

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 松山大学 薬学部

研究要旨

食品中のダイオキシン汚染に影響を与える一因に土壤汚染があげられるため、その対策研究として植物を利用した浄化技術の適用に関する検討を行った。宿主植物にはプラント・マスの大きなタバコを選択し、物質輸送能と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、MRP1 を選択し、これを発現させたタバコを実験植物1とした。また同じ ABC タンパク質ファミリーの MDR(multidrug resistance)サブファミリー、CjMDR1 を発現させたシロイヌナズナを実験植物2とした。それぞれの実験植物について、一定量のダイオキシン(PCDD, PCDF, Co-PCB 類)を暴露し吸収除去能を検討したところ、全体的に低塩素体(4 塩素体)の吸収量が最も高く、高塩素になるに従い吸収量が低減する傾向が認められた。

実験植物1と野生株における吸収除去能を比較したところ、両者に顕著な差は認められず、むしろ野生株の方の吸収量が多く、ダイオキシン暴露量が高くなるとその傾向は顕著に認められた。一方、実験植物2と野生株における吸収除去能を比較したところ、全てのダイオキシンにおいて実験植物2の吸収量が多く、MDR1 植物体のダイオキシン汚染浄化植物としての可能性が示唆された。

研究協力者

京都大学 生存圏研究所

矢崎一史, 土反伸和

国立医薬品食品衛生研究所 食品部

佐々木久美子, 堤 智昭

松山大学 薬学部

吉田隆志

A. 研究目的

「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、汚染経路が明らかとなり、それらに基づいた様々な削減対策が講じられ、我が国の汚染レベルは減少傾向が認められている。トータルダイエツ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年間は耐容一日摂取量(4 pg-TEQ/kg 体重/日)を下回る約 1.5 pg-TEQ/kg 体重/日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環境残留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、環境負荷の少ない方法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用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。またダイオキシンについての検討も少数例ある。しかしその期待の一方で、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。

そこで本研究では、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、その体内へダイオキシン類を吸収、蓄積することで土壌中のダイオキシンレベルの効率的低減化の可能性を模索する。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(タバコ)を実験植物として選択し、17年度は3種の有機塩素系農薬(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, alachlor, atrazine)を対象に実験系の検討を行った。今年度はその実験系を適用し、MRP1 発現タバコのダイオキシン吸収除去能について検討を行った。一方で、同じABCタンパク質遺伝子ファミ

リーである MDR (multidrug resistance) サブファミリーの MDR1 発現植物(シロイヌナズナ)についても、ダイオキシン吸収除去能を併せて検討した。

B. 研究方法

1. 試薬、試液

ダイオキシン類およびコプラナーPCB 類混合標準品は、Wellington 社製 NK-ST-E (PCDD 類 5 種 (2,3,7,8-TeCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD, OCDD), PCDF 類 5 種 (2,3,7,8-TeCDF, 1,2,3,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF, OCDF))、および BP-CP81 (4 種 : 3,4,4',5-TeCB (#81), 3,3',4,4'-TeCB (#77), 3,3',4,4',5-PeCB (#126), 3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169))を用いた。その他の試薬はすべて特級を用いた。

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1 (MRP1 タバコ) とし、野生株のタバコを対照植物 (Wild タバコ) として使用した。またキンポウゲ科植物のオウレン (*Coptis japonica*) *mdr1* 遺伝子を導入、発現させたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を実験植物2 (CjMDR1 シロイヌナズナ) とし、野生株のシロイヌナズナを対照植物 (Wild シロイヌナズナ) として使用した。

3. 植物体の栽培

MRP1 発現体(実験植物1)および Wild タバ

コ: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, 1/2LS 培地を 40 mL 添加したプラントボックス内のフロリアライト 552(日清紡社製)に移植し, 25 , 16 時間明 - 8 時間暗の光照射条件下で 3~4 ヶ月無菌栽培したタバコ(MRP1 および Wild)を試験に供した。

MDR1 発現体(実験植物2)あるいは Wild シロイヌナズナ: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 を 40 mL 添加したプラントボックス内のフロリアライト 552 に蒔き, 21 , 16 時間明 - 8 時間暗の光照射条件下で 3~4 ヶ月無菌栽培したシロイヌナズナ(CjMDR1 および Wild)を試験に供した。

{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. ダイオキシン吸収実験

MRP1 発現体(実験植物1)および Wild タバコ:ダイオキシン類およびコプラナーPCB 類標準溶液をジメチルスルホキシド(DMSO)に転溶し, その一定量(PCDD/PCDF 類, Co-PCB 類各 30 ng, または PCDD/PCDF 類各 60 ng,

