

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380194

研究課題名(和文) グルタチオンを用いて植物に蓄積するカドミウムの量を減らす - その分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms underlying inhibitory effects of glutathione on cadmium translocation and accumulation in plants

研究代表者

中村 進一 (Nakamura, Shin-ichi)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：00322339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：食の安全性に対する関心が高まりを見せている中、有害重金属元素であるカドミウムの含量が低い農作物を栽培する技術を確立することは喫緊の課題となっている。これまでの研究によって植物の根に部位特異的に与えたグルタチオンが植物体の地上部へのカドミウムの移行と蓄積を選択的に抑制する現象を見出している。この現象の分子メカニズムを解明し、応用展開することで、カドミウム蓄積量の少ない農作物の新しい栽培技術を確立することが期待できる。本研究では、この現象が起こる要因のひとつがグルタチオンによる植物の根からのカドミウムの排出の活性化であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Growing interests in food safety make it an urgent issue to establish a new technique to reduce cadmium (Cd), which is one of harmful heavy metal elements, in crop plants. In our research, we found that glutathione (GSH), which was applied to plant roots site-specifically, inhibited Cd translocation from roots to shoots and Cd accumulation in their shoots. It is expected to establish a novel cultivation technique by applying this phenomenon and carrying out some research for practical use. In this research, we tried to elucidate the molecular mechanism of this phenomenon. We found one of the causes for this phenomenon was that glutathione, applied to roots, activated Cd efflux from their roots.

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：グルタチオン カドミウム ポジトロンイメージング

1. 研究開始当初の背景

我々の食の安全を脅かす問題のひとつに有害重金属元素であるカドミウム(Cd)の農作物への蓄積がある。Cdは日本四大公害病のひとつであるイタイイタイ病の原因にもなった物質であり、その摂取は我々に深刻な健康障害をもたらす要因となりうる。そのため、農作物におけるCd含量を低減する技術を確立し、それらを実用化することは急務となっている。近年では、植物体内におけるカドミウム動態に参与するトランスポーター遺伝子を同定し、それらの植物体内における発現レベルを調節することや植物の物質吸収能を利用して栽培土壌を浄化する方法の実用化を検討することなど農作物のカドミウム含量を低減するために様々なアプローチがとられている。しかし、いずれも広汎に利用される実用化技術には至っていない。

我々の研究グループでは、植物体内のカドミウムの長距離輸送機構を解明し、それらを制御することによって農作物におけるCd含量を低減する技術を確立することを目指して研究を行ってきた。その研究において、生理活性ペプチドのグルタチオンを植物(アブラナ)の根に部位特異的に与えた時に、植物体の地上部に移行・蓄積するCdの量が有意に減少する現象を見出すことに成功した。この現象の分子メカニズムを解明し、それらを応用展開していくことによって、遺伝子組み換え技術を利用しない、即効性のある農作物におけるCd含量を低減する新たな栽培技術を確立することができるのではないかと考え、本研究テーマを提案するに至った。

2. 研究の目的

本研究課題はこれまでの研究で明らかになったアブラナの根に部位特異的に与えたグルタチオンが植物体の地上部へのカドミウムの移行・蓄積を選択的に抑制する現象の分子機構を明らかにすること、そしてそれらの知見を利用して、カドミウム低蓄積農作物の栽培技術の実用化に向けて応用展開するための研究基盤を確立することを目的にしている。

本研究課題において、具体的に検討を行ったのは、(1) グルタチオンに応答した植物根におけるカドミウムの挙動の解明、(2) ポジトロンイメージング技術を用いたグルタチオンに応答したカドミウムの挙動の定量的な解析、(3) マイクロアレイ法を用いたグルタチオン処理に応答する遺伝子の同定とその機能解析、(4) グルタチオン合成能を高めた形質転換アラビドプシスの創製の4項目である。

3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するために掲げた4つの研究課題に対応して、次のような実験を行った。

- (1) 根へのグルタチオン処理に応答した植物根におけるカドミウムの挙動の解明
植物根からのカドミウムの排出に根に与えたグルタチオンが及ぼす影響を調べた。
- (2) ポジトロンイメージング技術を用いたグルタチオンに応答したカドミウムの挙動の定量的な解析
ポジトロンイメージング装置で撮像した画像の解析を行い、根へのグルタチオン処理がカドミウム動態に及ぼす影響を調べた。
- (3) マイクロアレイ法を用いたグルタチオン処理に応答する遺伝子の同定とその機能解析
マイクロアレイ法を用いて根へのグルタチオン処理に応答して、発現量が変化する遺伝子群を同定することを試みた。
- (4) グルタチオン合成能を高めた形質転換アラビドプシスの創製
グルタチオン合成に関連した遺伝子を根に特異的に発現するプロモーターに繋いだベクターを利用して、根においてグルタチオン合成能を高めた形質転換アラビドプシスを創製することを試みた。

