

平成22年5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580066

研究課題名（和文）

野生植物由来のアルミニウム高耐性遺伝子群の単離と重金属ストレス耐性等への応用

研究課題名（英文） Isolation of the high Al tolerant genes derived from wild plants and application of these genes to heavy metal tolerance in plant

研究代表者

江崎 文一（EZAKI BUNICHI）

岡山大学・資源生物科学研究所・准教授

研究者番号：90243500

研究成果の概要（和文）：野生植物メリケンカルカヤやススキのアルミニウム（Al）耐性機構について解析した。さらに前者より、Alストレス誘導性遺伝子群の単離を試みた。その内の1つは、ABC transporter遺伝子で、酸化ストレスや重金属処理でも誘導された。一方Alストレスを含む多種のストレスに耐性となる遺伝子の単離も試み、S-adenosyl methionine synthetase遺伝子が得られた。これを導入した酵母形質転換体はAl、Zn、diamideに耐性を示した。現在、これら2つの完全長cDNAが単離された。

研究成果の概要（英文）：The aluminum (Al) tolerant mechanism in the two wild plants, *Andropogon virginicus* L and *Miscanthus sinensis*, were investigated. ABC transporter gene was isolated as an Al inducible genes from *Andropogon*. The gene was also response to oxidative stress and heavy metals. Other *Andropogon* genes which can confer multiple tolerance to various stresses were isolated. One of them was S-adenosyl methionine synthetase gene. Finally, we could isolate full length cDNA encoding these two genes from *Andropogon*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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:野生植物, 多種ストレス耐性機構, 重金属ストレス, Al ストレス, 酸化ストレス, ABC transporter protein, S-adenosyl methionine sythetase (SAMS), 耐性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

地球規模での土壌の酸性化(今や世界の全耕地の30~40%を酸性土壌が占める)によりAlストレスは作物を中心に著しい生育障害を起こす。このため世界農業では、食糧増産のためにもこの問題は早急に解決されなければならない。Alによる生育障害機構や耐性機構については、既に数多く報告されており、研究代表者もこれまでにタバコparB遺伝子などの6つの耐性遺伝子を報告している。

さらにここ数年、野生植物の持つ環境ストレスに対する高い潜在的耐性能力に注目し、特に金属ストレスと酸化ストレスに対する耐性植物の探索を進めてきた。その中でメリケンカルカヤとススキはこれらの環境ストレスに幅広く、しかも高い耐性能を持つことを明らかに注目された。本研究はそのような中で進められた。

2. 研究の目的

野生植物のメリケンカルカヤはAl、重金属、酸化等のストレスに広く耐性を示す。その耐性機構を解明し、他の植物に応用できれば問題土壌への植物作付けが可能となり農業上大変有益である。このような観点から以下の基礎研究を進めた。

本研究の目的は、高いAl耐性能を持つメリケンカルカヤとススキに注目して、遺伝子レベルでこれらのAl耐性機構を明らかにすることにあつた。そのために(1)Alストレス発現誘導性の遺伝子群の単離とその解析、(2)Alストレス耐性遺伝子の単離とそれらの他のストレス、特に重金属ストレス耐性への応用の2つを試みることにした。さらにこれらの単離された遺伝子の耐性機構との関連について解析することも研究目的であつた。

3. 研究の方法

(1) 植物栽培条件とストレス処理条件

メリケンカルカヤやススキの種子は、4℃で7日間低温処理した後にCaCl₂水溶液(pH5.7)中で発芽させた。以後、この溶液での水耕栽培を25℃で16時間の明所、8時間の暗所下で、10~14日間行った。Al

ストレスは、pH 4.2下で行った。

(2) メリケンカルカヤからの金属ストレス誘導性遺伝子の単離はPCRを応用したフィンガープリント法で行った。また、それらの遺伝子の多種のストレスにおける遺伝子発現応答性をリアルタイムPCRで解析した。

(3) プロリン、脂質過酸化物、H₂O₂の定量

広範囲の環境ストレス下で誘導されるプロリンの定量は、Chenらの方法に従った。酸化ストレスで生じる脂質過酸化物の定量は、バルビツール法で測定後マロンジアルデヒド換算を行った。また、H₂O₂の定量はSinghらの方法に従った。