Co-PCB 類各 100 ng) を 1/2LS 液体培地 10 mL に溶解後, 実験植物が生育しているプラントボックス内へ暴露した。25 , 16 時間明 - 8 時間暗の光照射条件下で経過を観察し, 14 日後に植物を回収し, ダイオキシン測定試料とした。

MDR1 発現体(実験植物2)あるいは Wild シロイヌナズナ:ダイオキシン類およびコプラナーPCB 類標準溶液を DMSO に転溶し, その一定量(PCDD/PCDF 類, Co-PCB 類各 10 ng) を 1/2LS 液体培地 10 mL に溶解後, 実験植物が生育しているプラントボックス内へ暴露した。25 , 16 時間明 - 8 時間暗の光照射条件下で経過を観察し, 7 日後に植物を回収し, ダイオキシン測定試料とした。

5. ダイオキシン量測定

ダイオキシンの分析は, 「食品中のダイオキシン類測定方法ガイドライン(厚生省, 平成 11 年 10 月)」に従った。

C. 研究結果及び考察

1. MRP1 タバコ(実験植物1)のダイオキシン吸収除去能

MRP1 タバコ及び Wild タバコ各 10 ポット(10 株)を, プラントボックス中で実験可能な大きさとなる 3~4 ヶ月間栽培した後, ダイオキシンを暴露した。14 日間経過観察したところ, 両タバコとも枯れることなく生育し, 抵抗性に差は認められなかった。暴露後, 14 日目に植物体をそれぞれ回収し, ダイオキシン分析を行った。図1にその結果を示す。Wild タバコと MRP1 タバコ, とともにダイオキシンが検出された。特に 2,3,7,8-TeCDD の吸収除去能が顕著に認められたが, 高塩素体になるに従い, 低下する傾向

が認められた。この傾向は、PCDD 類のみならず、PCDF 類、Co-PCB 類においても同じだった。また高濃度のダイオキシンを暴露した系においても同様の傾向が認められた〔図 1(b)〕。

MRP1 タバコと Wild タバコにおける両植物間でのダイオキシン吸収除去能には差が認められず、高濃度では Wild タバコの方の吸収除去能が大きい結果となった。

2. MDR1 シロイヌナズナ(実験植物2)のダイオキシン吸収除去能

MDR1 シロイヌナズナ及び Wild シロイヌナズナ各 20 ポット(40 株)をプラントボックス中で3~4 ヶ月間栽培した後、ダイオキシンを暴露した。7 日間経過を観察したところ、両シロイヌナズナとも枯れることなく生育し、抵抗性に差は認められなかった。暴露後、7 日目に植物体をそれぞれ回収し、ダイオキシン分析を行った。図2にその結果を示す。両シロイヌナズナともにダイオキシンを検出した。特に 2,3,7,8-TeCDD の吸収除去能が顕著で、高塩素になるに従い、低下する傾向が認められた。この傾向は、PCDD 類のみならず、PCDF 類、Co-PCB 類においても認められ、タバコでの傾向と同じであった。

MDR1 タバコと Wild シロイヌナズナにおける両植物間での吸収除去能の差を見てみると、全てのダイオキシンにおいて MDR1 発現植物の方の吸収除去能が大きい結果となった。

3. 考察

MRP1 発現タバコにおいて、MRP1 はタバコ緑葉の液胞膜に局在し、生体異物を細胞質から液胞内に蓄積することが予想されている。この液胞内に異物を隔離蓄積する機能により、

MRP1 発現タバコはカドミウム等毒性物質に対して Wild タバコよりも耐性を示すと共に、蓄積量も多いことが報告されている(Yazaki et al., 2006)。そこで MRP1 タバコは、ダイオキシンも同様に液胞に蓄積し、耐性を示し、より吸収除去能が高いことが予想された。しかし今回のダイオキシン吸収除去能試験においては、両タバコ間で耐性に差は見られず、Wild タバコの方の吸収除去能が大きく、予想に反する結果となった。抵抗性に差が認められなかったことに関しては、低濃度のダイオキシンを暴露したことから、両植物間で顕著な毒性を示さなかったことも考えられる。一方、MRP1 タバコにおいて吸収除去能が低かった点については、MRP1 の発現および機能が組織間で異なることに由来する可能性が考えられる。MRP1 の発現は緑葉においては液胞局在であることが実証されているが、根における局在は明らかとされていない。異種細胞からの輸送体を植物において高発現させた場合、組織間で局在部位が異なる可能性がある。MRP1 は、根においては細胞膜で発現している可能性がある。この場合、ダイオキシンを暴露した MRP1 タバコは、根細胞膜に発現した MRP1 が細胞質から細胞外にダイオキシンを排出することになり、その結果吸収除去能が Wild タバコよりも低くなると予想される。低濃度のダイオキシン暴露(30 ng)においては吸収除去能に差が見られなかったが、この点については MRP1 の発現レベルおよび基質認識が低かったためではないかと考えられる。今後、根における MRP1 の発現部位を確認する必要があるが、本仮説が確かめられた場合、ダイオキシンを逆に取り込まなくなる新規植物の分子育種が可能となると期待される。

