

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20780046

研究課題名（和文）メタロミクスを応用したミヤコグサ金属集積QTLの解析

研究課題名（英文）QTL analysis of metal accumulation in *Lotus japonicus*

研究代表者

古川 純 (FURUKAWA JUN)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：40451687

研究成果の概要（和文）：マメ科のモデル植物であるミヤコグサにおける金属集積の系統間差を解析したところ亜鉛集積において差が顕著であり、Zn-65を用いた解析からGifu系統でより短時間で上位葉まで輸送されていた。地上部への亜鉛集積を指標として、Gifu、Miyakojima両系統の後代約80系統によるQTL解析を行ったところ、亜鉛集積に関わると考えられる約20のQTL領域が得られ、同時に行ったマイクロアレイ解析からGifuで高発現し、かつQTL領域に座乗する亜鉛輸送体の相同遺伝子を得た。

研究成果の概要（英文）：Among 17 investigated metal elements, zinc accumulation was drastically different between two *Lotus japonicus* cultivars Gifu and Miyakojima. By comparing Zn-65 distribution images, zinc uptake and translocation activities were higher in Gifu. The zinc accumulation in shoot was investigated with about 80 RILs and several major QTLs were found. The genes located on these QTL were investigated based on the *L. japonicus* genome sequence and several genes annotated zinc transporter, which gene expression levels were higher in Gifu, were identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：植物栄養、メタロミクス、環境修復、亜鉛集積、QTL解析、マルチトレーサー

## 1. 研究開始当初の背景

ファイトレメディエーションは有害金属などによって汚染された土壌を対象とした植物を用いた環境浄化手法であり、植物の金属元素に対する吸収・集積能力を活用するものである。現在主に用いられている浄化手法

である客土法や化学的な洗浄法に比べて、環境への影響が少なく低コストであることから注目されている。ファイトレメディエーションによる環境浄化をより効率的に達成するためには、有害金属への耐性、高い金属集積能力、バイオマスが大きいといった特徴を

持っている植物を用いることが望ましい。しかしこのような理想的な植物はこれまでに見つかっておらず、バイオマスの大きい既存の作物が持つ有害金属耐性・集積能力を強化することが必要であると考えられている。陸上植物における金属集積には、根圏からの吸収、導管への導入、地上部への輸送、地上部における器官から細胞レベルにおける分配、局在、隔離など様々な場面で必要とされる多くの機構が関与している。また、このようにして保たれる生体内における金属の恒常性は特定の金属に対してただ一つの機構が働くのではなく多くの機構が協調して機能することによって保たれていると考えられる。その一方で金属輸送体の多くは複数の金属に対する輸送活性を持つことなどから、ある遺伝子が決まった金属だけではなく複数の金属の恒常性維持に関与する可能性も示されている。

研究代表者らは先行研究としてバイオマスが大きく、生育法が確立しているダイズなどによる環境浄化に応用可能な遺伝子情報を得るため、マメ科のモデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の主要実験系統 2 系統である Miyakojima MG-20 と Gifu B-129 を用いた金属集積能力の解析を行った。多数の放射性同位元素 ( $^7\text{Be}$ 、 $^{22}\text{Na}$ 、 $^{46}\text{Sc}$ 、 $^{48}\text{V}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{54}\text{Mn}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{65}\text{Zn}$ 、 $^{74}\text{As}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{84}\text{Rb}$ 、 $^{85}\text{Sr}$ 、 $^{88}\text{Y}$ 、 $^{88}\text{Zr}$ 、 $^{95\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{103}\text{Ru}$ 、 $^{99}\text{Rh}$ ) の混在溶液である理研マルチトレーサーを用いたメタロミクス解析から、Miyakojima と Gifu の間で鉄 (Fe)、亜鉛 (Zn)、ストロンチウム (Sr)、イットリウム (Y) など複数の金属の集積様式が異なることを明らかにしており、特に亜鉛においてその差が顕著であった。

## 2. 研究の目的

(1) ミヤコグサの主要実験系統である Miyakojima と Gifu 間で作成され、分子マーカーにより遺伝子型が決定された組換え自殖系統 (RILs) を用いたメタロミクス解析を行うことにより、ミヤコグサの金属集積関連 QTL を明らかにすることを目的とした。集積される金属とそれを司る QTL の位置が明らかになることにより、複数の金属の集積に関与する遺伝子座や特定の金属の集積に関与する遺伝子座についての知見が得られることを期待した。

(2) Miyakojima と Gifu を用いた Zn 集積関連 QTL についての詳細な解析と、マイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析を同時に行うことで、Zn 集積に関与する遺伝子の単離・同定を目的とした。植物の Zn 輸送は様々な遺伝子によって制御されていると考えられ、土壌浄化や、食物栄養価向上の為の理想的な組換え植物を作出するには複数の遺伝子の機能を解析し応用する必要がある。しかしながら、その吸収ならびに集積機構の解明は未だ十分ではないことから、新規 Zn 集積関連遺伝子を含めた具体的な候補遺伝子のスクリーニングを意図した。