4. 研究成果

- (1) 根へのグルタチオン処理に応答した植物根におけるカドミウムの挙動の解明

これまでに行ってきた研究によって植物体の根に部位特異的に与えたグルタチオンが植物体の地上部へのカドミウムの移行と蓄積を抑制することが明らかになっている。この現象を引き起こすのは根に部位特異的に与えたグルタチオンのみで、葉に与えたグルタチオンにはこのようなカドミウムの移行を抑制する効果がみられないということも明らかになっている。(図1)。

この現象は同じグルタチオンでも酸化型のグルタチオンを根に与えた場合には、そのカドミウムの移行と蓄積を抑制する様式が還元型とは異なる(図2)。同じグルタチオンでも酸化型のグルタチオンがカドミウムの移行と蓄積の抑制効果を持つことはこの現象がグ

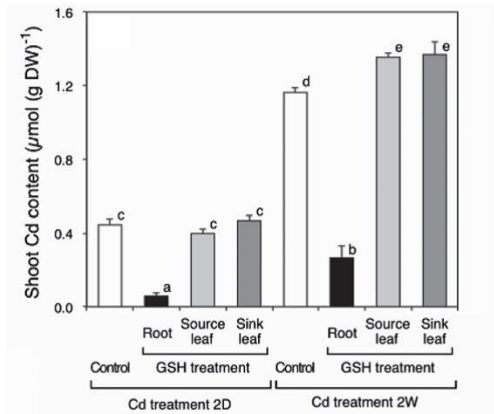


図 1 植物に部位特異的に与えたグルタチオンがアブラナの地上部カドミウム含量に及ぼす影響 処理期間は2D:2日間、2W:2週間、カドミウム処理濃度:10 μ M、グラフ内の異なるアルファベットはそれぞれの測定値に有意差があることを示す。(n>8)

グルタチオンとカドミウムの化学的な結合に起因するものではなく、植物根において何らかの生理的なメカニズムがグルタチオンによって活性化されるために起こっていることを示している。このことは、根に低温処理を行い、根における生理的機能が働くことを抑制した場合、この現象が起こらなかったという実験結果からも確認することができる。

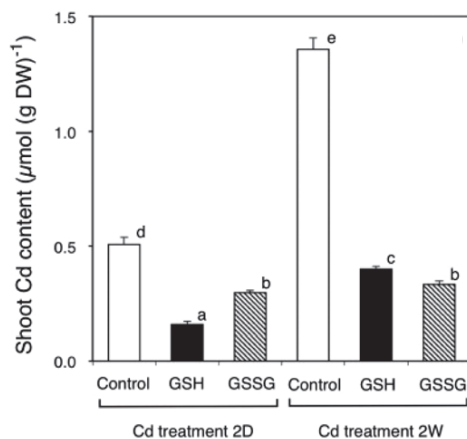


図 2 植物の根に与えるグルタチオンの化学形態がアブラナの地上部カドミウム含量に及ぼす影響 GSH:還元型、GSSG:酸化型、処理期間は2D:2日間、2W:2週間、カドミウム処理濃度:10 μ M、グラフ内の異なるアルファベットはそれぞれの測定値に有意差があることを示す。(n>7)

この現象を引き起こす原因となるメカニズムの一つとして根のグルタチオン処理によって、植物の根からのカドミウムの排出が活性化されていることが明らかになった。根からのカドミウムの排出に着目したのは後述のポジトロンイメージングの実験結果による。カドミウムによって前処理を行った植物

を新しい水耕液に浸し、水耕液中に排出されるカドミウム量を測定する実験を行ったところ、対照区の植物では根から排出されるカドミウムの量は、約120 nmol/gFWであったのに対し、根にグルタチオン処理を行った植物の根から排出されたカドミウムの量は約150 nmol/gFWであった。根におけるグルタチオン処理によって、根からのカドミウムの排出が有意に増加していた。

(2) ポジトロンイメージング技術を用いたグルタチオンに応答したカドミウムの挙動の定量的な解析

根に与えたグルタチオンが植物体の地上部へのカドミウムの移行と蓄積を抑制している様子をポジトロンイメージング技術を用いて可視化することに成功した(図3)。この実験では、同じグルタチオンでも酸化型・還元型とその化学形態が異なると植物のカドミウムの移行の抑制効果が異なることを可視化することにも成功している。また、このポジトロンイメージングの実験において植物の根から物質を吸収の様子(経根吸収の様子)を可視化することができたことは特筆すべき研究成果である。これまで経根吸収のポジトロンイメージング実験では、植物の根の部分に鉛ブロックで遮蔽していた。そのため、ポジトロンイメージング実験では経根吸収は、実験対象にはなっていない。ここで経根吸収の可視化という大きなブレイクスルーを得たことによって、本研究は大きな進展を見ることができた。

