

## 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 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：15201  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22780291  
 研究課題名(和文) 新奇ヒ素トランスポーターの単離に向けた究極の酵母タンパク質発現ライブラリーの構築  
 研究課題名(英文) Development of rice transporter gene enrichment library to isolate novel arsenic transporter genes.  
 研究代表者  
 秋廣 高志 (TAKASHI AKIHIRO)  
 島根大学・生物資源科学部・助教  
 研究者番号：40508941

## 研究成果の概要（和文）：

膜輸送体と機能類推されるイネ完全長 cDNA は約 1,500 個ある。これらをイネゲノムリソースセンターから入手し、Gap Repair Cloning 法を用いて酵母発現用プラスミド(pYES2)にサブクローニングした。得られたプラスミドを酵母に形質転換しライブラリーを構築した。その際、簡便にスクリーニングが行えるように 96 穴フォーマットでグリセロールストックを作成した。このライブラリーを用いてヒ素の輸送体の単離を行い、17 個のヒ素輸送体候補遺伝子（三価のヒ素で 8 遺伝子、五価のヒ素で 9 遺伝子）の単離に成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

The yeast expression library enriched with rice transporter genes was developed here. About 1,500 full length cDNAs were obtained from resource center and sub-cloned into yeast expression vector (pYES2). These plasmid were transformed into *Saccharomyces cerevisiae* and glycerol stocked. The library was screened on SD medium containing arsenic and arsenate. Total 17 As sensitive clones were screened.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学 環境農学

キーワード：トランスポーター ヒ素 重金属の転流機構

## 1. 研究開始当初の背景

重金属の無毒化や輸送に関与する遺伝子が数多く単離されているが、その研究の多くで、“シロイヌナズナの変異体”または“酵母タンパク質発現ライブラリー”をスクリーニングする方法が使われている。シロイヌナズナの変異体を用いる方法は、植物体中に同一の機能をもつタンパク質が複数存在する場合には利用できない欠点を有し、酵母を用いる方法においては、“質の高いライブラリー”と“巧妙なスクリーニング方法”の開発が必要となる。どちらの方法もスクリーニングをすれば必ず目的の遺伝子が単離できるというわけではないことから、これまでのスクリーニングにおいて単離できなかった遺伝子が数多く存在するものと考えられる。そこで本研究では、イネの輸送体に特化した酵母タンパク質発現ライブラリーを構築し、そのライブラリーを用いてヒ素の輸送に関わる新奇トランスポーター（細胞外から細胞内、細胞質から液胞、細胞質から細胞外、へヒ素を輸送する）の単離を行った。

## 2. 研究の目的

本研究の目標はヒ素の輸送に関わる新奇トランスポーターを単離することである。植物から重金属の吸収に関わるトランスポーターを単離する場合、酵母タンパク質発現ライブラリーをスクリーニングする方法が有効である。この手法においては、“ライブラリーの質”と“スクリーニング方法の善し悪し”が実験の正否を決定する。

そこで本研究では、イネゲノムに存在する全てのトランスポーターを発現するライブラリーを構築し、それらをポジティブスクリーニング（耐性株）またはネガティブスクリーニング（感受性株）し、ヒ素の輸送に関わる新奇のトランスポーターを単離することを考案した。

通常、酵母タンパク質発現ライブラリーを構築する場合、単離目的とする遺伝子が発現していると考えられる植物体から mRNA を抽出した後、cDNA の合成、ライブラリー化を行う。しかし、目的の遺伝子はその植物中で目的通り発現しているかどうかを確認する手段はなく、植物材料の選定は実験者の経験と勘に頼るしかないのが現状である。

