

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580092

研究課題名(和文) 野生植物メリケンカルカヤの高アルミニウム耐性機構に関わる候補遺伝子群の解析

研究課題名(英文) Characterization of candidate genes related to the high aluminum tolerant mechanisms in a wild plant, *Andropogon virginicus*

研究代表者

江崎 文一 (Ezaki, Bunichi)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：90243500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：イネ科野生植物メリケンカルカヤの高いAl耐性機構を遺伝子レベルで解明するために、AvSAMS1遺伝子とABC-transporter遺伝子(AvABCG1)の機能解析を進めた。まず両遺伝子を持つシロイヌナズナ形質転換株はAl、Cu、diamide、Zn等に耐性を示した。またAlストレス下では植物のDNAのメチル化状況が変化すること、AvSAMS1遺伝子がゲノム全体のエピジェネティック制御に関与することが示唆された。一方、AvABCG1 transporterの根、葉での局在性や金属輸送活性の解析結果から、この蛋白質はAlやPbの根や葉等の特定組織への集積に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify high Al tolerance mechanism in a poaceae wild plant, *Andropogon virginicus* L., its two candidate genes, S-adenosyl methionine synthase (AvSAMS1) and ABC transporter (AvABCG1), were characterized. The constructed two *Arabidopsis* transgenic lines expressing these two genes showed multiple tolerance phenotypes for Al, Cu, diamide or Zn. Microarray analysis and other experiments suggested that Al stress causes a dynamic change in DNA methylation status and that the AvSAMS1 gene is related to an epigenetic control of gene-expression under Al stress. It was also suggested that the AvABCG1 transporter functions for an accumulation of toxic Al and Pb in root and/or leaf, rather than a transportation of these metals from root to shoot.

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：植物栄養代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は、これまでに酸性土壌特有の植物生育障害をもたらすアルミニウム (Al) ストレスで誘導される 5 遺伝子を見つけ、それらを高発現するシロイヌナズナ形質転換体を創生して Al 耐性になることを示した。さらにそれらが関与する耐性機構を明らかにしてきた。最近では Al 高耐性の有用野生植物としてメリケンカルカヤとススキを選抜し、それらが持つ耐性機構を詳細に解析するとともに、重金属毒性や酸化ストレスにも耐性であることを示した。現在、これらの耐性機構に関する遺伝子レベルでの解析を進めており、Al 誘導性や耐性遺伝子として其々 ABC transporter 遺伝子 (*AvABCG1*) と SAMS 遺伝子 (*AvSAMS1*) 等を単離した。Al ストレスで前者は根と地上部の両方で、後者は根でのみ誘導されることも明らかとなり、耐性との関わりの上で興味深い。

(2) SAMS (S-adenosyl methionine syntase) により合成される SAM はポリアミン合成やエチレン合成などの重要な中間産物である。植物ではこれらの合成系に用いられる SAM は全体の 10% 程度に過ぎず、残り 90% は染色体 DNA 等のメチル化に使われるという報告もある。これは遺伝子のエピジェネティック制御 (塩基配列の変更を伴わぬ後天的な修飾での発現制御) に必須な機能であり、ストレス下で SAM により多数の遺伝子の発現が総括的に制御される可能性があるが、SAM とストレス耐性についての解析はほとんど無い。

(3) ABC transporter は細胞内からの毒性物質の排除機構に関わる蛋白であることが一般に知られており、いくつかの金属ストレス耐性関連の ABC transporter が植物でも報告されている。既に江崎はメリケンカルカヤが根で吸収した Al を地上部に高率で輸送することや、この遺伝子が Al ストレス誘導性であることを明らかにしており、この輸送機構との関連性が強く期待された。

2. 研究の目的

地球環境の改善や食糧問題の解決のために、環境の劣悪化から生じた広大な問題土壌を農業面で有効利用することは重要である。それには金属ストレスや酸化ストレス等に耐性を示す植物を創生できるかが、鍵となる。そのためにこれらのストレスに耐性の植物は何か? その耐性機構は何か? 高い耐性機構に関連する遺伝子群はどれか? 等を順序立てて解明していく必要がある。本研究では上記の多種のストレスに耐性を示すメリケンカルカヤに着目してその有用な耐性機構とそれに関連する遺伝子を解析し、耐性植物を構築することを目的としている。今回は特にこの植物由来の *AvABCG1* 遺伝子と *AvSAMS1* 遺伝子に焦点を当てて検討することにした。

