

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 4 月 5 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780054

研究課題名（和文）ニッケル過剰土壌における植物の鉄欠乏症発生と抑制法開発に関する分子生物学的研究

研究課題名（英文）molecular biological approach for Fe-deficiency symptom of plants at high Ni soil and suppression method

研究代表者

水野 隆文（MIZUNO TAKAFUMI）

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：50346003

研究成果の概要（和文）：シロイヌナズナをニッケルに曝露した結果、鉄の吸収量増加と鉄吸収トランスポーターである IRT1 の発現誘導が確認され、また IRT1 遺伝子の発現抑制によりニッケル過剰症が抑制された。以上のことから、ニッケル過剰土壌における鉄欠乏症状の発症は、IRT1 などの鉄輸送タンパク質がニッケルも輸送基質とすることにより鉄-ニッケルの競合が発生していることに起因することが示唆された。また、三重県鳥羽市に分布する植物の調査結果からも、高ニッケル土壌におけるニッケル-鉄含量の間に高い相関が確認された。

研究成果の概要（英文）：In hydroponic cultures, excess Ni exposure increased Fe accumulation and the relative transcription level of AtIRT1 in roots, indicating that excess Ni induces AtIRT1 expression in roots. Moreover, Ni accumulation under Fe-deficient conditions was markedly lower in AtIRT1-defective mutants than in the wild-type, Col-0. These data demonstrate that AtIRT1 transports Ni²⁺ in roots, and strongly suggest that Ni accumulation is further accelerated by AtIRT1 that is expressed in response to excess Ni. We also investigated metal contents and their correlation of the flora of the serpentine soil area in Suga Island, Toba in Mie prefecture. Among the elements investigated, Fe concentration showed high correlation with Ni in these plants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：高ニッケル土壌・シロイヌナズナ・IRT1・鉄輸送体・酵母・蛇紋岩・クロロシス

1. 研究開始当初の背景

本研究が開始された当時、多くの研究者によって植物が必要とする必須元素の吸収や集積に関する遺伝子群の解明が進められていたが、マンガンやニッケルなどの一部の必須微量元素については流入経路が明らかにされておらず、植物におけるこれらの重金属吸収と過剰障害の発生機構については明らかにされていなかった。特にニッケルについては、北海道中央部および中央構造線に沿った長野・東海・紀伊山地及び四国に及ぶ広い範囲において高ニッケル土壌（蛇紋岩質土壌）が分布し、古くよりニッケルの過剰障害による農作物被害が報告されているにもかかわらず、植物のニッケル吸収機構からの障害抑制についての検討はこれまで行われてこなかった。

一方、「植物のニッケル過剰障害が鉄欠乏症状（クロロシス）と類似すること」また過去の堀江らの研究による「蛇紋岩土壌固有の植物種は体内のニッケル濃度に対し一定量の鉄を獲得していること」などの報告から、植物のニッケル獲得には鉄吸収機構が関与すること、また輸送に関与するトランスポーターの基質として鉄とニッケルが競合することが予想された。

2. 研究の目的

植物における鉄ニッケルの競合とその結果としての高ニッケル土壌における鉄欠乏の発症について分子生物学的手法に解明することを目的として、遺伝子情報が利用可能なモデル植物であるシロイヌナズナを用い、その代表的な鉄吸収関連タンパク質であるIRT1のニッケル輸送能の検証と、IRT1の欠損が植物のニッケル獲得とクロロシス発症に与える影響について検討した。また、実際の高ニッケル土壌における植物の鉄欠乏症回避についての知見を得るため、三重県鳥羽

市に分布する植物のニッケル鉄含量の相関についても検証した。

3. 研究の方法

(1) AtIRT1 発現酵母におけるニッケル輸送

鉄欠乏条件のシロイヌナズナ根から採取したRNAよりcDNAテンプレートを作成し、PCRによりAtIRT1の全長cDNAをクローニングした。発現ベクターpKT10にAtIRT1遺伝子を連結後、出芽酵母BY4741株に導入した。組み換え酵母を鉄及びニッケル輸送能を添加した培地にて栽培し、細胞内に集積したニッケル量について原子吸光光度計もしくはICPにて測定した。また高ニッケル条件を模した寒天培地上で酵母の生育を観察し、*irt1*の発現が酵母のニッケル耐性に与える影響について検証した。

