

# 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

## 分担研究報告書

### （2）個別食品のダイオキシン類汚染実態調査 （2-2）植物を利用した汚染浄化技術に関する基礎検討

分担研究者 天倉吉章 国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究要旨

これまでの個別食品のダイオキシン類実態調査から、食品汚染に影響を与える一因として土壌汚染があげられるため、その軽減を志向した対策研究として、植物を利用した浄化技術（ファイトレメディエーション）に関する予備検討を行った。ダイオキシン類浄化の可能性を模索するため、まず3種の脂溶性の有機塩素系農薬〔2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), alachlor, atrazine〕を対象とした。ホスト植物にはプラント・マスの大きなタバコをモデル植物とし、物質輸送能と改変するために広い基質特異性を有する ABC (ATP-binding cassette) タンパク質の MRP (multidrug resistance associated protein) サブファミリーの一種 MRP1 遺伝子を選択し、これを発現させた植物を実験植物体とした。本実験系で、形質転換 (MRP1) タバコ及び野生 (Wild) タバコの 3 農薬に対する抵抗性と吸収除去能について検討した結果、両タバコとも 2,4-D に対しては抵抗性が観察されなかったが、alachlor, atrazine に対しては MRP1 タバコに抵抗性が示され、特に atrazine では顕著な抵抗性の差が認められた。一方、3 農薬の吸収除去能については経日的な吸収は認められたが、両タバコ間に顕著な差は認められなかった。

#### 研究協力者

京都大学生存圏研究所

矢崎一史, 廣岡孝志

国立医薬品食品衛生研究所

佐々木久美子, 堤 智昭

#### A. 研究目的

平成 9 年度から始まった「ダイオキシン類総合調査研究事業」などにより、ダイオキシンの生成機構、汚染実態、汚染経路などが明らかとなり、それを基盤とした様々な削減対策が実施され、それ以降、我が国の一般社会における汚染レベルは減少傾向が認められている。また平成 9 年度から厚生労働科学研究の一環として継続的に行われているトータルダイエット試料による日常食からのダイオキシン類摂取量調査においても、ここ 5 年間は日本における耐容一

日摂取量 (4 pg-TEQ/kgbw/day) を下回る約 1.5 pg-TEQ/kgbw/day で横這いに推移しており、今後はこれら調査結果に基づいたダイオキシン汚染レベルの軽減に向けた具体的な方策を講じる研究を模索する必要がある。現在の食品中のダイオキシン濃度は、自浄能力だけでは除去出来ない残留した環境濃度が反映しており、汚染状況をゼロにすることは不可能に近い。今後の取り組みとして、環境に負担の少ない形でそれらをいかに取り除いていくか、その浄化システムの構築が課題の一つとして考えられる。そこでその取り組みの一案として、植物を使った環境浄化技術 (ファイトレメディエーション) の利用に着目した。

ファイトレメディエーションはランニングコストも低く、土壌などの環境資源の有効機能を損なうことなく修復することが期

待され、これまで主に重金属の浄化に関する検討が行われている。またダイオキシン類についての検討も少数例ある。しかしファイトレメディエーションはその可能性が期待される一方、多大な予備検討が要求され、実用化に向けてはクリアしなければならない問題も多い。

本研究では、ABC (ATP-binding cassette) タンパク質のもつ物質輸送能とその基質特異性の広さに着目し、これを植物細胞で分子ポンプとして機能させた遺伝子組換え植物を用いて、その体内へダイオキシン類を吸収することでこれを土壌中から効率的に除去する可能性を模索し、食品汚染濃度へ反映している現在の汚染レベルを軽減させることを目標とする。まずその予備検討の一つとして、ABC タンパク質 MRP (multidrug resistance associated protein) サブファミリーの一つである薬剤排出ポンプ MRP1 発現植物を実験植物として選択し、3種の有機塩素系農薬(除草剤)を対象にその可能性を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 試薬, 試液

有機塩素系農薬:

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) はナカライテスク製を用いた。Alachlor, atrazine は和光純薬工業製を用いた。その他の試薬はすべて特級又は高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

### 2. 植物体

ABC タンパク質サブファミリーの中の薬剤排出ポンプの一つであるヒト *mrp1* 遺伝子を導入、発現させたタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) を実験植物 (MRP1 タバコ) として使用した。野生株のタバコを対照植物 (Wild タバコ) として使用した。