3. 研究の方法

(1) 植物材料と生育条件

本研究では、*A. virginicus* とシロイヌナズナ Col-0 株、及び *A. virginicus* 由来の

AvSAMS1 遺伝子と *AvABCG1* 遺伝子 (各々、cDNA) の発現株を用いた。これらの植物は 25 °C で明期 16 時間、暗期 8 時間の照明条件で土耕栽培または水耕栽培された。なお水耕栽培には Murashige-Skoog 培地を 6 倍希釈し、pH を 5.7 に調整して用いた。

(2) ストレスの処理方法

マイクロアレイ実験のための Al ストレス負荷では、培養土から根を痛めないように静かに分離した土耕栽培の植物体 (発芽後約 3 週目) を用いた。これらの根を十分量のストレス負荷用培養液 (前述の水耕用培地と同じ組成で pH 4.2 に調整) に 6 時間、浸漬した。処理した植物体は total RNA 抽出に用いるまで、-80 °C で保存した。

またストレス感受性試験を行う場合は、発芽後 10 ~ 14 日後の水耕栽培の植物体を其々のストレスサーを含む培養液中に 2 日間根を浸漬した後、根長を測定した。各ストレスの負荷条件は 300 μ M AlCl₃, 100 μ M CdCl₂, 100 μ M CuSO₄, 200 μ M ZnCl₂, 1 mM H₂O₂, 1 mM diamide である。感受性は未処理区の植物体の根長と比較して、相対的根伸長度 (%) として表した。

(3) マイクロアレイ解析

Total RNA は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社製) を用いて抽出した。得られた RNA の純度は Bioanalyzer (Agilent Technologies 社製) で確認後、Cy3 または Cy5 で標識し (cRNA 標識)、DNA マイクロアレイスキャナ G2565CA #003 (Agilent Technologies 社製) で解析した。なお今回はシロイヌナズナのマイクロアレイ (Agilent Technologies 社製) を用いた。

(4) バイサルファイト処理と CG 配列を多数含む遺伝子 DNA 断片の調製

2 日間の 300 μ M AlCl₃ 処理 (または未処理) した植物体からゲノム DNA を抽出後、2 μ g 相当量を用い、MethylEasy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (Takara 社製) でバイサルファイト処理を行い、未メチル化状態の C を T へ変換処理した。処理した DNA は、メチル化 DNA 用の遺伝子特異的な PCR プライマーを用いて PCR 反応により増幅した。なおプライマーの設計には Methyl Primer Express Software v1.0 (free soft supplied by Applied Biosystem) を用いた。PCR 増幅した DNA 断片はアガロースゲル電気泳動で分離し、回収精製後、配列の決定に供した。

(5) DNA 配列決定とメチル化状況の解析

塩基配列決定は外部委託で行った (Operon DNA シーケンス受託サービス)。オリジナルの配列での C の部分に注目し、その塩基部分の波形がどのようにバイサルファイト処理で変化したかを目視で解析した。各 C について

メチル体 (CM) かフリー体 (CF) か、さらにはこれらの混合物か、その大まかな割合によって以下の5つ (A~E) にさらに細分類した (A, CM only; B, CM>CF; C, CM=CF; D, CM<CF; E, CF only)。

(6) *AvABCG1* と *AvSAMS1* 蛋白質の細胞内局在性と植物内組織局在部位の検討

まず各々の遺伝子断片と S65-T 型 GFP 遺伝子融合遺伝子 (*AvABCG1::GFP*, *AvSAMS1::GFP*) を作成し、植物発現用ベクターの 35S プロモーター下流に挿入した。構築されたプラスミドをタマネギの上皮細胞に particle bombardment により導入し、1-2 日後に細胞内発現を蛍光顕微鏡で観察した。また、組織局在性の確認にはまず両蛋白についてポリクローナルウサギ抗体 (1 次抗体) を作成した。次にメリケンカルカヤと両遺伝子を発現するシロイヌナズナ形質転換株について根部と葉部の切断切片を作成後、スライドガラスに固定し、上記の2種類の抗体と反応させた。目的蛋白質と反応した抗体はさらに2次抗体の Alexa Fluor 488 Goat anti Rabbit IgG (Invitro 社製) と反応させ、可視化した。組織局在性は蛍光顕微鏡で観察した。

