

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292183

研究課題名(和文) グルタチオンが活性化する植物体内における物質輸送制御システムの分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms, which is activated by glutathione, controlling heavy metal behaviors in plants

研究代表者

中村 進一 (Nakamura, Shin-ichi)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：00322339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：食の安全を脅かす有害重金属元素の一種であるカドミウムの蓄積量が少ない農作物の栽培技術を確立することは喫緊の課題である。これまでの研究で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。この現象に関与する分子メカニズムの解明は新たな栽培技術を確立するためには必須である。本研究によって、根圏に存在するグルタチオンが吸収初期のカドミウム動態に及ぼす影響やこの現象を誘導するには根圏に一定量以上のグルタチオンが存在する必要があることが明らかになった。また、グルタチオンには根のカドミウムの保持力を高める効果があることも確認できた。

研究成果の概要(英文)：Cadmium (Cd), harmful heavy metal element, is one of the factors threatening our food safety. To establish a novel cultivation technique is an urgent issue to reduce Cd accumulation in crop plants. In our previous research, we found that glutathione (GSH), which was applied to plant roots site-specifically, inhibited Cd translocation from roots to shoots selectively and reduced Cd accumulation in shoots. Elucidation of molecular mechanisms, which is activated by GSH, is necessary to establish a novel cultivation technique by applying this phenomenon. In this research, we found GSH has no effects on physical process of Cd absorption in roots and more than a certain amount of GSH in root zone is required to trigger inhibition of Cd translocation from roots to shoots. GSH, applied to roots, increased amount of Cd in the apoplast of their roots.

研究分野：植物栄養学、植物生理学

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

本研究の主な研究対象であるカドミウム(Cd)は食の安全性を脅かす有害重金属元素の一つである。近年、コメにおけるカドミウム含量を削減するための対策として、カドミウム吸収に關与するトランスポーターが同定され、カドミウムを吸収しない品種が開発するなどの成果が得られている。その一方、畑作物についてはその対策が遅れている。しかし、今後は様々な畑作物にカドミウム含量の規制値が設けられることが予想されることから、畑作物のカドミウム対策は急務である。そして、生産現場からは、畑作物に蓄積するカドミウムを低減するための即効性がある技術の開発が望まれている。

我々の研究グループでは、植物の根への部位特異的なグルタチオンの施用がアブラナの地上部に蓄積するカドミウムの量を選択的に抑制する現象を見出し、その現象の要因の一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を明らかにした。この現象を実用化に結び付けることができれば、植物には他の必須重金属元素の吸収・移行・蓄積に影響を及ぼすことなく、すなわち作物の生産量に影響を与えることなく、カドミウム含量が低い畑作物(主に葉物(キャベツ、ハクサイなどはアブラナ科植物))を生産することが可能になる。グルタチオンによって制御される植物体内のカドミウムの輸送システムを解明することが、カドミウム低蓄積作物を栽培する技術の実用化に結び付けることができると考え、本研究テーマを提案するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の到達目標は根に与えたグルタチオンが活性化する植物体の地上部へのカドミウムの移行・蓄積を抑制する現象に關して、これまでの研究成果を礎に主に分子レベルでの研究を推進することで、システムとして機能することが推測される分子機構を明らかにすることである。以下に掲げた5つの課題に取り組むことで、新たなカドミウム低蓄積作物の生産技術の確立に向けた技術基盤を確立したいと考えている。

本研究課題で具体的に検討を行ったのは、(1) グルタチオンに反応する根タンパク質の同定、(2) マイクロアレイ法を用いたグルタチオン処理に反応する遺伝子の同定と機能解析、(3) グルタチオン合成能を高めたアラビドプシスの解析、(4) ポジトロンイメージング技術を用いたカドミウム動態の解析、(5) 実用化に向けた実現可能性検証実験の5項目である。

## 3. 研究の方法

研究目的のところに掲げた5つの研究課題を検討するために、次のような実験を行った。

(1) グルタチオンに反応する根タンパク質の同定  
根から抽出したタンパク質を二次元電気泳動法を用いて分離し、グルタチオンに反応するタンパク質の同定を試みた。

(2) マイクロアレイ法を用いたグルタチオン処理に反応する遺伝子の同定と機能解析  
根でグルタチオン処理に反応する遺伝子群をマイクロアレイ解析から選抜し、各部位におけるターゲット遺伝子の機能解析を行った。

