

根粒菌－レンゲソウ共生系による重金属汚染土壌の ファイトレメディエーション

山下 光雄

環境省は平成 19 年 10 月末、都道府県と土壌汚染対策法上の政令市を対象にした土壌汚染調査事例・対策事例についての平成 17 年度調査結果と土壌汚染対策法の施行状況調査の結果を公表した。土壌汚染調査事例は平成 17 年度までの累計で 4887 件あり、このうち 2573 件について指定基準に適合していないことが判明している。超過事例 2573 件を汚染物質項目別に分類すると、重金属のみに関わるものが 1590 件と半数以上を占め、個別の汚染物質では鉛、ふっ素、ヒ素の順に、事例が多かった¹⁾。特に 1999 年の土壌・地下水汚染に係る調査・対策指針および運用基準以降に調査事例、超過事例数ともに大幅に増加した。土壌環境センターの調査によると国内で浄化が必要な土地は 32 万カ所にも及び、その対策費用は今後累計で 13 兆円に達すると試算されている²⁾。

修復技術と重金属汚染

土壌環境センターが実施したアンケートを基に対策要素技術を大きく分類すると、①経路遮断、拡散流出防止技術、②原位置分解技術、③原位置抽出技術、④土壌浄化技術がある³⁾。①は汚染物質を原位置で封じ込める技術であり、汚染物質は依然として原位置に残る。②-④の技術は、処理場所の違いはあるが、固化・不溶化、洗浄、熱分解、酸化還元分解、吸引、生物処理などが組み合わされた処理が行われる。原位置処理では、対策の効果の確認や事後モニタリングなどで、浄化完了までに時間を要することが負担になる。④の技術では、経費はかかるが浄化完了まで短時間という利点がある。現在、数万種の化学物質が製造され、分解されずに汚染源となる物質があり、その挙動は現場の環境や生態によって、多様な形態で存在していると思われる。実際さまざまな修復技術がある事から分かるように、すべての汚染現場に適用できる優れた修復技術は存在していない。

先述のように、土壌汚染事例の半数以上が重金属による。このことから、カドミウム (Cd)、鉛 (Pb)、クロム (Cr)、ヒ素 (As)、水銀 (Hg)、セレン (Se) の元素が土壌環境基準において指定有害物質とされている。これらの元素が生物に吸収される形態はさまざま (イオン、オ

キソ酸化物、有機化合物など) である。重金属は地中での移動性が低いので掘削処理が多くで採用されている。オンサイト浄化処理も必ずしも費用対効果があるといえず、外部に搬出・処理される場合が多い。いずれにしろ汚染土壌を水 (酸) 洗浄するか、固定・不溶化して溶出を防止する方法しかなく、電気浸透法、熱処理法、生物処理法も研究レベルである^{3,4)}。

Cd は原子番号 48 の重金属で、亜鉛精錬などの副産物として採掘され、顔料、電極、めっき材料などの工業製品に多用されている。Cd が体内に入ると中毒を起こし、嘔吐、呼吸困難、肺気腫、肝機能障害に陥る。そこで食の安全確保のため世界規模で食品中に含まれる Cd 濃度の上限値を決めている。コーデックス委員会により 2006 年 5 月現在、精米については 0.4 ppm という国際基準値が採択された。この場合、生産米の約 0.3% に当たる約 3 万トンは非食用となり、その汚染面積は約 8000 ha と見積られている。

Cd の浄化方法は、客土と呼ばれる汚染土壌を入れ替える土木の処理か、硫黄を用いて硫化カドミウムとして不溶化し、溶出を防止するか、吸着効果のあるキレート剤などを用いて土壌を洗浄・除去する化学的処理方法が主流である。このような物理化学的処理はコストがかかると共に、土壌の地味がやせ細などの難点がある。

