

## 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24年6月14日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20510089

研究課題名（和文） 重金属汚染土壌の修復を目的とした有用植物資源の活用に関する研究

研究課題名（英文） Application of plant resource for remediation of heavy metal contaminated soil

研究代表者

玉置 雅紀（TAMAOKI MASANORI）

独立行政法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・主任研究員

研究者番号：00311324

研究成果の概要（和文）：

セレン高蓄積性を示す植物 *Stanleya pinnata*（スタンレア・ピナータ）がどのようにこの形質を発現するのかを解析した。その結果、この植物では植物ホルモンであるジャスモン酸やサリチル酸がセレンの無い状態で恒常的に蓄積していること、また、セレン高蓄積性を示さない近縁種である *Stanleya albescens*（スタンレア・アルベセンス）にこれらの植物ホルモンを投与するとセレン耐性・蓄積性が向上することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

The molecular mechanisms responsible for selenium (Se) tolerance and hyperaccumulation were studied in the Se hyperaccumulator *Stanleya (S.) pinnata* by comparing it to the related secondary Se accumulator *Stanleya albescens* using a combination of physiological, structural, genomic and biochemical approaches. The levels of jasmonic acid and salicylic acid were constitutively elevated in *S. pinnata* compared to *S. albescens*, and leaf Se accumulation was slightly enhanced in both species when these hormones were supplied. Thus, defense-related phytohormones may play an important signaling role in the Se hyperaccumulation of *S. pinnata*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	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：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：セレン、ファイトレメディエーション、*Stanleya pinnata*（スタンレア・ピナータ）、ハイパーアキュミレーター、植物ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

セレンは地質年代の石炭紀から第四期に堆積した土壌に含まれ、日本の土壌中には普遍的に見られる天然元素である。土壌中のセ

レンは農業による灌漑により表層水・表層土壌中に濃縮され、これにより農作物、野生生物及びヒトへの被害が報告されている。一方、セレンはヒトを含む多くの生物にとって必

須元素であり、ヒトではその欠乏症状として克山病（心筋症の一種）などが低セレン地域において報告されている。したがって、セレンの毒性を回避し、更にその吸収量を高めた植物を育成することは、高セレン汚染地域では植物による環境浄化（ファイトレメディエーション）に、また低セレン地域ではセレン含量を高めた作物の作出を容易にすることから栄養学的に資する重要な課題である。

セレン元素の化学的性質は硫黄元素と酷似していることから、土壌中のセレンは植物の硫黄吸収に関与する硫黄トランスポーターを介して吸収され、硫黄代謝経路に関与する酵素により代謝・蓄積される。このことから植物に硫黄耐性・高蓄積性を付与する方法としては、①セレンに対する親和性の高い硫黄トランスポーターを植物に組み込む、②硫黄の代謝に関する酵素をコードする遺伝子を植物に組み込み硫黄代謝経路を強化する、の2つの選択肢が考えられる。①については硫黄親和性の高いトランスポーター（*Sultr1;2*）に変異を持つシロイヌナズナがセレン耐性を示すことが報告されている。このトランスポーターをコードする遺伝子を植物に組み込むことによりセレン高蓄積性が期待されるが、一方で植物内のセレン濃度の増加の伴うセレン毒性による植物の生育抑制が懸念される。②については硫黄代謝経路に関与する ATP sulfurylase 遺伝子の過剰発現によりセレン含量を高めた遺伝子組換えカラシナの作出に成功しているが、そのセレン蓄積量は野生型の 2~4 倍にとどまっている。

一方でセレン含量の高い土壌に生育する植物の中には土壌濃度よりもはるかに高い濃度でセレンを蓄積する種が知られている。例えばアメリカに自生する *Stanleya pinnata*（スタンレア・ピナータ）は土壌中のセレンを乾重量の 0.1% まで蓄積することが知られている。しかしながらこのような植物は生育が遅くファイトレメディエーションには不向きである。またこれらの植物ではどのようなメカニズムでセレン耐性・高蓄積性になっているのかについては全く知見がないためこれらの植物の特徴を生かした分子育種は今のところ出来ないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究ではセレン耐性・高蓄積性の性質を付与した遺伝子組換え植物の開発を最終的な目的とする。具体的な内容は北米に自生しセレン耐性・高蓄積性を示すスタンレア・ピナータというアブラナ科の植物におけるセレン耐性・高蓄積性のメカニズムを解明しその成果をセレン耐性・高蓄積性植物の分子育種に応用する。この研究目標の達成のため、以下の研究を行う。

