

重金属トランスポーター

—生物機能による汚染重金属回収系の構築にむけて—

Heavy Metal Transporter

Towards Establishing A Bio-system for Recovering Heavy Metal from Polluted Sites

佐々木祥人, 皆川 貴洋, 宮崎 厚, 草野 友延*

YOSHITO SASAKI, TAKAHIRO MINAKAWA, ATSUSHI MIYAZAKI and TOMONOBU KUSANO

東北大学・大学院生命科学研究科・分子応答制御分野 〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平2-1-1

* TEL: 022-217-5709 FAX: 022-217-5709

* E-mail: kusano@ige.tohoku.ac.jp

Laboratory of Plant Molecular and Cellular Biology, Department of Biomolecular Science, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba, Sendai, Miyagi 980-8577, Japan

キーワード: 重金属, トランスポーター, 金属結合モチーフ, 膜貫通領域, 蛋白質工学, 分子育種

Key words: heavy metal, transporter, metal-binding motif, transmembrane domain, protein engineering, molecular breeding

1. はじめに

重金属による環境汚染が世界の多くの地域で深刻化している。翻って国内を見渡した場合でも、工場跡地での汚染や農地のカドミウム汚染が社会問題化している。汚染重金属は、鉱山などの自然界から溶出している場合もあるが、人的活動に起因している場合が大半である。

重金属のうち、銅、鉄、亜鉛、コバルト、マンガンなどは、ごく微量ながら生物にとって必須である。これらの重金属は、酸化還元反応や電子伝達に参与する酵素の活性中心に配位して活性を与える、あるいは酵素の活性化因子として機能する。しかし、必要量以上に存在すると毒性を示す。重金属の毒性は、タンパク質のチオール基への非特異的結合や酵素タンパク質の活性中心に存在する金属がこれらの重金属で置換されることによりタンパク質の機能が失われることに基づくと考えられている。熊本県水俣市でおきた水銀による水俣病、富山県神通川流域でおきたカドミウムによるイタイイタイ病などの公害病は広く知られているが、これら生物にとって非要求性の重金属(カドミウム、水銀、鉛、銀など)は、微量でより強い毒性を示す。重金属は、我々にさまざまな健康被害を与えるだけでなく、あらゆる生物に対して有害であり、その環境汚染の影響はより深刻である。

生物は生育に必要な重金属を取り込む機構をもつが、その場合も生体内の金属濃度を適正に保つためにさまざまな制御機構を発達させている。取り込んだ重金属を適切な細胞内小器官に運ぶためのメタロシャペロンが存在することが、最近の研究で明らかになってきた。また仮に重金属が過剰に体内に取り込まれた場合でも、生物は重金属の毒性から身を守るために様々な戦略を用いて無

毒化あるいは低毒化を行っていることが明らかにされている。多くの生物は、(1) システイン残基を多く持つ金属結合タンパク質であるメタロチオネインや(γ -Glu-Cys)_nGly(n=2-11)の構造を持つフェイトケラチンの働きによって重金属をキレート化する、(2) フェイトケラチンの場合は金属との複合体を液胞に運び隔離する¹⁾、(3) efflux 型の重金属トランスポーターで生体外へ排出する、などのいずれかあるいは複数の機構により重金属の毒性を軽減している。

重金属による土壌あるいは水系の汚染が起きてしまった場合、汚染サイトからの除染法として現在では物理化学的手法が多用されている。土壌の場合には汚染土壌を運び出し客土がなされる。従って、こうした方法は短期間に除染できる長所をもつ反面多大な経費を要する。これに替わるものとしてバイオレメディエーションあるいはファイトレメディエーションと呼ばれる生物的手法がある⁴⁾。この方法は経済的な長所を持つ一方除染のために長期間を要する欠点をもつ。この欠点を克服し生物による重金属除染技術をより確かなものにするためには、多くの点で改良が必要と思われる。ファイトレメディエーションの場合には、植物の生育が早くかつ高いバイオマス能力をもつこと、根からの吸収を効率的に行えること、そして植物体が十分な重金属耐性を持つことなどの課題がある。著者らはこうした課題のうち、土壌から重金属を高効率で生物体内に取り込む系の確立を目指し、重金属トランスポーターに着目して研究を行っている。

本稿では、これまでに細菌、酵母や高等動物などで報告されたトランスポーターのうち重金属輸送能をもつものを環境バイオテクノロジーに資する立場から概観す

る。あわせて著者らが研究を進めている微生物由来の重金属トランスポーターについても現状を紹介し、最後に将来を展望したい。

2. 重金属トランスポーター

重金属の取り込み、代謝、耐性などの観点から多くの研究が行われ、様々な生物から多くの重金属トランスポーターが同定されている。ここではその中でも代表的な重金属トランスポーターについて、一次構造上の類似性に基づくファミリーごとに構造、重金属特異性、重金属結合モチーフそして生理機能等を概説する(表1)。

2.1. P-type ATPase ファミリー

電荷を帯びた基質を輸送する P-type ATPase ファミリーのサブファミリーの中にも重金属を輸送するものがある。P-type ATPase は、荷電した基質が膜を通るために ATP を消費し反応サイクルの間にリン酸化された中

間体を形成することから P-type と名づけられた²⁸⁾。系統発生的に I~V のタイプに分類されるが³⁾、この中で重金属トランスポーターは、タイプ IB に属し³⁾ Cys-Pro-Cys, Cys-Pro-His または Cys-Pro-Ser (CPx モチーフ, x は任意のアミノ酸) の重金属輸送に関与すると考えられているモチーフを膜貫通ドメイン(以下 TMD と略)に持つ。このモチーフ配列から CPx-ATPase と呼ばれている⁶⁴⁾。図1に示すように、このタイプの P-type ATPase は、8回の TMD をもち、C 末端側の細胞質内のループに ATP の結合と加水分解にかかわる領域をもつ。また、N 末端の最初の TMD の細胞質側に延びた領域にいくつかのシステイン残基に富む金属結合部位(多くの場合 CxxC モチーフ)をもっている。遺伝病であるヒト Menkes 病は銅代謝に異常をもつが、その原因は Cu²⁺-ATPase (ATP7A) の機能欠損である。ATP7A は重金属結合モチーフと言われる GMTCxxC 配列を6回くり返しもつ。Arabidopsis thaliana の CPx-ATPase である PAA1 (P-type ATPase of Arabidopsis 1)

表1. 代表的な重金属トランスポーターファミリー

ファミリー	金属特異性	膜貫通領域の数	重金属結合モチーフ	例
P-type ATPase	Zn, Cu, Co, Ag, Cd, Pb	8	CxxC	ATP7A, ATP7B (<i>H. sapiens</i>) CadA (<i>S. aureus</i>)
ZIP	Zn, Fe, Mn, Cd	8	His rich	IRT1 (<i>A. thaliana</i>) ZRT1 (<i>S. cerevisiae</i>)
CDF	Zn, Co, Ni, Cd	6	His rich	CzcD (<i>Ralstonia</i> sp. strain CH34)
Nramp	Mn, Fe, Co, Cu, Cd	8~12	—	SMF1, 2, 3 (<i>S. cerevisiae</i>)
ABC	Zn, Mn, Fe, Ni, Co, Cd	12~17	—	ZnuC (<i>E. coli</i>) HMT1 (<i>S. pombe</i>)
NRD	Zn, Cu, Co, Ni, Ag, Cd	12	—	CnrA, CzcA (<i>A. eutrophus</i>)
CTR	Cu	3	MxxMxM	CTR1, 2, 3 (<i>S. cerevisiae</i>)
MerT	Hg	3	CxxC	MerT (<i>E. coli</i>)
MerC	Hg	4	CxxC	MerC (<i>A. ferrooxidans</i> strain E-15)

