

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580063

研究課題名(和文) 亜ヒ酸輸送体としてのイネおよびオオムギアクアポリンの同定と解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of rice and barley aquaporins as arsenite transporters.

研究代表者

且原 真木 (KATSUHARA MAKI)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：00211847

研究成果の概要(和文)：低ヒ素含有穀物の育成を最終目標として、イネ科作物の亜ヒ酸吸収機構を解析するという観点から、イネおよびオオムギにおいて亜ヒ酸輸送活性をもつアクアポリン遺伝子を同定して解析した。酵母細胞を使ったスクリーニング系により、イネおよびオオムギから3つ既知遺伝子を含む、5つの亜ヒ酸輸送体としてのアクアポリン遺伝子を同定した。これら同定したアクアポリン遺伝子は、イネの生育培地に亜ヒ酸を添加したとき、根ではOsNIP2;1の一過的な発現低下、葉ではOsNIP3;3の発現上昇がおこることが観察された。

研究成果の概要(英文)：In this project, rice and barley aquaporins were selected and analyzed from the view to elucidate the molecular mechanism of arsenite transports in *Poaceae* plants. Final goal of this project is to breed rice/barley lines containing low As. Using screening system with yeast cells, 5 aquaporin genes (including known 3 genes) were identified as arsenite transporters. Among these genes, temporal increase of OsNIP2;1 expression in roots and decrease of OsNIP3;3 in leaves were observed in rice plants treated with arsenite.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物生理・分子

キーワード：アクアポリン 亜ヒ酸輸送系 イネ オオムギ 土壤汚染 酵母 物質輸送

1. 研究開始当初の背景

地球環境において汚染物質あるいは有害物質と言われる物質は多数ある。多くの汚染物質や有害物質は人間が放出したものである。しかし元々地殻中に存在していたものが、人間の活動のために有害性が顕在化してくる場合もある。本研究計画ではそのような物質としてヒ素を取り上げ、植物分子栄養学の観点から研究を進めた。

地下水のヒ素汚染は世界中で大きな規模で発生している。世界中では5000万人が影響を受けているとされ、日本でも茨城県神栖町の地下水で最近問題となった。インドやバングラデシュの西ベンガル周辺では特に最近10年できわめて深刻な事態に陥っている

(日経サイエンス2004年11月号80ページ「飲料水をヒ素汚染から守れ バングラデシュでの試み」)。この地域では地下数十mの帯水層にある地下水の利用を始めたところ、この地下水にヒ素が含まれていたのである。現在社会学、医学保健学、地質学の方面からの対策・取り組みがなされている。しかし植物科学からヒ素汚染について取り組んだ例はわずかしかない。

ヒ素は通常の生理的条件下では、ヒ酸 (AsO_4^{3-}) と亜ヒ酸 (As(OH)_3) の2つの化学形態で存在している。このうちヒ酸については、その化学的性質がリンと似ているため、植物のリン酸輸送系によってヒ酸として取り込まれることが知られている。グルタチオンとのコンジュゲートを基本としたヒ素無毒化機構も植物に備えられている。ヒ素で汚染された土壌からヒ素分を効率的に葉に吸収し、蓄積する遺伝子組み換えシロイヌナズナ植物 (Nature Biotechnology 20:1140, 2002) も

作成されている。この組み換え体は非形質転換シロイヌナズナと比較して単位重量当たり2~3倍の量のヒ素を蓄積し、ファイトレメディエーションのモデルとしては有効である。しかしこの例は、ヒ素汚染土壌においてもヒ素含量が少ないような作物、ヒ素低吸収・排出型作物の創生を目指すモデルとはならない。

亜ヒ酸の化学形態については、pHが中性付近の場合、 As(OH)_3 の中性分子となる。この形態のヒ素(亜ヒ酸)を取り込む輸送系は長い間知られていなかったが、最近のアクアポリン研究の進展によって、ある種のアクアポリンが亜ヒ酸および同族原子アンチモンの同様の化学形態分子 (Sb(OH)_3) を取り込むと考えられるようになった。生理学的実験から、イネにおいてこの可能性が数年前に指摘されていた (New Phytologist 157:39, 2003)。モデル植物シロイヌナズナのアクアポリンについて、亜ヒ酸輸送活性を示すアクアポリン分子種の同定や亜ヒ酸を輸送体として認識する分子メカニズムについての検討が2007年7月に開催された第5回国際アクアポリン会議(奈良)でデンマークの研究者から報告された。

申請者はイネとオオムギのアクアポリンの研究に取り組んできた。もともとは浸透圧ストレスを伴う塩ストレス環境での植物の水利用・輸送の研究から、生体膜における水輸送を担っているタンパク質・アクアポリンの研究をスタートさせた。水以外の低分子化合物の輸送については、申請者は二酸化炭素を輸送するアクアポリンを共同研究者とともに見いだした (Plant Cell Physiol. 45: 521, 2004)。また申請者は岡山大学資源植物科学研究所の馬教授との共同研究で、ケイ酸を輸送するアクアポリンについての研究にも参加

