

## 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23年 4月16日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010年度～2011年度

課題番号：22780295

研究課題名（和文）ポリリン酸共役型輸送エンジニアリングによるカドミウム浄化植物の創生

研究課題名（英文）Development of transgenic plant for enhanced uptake and accumulation of cadmium

研究代表者

長田 武（NAGATA TAKESHI）

摂南大学・理工学部・講師

研究者番号：70411709

研究成果の概要（和文）：我々は現在までにポリリン酸キナーゼ（PPK）をコードした *ppk* 遺伝子組換え植物の創生に成功している。ポリリン酸はカドミウムなどの二価金属をキレートする性質を持っている。本研究では土壌中のカドミウムを積極的に植物細胞内へ取り込ませるためにカドミウムトランスポーターをコードする *zip8* 遺伝子を *ppk* 遺伝子組換え株へ導入を試みた。その結果、多数の遺伝子組換え候補株が得られ、一株のゲノム中に *zip8* 遺伝子の存在が確認された。*zip8* 遺伝子及び *ppk* 遺伝子を導入した遺伝子組換え株の創生に成功したと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To accelerate and enhance the uptake of cadmium into the *ppk*-transgenic tobacco, a cadmium-transport gene *zip8* was further integrated into the tobacco genome. A large number of independent transgenic tobacco plants were obtained, in some of which the *zip8* gene were stably integrated in the plant genome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境浄化

## 1. 研究開始当初の背景

イタイイタイ病に知られるようにカドミウムは極微量でヒトの健康に重篤な障害を与えるため、現在、その使用と廃棄が厳しく規制されている。しかし、カドミウムは微量ながらも環境中に残存し、汚染米など食物を介したヒトへの健康影響が懸念されている。加えて現在のカドミウム浄化法は汚染土壌の洗浄や埋め立てによる隔離など物理化学的方法のみであり、根本的な解決とはなっていない。このような現状を打破するために、環境中のカドミウムを安全かつ有効に浄化するシステムの開発が必要とされている。

我々はポリリン酸を発現し得る遺伝子組

換え植物を創生し、水銀汚染土壌の浄化への適用について研究を行ってきた。ポリリン酸とは、主に細菌や酵母などがリン酸を基質としてポリリン酸キナーゼ（PPK）の作用により合成される生体内分子であり、無機水銀など二価の重金属イオンをキレートすることが知られている。我々は小型植物と比較して葉が大きく、昆虫等に補食されにくい *Nicotiana tabacum*（タバコ）へ、*Klebsiella aerogenes* 由来のポリリン酸キナーゼ遺伝子 *ppk* を導入した（*ppk* 遺伝子組換えタバコ）。本遺伝子組換えタバコが野生株と比較して高い水銀耐性能及び水銀蓄積能を示

すことを初めて明らかにし(Nagata T. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006、Nagata T., *Biol. Pharm. Bull.* 2006)、本遺伝子組換えタバコを用いることで水銀汚染土壌の浄化が可能であることが判明した。

また、ポリリン酸は水銀だけでなくカドミウムに対してもキレート活性を有することから、*ppk* 遺伝子組換えタバコのカドミウム耐性能を検討したところ、野生株と比較して高い耐性能を有することが判明した(Nagata T., *J. Toxicol. Sci.* 2008)。そこで、本研究では*ppk* 遺伝子組換えタバコがより早く、より効率的にカドミウム浄化を行うためにカドミウムトランスポーターをコードする*zip8* 遺伝子を導入する。

## 2. 研究の目的

*ppk* 遺伝子組換えタバコにカドミウム取り込み活性を付加するため、カドミウムトランスポーター遺伝子 *zip8* を導入し、*ppk/zip8* 遺伝子組換えタバコを創生する。