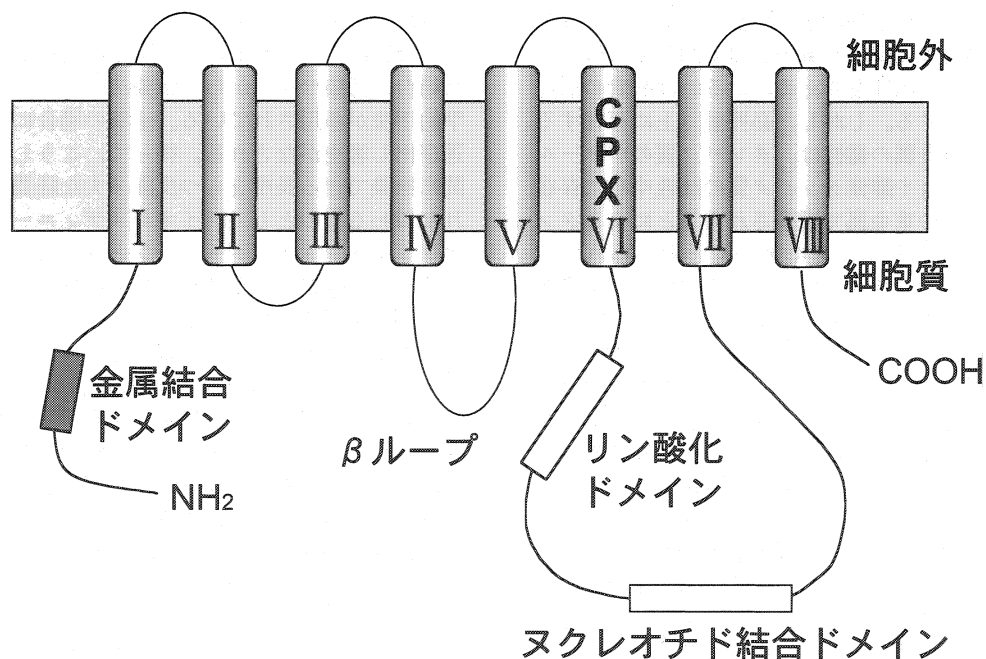


図1. 予想される P-type ATPase のトポロジー。例として *E. coli* の ZntA を示す。金属結合ドメインは CxxC モチーフをもつ。リン酸化ドメイン中のアスパラギン酸がリン酸化を受ける。CPx モチーフは P-type ATPase に保存されている。

は1つ、そして RAN1 (後述) は2つの GMTCxxC モチーフをもつ。このモチーフは、CPx-ATPase 以外の重金属結合タンパク質にもみられる。CPx-ATPase のなかには、*Enterococcus hirae* の CopB のように CxxC モチーフにかわりメチオニン、ヒスチジンに富む配列を持つものも存在する。ヒスチジン残基は、亜鉛結合モチーフである zinc finger モチーフにもみられる。

CPx-ATPase は、主に金属イオンの細胞内の恒常性や重金属耐性に関与しているが、Cu⁺、Ag⁺ などの一価カチオンを輸送するものと Co²⁺、Zn²⁺、Cd²⁺、Pb²⁺ などの二価カチオンを輸送するものの2つのグループに分けることができる (図2)^{58,64}。

2.1.1. 一価カチオンを輸送するグループ

CPx-ATPase の中で、もっとも研究が進んでいるのはヒトの遺伝病である Menkes 病 (上述) と Wilson 病に関するものである。これらは、細胞レベルでの銅輸送系に異常をもつことがわかっていたが、それぞれ ATP7A

と ATP7B 遺伝子に欠損をもち、それらの産物は共に銅を基質とする P-type ATPase であった。銅イオンと銀イオンを輸送する *Escherichia coli* の CopA は、N 末端に2つの GxxCxxC モチーフを持つ。CopA を作る大腸菌は、還元剤 (DTT) の存在下で銅の取り込み量が増加することから、銅は一価の還元された状態で細胞に輸送されたと考えられている⁵⁷。*E. hirae* の CopB は、Cu⁺ と Ag⁺ の排出ポンプである。CopB と同様に N 末端にヒスチジンに富む配列を持つ *Salmonella typhimurium* の SilP は、Ag⁺ の耐性に寄与するが Cu⁺ には耐性を示さない²⁶。CopB と SilP における Cu⁺ と Ag⁺ の金属識別がどのようになされているのか、その分子機構は興味深い。

2.1.2. 二価カチオンを輸送するグループ

二価のカチオンを輸送するグループには、カドミウム耐性に関わる *Staphylococcus aureus* の CadA や *E. coli* の ZntA などが入る。CadA はカドミウムを細胞外に排出することが知られている。zntA 遺伝子を破壊された *E. coli* は、鉛⁵⁹ そして亜鉛やカドミウム⁶⁰ に対して感受性になる。

高等植物で最初に同定された CPx-ATPase は、*A. thaliana* の PAA1 であるが機能は未だ不明である⁶⁶。*A. thaliana* には、7つの CPx-ATPase がある⁴が、このうち RAN1 (Responsive to ANtagonist 1) は、植物ホルモンであるエチレンのシグナル伝達系に関与することが示されている。活性型のエチレン受容体が作られるためには、銅の供給が必要であるが、この役目を果たすのが RAN1 であることが、酵母での相補実験を含めたこれまでの研究で示されている²⁹。

2.2. ZIP (ZRT, IRT-like Proteins) ファミリー

ZIP ファミリーは、最初に見つけられた *Saccharomyces cerevisiae* 由来の亜鉛トランスポーター ZRT1 (Zinc-Regulated Transporter 1) と *A. thaliana* の鉄トランスポーター IRT1 (Iron-Regulated Transporter 1) が同様なアミノ酸配列を持つ事から、ZRT, IRT-like Proteins と名づけられた^{17,74}。このファミリー蛋白質は、細菌、古細菌、カビ、原生動物、昆虫、植物そしてほ乳類と広範囲の生物に分布している (図3)。ZIP タンパク質は、アミノ酸配列に基づく系統解析から3つのサブグループに分類される。カビ、線形動物、植物そしてほ乳類にみられる ZIP サブファミリーが、主に金属取り込み能をもつことが知られている。*Myxococcus xanthus* の gufA (機能未知) に代表される gufA サブファミリーには、*S. cerevisiae* の亜鉛トランスポーターの ZRT3 が含まれる。LIV-1 サブファミリーのタンパク質群の生理機能は不明である²⁰。

IRT1 は、鉄、亜鉛、マンガンそしてカドミウムを取り込むことが知られている^{20,34}。この ZIP ファミリータンパク質の多くは、図4の IRT1 のトポロジーで示すように8回の TMD 構造をもち、N 末端と C 末端側が共に細胞膜の外側にある。TMD4~TMD8 のアミノ酸配列はいずれも保存性が高く、TMD4 と TMD5 の間は部分的に両親媒性であり保存性の高いヒスチジン残基とこれに近接してシステイン残基とグルタミン酸残基が存在する。IRT1 のこれらのアミノ酸残基に部位特異的変

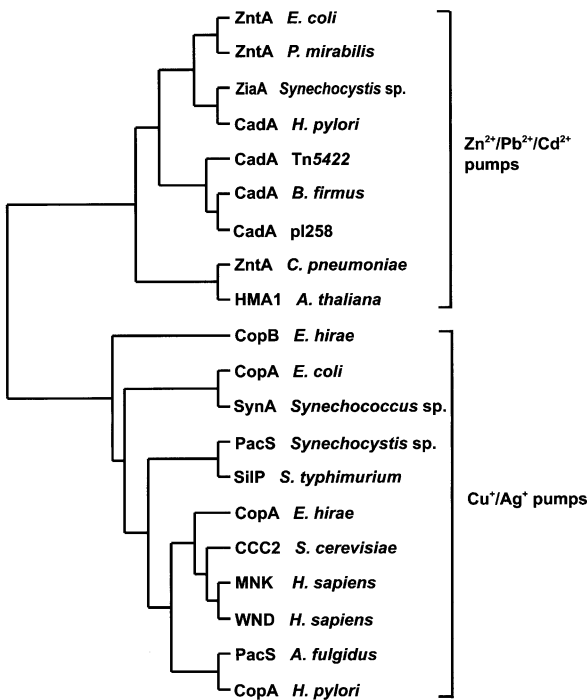


図2. 主な P-type ATPase ファミリータンパク質のクラスター解析。解析には DDBJ が公開している CLUSTALW (default) を用いた。Protein ID を () 内に示す。Zn²⁺/Pb²⁺/Cd²⁺ pumps: ZntA, *E. coli* (P37617); ZntA, *Proteus mirabilis* (CAA04762); ZiaA, *Synechocystis* sp. strain PCC6803 (Q59998); CadA, *Helicobacter pylori* (AAA93043); CadA, Tn5422 (AAA25275); CadA, *Bacillus firmus* (AAA22858); CadA, pl258 (AAB59154); ZntA, *Chlamydomonas pneumoniae* (AAD19006); HMA1, *Arabidopsis thaliana* (similarity to Cu²⁺-transporting ATPase) (CAB16773)。Cu⁺/Ag⁺ pumps: CopB, *Enterococcus hirae* (P05425); CopA, *E. coli* (AAB02268); SynA, *Synechococcus* sp. strain PCC7942 (P37385); PacS, *Synechocystis* sp. strain PCC6803 (P73241); SilP, *Salmonella typhimurium* Ag⁺ pump (AAD11750); CopA, *E. hirae* (P32113); CCC2, *S. cerevisiae* vacuolar copper pump (AAC37425); MNK (ATP7A), human Menkes disease-related protein (Q04656); WND (ATP7B), human Wilson disease-related protein (AAB52902); PacS, *Archaeoglobus fulgidus* (AAB90763); CopA, *H. pylori* (AAB05475)。