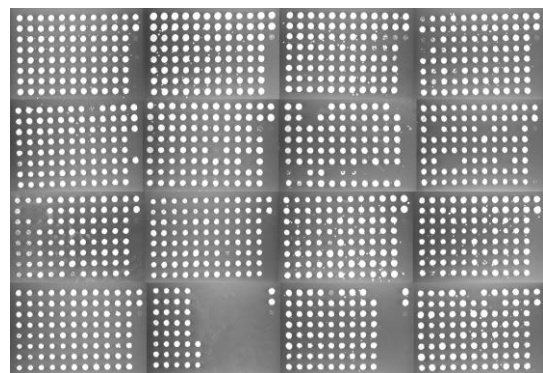
この問題を解決する目的で、本研究では、植物体を、ライブラリー作成の初発材料とするのではなく、完全長 cDNA としてすでに単離され、輸送体をコードする遺伝子であると機能類推されているものを初発材料とすることで、トランスポーターに特化したライブラリーを構築することとした。

## 3. 研究の方法

実験は大別して4つ行った。①約1,500個のイネ完全長 cDNA をリソースセンターから入手し、PCRによって完全長 cDNA を増幅した。PCRに用いる Primer の5'末端には酵母タンパク質発現用ベクター（pYES2）と相同の配列を付加した。②①で作成した PCR 産物と直鎖化したベクターを、酢酸リチウム法を用いて酵母内に同時に形質転換した。PCR 産物の末端とベクターは相同な配列を持つため、酵母内でこの配列間で相同組換えが起こり、最終的に pYES2 ベクターの GAL1 プロモーターの下流に、PCR 増幅させたイネの完全長 cDNA が挿入される（この方法を Gap Repair Cloning 法という）。③Gap Repair Cloning 法によって構築したプラスミド（1,480 個）を酢酸リチウム法を用いて酵母に形質転換し、得られた形質転換体を、96 穴フォーマットでグリセロールストックした（-80℃）。④構築したライブラリーをヒ素を含む SD-ura 培地（ヒ素を含む）で培養し、ヒ素に対して感受性または耐性になる株を選抜した。

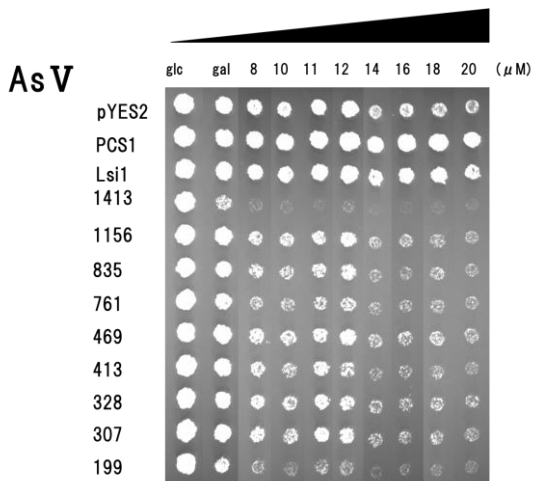
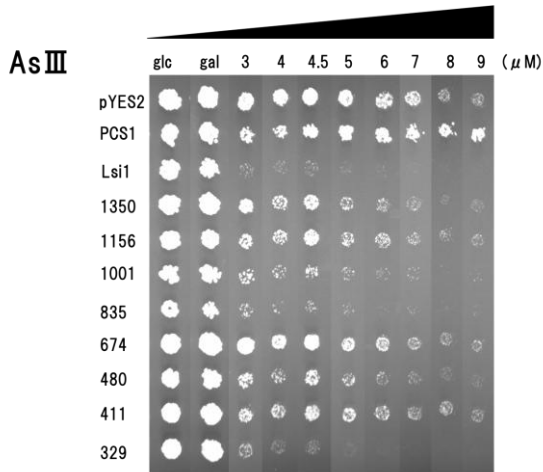
## 4. 研究成果

酵母用の発現ベクター（pYES2）にイネの輸送体遺伝子を Gap Repair Cloning 法を用いて挿入し、正しく挿入されたプラスミドを酵母に形質転換した（次図）。