(1) セレン耐性・高蓄積性スタンレア・ピナータとの比較対象となる植物種を決定し、セレン耐性・高蓄積性作用のメカニズムを解明するための材料の確立を行う。

(2) スタンレア・ピナータにおけるセレン耐性・高蓄積性の獲得にどのような遺伝子が関与しているのかについて解明する。

(3) スタンレア・ピナータにおけるセレン耐性・高蓄積性の獲得に関してどのような生体物質（植物ホルモンなど）が関与しているのかについて解明する。

(4) スタンレア・ピナータにおけるセレン耐性・高蓄積性に必要な因子（遺伝子）を他の植物に適用することにより対象植物がセレン耐性・高蓄積性を獲得出来るかどうかについて検証する。

## 3. 研究の方法

(1) セレン高蓄積性スタンレア・ピナータとの比較対象となる植物材料の確立を行うため、セレンを高蓄積するコロラド州原産のスタンレア・ピナータ、セレン吸収性が調べられていないカリフォルニア州原産のスタンレア・ピナータ及びその近縁野生種である *Stanleya albescens*（スタンレア・アルベセンス）のセレン耐性・蓄積性について検証を行った。これらの植物を 20  $\mu$ M のセレン酸を添加しながら 16 週間栽培し、葉におけるセレン蓄積量及び葉のセレン障害について調べた。

(2) スタンレア・ピナータにおけるセレン耐性・高蓄積性の獲得に必要な因子を遺伝子レベルで特定するため、モデル植物であるシロイヌナズナの硫黄代謝・トランスポートに関与する遺伝子、植物の防御応答に関与する遺伝子及び植物ホルモンの合成・応答に関与する遺伝子の cDNA を網羅的に載せたカスタムマイクロアレイを作製し、これを用いて、セレンの有無によるスタンレア・ピナータ及びスタンレア・アルベセンスの遺伝子発現解析を行った。この解析に先立ちシロイヌナズナの遺伝子から構成される DNA アレイがスタンレア・ピナータでも利用可能かを検証するために 26 種類のオルソログ遺伝子の塩基配列をスタンレア・ピナータ、スタンレア・アルベセンス、およびシロイヌナズナで比較した。

(3) 遺伝子発現解析によりスタンレア・ピナータにおけるセレン耐性・高蓄積性の獲得に植物ホルモンが関与している可能性が示唆された。そこで、セレン投与の有無によるジャスモン酸、サリチル酸及びエチレンの蓄積について調べた。植物を 20  $\mu$ M のセレン酸を添加しながら 10 週間栽培し、葉におけるジャスモン酸、メチルジャスモン酸及びサリチル酸の蓄積量を測定した。また、比較的新し

い葉を用いてエチレンの生成量を測定した。(4)これらの植物ホルモンをスタンレア・アルベセンスに投与することによりセレン耐性・蓄積性が向上するののかについて検証を行った。

#### 4. 研究成果

(1)セレンを高蓄積するコロラド州原産のスタンレア・ピナータ、カリフォルニア州原産のスタンレア・ピナータ及びその近縁野生種であるスタンレア・アルベセンスを  $20 \mu\text{M}$  のセレン酸を加えて 16 週間水耕栽培を行い、ICP-AES により植物に取り込まれたセレン含量を経時的に測定した。その結果、コロラド州原産のスタンレア・ピナータでは約 2500ppm のセレンの蓄積が見られたのに対して、カリフォルニア州のスタンレア・ピナータでは 500ppm、スタンレア・アルベセンスでは 125ppm のセレンが蓄積していた。またセレン酸を投与して育てたスタンレア・アルベセンスの葉の周縁部には可視的な障害が観察されたが、スタンレア・ピナータではそのような障害は現れなかった (図 1)。以上の結果からコロラド州原産のスタンレア・ピナータをセレン高蓄積性サンプルとして、スタンレア・アルベセンスをその対象として用いれば良いことが明らかになった。

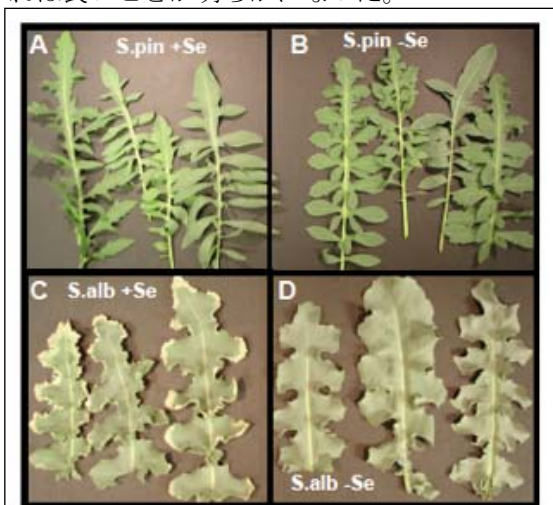


図 1 セレン酸投与による葉の可視障害  
播種後 16 週目のスタンレア・ピナータ (A はセレン投与、B はセレン無し) とスタンレア・アルベセンス (C はセレン投与、D はセレン無し) の葉

