

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14873

研究課題名(和文) 有害元素と栄養元素の選択的な長距離輸送を達成する分子育種

研究課題名(英文) Molecular breeding for controlling long-distance transport of toxic and nutritional elements in plants

研究代表者

浦口 晋平 (Uraguchi, Shimpei)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：20638837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物のミネラル輸送体の発現制御や機能改変は、可食部(子実)への有害元素の蓄積を阻害する効果がある一方、植物の生育に必要な無機栄養の輸送を阻害するケースがある。本研究は、重金属リガンドであるファイトケラチンに着目し、カドミウムやヒ素のような有害元素の長距離輸送を阻害し、亜鉛のような必須ミネラルを選択的に輸送できる植物の分子育種を目指した。シロイヌナズナのファイトケラチン合成酵素の解析から、亜ヒ酸応答に特異的に重要なアミノ酸配列を明らかとした。また、ファイトケラチン合成酵素が正常に機能することで、亜ヒ酸ストレス下での亜鉛のホメオスタシスが維持されることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Plant-derived foods are major sources of essential minerals like zinc as well as of toxic elements such as arsenic and cadmium. Previous studies demonstrated that expression or functional modification of several transporters responsible for arsenic or cadmium transport lead to reduction of respective element accumulation in edible parts of plants. However, such approaches possess a risk of disturbing plant nutritional homeostasis, development and/or environmental stress responses. In this study, we focused on a heavy metal binding ligand called phytochelatin (PC) and its synthases (PCS) aiming to achieve reduction of toxic element accumulation with minimized effects on mineral nutrition transport. We identified amino acid regions crucial for arsenite-specific responses of PCS in Arabidopsis. We also revealed significant roles of PCS in maintaining zinc homeostasis under arsenite stress conditions.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：有害元素 長距離輸送 リガンド

1. 研究開始当初の背景

植物由来の食品は、亜鉛のような人の必須ミネラルに加えて、有害元素の代表例であるカドミウムやヒ素の主要な摂取源である。必須微量元素である亜鉛の欠乏は、ビタミンA欠乏と並んで幼児の疾病や死亡の一大要因である。亜鉛欠乏に対する農学的アプローチとして、施肥や育種によって作物の亜鉛の吸収・蓄積を増進させる”Biofortification”の世界的なプロジェクトが進行している (<http://harvestplus.org>)。さらに、植物の亜鉛の輸送体分子が単離され、イネを中心とした作物の組換え技術を用いた”Biofortification”も進められている。

一方、カドミウムやヒ素の作物の可食部への蓄積は、これら毒性元素の日常的な摂取源である。この10年ほどで、イネをモデルとしてカドミウム・ヒ素輸送に関する主要な分子が集中的に同定された。輸送体の発現制御や遺伝子破壊によって、植物体内へのカドミウム・ヒ素の吸収やコメ(子実)への蓄積を低減させることにも成功している。しかし、輸送体遺伝子の破壊は、輸送体本来の基質となる栄養元素の輸送も阻害する。例えば、OsNramp5やOsHMA2という重金属輸送体の変異株では、玄米の亜鉛レベルが低下したり、亜鉛やマンガン欠乏によって植物自体の成長が阻害されることが報告されている。また、イネの亜ヒ酸輸送に重要なLsi1やLsi2のノックアウトによってイネのヒ素蓄積は低減できるが、イネの生育に有用なケイ酸の吸収・蓄積も阻害される点が問題となる。

このような背景から、栄養価や収量を維持しつつ、有害元素を含まない安全な食料生産を実現するため、有害元素は輸送しにくい、栄養元素は優先的に輸送するような植物の長距離輸送システムの構築が求められる。そのためのアプローチとして、本研究では植物が合成する重金属リガンドであるファイトケラチンに着目した。ファイトケラチンは、グルタチオンを基質としてファイトケラチン合成酵素PCSを介して合成されるシステインを含むポリペプチドである。カドミウムや亜ヒ酸に応答した細胞内のファイトケラチン合成は、これら有害元素の液胞への細胞内輸送に必須であり、結果として植物体内での移動性・分配にも影響することが示唆されている。

