

令和元年6月24日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07260

研究課題名(和文) イネ属におけるカドミウム耐性の多様性とカドミウム耐性機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the molecular mechanism of cadmium tolerance in wild rice

研究代表者

赤木 宏守 (Akagi, Hiromori)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：50315587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：イネ属植物はカドミウム(Cd)耐性において多様性を示すことを明らかにし、野生種の*O. barthii*と*O. latifolia*で高いCd耐性を示す系統を見出した。これら系統の網羅的な発現解析から、*O. barthii*ではCdやCdを介して発生する有害物質の解毒によってCd存在下でも生長できる可能性が、また、*O. latifolia*では細胞壁がCd耐性に寄与している可能性が示唆された。今後、形質転換植物による解析によりイネのCd耐性機構の解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有害重金属であるカドミウム(Cd)が土壌に蓄積しており、その対策としてCdを除去する植物の育成が求められている。本研究は、イネの野生種においてCd耐性に特徴ある複数の系統を見出した点、また、それらのCd耐性の仕組みを解明する足掛かりを得た点で学術的に意義がある。さらに、本研究で見出したCd耐性の野生種、そのCd耐性に関わる遺伝子は、Cd耐性の植物の開発につながり、Cd汚染土壌の浄化への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Lines of the *Oryza* genus - including the 94 wild and 41 cultivated lines - vary widely in their tolerance for cadmium (Cd). Several lines of *O. barthii* and *O. latifolia* show relatively high Cd tolerance. Expression profiles suggest that enhancing various detoxification systems in *O. barthii* lines may enable growth under Cd stress. Furthermore, transcripts encoding two types of cell wall proteins are expressed specifically in the Cd tolerant line of *O. latifolia*, suggesting that the first cell wall barrier may play a role in Cd tolerance.

研究分野：農学

キーワード：イネ 野生種 カドミウム

1. 研究開始当初の背景

カドミウム (Cd) は長年に渡って鉱山から排出され、Cd が集積している土壌が全国各地に点在している。土壌中の Cd は植物によって吸収され、農作物を介して人に健康被害を引き起こす。この問題に対処するためには植物と Cd との関係解明が不可欠である。

近年、植物において Cd の吸収や移行に関わる膜輸送体が同定され、イネにおいても Cd を蓄積する過程が分子レベルで明らかになりつつある。一方で、Cd は植物にも有害で、過剰に吸収した Cd を細胞外へ排出、液胞へ隔離、キレート化など様々な方法で無害化すると考えられているが、イネが過剰な Cd に対してどのような対応をしているのかは明らかではない。

この仕組みを解明するためには、Cd への適応性で特徴ある新たな素材の発見が鍵となる。イネ属の野生種は、栽培化や品種改良によって栽培種では失われた遺伝的多様性を保持しており、将来のイネ改良の重要な遺伝資源として注目されている。野生種は世界各地の熱帯から亜熱帯に広く分布し、それぞれの地域の環境に適応して自生しており、その中に特徴的な Cd への適応性を示すものが存在すると期待される。しかしながら、イネ属の植物が Cd に対してどのような反応や適応を示すかは知られていない。

本研究によって、イネ属の Cd への適応における多様性が明らかにされ、Cd 耐性の高い系統が選抜されることで、イネの Cd 耐性機構の解明につながると期待される。また、品種改良の遺伝資源としての活用により、将来的には、生長抑制を殆ど受けることなく高濃度で Cd を蓄積できるイネの開発につながり、Cd 問題の解決への貢献が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、イネ属の野生種の Cd に対する適応性、特に、Cd 耐性における多様性を明らかにするとともに、Cd 耐性で特徴的な系統を選抜することを目的とする。さらに、選抜した野生種の系統を活用して Cd 耐性に関与する遺伝子を明らかにし、イネの Cd 耐性機構解明の足掛かりを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 水耕栽培と Cd 処理

イネ属の野生種 16 種 94 系統と栽培種 2 種 41 系統を用い、1/2 木村氏 B 液 (pH5.6) で 14 日間育苗した後、CdCl₂ (0 または 0.5ppm) を含む水耕液で 10 日間栽培した。なお、水耕液は 2 日に 1 回交換し、人工気象器 (BIOTRON LPH200、日本医科機器製作所) を用い、明期 14 時間で 27℃、暗期 10 時間で 25℃、湿度 70% の条件で栽培を行なった。

