

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07703

研究課題名(和文) コムギ・ダイズのカドミウム吸収におけるNramp5遺伝子の役割

研究課題名(英文) Roles of Nramp5 genes for cadmium uptake by wheat and soybean

研究代表者

石川 覚 (Ishikawa, Satoru)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・ユニット長

研究者番号：40354005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イネはマンガントランスポーターであるOsNramp5を介して根からカドミウム(Cd)を吸収する。ダイズやコムギもNramp5のオルソログタンパク質を介してCdを吸収するのかどうか、調査した。イネ同様、ダイズやコムギのNramp5も原形質膜に局在した。ダイズのGmNramp5はCdとMnを輸送したが、コムギのNramp5 (TaNramp5A, 5B, 5D, TdNramp5A, 5B) はほとんど輸送活性を示さなかった。このことから、コムギは他のトランスポーターを介してCdを吸収している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コムギ、ダイズはカドミウム(Cd)の主要な摂取源であるため、低減策が必要である。本研究はイネの先行研究で得られた情報をもとに、Nramp5の相同性遺伝子にターゲットを絞り、コムギとダイズのCd吸収に関わる分子機構を解析した。ダイズのGmNramp5はCdを輸送するが、コムギのABDゲノム上にあるNramp5はいずれも輸送活性が低いことを初めて明らかにした。またOsNramp5とTaNramp5Aのキメラタンパク質からCd吸収に関わる膜貫通領域が示された。今後これらの情報はCd吸収を抑制した畑作物の開発に活用できると思われる。

研究成果の概要(英文)：Rice roots are well known to assimilate Cd and Mn via OsNramp5 transporter. We investigated whether ortholog proteins of Nramp5 in soybean and wheat as well as rice contribute to Cd uptake. We observed that all Nramp5 ortholog proteins localized on the plasma membrane. High ability for Cd and Mn transport was found in GmNramp5 in soybean, whereas was not or poor in all Nramp5 (TaNramp5A, 5B, and 5D in hexaploid wheat and TdNramp5A and 5B in tetraploid wheat). These results suggest the possibility of other transporters for root Cd uptake in wheat.

研究分野：農学

キーワード：食の安全 土壌環境 有害物質 遺伝子 輸送体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カドミウム (Cd) は「イタイイタイ病」の原因物質であり、我が国は、これまで食品衛生法によって食品中の Cd 濃度を監視してきた。一方、コーデックス委員会は農作物の Cd 濃度に関する国際基準値を制定し、それに準拠する形で日本国内のコメの基準値が 1mg/kg 未満から 0.4mg/kg 以下とより厳しい基準値になった。コメ以外の農作物における国内基準値は未だ制定されていないが、継続的な実態調査を基に今後基準値ができる可能性がある。現在、日本人が食品から摂取する Cd 量は、一生涯摂取しても健康に悪影響が出ないとされる量よりも十分に低い。しかしながら、基幹作物であるコメをはじめ、コムギやダイズも Cd の主要な摂取源であり、Cd の長期間暴露による健康被害リスクをできる限り低減させるためには、これら主要 3 作物の Cd 濃度を減らすことが必要である。コメの Cd 吸収低減対策として客土や湛水管理等、確立された技術はあるものの、畑作物には実用性の高い低減技術が未だ存在しない。

イネ、コムギ、ダイズの子実 Cd 濃度には品種間差が存在し、論文等で数多く報告されている。特にイネは、品種間差や変異体を利用して、Cd 吸収・集積に関わる分子メカニズムのかなりの部分が解明された。一方、コムギやダイズはゲノム情報基盤がイネに比べて整備遅れていることもあり、Cd 吸収メカニズムは未だ不明のままである。我々は以前の研究により、Cd をほとんど吸収しない水稻品種「コシヒカリ環 1 号」を開発した。これはコシヒカリの種子にイオンビームを照射し、変異した数千個体の Cd 濃度を測定して発見した。「コシヒカリ環 1 号」はマンガン (Mn) 輸送体をコードする *OsNramp5* 遺伝子に変異が生じ、機能欠失になったことで根の Cd 吸収が著しく抑制され、結果的に玄米 Cd 濃度がほぼ検出限界以下になった。ダイズやコムギにも *Nramp5* のホモログが存在すると思われるが、現在までその遺伝子の特定や機能解析に関する報告はなされていない。特に普通コムギは 6 倍体であるため、A、B、D ゲノム上に *Nramp5* の相同性遺伝子が存在し、そのどれか、もしくは全部が Cd 吸収に関連する遺伝子なのかどうか明らかにすることで、今後コムギ変異体を利用した Cd 低吸収品種の開発に役立つ情報を与えると思われる。