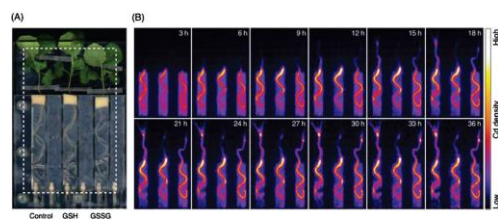


図 3 ポジトロンイメージング技術に用いた植物の根へのグルタチオンの施用がアブラナのカドミウム動態に及ぼす影響の可視化

(A) 実験に用いた植物の様子、(B) 各植物におけるカドミウムの蓄積の様子 control:対照、GSH:還元型グルタチオン処理した植物、GSSG:酸化型グルタチオン処理した植物

経根吸収イメージング実験の植物体の各部位(地上部、地下部)、水耕液におけるカドミウム動態の経時変化を調べた(図4)。その結果、対照区の植物の水耕液とグルタチオン(還元型)処理を行った植物の水耕液ではカドミウムシグナルの減少パターンに差がある

ことが明らかになった (図 4F)。この実験結果を端緒に、根からのカドミウムの排出がグルタチオンによって活性化されていることを検証する実験を着想するに至った。また、カドミウム動態を可視化することによって、植物体の地上部基部が植物体内でのカドミウムの分配に重要な役割を果たしていることがわかった。この部位はイネにおいてもカドミウム分配に重要な役割を果たしていることがこれまでの実験によって明らかになっている。現在はこの部位に着目した研究も推進している。

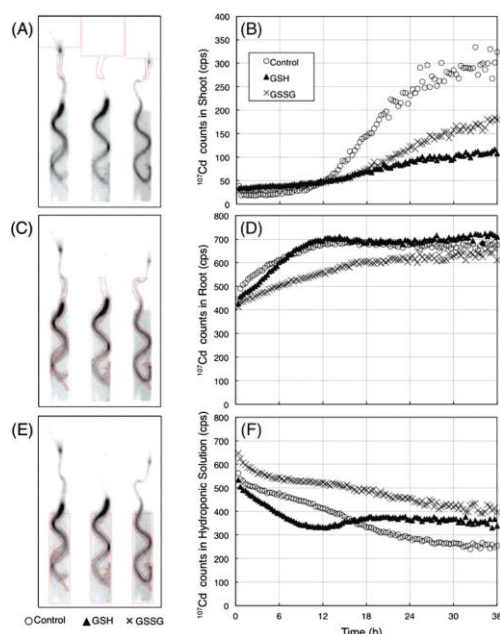


図4 アブラナ地上部・地下部および水耕液におけるカドミウムシグナルの経時変化

(A), (C), (E) 関心領域の設定 (A): 植物体地上部、(C): 植物体地下部、(E): 水耕液、(B), (D), (F) それぞれの関心領域におけるカドミウムシグナルの経時変化 カドミウムの経時変化グラフの作成時には ^{107}Cd シグナルの減衰補正を行っている。

(3) マイクロアレイ法を用いたグルタチオン処理に応答する遺伝子の同定とその機能解析

マイクロアレイ実験によって、根におけるグルタチオン処理によって、発現量が増加・減少する遺伝子群を検出・同定することができた。現在、この研究成果に関しては、本報告書の作成時点において論文投稿するための準備を進めているところである。

(4) グルタチオン合成能を高めた形質転換アラビドプシスの創製

グルタチオン合成に関与する酵素の遺伝子を根に特異的に発現するプロモ

ーターに繋いだ配列を有するベクターを用いて、アラビドプシスの形質転換を行った。得られた形質転換体では根におけるグルタチオン含量が野生株と比較して有意に増加していることを確認している。この研究成果に関しては、本報告書の作成時点において論文投稿するための準備を進めているところである。

以上のように得られた研究成果から、根に与えたグルタチオンが植物体の地上部へのカドミウムの移行と蓄積を抑制する現象の分子メカニズムの解明を試みるという研究当初の目的はおおむね達成することができたといえる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① Nakamura, S., Suzui, N., Nagasaka, T., Komatsu, F., Ishioka, N.S., Ito-Tanabata, S., Kawachi, N., Rai, H., Hattori, H., Chino, M. and Fujimaki, S. (2013), Application of glutathione to roots selectively inhibits cadmium transport from roots to shoots in oilseed rape, *J. Exp. Bot.*, 64:1073-1081. 査読有 DOI: 10.1093/jxb/ers388

② 小山博之、信濃卓郎、大津直子、丸山明子、三輪京子、小林優、渡部敏裕、上野大勢、中村進一、小林祐里子、高橋美智子(2013) 植物栄養学の基礎研究から見てきた応用への可能性、日本土壤肥料学会誌、84 : 136-141 査読有

