

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21248009

研究課題名（和文） 植物の新規有害金属トランスポーターの同定

研究課題名（英文） Identification of novel transporters involved in toxic metals

研究代表者

馬 建鋒 (MA JIAN FENG)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：80260389

研究成果の概要（和文）：

植物の有害金属（カドミウム、ヒ素、アルミニウム）の集積及び耐性に関わるトランスポーター遺伝子の同定を行った。カドミウムの超集積植物からカドミウムの無毒化に必要な *TcHMA3*、イネのカドミウムの集積に関わる *OsHMA3* をそれぞれ同定した。イネの内向きケイ酸トランスポーター *Lsi1* はメチル化されたヒ素（*MMA* と *DMA*）をも輸送することを明らかにした。さらにソバ、シロイヌナズナ及びイネからアルミニウムの耐性に関わるいくつかの新規トランスポーター遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：

We identified several transporter genes involved in accumulation and detoxification of toxic metals including Cd, As and Al. *TcHMA3* isolated from a Cd hyperaccumulator is required for tolerating high Cd and *OsHMA3* from rice is involved in Cd accumulation in grain. We also found that *Lsi1*, a silicon influx transporter, is able to transport methylated arsenic (*DMA* and *MMA*). Furthermore, we have identified several novel transporter genes involved in Al tolerance in rice, Arabidopsis and buckwheat.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	23,400,000	7,020,000	30,420,000
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
総計	37,400,000	11,220,000	48,620,000

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：トランスポーター・ヒ素・カドミウム・アルミニウム

1. 研究開始当初の背景

カドミウム (Cd) やヒ素 (As)、アルミニウム (Al) のような有害金属は植物の生育を阻害するだけではなく、食物連鎖を介して、人間の健康にも悪影響を及ぼす。したがって、植物の有害金属に対する耐性を付与することと

植物への集積を軽減することは作物の生産性や食品の安全性の観点からきわめて重要な課題である。

有害金属の集積や耐性には多くのトランスポーターが関与していると思われる。しかし、

これらのトランスポーターをコードする遺伝子の多くはまだ未同定の状況である。

2. 研究の目的

本研究の目的は植物のカドミウムとヒ素の集積に関与する遺伝子、アルミニウム耐性・集積に関与するトランスポーター遺伝子を同定することである。アルミニウムは世界の耕地面積の3割以上を占める酸性土壌での主な作物生育阻害因子で、またカドミウムとヒ素は食物連鎖を介して、人間の健康に悪影響を及ぼす有害元素である。したがって、植物のアルミニウムに対する耐性を付与することと植物へのカドミウムとヒ素の集積を軽減することは作物の生産性や食品の安全性の観点からきわめて重要な課題である。本研究では、これら有毒金属の集積や耐性に関わるトランスポーター遺伝子を同定し、アルミニウム耐性作物、環境中のカドミウムを浄化するためのカドミウム集積植物及び低ヒ素集積作物の作出に寄与したい。

3. 研究の方法

イネ、ゲンバイナズナ、ソバおよびシロイヌナズナを研究材料として用いた。これらの植物を水耕または土耕栽培した。金属の定量は原子吸光光度法またはICP-MSで行った。遺伝子の発現量は定量的RT-PCRで、タンパク質の局在は抗体染色で行った。金属の輸送活性は酵母に遺伝子を発現させて測定した。

4. 研究成果

(1) カドミウム集積に関与するトランスポーター遺伝子の同定

重金属超集積植物として知られている

*Thlaspi caerulescens*からカドミウムの高吸収に関与する遺伝子TcNramp1を単離し、その発現解析を行った。その結果、TcNramp1は根と地上部の両方で発現し、その発現量は亜鉛欠乏や過剰処理、カドミウム処理に影響さ

れなかった。またカドミウム集積の異なるエコタイプGangesとPrayonを比較すると、集積タイプのGangesでの発現が常に高かった。抗体染色でこの遺伝子によってコードされるタンパク質の細胞局在性を調べたところ、内皮細胞に局在していた。またwestern blotでこのタンパク質は細胞膜に局在していることを明らかにした。このことはTcNramp1がカドミウムの超集積に関与していることを示している。