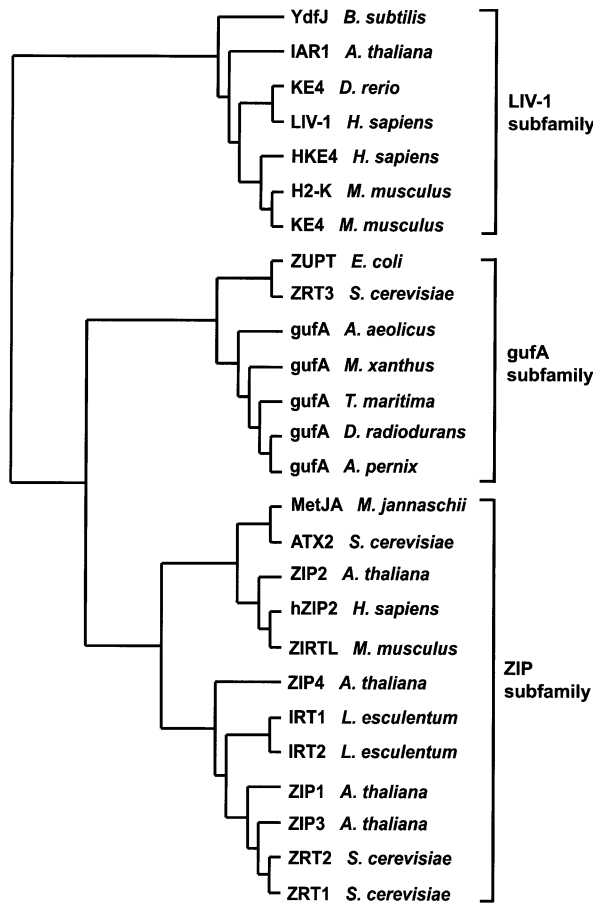


図3. ZIPファミリータンパク質のクラスター解析。解析にはDDBJが公開しているCLUSTALW (default)を用いた。Protein IDを()内に示す。LIV-1 subfamily: YdfJ, *B. subtilis* (H69780); IAR1, *A. thaliana* (AAF32299); KE4, *Danio rerio* (AAF05821); LIV-1, *H. sapiens* (NP.036451); HKE4, *H. sapiens* (CAA20238); H2-K, *Mus musculus* (NP.032228); KE4, *M. musculus* (Q31125). gufA subfamily: ZUPA, *E. coli* (P24198); ZRT3, *S. cerevisiae* (NP-012746); gufA, *Aquifex aeolicus* (D70456); gufA, *Myxococcus xanthus* (Q06916); gufA, *Thermotoga maritima* (A72218); gufA, *Deinococcus radiodurans* (A75447); gufA, *Aeropyrum pernix* (G72550). ZIP subfamily: MetJA, *Methanocaldococcus jannaschii* (Q58442); ATX2, *S. cerevisiae* (NP.014722); ZIP2, *A. thaliana* (AAC24198); hZIP2, *H. sapiens* (AAF35832); ZIRTL, *M. musculus* (CAB59982); ZIP4, *A. thaliana* (AAB65480); IRT1, *Lycopersicon esculentum* (AAD30548); IRT2, *L. esculentum* (AAD30549); ZIP1, *A. thaliana* (AAC24197); ZIP3, *A. thaliana* (AAC24199); ZRT2, *S. cerevisiae* (NP.013231); ZRT1, *S. cerevisiae* (NP.011259).

異を与えると、重金属輸送活性が損なわれることからその重要性が示されている。また、TMD2とTMD3間のループ部分の保存性が高いアミノ酸残基に同様に変異を与えると、鉄、亜鉛、マンガンそしてカドミウムの取り込みにそれぞれ変化がみられる。こうした結果から、ZIPファミリーの基質特異性はTMD2とTMD3間の配列によって左右されると考えられている⁶¹⁾。このファミリー蛋白質のTMD3とTMD4の間には長い可変領域(variable region)と呼ばれる部位²⁴⁾があるが、この部分にIRT1ではHGHGHGHそしてZRT1ではHDHTHDEの配列が存在する。このヒスチジンに富む配列は重金属

結合ドメインと推定されている。これに類似のモチーフ配列は、後述するCDFファミリーにも存在する。

*S. cerevisiae*のZRT1とZRT2は、亜鉛に高い特異性を持つトランスポーターである。ZRT1はZRT2より亜鉛に対する親和性が10倍高く、それぞれ高親和性そして低親和性亜鉛トランスポーターとして機能する。ZIPファミリーの中には、亜鉛のほかにカドミウム、鉄、そしてマンガンを送るメンバーも知られている^{20,75)}。亜鉛欠乏条件下で、根で発現している*A. thaliana*のZIP1とZIP3は、いずれも酵母の亜鉛トランスポーター遺伝子zrt1とzrt2の2重破壊株の亜鉛輸送能を相補することから、遺伝子産物であるZIP1とZIP3は亜鉛の取り込みに関わると考えられている²³⁾。

ヒトの亜鉛トランスポーターであるhZip2は、*in vivo*での実験でHCO₃⁻との共輸送により亜鉛を取り込むとの報告があるが、ZIPファミリーの金属輸送機構の詳細は明らかとなっていない¹⁹⁾。

2.3. CDF (Cation Diffusion Facilitator) ファミリー

CDFファミリーは、細菌、古細菌そして真核生物に分布しており、コバルト、亜鉛そしてカドミウムなどを輸送するトランスポーターである。CDFファミリーのメンバーは、金属の排出、取り込みあるいは細胞内小器官である液胞への隔離を行う。このファミリーに含まれるトランスポーターはこれまでに100以上が知られており²⁰⁾、そのアミノ酸配列から3つのサブファミリーに分類される。その中の一部を図5に示した。サブファミリーIには、おもに原核生物由来のものが、サブファミリーIIとIIIには、真核生物と原核生物由来のものがほぼ同程度含まれる²⁰⁾。

多くのCDFファミリーのメンバーは、図6に示すZRC1のように6回のTMD構造をもつ。水素細菌の一種である*Ralstonia* sp. CH34株由来のczcオペロンはコバルト、亜鉛そしてカドミウムを細胞外に排出する機能を持つことが知られている。このオペロンの構成遺伝子czcDの産物が重金属輸送の機能を持つ。CzcDのN末端とC末端側の部分は共に細胞質に位置している。TMD4とTMD5の間に長いループ構造があり、ここにヒスチジンに富む(Hx)_n (n=3~6, xはセリンまたはグリシン)配列が存在する。さらにC末端の細胞質に位置する領域にH(D/E)xHWxFTx₈Hの配列が存在する¹⁾。これらの配列はよく保存されており、金属結合モチーフとみられている。TMD1, TMD2およびTMD5の3つの領域は両親媒性でかつ保存性の高い領域であり、基質金属の輸送に重要な役割を果たしていると推察されている²⁰⁾。この点については実験的な検証が待たれる。

ほ乳類のZnTサブファミリーに属するZnT1は細胞膜に、ZnT2はエンドソームに局在し⁵⁰⁾、共に亜鉛耐性に寄与している。*S. cerevisiae*のZRC1とCOT1は、液胞膜に局在し、金属を液胞へ隔離している³⁷⁾。これらをコードする遺伝子を高発現させた場合、宿主の酵母はそれぞれ亜鉛とカドミウム³²⁾およびコバルトに耐性¹⁴⁾となった。分裂酵母の*Schizosaccharomyces pombe*では、ZRC1相同遺伝子が恒常的に発現している。この遺伝子破壊株は亜鉛に高感受性となることから、亜鉛輸送