微生物の機能を活用するバイオレメディエーションは、多様な汚染物質への適応可能性があり、投入エネルギーが少なく、一般的には浄化費用も安価で、将来に向けての主要技術の一つと考えられている。近年、植物を利用して汚染環境を回復させようとする、ファイトレメディエーションもある。特に重金属特異的に蓄積する植物はハイパーアキュムレーターと呼ばれ、Cd に対してはグンバイナズナ、カラシナ、ヘビノネゴザなどが挙げられる。しかし、浄化時間が長く、処理物質に制限があり、根圏範囲による制限や汚染物質が比較的吸収し易い形態で存在する必要があるなどの問題点がある⁴⁾。これら問題点を克服するために、微生物と植物の利点を効果的に組み合わせた共生体での重金属汚染浄化への応用を紹介する。

マメ科植物と根粒菌の共生機構

植物と微生物の共生機構の研究は、マメ科植物と根粒菌または樹木と菌根菌の系が進んでいる。植物側の根毛からフラボノイドが分泌され、これを根粒菌内の NodD タンパク質が認識して根粒形成遺伝子 (*nod*) 群を発現誘導し、その結果根粒形成因子 (Nod factors) (キチンオリゴ糖誘導体) を生成して細胞外に分泌する。この因子が宿主植物を認識して結合し、根粒菌を取り込む。取り込まれた根粒菌は、増殖しながら感染糸を形成して根毛組織に入り、バクテロイド (共生時に特異的に分化した根粒菌が詰まったもの) を形成する。その結果、根の細胞分化が起こり、根粒を形成する。植物側はエネルギー源としての糖や有機酸をバクテロイドに供給して共生関係が成立する⁵⁾。根粒菌は好気条件下で増殖できるが、根粒バクテロイド内は極端な嫌気条件に保たれている。

共生工学の基盤技術開発

生物種間の共生機構を解明し、共生系をデザインし、応用することを「共生工学」という⁶⁾。根粒菌とマメ科植物の共生の場合、以下のように両者の利点を生かせる。

根粒菌はグラム陰性細菌であることから、大腸菌での系を利用できる。特に、根粒菌はバクテロイドの中で複数の *nif* オペロン遺伝子をポリシストロニックに転写・翻訳していることから、多重遺伝子発現は可能である。植物は光エネルギーを利用して炭酸ガスを固定し、種子や果実、根塊に炭水化物、タンパク質などを蓄積でき、環境調和型といわれている。土壌から栄養分、水を吸収でき、根圏の拡大に依存して、水溶性物質を吸収できる。

レンゲソウ・根粒菌は共生を活用した窒素固定の代表

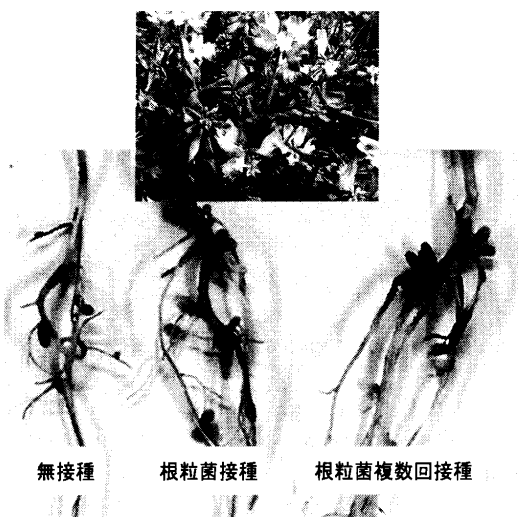


図1. レンゲソウと根粒菌

である (図1)。田んぼの肥沃化に用いられてきたが、現在は激減している。花はミツバチの糖蜜源であり、レンゲ蜂蜜は市販されている。中国と日本のレンゲソウ根粒菌は系統学的に違うことが分かり、日本の根粒菌は *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei* と改名された⁷⁾。ついで根粒菌に有用遺伝子を導入するために、広宿主ベクターを用いて形質転換系が開発された⁸⁾。

