

令和元年6月11日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07639

研究課題名(和文)植物においてグルタチオン長距離輸送を担う輸送体が硫黄や重金属分配に果たす役割

研究課題名(英文)Roles of glutathione transport on sulfur and heavy metal movements

研究代表者

大津 直子(Ohkama-Ohtsu, Naoko)

東京農工大学・グローバルイノベーション研究院・教授

研究者番号：40513437

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)：植物において硫黄は、主にgamma-Glu-Cys-Gyからならトリペプチドであるグルタチオンの形態で、ソースからシンクへ篩管を介して輸送される。我々は、シロイヌナズナの変異体を用いた解析からAtOPT6がグルタチオンの篩管輸送を担うこと、カドミウム輸送に関与すること、発芽や生殖器官形成に貢献することを示した。さらにAtOPT6を篩部で強発現させてグルタチオンの輸送を強化することにより、地上部の亜鉛含量を増加できることを示した。本研究により、AtOPT6遺伝子の発現を制御することにより、人にとっての有害重金属や有用ミネラル金属元素の輸送を変化させることができることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルタチオンの篩管輸送は硫黄、窒素、重金属輸送に関与することが示唆されていたが、本研究はそれを担うグルタチオン輸送体を同定し、それが植物の生育や重金属動態に関与することを示した初めての例である。本研究の成果は、人間の健康に有用なミネラル金属成分を作物可食部で増加させるbio-fortificationや、有害重金属を減少させる方法につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Organic sulfur in plants is mainly transported in the form of Glutathione, a tripeptide of gamma;-Glu-Cys-Gy. In this study we demonstrated that AtOPT6 is the glutathione transporter involved in transport of glutathione via phloem, transport of cadmium, germination and development of reproductive organs. Furthermore we showed that Zn transport into shoots are increased by overexpressing AtOPT6 in phloem. Our study shows that regulation of AtOPT6 will lead to change movement of toxic metals and important mineral metals for human.

研究分野：植物栄養学

キーワード：グルタチオン輸送体 植物 カドミウム 亜鉛 篩管輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物において硫黄は、主に  $\gamma$ -Glu-Cys-Gy からならトリペプチドであるグルタチオンの形態で、ソースからシンクへ篩管を介して輸送される。我々は、シロイヌナズナの変異体を用いた解析から **AtOPT6 が篩管にグルタチオンを積み込む輸送体である**可能性を示唆する結果を得た。重金属の一部は、グルタチオンとの抱合体として植物体内を輸送されると考えられているが、グルタチオン輸送体が植物の重金属動態に与える影響は分かっていた。

### 2. 研究の目的

研究開始当初我々は、シロイヌナズナの変異体を用いた解析から AtOPT6 が篩管にグルタチオンを積み込む輸送体である可能性を示唆する結果を得た。これを証明し、AtOPT6 が重金属輸送に果たす役割を解明する。さらに、AtOPT6 の機能を利用し、植物の重金属動態を制御する可能性を示す。

### 3. 研究の方法

シロイヌナズナの *AtOPT6* 変異体を水耕栽培し、シンク及びソースの各器官におけるグルタチオン濃度を測定することにより、グルタチオン輸送体であることを証明する。さらに水耕液にカドミウムを添加した際の、変異体におけるカドミウム濃度を器官別に測定する。篩管を介したグルタチオンの輸送を強化するために、篩部特異的に発現を促進する *Sucrose transporter2 (SUC2)* のプロモーター制御下で *AtOPT6* を発現させる形質転換シロイヌナズナを作成し、各器官におけるグルタチオン、ファイトケラチン、重金属濃度を、野生型株と比較する。