(7) 金属イオンの植物内含有量の測定

Al または重金属処理した植物体を地上部と根部に分けてサンプリングし、酸混合液 ($\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{SO}_4$, 1:1, v/v) で 100 分後、原子吸光度計 Z-9000 (HITACHI 社製) で金属含有量を測定した。

(8) 植物内の金属存在部位の同定

Al 処理した植物体の根部や葉部はモーンで、重金属処理した植物体の根は Magnesium GreenTMAM で染色し、蛍光顕微鏡で金属存在部位を観察した。なお、後者の指示薬は Cd, Cu, Pb, Zn 等の金属のどれともキレートし蛍光を発するが、単独の重金属処理であれば、その重金属特有の蛍光と見なせる。

4. 研究成果

(1) *AvSAMS1* と *AvABCG1* 遺伝子発現株の金属ストレス感受性試験や蛋白質局在性試験

まずコントロール株の Col-0 株と両遺伝子のシロイヌナズナ形質転換体を用いて、各種ストレスに対する感受性試験を行った。その結果、形質転換体は Al, Cu, Zn, diamide 等に幅広く耐性を示したことから、両遺伝子はこれらのストレスに広範囲に耐性を付与することが明らかになった (Fig. 1)。また GFP 蛋白質との融合蛋白質を用いて *AvSAMS1* と *AvABCG1* 蛋白質の細胞内局在性を検討した。その結果、前者は細胞質部位に、後者は細胞膜部位に局在していた (結果未提示)。さらに根、葉組織での両蛋白質の局在性を其々の抗体を用いた免疫染色法で検討した。メリケンカルカヤでは両者は、根の皮層、内皮、維管束部分、葉の維管束鞘等に局在するほか、

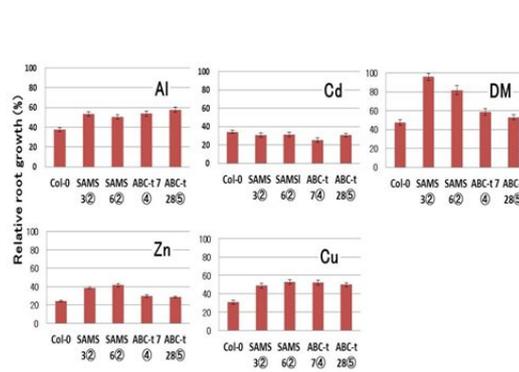


Fig. 1 *AvSAMS1*, *AvABCG1* 発現シロイヌナズナ形質転換体を用いたストレス感受性試験。SAMS3-2, SAMS6-2が*AvSAMS1* 遺伝子導入2系統、ABC-17-4, ABC-128-5が*AvABCG1* 遺伝子導入2系統。Col-0はコントロールの非形質転換株。

前者は根の維管束 (中心部分) にも存在していた (結果未提示)。またシロイヌナズナ形質転換植物では、両者は根の表皮と維管束部位に観察された (結果未提示)。

(2) *AvSAMS1* 遺伝子高発現株を用いた Al ストレス下での遺伝子発現レベルの変化

AvSAMS1 遺伝子発現シロイヌナズナ形質転換株と非形質転換株 (Col-0) を用い、Al 処理下での SAMS を介したエピジェネティックな発現制御の有無をマイクロアレイ (スキャナープロット解析) で確認した。その結果、

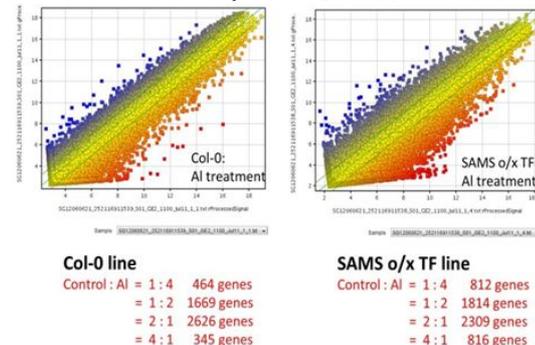


Fig. 2 *AvSAMS1* 遺伝子高発現シロイヌナズナ形質転換体と非形質転換体 (Col-0 株) を用いた Al 処理における遺伝子発現量の網羅的解析結果 (Micro array の結果)

赤、黄、青のスポット群は各々、Al ストレス特異的に誘導、変動なし、抑制された遺伝子の存在を示す。下に表した遺伝子数は、この micro array で 4 倍、2 倍以上誘導された遺伝子数や 1/2 倍、1/4 倍以下に抑制された遺伝子数を算出し、両植物間で比較したものである。