(3) グルタチオン合成能を高めたアラビドプシスの解析  
これまでの研究で作出に成功した根におけるグルタチオン合成能を高めた形質転換体(アラビドプシス)のカドミウム蓄積能・グルタチオン動態を評価し、グルタチオン作用機作を明らかにすることを試みた。

(4) ポジトロンイメージング技術を用いたカドミウム動態の解析  
根からのカドミウム排出・形質転換体のカドミウム動態をポジトロンイメージング技術を用いて可視化し、得られた画像データからカドミウム動態の数理解析を行った。

(5) 実用化に向けた実現可能性検証実験  
様々な含硫化合物を植物に施用し、それらの物質がカドミウム動態に及ぼす影響を評価した。また、グルタチオンの施用期間・施用量がカドミウム動態に及ぼす影響の評価も行った。

## 4. 研究成果

(1) グルタチオンに反応する根タンパク質の同定  
根タンパク質を二次元電気泳動法により分離し、その泳動パターンを比較した結果、複数のタンパク質が、グルタチオン処理に反応して、その存在量を変化させていることが明らかになった。

(2) マイクロアレイ法を用いたグルタチオン処理に反応する遺伝子の同定と機能解析  
根においてグルタチオン処理に反応して発現量が変化する遺伝子群をマイクロアレイ解析の結果から明らかにした。発現が変動する遺伝子の解析を行ったところ、同

じょうな機能を持つ遺伝子群を検出することができた。また、植物体内の重金属動態に影響を及ぼすことが予想される輸送体タンパク質をコードする遺伝子がグルタチオン処理に反応して、その発現量を変化させていることも明らかになった。

### (3) グルタチオン合成能を高めたアラビドプシスの解析

これまでの研究で作出に成功した根におけるグルタチオン合成能を高めた形質転換体(アラビドプシス)の各部位におけるカドミウム蓄積量を調べ、根の細胞内で存在量が有意に増加したグルタチオンがカドミウム動態に及ぼす影響を評価した。また、ポジトロンイメージング実験ではアラビドプシスにおけるカドミウム動態を可視化することに成功した。このアラビドプシス形質転換体を利用した実験の結果から、植物の根において、グルタチオンが主に作用している場所を明らかにすることができた。

### (4) ポジトロンイメージング技術を用いたカドミウム動態の解析

カドミウムのポジトロン放出核種である<sup>107</sup>Cdを用いて、供試作物としてはアブラナを使い、グルタチオンがカドミウム動態に及ぼす影響を撮像した。得られた画像データの中でもカドミウム吸収実験の開始1時間の根におけるカドミウム動態に着目し、解析を行った。その結果、コントロール植物とグルタチオン処理植物の根から得られたカドミウムシグナルの経時変化のパターンにはほとんど差は見られなかった(図1)。この実験結果は、根圏に存在するグルタチオンは根へのカドミウムの物理的な吸着にはほとんど影響を及ぼさないことを示している。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にグルタチオンは主に生理学的に機能していることを確認することができた。また、植物根からカドミウムが排出さ

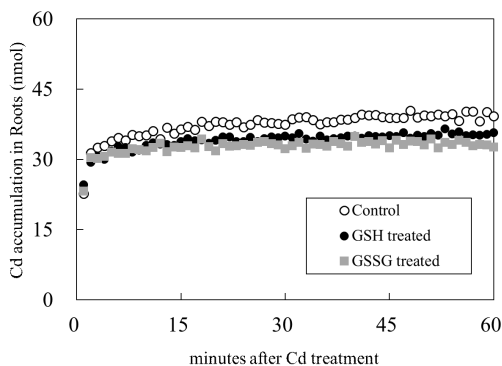


図1 カドミウム吸収開始直後の根へのカドミウムの蓄積

れる様子をこの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。

(5) 実用化に向けた実現可能性検証実験  
硫酸イオン、システイン (Cys)、ジチオトレイトール (DTT) などの含硫化合物を植物に施用して、それらの物質がカドミウム動態に及ぼす影響を評価した。その結果、ジチオトレイトールにはグルタチオンと同程度の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効果が見られた(図2)。