MDR1 シロイヌナズナに発現させた CjMDR1 は、オウレンにおいては細胞膜に発現し、生体内基質であるベルベリンアルカロイドを細胞外から細胞内に取り込む輸送体である。その輸送基質は比較的選択性が高いとされるが、4-Nitroquinoline-*N*-oxide など化学構造上かなり異なる化合物をも基質とすることが報告されている (Shitan et al., 2003)。そこで CjMDR1 を発現させたシロイヌナズナは、ダイオキシンを基質として細胞外から細胞内に取り込み、結果として吸収除去能が高まることが期待された。今回のダイオキシン処理において、MDR1 発現シロイヌナズナでより吸収除去能が高かったことは、期待に添う結果となった。また、全てのダイオキシンについて吸収除去能が高かったことから、発現させた MDR1 はシロイヌナズナ中、広い基質認識を示して細胞内に取り込んだと期待される。これらの結果から、今回用いた MDR1 シロイヌナズナには、ダイオキシン浄化植物としての可能性が示された。

D. 結論

形質転換株 (MRP1) と野生株 (Wild) のタバコのダイオキシンに対する吸収除去能について検討を行った。その結果、ダイオキシンに対する抵抗性について差は認められず、また吸収除去能についても顕著な差は認められなかった。

一方、形質転換株 (CjMDR1) と野生株 (Wild) のシロイヌナズナのダイオキシン吸収除去能について検討した結果、ダイオキシンに対する抵抗性には差は認められなかった。吸収除去能については、CjMDR1 株の方が優れており、MDR1 植物体のダイオキシン浄化植物としての可能性が示唆された。

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ノベーション*, **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) .
- ・ Shitan, N., Bazin, I., Dan, K., Obata, K., Kigawa, K., Ueda, K., Sato, F., Forestier, C., Yazaki, K., Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transporter in *Coptis japonica*, *PNAS*, **100**, 751-756 (2003).
- ・ Yazaki, K., ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites, *FEBS Letters*, **580**, 1183-1191 (2006).
- ・ Yazaki, K., Yamanaka, N., Masuno, T., Konagai, S., Kaneko, S., Ueda, K., Sato, F., Heterologous expression of a mammalian ABC transporter in plant and its application to phytoremediation, *Plant Mol. Biol.*, **61**, 491-503 (2006).

- 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., Fujihira, K., Nagasaka, H., Hisamatsu, S., Sonoki, S., Phytoaccumulation of coplanar PCBs by *Arabidopsis thaliana*, *Environmental Pollution*, **120**, 509 - 511 (2002).