*Thlaspi caerulescens*の非カドミウム集積エコタイプ(Prayon)と集積エコタイプGangesからそれぞれTcHMA3の全長を得、配列を比較したところ、アミノ酸レベルで99%の高い相同性が認められた。酵母発現系において、両エコタイプ由来のHMA3は共にカドミウムを輸送する活性が見られたが、亜鉛に対する活性は見られなかった。またTcHMA3の発現は根と地上部の両方で見られ、その発現は高濃度亜鉛及びカドミウム処理による影響を受けなかったが、Gangesの方がPrayonより常に約4倍高く発現していた(図1)。TcHMA3:GFP融合タンパクの発現及びウェスタン解析の結果、HMA3が液胞膜に局在していることが観察された(図2)。この遺伝子をシロイヌナズナに過剰発現させると、カドミウム耐性が増加した。これらの結果は、GangesにおいてTcHMA3がカドミウムの液胞へ輸送に関与し、カドミウムの無毒化に関与していることを示している。

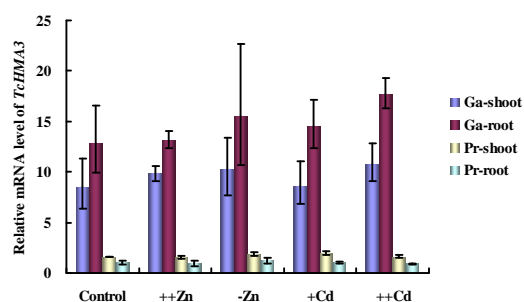


図1 Ganges及びPrayonの根と地上部での

TcHMA3の発現

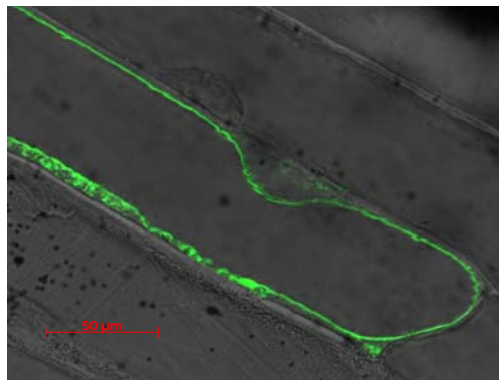


図 2. TcHMA3の細胞内局在

イネからもTcHMA3の相同遺伝子OsHMA3を単離した。しかし、TcHMA3とは異なり、OsHMA3は主に根で発現していた。抗体染色とプロモーターGFPによりタンパクの組織局在を調べたところ、根の全ての細胞でシグナルが検出された。また、タマネギの表皮細胞におけるGFP融合タンパクの一時的発現とウエスタン解析により細胞内局在を調べたところ、液胞膜への局在が認められた。イネ系統間で組織・細胞内局在に違いは見られなかったが、酵母においてカドミウム低集積品種から単離したOsHMA3がカドミウムの輸送活性を示すのに対して、高集積品種のOsHMA3は輸送活性を失っていた。これらの結果から、機能型OsHMA3輸送体は根において液胞内にカドミウムを特異的に隔離することにより、地上部へのカドミウムの移行を減少させていることが明らかになった。

(2) ヒ素の集積に関与する遺伝子の同定
イネの内向きケイ酸トランスポーターLsi1はメチル化されたヒ素 (MMAとDMA) をも輸送することを明らかにした。しかし、ケイ酸外向きトランスポーターLsi2はMMAとDMAの吸収に関与しなかった。またLsi1は亜ヒ酸の根圏への排出の一部にも関与していることをつきとめた。さらにLsi1はイネのセレン吸収にも関