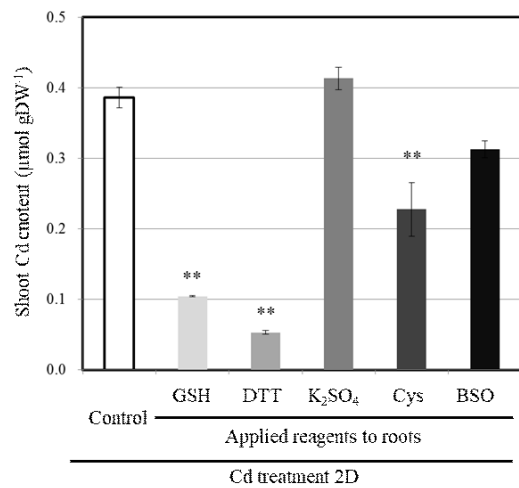


図2 含硫化合物が植物体の地上部へのカドミウムの蓄積に及ぼす影響

しかし、ジチオトレイトールとグルタチオンではカドミウム動態に及ぼす影響が異なっており、ジチオトレイトールはカドミウムの根への吸収を抑制していた。また、ジチオトレイトールは長期間の処理を行うと植物体の生育に悪影響を及ぼすこと

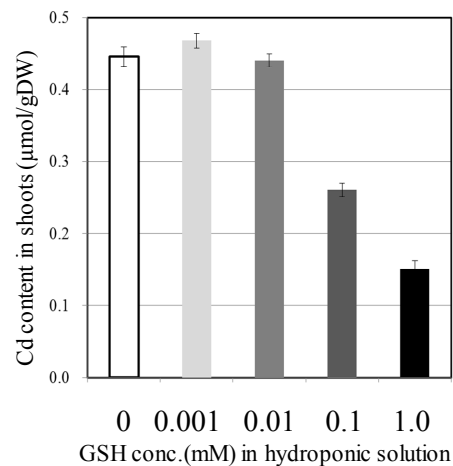


図3 根圏に存在するグルタチオン濃度が植物体の地上部へのカドミウムの蓄積に及ぼす影響

も確認することができた。グルタチオンとジチオトレイトールが植物体内におけるカドミウム動態に及ぼす影響を比較することで、グルタチオンには根におけるカドミウム保持力を高める効果があることが明らかになった。グルタチオンの施用期間がカドミウム動態に及ぼす影響を調べたところ、処理期間が長くなると植物の根に保持されるカドミウムの量がコントロール植物と比べると増加していることが明らかになった。根に施用するグルタチオン量を変える実験では、根圏に存在するグルタチオン量が減少すると植物体の地上へのカドミウムの移行と蓄積を抑制する効果が失われていった(図3)。この実験結果は根圏においてグルタチオンが機能して、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ためには一定量以上のグルタチオンの存在が必要であることを示している。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計3件)

中村進一, グルタチオンを利用して、植物体内の重金属動態を制御する:安全な農作物の栽培方法の確立を目指して, 秋田県立大学ウェブジャーナル A, 査読有, 5, 2018, pp. 79-86

[https://akita-pu.repo.nii.ac.jp/?action=pages\\_view\\_main&active\\_action=repository\\_view\\_main\\_item\\_detail&item\\_id=790&item\\_no=1&page\\_id=13&block\\_id=21](https://akita-pu.repo.nii.ac.jp/?action=pages_view_main&active_action=repository_view_main_item_detail&item_id=790&item_no=1&page_id=13&block_id=21)

Shin-ichi Nakamura, Nobuo Suzui, Sayuri Ito-Tanabata, Satomi Ishii, Naoki Kawachi, Hiroki Rai, Hiroyuki Hattori and Shu Fujimaki, Application of glutathione and dithiothreitol to oil seed rape roots affects cadmium distribution in roots and inhibits Cd translocation to shoots, Soil Science Plant Nutrition, 査読有, 62, 2016, pp. 379-385  
DOI: 10.1080/00380768.2016.1188025

Shin-ichi Nakamura, Hikari Kondo, Nobuo Suzui, Yong-Gen Yin, Satomi Ishii, Naoki Kawachi, Hiroki Rai, Hiroyuki Hattori and Shu Fujimaki, Effects of Glutathione Concentration in the Root Zone and Glutathione Treatment Period on Cadmium Partitioning in Oilseed Rape Plants, Molecular Physiology and Ecophysiology of Sulfur, 査読有, 2015, pp. 253-259

### [学会発表](計12件)

中村進一, 鈴木伸郎, 尹永根, 石井里美, 藤巻秀, 河地有木, 頼泰樹, 松本隆, 伊澤かんな, 山路英一, 大津直子, 根のグルタチオンがシロイヌナズナにおけるカドミ

ウム動態に及ぼす影響, 日本土壤肥料学会 2017年度仙台大会, 平成29年9月5日, 東北大学(宮城県仙台市)