### 3. 植物体の栽培

MRP1 発現体 (クローン名 P3) あるいは Wild タバコの種表面を、有効塩素濃度 5% の次亜塩素ナトリウムと 0.02% triton-X100

を含む水溶液を用いて滅菌処理した。これらの種を 1/2LS 寒天培地上で発芽させた後、25°C, 16 時間明-8 時間暗の照射条件下で3ヶ月から4ヶ月無菌栽培した。その後、さらに 1/10LS 液体培地 (1/2LS 液体培地を5倍希釈したもの) を用いて、25°C, 16 時間明-8 時間暗の照射条件下で1ヶ月間有菌水耕栽培したタバコを農薬耐性試験に供した。

1/2LS 培地の組成:  $H_3BO_3$  (3.09 mg),  $MnSO_4 \cdot nH_2O$  (12.05 mg),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (4.315 mg), KI (0.415 mg),  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  (0.121 mg),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (0.0125 mg),  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  (0.012 mg),  $KH_2PO_4$  (85 mg),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (185 mg),  $NH_4NO_3$  (825 mg),  $KNO_3$  (950 mg),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (220 mg),  $NaFeEDTA \cdot 3H_2O$  (21.055 mg), チアミン塩酸塩 (0.2 mg), イノシトール (50 mg), スクロース (15 g) を蒸留水 1 L に溶解し、pH5.8 とした。

## 4. 耐性試験

2,4-D, alachlor 及び atrazine をジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液 (1000 mg/L) とし、これを用いて各農薬含有 1/10LS 液体培地 (10 mg/L) を作成した。農薬含有液体培地 10 mL が入った遠沈管に各タバコを移植した後、14 mL まで農薬含有液体培地をメスアップした。これらタバコを、25°C, 16 時間明-8 時間暗の照射条件下で10日または14日間水耕栽培した。

## 5. 農薬測定

タバコ水耕栽培中、1日ごとに培地内の各農薬濃度を HPLC により測定した。測定条件は下記に従った。

使用機器: HPLC (Elite LaChrom system: 日立), カラム: Cosmosil 5C<sub>18</sub> MSII (ナカライテスク社製), 溶媒①: 50%アセトニトリル-1%酢酸 (1:1), 溶媒②: 50%アセトニトリル, 溶媒③: 60%メタノール (0.3%酢酸含), カラム温度: 40°C, 検出波長: 220, 254, 280 nm.

## C. 研究結果及び考察

### 1.3 農薬に対する MRP1 タバコの抵抗性

MRP1 及び Wild タバコ各 3 本を各農薬含有液体培地中で 10 日間水耕栽培した。2,4-D に暴露させた系では、両タバコとも栽培開始 16 時間後に葉に変化が生じ、4 日目には完全に枯れてしまった。従って、両タバコとも 2,4-D に対する抵抗性は弱く、その差は認められなかった。Alachlor を暴露させた系では、Wild タバコの葉に変化が生じ、培養 10 日目に枯れはじめ、MRP1 タバコに若干の抵抗性が示された。Atrazine 含有 1/10LS 液体培地では、栽培開始 7 日目に両タバコ間の形態に変化が観察され、10 日目に Wild タバコはすべて枯れてしまった。一方、MRP1 タバコは 1 本枯れたのみであった。また根の生育量に視覚的な差が観察された。そこで再度 atrazine に対する耐性試験を行い、再現性の確認を試みた。MRP1 及び Wild タバコ各 5 本について、atrazine 含有 1/10LS 液体培地で 14 日間水耕栽培を行った。その結果、前試験と同様、栽培 7 日目から両タバコ間で葉に変化が観察され始め、12 日目には明らかな抵抗性の差が示された。図 1 は両タバコの 12 日目の形態変化を示したもので、MRP1 タバコに atrazine に対する抵抗性が観察された。

### 2. MRP1 タバコの 3 農薬吸収除去能

図 2 に MRP1 及び Wild タバコを暴露させた液体培地中の 2,4-D, alachlor 及び atrazine の濃度変化を示す。両タバコにおいて経日的な 3 農薬の減少(吸収)は認められたが、両植物間における濃度変化の差はなく、顕著な除去能力の差は認められなかった。

### 3. 考察

MRP1 タバコの atrazine に対する除去能力は、Wild タバコと差を認めなかったが、抵抗力に差が認められたことは、耐性の高い植物個体を長期的に栽培することによって生長を続けるプラント・マスに atrazine