③ Nakamura S., Suzui N., Yin Y.-G., Ishii S., Kawachi N., Rai H., Hattori H., Fujimaki S. (2013) Effects of glutathione, applied to roots specifically, on Cd behavior in oilseed rape plants The Proceeding book of the International Plant Nutrition Colloquium (IPNC) and Boron Satellite Meeting, 689-690

[学会発表] (計 12 件)

① 中村進一、鈴木康大、鈴木伸郎、伊藤正志、石井里美、河地有木、頼泰樹、服部浩之、藤巻秀、グルタチオンによる植物体の地上部へのカドミウムの移行と蓄積の抑制～カドミウム処理濃度の影響、日本土壤肥料学会 2011 年度つくば大会、平成 23 年 8 月 8 日～10 日、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

② 中村進一、農作物に蓄積する重金属元素

の量を制御する、イノベーションジャパン 2011、平成 23 年 9 月 21 日～22 日、東京ビックサイト（東京都江東区）

③中村進一、鈴木康大、鈴木伸郎、伊藤正志、石井里美、河地有木、頼泰樹、服部浩之、藤巻秀、高等植物における地上部へのカドミウムの移行と蓄積を抑制するメカニズムの解明～カドミウム処理濃度の影響～、第 6 回高崎量子応用研究シンポジウム、平成 23 年 10 月 13 日～14 日、高崎シティギャラリー（群馬県高崎市）

④中村進一、農作物に蓄積する重金属量を制御する、第 5 回北東北地域イノベーションフォーラム、平成 23 年 11 月 15 日、ホテル青森（青森県青森市）

⑤中村進一、チオール物質を用いた植物に蓄積する重金属量の制御、新技術説明会、平成 24 年 2 月 10 日、JST 東京別館ホール（東京都千代田区）

⑥中村進一、チオール物質を用いた植物に蓄積する重金属量の制御、Biotech アカデミックフォーラム 2012、平成 24 年 4 月 25 日～27 日、東京ビックサイト（東京都江東区）

⑦中村進一、鈴木伸郎、近藤ひかり、河地有木、尹永根、石井里美、頼泰樹、服部浩之、藤巻秀、植物体の地上部へのカドミウムの移行と蓄積を抑制するグルタチオンの効果、日本土壤肥料学会 2012 年度鳥取大会、平成 24 年 9 月 4 日～6 日、鳥取大学（鳥取県鳥取市）

⑧中村進一、グルタチオンを用いて植物体内の重金属の動きを変える、日本土壤肥料学会 2012 年度鳥取大会シンポジウム、平成 24 年 9 月 6 日、鳥取大学（鳥取県鳥取市）

⑨中村進一、鈴木伸郎、長坂俊紀、石岡典子、七夕（伊藤）小百合、河地直木、頼泰樹、服部浩之、茅野充男、藤巻秀、根に与えたグルタチオンが植物のカドミウム動態に及ぼす影響、第 54 回日本植物生理学会年会、平成 25 年 3 月 21 日～23 日、岡山大学（岡山県岡山市）

⑩Nakamura S., Suzui N., Yin Y.-G., Ishii S., Kawachi N., Rai H., Hattori H., Fujimaki S., Effects of glutathione, applied to roots specifically, on Cd behavior in oilseed rape plants, XVII International Plant Nutrition Colloquium (IPNC) 2013, 平成 25 年 8 月 19 日～22 日、トルコ国際会議場（イスタンブール）

⑪中村進一、鈴木伸郎、尹永根、石井里美、河地有木、頼泰樹、服部浩之、藤巻秀、根に与えたグルタチオンが植物体内のカドミウム分配に及ぼす影響、日本土壤肥料学会 2013 年度名古屋大会、平成 25 年 9 月 11 日～13 日、名古屋大学（愛知県名古屋市）

⑫中村進一、PETIS によるカドミウム吸収動態解析と経根吸収イメージング、第 55 回日本植物生理学会年会シンポジウム、平成 26 年 3 月 18 日、ご富山大学（富山県富山市）

[その他]

ホームページ

秋田県立大学研究者総覧、

<http://www.akita-pu.ac.jp/stic/souran/scholar/detail.php?id=41>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 進一 (NAKAMURA Shin-ichi)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：00322339

(2)研究分担者

中井 雄治 (NAKAI Yuji)

弘前大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号：10321788

藤巻 秀 (FUJIMAKI Shu)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・リーダー
研究者番号：20354962

鈴木 伸郎 (SUZUI Nobuo)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究副主幹
研究者番号：20391287

頼 泰樹 (RAI Hiroki)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教
研究者番号：30503099

大津 直子 (OHKAMA-OHTSU Naoko)

東京農工大学・(連合) 農学研究科 (研究院)・講師
研究者番号：40513437