共生工学による環境浄化

筆者らはCd、亜鉛 (Zn)、銅 (Cu) などの重金属を特異的に結合するヒトメタロチオネイン (*hMT*) を大腸菌で高発現したことから⁹⁾、重金属に焦点をおいて研究を進めた。重金属結合能を向上させるために4量体メタロチオネイン遺伝子 (*MTL4*) をデザインした¹⁰⁾。組換え *MTL4* はタンパク質分子あたり28原子のCd、Znを結合した¹⁰⁾。

レンゲソウ根粒菌は窒素固定に関わる酵素とその制御遺伝子 (*nif*, *fix*) や根粒形成因子の生合成遺伝子 (*nod*, *nol*) を菌体内のプラスミド上に保有している¹¹⁾。 *nif*, *nol* 遺伝子群は酸素制限下のバクテロイド内で発現しており、これらの遺伝子制御領域 (プロモーター) 下に目的遺伝子を組換え発現すれば、新機能を付加できると思われる。そこで、*nifH*, *nolB* プロモーターを分離し、その下流に *MTL4* を挿入後、レンゲソウ根粒菌に導入した。根粒バクテロイド内で *MTL4* が合成された¹²⁾。これは植物根粒内においてヒトの遺伝子を発現させた最初であり、植物への新規遺伝子導入法でもある (図2)。 *MTL4* が発現した根粒は野生株の約2倍のCdを蓄積していた。MTはヒ素も結合するので¹³⁾、ヒ素浄化にも応用できるかもしれない。

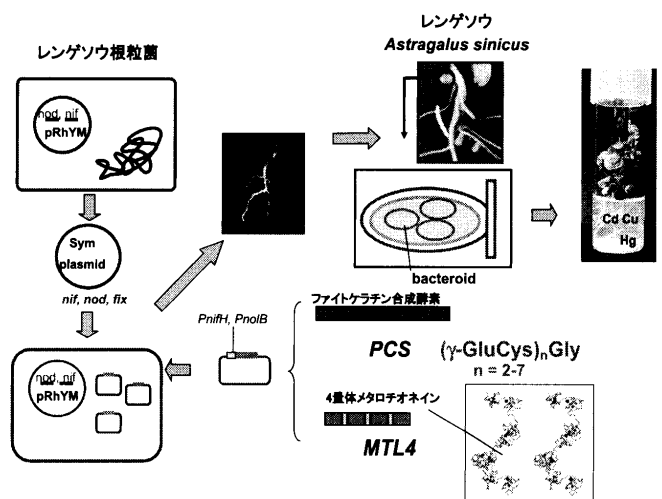


図2. 重金属浄化共生体の創生

特 集

さらに、植物などで存在している金属結合ペプチドであるファイトケラチンを合成するファイトケラチン合成酵素遺伝子 (*AtPCS*) をアラビドプシスからクローニングし、*nifH* プロモーター下流に挿入し、レンゲソウ根粒菌で2-7量体のファイトケラチンオリゴマーを合成させた。*AtPCS* 組換え根粒菌は、*AtPCS* を有しない根粒菌に比べ10-20倍のCdを蓄積した¹⁴⁾。この組換え根粒菌を持つレンゲソウの根粒では、野生型根粒に比べ約1.5倍のCd蓄積を検出した。*MTL4* と *AtPCS* 両遺伝子を発現する組換え根粒菌をレンゲソウに感染させ、水栽培すると根粒内では2倍のCdを蓄積した¹⁵⁾。次にCd汚染水田土壌に組換え根粒菌-レンゲソウ共生体を植えると、根全体でCdを3倍吸収した。2ヶ月間の培養によって汚染土壌 (1 mg Cd/kg) の9%のCdを除去し¹⁵⁾、重金属浄化に貢献できると思われる。

続いて、重金属の取り込み能を向上させるためにアラビドプシスの鉄制御トランスポーター遺伝子 (*AtIRT1*) を *nifH* プロモーター下流に挿入し、レンゲソウ根粒菌で組換え発現させた。*MTL4* と *AtPCS* とを同時に発現させた組換え根粒菌よりは、約1.6倍Cdを多く蓄積した¹⁶⁾。しかし、これらの遺伝子を発現する根粒菌をレンゲソウに感染させ、水栽培したところCdやZnに対して相乗効果は見られなかったが、CuやAsに対してはやや見られた¹⁶⁾。

