

## 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：21401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780007

研究課題名（和文） イネにおけるカドミウム蓄積機構の分子遺伝学的解析

研究課題名（英文） Molecular genetic analysis of cadmium accumulation in rice

研究代表者 永澤 奈美子（NAGASAWA NAMIKO）

秋田県立大学 生物資源科学部生物生産科学科・助教

研究者番号：00535289

研究成果の概要（和文）：本研究では、土壤中から吸収したカドミウム(Cd)の多くを地上部に移行させるイネ品種、長香穀の表現型の原因遺伝子が *Oryza sativa* heavy-metal-transporting P-type ATPase (HMA) 3 (*OsHMA3*) 遺伝子であることを明らかにした。また、*OsHMA3* 遺伝子のホモログである *OsHMA2* 遺伝子が Cd 及び亜鉛の地上部への移行を促進していることを示した。さらに、イネにおけるカドミウム蓄積に関係する未知の遺伝子の同定を試みて突然変異体のスクリーニングを行い、カドミウムへの反応性が野生型と異なる突然変異体を単離した。

研究成果の概要（英文）：This research revealed how cadmium is transported from root to shoot in cadmium hyper-accumulating rice cultivar, Cho-Ko-Koku. The main gene in the mechanism was *OsHMA3*. *OsHMA2*, a homolog of *OsHMA3*, also functions in the pathway of cadmium transport in rice. In addition, the genetic screen was conducted in this research and several mutants were isolated.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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：農学・育種学

キーワード：植物育種・遺伝、イネ、突然変異体、カドミウム

## 1. 研究開始当初の背景

カドミウム (Cd) は、人が摂取すると体内に蓄積され続け腎臓障害や骨の脆弱化の原因となる重金属である。Cdに汚染された土壌で栽培された作物には、Cdが高濃度に集積す

るため、Cd汚染対策が我が国における重要な課題となっている。植物にCdが集積する際には、Cdの可溶化、根からの吸収、地上部への移行、地上部での重金属の蓄積といった過程を経る。この蓄積過程には、細胞レベルで

の膜輸送や解毒なども関わっていると考えられる。したがって、これらの過程を経る Cd の蓄積には、複数の遺伝子が関与しており、これらの遺伝子の機能解析を行うことが植物への Cd 蓄積メカニズムの解明につながると考えられた。植物への Cd 蓄積メカニズムが解明できれば、植物を用いた土壌浄化や Cd を蓄積しない農作物の創出に役立つ。

この研究開始当初は、Cd 蓄積に関しては、主に Cd 高蓄積植物及びシロイヌナズナにおいて遺伝子の研究が行われていた。一方、単子葉植物では、Cd 蓄積に関連する遺伝子の機能解析の報告はほとんどなされていなかった。また、高 Cd 条件下で生育させた場合、シロイヌナズナでは Cd を地上部に多く移行させるが、イネでは地下部に多く蓄積する、という知見も得られており、シロイヌナズナとイネでは、Cd 蓄積に関して異なる機構が存在すると考えられた。したがって、本研究でイネを材料として Cd 蓄積に関する解析を行う意義は大きいと考えた。

また、研究代表者はこの研究開始以前にはイネ及びトウモロコシの形態形成について、突然変異体を用いた遺伝学的研究を行ってきた。秋田県立大学へ赴任し、Cd 汚染土壌の問題を知り、これまで応募者が学んできた手法や考え方を、Cd 蓄積機構の解明に役立てることができるのではないかと考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、イネにおける Cd 蓄積機構を包括的に解明することを目指した。

(1) 長香穀は、高 Cd 条件下で生育させると地上部に Cd を蓄積する。このユニークな Cd 蓄積機構の原因遺伝子の解析や詳細な Cd 蓄積の特性調査により、イネにおける Cd 蓄積機構について新たな知見を得ることを目指す。

(2) シロイヌナズナの Cd 蓄積に関わる遺伝子 *AtHMA2*~*4* のイネにおけるホモログ (*OsHMA2*) の機能を解析することで、イネとシロイヌナズナの Cd 蓄積機構の違いについて考察する。