を溜め続けることを意味しており、土壌中の除去の可能性が示唆される。

ABC タンパク MRP1 は、輸送基質特異性が低く、化学構造に直接類似のない種々の抗がん剤、また様々な脂溶性の生体異物と直接結合し、ATP 加水分解エネルギーにより物質を排出させる。今回、これをタバコに発現させ、物質を液胞内へ輸送隔離することを期待した。一方で、MRP タイプの輸送体の場合、基質としては負電荷を持った化合物に親和性が高い傾向があり、特にグルタチオンなどの抱合体を良い基質として輸送することが知られている。今回供試した 3 種の農薬の植物体内での代謝については、triazine 系除草剤である atrazine と chloroacetoanilide 系除草剤である alachlor は、主に植物細胞内でグルタチオン抱合体として液胞に輸送されるのに対し、phenoxyalkanoic acid 系除草剤である 2,4-D は主にグルコース抱合体として輸送されると報告されている。本研究で用いた MRP1 はタバコで発現させるとその液胞膜に発現することも確認されている。これらをまとめて考察すると、MRP1 タバコが alachlor や atrazine に対して抵抗性を示したことは、タバコ細胞内にこれら 2 農薬のグルタチオン抱合体が MRP1 により液胞内に蓄積され、Wild タバコよりもその毒性発現速度が低下したことが考察される。一方、2,4-D については、MRP1 による輸送基質になれなかったことが考察される。今後、抱合体を含めた検討についても考慮する必要性が示唆された。

## D. 結論

形質転換株 (MRP1) と野生株 (Wild) のタバコの 3 種有機塩素系農薬 (2,4-D, alachlor, atrazine) に対する抵抗性と吸収除去能について検討を行った。その結果、2,4-D に対する抵抗性については、両タバコとも培養 4 日目で完全に枯れ、差は認められなかった。Alachlor に対しては、両タバコを比較した結果、MRP1 タバコに僅かな

抵抗性が認められた。Atrazine に対しては、Wild タバコと比較の結果、MRP1 タバコに明らかな抵抗性が認められた。一方、培地中の各農薬濃度を検討した結果、3 農薬とも両タバコ間に顕著な吸収除去能の差は認められなかった。

## E. 参考文献

- 矢崎一史：高等植物における ABC タンパク質スーパーファミリー，バイオサイエンスとインダストリー，**60**，17-22 (2002)。
- 土反伸和，矢崎一史：植物 ABC タンパク質スーパーファミリーの多様性，生化学，**76**，1221-1224 (2004)。
- 殷熙洙，渡邊栄喜，服部眞幸，西原英治，ダイオキシン類軽減・除去のためのファイトレメディエーション，第 12 回環境化学討論会講演要旨集，P180 (2003)。
- 竹田竜嗣，森田真弘，川村三郎，松本貞義，米虫節夫，沢辺昭義，草本植物による重金属の集積とファイトレメディエーションへの適用，第 12 回環境化学討論会講演要旨集，P814 (2003)。
- Barazani, O., Sathiyamaoorthy, P., Manandhar, U., Vulkan, R., Golan-Goldhirsh, A., Heavy metal accumulation by *Nicotiana glauca* Graham in a solid waste disposal site, *Chemosphere*, **54**, 867-872 (2004)。
- Ranbgsayatorn, N., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Lanza, G.R., Phytoremediation potential of *Spirulina (Arthrospire) platensis*: biosorption and toxicity studies of cadmium, *Environmental Pollution*, **119**, 45-53 (2002)。
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1(ABCC1) and related transporters, *Toxicology*, **167**, 3-23 (2001)。
- Asai, K., Takagi, K., Shimokawa, M., Sue,

T., Hibi, A., Hiruta, T., Fujihiro, K., Nagasaka, H., Hisamatsu, S., Sonoki, S., Phytoaccumulation of coplanar PCBs by *Arabidopsis thaliana*, *Environmental Pollution*, **120**, 509-511 (2002)。

- Coleman, J.O., Frova, C., Schroder, P., Tissut, M., Exploiting plant metabolism for the phytoremediation of persistent herbicides, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **9**, 18-28 (2002)。
- Hamburg, H., Puvanesarajah, V., Burnett, T.J., Barnekow, D.E., Premkumar, N.D., Smith, G.A., Comparative degradation of [<sup>14</sup>C]-2,4-dichlorophenoxyacetic acid in wheat and potato after foliar application and in wheat, radish, lettuce, and apple after soil application, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 146-155 (2001)。