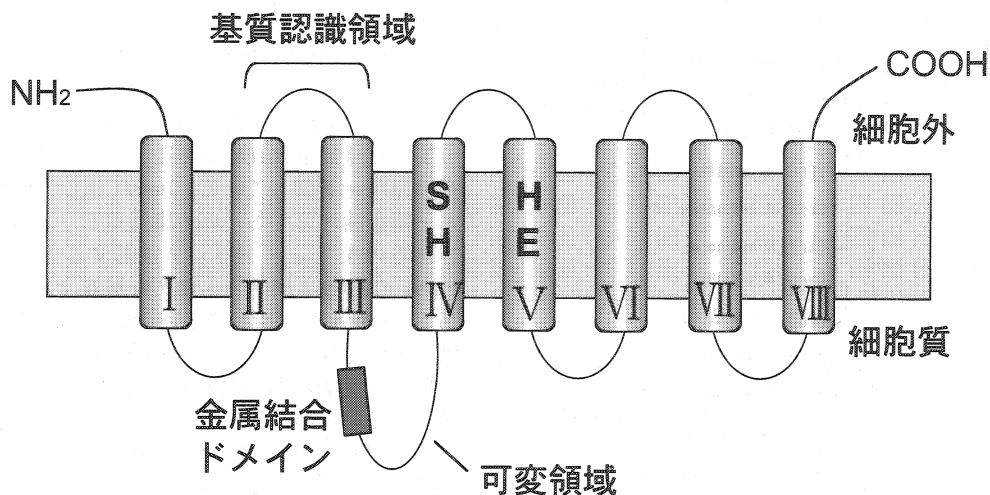


図4. 予想される ZIP ファミリーのトポロジー。例として *A. thaliana* の IRT1 を示す。金属結合ドメインはヒスチジンに富んだ HGHGHGHG のモチーフをもつ。

に参与することが示された¹⁰⁾。*A. thaliana* の ZAT は液胞膜に局在している。この ZAT 遺伝子を高発現したトランスジェニック植物は、亜鉛耐性となったがカドミウム感受性は変わらなかった⁷⁰⁾。

2.4. Nramp (Natural resistance associated macrophage protein) ファミリー

マウスの細菌に対する感受性は *lty* (*Lsh* あるいは *Bcg* とも呼ばれる) ローカスに支配される事が知られていた。ポジショナルクローニングにより単離された原因遺伝子が *Nramp1* である⁷¹⁾。*Nramp1* mRNA はマクロファージで発現し、疎水性の 56 kDa の蛋白質をコードしていた。この *Nramp1* 蛋白質はマクロファージのファゴソーム膜で 2 価カチオンの排出ポンプとして働き、マンガンなどを必要とするスーパーオキシドジスムターゼなどの活性化を防いでいると考えられている²²⁾。*Nramp* ファミリーのメンバーは、8 から 12 回の TMD 構造を持つ。TMD8 と TMD9 の間のコンセンサス配列 (TMTX₄GD/QX₄GF) は K⁺ チャンネルファミリーの透過孔 (permeation pore) の部分に見られる配列に極めて類似しており金属輸送において重要な働きをしていると考えられている。このファミリーによる金属輸送は pH 依存性である。ラットの DCT1/*Nramp2*²⁵⁾ と *S. cerevisiae* の SMF1⁶⁵⁾ ではプロトンとの共輸送で金属が取り込まれる。

Nramp ファミリーのホモログは、細菌、カビ、植物でも見つかっている。*S. cerevisiae* では、高親和性マンガントランスポーター SMF1、低親和性マンガントランスポーター SMF2 そして SMF3 が同定され、それぞれ細胞膜、ポストゴルジ膜、液胞膜に局在することがわかっている。これらの 3 重破壊株では、マンガンの蓄積が減少した¹³⁾。SMF1 と SMF2 を過剰に発現させた酵母では、マンガンの取り込みが増加した⁶⁵⁾。また SMF1 と SMF2 は、鉄、銅、カドミウムそしてコバルトも取り込み、SMF2 はコバルトを優先的に取り込んだ⁴¹⁾。

植物からは *A. thaliana* で AtNramp1-5 が、*Oryza sativa* で OsNramp1-3 が報告されている。これらの

Nramp 金属トランスポーターは、アミノ酸配列による系統解析によって AtNramp1 と OsNramp1 のグループと、AtNramp2-5 と OsNramp2 の 2 つの小グループに分けることができる¹⁵⁾。AtNramp1, 3 そして 4 は、*S. cerevisiae* の鉄輸送トランスポーター遺伝子である *fet3* と *fet4* の 2 重変異体の鉄輸送機能を相補する。また、これらの遺伝子発現は鉄の供給が抑えられた条件で誘導された。*AtNramp3* の過剰発現株は、カドミウムに対し高感受性になり、一方破壊株はカドミウム耐性になることから、AtNramp3 は、カドミウムの取り込みにも関与することが判明している⁶⁷⁾。

2.5. ABC (ATP Binding Cassette) トランスポーター

このファミリーのメンバーは、WalkerA および WalkerB とよばれるモチーフに加えて ABC タンパク質に特徴的な 12 から 13 個のアミノ酸残基からなるヌクレオチド結合領域 (NBD) を持つ ATPase である²⁸⁾。ABC トランスポーターの多くは、2 個の NBD と 12~17 回の TMD を持つ。また、イオン、重金属、炭水化物、抗がん剤、アミノ酸、りん脂質、ステロイド、抗生物質などの他、様々なものを輸送することが知られている⁶⁾。

大腸菌やその他の生物のゲノム解析により、ABC トランスポーターはいずれの生物においても最も大きな遺伝子ファミリーを形成していることがわかってきた⁷²⁾。高等植物の *A. thaliana* では 129 の遺伝子からファミリーが構成される⁶³⁾。*E. coli* の ZnuABC は、ペリプラズムタンパク質 ZnuA、膜タンパク質 ZnuB、ATPase 本体である ZnuC の 3 つのタンパク質から構成されており、亜鉛を特異的に細胞質に取り込む⁵²⁾。他にも亜鉛、マンガン、ニッケル、コバルトそして鉄など多くの重金属を輸送する ABC トランスポーターがあるが、詳細は他を参照されたい^{9,18)}。

S. pombe の液胞膜に局在する HMT1 は、ファイトケラチンとカドミウムの複合体 (PC-Cd コンプレックス) を液胞へ輸送する⁴⁹⁾。抗癌剤多剤耐性を与える異物排出ポンプである MRP (human multi-drug resistance-associated protein) の酵母ホモログ YCF1 は、ファイトケ

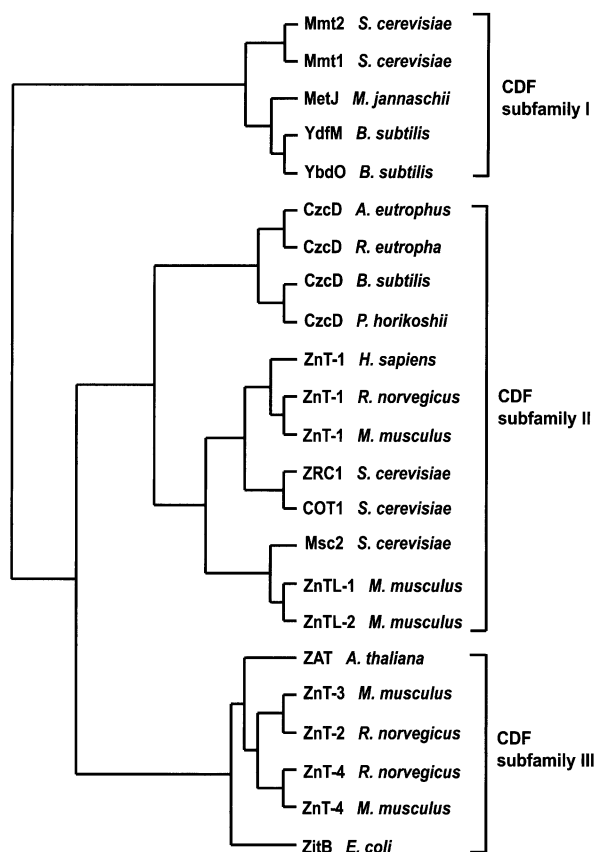


図5. CDFファミリータンパク質のクラスター解析。解析には DDBJ が公開している CLUSTALW (default) を用いた。Protein ID を () 内に示す。CDF subfamily I: Mmt2, *S. cerevisiae* (NP_015100); Mmt1, *S. cerevisiae* (NP_013902); MetJ, *M. jannaschii* (Q57891); YdfM, *B. subtilis* (C69781); YbdO, *B. subtilis* (B69772)。CDF subfamily II: CzcD, *Alcaligenes eutrophus* (D33830); CzcD, *Ralstonia eutropha* (P13512); CzcD, *B. subtilis* (C69612); CzcD, *Pyrococcus horikoshii* (H71078); ZnT-1, *H. sapiens* (Q9Y6M5); ZnT-1, *Rattus norvegicus* (Q62720); ZnT-1, *M. musculus* (AAF43422); ZRC1, *S. cerevisiae* (NP_013970); COT1, *S. cerevisiae* (NP_014961); Msc2, *S. cerevisiae* (NP_010491); ZnTL-1, *M. musculus* (AAF43422); ZnTL-2, *M. musculus* (AAF43423)。CDF subfamily III: ZAT, *A. thaliana* (AAD11757); ZnT-3, *M. musculus* (P97441); ZnT-2, *R. norvegicus* (NP_037022); ZnT-4, *R. norvegicus* (O55174); ZnT-4, *M. musculus* (NP_035904); ZitB, *E. coli* (P75757)。