(2) Cd 耐性の評価

Cd による生長抑制率を式 (1) で求めた。また、植物体の Cd 濃度は、ICP 発光分光分析装置 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて定量し、Cd 耐性を評価した。

式 (1) : 生長抑制率 (%) =
$$100 \times (0.5\text{ppmCd 処理の草丈の増加率} - 0\text{ppmCd 処理の草丈の増加率}) \times 100$$

(3) RNAseq 解析

O. barthii (W0652 と W0720) と *O. latifolia* (W0048 と W1166) を水耕栽培し、Cd 処理 48 時間後に植物体を収穫し、地上部と地下部から TORISOAL 試薬 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて全 RNA を抽出した。抽出した RNA からライブラリを作製し、HiSeq 1000 (Illumina 社) で両側から 100 bp ずつ RNA の塩基配列 (リード) を解読した。

O. barthii については、Ensemble Plants からリファレンス配列情報とアノテーション情報を取得し、リファレンス配列情報に対して TopHat でリードをアライメントした。次に、Cufflinks でアノテーション情報に基づき、遺伝子ごとのリード数情報を取得し、DESeq を用いて Cd 処理間で有意に発現量が異なるトランスクリプトを抽出した。

リファレンス配列のない *O. latifolia* については、FASTX-Tool kit を用いて信頼性の低い配列を除外し、Trinity と SOAP denovo-Trans を用いて、それぞれの系統ごとに de novo アセンブルを行なった。Evidential Gene で整理統合し、それぞれの系統で 53,625 個および 56,681 個のコンティグ配列を得た。RSEM を用いて各サンプルの配列をアラインメントし、DESeq を用いて Cd 処理間で有意に発現量が異なるトランスクリプトを抽出した。

(4) リアルタイム PCR

O. barthii と *O. latifolia* の系統を水耕栽培し、Cd 処理開始から、0、3、6、12、24、48、96 および 240 時間後に植物体を収穫し、-80℃ で保存した。TRIZOL 試薬 (Thermo Fisher

Scientific 社) を用いて全 RNA を抽出し、ReverTraAce® qPCR RT Master Mix with qDNA Remover(Toyobo 社) を用いて cDNA を合成した。リアルタイム PCR には KOD SYBER qPCR Mix (Toyobo 社) を用い、CFX96™ Real-Time System および Bio-Rad CFX Manager 2.0 (Bio Rad 社) によって解析した。遺伝子の発現量は、*Actin1* 遺伝子をリファレンスとし、各遺伝子の検量線から増幅効率を求め、Pfaffl 改法(式) で、リファレンス遺伝子に対する発現量比を求めた。

$$\text{式 : 発現量比} = \frac{E_{\text{(ct 目的遺伝子 Cd 無処理 - ct 目的遺伝子 Cd 処理)}}}{E_{\text{(目的遺伝子)}}} \div \frac{E_{\text{(ct リファレンス Cd 無処理 - ct リファレンス Cd 処理)}}}{E_{\text{(リファレンス)}}}$$

$$E=1+(\eta/100) \quad \eta:\text{増幅効率}(\%)$$

(5) ベクターの構築と形質転換シロイヌナズナの作成

Cd 処理を行った W0652 (*O. barthii*) の地下部から抽出した全 RNA から、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて cDNA を合成した。cDNA を鋳型とし、Cd で発現が誘導される 2-Alkenal Reductase (AER) をコードする *OBART11G08500* 遺伝子の cDNA を増幅し、pCAMBIA1305 の 35s プロモーターと Nos ターミネーターの間に挿入したバイナリーベクター、pCAM-35s-AER を構築した。これをシロイヌナズナのエコタイプ 'Colombia-0' (Col-0) に導入し、ハイグロマイシン耐性で形質転換体を選抜した。

(6) シロイヌナズナの Cd 耐性の解析

1/2MS 寒天培地に CdCl₂ を添加し、角形 2 号シャーレに 50mL 分注した。形質転換植物の T₃ 世代の種子を殺菌して播種し、4 で 2 日間処理した後に、人工気象器 (CLE-303、トミー精工) を用いて明期 14 時間 / 暗期 10 時間、22 で生育させ、7 日および 14 日後に根長を測定した。