(2) AtIRT1 欠損シロイヌナズナにおけるニッケル取り込み試験

鉄十分もしくは鉄欠乏条件で栽培した2週齢のシロイヌナズナコロンビア株(Col-0)を0-50 μ Mのニッケル条件で1週間水耕栽培し、本植物におけるニッケル過剰障害（クロロシス）の発生状況と地上部及び地下部のニッケル集積を原子吸光光度計もしくはICPにより測定した。さらに⁶³Niを含む水耕液にシロイヌナズナを1時間曝露し、吸収した⁶³Ni量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。これらの試験を*irt1*遺伝子の発現を抑制したノックアウト株でも行い、コントロール株とのニッケル過剰障害の発症と集積量を比較した。

(3) 三重県鳥羽市菅島の高ニッケル土壌地帯における植物の鉄-ニッケルの相関

2010年10月から2011年11月までの期間、三重県鳥羽市菅島の高ニッケル土壌地帯

(伊勢志摩国立公園の特別地域を除く)において、草本植物(52種)、木本植物(18種)およびシダ植物(6種)の地上部全体もしくは葉のみを採取した。サンプルを乾燥後硝酸により湿式分解し、ICPにより各種金属濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) AtIRT1はニッケルを輸送する

鉄輸送能を正常に持つシロイヌナズナ Col-0 株由来の *irt1* 遺伝子を導入した酵母に対し、ベクターコントロールもしくは鉄輸送能を失った変異 *irt1* 遺伝子(*irt1-2*)を導入した出芽酵母が鉄輸送能を有さないことを確認した(図1-A)。これらの酵母を $500 \mu\text{M}$ のニッケルを含む寒天培地上で生育した結果、*irt1* 遺伝子を発現した酵母は生育が抑制され、ベクターコントロールや *irt1-2* 発現酵母では生育が阻害されなかった(図1-B)。さらに *irt1* 発現酵母をニッケル含有培地で培養した結果、ベクターコントロール導入株と比較して約2倍にニッケル集積量が増加していた(図1-C)。以上の結果から、*irt1* は細胞内部へのニッケル輸送能を有することが確認された。