植物に蓄積した金属含量を多くすれば資源価値は上がり、焼却して有機物は炭化し、金属はトラップする。これを繰り返せば汚染土壌は浄化される。固化するよりは処理後安全であるし、客土するより経済的だと思われる。

重金属ファイトレメディエーションの促進技術

植物・微生物体による浄化効率を向上するための戦略として、図3に示すようにバイオマスの増産による金属蓄積量増加技術の開発、土壌重金属の可溶化による金属吸収促進技術の開発、金属吸収・輸送・結合タンパク質

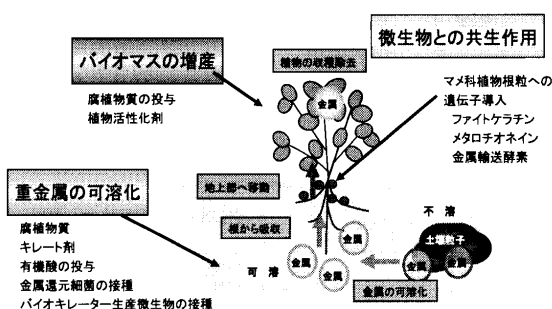


図3. 共生工学による重金属浄化促進戦略

などをコードする遺伝子組換え技術の開発が挙げられる。

バイオマス増産には、腐植物質や植物活性化剤の投与が考えられ、環境浄化に使用できないか検討している。土壌重金属の可溶化には、一般的にはキレート剤や有機酸が投与されているが、生分解性や溶出効果の知見が不足している。また環境への低負荷という点から、生分解性キレート剤を分泌する微生物の探索や有機酸合成能が高い微生物の添加効果実験を行っている。根粒菌以外にも植物と共生し、浄化、環境修復を行うことができると思われる。

共生工学におけるメタルバイオの将来

筆者らはhMTのアスパラギン酸とセリンをシステインに置換し、Cdへの金属結合能と親和性を向上させた¹⁷⁾。この知見を敷衍すれば、新規な金属への結合能を創製できるかもしれない。将来、貴（希少）金属高含有根粒ができるかもしれない。また植物の貯蔵タンパク質合成遺伝子のプロモーターの下流にhMT遺伝子を組換えれば、貯蔵組織に重金属を集積することも夢ではない。デンプンは栄養源や加工原料となり、貯蔵タンパク質に存在する重金属は回収・資源化する。共生系を解明、新構築することにより、エネルギー循環効率を高めれば、環境低負荷型のメタルバイオテクノロジーを開発できるに違いない。

文 献

- 1) 環境省（水・大気環境局）<http://www.env.go.jp/>
- 2) 土壌環境センター <http://www.gepc.or.jp/>
- 3) 日本地下水学会編：地下水・土壌汚染の基礎から応用，理工図書（2006）
- 4) 藤田正憲，池 道彦：バイオ環境工学，シーエムシー出版（2006）。
- 5) Hirsch, A. M. *et al.*: *Plant Physiol.*, **127**, 1484 (2001).
- 6) 室岡義勝：生物工学, **82**, 2 (2004).
- 7) Murooka, Y. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 38 (1993).
- 8) Hayashi, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 550 (2000).
- 9) Yamashita, M. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 113 (1994).
- 10) Hong, S.-H. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 84 (2000).
- 11) Xu, Y. and Murooka, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 276 (1995).
- 12) Sriprang, R. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **99**, 279 (2002).
- 13) Toyoma, M. *et al.*: *J. Biochem.*, **132**, 217 (2002).
- 14) Sriprang, R. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1791 (2003).
- 15) Ike, A. *et al.*: *Chemosphere*, **66**, 1670 (2007).
- 16) Ike, A. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 642 (2008).
- 17) Toyoma, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 354 (2006).