前者では Col-0 株に比べ、Al 処理で強く発現誘導または抑制される遺伝子数とともに 2 倍前後に増加した (Fig. 2 グラフ下の数値を参照のこと)。これらの結果は *AvSAMS1* がゲノム DNA のメチル化を高め (またはメチル化の状態に変化を与え)、エピジェネティック制御に関与することを示唆した。

(3) *AvSAMS1* 遺伝子高発現株を用いた Al ストレス下での DNA メチル化レベルの変化
前記のマイクロアレイの結果で、Al ストレス条件下で Col-0 株より *AvSAMS1* 発現株の方で

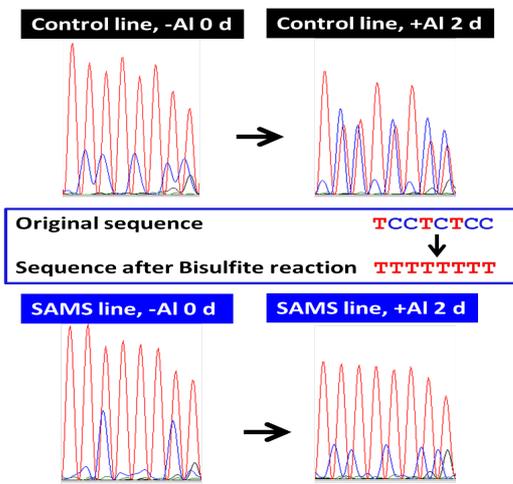


Fig. 3 Bisulfite処理後の塩基配列決定によるDNA上の多彩なメチル化の状況変化の例
At2g34430遺伝子の一部での変化の状況を示している。コントロール株ではAI処理でC残基のメチル化が、急激に進んでいる。一方SAMS株ではAI処理で、C残基毎にメチル化と脱メチル化が起こるのがわかる。

特異的に発現量が大きく変化する（誘導型、抑制型）遺伝子群を各々6個、2個選び出した。これらの遺伝子では特にプロモーター領域やN末端領域においてC位がメチル化されてエピジェネティックな制御を受ける可能性が高いと考えられた。そこでAI処理した形質転換株より、ゲノムDNAを抽出し、AIストレスによってDNAのメチル化状況がどのように変化するのか、バイサルファイト処理後

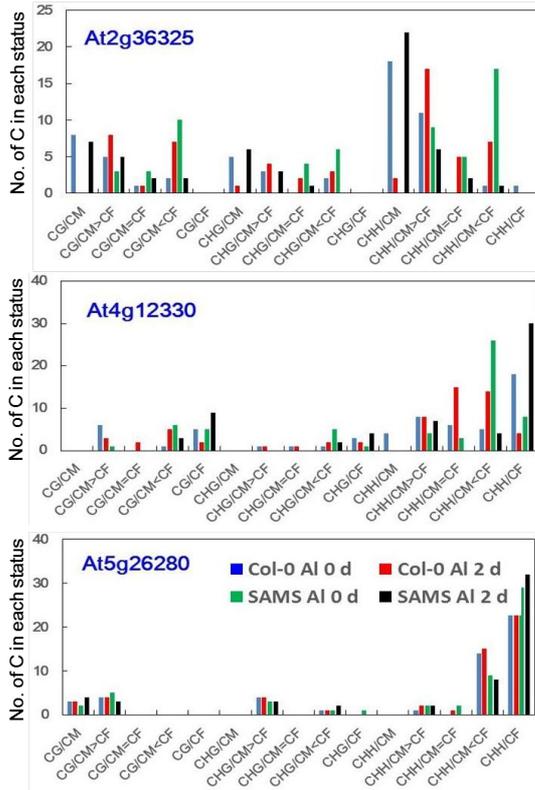


Fig. 4 AI処理後のAvSAMS1遺伝子発現株と非形質転換株(Col-0株)における発現抑制型遺伝子のDNAメチル化の状況。DNAメチル化を起こすCG、CHG、CHH配列において、以下の5つに分類して表した。CM:メチル体(100%)、CM>CF:メチル体の方が非メチル体よりも多いもの、CM<CF:両者が同じ程度、CM<CF:非メチル体の方がメチル体よりも多いもの、CF:非メチル体(100%)。ここには6つの抑制型遺伝子の解析結果の内、3つ(At2g36325, At4g12330, At5g26280)を提示した。