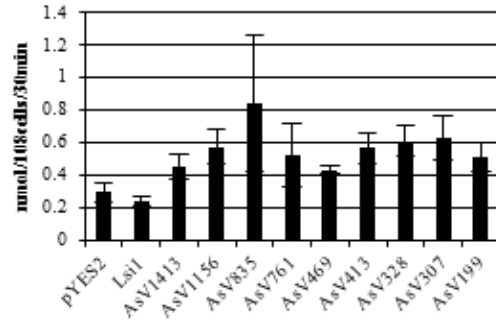
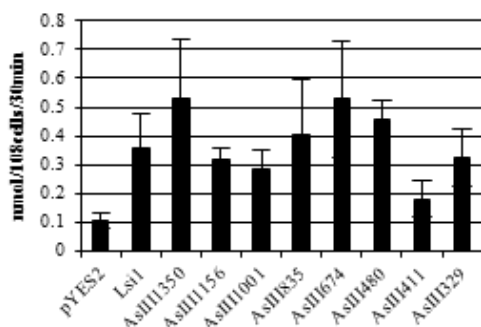


最終的に、1,480 個のイネの輸送体遺伝子が発現するライブラリーの構築に成功した。このようにイネの輸送体遺伝子（植物の輸送体遺伝子）だけを発現するライブラリーはこれまでに報告例がなく、世界に一つしかないリソースであると考えられ、本研究の最大の成果であると言える。このライブラリーは耐性株のスクリーニング（ポジティブスクリーニング）に加えて、感受性株のスクリーニング（ネガティブスクリーニング）も可能である。通常のライブラリーではネガティブスクリーニングは行えないことから、この点も本リソースの特筆すべき点になっている。

続いてこのライブラリーを 3  $\mu$ M または 10  $\mu$ M の As<sup>III</sup> または As<sup>V</sup> を含む培地を用いて感受性株のスクリーニングを行った。その結果、3 価のヒ素で 8 株、5 価のヒ素で 9 株の感受性株を単離することができた（下図）単離した遺伝子の中には、3 価のヒ素の輸送体として単離・報告されている *OsLsi1* が含まれていたことから、スクリーニングは正しく行えたものと考えられた。



選抜された感受性株が、培地中のヒ素を過剰に吸収したことで感受性を示したことを確認する目的で、単離した酵母を、ヒ素を含む液体培地で 1 時間培養した後培養を止め、細胞を硝酸分解しヒ素を抽出した後、ヒ素の含量を ICP-MS を用いて測定した（次図）。



その結果、単離した全ての酵母がベクターのみを導入した酵母よりも高いヒ素含有量していることが明らかとなり、導入したイネの輸送体にヒ素輸送活性があることが明らかとなった。

#### 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 Oda, K., Otani, M., Uraguchi, S., Akihiro, T., Fujiwara, T., Rice ABCG43 is Cd inducible and confers Cd tolerance to yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75:1211-1213 (2011)

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① イネのトランスポーター遺伝子を網羅的に発現する酵母タンパク質発現ライブラリーの構築と迅速スクリーニングシステムの構築 南井岳志 小田紘士郎 大谷真広 山木智央 秋廣高志 中国四国植物学会 島根大学 (松江) 2013 年 5 月 12・13 日
- ② イネにおける放射性セシウム輸送体の単離と機能解析 山木智央 秋廣高志 中国四国植物学会 島根大学 (松江) 2013 年 5 月 12・13 日
- ③ Construction of yeast expression library enriched with rice transporter genes. Akihiro T., Oda K, Otani M, Minami T, Yamaki T, Ishikawa T International Workshop on Plant Membrane Biology (IWPMB2013) in Kurashiki 26-31 March, 2013 倉敷芸文館 (倉敷)

- ④ Isolation and characterization of rice cesium transporter genes. Tomohiro Yamaki, Takashi Akihiro. The 9th International Symposium of Rice Functional Genomics (ISRFG 9) in Taipei. November 7-9, 2011

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：セシウムトランスポータおよびセシウム低吸収性イネ  
発明者：山本智央 秋廣高志  
権利者：島根大学  
種類：特願  
番号：2012-024729  
出願年月日：2012年2月8日  
国内外の別：国内

○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〕

新聞報道

2012年8月2日読売新聞

2012年7月5日商経アドバイス

2012年6月18日朝日新聞

2012年6月16日山陰中央新報

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋廣高志 (TAKASHI AKIHIRO)  
島根大学・生物資源科学部・助教  
研究者番号：40508941