中村進一, 大山将史, 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, 植物根に与えたグルタチオンが植物体内のカドミウム動態に及ぼす影響の評価, 日本土壤肥料学会 2016年度佐賀大会, 平成28年9月20日, 佐賀大学(佐賀県佐賀市)

Shin-ichi Nakamura, Nobuo Suzui, Yong-Gen Yin, Satomi Ishii, Naoki Kawachi, Hiroki Rai, Hiroyuki Hattori, Mitsuo Chino and Shu Fujimaki, Root-applied Glutathione Inhibits Cadmium Translocation from roots to shoots Selectively in Oilseed Rape Plants, The 18th International conference on Heavy Metals in the Environment, 平成28年9月14日, ヘント大学(ベルギー国ヘント市)

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, アブラナの根に与えたグルタチオンが根からのカドミウム排出に及ぼす影響, 第57回日本植物生理学会年会, 平成28年3月20日, 岩手大学(岩手県盛岡市)

中村進一, 鈴木伸郎, 中井雄治, 尹永根, 石井里美, 河地有木, 頼泰樹, 服部浩之, 藤巻秀, グルタチオンが植物体内のカドミウム動態に及ぼす影響の分子メカニズムの解明, 日本土壤肥料学会 2015年度京都大会, 平成27年9月9日, 京都大学(京都府京都市)

Shin-ichi Nakamura, Nobuo Suzui, Yong-Gen Yin, Satomi Ishii, Naoki Kawachi, Hiroki Rai, Hiroyuki Hattori, Mitsuo Chino and Shu Fujimaki, Glutathione, applied to roots site-specifically, inhibits cadmium movement from roots to shoots selectively in oilseed rape plants, The 13th International Conference on the Biochemistry of Trace Elements, 平成27年7月15日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

中村進一, 鈴木伸郎, 長坂俊紀, 尹永根, 石井里美, 河地直木, 頼泰樹, 服部浩之, 藤巻秀, 根圏のグルタチオンは根からのカドミウムの排出を活性化する, 第42回根研究会, 平成27年6月6日, 秋田県立大学(秋田県秋田市)

中村進一, 鈴木伸郎, 尹永根, 石井里美, 河地直木, 頼泰樹, 服部浩之, 藤巻秀, チオール物質がアブラナのカドミウム動態に及ぼす影響, 第56回日本植物生理学会年会, 平成27年3月18日, 東京農業大学

(東京都世田谷区)

中村進一、農学への放射光の利用、東北放射光施設シンポジウム in あきた、平成26年12月17日、秋田大学(秋田県秋田市)

中村進一、近藤ひかり、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、根へのグルタチオンの施用方法が植物体内のカドミウム動態に及ぼす影響、日本土壤肥料学会 2014 年度東京大会、平成26年9月11日、東京農工大学(東京都小金井市)

山路英一、中村進一、鈴木伸郎、尹永根、石井里美、河地有木、藤巻秀、大津直子、グルタチオン合成能を強化した形質転換シロイヌナズナにおけるカドミウム動態、日本土壤肥料学会 2014 年度東京大会、平成26年9月9日、東京農工大学(東京都小金井市)

中村進一、鈴木伸郎、尹永根、石井里美、河地直木、頼泰樹、服部浩之、藤巻秀、ポジトロンイメージング技術を用いたグルタチオンが植物体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、第51回アイソトープ・放射線研究会、平成26年7月7日、東京大学(東京都文京区)

[その他]

ホームページ等

東京農業大学 教員紹介

<http://dbs.nodai.ac.jp/view?l=ja&u=10001098>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中村 進一 (NAKAMURA, Shin-ichi)  
東京農業大学・生命科学部・教授  
研究者番号：00322339

### (2)研究分担者

中井 雄治 (NAKAI, Yuji)  
弘前大学・地域戦略研究所・教授  
研究者番号：10321788

藤巻 秀 (FUJIMAKI, Shu)  
国立研究開発法人放射線医学総合研究所・放射線生物応用研究部・上席研究員(定常)  
研究者番号：20354962  
(平成28年度より連携研究者)

鈴木 伸郎 (SUZUI, Nobuo)  
国立研究開発法人放射線医学総合研究所・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・主幹研究員(定常)  
研究者番号：20391287

頼 泰樹 (RAI, Hiroki)  
秋田県立大学・生物資源科学部・准教授  
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)・准教授  
研究者番号：40513437