

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月30日現在

機関番号：11301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23710085
 研究課題名（和文）全cDNA解析によるヒ素高蓄積植物土壌浄化システムの解析
 研究課題名（英文）Transcriptome analysis of As-hyperaccumulator, *Pteris vittata*, for the soil remediation system.
 研究代表者
 畑山 正美（HATAYAMA MASAYOSHI）
 東北大学・大学院環境科学研究科・助教
 研究者番号：30447148

研究成果の概要（和文）：

次世代シーケンサー（Roche社454FLX Titanium）を用いたヒ素超蓄積植物の転写産物の網羅的解析を行った。ヒ素暴露有無条件下でインキュベートした後、羽片（葉）、根よりTotalRNAを調製した。Roche社454FLX Titanium より263 Mbのシーケンシングが行われた。アセンブル解析の結果10,000以上のlarge contigが得られた。Blast等の解析を行い、ヒ素を液胞輸送、または細胞外へ排出する輸送体遺伝子の候補遺伝子の情報を得た。さらに、3'フラグメントライブラリ解析により、シダ暴露有無における羽片・根各部における全発現遺伝子の定量発現解析を行った。その結果いくつかの遺伝子にヒ素暴露による、大きな発現の差異を見出した。現在発現結果の網羅的解析と輸送体候補遺伝子の詳細な解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：

Transcriptome analysis of As-hyperaccumulating plant, *Pteris vittata*, by next-generation sequencing technology was conducted. Total RNA was prepared from both As-exposed and non-exposed fern. *Pteris vittata* transcriptome from normalized cDNA library was sequenced in a full 454 GS-FLX run, producing more than 263 Mb sequences.

The subsequent de novo assembly yielded putative 11,612 large contigs. Several putative genes, which are responsible for AsIII or AsV transport, were obtained. Further, illumina-based expression profiling with 3' -fragment library was conducted for roots and shoot of the As-exposed or non-exposed fern. The differences of expression in As-exposed and non-exposed fern were observed for several genes. Further, more detailed analysis is being performed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境技術・環境材料

 キーワード：環境浄化技術・ファイトレメディエーション・次世代シーケンシング解析・*Pteris vittata*・ヒ素

1. 研究開始当初の背景

ヒ素は土壤汚染件数が1、2位と多く、その汚染は世界各地で深刻な健康被害を引き起こしている。こうしたヒ素汚染土壌よりヒ素高蓄積植物としてモエジマシダが発見されファイトレメディエーションとしての利用に期待が集まっている (Ma et al., *Nature*, 2001, 409, 579-)。このモエジマシダの耐性・蓄積メカニズムの研究はヒ素の取り込み実験や化学形態の解析を中心に行われてきた (Wang et al., *Plant Physiol.*, 2002, 1043, 249-; Hataytama et al., *J. Biosci. Bioeng.* In press)。ヒ素耐性・蓄積メカニズムは酵母細胞で詳細に研究されており、『ヒ素は3価の亜ヒ酸、もしくは5価のヒ酸の形態で細胞内に取り込まれ、ヒ酸はヒ酸還元酵素により亜ヒ酸に還元され、細胞膜の輸送体により細胞外に排出されるか、低分子のチオール性化合物が結合した後液胞膜上の輸送体により液胞内腔に隔離される事でヒ素を無毒化している』。しかしながら、モエジマシダでは大部分のヒ素は亜ヒ酸もしくは、ヒ酸として存在しており既存の耐性機構とは異なる事が示唆された (Webb et al., *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37, 754-)。また、本植物は高等植物では進化の過程で失われた液胞へのヒ素の輸送を担う亜ヒ酸輸送体遺伝子の存在が報告されている (Indriolo et al., *Plant Cell*, 2010, online)。これに加えて分子生物学的研究はヒ酸還元酵素遺伝子 (Ellis et al., *Plant Physiology*, 2006, 141, 1544-) やグルタチオン合成酵素の単離など部分的に明らかとなっているが、ヒ素の取り込みや統合的なメカニズムに関する分子生物学的知見はない。

代表者は他のグループに先駆けて羽片

(葉) でヒ酸を細胞内に輸送するリン酸輸送体を取得し、その一つがヒ素存在下でも発現の抑制がされない事を示した。しかしながらその輸送能は地上部組織限定されており、さらなる輸送体の探索が必要であると考えられた。

次世代シーケンサーを用いた網羅的解析は、微生物のメタゲノムを対象としてが急速に拡大しており、発現遺伝子の網羅的解析としても利用され始めている (Nagalakshmi et al., *Science*, 2008, 320, 1344-1349)。本法は、従来の手法に比べ、ゲルの切り出し、PCR や単離 (クローニング) といった手間がなく簡便に行える利点がある事に加え、旧来のシーケンサーに比べ格段に安価になったことから将来主流の解析法となると考えられている。ゲノム未知の環境浄化生物を対象とした発現遺伝子の網羅的解析を行えば、環境浄化や新規遺伝子資源の探索などに有用であり、既知の植物ゲノムや EST と比較すれば、その特異性が明らかになると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、近年急速に普及して来ている次世代シーケンサー (Roche社454FLX Titanium) を用い、ヒ素超蓄積植物であるモエジマシダのトランスクリプトームを網羅的に解析することにより当該植物のヒ素蓄積・耐性機構の全体像を分子レベルで評価する事を試みた。また、トランスクリプトーム解析により、ヒ素の輸送やヒ酸還元に関連する遺伝子群などの個々の解析の基盤となる遺伝子配列情報やヒ素の暴露や発現部位による発現の違いなどを整備する事を目的とした。