与し、亜セレン酸に対する輸送活性を示し、セレン酸に対する輸送活性を示さないことを明らかにした。

世界のイネコアコレクション123品種を用いてケイ酸の吸収と亜ヒ酸、メチルヒ素の集積の品種間差を調べた。その結果、品種によってケイ酸の吸収能力は6倍、亜ヒ酸集積は3.2倍、メチルヒ素集積は7.0倍の差が見られた。またジャポニカ品種はインディカ品種よりケイ酸と亜ヒ酸の集積量が多い傾向を示した。メチルヒ素の集積には亜種間に差がなかった。ケイ酸吸収量と亜ヒ酸集積量の間にも全品種を通じての相関は示されなかったが、ケイ酸吸収量の多い品種は地上部のヒ素濃度も高い傾向があった。ケイ酸吸収量とメチルヒ素の集積量との間にも相関は見られなかった。これらのことは地上部のヒ素の集積量はケイ酸吸収能力のみによって規定されず、他の因子も関与していることを示唆している。

ヒ素高集積と低集積イネ品種から作出したF2集団を用いて、QTL解析を行った結果、ヒ素の集積に関与する遺伝子は8番染色体に座乗していた。

(3) アルミニウム耐性に関わるトランスポーターの同定

アルミニウム耐性植物のソバから、アルミニウム耐性関連遺伝子を網羅的解析するため、20 μMのAlを6時間処理したソバの根から、RNAを調製し、トランスクリプトームの配列解析を行った。配列を読んだ4万程度のcontigからアルミニウム耐性関連の候補遺伝子を選抜して、定量的RT-PCRで組織別の発現とアルミニウム誘導性を調べた。その結果、いくつかの遺伝子が根特異的にアルミニウムによって誘導されることが明らかとなった。

その中から発現量の高いトランスポーターの1つであるFeIREG2について解析を行った。

FeIREG2は鉄欠乏で誘導されず、Alによって発現が誘導された。また他の金属 (Cd, La, Ni) には応答を示さなかった。FeIREG2とGFPの融合遺伝子をタマネギ表皮細胞に発現させたところ、液胞膜に局在していた。FeIREG2はAlや他の金属 (Cd, Ni) の液胞への隔離に関与している可能性が考えられる。

シロイヌナズナでのイネのアルミニウム耐性遺伝子STAR1の相同遺伝子AtSTAR1について機能解析を行った。AtSTAR1遺伝子が破壊されると、アルミニウム耐性が劇的に低下し (図3)、OsSTAR1と同様にアルミニウム耐性に関与していた。しかし、それ以外に開花の時期にも関与していた。またOsSTAR1とは異なり、その発現はアルミニウムによって誘導されなかった。しかし、OsSTAR1はAtSTAR1の変異体を相補できる。これらのことからAtSTAR1がアルミニウム耐性以外に、他の機能にも関与している可能性がある。

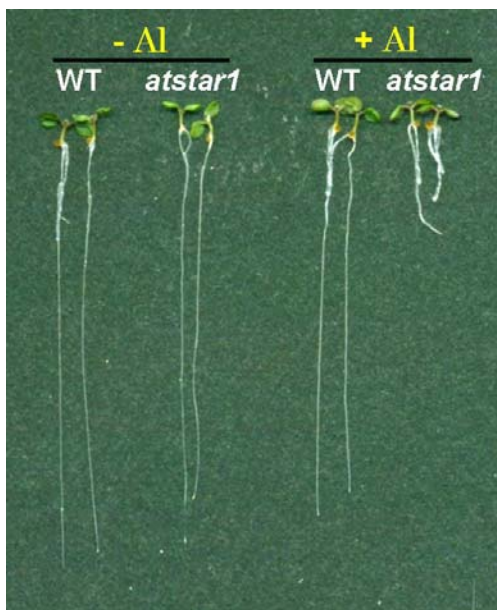


図3 atstar1のアルミニウム耐性試験

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 21 件)

① 藤井, M., Yokosho, K., Yamaji, N., Saisho,

D., Yamane, M., Takahashi, H., Sato, K., Nakazono, M., Ma, J.F., 2012, Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley, Nature Communications, 査読有, Vol.3, pp.713, doi: 10.1038/ncomms1726.