(3) 長香穀及び Cd を地下部に蓄積する日本型イネ (台中 65 号 (T65)) の変異源処理集団を用いて、突然変異体のスクリーニングを行い、イネにおける Cd 蓄積に関連する未知の遺伝子の単離及び解析を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) 長香穀の Cd 蓄積特性の原因遺伝子の確

定及び発現解析

①本研究開始時までに、秋田県立大学遺伝・育種学研究室では、長香穀の Cd 特性の原因遺伝子の QTL 解析がなされており、候補遺伝子が数個に絞り込まれていた。本研究では、ポジショナルクローニング法を用いて、その解析を継続し、原因遺伝子の確定を行った。

②RT-PCR 法による発現解析、酵母での相補性検定及び酵母やタマネギ細胞内でのタンパク局在の調査を行い、遺伝子の分子生物学的機能を明らかにした。

③確定した原因遺伝子の野生型遺伝子を形質転換することによって長香穀の表現型が相補されるかどうか、また、原因遺伝子の発現を RNAi によって抑制することで長香穀の表現型を再現できるかを調査することで、ポジショナルクローニングの結果が正しいことを証明した。

(2) *OsHMA2* 遺伝子の解析

①Tos17 集団や T-DNA tag line からのノックアウト系統を探索した。

②ノックアウト系統における Cd 吸収特性を調査した。

③RT-PCR 法による発現解析や、酵母での相補性検定やタマネギ細胞内でのタンパク局在の調査を行い、遺伝子の分子生物学的機能を明らかにした。

(3) 新たな突然変異体のスクリーニング

①T65 の変異源処理済み  $M_3$  約 1600 系統を、野生型の植物体の草丈が約半分になる Cd 濃度の水耕液をもちいて栽培し、野生型と Cd への反応性が異なる突然変異系統を探索した。

②長香穀の変異源処理済み  $M_2$  約 1000 系統を、未処理の長香穀の植物体の草丈が約半分になる Cd 濃度の水耕液をもちいて栽培し、未処理の長香穀と Cd への反応性が異なる突然変異系統を探索した。

## 4. 研究成果

(1) 長香穀の Cd 蓄積特性の原因遺伝子の確定及び発現解析

①本研究で用いた、高 Cd 条件下で生育させると、Cd を地上部に蓄積するというユニークな表現型を示す長香穀の表現型の原因は、*OsHMA3* 遺伝子と呼ばれる遺伝子に存在する変異であることが、ポジショナルクローニングの結果から明らかになった。

②RT-PCR の結果より、*OsHMA3* 遺伝子は、主にイネの地下部で発現していることがわか

った。また、酵母において Cd を液胞内に取り込むタンパクが変異した変異体を用いて、相補性実験をおこなったところ、野生型の *OsHMA3* 遺伝子は酵母の変異遺伝子の機能を相補した。さらに、タマネギの細胞内及び酵母で、*OsHMA3* タンパクは液胞膜に局在した。これらのことから、*OsHMA3* タンパクは、イネ地下部の細胞の液胞膜に局在し、Cd を液胞内に取り込み蓄積する働きを持つと推察された。

③野生型の *OsHMA3* 遺伝子を長香穀に形質転換したところ、地上部への Cd 移行率が低下した。また、*OsHMA3* の RNAi 系統で長香穀と同様 Cd が地上部に多く移行した (図 1) ことから、*OsHMA3* が長香穀の表現型の原因遺伝子であることが確認された。*OsHMA3* 遺伝子の RNAi 系統を詳細に解析した結果、*OsHMA3* 遺伝子が亜鉛を輸送する機能も持つことが明らかになった。ただし、その機能は、カドミウムの存在下のみで発現する。

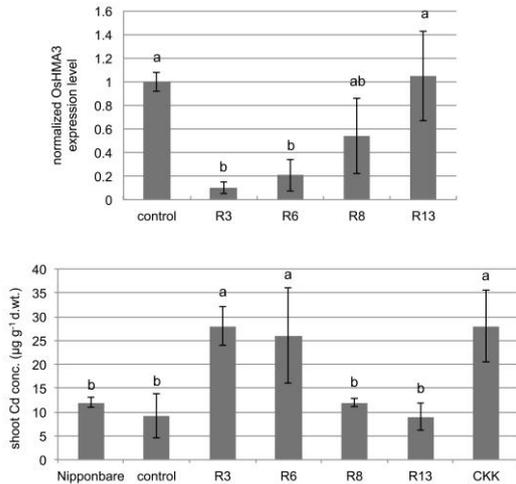


図 1 *OsHMA3* の RNAi 系統 (R3、R6、R8、R13) における *OsHMA3* の発現量と地上部 Cd 濃度 (チューキー法による検定結果から、異なるアルファベットが付してある場合は互いに 5%水準で有意に差があることを示す)