4. 研究成果

(1) イネ属における Cd 耐性の多様性

イネ属の遺伝変異を広くカバーする 18 種 135 系統の Cd による生長抑制率は、18.7 から 89.6% と系統によって大きく異なり、イネ属における Cd 耐性が多様であることが明らかとなった。野生種の中に Cd による生長抑制をほとんど受けない系統が存在していたが、それらの多くは *O. barthii* と *O. latifolia* に属していた (図 1)。

本研究の条件では、野生種の系統の大部分は、地上部の Cd 濃度が 20 ~ 200 ppm の範囲に分布し、地上部の Cd 濃度が 100 ppm を超えた系統では生長が大きく抑制されていた。地上部の Cd 濃度が 50ppm と同程度であっても、生長抑制率は系統によって大きく異なっており、*O. barthii* の系統は生長抑制をほとんど受けていなかった。また、*O. latifolia* には地上部の Cd 濃度が 100 ppm 程度であったにもかかわらず生長が抑制されない系統が存在していた (図 1)。

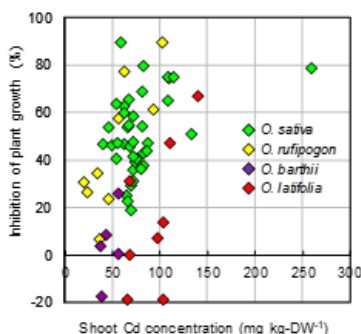


図 1 Cd による生長抑制率と植物体の Cd 濃度との関係

O. sativa, *O. rufipogone*, *O. barthii*, *O. latifolia* の系統を抜粋して示した。

以上の結果から、イネ属の植物は、Cd による生長抑制の受け方において多様であることが明らかになった。さらに、*O. barthii* や *O. latifolia* には、Cd による生長抑制をほとんど受けない系統が存在しており、これらの系統は高濃度の Cd 存在下でも生長できる何らかの仕組みを有している可能性が考えられた。

(2) *O. barthii* の Cd 耐性に関わる遺伝子

Cd 耐性が高いと考えられた *O. barthii* の系統 (W0720 と W0652) について、Cd 存在下での生長に関わる遺伝子を明らかにするため、Cd 処理で変動する遺伝子の RNAseq 解析を行った。

Cd 処理 48 時間後では、W0720 と W0652 は伸長抑制を受けていなかったが、地下部および地上部の Cd 濃度は、それぞれ 200~250 ppm および 30~33 ppm であった。このことから、Cd 処理 48 時間後には、遺伝子発現が Cd による影響を受けているものと考えられた。

Cd 処理 48 時間後に W0720 の地下部で発現量が有意に増加した遺伝子が 35 個見出され、その内 27 個は発現が 5 倍以上に高まっていた。それらの多くは解毒やストレス応答、代謝に関与していると考えられた。また、27 個中 21 個は W0652 でも有意に発現が増加していたことから、これらが *O. barthii* の Cd 耐性に関与している可能性が考えられた。

次に、解毒に関与すると考えられた遺伝子の発現をリアルタイム PCR で解析したところ、Cd 処理 48 時間後には、還元酵素をコードする遺伝子の発現量が著しく増加することが明らかとなった (図 2)。一方、メタロチオネンをコードする遺伝子は、1 遺伝子を除き有意な発現量の増加は確認されなかったが、Cd 処理 4 日後以降に発現量が高まる傾向を示した。

Cd 処理後の発現量の変化は遺伝子によって異なっており、*O. barthii* の根では Cd が引き起こす様々な反応に対応して、それぞれ解毒が行なわれており、それらが強く働くことで Cd による生長抑制を緩和している可能性が考えられた。

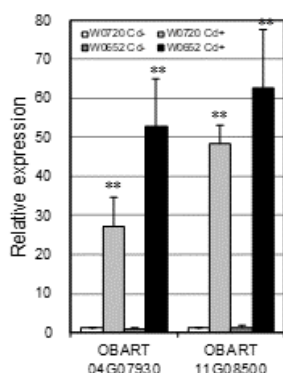


図 2 *O. barthii* の地下部における遺伝子のリアルタイム PCR による発現解析

Cd 処理 48 時間の発現を解析した。バーは標準誤差を、**は Cd 処理により有意に発現量が 1%水準 (t -検定) で有意に増加したことを示す。

(3) *O. latifolia* の Cd 耐性に関わる遺伝子

O. latifolia には Cd 耐性が高いと考えられる系統 (W1166) と、それが低いと考えられる系統 (W0048) が存在していた (図 1)。*O. latifolia* の Cd 耐性と関連する遺伝子を同定するため、これら *O. latifolia* の Cd 耐性の異なる系統の遺伝子発現を RNAseq 解析での比較を試みた。

