resistance: new surprises. Annu Rev Microbiol 50: 753-789, 1996
- Summers AO: Organization, expression, and evolution of genes for mercury resistance. Annu Rev Microbiol 40: 607-634, 1986
- Tomomura K, Maeda K, et al: Stimulative vaporization of phenylmercuric acetate by mercury-resistant bacteria. Nature 217: 644-646, 1968.
- Tezuka T, Tomomura K: Purification and properties of an enzyme catalyzing the splitting of carbon-mercury linkages from mercury-resistant *Pseudomonas* K-62 strain. I. Splitting enzyme I. J Biochem 80: 79-87, 1976
- Tezuka T, Tomomura K: Purification and properties of a second enzyme catalyzing the splitting of carbon-mercury linkages from mercury-resistant *Pseudomonas* K-62. J Bacteriol 135: 138-143, 1978
- Tomomura K, Kanzaki F: The reductive decomposition of organic mercurials by cell-free extract of a mercury-resistant pseudomonad. Biochim Biophys Acta 184: 227-229, 1969
- Kiyono M, Omura T, et al: Organomercurial resistance determinants in *Pseudomonas* K-62 are present on two plasmids. Arch Microbiol 163: 242-247, 1995
- Kiyono M, Omura T, et al: Nucleotide sequence and expression of the organomercurial-resistance determinants from a *Pseudomonas* K-62 plasmid pMR26. Gene 189: 151-157, 1997
- Kiyono M, Pan-Hou H: DNA sequence and expression of a defective *mer* operon from *Pseudomonas* K-62 plasmid pMR26. Biol Pharm Bull 22: 910-914, 1999
- Kiyono M, Omura T, et al: Lack of involvement of *merT* and *merP* in methylmercury transport in mercury resistant *Pseudomonas* K-62. FEMS Microbiol Lett 128: 301-306, 1995
- Uno Y, Kiyono M, et al: Phenylmercury transport mediated by *merT*-*merP* genes of *Pseudomonas* K-62 plasmid pMR26. Biol Pharm Bull 20: 107-109, 1997
- Kiyono M, Uno Y, et al: Role of *MerT* and *MerP* from *Pseudomonas* K-62 plasmid pMR26 in the transport of phenylmercury. Biol Pharm Bull 23: 279-282, 2000
- Kiyono M, Pan-Hou H: The *merG* gene product is involved in phenylmercury resistance in

- Pseudomonas* strain K-62. J Bacteriol 181: 726-730, 1999
- 20) Kiyono M, Uno Y, et al: Involvement of *merB* in the Expression of the pMR26 *mer* operon induced by organomercurials. J Health Sci 46: 142-145, 2000
 - 21) Sone Y, Mochizuki Y, et al: Mercurial-resistance determinants in *Pseudomonas* strain K-62 plasmid pMR68. AMB Express 3: 41, 2013
 - 22) Silver S: Exploiting heavy metal resistance systems in bioremediation. Res Microbiol 145: 61-67, 1994
 - 23) Sone Y, Pan-Hou H et al: 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.
 - 24) Kiyono M, Sone Y, et al: The MerE protein encoded by transposon Tn21 is a broad mercury transporter in *Escherichia coli*. FEBS Let 583: 1127-1131, 2009
 - 25) Sone Y, Nakamura R, et al: Role of MerC, MerE, MerF, MerT, and/or MerP in resistance to mercurials and the transport of mercurials in *Escherichia coli*. Biol Pharm Bull 36: 1835-1841, 2013
 - 26) Clemens S, Palmgren MG, et al: A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. Trends Plant Sci 7: 309-315, 2002
 - 27) Kramer U: Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. Curr Opin Biotechnol 16: 133-141, 2005
 - 28) Malik A: Metal bioremediation through growing cells. Environ Int 30: 261-278, 2004
 - 29) Ruiz ON, Daniell H: Genetic engineering to enhance mercury phytoremediation. Current Opinion in Biotechnology. 20: 213-219, 2009
 - 30) Kiyono M, Sone Y, et al: Engineering expression of metal transporter in transgenic plant for metal phytoremediation. Jpn J Clin Ecol 17: 108-117, 2008
 - 31) Sollner T, Bennett MK, et al: A protein assembly-disassembly pathway *in vitro* that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. Cell 75: 409-418, 1993
 - 32) Sollner T, Whiteheart SW, et al: SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature 362: 318-324, 1993
 - 33) Rothman JE: Mechanisms of intracellular protein transport. Nature 372: 55-63, 1994
 - 34) 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
 - 35) Kiyono M, Miyahara K, et al: Engineering expression of the heavy metal transporter MerC in *Saccharomyces cerevisiae* for increased cadmium accumulation. Appl Microbiol Biotechnol 86: 753-759, 2010
 - 36) Kiyono M, Sone Y, et al: Genetic expression of bacterial *merC* fused with plant SNARE in *Saccharomyces cerevisiae* increased mercury accumulation. Biochem Eng J 56: 137-141, 2011
 - 37) Kiyono M, Oka Y, et al: Expression of the bacterial heavy metal transporter MerC fused with a plant SNARE, SYP121, in *Arabidopsis thaliana* increases cadmium accumulation and tolerance. Planta 235: 841-850, 2012
 - 38) Kiyono M, Oka Y, et al: Bacterial heavy metal transporter MerC increases mercury accumulation in *Arabidopsis thaliana*. Biochem Eng J 71: 19-24, 2013