ラチンの前駆体であるグルタチオンとカドミウムの複合体を輸送する glutathione *S*-conjugate pump である^{38,39}。MRP の *A. thaliana* ホモログである AtMRP3 は、液胞に PC-Cd コンプレックスを輸送すると考えられており、事実 *S. cerevisiae* の *YCF1* 変異株を部分的にだが相補する⁶⁸。

2.6. 水銀トランスポーター

2.6.1. 細菌の水銀耐性遺伝子に見られる水銀トランスポーター遺伝子

これまでに見いだされた細菌の水銀耐性の多くは、*mer* 遺伝子によっている (本号の Endo G. and Silver S. 及び芳生, 清野の稿を参照)。トランスポゾン Tn501 の *mer* 遺伝子の場合、構造遺伝子は *merT*, *merP*, *merA*,

merD そして *merE* からなっており、単一のプロモーターから一つの転写単位で読み出される、いわゆるオペロンを構成している (図7A)⁴⁰。オペレーター/プロモーターの上流に構造遺伝子とは転写の向きが反対になっている遺伝子 *merR* が存在し、この遺伝子産物がこの系の発現を制御している。*merD* 遺伝子産物もオペレーター結合活性をもち、*mer* 構造遺伝子が必要以上に転写されるのをフィードバック制御すると言われている。*merA* の産物は $Hg^{2+} \rightarrow Hg^0$ を触媒する水銀還元酵素である。*merA* の上流にある *merP* と *merT* の遺伝子産物は、それぞれペリプラズムと細胞膜に局在し、培地から水銀イオンを細胞質に存在する MerA タンパク質に輸送する役目を担っている事がわかっている。トランスポゾン Tn21 の *mer* オペロンの場合には、*merP* と *merA* の間に新たな遺伝子 *merC* が存在した (図7A)。Tn21 の *mer* オペロンから *merC* を欠損させた変異体の水銀耐性能が親株と変わらない事から、当初 *merC* は機能を持たないと考えられた。

著者らが鉄酸化細菌の一種である *Acidithiobacillus ferrooxidans* E-15 株より見いだした水銀耐性決定因子は、次のような遺伝子構成をもつ: 制御遺伝子である *merR* は少なくとも2つあり、ゲノム DNA 上 6 kb 以上離れた位置のオペレーター/プロモーター (P3) の下流には *merC* と *merA* のみが存在した (図7B)³¹。すなわちこの *mer* オペロンの中には *merT* と *merP* が存在しなかった。*merA* 遺伝子は、DNA 塩基配列の相同性から水銀還元酵素をコードすることが予想され、事実、大腸菌で作られた鉄酸化細菌由来の組み換え MerA タンパク質は、NADPH に依存して Hg^{2+} を Hg^0 に還元することが示された³⁵。一方、*merC* 遺伝子産物は MerT や MerP のかわりに水銀イオン (Hg^{2+}) を細胞内への取り込むことが示された³⁰。Tn21 の *merC* 遺伝子も水銀イオンの輸送担体をコードすることが追認されている。

Tn5053 の *mer* オペロンでは、*merP* と *merA* の間に *merF* 遺伝子が存在するが、この遺伝子も水銀トランスポーターをコードすることが N. Brown のグループによって示されている (図7A)⁷³。従ってグラム陰性細菌では、MerT, MerC そして MerF が水銀トランスポート活性を持っている事がわかっている。

2.6.2. MerC トランスポーター

著者らは、鉄酸化細菌由来の *merC* 遺伝子を酵母に導入し、ガラクトース誘導条件下に発現させた (図8A)。こうした酵母は水銀以外の重金属、特にカドミウム、コバルト、亜鉛そして銅に対して高感受性となる事実をみいだした (図8B)^{45,46}。この現象は大腸菌でも確認された。この結果は、MerC タンパク質の重金属に対する基質認識は厳密でなく、水銀ばかりでなくカドミウム、コバルト、亜鉛そして銅イオンの輸送担体としても機能することを示している。

MerC タンパク質はいずれも4回の TMD 構造を持つと予想されている。このうち Tn21 由来の MerC の研究では、4つの TMD のうち N 末端側にある最初の TMD にある重金属結合モチーフ MxCxxC にある22番目と25番目のシステイン対が水銀輸送に重要であることが部位特異的変異実験から結論されている⁶²。著者らは鉄酸化

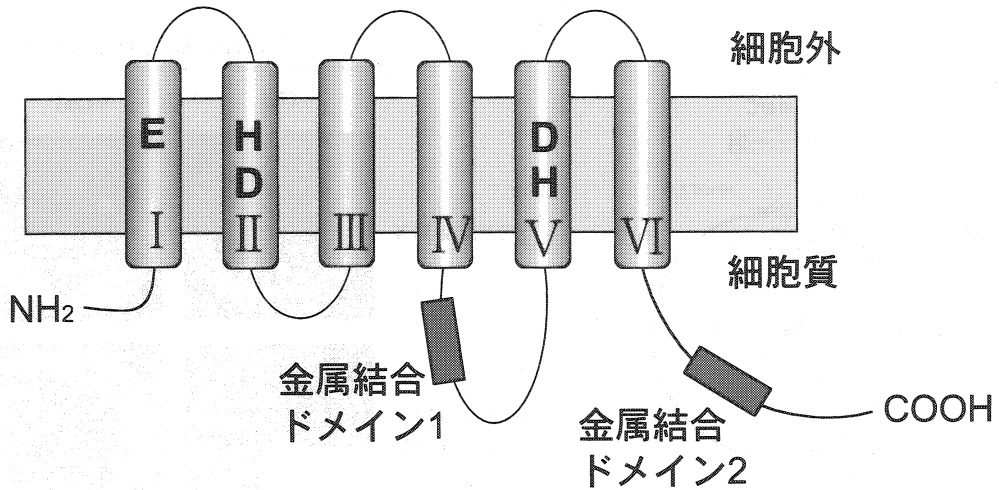
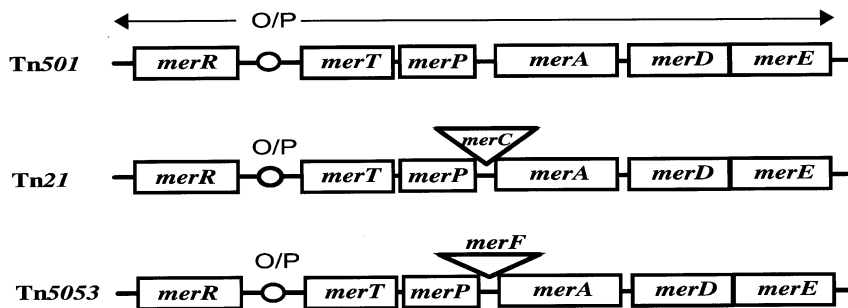


図6. 予想される CDF ファミリーのトポロジー。例として *S. cerevisiae* の ZRC1 を示す。金属結合ドメインはヒスチジンに富んだ HDH-x5-HSHSHG-x16-HSHSH (ドメイン1) と HD-x-H-x-W-x-LT-x8-H (ドメイン2) より成っている。ドメイン I, II と V に保存されている極性アミノ酸残基または電荷を持つアミノ酸残基を示す。