また、輸送体を応用したアプローチとして、輸送体の本来の輸送基質(必須元素など)に対する活性を保ちつつ、カドミウムや亜ヒ酸を輸送しないような変異が同定できれば、栄養元素と有害元素の選択的輸送の達成へ向けて有用な知見が得られると期待された。従来の研究では、出芽酵母への異種発現系がよく用いられるが、この系では排出型輸送体の活性を検出するのに難点があった。そこで、本研究ではカドミウムの排出活性をもつイネ輸送体OsLCT1に着目し、コムギ無細胞系により調製したプロテオリポソームを用い

たカドミウム排出活性の測定を試みた。

2. 研究の目的

本研究は、おもに重金属リガンドであるファイトケラチンの合成酵素PCSの発現制御・機能改変によって、根から地上部・種子へのミネラル成分の長距離輸送の最適化を目的とした。具体的には、PCSの制御・改変によってカドミウムやヒ素のような有害元素の植物体内における長距離輸送を阻害する一方で、亜鉛のような必須元素を選択的に輸送できる植物輸送システムの基盤の確立を目指した。また、カドミウムを有害元素のモデルとして、プロテオリポソームを用いたカドミウム輸送体の活性測定システムの確立にも挑戦した。

3. 研究の方法

(1) イネのファイトケラチン合成酵素OsPCSのバリエーションを用いて、カドミウム、亜ヒ酸に対する応答活性に必要な領域を検討した。各バリエーションを分裂酵母の Δpcs 変異株、シロイヌナズナの*AtPCS1*欠損変異株*cad1-3*に形質転換した。導入したOsPCS各バリエーションの分裂酵母における発現をウェスタンブロットで解析した。シロイヌナズナのOsPCS導入系統は、RT-PCRにより導入遺伝子の発現を解析した。OsPCS各バリエーション組換え分裂酵母およびシロイヌナズナについてカドミウム、亜ヒ酸に対する耐性を解析した。分裂酵母の Δpcs あるいはシロイヌナズナの*cad1-3*変異株のカドミウム・亜ヒ酸に対する感受性をどのOsPCS分子が相補するか検証した。より直接的な解析として、各組換え株のファイトケラチン合成活性をHPLCにより定量した。

(2) シロイヌナズナのファイトケラチン合成酵素*AtPCS1*の亜ヒ酸応答に必要な領域について、C末端側の制御ドメインに着目して解析した。*AtPCS1*欠損変異株の*cad1-3*に加えて、T-DNA挿入株*cad1-6*を用いた。*cad1-6*は、制御ドメインのC末端側がT-DNAの挿入によって欠損している部分欠損変異株であると報告されている。これら変異株の亜ヒ酸に対する感受性、ファイトケラチン蓄積、ヒ素および微量栄養元素の蓄積を解析した。これら植物体の解析より亜ヒ酸応答への関与が示唆された制御ドメインのC末端側の領域について、分裂酵母にC末端領域の部分欠損変異株を発現させた系を用いて、亜ヒ酸に反応したPCS活性を検討した。

(3) 酵母を用いた異種発現系が植物の輸送体の活性試験ではよく用いられるが、この系では発現させた輸送体タンパクの細胞内での局在など制御が難しい要素がある。一方、無細胞系で合成された輸送体タンパクをリポソームに封入する系では、細胞内外の各種条件(基質濃度やpHなど)を容易に制御で

きる利点がある。そこで、コムギ無細胞系により合成された輸送体タンパクを封入したプロテオリポソームを用いて、カドミウム輸送体の活性測定を試みた。材料として、カドミウム排出活性が示唆されている *OsLCT1* とその点変異株を用いた。プロテオリポソームを種々のカドミウム条件で処理し、ICP-AESによりリポソーム内のカドミウム濃度を定量することで活性を測定した。