## 3. 研究の方法

(1) Miyakojima と Gifu、ならびに RILs における複数の金属元素の集積を、理化学研究所によって開発されたマルチトレーサーを用いて比較・解析した。1/10 Hoagland 水耕液を用いた水耕栽培により植物育成器の中で 1 ヶ月間育成し、生育段階の揃っている個体を選抜してマルチトレーサーを含む同水耕液に移し換えた。2 日間の処理を行った後に収穫し、地上部に含まれる各放射性同位元素の量をガンマ線スペクトロメトリにより測定した。約 20 系統の組換え自殖系統を用いて地上部における金属集積量を測定し、染色体のどの領域に金属集積関連 QTL が存在するかについて QTL 解析ソフト (J/QTL 1.3.1) を用いて遺伝子型と比較することによって検討した。

(2) Zn 集積に関わる QTL を高精度に取得するために Miyakojima、Gifu ならびにそれらの RILs を水耕栽培で 1 ヶ月間育成し、植物体に Zn の放射性同位元素である Zn-65 を 2 日間吸収させ、ガンマカウンタ、オートラジオグラフィならびに PETIS (Positron-emitting tracer imaging system) 法により Zn 集積・輸送の特性を比較した。また、約 80 系統の組換え自殖系統を用いて地上部における Zn 集積量を測定し、染色体のどの領域に Zn 集積関連 QTL が存在するかについて QTL 解析ソフト (J/QTL 1.3.1) を用いて検討した。

(3) 播種後 1 ヶ月の Miyakojima、Gifu の根から RNA を抽出し、アジレント社のマイクロアレイ「4×44k\_Kazusa-001」を用いて網羅的な遺伝子発現比較を行った。また着目した

個々の遺伝子発現については RT-PCR 法により確認を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 理研マルチトレーサーを用いて、ミヤコグサ Miyakojima と Gifu 間で作成されている組換え自殖系統 (RILs) における金属元素の集積様式の比較を行ったところ、地上部の、特に茎における Zn と Sr の集積に関与すると考えられる QTL が、Zn で 10 ヶ所、Sr で 4 ヶ所得られた。このうち 3 ヶ所の QTL は Zn と Sr で共通していたが、Sr の残りの 1 ヶ所は独立した QTL であった (図 1)。これらは元素

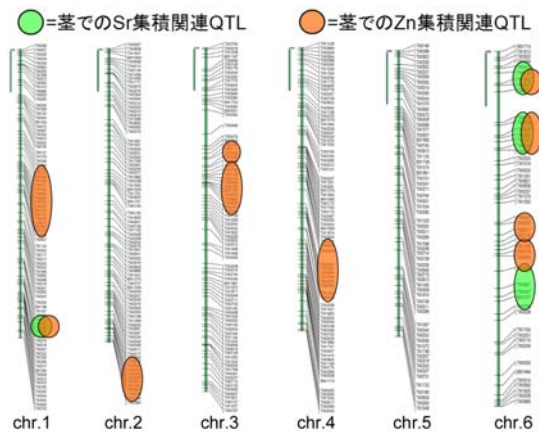


図 1 ミヤコグサにおける Zn および Sr 集積関連 QTL

集積の制御機構に、共通する遺伝子と独立した遺伝子があることを示唆しており、植物の金属集積における協調性と独立性を示していると考えられる。今後は Zn の吸収・集積能が高く、遺伝子型の確定している系統を用いて Sr 集積を解析することで、Sr 輸送に関わる具体的な遺伝子の単離・同定を目指す。

(2) 生育 1 ヶ月の Miyakojima と Gifu に Zn のトレーサーである Zn-65 を吸収させ、ガンマカウンタ、オートラジオグラフィを用いて解析を行った (図 2)。両系統とも茎や節、根の先端に高い集積が見られ、葉においては先端の最も若い葉で高い集積が認められたものの (図 2 赤矢印)、Gifu において地上部への高い Zn 集積が認められた。

Zn 集積の系統間差をより詳細に検証するために、Zn-65 の挙動をリアルタイムに画像化できる PETIS (Positron-emitting tracer imaging system) 法による解析を試みた。根



Miyakojima Gifu Miyakojima Gifu

図 2 Miyakojima, Gifu における Zn 集積 (処理後 3 時間での Zn-65 分布)

への Zn 取り込みには両系統で顕著な差は認められなかったものの、Gifu では根から地上部への Zn 輸送活性が高く、一方 Miyakojima では吸収された Zn が根に留まる傾向があることが明らかとなった。これら Zn 輸送における両系統の特徴と、以下の QTL 解析から候補遺伝子と考えられる遺伝子の機能を比較することにより、ミヤコグサの Zn 集積機構の一端が明らかになるものと考えられる。