のDNA塩基配列で検討した。また同様の解析をCol-0株でも行った(Fig. 3)。その結果、同じDNA領域でもAvSAMS1発現形質転換株とCol-0株の間でC位毎に波形の違いとして大きな差異を検出することができた。このことはバイサルファイト処理後のDNAの塩基配列決定がDNAのメチル化状態の微細な違いを検出するのに大変有効な手段であることを示している。そこでこの方法を用いてAI処理または未処理のCol-0、AvSAMS1両株由来の上記の8個の遺伝子について部分塩基配列を決定した。さらにその中に存在するCG、CHG、CHHにおけるC位のメチル化の状況をAI処理下または未処理下で比較解析し、5つのカテゴリーに分類した(Fig. 4; 結果の一部を提示)。その結果、AI処理によって両シロイナズナでは誘導型、抑制型のどれでもDNAのメチル化と脱メチル化が起こることが明らかとなった。これらは、AIストレス下ではDNAのメチル化修飾に変化が起こることを示している。このような遺伝子発現の制御機構の存在はAIでは初めて報告である。ところで当初、6個の抑制型遺伝子では、AvSAMS1発現株の方がAI処理でDNAのメチル化が高頻度にかかるのではないかと予想したが、この予想に反するものもあった(Fig. 4 At4g12330遺伝子やAt5g26280遺伝子など)。メチル化と脱メチル化の部位の総数やこれらの修飾の密度等が遺伝子の発現制御には重要な意味を持つかもしれない。

(4) AvABCG1 トランスポーターが関与するAIストレス耐性機構に関する解析

上述のように、この遺伝子を発現する形質転換植物は、AI、Cu、diamide等に耐性を示したことから、また細胞膜局在性を示したことから、このトランスポーターを介して、毒性イオンや脂質過酸化物質等を細胞外に排出することで耐性になる可能性が示唆された。そこで、AIやCu処理したシロイナズナ形質転換体と非形質転換体での地上部への金属移行にこの蛋白質が関与するか否かを原子吸光法で検討した。しかし両株間でAIの移動率には差はなく、Cuでは形質転換体の方が根から移動しにくいという結果になった。さらにAI処理した根の断面切片についてAIの存在部位を特異的な蛍光指示薬であるモーリンで染色し、顕微鏡観察してみると、AvABCG1蛋白質が局在する維管束部位(師部、木部付近)にAIが集積しているのが観察された(Fig. 5)。興味深いことにPbで処理した根でも同じ部位へのPbの集積が見られた(結果未提示)。メリケンカルカヤで同様の実験を行ったが、AvABCG1蛋白質とAIの存在部位はほぼ一致していた。これらのことから、このトランスポーターは根から地上部へのAI移行に関与するのではなく、むしろ根の特定組織への集積に関与していると考えられた。