### 4. 研究成果

独立な 2 系統の *atopt6* 変異株両方について、鞘や花といったシンク器官でグルタチオン濃度が低下していることを確認した。篩管液中のグルタチオンを測定したところ、野生型株と *atopt6* 変異株と同様であった。*AtOPT6* 遺伝子の発現はシンク器官の篩部周囲で強いことから、*AtOPT6* は、篩管を通して運ばれてきたグルタチオンを、篩管からアポプラスト空間に出た後に篩部周辺の細胞に吸収する役割を果たすと考えられた。これにより、シンク器官での成長に必要な硫黄や窒素源の取り込みに寄与すると示唆された。さらに変異体では花茎の出現が遅れたことから、栄養成長から生殖成長への変換の制御にもグルタチオン輸送が関連していることが示唆された。また *atopt6* 変異株は発芽が遅れたが、種子成熟への影響を実態顕微鏡で観察することにより調べたところ野生型株と *atopt6* 変異株の間に見た目の違いはなかったことから、細胞内部の代謝への影響と考えられた。

有害元素であるカドミウムは、グルタチオンやその重合体であるファイトケラチンに抱合され、植物体内を輸送されると考えられている。*AtOPT6* の重金属輸送における機能を明らかにするために、*atopt6* 変異株と野生型株を栽培する際の水耕液にカドミウムを添加した後、ファイトケラチン濃度を器官別に測定した。主要なファイトケラチンである PC2 含量が *atopt6* の花で減少した(図 1)。また変異株においてカドミウムが根で蓄積していた。このことから、*AtOPT6* によるグルタチオンやファイトケラチンの輸送が、植物体内のカドミウム動態に影響を与えていることが明らかになった。これらの結果について *Plant and Cell Physiology* 誌に受理された。

次に、篩管中を介したグルタチオンの輸送を活性化することによる植物体内の重金属動態への影響を調べるために、篩部伴細胞で発現するスクローストランスporter 2 遺伝子のプロモーター