A



B

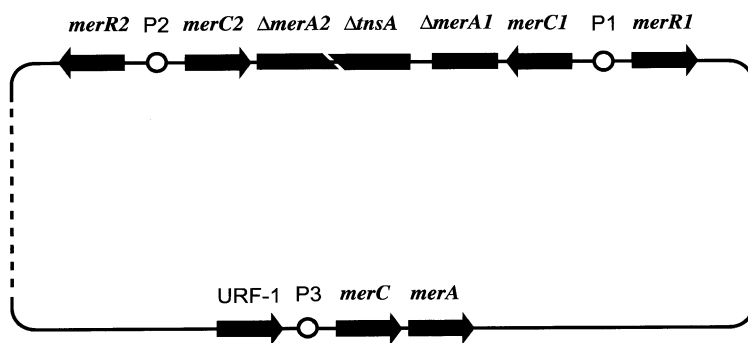


図7. (A) 3種の代表的な水銀耐性 *mer* オペロンの遺伝子構成と (B) *A. ferrooxidans* E-15 株染色体上の水銀耐性遺伝子の遺伝子構成。
 A. Tn501 は *merT*, *merP*, *merA*, *merD* として *merE* が単一プロモーターから矢印で示されるように転写される。Tn21 *mer* オペロンには *merP* と *merA* の間に *merC* 遺伝子が存在する。Tn5053 *mer* オペロンは *merP* と *merA* の間に *merF* を持っている。いずれの *mer* オペロンの場合でも、*merT* の上流に発現制御遺伝子である *merR* が存在する。*merR* 遺伝子の転写の向きは、*merT* 以下の構造遺伝子とは逆である。B. P3 プロモーターの下流に *merC* と *merA* 遺伝子が存在する。*merR* (レギュレーター) 遺伝子は2コピー (*merR1* と *merR2*) 存在するが、P3 転写単位には連結していない。P1 と P2 プロモーターの下流には、それぞれ *merC1* とトランケート型の *merA1* として *merC2* とトランケート型の *merA2* が位置する。Tn7 *tnsA* 遺伝子が二つのトランケート型の *merA* に挟まれている。

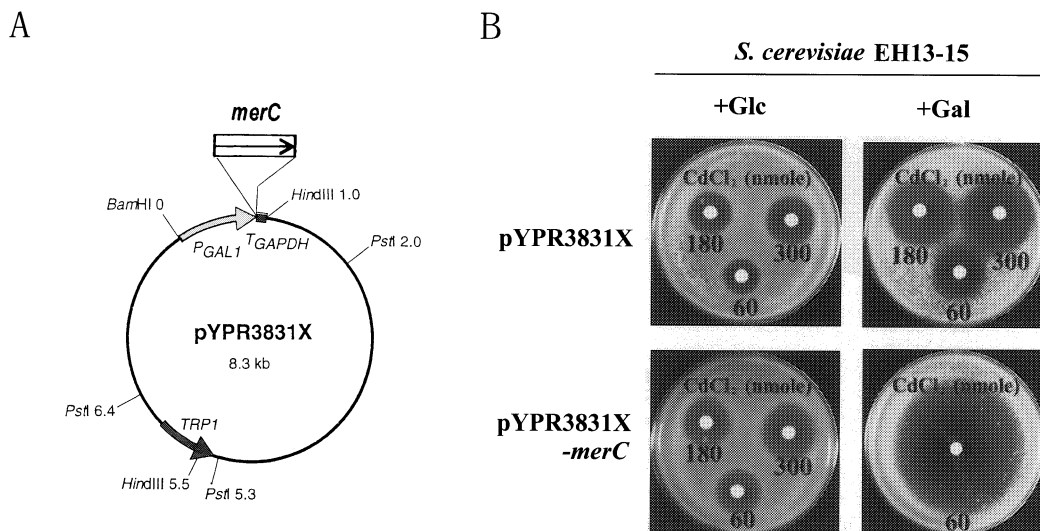


図 8. 酵母の *merC* 発現ベクターの模式図と *merC* 発現酵母のカドミウム感受性。A. トリプトファン合成酵素遺伝子を選択マーカーとして持つ酵母プラスミド pYPR3831X のガラクトース誘導性 *GAL1* プロモーターの支配下に *merC* 遺伝子が挿入されている。B. 対照ベクター pYPR3831X と pYPR3831X-*merC* プラスミドを *S. cerevisiae* EH13-15 に形質転換し、グルコース (*GAL1* プロモーターが誘導されない) 含有培地、ガラクトース (*GAL1* プロモーターが誘導される) 含有培地でカドミウム感受性を測定した。数字は抗生物質検定用ディスクに含まれる塩化カドミウムの量 (nmole) を示す。

細菌由来の MerC のほぼ同じ位置にあるシステイン対 (23番と26番目) を他のアミノ酸に変えると、宿主大腸菌の水銀に対する高感受性が失われる事を確認しており Tn2I 由来の MerC での結果と一致する。興味深いことに、これらのシステイン対はカドミウムに対する感受性には影響を与えない。この結果は、少なくとも大腸菌では MerC は水銀とカドミウムを異なる機構で認識している事を示している (投稿準備中)。現在、植物において MerC が、今日土壌汚染で大きな問題となっているカドミウムを吸収できるか検討を行っている。

さらに上記の結果は、重金属トランスポーターの金属選択性を蛋白質工学的に操作することが可能である事を示している。

2.7. その他の重金属トランスポーター

2.7.1. RND (Resistance Nodulation cell Division) ファミリー

RND ファミリーは細菌、古細菌そして真核生物に見られ 8つのサブファミリーに系統分類される。重金属を輸送するものはサブファミリー 1 に属し、主にグラム陰性細菌に由来する⁶⁹⁾。このファミリーは12回の TMD 構造をもち、プロトンとの対向輸送によりコバルト、亜鉛、カドミウム、ニッケル、銅そして銀などの重金属を細胞外へ排出する。グラム陰性細菌は、外膜と内膜から構成される膜構造をもっており、その間にはペリプラズムが存在する。従って、外膜因子 (OMF) と膜融合蛋白質 (MFP) と RND 蛋白質の3つがチャンネルを構成する (図9)。 *Alcaligenes eutrophus* では、CnrA と CzcA

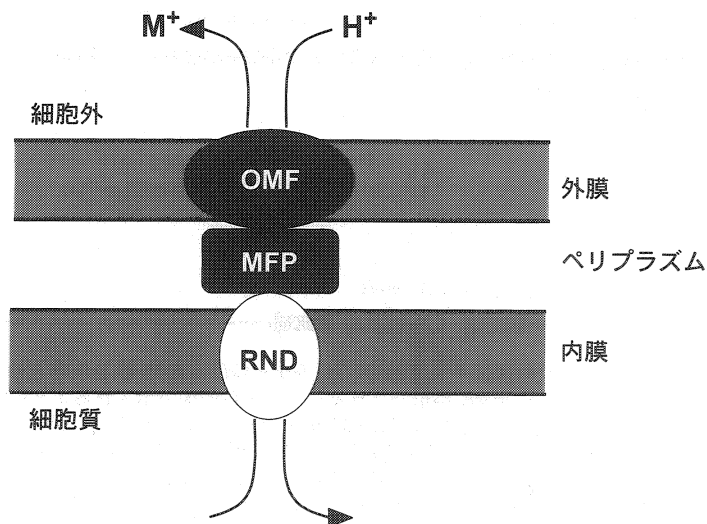


図 9. RND ファミリーの金属輸送複体の模式図。

が知られており、前者はコバルトと亜鉛を、後者はカドミウム、ニッケルそしてコバルトを輸送する⁵³⁾。

2.7.2. CTR (Copper TRansporter) ファミリー

S. cerevisiae の CTR1 と CTR3 は、3回の TMD 構造をもち、銅の取り込み活性をもつ。酵母細胞の表層にある金属還元酵素 Fre1, Fre2 によって $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ の反応がおこるが、これらの輸送体は1価の銅を輸送する^{21,27)}。Fre1, Fre2 酵素は、 $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ の反応も触媒する。CTR1 の N 末端側の細胞外に位置する領域には Mets ドメインと呼ばれる金属結合モチーフ (MxxMxM) が8回くり返される¹⁶⁾。ヒトの hCTR1 やマウスの mCTR1 では2回、*S. pombe* の CTR4 では Mets ドメインが5回繰り返される³⁶⁾。CTR1 はホモ多量体を¹⁶⁾、CTR3 はホモ3量体を形成する³⁴⁾ 高親和性銅トランスポーターであり、一方 CTR2 は低親和性銅トランスポーターである³⁶⁾。酵母の銅の取り込みと各器官への輸送についての詳細は文献⁵⁶⁾ を参照していただきたい。植物では、*A. thaliana* から銅トランスポーターと推定される COPT1 (COpper Transpoter 1) が報告されている³³⁾。

3. 環境からの重金属回収のために重金属トランスポーター研究は貢献できるか

ハイパーアキュムレーターと呼ばれる重金属を高蓄積する植物が知られている。こうした植物は鉱山などの重金属の多い場所に生息する 경우가多く、上述の特性のためにファイトレメディエーションへの利用が考えられている。ニッケルを多量に蓄積するアカネ科の *Psychotria douarrei*、亜鉛を蓄積するアブラナ科の *Thlaspi caerulescens* そして銅を蓄積するヒルガオ科の *Ipomoea alpina* などが知られている⁴⁸⁾。最近の研究により、こうした重金属高度蓄積植物の金属蓄積に重金属トランスポーター遺伝子の発現が関わっていることが徐々に明らかになってきており、いくつかの例を紹介する。