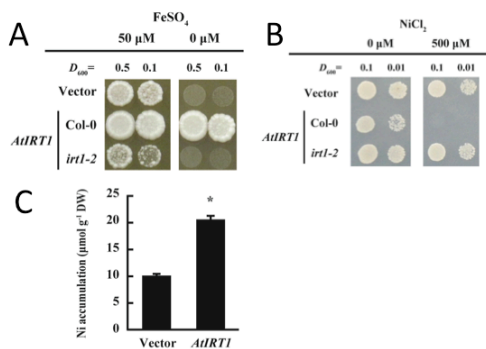


図1 *irt1* 遺伝子の発現が酵母のニッケル耐性に与える影響

(2) *irt1* 遺伝子のノックアウトによるシロイヌナズナのニッケル過剰障害の回避

シロイヌナズナ Col-0 株(野生株)および *irt1* 遺伝子の機能を失わせたノックアウト株

(*irt1-1*)を、鉄欠乏条件および *irt1* 遺伝子の発現が抑制される鉄供給条件($\text{Fe}:50 \mu\text{M}$)で水耕栽培し、さらにニッケルを添加することによるクロロシスの発症について検証した。野生株が *irt1* の発現が誘導される鉄欠乏条件でニッケルを添加することにより新葉に強いクロロシスが発生したのに対し、*irt1* ノックアウト株ではクロロシス症状が軽減していた。これらの症状はニッケルを添加しない鉄欠乏条件では認められなかった(図2-A)。さらに、シロイヌナズナ根におけるニッケル集積量は、*irt1* 発現が誘導される鉄欠乏条件で非常に高く、鉄が十分な条件では低いが、*irt1* ノックアウト株では両条件とも低い集積量に留まった(図2-B)。以上の結果から、シロイヌナズナのニッケル吸収を担う主たる輸送体は IRT1 であり、そのノックアウトによりニッケル過剰条件での過剰障害が回避されることが示された。また高ニッケル環境において鉄欠乏の症状が発生するメカニズムについて、高ニッケル条件におかれたシロイヌナズナが鉄輸送体 IRT1 によってニッケルを吸収することにより鉄欠乏を感知し、さらに IRT1 を発現することでニッケル吸収量を増やすという負の連鎖が起こることが要因であることが示唆された。

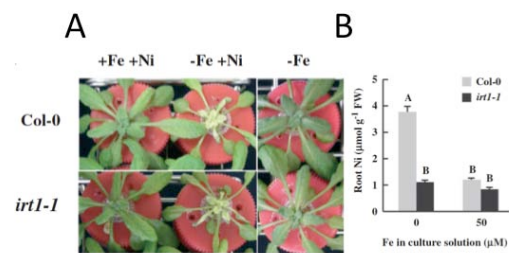


図2 *irt1* 遺伝子のノックアウトがシロイヌナズナのニッケル過剰症と集積に与える影響

(3) 鳥羽市菅島の高ニッケル環境における植物体内のニッケル-鉄相関

調査エリア(菅島西側)の10地点において土壌の採取を行い、土壌の金属特性

について調査した。このエリアの土壤は典型的な蛇紋岩由来の高ニッケル土壤であり、一般的な土壤の 116 倍のニッケルが含まれているほか、コバルト (46 倍)、クロム (62.5 倍) が多く含まれていた。また Mg/Ca 比も 7.7 と高く、一般土壤の値 0.33 と比較しても際だったマグネシウム含量が確認した。

2010 年 10 月から翌年 11 月までの約 1 年間の期間において菅島の蛇紋岩土壤地帯に分布する 76 種類の植物を採取し、ICP を用いてニッケルを含む 10 種類の金属含有量 (K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Cr, Co, Ni, Zn) について調査を行った。植物の平均ニッケル含量は $20.3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ D.W.}$ であり、日本の一般植物の約 10.5 倍であった。これらの植物の中でニッケル超集積性植物の基準 ($1,000 \text{ mg kg}^{-1} \text{ D.W.}$) を超えるものは存在しなかったが、島の中央部で優勢群落を形成するアサマツゲ *Buxus microphylla* が高いニッケル集積性を示し (平均 $471 \text{ mg kg}^{-1} \text{ D.W.}$) ニッケル強集積性を持つことが確認された。また一部のセンブリ *Swertia japonica*、タチツボスミレ *Viola grypoceras* A. Gray が 100 mg kg^{-1} を超えるニッケルを集積していた。 $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ D.W.}$ 以上のニッケルを集積する植物 (アサマツゲを除く) については、ニッケル含有率と鉄含有率の間に高い正の相関関係 ($r=0.90$) が認められた (図 3)。採取した植物の中には一般植物の平均鉄集積の 100 倍近い鉄集積を行う主も存在した。この結果は先のシロイヌナズナ IRT1 の実験結果と同様、鉄輸送体を経由したニッケル流入を示唆するものと考えられ、また一部の植物については、体内に過剰量の鉄を蓄積するメカニズムを発達させることによりニッケ

ルによる鉄欠乏症の発生を回避していることが示唆された。

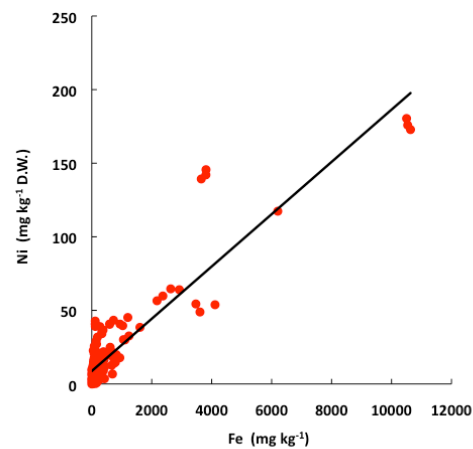


図3 三重県鳥羽市菅島の高ニッケル土壤に分布する植物のニッケル-鉄含量相関

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 4 件)