W1166 の地下部において、Cd 処理によって発現量が有意 ($0.05 <$) に 2 倍以上に増加し、*O. sativa japonica* の推定遺伝子と 50%以上の相同性を示したトランスクリプトが 59 個検出された。一方、W0048 の地下部では 111 個のトランスクリプトの発現量が有意に増加していた。さらに、地下部において発現量が 5 倍以上に増加していた遺伝子は、W1166 が 25 個、W0048 が 51 個で、W0048 の方が Cd に対して発現が変化する遺伝子が多いことが示された (図 3)。

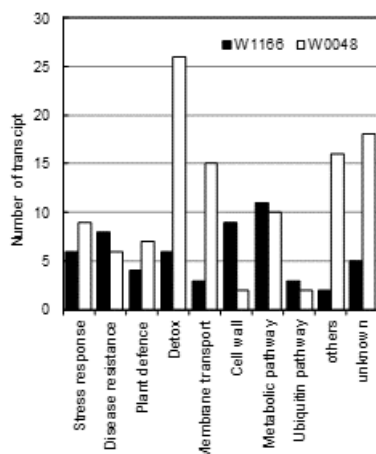


図 3 *O. latifolia* の地下部で Cd により発現量が増加する転写産物の推定機能による分類

W1166: Cd 耐性系統、W0048: Cd 感受性系統

W0048では解毒に関わるタンパク質の遺伝子が数多くCdで発現量が増加していたのに対し、W1166ではこれらの遺伝子の発現量は増加していなかった(図3)。また、W1166では、それらの発現量はCdの有無に関わらず低く、W1166のCd耐性には関与していないものと考えられた。また、W0048で多数の膜輸送体の遺伝子の発現量が高まっていたのに対し、W1166ではこれらの膜輸送体の遺伝子の発現は高くないことも明らかとなった(図3)。これらの結果から、Cd耐性系統のW1166では、W0048に比べてCdによる障害が高まっていないことを示唆された。

一方、W1166では細胞壁に局在するタンパク質をコードする遺伝子に特徴が見られた(図3)。W1166では細胞壁に存在するペルオキシダーゼをコードする5個の遺伝子の発現量が11.1~22.7倍に増加していたのに対し、W0048では、これらの発現量はどれも低く、Cdによる増加も見られなかった。また、細胞壁に存在するグリシンリッチタンパク質も、W1166ではCdで発現量が増加していた。

このようにCd耐性系統のW1166では、W0048には見られない細胞壁に特徴的な遺伝子の発現量が增大していた。植物の根の細胞壁はCdに最初に出会う組織で、その分子構造や形態はCdの吸収や輸送に重要な役割を果たしていると考えられている。このことから、*O. latifolia*のCd耐性には、根の細胞壁が何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

(4) モデル植物を用いた遺伝子機能の解析

*O. barthii*は、AERをコードする遺伝子を少なくとも8個の持つが、この内、Cdで発現が著しく高まったのはOBART11G08500のみであったことから、このcDNAをシロイヌナズナで発現させて、Cdによる障害への影響を解析した。シロイヌナズナの根の生長は15 μ MのCdCl₂の添加によって抑制されたが、AERを導入したシロイヌナズナの根長はCol-0よりも有意に長く、Cdによる生長抑制が緩和されることが明らかとなった(図4、図5)。

AERは、活性酸素を介して産生される有害物質を分解する作用を有すると考えられることから、活性酸素を介した有害物質の生成がカドミウムによる成長抑制の一因となっており、その分解によってカドミウムによるシロイヌナズナの根の伸長抑制が緩和されたものと考えられた。*O. barthii*においても、AERをコードする遺伝子が同様の機構でカドミウムによる障害を緩和しているものと考えられた。

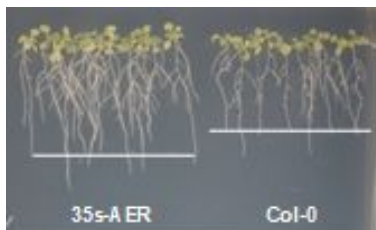


図4 形質転換シロイヌナズナの根の伸長

*O. barthii*のAERを導入した形質転換系統(35s-AER)とCol-0の、15 μ MのCdCl₂を含む培地で生育14日目の写真。白線は、それぞれの系統の平均的な根長を示す。