(4) 植物体からの蛋白抽出と二次元電気泳動法
根中の蛋白はTCAとアセトンで抽出し、-20℃下で沈殿させた後、urea・thiourea溶解液に溶かし、二次元電気泳動に供した。電気泳動は1次元目として等電点電気泳動(IEF)、続いて12.5% SDS-PAGEを行った。

(5) 金属ストレス耐性の違いを検討するために植物内の重金属含有量は濃硝酸:濃硫酸=1:1混酸で分解後、原子吸光法で測定した。

(6) 酵母を用いたストレス感受性試験

植物由来の耐性候補遺伝子群は、酵母発現用プラスミドDNA(pYES2)に連結した後に、定法により酵母に導入した。得られた形質転換体をAl、重金属(Ag, Cd, Cu, Cr, Zn)、酸化物(H₂O₂, diamide)を含む寒天プレート上にスポットし、30℃で3~5日間保温し、生育状況を観察した。コロニーの形成具合により、各ストレスに対する感受性を評価した。

(7) NOの発生状況の観察

ストレス応答により生ずるNO量は、NO特異的蛍光指示薬であるDAF-FMで染色した後、その発生部位と生成量を蛍光顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) メリケンカルカヤやススキのAlストレス耐性機構に関する生理学的解析

これまでにAlストレス下では、植物根中に二次的に酸化ストレスを発生させることが知られているので、メリケンカルカヤやススキにおけるそ

の発生状況を脂質過酸化物質と H_2O_2 の定量で検討した。その結果、脂質過酸化物質の生成量は元々低く、Al ストレス下でもその上昇が他の Al 感受性植物に比べて低く抑えられていた。このような上昇の抑制は他の重金属ストレスでも見られた。このことはメリケンカルカヤやススキでは抗酸化ストレス酵素群 (SOD、カタラーゼ、パーオキシダーゼなど) の生成量が多く、このことが酸化ストレスの発生抑制に作用しているという、我々の以前の結果とよく一致した。

重金属ストレスや酸化ストレスでは、生育阻害の現われとしてプロリンの合成量が上昇することが知られているが、Al ストレスではどうかを検討した。その結果、Al 感受性植物 (コントロール植物) では Al ストレスによってプロリン生成量が誘導されたが、両植物とも Al 処理による顕著な増加は認められなかった。このことも両植物が Al 耐性であることとよく一致した。

(2) メリケンカルカヤの金属集積性やストレス特異的な NO (nitric oxide) の生成について

メリケンカルカヤ、ススキは Al や重金属を地上部分に高集積するか否かを検討するために、メリケンカルカヤ、ススキ、イヌビエなどの6種の野生植物に対して Al、Cd、Cu、Zn などの重金属ストレスを根に付与し、植物体内での集積の状況を解析した。その結果、メリケンカルカヤでは Al ストレスで土壌から吸収した毒性 Al を根に過剰蓄積しないように地上部へ輸送することが観察され、耐性となる要因の1つであることが示された。また、地上部に輸送された Al は、葉の表面のトライコームに集積しやすいことも明らかにし、葉の表面から外界へ排出される可能性を示唆した。このような局所的な集積性は、重金属処理では見られず Al でのみ、しかもメリケンカルカヤにおいてしか見られなかった。

Al を含めた金属ストレスや温度ストレス下にあると応答の1つとして NO を生成する植物が報告されている。そこで NO 特異的な DAF-FM を用い、メリケンカルカヤの根での NO の発生状況を検討したところ、根

での発生は他の植物の場合に比べて、低く抑えられていた。また NO の発生阻害剤で予め処理した後に Al 処理してみると、Al 処理にも関わらず NO の発生や酸化ストレスの生成が抑制された。これは、Al ストレス、酸化ストレス、NO 生成の3者間の強い関連性を示しており、NO の生成は毒性機構の現われであると同時に、抗酸化作用を引き起こすことへ繋がる重要な現象であると思われた。

