

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658022

研究課題名（和文） アルミニウム結合性ペプチドの同定

研究課題名（英文） Identification of Al-binding peptide

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）：

イネのアルミニウム耐性転写調節因子ART1の制御下にある遺伝子 *OsCDT3* の機能解析を行った。*OsCDT3* は僅か53アミノ酸のペプチドをコードし、そのうち14個のアミノ酸はシステインであった。*OsCDT3* は主に根で発現し、アルミニウムによって誘導される。*OsCDT3* は細胞膜に局在していた。*OsCDT3* の発現を抑制すると、アルミニウム耐性が低下した。また酵母で発現させると、アルミニウム耐性が高くなり、細胞内のアルミニウム濃度が減少した。これらのことから *OsCDT3* はアルミニウムを細胞内に輸送しないようにアポプラストで無毒化している可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

We functionally characterized an ART-regulated gene, *OsCDT3*. *OsCDT3* encodes a predicted peptide of 53 amino acid residues, of which 14 (26.4%) are cysteine residues. *OsCDT3* was mainly expressed in the roots and its expression was specifically induced by Al exposure. *OsCDT3* was localized to the plasma membrane. Knockdown of *OsCDT3* resulted in increased sensitivity to Al in rice. Yeast expressing *OsCDT3* showed increased tolerance to Al and decreased accumulation of Al. Our results indicate that *OsCDT3* may play a role in detoxifying Al at the apoplast.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

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：イネ・アルミニウム・ペプチド・結合

1. 研究開始当初の背景

アルミニウムイオン毒性(Al^{3+})は世界の耕地面積の3割を占める酸性土壌での主な作物生育阻害因子であり、わずか数マイクロモルの濃度ですばやく根の伸長阻害を引き起こす。しかし、一部の植物種あるいは品種はアルミニウム毒性に対して耐性機構を発達させてきた。イネはイネ科作物の中で最もアルミニウム耐性の強い種とされている。最近、アルミニウム耐性転写調節因子ART1が同定され、イネの高いアルミニウム耐性は複数の耐性遺伝子が寄与していることが明らかとなった。ART1は少なくとも31個の遺伝子の発現を制御しているが、そのうちの数個しか機能が解明されておらず、イネの高いアルミニウム耐性の全貌はまだ解明されていない状況である。

2. 研究の目的

本研究ではART1制御下にある遺伝子*OsCDT3*の機能解明を目的とする。*CDT3*は53個のアミノ酸からなる短いペプチドをコードすると予想される。しかし、その機能は全く明らかにされていない。本研究では*CDT3*の発現パターン、細胞・組織局在性を明らかにし、*CDT3*の過剰発現体や発現抑制体を作成して、アルミニウム耐性における*CDT3*の役割を解明する。

3. 研究の方法

アルミニウムや他の金属で処理したイネの根と地上部からRNAを抽出して、定量的RT-PCRで発現量を調べた。また*OsCDT3*プロモーター-GFPをイネに形質転換して、蛍光顕微鏡で組織局在を観察した。*OsCDT3*-GFPをタマネギの表皮細胞に一過的に発現させて、細胞内局在を調べた。

pANDAベクターに*OsCDT3*をつないだプラスミドをイネに形質転換し、RNAi発現抑制体を

作成した。アルミニウム耐性は根の伸長阻害を持って評価した。

酵母に*OsCDT3*を発現させて、アルミニウム耐性と吸収量を調べた。アルミニウム吸収量は処理後、2NのHClで溶解し、原子吸光法で定量した。

4. 研究成果

(1) 発現解析

発現解析の結果、*OsCDT3*は主に根で発現していて、その発現量はアルミニウムによって増加した(図1)。しかし、*OsCDT3*の発現は他の金属(カドミウムとランタン)や低pHには応答しなかった。また*art1*変異体では、アルミニウムによる発現誘導が見られなかった。

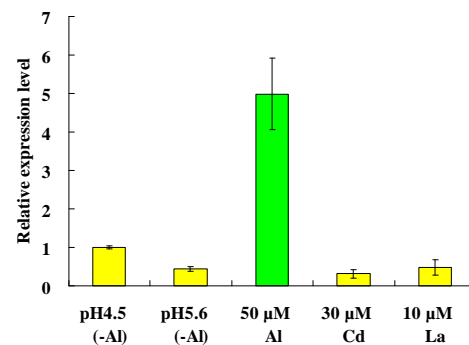


図1 *OsCDT3*の発現パターン

(2) 組織・細胞内局在

*CDT3*の組織局在性をp*OsCDT3*-GFP形質転換植物を用いて解析した結果、根のすべての細胞に局在していることがわかった(図2)。またGFP-*OsCDT3*融合遺伝子をタマネギの表皮細胞に一過的に発現させて、細胞内局在を調べたところ、細胞膜に局在していた。