② 黄, C. F., Yamaji, N., Ono, K., Ma, J.F., 2012, A leucine-rich repeat receptor-like kinase gene is involved in the specification of outer cell layers in rice roots, Plant Journal, 査読有, Vol. 69: 565–576

③ 黄, C. F., Yamaji, N., Chen, Z. and Ma, J.F., 2012, A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice, Plant Journal, 査読有, Vol. 69: 857–867

④ 横所, K., Yamaji, N., Ma, J.F., 2011, An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice, Plant Journal, 査読有, Vol.68, 1061-1069

⑤ Moore, K.L., Schroder, M., Wu, Z.C., Martin, B.G.H., Hawes, C.R., Mcgrath, S.P., Hawkesford, M.J., Ma, J.F., Zhao, F.J. Grovenor, C.R.M., 2011, High resolution secondary ion mass spectrometry reveals the contrasting subcellular distribution of arsenic and silicon in rice roots, Plant Physiology, 査読有, Vol.156, 913-924.

⑥ 夏, J.X., Yamaji, N., Ma, J.F., 2011, Further characterization of an aluminum influx transporter in rice, Plant Signal. Behavior, 査読有, Vol.6, 160-163.

⑦ 宇野, D., Milner, M., Yamaji, N., Yokosho, K., Koyama, E., Zambrano, C., Kaskie, M., Ebbs, S., Kochian, L., Ma, J.F., 2011., Elevated expression of TcHMA3 plays a key role in the extreme Cd tolerance in a Cd-hyperaccumulating ecotype of Thlaspi

- caerulescens, *Plant Journal*, 査読有, Vol.66, 852-862.
- ⑧ 宇野, D., 小野山, E., Yamaji, N., Ma, J.F., 2011, Physiological, genetic, and molecular characterization of a high-Cd- accumulating rice cultivar, *Jarjan. J., Expt. Bot.*, 査読有, Vol.62, 2265-2272.
- ⑨ 宇野, D., Yamaji, N., 小野山, I., 黄, C.F., 安藤, T., 矢野, M., Ma, J.F., 2010, Gene limiting cadmium accumulation in rice., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, Vol.107, 16500-16505, doi:10.1073/pnas.1005396107.
- ⑩ 夏, J.X., Yamaji, N., Ma, J.F., 2010, A plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, Vol.107, 18381-18385, doi/10.1073/pnas.1004949107
- ⑪ 黄, C.F., Yamaji, N., Ma, J.F., 2010, Knockout of a bacterial-type ABC transporter gene, AtSTAR1, results in increased Al sensitivity in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, 査読有, Vol.153, 1669-1677.
- ⑫ 赵, F.J., 阿古, Y., 米谷, N., 李, R.Y., 苏, Y.H., Yamaji, N., 麦格拉思, S.P., Ma, J.F., 2010, The role of the rice aquaporin Lsi1 in arsenite efflux from roots, *New Phytol.*, 査読有, Vol.186, 392-399.
- ⑬ 横尾, K., Yamaji, N., Ma, J.F., 2010, Isolation and characterisation of two MATE genes in rye, *Funct. Plant Biol.*, 査読有, Vol.37, 296-303.
- ⑭ 宇野, D., 小野山, I., 横尾, K., 安藤, T., 矢野, M., Ma, J.F., 2009, A major quantitative trait locus controlling cadmium translocation in rice (*Oryza sativa*), *New Phytologist*, 査読有, 182: 644-653.
- ⑮ 赵, F.J., Ma, J.F., 梅哈格, A.A., 麦格拉思, S.P., 2009, Arsenic uptake and metabolism in plants, *New Phytol.*, 査読有, Vol.181, 777-794.
- ⑯ 李, R.Y., 史德, J.L., Ma, J.F., 麦格拉思, S.P., 赵, F.J., 2009, Mitigation of arsenic accumulation in rice with water management and silicon fertilization, *Environ. Sci. Technol.*, 査読有, Vol.43, 3778-3783.
- ⑰ 李, R.Y., 阿古, Y., 刘, W.J., 米谷, N., 费德曼, J., 麦格拉思, S. P., Ma, J.F., 赵, F.J., 2009, The rice aquaporin Lsi1 mediates uptake of methylated arsenic species, *Plant Physiol.*, 査読有, Vol.150, 2071-2080.
- [学会発表] (計 19件)
- ① Ma, J.F., Genes involved in the accumulation of toxic Cd and As in rice, International Symposium of Rice functional Genomics 9th ISRFG in Taiwan, Taipei, Taiwan, Nov. 7-9, 2011
- ② 藤井, M., Yamaji, N., Ma, J.F., Mechanism regulating HvAACT1 expression in barley, Rhizosphere 3 International Conference. Perth, Australia, Sep. 25-30, 2011
- ③ 横尾, K., Yamaji, N., Ma, J.F., Isolation and characterization of an Al-induced transporter gene in buckwheat, Rhizosphere 3 International Conference, Perth, Australia, Sep. 25-30, 2011.
- ④ Ma, J. F., Transporters involved in uptake and detoxification of minerals in plants, Rhizosphere 3 International Conference, Perth, Australia, Sep. 25-30, 2011
- ⑤ 馬 建鋒、イネ有害元素の集積に関与する遺伝子の同定と応用、日本遺伝学会第83回大会、京都、9月20日～23日、2011
- ⑥ 横正健剛、山地直樹、馬 建鋒、ソバのアルミニウム誘導性トランスポーターの単離と機能解析、日本土壌肥料学会年会、つくば、8月8日～10日、2011
- ⑦ Ma, J.F., Transporters involved in accumulation of toxic Cd and As in rice, 2nd International Symposium on Genomics and Crop Genetic Improvement, Wuhan, China, July 4-8, 2011
- ⑧ Ma, J.F., OsHMA3, a tonoplast-localized transporter for Cd, controls Cd transfer from the roots to the grains in rice, 4th International IUPAC Symposium for Trace Elements in Food (TEF-4), Aberdeen, Scotland, June 19-22, 2011
- ⑨ 馬 建鋒、山地直樹、三谷奈見季、ケイ