## 3. 研究の方法

### ①PCR による mouse ZIP8 cDNA の増幅と HA-tag 配列の付加

雄性ICRマウス肝臓から、定法に従い総RNAを抽出し、その後、逆転写酵素SuperScript II (Invitrogen社)とOligo(dT)<sub>20</sub>プライマーを用いてcDNAを合成した。このcDNAを鋳型として、PCR法により遺伝子を増幅し、HA-tag配列を付加した*zip8*遺伝子断片を合成した。まず、鋳型cDNA、primer mZIP8-F (5'-gggtccctgcacagcta-3' ; 10 μM) 及び primer mZIP8-R (5'-cgcggttgacgttatactcca-3' ; 10 μM) をそれぞれ0.5 μL、x10 PCR buffer、2mM dNTPsをそれぞれ 5 μL、25mM MgSO<sub>4</sub> 2 μL、KOD plus DNA polymerase (Toyobo社) 1 μLに滅菌精製水を加えて全量を50 μLとした。この反応溶液を94°Cで120秒間反応させ、続いて94°C 15秒、60°C 30秒、68°C 1分、を30サイクル繰り返し、最後に72°Cで10秒反応させた。このPCR反応液0.1 μLを鋳型に、primer mZIP8-F-TOPO (5'-caccatggctccggcggcagct-3' ; 10 μM) 及びprimer mZIP8-R-stop (5'-ctactgcaattcgatgtctcctgcgtacaa-3' ; 10 μM)を用い、再度、PCR反応を行った。得られたPCR反応液についてアガロースゲル電気泳動を行い、1.4kbp付近のmZIP8 cDNAと思われる遺伝子断片をゲルから抽出した。ゲル抽出には、PureLink Gel Extraction Kit (Invitrogen社)を用いた。

次に、このゲル抽出液 0.1 μL を鋳型に、primer mZIP8-F-TOPO (10 μM) 及び primer mZIP8-R-HA (5'-gacgtcgtatgggtactgcaattcgatgtc-3' ; 10 μM)を用い、PCR 反応を行った。再度、このPCR 反応液を鋳型に、primer mZIP8-F-TOPO (10 μM) 及び primer R-HA (5'-ttaagcgtagtctgggacgtcgtatgggta-3' ; 10 μM)を用い、PCR 反応を行った。このPCR 反応液について、再度、アガロースゲル電気泳動を行い、1.4kbp 付近のバンドをゲル抽出することで、cacc 配列及びHA-tag 配列を付加したmZIP8 cDNA (約1.4kbp)を得た。

### ②エントリーベクター (pENTR/D-TOPO) への mZIP8 cDNA の導入

PCR 法により得た cacc 配列及び HA-tag 配列を付加した mZIP8 cDNA を、pENTR/D-TOPO クローニングキット (Invitrogen 社)を用いた Directional TOPO クローニングにより、pENTR/D-TOPO に連結し、エントリークローン pENTR/mZIP8-HA を作成した。

### ③バイナリーベクター (pBIDAVL-GWR1) への ZIP8 cDNA の導入

Directional TOPO クローニングにより得たエントリークローン (pENTR/mZIP8-HA) と、デスティネーションベクターとして pBIDAVL-GWR1 (Inplanta 社)を用い、LR clonase II (Invitrogen社)を用いるLR反応を行うことで、pBIDAVL-GWR1/mZIP8-HAを作成した。なお、pBIDAVL-GWR1/mZIP8-HA作成の際、エントリークローンとデスティネーションベクターの薬剤耐性遺伝子がともにカナマイシン耐性遺伝子であり、薬剤耐性による選抜が不可能であるため、エントリークローンをあらかじめ *EcoRV*により消化したものをを用いてLR反応を行い、pBIDAVL-GWR1/mZIP8-HAを得た。

### ④pBIDAVL-GWR1/mZip8-HA の *Agrobacterium tumefaciens* への形質転換

上記で調製したコンピテントセルの懸濁液を予冷しておいた Pulser Cuvette にとり、これに pBIDAVL-GWR1/mZip8-HA を加え、懸濁させた。この Cuvette を GENE PULSER II にセットし、放電することにより pBIDAVL-GWR1/mZip8-HA を *A. tumefaciens* へ形質転換を行った。形質転換後、直ちに SOC 溶液を加え 25°C で 1 時間培養した。この培養液を kanamycin 含有 LB プレートに塗抹し、25°C で二日間培養して形質転換クローンを得た。

### ⑤タバコ葉への *zip8* 遺伝子をもつ *A.*

*tumefaciens* のタバコ葉への感染

pBIDAVL-GWR1/mZip8-HA をもつ *A. tumefaciens* を kanamycin 含有 LB 液体培地中に 25°C で 3 日間、振盪培養した。この培養液 200  $\mu$ L を同培地 50ml に添加し、25°C で 2 日間、振盪培養した。この培養液 25mL を、クリーンベンチ内でシャーレに入れた。植え継ぎ培養したタバコの葉を、この培養液中でメスを用いて約 5–10mm 角の切片にした。この切片を滅菌キムタオルで軽く脱水した。この葉を、表面にろ紙をのせた共存 MS 培地に葉を裏にしてのせた。これを 25°C で 2 日間、光照射下で *A. tumefaciens* とタバコ葉を共存培養し、感染させた。