3. 研究の方法

5-6 羽の生長段階のシダを土壌栽培・水耕栽培し、ヒ素暴露有無の条件下でインキュベートした後、羽片（葉）、根よりそれぞれ totalRNA を調製した。mRNA を調製しランダムプライム法によりライブラリーを調製された。調製したライブラリーを増幅し、Roche 社 454FLX Titanium により解析され、263Mb のシーケンシングが行われた。

4. 研究成果

次世代シーケンサー（Roche 社 454FLX Titanium）を用い、ヒ素超蓄積植物の転写産物の網羅的解析を行い研究基盤を作ると共に、これまで得られ本植物のヒや亜ヒ酸取込を担う輸送体遺伝子のホモログを探索することを目的とした。アセンブル解析の結果 10,000 以上の large contig が得られた。ブラスト等の解析を行い、ヒ素を液胞輸送、または細胞外へ排出する輸送体遺伝子の候補遺伝子の情報を得た。さらに、3' フラグメントライブラリ解析により、シダ暴露有無における羽片、根各部における全発現遺伝子の定量発現解析を行った。その結果いくつかの遺伝子にヒ素暴露による、大きな発現の差異を見出した（図 1）。現在発現結果の網羅的解析と輸送体候補遺伝子の詳細な解析を行っている。

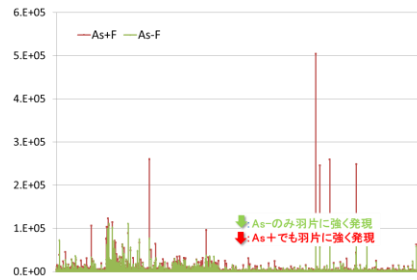


図 1 モエジマシダトランスクリプトーム発現解析（ヒ素有無）

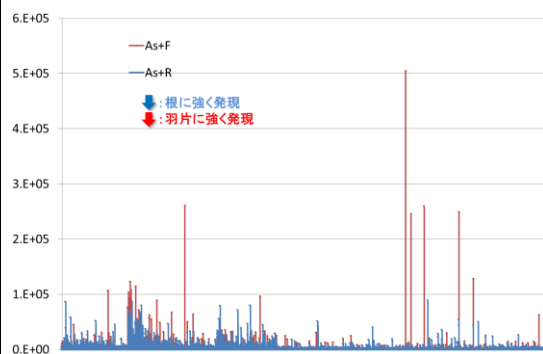


図 2 モエジマシダトランスクリプトーム発現解析（部位別）

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 2 件）

- 1 . Zhang Zhenyi, Sugawara Kazuki, Hatayama Masayoshi, Huang Yi, Inoue Chihiro Screening of As-accumulating plants using a foliar application and a native accumulation of As. International Journal of Phytoremediation, in press, (2013) 査読有

[10.1080/15226514.2013.773277](https://doi.org/10.1080/15226514.2013.773277)

2. Huynh Vinh Khang, Masayoshi Hatayama,
Chihiro Inoue Arsenic accumulation by
aquatic macrophyte coontail
(*Ceratophyllum demersum* L.) exposed
to arsenite, and the effect of iron on
the uptake of arsenite and
arsenate. Environmental and
Experimental Botany, 83, (2012), 47-52
査読有
[10.1016/j.envexpbot.2012.04.008](http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.008)

[学会発表] (計2件)

1. 菅原 一輝, 畑山 正美, 井上 千弘
ヒ素超蓄積植物モエジマシダによるヒ
素の挙動、第45回日本水環境学会(北
海道)、2011年3月18-20日
2. Huynh Vinh Khang, 畑山正美, 井上千弘
マツ藻 (*Ceratophyllum demersum*) によ
る水環境中からのヒ素除去に関する研
究、第45回日本水環境学会(北海道)、
2011年3月18-20日
3. 菅原一輝, 畑山正美, 井上千弘
モエジマシダのヒ素排出と輸送の検討.
第63回日本生物工学会大会(東京)、2011
年9月26-28日
4. 菅原一輝, 畑山正美, 井上千弘.
ヒ素超集積植物モエジマシダにおける
ヒ素の輸送. 第4回資源・素材学会東北
支部若手の会(岩手)、2011年11月20-21
日

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑山 正美 (HATAYAMA MASAYOSHI)
東北大学・大学院環境科学研究科・助教
研究者番号：30447148

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

西郷 浩人 (SAIGO HIROTO)

九州工業大学・生命情報工学科・准教授

研究者番号：90586124