酸トランスポーターLsi1 は亜ヒ酸も亜セレン酸も輸送する、第3回植物アクアポリン研究検討会、倉敷、6月3日、2011

- ⑩ 馬 建鋒、カドミウムトランスポーターの機能と構造、第33回日本分子生物学会年会、神戸、12月7日-10日、2010
- ⑪ Ma, J.F., Ueno, D., Yamaji, N., Transporters involved in the accumulation and hypertolerance of Cd in plants, Plant Membrane Biology, 15th International Workshop Adelaide 2010, Adelaide, Australia, Sep. 19-24, 2010
- ⑫ Ueno, D., Ma, J.F., Cloning and functional characterization of a tonoplast-localized Cd transporter in rice, 15th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants, Budapest, Hungary, June 26-30, 2010
- ⑬ 馬 建鋒、植物の必須及び有害ミネラルのトランスポーター、日本薬学会第130年会、岡山、3月29日、2010
- ⑭ 上野大勢、山地直樹、馬 建鋒、Cd超集積植物 *Thlaspi caerulescens* (ecotype, Ganges)由来の P-type ATPase HMA3 の機能、日本土壌肥料学会年会、京都、9月15日~18日、2009
- ⑮ Ma, J.F., Huang, C.F., Furukawa, J., Yamaji, N., Transporters involved in Al resistance in gramineous crops, 7th International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH, Guangzhou, China, May 17-21, 2009.

[図書] (計 1件)

- ① 馬 建鋒、文永堂出版、2010、第4章 不良土壌に対する植物の応答、1. 酸性土壌、pp. 199-209、間藤徹・馬 建鋒・藤原徹 編、植物栄養学 第2版。

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/plant.stress/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬 建鋒 (Jian Feng Ma)
岡山大学・資源植物科学研究所・教授
研究者番号：80260389

(2) 研究分担者

山地 直樹 (YAMAJI NAOKI)
岡山大学・資源植物科学研究所・助教
研究者番号：00444646

(3) 連携研究者

()

研究者番号：