2. 研究の目的

本研究は、イネの先行研究を参考に、*Nramp5* がコムギやダイズにおいても Cd 吸収の主要な輸送体になり得るのかどうか検証するため、以下の 4 つの課題に取り組んだ。

- (1) コムギ・ダイズの Cd 吸収が必須重金属濃度に与える影響
- (2) *Nramp5* 遺伝子のクローニング
- (3) *Nramp5* の細胞内局在性と酵母を用いた機能解析
- (4) 形質転換植物による相補実験

3. 研究の方法

- (1) コムギ・ダイズの Cd 吸収が必須重金属濃度に与える影響

播種後、2 - 3 週間経過したイネ、ダイズ、コムギの幼植物を数段階レベルの Cd を含む 1/2 木村 B 溶液で処理した。茎葉部と根部に分け、各部位の重金属濃度を ICP-MS または ICP-OES で測定した。

- (2) *Nramp5* 遺伝子のクローニング

幼植物の根から RNA を抽出し、市販のキットで cDNA を合成した。各作物種における *Nramp5* の完全長 ORF をベクターにクローニングし、塩基配列を解読した。

- (3) *Nramp5* の細胞内局在性と酵母を用いた機能解析

各 *Nramp5* の C 末端側に sGFP を融合させ、35S プロモーター制御下のタンパク発現用ベクター内に組み込み、イネのプロトプラストに導入した。同時にベクターに組み込んだ 35S-mCherry をコントロールとして、2 色法により、共焦点レーザー顕微鏡で局在性を観察した。Cd 感受性酵母株 *ycf1* や Mn 輸送体欠損株 *smf1* に各 *Nramp5* を形質転換し、Cd や Mn (+EDTA) を含む SD 寒天培地にスポットした変異株の増殖程度から、各 *Nramp5* オルソログタンパク質における輸送活性を評価した。*OsNramp5* の C 末端側の膜貫通領域を順次 Ta*Nramp5A* と交換したキメラタンパク質を複数作製し、*ycf1* や *smf1* の酵母変異株を用いて、輸送活性に関わる膜貫通領域の特定を行った。

- (4) 形質転換植物による相補実験

OsNramp5 のネイティブプロモーターまたは 35S プロモーターの下流に、各 *Nramp5* の完全長 ORFs を組み組み込んだコンストラクトを作製し、組換え植物用のバイナリーベクターに挿入した。アグロバクテリウム法により、*OsNramp5* の機能欠損体である水稻品種「コシヒカリ環 1 号」に感染させ、ハイグロマイシンによる選抜で組換えイネを作製した。Cd を含む水耕液もしくは Cd 汚染土壌で組換えイネを栽培し、*OsNramp5* オルソログ挿入による相補の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) コムギ・ダイズの Cd 吸収が必須重金属濃度に与える影響

Cd 処理濃度の増加に伴い、すべての作物において茎葉部と根部の Cd 濃度は増加し、一方、根の Mn 濃度は減少した (図 1)。この結果、イネのみならずダイズやコムギにおいても Cd は Mn の吸収抑制に働くことが示唆された。

Nramp5 オルソログ間のアミノ酸配列を比較したところ、コムギの ABD ゲノム上に存在する Nramp5 はイネと 80%以上の高い相同性を示した。ダイズとイネの Nramp5 は 69%一致した。

Nramp5 を一過的に発現させたプロトプラストを用いた GFP の蛍光観察を行った結果、Nramp5 はすべて原形質膜上に局在した (図 2)。

酵母による輸送活性試験では、*GmNramp5* を導入した *ycf1* の生育は Cd 処理によって著しく抑制されたが、コムギの *TaNramp5* または *TdNramp5* ホモログを導入した *ycf1* はいずれもベクターコントロール (VC) と同様の生育を示した (図 3)。Mn (+EDTA) 培地においても、*GmNramp5* を導入した *smf1* は VC に比べ生育が改善したが、コムギの *TaNramp5* や *TdNramp5* はいずれも VC と同等の生育であった。このことから、*GmNramp5* は Cd と Mn に対して高い輸送活性を示すが、コムギの Nramp5 はいずれも輸送活性がないか、低いことが予想された。