## (2) *OsHMA2* 遺伝子の解析

① *OsHMA2* のノックアウト系統では、Cd および亜鉛 (Zn) の地上部への移行率が顕著に低下していた (図 2)。ノックアウト系統には遺伝子の機能が中程度壊れたもの (図 2 の 2 及び 3) も含まれ、これらの系統では、Cd は完全なノックアウト系統 (図 2 の 1) と同程度に移行しないが、Zn は生育に十分な量移行しており、植物体は正常に生育した。これらの系統は玄米に Cd を含まないイネを作出する際の有用な交配母本の一つとなると考えられた。

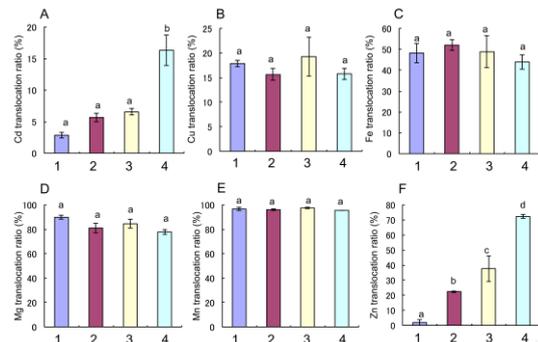


図 2 *OsHMA2* のノックアウト系統 (1、2、3) の Cd (A)、銅 (B)、鉄 (C)、マグネシウム (D)、マンガン (E) 及び Zn (F) の移行率 (4 は日本晴) (チューキー法による検定結果から、異なるアルファベットが付してある場合は互いに 5%水準で有意に差があることを示す)

② *OsHMA2* 遺伝子は特に根で強く発現していた。また、*OsHMA2* 遺伝子を Cd 及び Zn 耐性の低い酵母内で発現させたところ、それらの耐性を向上させた。タマネギの上皮細胞で *OsHMA2* タンパクが細胞膜上に局在する (図 3) ことも合わせ、*OsHMA2* 遺伝子に関連する解析を総合すると、*OsHMA2* は根の導管と他の細胞の間に位置し、根で吸収した Cd および Zn を導管へ送り込み、地上部への移行を促進しているトランスポーターであると推察された。

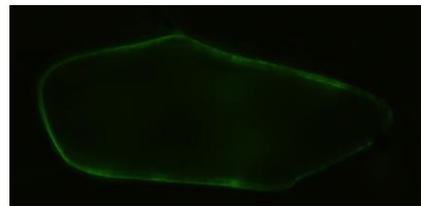


図 3 *OsHMA2*-GFP 融合タンパクの局在

## (3) 新たな突然変異体のスクリーニング

① T65 の変異源処理済み  $M_3$  約 1600 系統を用いたスクリーニングでは、Cd に対する反応性に変化が起きた系統が 1 系統同定され、Cd への反応性の喪失が見られた。この *stinky* 突然変異体はカドミウムに対する反応性を失っているだけでなく、葉の伸長や分けつ芽の形成にも異常が見られた。変異体内のカドミウム分布は野生型と違いがなかった。現在までの解析からは、イネがカドミウムに反応する際の矮化に *STINKY* 遺伝子が関与しているのではないかと考えている。

② 長香穀の変異源処理済み  $M_2$  約 1000 系統を用いたスクリーニングは、1 次スクリーニングが終了しており、Cd 感受性系統が約 15 系統、Cd 非感受性系統が約 20 系統得られた。今後 2 次スクリーニングを進める予定である。