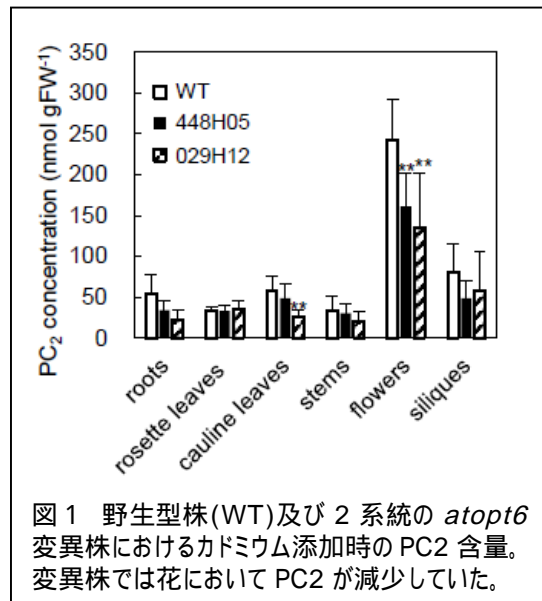


図 1 野生型株(WT)及び 2 系統の *atopt6* 変異株におけるカドミウム添加時の PC2 含量。変異株では花において PC2 が減少していた。

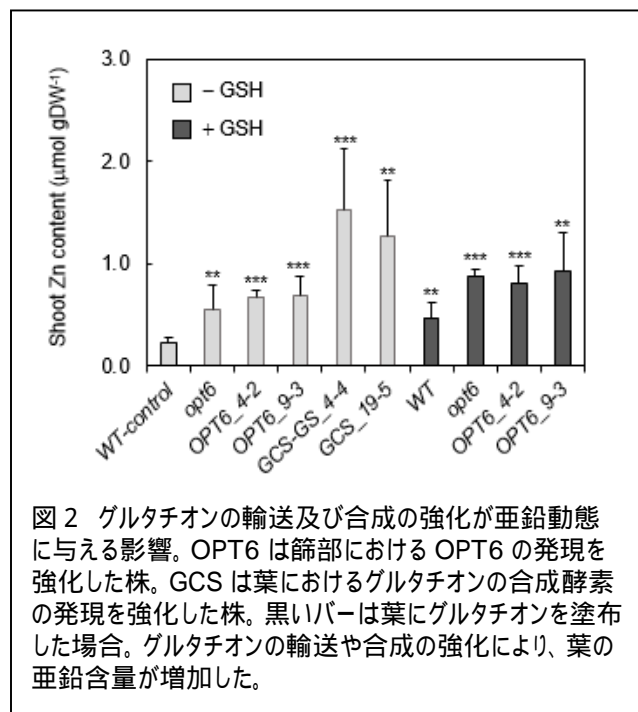


図 2 グルタチオンの輸送及び合成の強化が亜鉛動態に与える影響。OPT6 は篩部における OPT6 の発現を強化した株。GCS は葉におけるグルタチオンの合成酵素の発現を強化した株。黒いバーは葉にグルタチオンを塗布した場合。グルタチオンの輸送や合成の強化により、葉の亜鉛含量が増加した。

pSUC2 に *AtOPT6* 遺伝子をつなげて、シロイヌナズナに形質転換した。この方法でグルタチオンの篩管輸送を強化した株および葉におけるグルタチオン合成を強化した株では、根から地上部へのグルタチオン輸送が増加し、地上部の亜鉛含量も増加することが観察された(図2)。亜鉛は人類の健康に必要な元素であり、この技術が作物の bio fortification につながる可能性がある。これらの結果について *Plant Science* 誌に受理された。さらにこの形質転換態中の亜鉛以外の金属元素、鉄、マンガン、銅、についても調査している。またカドミウムを培地に添加した際の成長点へのカドミウムの輸送についても、形質転換態を用いて調査を行った。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

1. Wongkaew, A., Nakamura, S., Sekimoto, H., Yokoyama, T. and **Ohkama-Ohtsu, N.** (責任著者) Phloem-specific overexpression of *AtOPT6* in *Arabidopsis* enhances Zn transport into shoots *Plant Science*, 285 (2019), pp. 91-98. doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.04.022 査読有
2. Wongkaew, A., Nakamura, S., Suzui, N., Yin, Y-G., Ishii, S., Kawachi, N., Kojima, K., Sekimoto, H., Yokoyama, T. and **Ohkama-Ohtsu, N.** (責任著者) Elevated glutathione synthesis in leaves contributes to zinc transport from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 283 (2019), pp. 416-423. 10.1016/j.plantsci.2018.11.003 査読有
3. Nakamura, S., Wongkaew, A., Nakai, Y., Rai, R. and Naoko **Ohkama-Ohtsu, N.** Foliar-applied glutathione activates zinc transport from roots to shoots in oilseed rape. *Plant Science*, 283 (2019), pp. 424-434. 10.1016/j.plantsci.2018.10.018 査読有
4. Wongkaew, A., Asayama, A., Kitaiwa, T., Nakamura, S., Kojima, K., Stacey, G., Sekimoto, H., Yokoyama, T. and **Ohkama-Ohtsu, N.** (責任著者) *AtOPT6* Protein Functions in Long Distance Transport of Glutathione in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 59 (2018), pp.1443-1451. 査読有
5. Uruguchi, S., Sone, Y., Ohta, Y., **Ohkama-Ohtsu, N.**, Hofmann, C., Hess, N., Nakamura, R., Takanezawa, Y., Clemens, S. and Kiyono, M. Identification of C-terminal regions in *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase 1 specifically involved in activation by arsenite, *Plant and Cell Physiology* 59(3) (2018), pp. 500-509. 査読有
6. Uruguchi, S., Tanaka, N., Hofmann, C., Abiko, K., **Ohkama-Ohtsu, N.**, Weber, M., Kamiya, T., Sone, Y., Nakamura, R., Takanezawa, Y., Kiyono, Masako, Fujiwara, T. and Clemens, S. Phytochelatin synthase has contrasting effects on cadmium and arsenic accumulation in rice grains, *Plant Cell and Physiology* 58 (10) (2017), pp. 1730-1742. 査読有
7. Yamaguchi, C., **Ohkama-Ohtsu, N.**, Shinano, T. and Maruyama-Nakashita, A. Plants prioritize phytochelatin synthesis during cadmium exposure even under reduced sulfate uptake caused by the disruption of *SULTR1;2*, *Plant Signaling and Behavior* 12(5) (2017), e1325053. 査読有
8. Yamaguchi, C., Takimoto, Y., **Ohkama-Ohtsu, N.**, Hokura, A., Shinano, T., Nakamura, T., Suyama, A. and Maruyama-Nakashita, A. Effects of cadmium treatment on the uptake and translocation of sulfate in *Arabidopsis thaliana*, *Plant and Cell Physiology*. 57(11) (2016), pp. 2353-2366. 査読有
9. Nishida, S., Duan, G., **Ohkama-Ohtsu, N.**, Uruguchi, S. and Fujiwara, T. Enhanced arsenic sensitivity with excess phytochelatin accumulation in shoots of a *SULTR1;2* knockout mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, *Soil Science and Plant Nutrition* 62(4) (2016), pp. 367-372. 査読有