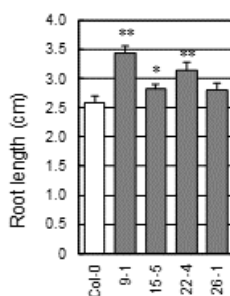


図5 *O. barthii*のAERを導入したシロイヌナズナのCd耐性

15 μ MのCdCl₂を含む培地で生育14日目の根長。白と灰色の棒グラフは、それぞれCol-0およびAERを導入した形質転換系統をしめし、エラーバーは標準誤差、*および**は、5%および1%水準(*t*-検定)でCol-0より有意に長いことを示す。

以上のように、本研究においてイネ属の野生種のCd耐性における多様性を明らかにするとともに、*O. barthii*と*O. latifolia*の中に高いCd耐性を示す系統が存在することを見出した。さらに、これらの系統を活用してCd存在下での遺伝子発現を網羅的に解析することで、これら系統のCd存在下での生長への関与が示唆される遺伝子群を推定することができた。また、これらの一部の遺伝子について、モデル植物を用いてCd耐性向上に寄与することを明らかにした。

今後、植物のCd耐性の機構を解明するため、シロイヌナズナやイネの形質転換植物を用いて、本研究で見出した遺伝子の機能の解析を進めるとともに、それらの相互作用を明らかにする必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- (1) R. Takahashi, M. Ito, K. Katou, K. Sato, S. Nakagawa, K. Tezuka, H. Akagi, T. Kawamoto, Breeding and characterization of the rice (*Oryza sativa* L.) line “Akita 110” for cadmium phytoremediation. *Soil Science and Plant Nutrition*, 査読有, 62, 2016, 373–378
DOI: 10.1080/00380768.2016.1150791
- (2) M. Okoshi, T. Nishikawa, H. Akagi, T. Fujimura, Genetic diversity of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) and wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in Asia, especially in Myanmar, as revealed by organelle markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 査読有, 65, 2018, 713-726
DOI: 10.1007/s10722-017-0566-5

〔学会発表〕(計7件)

宮川典子、藤枝英里、佐藤奈美子、櫻井健二、高橋秀和、渡辺明夫、赤木宏守、*O. barthii* および *O. latifolia* におけるカドミウム耐性の解析、第10回 東北育種研究集会、2015年11月14日、東北大学

R. Takahashi, M. Ito, K. Kato, K. Sato, S. Nakagawa, K. Tezuka, H. Akagi, T. Kawamoto, “Akita 110” is a promising candidate for practical Cd phytoremediation. 13th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, 2015年06月12日～2015年06月16日、Fukuoka International Congress Center

宮川典子、高橋美紀、上田健治、櫻井健二、高橋秀和、渡辺明夫、赤木宏守、*O. barthii* においてカドミウムによって発現変動する遺伝子の解析、日本育種学会第129回講演会、2016年3月22日、横浜市立大学

宮川典子、高橋美紀、上田健治、櫻井健二、渡辺明夫、高橋秀和、赤木宏守、*O. latifolia* のカドミウム耐性に関わる遺伝子のRNAseq解析、日本植物細胞分子生物学会 第34回講演会、2016年9月1日、信州大学

渡辺明夫、中村咲耶、熊谷さおり、中村進一、上田健治、高橋秀和、櫻井健二、赤木宏守、カドミウム耐性を有するシロイヌナズナ *argonaute1* 変異体の生育特性の解析、日本育種学会第131回講演会、2017年3月30日、名古屋大学

高橋美紀、宮川典子、上田健治、櫻井健二、渡辺明夫、高橋秀和、赤木宏守、*Oryza barthii* においてカドミウムによって発現変動する遺伝子の解析、第35回 日本植物細胞分子生物学会(さいたま)大会、2017年8月29日、大宮ソニックシティ

高橋溪斗、高橋美紀、宮川典子、上田健治、櫻井健二、高橋秀和、渡辺明夫、赤木宏守、*Oryza latifolia* のカドミウム耐性に関わる遺伝子の発現解析、第12回 東北育種研究集会、2017年11月25日、カレッジプラザ(秋田県立大学)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

赤木 宏守 (AKAGI HIROMORI)
秋田県立大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：50315587