F. 研究業績

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

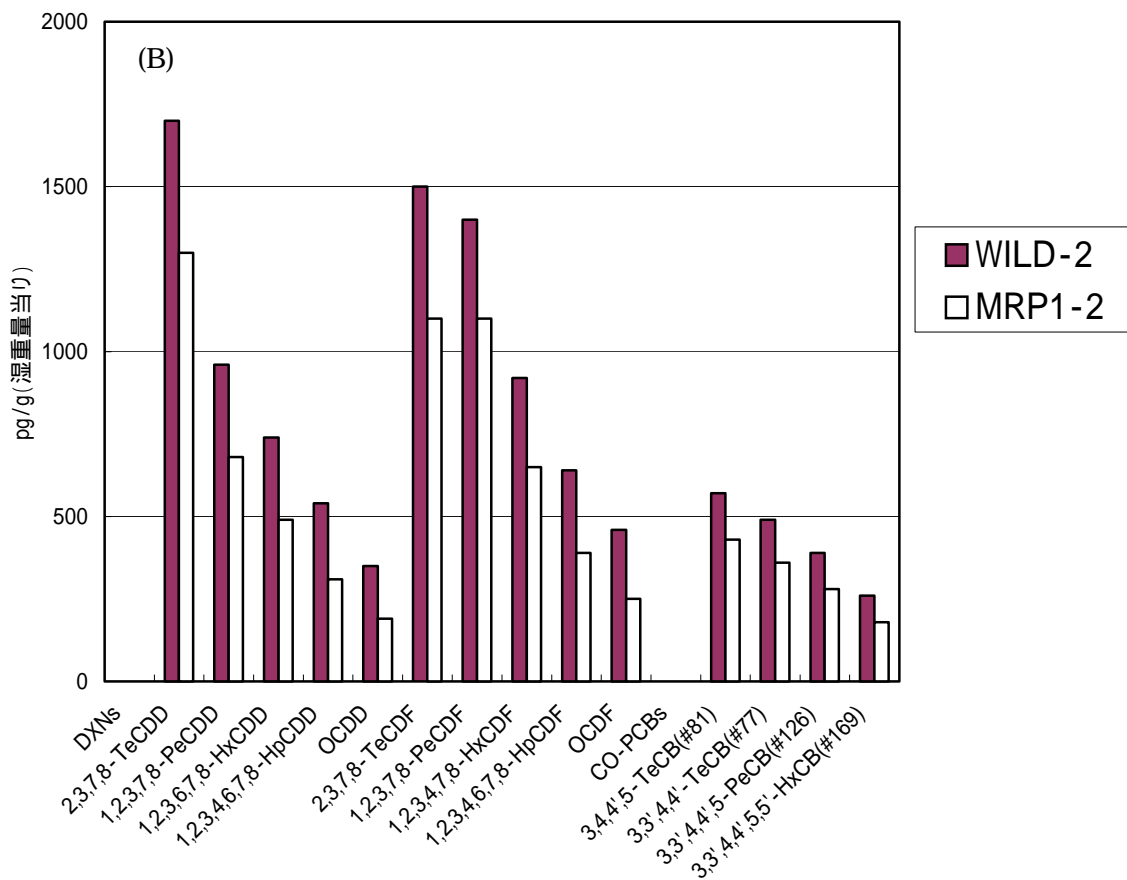
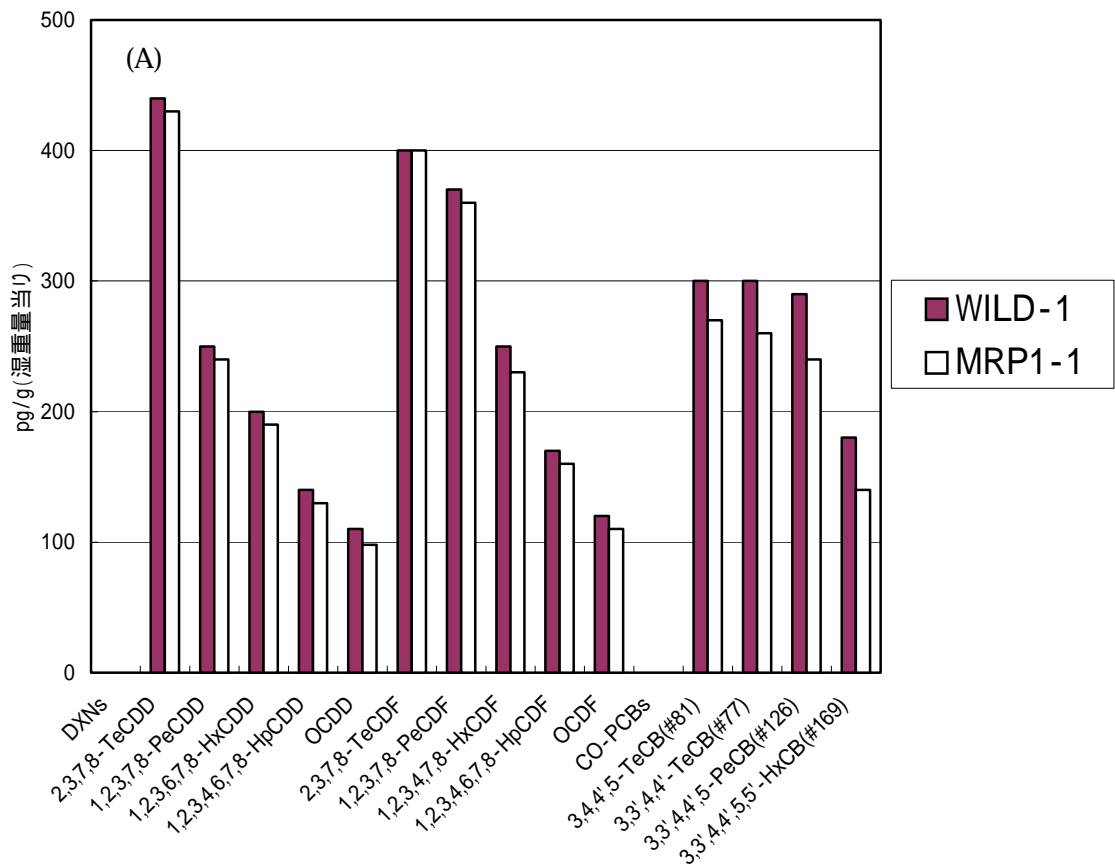