した (Nature 440:688, 2006) 。

2. 研究の目的

前述の状況を踏まえ、アクアポリンが亜ヒ酸を輸送する可能性が指摘されているにもかかわらずヒ素汚染が大きな社会問題となっているアジアでの主食であるイネを中心としたイネ科作物のアクアポリンについて亜ヒ酸輸送活性が調査されていないこと、現在進行中のアクアポリン研究プログラムでは亜ヒ酸については計画外であること、の理由から本研究計画を立てて、亜ヒ酸輸送体としてのイネおよびオオムギアクアポリンを同定して解析することを研究目的とした。

(1) 中間目標

イネゲノム研究の成果を解析して、イネは33個のアクアポリン遺伝子ファミリーメンバーを持つことが、明らかになっている (Sakurai et al. Plant Cell Physiol. 46:1568-1577 (2005))。申請者らはオオムギにおいては原形質膜で機能するアクアポリンサブファミリーメンバーが10個あることを確認して塩基配列解析、発現解析をおこなった (Horie et al. Plant Cell Physiol. 52:663-675 (2011))。これらアクアポリンのうちで、原形質膜において細胞外から亜ヒ酸を取り込む活性をもつアクアポリン分子種を同定する。

(2) 最終目標

亜ヒ酸輸送に関与するアクアポリンを見いだすことができれば、まずこれら遺伝子の亜ヒ酸存在下での植物体での発現を調べる。また該当アクアポリンに変異・欠損が起こっているイネおよびオオムギ系統を探して適当な系統があれば、その系統での亜ヒ酸吸収の定量的測定、植物体へのヒ素蓄積量の測定

を期間内で時間の許す限りすすめる。

3. 研究の方法

(1) 亜ヒ酸輸送活性をもつアクアポリンの同定 (スクリーニング)

イネおよびオオムギのアクアポリン遺伝子を酵母発現用ベクターpYES2に組み込んで構築したベクタープラスミドによりヒ素感受性酵母 (Δ ACR3) を酢酸リチウム法で形質転換した。このヒ素感受性酵母はヒ素化合物を細胞外に排出したり、液胞内に隔離したりするための輸送系が欠損しているため、ヒ素感受性となっている。導入したアクアポリン遺伝子は酵母細胞内でアクアポリンを発現する。スクリーニングに供したイネおよびオオムギのアクアポリン遺伝子は以下の44遺伝子である。

HvPIP1;1, HvPIP1;2, HvPIP1;3, HvPIP1;4, HvPIP1;5, HvPIP2;1, HvPIP2;2, HvPIP2;3, HvPIP2;4, HvPIP2;5, HvTIP1;1, HvTIP1;2, HvTIP2;1, HvTIP2;2, HvTIP2;3, HvTIP3;1, HvTIP4;1, HvTIP5;1, HvNIP1;1, HvNIP1;2, HvNIP2;1, OsPIP1;1, OsPIP1;2, OsPIP1;3, OsPIP2;1, OsPIP2;2, OsPIP2;3, OsPIP2;4, OsPIP2;5, OsPIP2;6, OsPIP2;7, OsPIP2;8, OsTIP1;1, OsTIP1;2, OsTIP2;1, OsTIP2;2, OsTIP3;1, OsTIP4;2, OsTIP5;1, OsNIP2;1, OsNIP2;2, OsNIP3;2, OsNIP3;3

受性試験のスクリーニングについては通常培地に5 μ M亜ヒ酸を加えた濃度においてアクアポリン非発現株がコロニー形成をするのに対して、コロニー形成できない株を選抜した。耐性検定では、アクアポリン非発現株がコロニー形成できない20 μ M亜ヒ酸添加で培地したときにコロニー形成ができる株があるかどうかを調べた。

(2) イネにおけるアクアポリンの発現変動

イネ (品種：日本晴れ) を水耕栽培で3週

間生育させて亜ヒ酸ナトリウム (NaAsO₂) 濃度を3段階 (0 μM, 5 μM, 10 μM) で水耕液に添加して、1日、2日、4日後の根 (全体) および葉 (第2葉) をサンプリングしてRNAを抽出し、調査対象遺伝子の発現量リアルタイムRT-PCRを使って調べた。