(3) ススキに関するプロテオミクス解析

ススキでも高い Al 耐性を示したことから、当初この植物についても、後述のメリケンカルカヤと同様に Al ストレス誘導性遺伝子や耐性遺伝子の単離などの遺伝子レベルでの解析を進める予定であったが、フェノール性夾雑物の混入が著しく、ついに精製 RNA を単離することができなかった。このため、ススキについては蛋白レベルでのプロテオミクス解析を試みることにした。Al 処理区で得られた蛋白抽出画分を用いて2次元電気泳動を行ったところ、再現良く、ストレス特異的に生成量が変化する蛋白スポット群を確認できた。これに関しては今後も TOF-MAS などの手法を用いて網羅的に解析していく予定である。

(4) Al ストレスや多種のストレスに応答するメリケンカルカヤの遺伝子群の分子遺伝学的解析

メリケンカルカヤより Al ストレスに応答する遺伝子群の単離を試みた。まず、Al 処理を施した植物と未処理植物より RNA を抽出し、finger print 法により、Al ストレス誘導性遺伝子の候補を6クローン得た。塩基配列の結果から、これらのほとんどは未知の遺伝子であったが、1つだけはトウモロコシの ABC transporter 遺伝子と高い相同性があることが示された。また、この遺伝子は根でも地上部でも、Al ストレスで誘導されることが、リアルタイム PCR 法による解析で示された。他のストレスに対する誘導性に関しても検討したところ、diamide (酸化ストレス誘発剤) によって根で誘導されるものの、Cd、Zn、 H_2O_2 に対しては根で逆に発現抑制が見られ、各ストレスに異なる応答を示すことが示された。

現在、この遺伝子の Al ストレスや他のストレスにおける機能を解明するために、メリケンカルカヤから完全長の open reading frame と思われる cDNA を単離した。なお、DNA 配列を決定した結果ではこの ABC transporter は、half type のものであり、通常の full type のものの半分程度の分子量であることが明らかとなった。このことから植物細胞内では 2 量体構造物として機能しているものと思われた。

今後この ABC transporter が、メリケンカルカヤ特異的な地上部への Al 輸送等に関与するか否かについて検討していく予定である。

(5) メリケンカルカヤの示す Al ストレスを含めた多種のストレス耐性機構の解明

メリケンカルカヤは、Al, Zn などの金属ストレスや H₂O₂, diamide などの酸化ストレスに対して耐性を示す。そこでこの多種耐性機構に関連すると考えられる遺伝子群の単離と解析を試みた。まず Al ストレスを付与したメリケンカルカヤから全 RNA を抽出し、逆転写により cDNA を調製し cDNA ライブラリーを構築した。さらにこのライブラリーから Al, Cd, Zn, diamide, H₂O₂ 等に耐性を示すクローンの単離を酵母形質転換体より行った。その結果、其々のストレスに対していくつかのクローンが得られたので、さらにその耐性について再現性を確認した。

Al 耐性遺伝子の選抜に関しては、5 つの候補遺伝子が得られたが、再現よく耐性を示したのは 2 候補

(#3A-4, #5B-2) であった。挿入されていた不完全長 cDNA 断片に関して塩基配列を決定し、その機能の推定を行ったところ、#3A-4 は、SAMS (S-adenosyl methionine synthetase) 遺伝子であることが明らかとなった。一方、#5B-2 は unknown protein であった。さらに SAMS 遺伝子のイネ完全長 cDNA を理研より得て、これを導入した酵母形質転換体についても感受性試験を行った。その結果、この形質転換体も金属ストレス、酸化ストレスに広範囲に耐性を示したことから、SAMS が多種ストレスに対して耐性を付与できることを明らかにした。現在までに、SAMS についても完全長の open reading frame が単離されている。