4. 研究成果

(1) イネのゲノム上には2コピーのPCS遺伝子が存在するが、これまでの転写産物の解析によって、N末端側の触媒ドメインあるいはC末端側の制御ドメインを欠損した*OsPCS*分子種が単離されていた(図1)。そこで、これらの*OsPCS*バリエーションについてカドミウム、亜ヒ酸に対する応答を分裂酵母およびシロイヌナズナに導入して解析した。その結果、イネPCSでは、触媒ドメインおよび制御ドメインをともに備えることがカドミウム、亜ヒ酸に応答したPCS活性に必要であることがわかった。これらの結果から、イネPCS1は触媒ドメインだけでもカドミウムに応答したPCS活性を示すシロイヌナズナ*AtPCS1*とは性質が異なることがわかった。

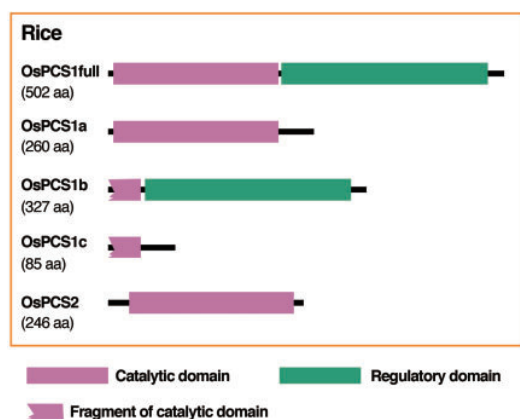


図1 イネのPCSバリエーションのドメイン構造

(2) 続いて、シロイヌナズナの主要なファイトケラチン合成酵素であり、先行研究が進んでいる*AtPCS1*についてC末端領域の亜ヒ酸応答における機能を解析した。*AtPCS1*のT-DNA挿入株である*cad1-6*では、T-DNA挿入によって制御ドメインのC末端側の配列を欠損させることに着目し、亜ヒ酸ストレスに対する表現型をノックアウト変異株*cad1-3*と比較した。*cad1-6*は、*cad1-3*と同様の亜ヒ酸感受性の表現型を示した。野生型株では亜ヒ酸処理によってPC合成が顕著に誘導されたのに対して、*cad1-6*では*cad1-3*と同様に亜ヒ酸に応答したPC合成は認められなかった。以上の結果から制御ドメインのC末端側の配列が亜ヒ酸応答に必要であることが示唆された。

さらに、分裂酵母を用いた異種発現系によって*AtPCS1*のC末端領域を欠損させた変異

株のPC合成活性を調べた(図2)。

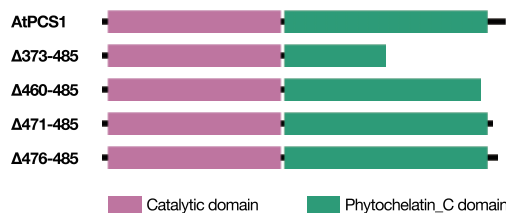


図2 シロイヌナズナ*AtPCS1*のC末端欠損変異株の模式図

$\Delta 373-485$ では亜ヒ酸に応答したPCS活性が認められず、 $\Delta 460-485$ 、 $\Delta 471-485$ では野生型の半分程度の活性を示したことから、373番目のアスパラギンから459番目のロイシンの領域がまず亜ヒ酸応答に必要であることがわかった。また、 $\Delta 476-485$ では $\Delta 460-485$ 、 $\Delta 471-485$ より高いPCS活性を示したことから、471番目のシステインから475番目のリジンの領域の重要性が示された。

植物体の元素解析の結果、C末端領域を欠損した*cad1-6*は、*cad1-3*と同様に地上部へのヒ素分配が野生型株より上昇していたことから、*AtPCS1*のC末端領域はシロイヌナズナ体内においてヒ素の分配制御に重要であることがわかった。また、亜ヒ酸ストレス下において、変異株の地上部への亜鉛の分配が著しく低下したことから、*AtPCS1*が亜ヒ酸ストレス下の亜鉛の体内分配の維持に極めて重要であることがわかった。