4. 研究成果

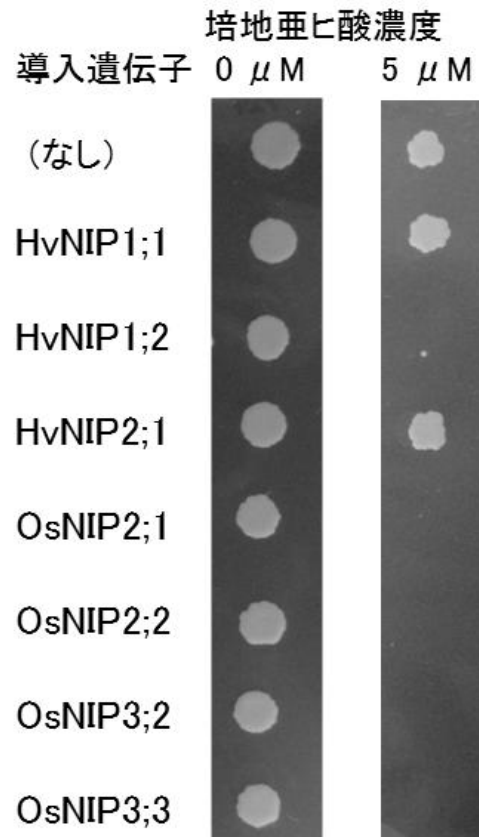
(1) 亜ヒ酸輸送活性をもつアクアポリン分子種

PIP型アクアポリンおよびNIP型アクアポリンは原形質膜で機能すると考えられる。このため、PIP型およびNIP型が亜ヒ酸透過性を有する場合、これらアクアポリンを発現した酵母株では、非形質転換コントロール株よりも低濃度亜ヒ酸を含む培地からでも亜ヒ酸を吸収する量が増えることにより、感受性が高まると考えられる。予備実験としてベクター

(pYES2) のみを導入した酵母acr3株では、亜ヒ酸添加によって生育が阻害される濃度 (閾値) は5 μM以上であったので、5 μM亜ヒ酸濃度においてスクリーニングを実施した。

その結果、HvNIP1;2, OsNIP2;1, OsNIP2;2, OsNIP3;2, OsNIP3;3の遺伝子を導入した酵母acr3株において亜ヒ酸5 μM添加培地で生育が阻害され、この5つのアクアポリンは亜ヒ酸輸送活性をもつと考えられた。このうちOsNIP2;1, OsNIP2;2, OsNIP3;2, の3つについてはすでに亜ヒ酸輸送活性が本研究実施中に報告がされている (BMC Biology 6:26, 2008; PNAS 105:9931, 2008)。本研究で新奇に2つのアクアポリンHvNIP1;2とOsNIP3;3が亜ヒ酸輸送活性をもつことを同定した (右図)

酵母 (ΔACR3) 株の生育



なお今回用いたアクアポリン分子種を発現させた酵母により、ヒ酸 (AsO₄³⁻) 透過性の検定も実施した。しかしヒ酸輸送活性を持つと思われるアクアポリン分子種は見出されなかった。

(2) イネにおける亜ヒ酸輸送活性をもつアクアポリンの発現

亜ヒ酸輸送活性をもつアクアポリンとして同定されたイネの4つの遺伝子 (OsNIP2;1, OsNIP2;2, OsNIP3;2, OsNIP3;3) について、亜ヒ酸ストレス条件下でのイネ植物体での発現を調べた。その結果、4遺伝子のうちで根ではOsNIP2;1の発現がもっとも高く、10 μMの亜ヒ酸添加によって1日後に発現が低下し、2から4日目で発現レベルがもとに戻る事が観察された。残り3つの遺伝子の発現は少な

く、亜硝酸添加による発現量の大きな変動も見られなかった。葉においても非ストレス下では根同様にOsNIP2;1の発現がもっとも高かったが、亜硝酸添加による変動は葉ではあまり認められなかった。5 μ Mの亜硝酸添よって葉ではOsNIP3;3の発現が上昇することが観察された。

本研究では当初亜硝酸輸送活性をもつアクアポリンの欠損系統、あるいは該当アクアポリンの過剰発現系の亜硝酸ストレス耐性やヒ素蓄積状況まで調査する計画であったが、この点は試験実施ができなかった。スクリーニング条件の設定に時間がかかり、安定した結果が出て亜硝酸輸送活性をもつアクアポリンを確定するまでに多くの時間がかかったためである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Katsuhara, M., Hanba, T. Y., Shiratake, K., Maeshima, M. Expanding roles of plant aquaporins in plasma membranes and cell organelles. Functional Plant Biology 35: 1-14 (2008)

[学会発表] (計1件)

- ① 李志芮, 森泉, 篠野静香, 且原真木
Detection of transport activity in barley and rice aquaporins with newly developed yeast system. 日本植物生理学会 2011年度年会(仙台) 2011. 3. 20(東日本大震災のため東北大学での年会は中止されたが、要旨集の公開を持って成立となった)

[図書] (計1件)

- ① 且原真木. 文永堂 「植物栄養学 第2版」(2010)(間藤徹、馬建鋒、藤原徹 編、総ページ288 ページ) のうち「水の吸収と輸送」 (50-54 ページ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

且原 真木 (KATSUHARA MAKI)
岡山大学・資源植物科学研究所・准教授
研究者番号：00211847

(2) 研究分担者 (該当なし)

(3) 連携研究者 (該当なし)