The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Development of bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia
Author(s)	Sriprang, Rutchadaporn
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44934
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【6】

氏　　名	Sriprang（スリプラング）, Rutchadaporn（ラッチャダポーン）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学　位　記　番　号	第　１８０２６　号
学位授与年月日	平成 15 年 5 月 21 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学　位　論　文　名	Development of bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia **（マメ科植物と遺伝子組換え根粒菌との共生系を利用した重金属汚染修復システムの開発）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　室岡　義勝 （副査） 教　授　塩谷　捨明　　教　授　福井　希一　　教　授　卜部　　格 教　授　小林　昭雄　　教　授　原島　　俊　　教　授　金谷　茂則

論　文　内　容　の　要　旨

本論文は、環境汚染の中でも人体に有害な重金属に汚染された土壌を植物を用いて浄化する新しいファイトレメディエーションシステムを開発したものであり、水田の富沃化のために広く栽培されてきたマメ科植物のレンゲソウと窒素固定根粒菌との共生系の利用について述べている。すなわち、重金属結合タンパク質遺伝子を組込んだ根粒菌をレンゲソウの根に感染させて根粒を形成させる。根粒内で重金属結合タンパク質を過剰生産させて、土壌中の重金属を根粒内に蓄積させることにより、土壌を浄化する新システムを開発している。論文は、緒論、本文及び総括の６章より構成されている。

第１章では、緒論として、この研究の背景となる重金属による土壌汚染、人体への影響、従来の化学・生物土壌修復方法、金属結合タンパク質メタロチオネインおよびファイトケラチンの性質、根粒菌とマメ科植物共生機構及びレンゲソウをこの系に選んだ理由と利用方法を述べると共に、本研究の目的について述べている。

第２章では、４量体メタロチオネイン遺伝子（*MTL4*）を、根粒バクテロイド内で発現する *nifH* および *nolB* プロモーターにつなぎ、レンゲソウ根粒菌 *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei* B3 株を形質転換し、重金属集積について述べている。この形質転換根粒菌をレンゲソウの根に感染させて根粒を形成させている。*In situ* hybridization により根粒内で *MTL4* 遺伝子の mRNA が発現していること、また免疫染色により MLT4 タンパク質が生成していることを確かめている。カドミウム添加土壌のポット内試験の結果、MTL4 生成根粒は野生株の 1.5-1.8 倍カドミウムを蓄積している。

第３章では、アラビドプシスより、ファイトケラチン合成酵素遺伝子（*AtPCS*）をクローニングして根粒菌 B3 株に導入し、重金属蓄積の向上を目的とした研究結果について述べている。この遺伝子発現によりファイトケラチンオリゴマー(PC)n、n＝2－7、が B3 細胞内で生成している。この組換え菌によるカドミウムの蓄積は 9-19 倍に増加した。組換え菌をレンゲソウに感染させ根粒形成の後、免疫染色により *AtPCS* が根粒バクテロイド内で生成していることを確認している。この根粒は 1.5 倍のカドミウムを蓄積している。

第４章では、４量体メタロチオネイン遺伝子（*MTL4*）およびファイトケラチン合成酵素遺伝子（*AtPCS*）の両方を根粒菌 B3 株に導入した結果について述べている。両遺伝子発現により、ファイトケラチン合成酵素遺伝子単独発現の 1.7 倍のカドミウムの細胞内蓄積が観察されている。

第５章では、根粒バクテロイド内への金属透過促進の試みについて述べた。ファイトケラチン合成酵素遺伝子（*AtPCS*）を組み換えた根粒菌では、約 20 倍ものカドミウムの蓄積があるにもかかわらず、レンゲソウ根粒への重金属取り込み量は、1.7 倍しか増加しないことから、膜内の金属取り込みに関与するアラビドプシスの鉄制御型トランスポーター遺伝子（*IRT1*）をクローニングして、アルカリフォスファターゼ遺伝子（*phoA*）と融合し、根粒菌 B3 株に導入している。細胞膜区分の PhoA 活性は 16 倍に増加し、カドミウムに対する感受性が高まっている。

第６章では、総括として、本研究の成果、意義を要約し、この共生システムによる稲田のカドミウム除去量をシミュレートして、今後の展望について述べている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、環境汚染の中でも人体に有害な重金属に汚染された土壌を植物を用いて浄化する、新しいファイトレメディエーションシステムを開発したものであり、水田の富沃化のために広く栽培されてきたマメ科植物のレンゲソウと窒素固定根粒菌との共生系の利用について研究している。すなわち、重金属結合タンパク質遺伝子を組込んだ根粒菌をレンゲソウの根に感染させて根粒を形成させる。根粒内で重金属結合タンパク質を過剰生産させて、土壌中の重金属を根粒内に蓄積させることにより、土壌を浄化する新システムを開発している。これらの成果の要約は、以下のとおりである。

(1) 4 量体メタロチオネイン遺伝子（*MTL4*）を、根粒バクテロイド内で発現する *nifH* および *nolB* プロモーターにつなぎ、レンゲソウ根粒菌 *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei* B3 株を形質転換し、重金属集積量を測定している。この形質転換根粒菌をレンゲソウの根に感染させて根粒を形成させている。*In situ* hybridization により根粒内で *MTL4* 遺伝子の mRNA が発現していること、また免疫染色により MTL4 タンパク質が生成していることを確かめている。カドミウム添加土壌のポット内試験の結果、MTL4 生成根粒は野生株の 1.5-1.8 倍カドミウムを蓄積している。

(2)アラビドプシスより、ファイトケラチン合成酵素遺伝子（*AtPCS*）をクローニングして根粒菌 B3 株に導入し、重金属蓄積の向上を目的とした研究結果を示している。この遺伝子発現によりファイトケラチンオリゴマー(PC)n、n＝2－7、が B3 細胞内で生成している。この組換え菌によるカドミウムの蓄積は 9-19 倍に増加した。組換え菌をレンゲソウに感染させ根粒形成の後、免疫染色により *AtPCS* が根粒バクテロイド内で生成していることを確認している。この根粒は 1.5 倍のカドミウムを蓄積している。

(3) 4 量体メタロチオネイン遺伝子（*MTL4*）およびファイトケラチン合成酵素遺伝子（*AtPCS*）の両方を根粒菌 B3 株に導入に成功している。両遺伝子発現により、ファイトケラチン合成酵素遺伝子単独発現の 1.7 倍のカドミウムの細胞内蓄積が観察されている。

(4)根粒バクテロイド内への金属透過促進の試みている。ファイトケラチン合成酵素遺伝子（*AtPCS*）を組み換えた根粒菌では、約 20 倍ものカドミウムの蓄積があるにもかかわらず、レンゲソウ根粒への重金属取り込み量は、1.7 倍しか増加しないことから、膜内の金属取り込みに関与するアラビドプシスの鉄制御型トランスポーター遺伝子（*IRT1*）をクローニングして、アルカリフォスファターゼ遺伝子（*phoA*）と融合し、根粒菌 B3 株に導入している。細胞膜区分の PhoA 活性は 16 倍に増加し、カドミウムに対する感受性が高まっている。

以上のように、本論文は土壌の重金属汚染，特に現在も我が国を初め世界の水田地帯で問題となっている重金属による土壌汚染を、稲田の富沃化に栽培されてきたレンゲソウに着目し、重金属結合ペプチドを植物根粒内で過剰生産させることにより土壌を浄化させる新しい共生工学技術を開発したものであり、環境工学、生物工学の発展に少なからず寄与するものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。