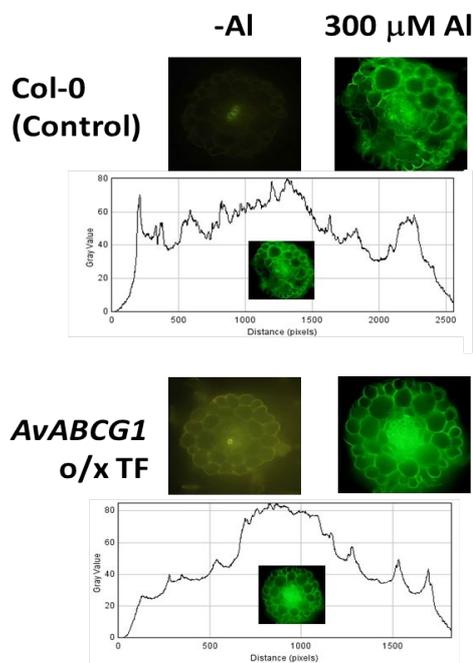


Fig. 5 AvABCG1発現シロイヌナズナ株におけるAlの集積部位の観察
各左側はAl未処理、右側はAl処理した根のモーリン染色後の断面写真。写真下の波形はAl処理した根の蛍光強度をImageJ (NIHよりdownload)でスキャンし、数値化したもの。Col-0ではAlは根全体に均一に存在しているのに対し、AvABCG1株では中心部位に集中している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) B. Ezaki, K. Jayaram, A. Higashi, K. Takahashi, 2013, A combination of five mechanisms confers a high tolerance for aluminum to a wild species of Poaceae, *Andropogon virginicus* L. *Environmental and Experimental Botany* 93: 35–44. 査読有り
- (2) T. Kouno, B. Ezaki, 2013, Multiple regulation of Arabidopsis *AtGST11* gene expression by four transcription factors under abiotic stresses. *Physiologia Plantarum* 148: 97–104. 査読有り
- (3) B. N. Tripathi, V. Singh, B. Ezaki, V. Sharma, J. P. Gaur, 2013, Mechanism of Cu- and Cd-induced proline hyperaccumulation in *Triticum aestivum* (wheat). *J. Plant Growth Regulation*. 12: DOI <http://link.springer.com/journal/344> 10.1007/s00344-013-9343-7. 査読有り
- (4) B. Ezaki, E. Nakahara, 2012. Possible involvement of GDI1 protein, a GDP dissociation inhibitor related to vesicle transport, in an amelioration of zinc toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 29: 17-24. 査読有り

〔学会発表〕(計 12 件)

- (1) Ezaki B., Kouno T. and Yulita K.S, Four transcription factors are related to the multiple response of Arabidopsis *AtGST11* gene under abiotic stress. Sydney, Australia, 24-28, June, 2013
- (2) 江崎文一、稲田真利、東藍子、西村秀希、西内巧 イネ科野生植物メリケンカルカヤ由来の SAMS 遺伝子と ABC transporter 遺伝子の Al ストレス耐性機構における機能

解析 日本土壤肥料学会年会、名古屋、2013年9月11-13日。

(3) 江崎文一、稲田真利、内海かおり イネ科野生植物メリケンカルカヤ由来の SAMS 遺伝子と ABC transporter 遺伝子の Al ストレス耐性機構における機能解析日本植物生理学会 富山 2014年3月18-20日、

(4) 江崎文一、東藍子、Kottapalli, J. イネ科野生植物メリケンカルカヤの高 Al 耐性機構の解析 日本土壤肥料学会年会、鳥取、9月4-7日、2012.

(5) 江崎文一、東藍子、高橋憲公、西内巧、Kottapalli, J. イネ科メリケンカルカヤの Al 耐性機構と耐性関連の SAMS、ABC-transporter 遺伝子の解析 土壤肥料学会関西土壤肥料支部会及び協議会、倉敷、12月6-7日
(6) Ezaki, B., Higashi, A. Characterization of Al tolerance mechanisms in a wild plant, *A. virginicus* L. 10th International Congress on Plant Molecular biology. Jeju, Korea, 21-26 Oct., 2012.

(7) 江崎文一、東藍子、西内巧 イネ科野生植物メリケンカルカヤの Al 耐性の解析と、SAMS 及び ABC transporter 両遺伝子の耐性との関連について 日本植物生理学会年会、岡山、3月21-23日、2013.

(8) 江崎文一・東藍子・Jayaram Kottapalli : イネ科野生植物メリケンカルカヤ (*Andropogon virginicus* L.) の5つの Al ストレス耐性機構 日本土壤肥料学会、筑波、8月8日-10日、2011 .

(9) 河野貴文・西内巧・江崎文一: アラビドプシス *AtGST11* 遺伝子の発現・応答に関わる転写調節因子群の単離と解析. 日本植物細胞分子生物学会年会、福岡、9月6日-8日、2011.

(10) Issiki, R., Tanakamaru, S., Ezaki, B., Nakajima, S. The studies on freezing tolerance of Purimula plants International Symposium on Agricultural Meteorology 2011. Kagoshima Mar.16-18. 2011.

(11) 江崎文一、東藍子 イネ科野生植物メリケンカルカヤの Al 耐性の解析と、SAMS 及び ABC transporter 両遺伝子の耐性との関連について 日本植物生理学会年会、京都、3月16-18日、2012.

(12) 河野貴文、江崎文一 アラビドプシス *AtGST11* 遺伝子の発現・応答に関わる4つの転写調節因子の解析 日本植物生理学会年会、京都、3月16-18日、2012.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/research/pgm-hp.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

江崎 文一 (EZAKI BUNICHI)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：90243500

(2)研究分担者

園田 昌司 (SONODA SYOUJI)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：00325127

(平成23～24年度で役割分担の仕事を終了)

(3)連携研究者

なし