SAMS は、一般的に生体内ポリアミンの生合成系に関わるだけでなく、植物内では重要なホルモンであるエチレンの合成系にも関与する重要な酵素である。さらにその反応生成物である SAM は、遺伝子発現におけるエピジェネティックな制御方法の 1 つである「DNA のメチル化」に関わる重要な物質でもある。このように SAMS は多種のストレス耐性機構に関わる可能性が高く、今後ともその生理学的機能について解析していく必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Kusumadewi Sri Yulita, Takafumi Kouno, Bunichi Ezaki, A phage display combined with DNA affinity magnetic system can be applied to a screening of DNA binding proteins, such as transcription factors, *Electronic Journal of Biotechnology*, 査読有, 2010, 13, (インターネット上の open journal のため、頁番号がない).
- ② Y. Kim, W. Park, H. Nian, T. Sasaki, B. Ezaki, Y. Jang, G. Chung, H. Bae, S. Ahn, Aluminum tolerance associated with enhancement of plasma membrane H⁺-ATPase in the root apex of soybean, *Soil Science and Plant Nutrition*, 査読有, 2010, 56, pp. 140-149.
- ③ E. Nakahara, H. Kondo, S. Nakashima, B. Ezaki, Role of N-terminal His-rich domain of *Oscillatoria brevis* Bxa1 in both Ag(I)/Cu(I) and Cd(II)/Zn(II) tolerance. *The Open Microbiology Journal*, 2009, 査読有, 3, pp. 15-22.
- ④ S. Tagawa, S. Nakashima, B. Ezaki, Gold induces a metallothionein gene and a CPx-ATPase gene through regulation of a repressor BxmR in *Oscillatoria brevis*. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*. 査読有, 45, 2009, pp. 107-113.
- ⑤ B. Ezaki, H. Kiyohara, H. Matsumoto, S. Nakashima, Over-expression of an auxilin-like gene (F9E10.5) can suppress Al uptake in roots of *Arabidopsis*. 査読有, 58, 2008, pp. 497-506.

⑥ B. Ezaki, E. Nagao, Y. Yamamoto, S. Nakashima, T. Enomoto, Screening of high-tolerant wild plants simultaneously to aluminum, heavy metal stresses and oxidative stresses, and characterization of their unique tolerance mechanisms. *Plant Cell Reports*, 2008, 査読有, 27, pp. 951-961.

[学会発表] (計 9件)

① 高橋憲公、東 藍子、江崎文一、野生植物 *Andropogon virginicus* L. のAlストレスに応答するABC transporter様遺伝子とSAMS遺伝子の解析、日本植物生理学会、2010年3月18日-21日、熊本

② Jayaram K, Ezaki B, Aluminum and heavy metals stimulate nitric oxide (NO) production in *Andropogon virginicus* L., 日本植物生理学会、2010年3月18日-21日、熊本

③河野貴文、江崎文一、多種のストレスに応答するAtGST11 遺伝子の応答に関わる転写調節因子の単離と解析、日本植物生理学会、2010年3月18日-21日、熊本

④田川、中島、江崎、重金属ストレスに対するラ
ン藻 *Oscillatoria brevis* のリプレッサー蛋白
BxmRの機能に関する分子遺伝学的解析、日本植
物生理学会、2009年3月21日~24日、名古屋

⑤高橋、河野、東、中島、江崎、野生植物メリケ
ンカルカヤ (*Andropogon virginicus* L.) の持つ
金属ストレス及び酸化ストレス耐性遺伝子群の単
離と解析、日本植物生理学会、2009年3月21日~
24日、名古屋

⑥河野、Kusumadewi.S.Yulita、中島、江崎、金
属ストレスや酸化ストレス等の多種のストレスに
応答するアラビドプシスのAtGST11 遺伝子の応
答に関わる転写調節因子の単離と解析、日本植
物生理学会、2009年3月21日~24日、名古屋

⑦ 江崎、高橋、Metwally、河野、中木原、東、
榎本、中島、野生植物メリケンカルカヤやススキ
由来の金属ストレスや酸化ストレス耐性機構およ
び応答機構に関する解析、日本肥料学会、2008年
9月9日~13日、名古屋

⑧B. Ezaki Wild plants including *Andropogon virginicus* L and *Miscanthus sinensis* show high tolerance to aluminum heavy metal stresses and oxidative stress by combination of their tolerance mechanism, 2008, October, 19-21th, Banasthali, India

⑨B. Ezaki、Molecular genetic characterization

for tolerant mechanism and response mechanism against Al stress in plants. *Globalization of Human Resources* 2, 2008, November, 20th, Gwanjyu, Korea

[その他]

代表者の所属する研究グループのホームページに研究内容に関する記載がある。

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/sentan/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江崎 文一 (EZAKI BUNICHI)

岡山大学・資源生物科学研究所・准教授

研究者番号：90243500

(2) 研究分担者

初年度(平成19年度)のみ、以下の者を分担者としていた。

中島 進 (NAKASHIMA SUSUMU)

岡山大学・資源生物科学研究所・准教授

研究者番号：60033122

(3) 連携研究者

該当者なし