(2) シロイヌナズナの DNA アレイがこの植物で使用可能かどうかについて検証を行うため、シロイヌナズナにコードされている 30 種類の遺伝子をランダムに抽出し、スタンレア・アルベセンスの全 RNA を用いて RT-PCR 及び塩基配列の決定を行った。その結果、30 組のプライマーのうち 26 組でバンドが得られ、その塩基配列は平均でシロイヌナズナの遺伝子と 80% の同一性があることが確認され

た。そこでシロイヌナズナの防御応答、硫黄代謝及び植物ホルモンの合成・応答に関与する遺伝子等を載せたカスタムマイクロアレイ (約 400 遺伝子から構成される) を作製した。この DNA アレイを用いて、スタンレア・ピナータ及びスタンレア・アルベセンスから単離した mRNA を用いて、これらの植物間におけるセレンの有無による遺伝子発現パターンに違いがあるのかどうかについて調べた。その結果、スタンレア・ピナータにおいて植物の防御応答、硫黄代謝及び植物ホルモンの合成・応答に関与する遺伝子の発現が構成的に高いことが示された。

(3) 遺伝子発現パターンからスタンレア・ピナータにおけるセレン耐性・高蓄積性の獲得に植物ホルモンが関与している可能性が示唆された。そこで植物ホルモン生成について調べた結果、スタンレア・ピナータではセレンを投与しない条件下でジャスモン酸、メチルジャスモン酸及びサリチル酸の含有量が高いこと、またこれらの含有量はセレン投与により低下することを見出した (図 2)。

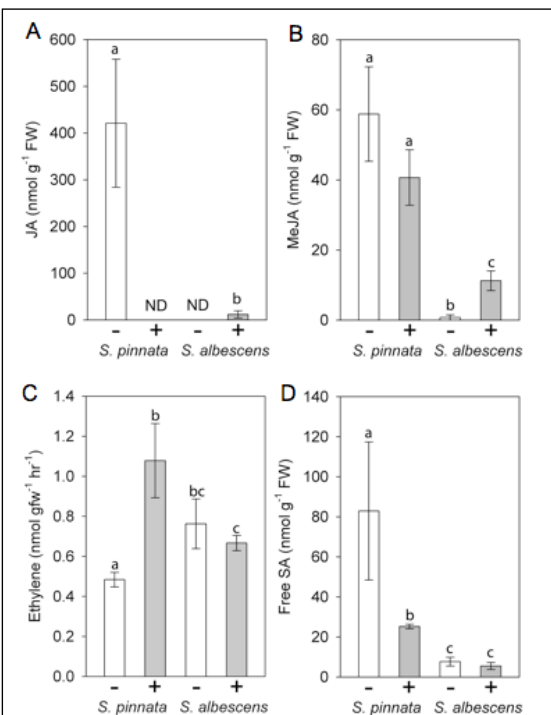


図 2 セレンによる植物ホルモンの蓄積

$20 \mu\text{M}$  のセレン添加 (+) 及び無添加 (-) 条件下で育てた植物における (A) ジャスモン酸、(B) ジャスモン酸メチル、(C) エチレン、及び (D) サリチル酸の蓄積量。棒グラフのバーは標準偏差を表す。また、異なるアルファベットは  $P < 0.05$  の水準で有意差が有ることを示す。ND: 検出限界以下

一方、スタンレア・アルベセンスにおいては、これらの植物ホルモン含量はセレン投与により増加 (ジャスモン酸及びメチルジャスモ

ン酸)、又は変化しない(サリチル酸)ことが明らかになった。また、エチレン生成量はスタンレア・ピナータにおいてセレン投与により増加したが、スタンレア・アルベセンスではこのような増加は見られなかった。

(4) スタンレア・ピナータにおけるセレン耐性・高蓄積性の獲得に植物ホルモンであるジャスモン酸やサリチル酸が関与していることが示唆された。そこでこれらの植物ホルモンをスタンレア・アルベセンスに投与したときにセレン高蓄積性が付与されるのかどうかについて検証を行った。スタンレア・アルベセンスに濃度勾配を与えてジャスモン酸メチル (0, 5, 10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) またはエチレンの前駆体である 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (0, 5, 10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) をセレンと共に投与して栽培した。その結果、スタンレア・アルベセンスのセレン耐性及びセレン蓄積性はそれぞれ 10  $\mu\text{M}$  までの植物ホルモン投与により濃度依存的に増加した。一方、これらの物質の投与によるスタンレア・ピナータにおけるセレン耐性・高蓄積性に変化は見られなかった。また、50  $\mu\text{M}$  以上の植物ホルモンの投与ではスタンレア・アルベセンスのセレン耐性及びセレン蓄積性に変化はみられなかった。以上の結果、スタンレア・ピナータにおける植物ホルモンの構成的な合成・蓄積がセレン耐性・高蓄積性の獲得に必要であることが示された(図3)。