[学会発表](計 8 件)

1. Arunee Wongkaew・Shin-ichi Nakamura・Tadashi Yokoyama・**Naoko Ohkama-Ohtsu**, Assessment of glutathione transporter *AtOP6* functions on sink organs in *Arabidopsis* 日本土壤肥料学会神奈川大会 2018 年
2. Arunee Wongkaewa, S. Nakamura, N. Suzui, Y-G. Yinc, S Ishii, S Fujimaki, N. Kawachi, **N. Ohkama-Ohtsu**, The inner and outer enhancement of glutathione on Zn behavior in plants 日本土壤肥料学会仙台大会 2017 年
3. 朝山紘貴・北岩泰祐・中村進一・横山正・**大津(大鎌)直子**、シロイヌナズナのグルタチオン輸送体がカドミウム輸送と花茎形成に果たす役割、日本土壤肥料学会仙台大会 2017 年

4. 浦口晋平・曾根有香・太田有美佳・**大津(大鎌)直子**・中村亮介・高根沢康一・Stephan Clemens・清野正、亜ヒ酸応答における AtPCS1 の C 末端領域の機能解析、日本土壌肥料学会仙台大会 2017 年
5. Chisato Yamaguchi, Yuki Takimoto, **Naoko Ohkama-Ohtsu**, Akiko Hokura, Takuro Shinano, Toshiki Nakamura, Akiko Suyama, Akiko Maruyama-Nakashita, Mechanisms of cadmium-induced increases of sulfate uptake, translocation and thiol synthesis in Arabidopsis thaliana, TAIWAN-Japan Plant Biology 2017 年 (国際学会)
6. 北岩泰祐・横山 正・**大津(大鎌)直子**、細胞内グルタチオン分解酵素の同定と硫黄代謝における役割の解析、日本土壌肥料学会佐賀大会 2016 年
7. 浦口晋平・田中伸裕・Christian Hofmann・Stephan Hoereth・Michael Weber・神谷岳洋・**大津直子**・安孫子果歩・曾根有香・中村 亮介・高根沢康一・清野正子・Stephan Clemens・藤原徹 Physiological roles of a rice phytochelatin synthase gene OsPCS1 in cadmium and arsenic tolerance. 日本土壌肥料学会佐賀大会 2016 年
8. Chisato Yamaguchi, Yuki Takimoto, **Naoko Ohkama-Ohtsu**, Akiko Hokura, Takuro Shinano, Toshiki Nakamura, Akiko Suyama and Akiko Maruyama-Nakashita, Effects of Cadmium Treatment on the Uptake and Translocation of Sulfate in Arabidopsis thaliana. 5th Sulphyton Workshop: "Sulfur Nutrition and Metabolism in Plants" 2016 年 (国際学会)

〔図書〕(計 1 件)

1. Maruyama-Nakashita, A. and **Ohkama-Ohtsu, N.** "Chapter 13: Sulfur assimilation and glutathione metabolism in plants," Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance (edited by M.A. Hossain et al., Springer International Publishing AG, (2017) pp. 287-308

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.tuat.ac.jp/~plantnut/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Arunee Wongkaewa

ローマ字氏名：

研究協力者氏名：中村 進一

ローマ字氏名：Shin-ichi Nakamura

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。