図1. タバコ(Wild, MRP1)のダイオキシンの吸収除去能
 (A) PCDD/PCDF 類, Co-PCB 類 各 30 ng 暴露
 (B) PCDD/PCDF 類 各 60 ng, Co-PCB 類 各 100 ng 暴露

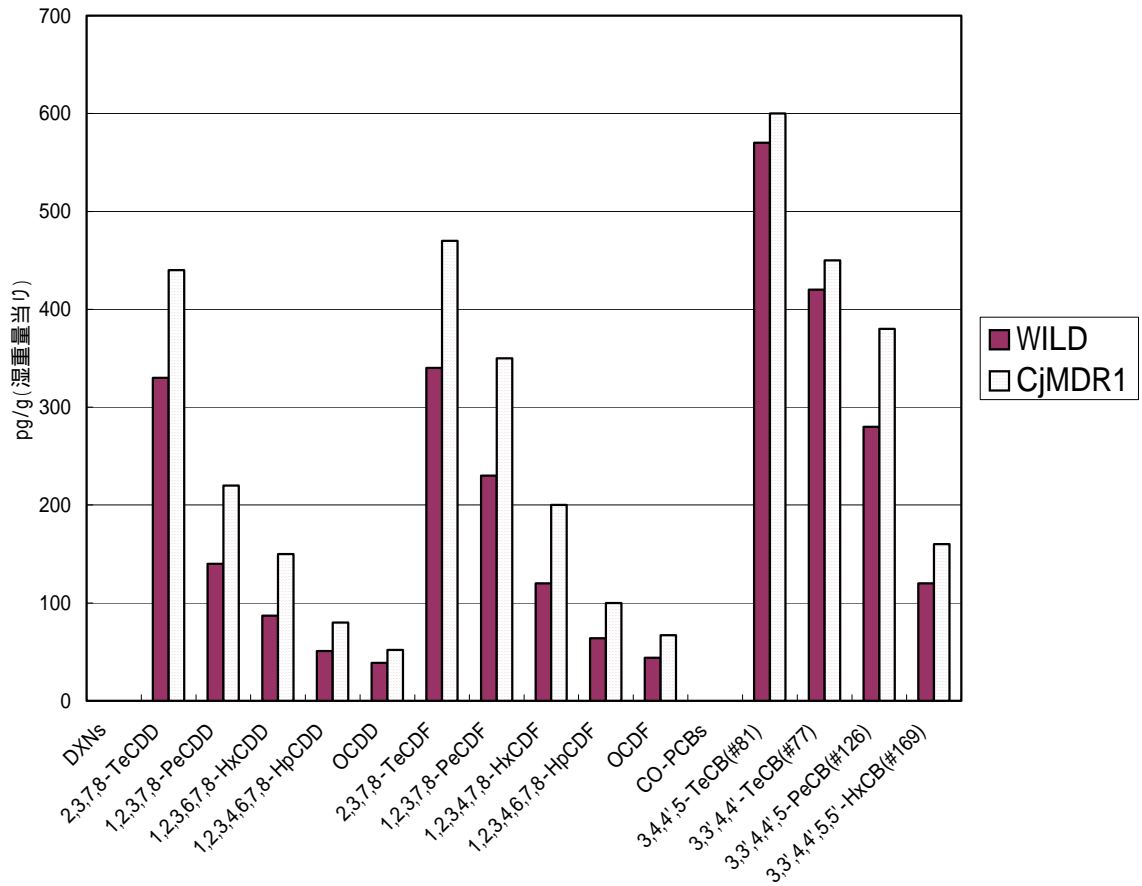


図2 . シロイヌナズナ (Wild , CjMDR1) のダイオキシンの吸収除去能 (PCDD/PCDF 類 , Co-PCB 類 各 10 ng 暴露)