(3) また地上部全体への Zn 集積を対象とした QTL 解析では、RILs の解析数を増やして精度を高めたことにより、合計 23 ヶ所の QTL を得ることができた (図 3)。2008 年 6 月に公開されたミヤコグサゲノムの塩基配列データを基にして、シロイヌナズナなどで Zn の集積に関連すると報告されている既知遺伝子の相同遺伝子を探索したところ、特に第 4 染色体 30 cM 付近では、Zn を輸送するトランスポーターとして知られている *IRT1* および

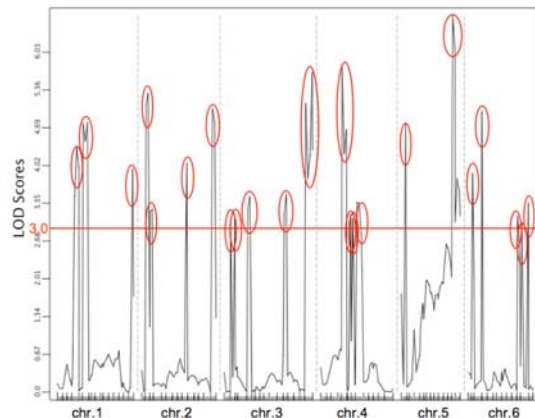


図 3 ミヤコグサ地上部 Zn 集積関連 QTL (赤○が QTL を示す)

ZIP10 と相同であると予測される遺伝子が QTL 領域に存在していた。

(4) これらの遺伝子が地上部への Zn 集積に関与しているかを解析するために、Miyakojima と Gifu の根から抽出した RNA を用いたマイクロアレイおよび RT-PCR 法により発現量を比較すると、IRT1 および ZIP10 の相同遺伝子は Gifu において Miyakojima よりも転写産物量がそれぞれ 3-4 倍に高まっていることが示された。今後これらの相同遺伝子をクローニングして Zn の輸送活性などを明らかにすることによりミヤコグサにおける具体的な機能について解析を進める予定である。

また他の QTL には金属輸送に関与すると考えられる既知の遺伝子の相同遺伝子として、植物体内で金属元素とキレートを形成することで金属輸送に関与するとされる有機酸の輸送体である MATE 遺伝子などが存在していたが、直接的に金属輸送との関連性が報告されているような遺伝子が存在しないことから、主要な QTL について今後マップベースクローニングなどを行うことにより、転写因子などを含めた新規金属集積関連遺伝子の取得が期待される。

本研究によりミヤコグサの Zn 集積・輸送に関わる複数の QTL が得られた。これにより個々の候補領域に存在する遺伝子の発現解析や塩基配列の比較をより効率的に行うことが可能となり、植物の Zn 集積・輸送に関わる機能の解析において更なる展開が期待される。

## 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)

[学会発表] (計 7 件)

①古川純、岩田佳晃、榎本秀一、佐藤忍、ミヤコグサにおける亜鉛集積の系統間差と関連 QTL の解析、植物生理学会、2011 年 3 月 20 日 (震災のため要旨集の発行により成立)、仙台、東北大学

②古川純、佐藤忍、ミヤコグサ種子中の微量元素集積に関わる QTL 解析、JRR-3 改造 20 周年記念シンポジウム、2011 年 2 月 28 日、東京、日本科学未来館

③古川純、石本光憲、佐藤忍、放射化分析法を用いたミヤコグサ種子中の微量元素蓄積関連遺伝子の解析、原子力関係設備の在り方を考えるシンポジウム、2010 年 12 月 6 日、東京、東京大学

④岩田佳晃、古川純、佐藤忍、ミヤコグサにおける亜鉛集積と関連 QTL の解析、アイソトープ・放射線研究発表会、2010 年 7 月 8 日、東京、日本科学未来館

⑤古川純、石本光憲、佐藤忍、Quantitative trait locus analysis for seed zinc accumulation in model legume, *Lotus japonicus*、Asia-Pacific Symposium on Radiochemistry '09、2009 年 12 月 1 日、米国・Napa

⑥古川純、石本光憲、佐藤忍、各種放射線計測手法を用いたミヤコグサにおける金属集積機構の解析、日本アイソトープ協会オクタームスクール、2009 年 10 月 31 日、野田、東京理科大学

⑦古川純、羽場宏光、榎本秀一、佐藤忍、ミヤコグサ *Lotus japonicus* における金属集積とその系統間差、アイソトープ・放射線研究発表会、2008 年 7 月 2 日、東京、日本青年館

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古川 純 (FURUKAWA JUN)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：40451687

### (2) 研究協力者

榎本 秀一 (ENOMOTO SHUICHI)

理化学研究所・分子イメージング科学研究センター 複数分子イメージング研究チーム・チームリーダー

研究者番号：10271553