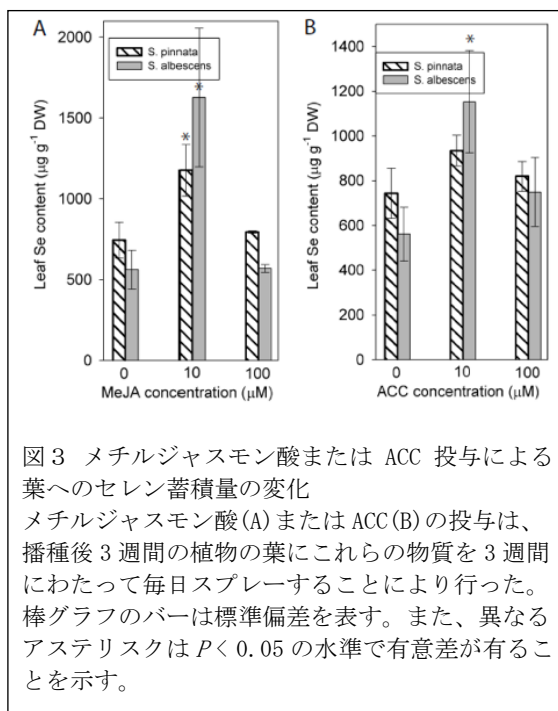


図3 メチルジャスモン酸または ACC 投与による葉へのセレン蓄積量の変化  
メチルジャスモン酸(A)または ACC(B)の投与は、播種後3週間の植物の葉にこれらの物質を3週間にわたって毎日スプレーすることにより行った。棒グラフのバーは標準偏差を表す。また、異なるアステリスクは  $P < 0.05$  の水準で有意差が有ることを示す。

以上のことからスタンレア・ピナータにおけるセレン耐性・高蓄積性の獲得に植物ホルモンが大きく関与していることが示唆された。

## 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18件)

- ① Freeman J.L., Tamaoki M., Stushnoff C., Quinn C.F., Cappa J.J., Devonshire J., Fakra S.C., Marcus M.A., McGrath S.P., Van Hoewyk D., Pilon-Smits E.A.H., Molecular mechanisms of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*. *Plant Physiol.*, 153, 1630-1652, 2010, 査読有, <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.156570>
- ② Van Hoewyk D., Takahashi H., Inoue E., Hess A., Tamaoki M., Pilon-Smits E.A.H., Transcriptome analysis gives insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.*, 132, 236-253, 2008, 査読有, DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.01002.x
- ③ Tamaoki M., Freeman, J.L., Marquès, L., Pilon-Smits, E.A.H., New insights into the roles of ethylene and jasmonic acid in the acquisition of selenium resistance in plants. *Plant Signal. Behav.*, 3, 865-867, 2008, 査読有, <http://dx.doi.org/10.4161/psb.3.10.6050>
- ④ Tamaoki M., Freeman J.L., Pilon-Smits E.A.H., Cooperative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenite resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 146, 1219-1230, 2008, 査読有, <http://dx.doi.org/10.1104/pp.107.110742>

[学会発表] (計42件)

- ① 野田祐作, 玉置雅紀, 中嶋信美, 塚原啓太, シロイヌナズナを用いた QTL 解析によるセレン耐性遺伝子の同定, 第 52 回日本植物生理学会年会, 2011 年 3 月 22 日, 仙台
- ② 野田祐作, 玉置雅紀, 中嶋信美, シロイヌナズナ RIL を用いた QTL 解析によるセレン耐性遺伝子の同定, 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010 年 3 月 18 日, 熊本
- ③ Tamaoki M., Freeman J.L., Pilon-Smits E.A.H., Jasmonic acid and ethylene regulate selenite resistance in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Neurobiology* 2008, 2008 年 9 月 19 日, Fukuoka
- ④ Tamaoki M., Freeman J.L., Noda Y., Pilon-Smits E.A.H., Jasmonic acid and ethylene regulate selenite resistance in *Arabidopsis thaliana*, *International Phytotechnologies Conference* 2009, 2009 年 12 月 4 日, St. Louis

⑤ 玉置雅紀, Freeman J.L., Pilon-Smits E. A.H., 植物はジャスモン酸, エチレンジグナルの協調的な働きによりセレン耐性・高蓄積性を獲得する. 第 49 回日本植物生理学会年会, 2008 年 3 月 21 日, 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉置 雅紀 (TAMAOKI MASANORI)

独立行政法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・主任研究員

研究者番号: 00311324

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし