

科学研究費補助金研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580008

研究課題名(和文) イネのカドミウム輸送の分子機構解明と利用

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for cadmium translocation in 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

研究成果の概要(和文)：イネのOsHMA3は細胞の中の液胞膜に存在し、そこで液胞内へカドミウム(Cd)を輸送していることを明らかにした。通常、イネはOsHMA3の働きにより吸収したCdを根に蓄積させているが、OsHMA3の機能喪失により多量のCdが茎葉部に輸送されCdを高蓄積する仕組みを明らかにした。また、OsHMA3を用いて植物組織のCd蓄積を制御できる可能性が示されるとともに、タンパク質の改変によるCd輸送活性の制御の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In rice, cadmium (Cd) taken up in the cytoplasm of root cells is sequestered into the vacuole of the cells via OsHMA3, then loading to the xylem and translocation to shoots of Cd are limited. By contrast, in Cd over-accumulating rice, Cd remains at a higher concentration in the cytoplasm due to the lack of OsHMA3 function, and is available for loading to the xylem. This vacuole sequestrating by OsHMA3 is a key for over-accumulation of Cd in rice shoots. And we also demonstrated that the overexpression of *OsHMA3* allows control distribution of Cd in plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
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：農学・育種学

キーワード：植物分子育種

1. 研究開始当初の背景

有害重金属のカドミウム(Cd)は農耕地

に広くに蓄積しており、農産物を介して健康障害を引き起こす。この問題に対処する

ためには、植物が Cd を蓄積する機構を解明することが不可欠である。近年、Cd を高蓄積する植物の解析から HMA ファミリーに属す一群の重金属輸送体が Cd の蓄積に関わっていることが明らかになってきた。特に、Cd を茎葉部に多量に蓄積している植物では、導管へ Cd を送り出す輸送体が茎葉部への Cd 輸送を高めることで重要な役割を担っていることが明らかにされている。

我々は、茎葉部に多量の Cd を蓄積するイネ品種「長香穀」が、吸収した Cd を地上部へと高移行させることで日本品種の 5 倍もの Cd を茎葉部に蓄積する特徴を有することを明らかにした。この Cd 高移行性が単一劣性遺伝子に支配されており、その原因遺伝子として第 7 染色体に座乗する *OsHMA3* 遺伝子を同定してきた。「長香穀」が劣性で Cd 移行を高める特性から、*OsHMA3* は根の細胞で液胞内に Cd を輸送する役割を担っており、その機能が喪失されることで Cd が茎葉部に高移行すると考えられた。

この *OsHMA3* の機能を分子レベルで明らかにすることでイネにおける Cd 輸送機構解明の足掛かりが得られ、さらには *OsHMA3* を活用して根や葉といった器官特異的に Cd を集積させるイネの育成への道が開かれるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、*OsHMA3* の細胞内局在性を明らかにするとともに、*OsHMA3* の Cd 輸送活性を明らかにすることで我々の仮説を実証し、イネにおける Cd 蓄積機構の一端を分子レベルで明らかにすることを目的とした。さらに、*OsHMA3* の構造と Cd 輸送活性との関係を解析するとともに、*OsHMA3* 遺伝子による Cd 輸送の制御技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) *OsHMA3* による Cd 高移行機構の解明

Cd 高移行性品種の「長香穀」と Cd 低移

行性品種の「秋田 63 号」を 14 日間水耕栽培し、それらの根から抽出した全 RNA から cDNA を合成した。それらを鋳型とし、KOD plus (TOYOBO) を用いて *OsHMA3* の cDNA 全長を増幅した。これらの *OsHMA3* の cDNA の 3' 側に *EGFP* (Clontech) を融合させ、これらを *35s* プロモーターと *Nos* ターミナーター間に連結した。これらのプラスミドをタマネギ表皮細胞に遺伝子銃で導入し、25°C で 24 時間後に蛍光顕微鏡で GFP の蛍光を観察した。

また、これら *OsHMA3* の cDNA を *pYes2* (Invitrogen) にクローニングした誘導ベクターを構築し、酵母野生株 (IB1383) と YCF1 (Yeast Cadmium Factor 1) を破壊した Cd 感受性変異株 $\Delta ycf1$ (YDR135c) に形質転換した。形質転換した酵母を 2% D(+)-Galactose を添加した SD 液体培地を用いて 30°C で一晩前培養した。細胞密度を 1×10^7 /ml に合わせ、 $10^7 \sim 10^3$ の希釈系列を作成し、CdCl₂ を添加した 2% D(+)-Galactose を含む SD 寒天培地にスポットして 30°C で 5 日間培養した。

さらに、*OsHMA3* の cDNA を pCambia1301M の *35s* プロモーターと *Nos* ターミナーター間に挿入してバイナリベクターを構築した。これらをシロイヌナズナのエコタイプ Col-0 (Col) にアグロバクテリウムを介して導入した。

様々な濃度で CdCl₂ を添加した 1/2MS 寒天培地を 50mL 分注した角形 2 号シャーレに、形質転換系統の種子を殺菌して播種した。4°C で 2 日間の低温処理後に明期 16 時間/暗期 8 時間に設定した人工気象器を用いて 22°C で生育させ、10 日または 14 日後に根長を測定した。

(2) *OsHMA3* の機能解析

「秋田 63 号」の *OsHMA3* の cDNA を

鋳型とし、PCRにより終止コドンを導入してC末端領域を削った4種類のcDNAを作成した。これらをバイナリーベクターのpCAMBIA1301Mの35SプロモーターとNosターミネーターの間に挿入した。これらをシロイヌナズナ(Co1)に導入し、形質転換系統(C889、C836、C788およびC872)を作出した。

CdCl₂を30および90 μMの濃度で添加した1/2MS寒天培地を50mL分注した角形2号シャーレに、殺菌処理した形質転換系統の種子を播種した。4℃で2日間の低温処理後、22℃で明期16時間/暗期8時間の条件で生育させ、2週間後に根長を測定した。

(3) OsHMA3によるCdの移行制御

「秋田63号」の*OsHMA3*のcDNAを含むバイナリーベクターをアグロバクテリウム法で「日本晴」カルスに形質転換し、選抜したハイグロマイシン耐性カルスから植物体を再生させた。一部の個体を5 μg L⁻¹のCdCl₂を含む水耕液を用いて明期14hr; 26℃/暗期10hr; 22℃の人工気象器で14日間水耕栽培を行ない、形質転換イネのCd移行能を解析した。

水耕栽培した植物体を地上部と地下部に分割し、105℃で24時間乾燥した。乾物重を計測後、過塩素酸法により分解してCd濃度をICP発光分析装置で測定し、植物体のCd濃度、Cd蓄積量およびCd移行率(全Cd蓄積量に占める地上部Cd蓄積量の割合)を求めた。

4. 研究成果

(1) OsHMA3によるCd高移行機構の解明

「長香穀」においてCdを地上部へ高移行させる遺伝子として同定された*OsHMA3*はP_{1B}-ATPaseファミリーに属し、アミノ酸配列

の解析から2価の重金属を排出する膜輸送体に分類された。OsHMA3が重金属を輸送する膜を特定するため、GFPとOsHMA3との融合タンパク質をタマネギ表皮細胞で発現させたところ、緑色蛍光は細胞の周辺部で観察され、かつ、一部で蛍光が細胞内に窪んで発現していた(図1A)。この部分には核が存在しており、GFPの蛍光が核を避けるように発現していることが明らかとなった(図1B)。このことから、OsHMA3は液胞膜に局在し、液胞内へと2価の重金属を輸送する機能を担っているものと推定された。

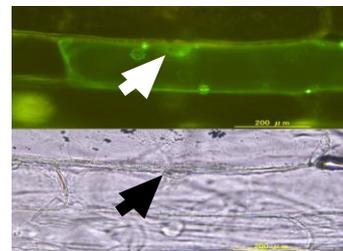


図1. OsHMA3の細胞内局在性(矢印は核)

次に、OsHMA3が機能する組織を特定するため、水耕栽培した「長香穀」と「秋田63号」の葉と根を用いてRT-PCRにより発現を解析したところ、何れの品種でも主に根で発現していることがあきらかとなった。また、根に比べて発現は弱いもの葉でも発現していることが明らかになった。すなわち、OsHMA3は根や葉においてCdを含む2価の重金属の膜輸送に関わっていることが示唆された。

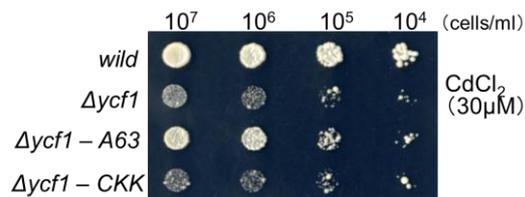


図2. 酵母におけるOsHMA3のCd輸送機能の解析

OsHMA3がCdを輸送することを明らかにするため、液胞へのCd輸送体をコードする*YCF1*遺伝子が破壊された酵母($\Delta ycf1$)で

「秋田 63 号」と「長香穀」の *OsHMA3* を発現させた。野生株は増殖が抑制されるものの $60 \mu\text{M}$ の CdCl_2 を含む培地で増殖できた。これに対し、変異株 ($\Delta ycf1$) は $30 \mu\text{M}$ の CdCl_2 を含む培地で殆ど生育できなかったが、「秋田 63 号」由来の *OsHMA3* を発現させた変異株 ($\Delta ycf1\text{-A63}$) は $30 \mu\text{M}$ の CdCl_2 を含む培地で増殖することができた (図 2)。このように「秋田 63 号」の *OsHMA3* が YCF1 の機能を相補したことから、イネの *OsHMA3* が Cd を液胞へと輸送するものと考えられた。

一方、「長香穀」由来の *OsHMA3* を発現させた変異株 ($\Delta ycf1\text{-CKK}$) は $30 \mu\text{M}$ の CdCl_2 を含む培地で増殖できなかったことから (図 2)、「長香穀」の *OsHMA3* は Cd 輸送機能が著しく弱い、喪失しているものと結論した。



図 3. CdCl_2 ($60 \mu\text{M}$) を含む培地でのシロイヌナズナ (Col) と *OsHMA3* (「秋田 63 号」) の形質転換体の成長

植物においても *OsHMA3* が Cd を輸送することを確認するため、液胞への Cd 輸送体である *AtHMA3* がフレームシフトにより機能を喪失しているシロイヌナズナの Col-0 (Col) に *OsHMA3* を導入して Cd 存在下での成長への影響を解析した。

Col は $60 \mu\text{M}$ の CdCl_2 を含む培地で根の伸長が著しく抑制されたが、「秋田 63 号」由来の *OsHMA3* を導入した形質転換体は同じ培地で根が伸長し、根長が有意に長くなった (図 3、4)。これは *OsHMA3* が形質転換体の根で液胞内に Cd を輸送したことで細胞質の Cd 濃度が低下して Cd の毒性が軽減されたためと考えられ、*OsHMA3* が植物においても Cd を輸送しているものと結論した。

これに対し、「長香穀」の *OsHMA3* を導入

した形質転換体の根長は Col と同程度で Cd による根の伸長阻害が緩和されなかったことから、植物においても「長香穀」の *OsHMA3* の機能が喪失あるいは著しく低下していることが確認された (図 4)。

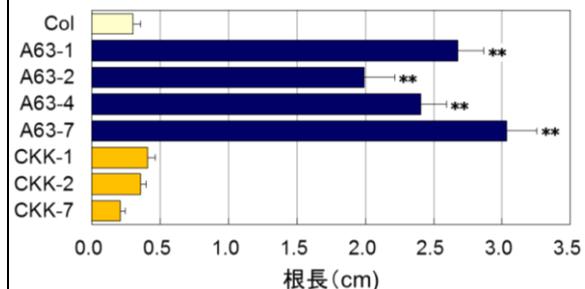


図 4. シロイヌナズナにおける *OsHMA3* の機能解析
A63:「秋田 63 号」由来の *OsHMA3* の形質転換系統
CKK:「長香穀」由来の *OsHMA3* の形質転換系統
**: Col との 1%水準での有意差。

以上のように、*OsHMA3* 遺伝子にコードされる膜輸送体が液胞へと Cd を輸送すること、また、Cd 高移行性を示す「長香穀」では *OsHMA3* 遺伝子に生じた構造変異によって Cd 輸送機能が喪失または著しく低下していることが明らかとなった。

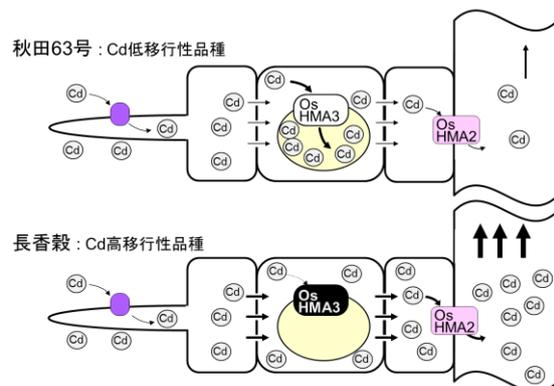


図 5. イネにおける *OsHMA3* による Cd 移行モデル

すなわち、「秋田 63 号」などの通常のイネでは、吸収された Cd は根の細胞において *OsHMA3* により液胞に蓄積される。そのため地上部への Cd 移行が抑えられている (図 5)。これに対し、「長香穀」では *OsHMA3* の機能喪失で根の細胞質に残留した Cd が導管へと

排出され、地上部へと高移行する仕組みが明らかとなった (図 5)。

(2) OsHMA3 の機能解析

OsHMA3 には、膜貫通ドメインの後に 9 個のシステインペアを含む長い C 末端領域 (273aa) が存在しているが、「長香穀」の OsHMA3 は C 末端領域の 53aa が欠失していた。植物の HMA ファミリーには長い C 末端領域が存在しているが、その長さや配列は遺伝子によって異なっている。OsHMA3 の C 末端領域の役割を明らかにするため、C 末端領域を削った遺伝子をシロイヌナズナに導入し、植物における Cd 輸送活性への影響を解析した。

90 μ M の CdCl₂ を含む培地において、C889 と C836 は OsHMA3 と同程度の根長を示したのに対し、C788 と C872 の根長は Col と有意差が無く Cd によって伸長が抑制された (図 6)。培地の CdCl₂ 濃度を 30 μ M に低下させた場合にも同様の結果が得られたことから、C788 と C872 では Cd 輸送活性が失われているものと考えられた。

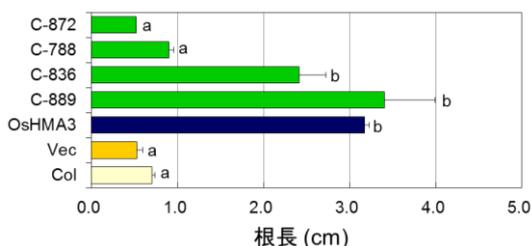


図 6. シロイヌナズナにおける OsHMA3 の C 末端領域が Cd 輸送におよぼす影響 (90 μ M CdCl₂ 培地) 異なるアルファベット: 1%水準で有意差 (Tukey)

また、C 末端領域を 216aa 削った C788 の細胞内局在性は変化しておらず、液胞膜に局在していたことから、削った 216aa に Cd 輸送に必要な構造が存在するものと考えられた。さらに、C836 では C 末端から 168aa が削られていることから、少なくとも膜貫

通ドメインに続く 105aa が液胞への Cd 輸送に必要であることが明らかとなった。

今後、この領域の構造解析を進めることで OsHMA3 の Cd 輸送における C 末端領域の役割を明らかにすることで、Cd 輸送機能の改変が期待される。

(3) OsHMA3 による Cd 移行の制御

OsHMA3 は液胞内に Cd を特異的に輸送して Cd の毒性を軽減することが明らかとなった。OsHMA3 を様々な組織で発現させることで Cd 移行を制限し、組織に障害を与えずに多量の Cd を蓄積できる植物の育成が期待される。

そこで、OsHMA3 をイネで強発現させることで Cd 移行の制御を試みた。イネ品種の「日本晴」(NIP) は正常な OsHMA3 を持つため茎葉部への Cd 移行率は 20% 程度である (図 7)。これに対し、OsHMA3 を 35s プロモーターによって高発現させた形質転換イネ (35s) では、茎葉部への Cd 移行率が僅か 4% に低下し、茎葉部への Cd 移行をさらに制限できることが明らかとなった (図 7)。

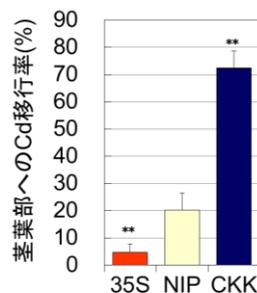


図 7. OsHMA3 による Cd 移行の制御
CKK: 「長香穀」、NIP: 「日本晴」、
35s: OsHMA3 を強発現させた「日本晴」
**: NIP に対して 1%水準で有意に異なる

「長香穀」では OsHMA3 が機能していないため茎葉部への Cd 移行が高まっているが、その茎葉部で OsHMA3 を高発現させることで、Cd による障

害を軽減させ、かつ多量の Cd を蓄積するイネの作出が期待される。

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4件)

- ① Miyadate H., Adachi S., Hiraizumi A., Tezuka K., Nakazawa N., Kawamoto T., Katou K., Kodama I., Sakurai K., Takahashi H., Satoh N., Watanabe A., Fujimura T., Akagi H., OsHMA3, a P_{1B}-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles, *New Phytologist*, 査読有、189、2011、190-199
- ② Watanabe A., Ito H, Chiba M, Ito A, Shimizu H, Fuji S, Nakamura S, Hattori H, Chino M, Satoh N, Takahashi H, Sakurai K, Akagi H., Isolation of novel types of Arabidopsis mutants with altered reactions to cadmium: cadmium-gradient agar plates are an effective screen for the heavy metal-related mutants、*Planta*、査読有、232、2011、825-836
- ③ Tezuka K., Miyadate H., Kato K., Kodama I., Matsumoto S., Kawamoto T., Masaki S., Satoh H., Yamaguchi M., Sakurai K., Takahashi H., Satoh 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*、査読有、120、2010、1175-1182

[学会発表](計9件)

- ① 熊谷さおり、堀川悠佑、相馬美沙子、佐藤奈美子、高橋秀和、櫻井健二、渡辺明夫、赤木宏守、イネ属の A ゲノム野生種における *OsHMA3* 遺伝子の進化とカドミウム移行の多様性、日本育種学会第 123 回講演会、2013 年 3 月 28 日、東京農業大学
- ② 熊谷さおり、鈴木辰弥、佐藤奈美子、高橋秀和、櫻井健二、渡辺明夫、赤木宏守、イネのカドミウム輸送体(OsHMA3)の C 末端領域の機能解析、日本育種学会第 122 回講演会、2012 年 9 月 1 日、京都産業大学
- ③ 熊谷さおり、鈴木辰弥、佐藤奈美子、高橋秀和、櫻井健二、渡辺明夫、赤木宏守、イネの OsHMA3 の構造がカドミウム輸送に及ぼす影響、第 7 回東北育種研究集会、2012 年 8 月 20 日 秋田県立大学
- ④ 宮舘秀典、手塚耕一、佐藤奈美子、櫻井健二、高橋秀和、渡辺明夫、赤木宏守、イネの液胞への重金属輸送体(OsHMA3)はイネのカドミウム移行を制御する、第 5 回東

北育種研究集会、2010 年 8 月 26 日、東北大学

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

(2)研究分担者

渡辺 明夫(WATANABE AKIO)
秋田県立大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号:50325940
中沢 伸重(NAKAZAWA NOBUSHIGE)
秋田県立大学・生物資源科学部・教授
研究者番号:40315586