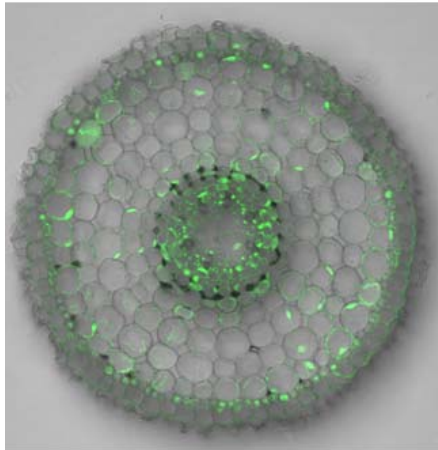


図2 OsCDT3の組織局在

(3) アルミニウム耐性におけるOsCDT3の役割

OsCDT3の発現を抑制するために、RNAiライオンを作成して、アルミニウム耐性を調べた。その結果、OsCDT3の発現を低下させると、アルミニウム耐性が弱くなった(図3)。6時間のアルミニウム処理後、原子吸光法で根のアポプラストとシンプラスト中のアルミニウムを定量し、CDT3の発現抑制株と野生型を比べた。その結果、アポプラスト中のアルミニウムが野生型と比べ、発現抑制株で低下した。逆にシンプラスト中のアルミニウムは発現抑制株で増加した。これらのことからCDT3はアルミニウムをアポプラストにおいてキレートすることによって無毒化している可能性がある。

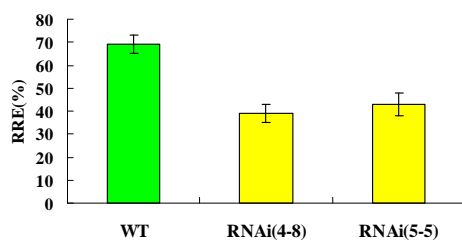


図3 OsCDT3発現抑制体のアルミニウム耐性

一方、CDT3を35Sプロモーター及びアルミニウム誘導性OsFRDL4プロモーター制御下で過剰発現させると、発現レベルが増加したが、

アルミニウム耐性は野生型とほとんど変わらなかった。

(4) 酵母での耐性評価

酵母にOsCDT3とその相同遺伝子4つを発現させると、OsCDT3とOsCDT4のみがアルミニウム耐性を高めた(図4)。一方、OsCDT1のみがカドミウム耐性を高めた。またOsCDT3を発現させた酵母は細胞内のアルミニウム濃度が減少した。

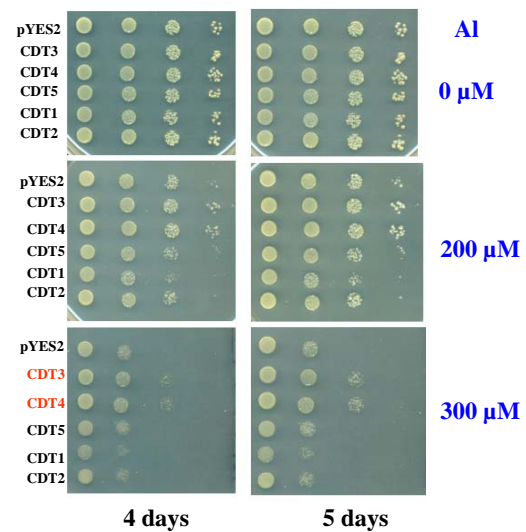


図4 OsCDTを発現させた酵母のアルミニウム耐性

(5) 他のART1制御遺伝子との相互作用

ART1下流のいくつかの遺伝子の発現を野生株とCDT3発現抑制株との間で比較した。CDT3を抑制してもアルミニウム耐性遺伝子Nr1t1, OsSTAR1及びOsFRDL4の発現レベルはほとんど変わらなかった。これらのことはCDT3がアルミニウムのレセプターとしての役割をしていないことを示している。

これらのことからOsCDT3はイネの高いアルミニウム耐性に寄与している因子の一つで、アルミニウムを細胞内に輸送しないようにアポプラストで無毒化している可能性がある。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- (1) Xia, J. X. and Ma, J. F. A gene encoding a cysteine-rich peptide is involved in rice Al tolerance. 3rd Japan-China Joint Workshop on Plant Nutrition. Kurashiki, Japan, March 27-29, 2011.
- (2) Xia, J. X., Yamaji, N., Ma, J. F. : A gene encoding a cysteine-rich peptide is involved in rice Al tolerance. 第52回日本植物生理学会年会, 仙台, 3月20日-22日, 2011. p.180.

[図書] (計 0 件)

[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 (MA JIAN FENG)
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：