(3) コムギの無細胞タンパク合成系を用い、カドミウムの排出活性を示すイネの輸送体である*OsLCT1*をモデルとしてプロテオリポソームの調製とカドミウム排出活性測定系の構築を試みた。野生型*OsLCT1*を含むプロテオリポソームの調製に成功し、得られたプロテオリポソームを用いてカドミウム輸送活性を検討した。リポソーム内外でpHグラジエントをつけた条件、基質となるカドミウムイオンをリポソームの内部あるいは外部に添加した条件など検討し、リポソーム内のカドミウム濃度をICP-AESで定量することで活性測定を行ったが、*OsLCT1*のカドミウム輸送活性を検出する条件を見出すことはできなかった。

以上の結果を総括すると、本研究によって、植物の主要な重金属リガンドであるファイトケラチンの合成酵素PCSの活性制御について、亜ヒ酸応答におけるC末端制御領域の重要性を明らかとした。また、PCSが亜ヒ酸ストレス下における亜鉛のホメオスタシスに重要であることを発見した。本研究の成果は、今後PCSを応用した農作物中の有害元素の低減を亜鉛など栄養元素のホメオスタシスを維持した形で達成するための基礎となることが期待される。

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 2 件)

- ① Shimpei Uraguchi, Yuka Sone, Yumika Ohta, Naoko Ohkama-Ohtsu, Christian Hofmann, Nathalia Hess, Ryosuke Nakamura, Yasukazu Takanezawa, Stephan Clemens, Masako Kiyono, Identification of C-terminal Regions in Arabidopsis thaliana Phytochelatase Synthase 1 Specifically Involved in Activation by Arsenite., *Plant & Cell Physiology*, 査読有り, 59: 500-509, 2018, doi: 10.1093/pcp/pcx204.
- ② Shimpei Uraguchi, Nobuhiro Tanaka, Christian Hofmann, Kaho Abiko, Naoko Ohkama-Ohtsu, Michael Weber, Takehiro Kamiya, Yuka Sone, Ryosuke Nakamura, Yasukazu Takanezawa, Masako Kiyono, Toru Fujiwara, Stephan Clemens, Phytochelatase Synthase has Contrasting Effects on Cadmium and Arsenic Accumulation in Rice Grains., *Plant & Cell Physiology*, 査読有り, 58: 1730-1742, 2017, doi: 10.1093/pcp/pcx114.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 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, 清野正子, AtPCS1のC末端領域における亜ヒ酸応答に必要な配列の同定, 第59回日本植物生理学会年会, 2018年
- ② 浦口晋平, 曾根有香, 太田有美佳, 大津直子, 中村亮介, 高根沢康一, Stephan Clemens, 清野正子, 亜ヒ酸応答におけるAtPCS1のC末端領域の機能解析, 日本土壤肥料学会2017年度仙台大会, 2017年
- ③ Shimpei Uraguchi, Nobuhiro Tanaka, Christian Hofmann, Stephan Hoereth, Michael Weber, Takehiro Kamiya, Naoko Ohkama-Ohtsu, Kaho Abiko, Yuka Sone, Ryosuke Nakamura, Yasukazu Takanezawa, Masako Kiyono, Stephan Clemens, Toru Fujiwara, Physiological roles of a rice phytochelatase synthase gene OsPCS1 in cadmium and arsenic tolerance., 日本土壤肥料学会2016年度佐賀大会

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/kouei/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

浦口 晋平 (URAGUCHI, Shimpei)
北里大学・薬学部・講師
研究者番号：20638837

(3)連携研究者

野澤 彰 (NOZAWA, Akira)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師
研究者番号：30432800

曾根 有香 (SONE, Yuka)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号：60550035

(4)研究協力者

Stephan Clemens
University of Bayreuth, Department of Plant Physiology, Professor