## F. 研究業績

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

培養 12 日目



図1. Atrazine 暴露系におけるタバコ (Wild, MRP1) の抵抗性  
(培養 12 日目)

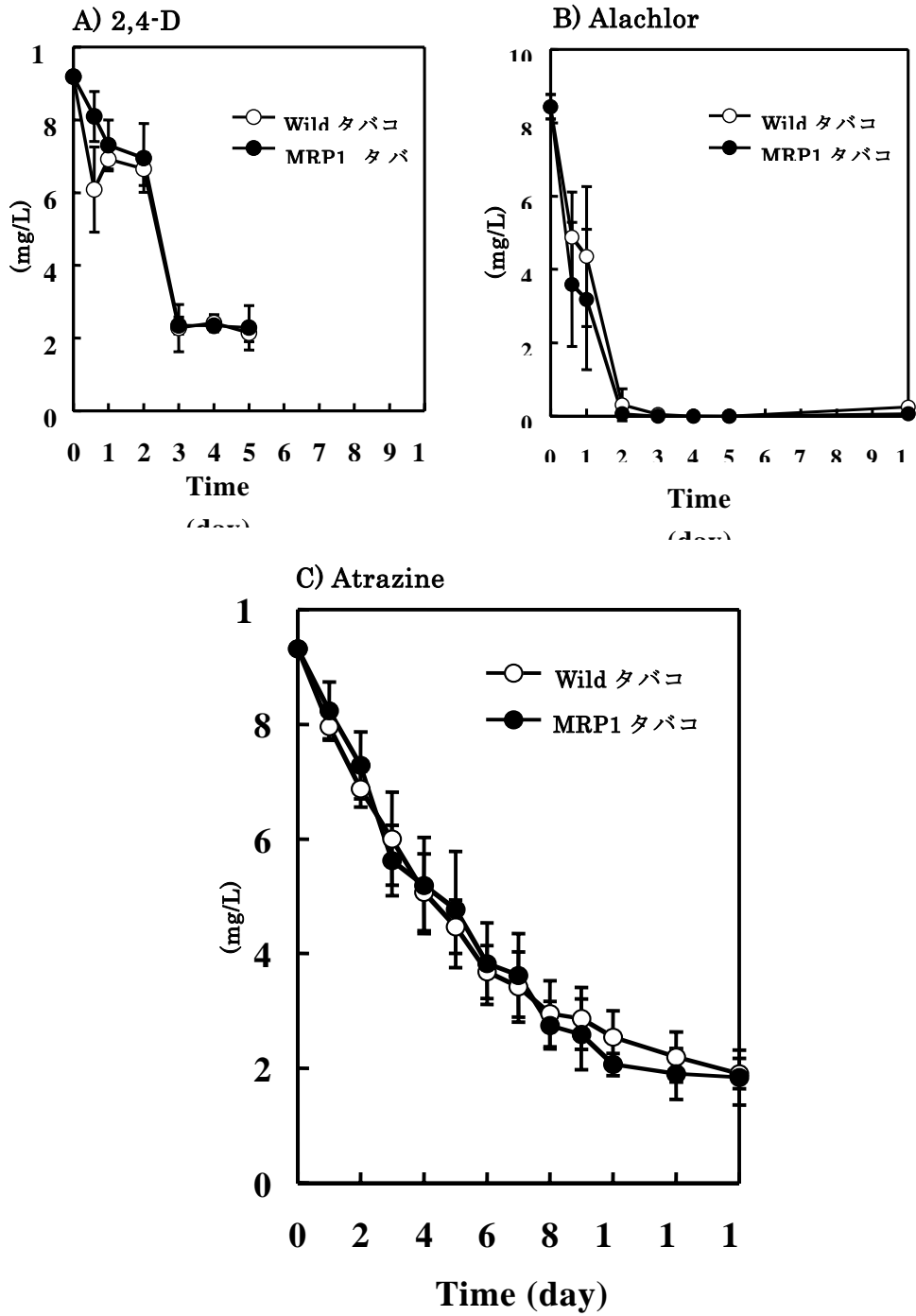


図2. タバコ(Wild, MRP1)の各有機塩素系農薬の吸収除去能 (n=3)  
 (A) 2,4-D, (B) Alachlor, (C) Atrazine