ヘビノネゴザの一種である *T. caerulescens* は、亜鉛などの金属を多量に蓄積する。この植物から ZIP ファミリーの重金属トランスポーター遺伝子である ZNT1 と ZNT2 が同定された^{2,55)}。*T. caerulescens* では高親和性の亜鉛トランスポーターである ZNT1 の発現量が、金属を高レベルに蓄積しない *T. arvense* と比較して極めて高いことが報告されている。また、*T. caerulescens* では亜鉛による ZNT1 の発現抑制が *T. arvense* より高濃度で起こることも知られている。こうしたことから *T. caerulescens* の亜鉛の高度蓄積は金属トランスポーター遺伝子の発現レベルと相関することが強く示唆された⁵⁵⁾。また通常 *T. caerulescens* は、カドミウムを茎に 100 mg/kg 以上蓄積する。ところが南フランス産の Ganges は分類上同じ *T. caerulescens* に属するが、他のエコタイプと比較してカドミウムの茎への蓄積量が 10,000 mg/kg と100倍も多い^{43,44)}。この Ganges から ZIP ファミリーに属する IRT1 の相同遺伝子 TcIRT1-G と TcZNT1-G が同定された。*A. thaliana* の IRT1 は、鉄欠乏時にその発現量が増加すること¹²⁾ から、鉄の存在量と亜鉛とカドミウムの取り込みの関係が調べられた。その結果、鉄欠乏時に Ganges では、TcIRT1-G の発現

量が増加し、そしてカドミウムの取り込みも増加した。一方、亜鉛の取り込みは鉄欠乏の影響を受けなかった。このことから、Ganges における鉄欠乏時のカドミウム取り込みの増加は、TcIRT1-G 遺伝子の発現量が増加するためであると考えられている⁴²⁾。

こうした事例は、生物の重金属トランスポーター遺伝子を高発現させたり、重金属取り込み効率に優れた重金属トランスポーターを創成し生物に導入することにより、従来の生物にくらべ高度に重金属を蓄積する生物を創りだせる可能性を示唆している。

4. 重金属トランスポーターのバイオレメディエーションへの利用

分子生物学的な手法を用いて生物に重金属耐性を付与する試みは、(1) メタロチオネインやファイトケラチン遺伝子の発現を強化させる、(2) これらに多く含まれるシステインが含硫アミノ酸であることから硫黄代謝系を活性化する等によりなされている。有機水銀を無機化する merB 遺伝子と前述の水銀還元酵素をコードする merA 遺伝子を共発現させた形質転換植物は、有機および無機水銀に耐性となったとの報告も最近なされている⁷⁾。本稿で取り扱っている重金属トランスポーターを利用した例として興味深い研究がいくつか報告されている。水銀トランスポーターである merT-merP と *S. cerevisiae* と *Pisum sativum* 由来のメタロチオネイン遺伝子⁸⁾ や化学合成したファイトケラチン遺伝子⁹⁾ を共発現させた大腸菌はいずれも、無機水銀を親株の数倍も蓄積した。さらに、詳細は本号の芳生、清野の稿に詳しいが、*Pseudomonas* sp. K-62 株由来の水銀耐性オペロンから merA を除いた merR-o/p-merT-merP-merB1 の下流に細菌由来のポリリン酸キナーゼ (ppk) 遺伝子を挿入した大腸菌の組み換え体は、無機および有機水銀に耐性になる報告もされている⁵¹⁾。これらの組換え体では、水銀トランスポーターである MerP と MerT により細胞質へ無機水銀が取り込まれ、この水銀が重金属と親和性の高いメタロチオネイン、ファイトケラチンそしてポリリン酸によってキレートされることにより低毒化されたと考えられる。こうした研究は、生物を用いた重金属回収のひとつのモデル系を提示していると言える。

5. おわりに

これまで概説したように、重金属トランスポーターに関する構造、金属特異性、生理的役割そして発現制御機構などが次第に明らかになってきている。さらに今日のゲノムプロジェクトからの情報の蓄積によって多くの生物のもつ種々のトランスポーターの存在が確かめられている。こうしたものの中には機能未知の重金属トランスポーターが数多く存在しており、それらに対する研究の進展が待たれるところである。機能、構造そして基質特異性等に関する様々な基礎的知見を総合することにより、進化工学、タンパク質工学的手法を用いた輸送効率、基質特異性に優れた重金属トランスポーターの創成が可能になる。こうした成果は、バイオレメディエーションによる重金属除染システムの構築をより現実的なも

のにすると考える。

文 献

- 1) Anton, A., C. Grosse, J. Reissmann, T. Pribyl, and D.H. Nies. 1999. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *J. Bacteriol.* 181: 6876–6881.
- 2) Assunção, A.G.L., P. Da Costa Martins, S. De Folter, R. Vooijs, H. Schat, and M.G. Aarts. 2001. Melevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ.* 24: 217–226.
- 3) Axelsen, K.B., and M.G. Palmgren. 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* 46: 84–101.
- 4) Axelsen, K.B., and M.G. Palmgren. 2001. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 696–706.
- 5) Bae, W., R.K. Mehra, A. Mulchandani, and W. Chen. 2001. Genetic engineering of *Escherichia coli* for enhanced uptake and bioaccumulation of mercury. *Appl Environ Microbiol.* 67: 5335–5338.
- 6) Bauer, B.E., H. Wolfger, and K. Kuchler. 1999. Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1461: 217–236.
- 7) Bizily, S.P., C.L. Rugh, and R.B. Meagher. 2000. Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. *Nat. Biotechnol.* 18: 213–217.
- 8) Chen, S., and D.B. Wilson. 1997. Construction and characterization of *Escherichia coli* genetically engineered for bioremediation of Hg²⁺-contaminated environments. *Appl Environ Microbiol.* 63: 2442–2445.
- 9) Claverys, J.P. 2001. A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res. Microbiol.* 152: 231–243.
- 10) Clemens, S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475–486.
- 11) Cobbett, C., and P. Goldsbrough. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 53: 159–182.
- 12) Cohen, C.K., T.C. Fox, D.F. Garvin, and L.V. Kochian. 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol.* 116: 1063–1072.
- 13) Cohen, A., H. Nelson, and N. Nelson. 2000. The family of SMF metal ion transporters in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 275: 33388–33394.
- 14) Conklin, D.S., J.A. McMaster, M.R. Culbertson, and C. Kung. 1992. COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12: 3678–3688.
- 15) Curie, C., J.M. Alonso, M. Le. Jean, J.R. Ecker, and J.F. Briat. 2000. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* 347: 749–755.
- 16) Dancis, A., D.S. Yuan, D. Haile, C. Askwith, D. Eide, C. Moehle, J. Kaplan, and R.D. Klausner. 1994. Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* 76: 393–402.
- 17) Eide, D., M. Broderius, J. Fett, and M.L. Guerinot. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5624–5628.
- 18) Eitinger, T., and M.A. Mandrand-Berthelot. 2000. Nickel transport systems in microorganisms. *Arch. Microbiol.* 173: 1–9.
- 19) Gaither, L.A., and D.J. Eide. 2000. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *J. Biol. Chem.* 275: 5560–5564.
- 20) Gaither, L.A., and D.J. Eide. 2001. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biomaterials* 14: 251–270.
- 21) Georgatsou, E., L.A. Mavrogiannis, G.S. Fragiadakis, and D. Alexandraki. 1997. The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J. Biol. Chem.* 272: 13786–13792.
- 22) Govoni, G., and P. Gros. 1998. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm. Res.* 47: 277–284.
- 23) Grotz, N., T. Fox, E. Connolly, W. Park, M.L. Guerinot, and D. Eide. 1998. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 7220–7224.
- 24) Guerinot, M.L. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta.* 1465: 190–819.
- 25) Gunshin, H., B. Mackenzie, U.V. Berger, Y. Gunshin, M.F. Romero, W.F. Boron, S. Nussberger, J.L. Gollan, and M.A. Hediger. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388: 482–488.
- 26) Gupta, A., K. Matsui, J.F. Lo, and S. Silver. 1999. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat. Med.* 5: 183–188.
- 27) Hassett, R., and D.J. Kosman. 1995. Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270: 128–134.
- 28) 平田 肇, 茂木立志. 2000. ポンプとトランスポーター. 日本生物物理学会, シリーズ・ニューバイオフィジックス 刊行委員会編. pp. 40–205.
- 29) Hirayama, T., J.J. Kieber, N. Hirayama, M. Kogan, P. Guzman, S. Nourizadeh, J.M. Alonso, W.P. Dailey, A. Dancis, and J.R. Ecker. 1999. RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* 97: 383–393.
- 30) Inoue, C., T. Kusano, and S. Silver. 1996. Mercuric ion uptake by *Escherichia coli* cells producing *Thiobacillus ferrooxidans merC*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 1289–1292.
- 31) Inoue, C., K. Sugawara, and T. Kusano. 1991. The *merR* regulatory gene in *Thiobacillus ferrooxidans* is spaced apart from the *mer* structural genes. *Mol. Microbiol.* 5: 2707–2718.
- 32) Kamazono, A., M. Nishizawa, Y. Teranishi, K. Murata, and A. Kimura. 1989. Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 219: 161–167.
- 33) Kampfenkel, K., S. Kushnir, E. Babiychuk, D. Inze, and M. Van Montagu. 1995. Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J. Biol. Chem.* 270: 28479–28486.
- 34) Korshunova, Y.O., D. Eide, W.G. Clark, M.L. Guerinot, and H.B. Pakrasi. 1999. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol. Biol.* 40: 37–44.
- 35) Kusano, T., G.Y. Ji, C. Inoue, and S. Silver. 1990. Constitutive synthesis of a transport function encoded by the *Thiobacillus ferrooxidans merC* gene cloned in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 2688–2692.
- 36) Labbe, S., and D.J. Thiele. 1999. Pipes and wiring: the regulation of copper uptake and distribution in yeast. *Trends Microbiol.* 7: 500–505.
- 37) Li, L., and J. Kaplan. 1998. Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J. Biol. Chem.* 273: 22181–22187.
- 38) Li, Z.S., Y.P. Lu, R.G. Zhen, M. Szczypka, D.J. Thiele, and P.A. Rea. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed

- transport of bis (glutathionato) cadmium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 42-47.
- 39) Li, Z.S., M. Szczypka, Y.P. Lu, D.J. Thiele, and P.A. Rea. 1996. The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. J. Biol. Chem. 271: 6509-6517.
 - 40) Liebert, C.A., A.L. Watson, and A.O. Summers. 2000. The quality of *merC*, a module of the *mer* mosaic. J. Mol. Evol. 51: 607-622.
 - 41) Liu, X.F., F. Supek, N. Nelson, and V.C. Culotta. 1997. Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* *BSD2* gene. J. Biol. Chem. 272: 11763-11769.
 - 42) Lombi, E., K.L. Tearall, J.R. Howarth, F.J. Zhao, M.J. Hawkesford, and S.P. McGrath. 2002. Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant Physiol. 128: 1359-1367.
 - 43) Lombi, E.F., J. Zhao, S.J. Dunham, and S.P. McGrath. 2000. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. New. Phytol. 145: 11-20.
 - 44) Lombi, E., F.J. Zhao, S.P. McGrath, S.D. Youngand, and G.A. Sacchi. 2001. Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. New. Phytol. 149: 53-60.
 - 45) 皆川貴洋, 宮崎 厚, 草野友延. 2002. 水銀イオン輸送担体 MerC の金属特異性の検討. 日本農芸化学会大会 講演番号 3-5Ba03 大会講演要旨集 p. 174.
 - 46) 皆川貴洋, 佐々木祥人, 宮崎 厚, 草野友延. 2002. 鉄酸化細菌由来の水銀輸送担体 MerC の重金属特異性と金属輸送能に関するアミノ残基の同定. 日本農芸化学会東北支部会 講演番号 A-6 講演要旨集. 1: p. 18.
 - 47) 森川弘道, 高橋美佐, 河村義史. 2001. ファイトレメディエーションによる環境修復の新展開. 環境バイオテクノロジー学会誌. 1: 1-14.
 - 48) 大川安信, 大川秀郎. 2002. 植物の機能を利用した環境の修復. 化学と生物. 40: 239-244.
 - 49) Ortiz, D.F., T. Ruscitti, K.F. McCue, and D.W. Ow. 1995. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. J. Biol. Chem. 270: 4721-4728.
 - 50) Palmiter, R.D., T.B. Cole, and S.D. Findley. 1996. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. EMBO J. 15: 1784-1791.
 - 51) Pan-Hou, H., M. Kiyono, H. Omura, T. Omura, and G. Endo. 2002. Polyphosphate produced in recombinant *Escherichia coli* confers mercury resistance. FEMS Microbiol. Lett. 207: 159-164.
 - 52) Patzer, S.I., and K. Hantke. 1998. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 28: 1199-1210.
 - 53) Paulsen, I.T., J.H. Park, P.S. Choi, and M.H. Jr. Saier. 1997. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 156: 1-8.
 - 54) Pena, M.M., S. Puig, and D.J. Thiele. 2000. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. J. Biol. Chem. 275: 33244-33251.
 - 55) Pence, N.S., P.B. Larsen, S.D. Ebbs, D.L. Letham, M.M. Lasat, D.F. Garvin, D. Eide, and L.V. Kochian. 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 4956-4960.
 - 56) Portnoy, M.E., P.J. Schmidt, R.S. Rogers, and V.C. Culotta. 2001. Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genomics. 265: 873-882.
 - 57) Rensing, C., B. Fan, R. Sharma, B. Mitra, and B.P. Rosen. 2000. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 652-656.
 - 58) Rensing, C., M. Ghosh, and B.P. Rosen. 1999. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. J. Bacteriol. 181: 5891-5897.
 - 59) Rensing, C., Y. Sun, B. Mitra, and B.P. Rosen. 1998. Pb(II)-translocating P-type ATPases. J. Biol. Chem. 273: 32614-32617.
 - 60) Rensing, C., B. Mitra, and B.P. Rosen. 1997. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 14326-14331.
 - 61) Rogers, E.E., D.J. Eide, and M.L. Guerinot. 2000. Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 12356-12360.
 - 62) Sahlman, L., E.M. Hagglof, and J. Powlowski. 1999. Roles of the four cysteine residues in the function of the integral inner membrane Hg²⁺-binding protein, MerC. Biochem. Biophys. Res. Commun. 255: 307-311.
 - 63) Sánchez-Fernández, R., T.G.E. Davies, J.O.D. Coleman, and P.A. Rea. 2001. The *Arabidopsis thaliana* ABC Protein Superfamily, a Complete Inventory. J. Biol. Chem. 276: 30231-30244.
 - 64) Solioz, M., and C. Vulpe. 1996. CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. Trends. Biochem. Sci. 21: 237-241.
 - 65) Supek, F., L. Supekova, H. Nelson, and N. Nelson. 1996. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 5105-5110.
 - 66) Tabata, K., S. Kashiwagi, H. Mori, C. Ueguchi, and T. Mizuno. 1997. Cloning of a cDNA encoding a putative metal-transporting P-type ATPase from *Arabidopsis thaliana*. Biochim. Biophys. Acta. 1326: 1-6.
 - 67) Thomine, S., R. Wang, J.M. Ward, N.M. Crawford, and J.I. Schroeder. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 4991-4996.
 - 68) Tommasini, R., E. Vogt, M. Fromenteau, S. Hortensteiner, P. Matile, N. Amrhein, and E. Martinoia. 1998. An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. Plant J. 13: 773-780.
 - 69) Tseng, T.T., K.S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D.H. Nies, A. Goffeau, and M.H. Jr. Saier. 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1: 107-125.
 - 70) van der Zaal, B.J., L.W. Neuteboom, J.E. Pinas, A.N. Chardonnens, H. Schat, J.A. Verkleij, and P.J. Hooykaas. 1999. Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. Plant Physiol. 119: 1047-1055.
 - 71) Vidal, S.M., D. Malo, K. Vogan, E. Skamene, and P. Gros. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. Cell 73: 469-485.
 - 72) 和田守正, 内海 健, 桑野信彦. 2001. ABC トランスポーター: 構造と機能研究の新展開. 生化学. 73: 537-546.
 - 73) Wilson, J.R., C. Leang, A.P. Morby, J.L. Hobman, and N.L. Brown. 2000. MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercuric ion transporters? FEBS Lett. 472: 78-82.
 - 74) Zhao, H., and D. Eide. 1996. The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 2454-2458.
 - 75) Zhao, H., and D. Eide. 1996. The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 271: 23203-23210.