⑥ 遺伝子組換えタバコ株のカルス化およびシュート化

*A. tumefaciens* を感染させたタバコ葉を、選抜 MS 培地に移植した。これを 25°C で 2 週間、光照射下で培養し、カルス化を促した。2 週間後、葉の切片から未分化細胞塊であるカルスを得た。次に、カルスを無菌的に分割し、シュート化 MS 培地に移植した。これによりカルスからのシュート化を促した。

⑦ CTAB 法によるタバコ葉からの DNA 抽出

液体窒素でよく冷やしておいた乳鉢にサンプルの植物試料 (~0.5g) を入れ、液体窒素を足しながら乳鉢を用いて粉碎した。粉碎した試料をすべて 1.5mL エッペンドルフチューブに移し、蓋を開けたまま冷蔵庫に置き、液体窒素を完全に蒸発させた。その後、試料の重量を測定し、等量 (試料 1mg あたり 1  $\mu$ L) の 2 $\times$ CTAB 抽出緩衝液を加えてよく混和した。試料を 65°C で 20 分静置後、室温まで冷まし等量の Chloroform/IAA 混液を加え激しく攪拌した。それを室温、14,000rpm で 5 分間遠心し水層 (上層) を取り、新しい 1.5mL エッペンドルフチューブに移した。そこに、1/5 量の CTAB/NaCl を加えて混和し、等量の chloroform/IAA 混液を加え激しく攪拌した。再度室温、14,000rpm で 5 分間遠心し水層 (上層) を取り、新しい 1.5mL エッペンドルフチューブに移した。そこに等量の CTAB 沈殿緩衝液を加え穏やかに混合し、室温で 1 時間放置後それを室温、14,000rpm で 5 分間遠心した。上清を捨て、沈殿に相当量の High-salt TE を加え、65°C に保温して沈殿を溶解させた。それを室温で冷まし、2 倍量の予冷しておいたエタノールを加え混合した。2 時間以上冷蔵庫に入れ、その後 4°C、10,000rpm で 20 分間遠心し上清を捨て、沈殿を 1mL の 80% エタノールで洗浄し、4°C、10,000rpm で 5 分間遠

心し上清を捨て、沈殿を軽く減圧乾燥した。それを適当量の精製水に溶解し DNA 溶液とした。DNA を抽出できているかどうかを確認するため、本溶液 1  $\mu$ L に滅菌精製水 9  $\mu$ L、Dye 溶液 1  $\mu$ L 加えて 0.8% アガロースゲルで 100V、30 分間電気泳動した。電気泳動後、EtBr で染色し、精製水で脱色後、紫外線を照射して DNA を確認した。

⑧ PCR 法による *zip8* 遺伝子の検出

PCR 反応液を PCR チューブに入れ、⑦で得た DNA 溶液及び *zip8* 遺伝子を有するプラスミドを用いた PCR により合成したポジティブコントロールを 1  $\mu$ L 加え、オイルを 50  $\mu$ L 加えた後、PCR Thermal Cycler を用いて 94°C 1 分、60°C 1 分、72°C 2 分のサイクルを 30 回繰り返し反応させた。得られた溶液 1  $\mu$ L に滅菌精製水 9  $\mu$ L、Dye 溶液 1  $\mu$ L 加えて 0.8% アガロースゲルで 100V、30 分間電気泳動した。

#### 4. 研究成果

① *A. tumefaciens* の調整

プラスミド pBIDAVL-GWR1/mZIP8-HA (Fig. 1) を有する *A. tumefaciens* を選抜液体 LB 培地 5mL 中で 25°C、2 日間振とう培養した。形質転換時には Fig. 1 における RB から LB までが植物ゲノムに導入される。また、このプラスミドにはカナマイシン耐性遺伝子 (*nptII*) が付加されている。そのため、カナマイシンを曝露する事により、遺伝子が導入されたかを選抜する事ができる。また、pBIDAVL-GWR1、*zip8-HA* の大きさはそれぞれ 14kbp、1.6kbp であり、遺伝子導入の確認の際に行う PCR により増幅される配列の大きさは *zip8-HA* の配列のうち、特に選択性の高い一部にプライマーを設計したため、PCR で合成される遺伝子断片は 0.4kbp である。