OsNramp5 と *TaNramp5A* のキメラタンパク質による輸送活性を評価したところ、N 末側に位置する数個の膜貫通領域をイネタイプに変換すると、コムギの *TaNramp5A* は Cd と Mn に対して輸送活性を示した。

コシヒカリ環 1 号への導入による相補性試験の結果、プロモーターに関わらず、イネを含めすべての Nramp5 オルソログにおいて相補できなかった。相補のためにはイントロンを含むゲノム DNA を組み込む必要があると思われたが、今後の検討すべき点である。

以上の結果、ダイズは *GmNramp5* は Cd と Mn を輸送するトランスポーターであるが、コムギは *TaNramp5(A, B, D)* と *TdNramp5(A, B)* は Cd と Mn の輸送にあまり貢献せず、他の輸送体を介して吸収されている可能性が示唆された。

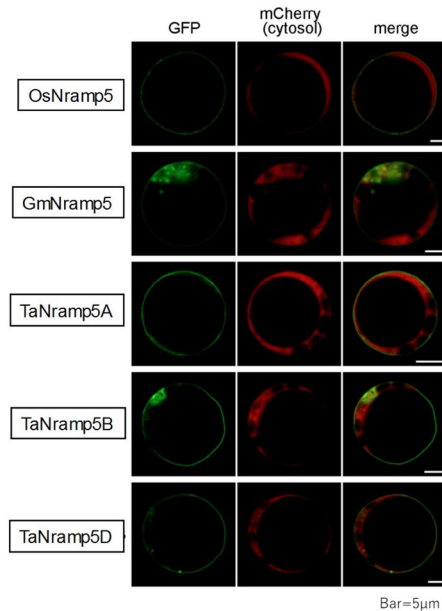
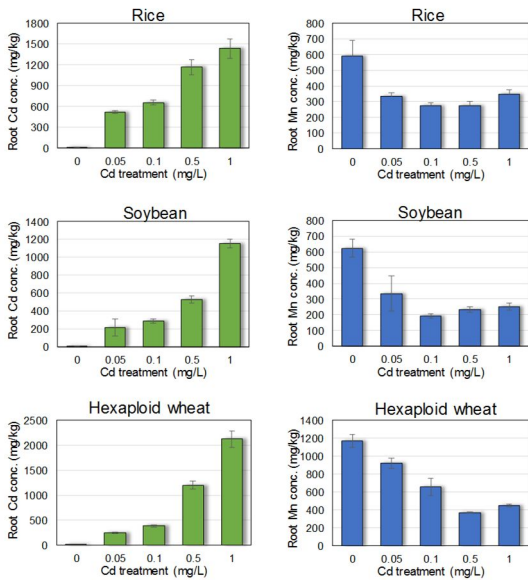


図 1 Cd 濃度の異なる水耕液で処理した時の根の Cd と Mn 濃度

図 2 Nramp5 の局在性観察

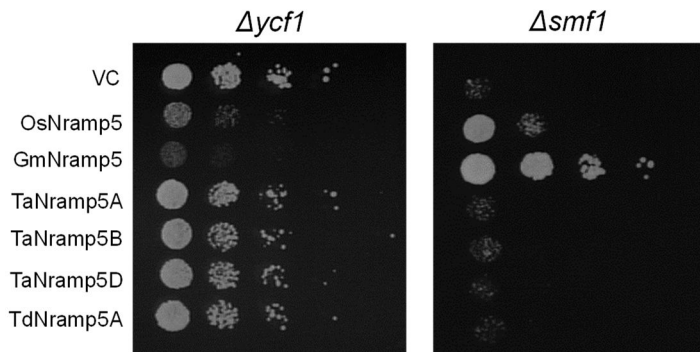


図 3 Nramp5 を導入した酵母変異株 (*ycf1* と *smf1*) の生育

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Satoru Ishikawa, Masato Kuramata, Tadashi Abe, Shimpei Hayashi
2. 発表標題 Functional characterization of Nramp5 for Cd and Mn transport in rice, soybean, and wheat
3. 学会等名 15th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----