- ① Nishida S, Aisu A, and Mizuno T 2012. Induction of IRT1 by the nickel-induced iron-deficient response in Arabidopsis. Plant Signaling and Behavior. 査読有, 7, 1-3.
- ② Nishida S, Tsuzuki C, Kato A, Aisu A, Yoshida J and Mizuno T. 2011. AtIRT1, the Primary Iron Uptake Transporter in the Root, Mediates Excess Nickel Accumulation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology. 査読有, 52, 1433-1442
- ③ Nishida S, Morinaga Y, Obata H and Mizuno T. 2011. Identification of the N-terminal Region of TjZNT2, a Zrt/Irt-like Protein Family Metal Transporter, as a Novel Functional Region Involved in Metal Ion Selectivity. FEBS Journal, 査読有, 278, 851-858
- ④ Mizuno T, Horie K, Nosaka S, Obata H, and Mizuno N. 2009 Serpentine plants in Hokkaido and their chemical

characteristics. *Northeastern Naturalist*.
査読有, 16, 65-80

[学会発表] (計 6 件)

①西田翔・愛須彩加・水野隆文「重金属集積植物 *Thlaspi japonicum* 由来重金属トランスポーターの機能解析」日本土壌肥料学会 2011 大会 2011 年 8 月 8-10 日 つくば国際会議場 (つくば)

②橋本 洋平・水野 隆文 「X 線吸収分光法による蛇紋岩質土壌の Ni と Cr の化学形態分析」日本土壌肥料学会 2010 大会 2010 年 9 月 7-9 日 北海道大学 (札幌)

③西田 翔・加藤 亜季・都築 千里・愛須 彩加・鰐部 順平・小畑 仁・水野 隆文 「植物の亜鉛吸収経路を介したニッケルの過剰吸収」日本土壌肥料学会 2010 大会 2010 年 9 月 7-9 日 北海道大学 (札幌)

④Sho Nishida, Ayaka Aisu and Takafumi Mizuno 「Characterization of alternative splice variants of TjZNT1, a Zrt/Irt-like protein family metal transporter gene, of *Thlaspi japonicum*. *Plant Biology* 2010, the Montréal convention centre, Montréal, Canada. July 31-August 4 2010

⑤水野隆文 「日本の重金属超集積性植物-主に Ni と Mn について-」第 27 回日本植物細胞分子生物学会 (藤沢) 大会・シンポジウム・シンポジウム 3 「ストレス耐性植物: その基礎と利用の植物科学」2009 年 7 月 3 1 日 日本大学 (神奈川)

⑥西田 翔・都築知里・加藤亜季・小畑 仁・水野隆文「植物におけるニッケル吸収機構の解明」日本土壌肥料学会講演要旨集 第 55 集 P86 京都 (京都大学) 2009 年 9 月 1 5 日

[図書] (計 2 件)

①水野隆文 「6. 亜鉛、ホウ素、ニッケル、

塩素 (ニッケル担当)」in 間籐徹、馬健鋒、藤原徹編 「植物栄養学 第 2 版」pp. 177-181, 文永堂出版 (東京) (2010 年 4 月)

②水野隆文 「10 章 バイオレメディエーション・ファイトレメディエーション」in 吉原利一編 地球環境テキストブック 「環境科学」pp. 236-251, オーム社 (東京) (2010 年 3 月)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.mie-u.ac.jp/junkan/busshitsu/lab4/SSPN/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 隆文 (MIZUNO TAKAFUMI)

三重大学・大学院生物資源学研究所・准教授

研究者番号: 50346003