(4) まとめ

以上、(1)、(2)はイネにおける Cd トランスポーター研究の先駆けとして、解析結果をまとめた論文が国際誌に掲載された。(3)では、(1)及び(2)では明らかにならなかった新規遺伝子の同定がなされたと考えられ、解析結果がまとめられれば(1)及び(2)の結果と同様、一定のインパクトを持ったものとなると考えられる。

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3件)

- 1) Satoh-Nagasawa N., Mori M., Nakazawa N., Kawamoto T., Nagato Y., Sakurai K., Takahashi H., Watanabe A., Akagi H. Mutations in rice (*Oryza sativa*) heavy metal ATPase 2 (*OsHMA2*) restrict the translocation of Zn and Cd. *Plant Cell Physiol.* 53: 213-224 (2012). 査読あり.
- 2) Miyadate, H., Adachi, S., Hiraizumi, A., Tezuka, K., Nakazawa, N., Kawamoto, T., Katou, K., Kodama, I., Sakurai, K., Takahashi, H., Satoh-Nagasawa, N., Watanabe, A., Fujimura, T., Akagi, H., OsHMA3, a P<sub>1B</sub>-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles, *New Phytologist*, 189:190 - 199 (2011). 査読あり.
- 3) Tezuka, K., Miyadate, H., Katou, K., Kodama, I., Matsumoto, S., Kawamoto, T., Masaki, S., Satoh, H., Yamaguchi, M., Sakurai, K., Takahashi, H., Satoh-Nagasawa, N., Watanabe, A., Fujimura, T., Akagi, H., A single recessive gene controls cadmium translocation in the cadmium hyperaccumulating rice cultivar Cho-Ko-Koku, *Theoretical and Applied Genetics*, 120:1175 - 1182 (2010), DOI 10.1007/s00122-009-1244-6. 査読あり.

[学会発表] (計6件)

- 1) Satoh-Nagasawa N., Mori M., Nakazawa N., Kawamoto T., Nagato Y., Sakurai K., Takahashi H., Watanabe A., Akagi H. *OsHMA2* mutants are blocked in Zn and Cd transport、第53回日本植物生理学会年会、2012. 3. 16、京都産業大学
- 2) 佐藤(永澤) 奈美子・森美果子・川本朋彦・長戸康郎・櫻井健二・高橋秀和・渡辺明夫・赤木宏守 レトロトランスポ

ン *Tos17* 挿入系統を用いたイネ *OsHMA2* 遺伝子の機能解析 日本育種学会、2011. 9. 23、福井県立大学

- 3) 森美果子・宮舘秀典・川本朋彦・櫻井健二・高橋秀和・渡辺明夫・佐藤(永澤) 奈美子・赤木宏守、イネのカドミウム移行における P<sub>1B</sub>-type heavy-metal ATPase の機能の解析、日本育種学会、2010. 9. 24、秋田県立大学
- 4) 平泉彩・安達早希・宮舘秀典・手塚耕一・佐藤奈美子・渡辺明夫・櫻井健二・高橋秀和・川本朋彦・加藤和直・小玉郁子・眞崎聡・赤木宏守、カドミウム高蓄積性イネ‘長香穀’における地上部へのカドミウム移行機構、日本育種学会、2010. 3. 27、京都大学
- 5) 宮舘秀典・手塚耕一・安達早紀・平泉彩・佐藤奈美子・渡辺昭夫・櫻井健二・高橋秀和・川本朋彦・加藤和直・小玉郁子・眞崎聡・赤木宏守、イネのカドミウム移行を高める遺伝子 qCdT7 の単離、日本育種学会、2009. 9. 25、北海道大学
- 6) 手塚耕一・宮舘秀典・佐藤奈美子・渡辺明夫・櫻井健二・高橋秀和・川本朋彦・加藤和直・小玉郁子・眞崎聡・佐藤秀樹・山口誠之・赤木宏守、カドミウム高吸収性イネ‘長香穀’のカドミウム蓄積性に関する QTL、日本育種学会、2009. 9. 25、北海道大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.akita-pu.ac.jp/stic/souran/scholar/detail.php?id=224>

<http://www.akita-pu.ac.jp/stic/souran/study/detail.php?id=233>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永澤 奈美子 (NAGASAWA NAMIKO)

秋田県立大学・生物資源科学部生物生産科学科・助教

研究者番号：00535289

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：