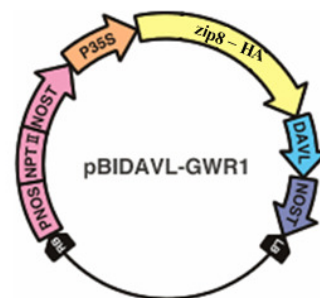


Fig. 1 プラスミド pBIDAVL-GWR1/mZIP8-HA

② *A. tumefaciens* のタバコ葉への感染

葉を約 5 日間 *A. tumefaciens* と共存培養し、感染させた。以上の方法によりタバコ葉約 1000 切片への形質転換を行った。

### ③遺伝子組換え候補株の選抜

葉切片のカルス化 (Fig. 2)、シュート化 (Fig. 3) により得られたシュートを、選抜 MS 寒天培地に移植した。その後地上部から発根し、個体再生が確認された株を組換え候補株として選抜した。*ppk* 組換え株に対して組換えを行ったシュートは 42 株中 3 株、野生株に対して選抜を行ったシュートは 50 株中 5 株が組換え候補株として得られた。

また、得られた野生株のシュートを、選抜せずに MS 寒天培地に移植したものは、6 株中 6 株全てに個体再生が確認された。



Fig. 2 葉切片のカルス化

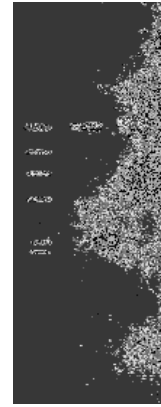


Fig. 3 カルスのシュート化

### ④CTAB 法によるタバコ葉からの DNA 抽出

PCR 法による *zip8* 遺伝子の検出を試みる前に、DNA 抽出に成功していることを確認するため、電気泳動後、EtBr で染色し、精製水で脱色後、紫外線を照射して DNA を確認した。その結果、Fig. 4 のレーン 2 及び 3 に、タバコ葉から抽出したゲノム DNA が確認された。また、RNA のコンタミもされなかったことから、次に本試料を用いて PCR 法による *zip8* 遺伝子の検出を試みた。

1 2 3

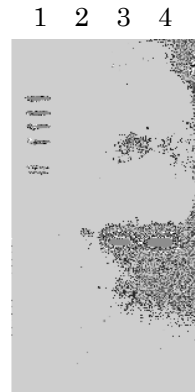


1 :  $\lambda$  / H  
2 : *ppk* 組換え株  
3 : 候補株

Fig. 4 組換え候補株の DNA 確認

### ⑤PCR 法による *zip8* 遺伝子の検出

Fig. 5 のレーン 2 より *zip8* 遺伝子を組換えしていない株には 0.4kb の遺伝子断片が観察されず、レーン 3 に示す *zip8* 遺伝子を導入した *ppk* 組換え株とレーン 4 に示すポジティブコントロールでは同じサイズの遺伝子断片が合成されたことが確認された。これらの結果より、*ppk* 組換え株に *zip8* 遺伝子が導入されていると考えられる。この *zip8* および *ppk* 組換え株を「PZ-1」と命名した。



1 :  $\lambda$  / H  
2 : *ppk* 組換え株  
3 : *zip8* 組換え P-20 株  
4 : P. C.  
←0.4kb

Fig. 5 組換え候補株の *zip8* 遺伝子の確認

### ⑥組換え株が示す表現型

*zip8* 遺伝子の検出に成功した若苗を 1/2MS 液体培地を入れ、PZ-1 を挿した。特徴として、野生株と比較して非常に生育が遅く、葉が厚く、根の伸長および分枝が観察されなかった。また、3 週間後には葉の緑色色素が減少し、新しい葉の展開も見られず矮小な表現型を有することが分かった (Fig. 6)。

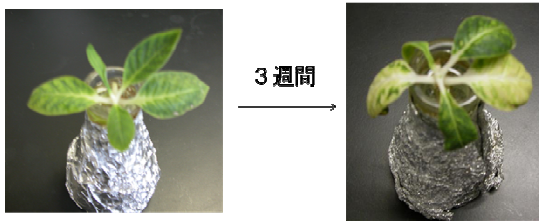


Fig. 6 PZ-1 の表現型

## 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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権] (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~bio/labo/nagata.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長田 武 (NAGATA TAKESHI)

摂南大学・理工学部・講師

研究者番号：70411709